

**Arlei Marcili**

***Trypanosoma cruzi*: Diversidade, relações filogenéticas e  
padrões ecogeográficos de isolados silvestres**

**Tese apresentada ao Instituto de  
Ciências Biomédicas da Universidade de  
São Paulo, para a obtenção do Título de  
Doutor em Ciências.**

**Área de concentração:  
Biologia da Relação Parasita-Hospedeiro**

**Orientador:  
Profa. Dra. Marta Maria Geraldês Teixeira**

**São Paulo  
2008**

## RESUMO

Marcili A. *Trypanosoma cruzi*: diversidade, relações filogenéticas e padrões ecogeográficos de isolados silvestres [Tese]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2008.

*T. cruzi* compreende populações com características fenotípicas e genotípicas extremamente heterogêneas classificadas nas linhagens *T. cruzi* I (TCI) e *T. cruzi* II (TCIIa-e). A história evolutiva de *T. cruzi* está relacionada a uma longa associação com seus hospedeiros. Estudos filogenéticos e ecobiológicos sugerem que os ecótopos, hospedeiros mamíferos e vetores são fatores determinantes das linhagens de *T. cruzi*. Contrastando com o ciclo domiciliar, muito pouco se conhece sobre os isolados do ciclo silvestre e associação com hospedeiros e origem geográfica. O conhecimento sobre a complexidade das populações de *T. cruzi* e suas dinâmicas de transmissão é essencial para compreender a história evolutiva de *T. cruzi* e avaliar o risco de emergência das linhagens silvestres como agentes importantes de infecção humana. Neste estudo foram caracterizados um grande número de isolados brasileiros de *T. cruzi* provenientes de mamíferos silvestres e vetores de diversas origens geográficas, além de isolados humanos provenientes da região Amazônica. Análises filogenéticas baseadas em seqüências de SSU rDNA e Citocromo b (Cytb) foram inferidas para avaliar as relações entre as linhagens e para verificar padrões biogeográficos. O polimorfismo intraespecífico foi detectado através do ITS1 rDNA e padrões de RAPD. Os resultados forneceram evidências filogenéticas e biogeográficas que TCI e TCIIa circulam em primatas não-humanos na Amazônia brasileira e são transmitidos por triatomíneos do gênero *Rhodnius* spp no ecótopo arbóreo. A linhagem TCI é mais prevalente que TCIIa em primatas silvestres. Todas as análises claramente separam TCIIa e ainda revelou uma baixa heterogeneidade intraespecífica dos isolados brasileiros. Na Amazônia muitos casos autóctones da Doença de Chagas estão associados a TCI, com as manifestações clínicas que vão desde febre até falência cardíaca com casos fatais. Estes achados, com diversos casos agudos e crônicos com cardiomiopatia em países da região central e nordeste da América do Sul onde TCI é o único ou o mais prevalente nos casos humanos, indicando que esta linhagem pode ser responsável por casos severos sem megasíndromes (anexo 1). Foi ainda caracterizado um isolado de *T. cruzi* proveniente de uma biópsia cardíaca de um paciente com estágio final de falência cardíaca, de uma região rural do nordeste brasileiro, que tipada como TCI (anexo 2). Foi ainda possível verificar que *T. rangeli* é mais prevalente que *T. cruzi* nos primatas amazônicos. Esta espécie pode infectar o homem e é transmitida por *Rhodnius* spp. estando presente no ecótopo arbóreo como TCI e TCIIa. (anexo3). A diversidade genética e os padrões filogeográficos e biogeográficos das espécies do subgênero *Schizotrypanum*, gênero *Trypanosoma* (Euglenozoa, Kinetoplastida), que infectam morcegos brasileiros foram avaliados com o exame de amostras de sangue de 1043 morcegos, 63 espécies de sete famílias,

capturados na Amazônia, Pantanal, Cerrado e Mata Atlântica. A prevalência dos tripanossomas que infectam morcegos foi estimada por hemocultura (12,9%) e resultou em 77 culturas. A maioria das culturas foi morfológicamente caracterizada como *T. cruzi*-like e identificadas por marcadores moleculares como *T. cruzi* (14), *T. c. marinkellei* (38) e *T. dionisii* (25). Análises filogenéticas baseadas na região V7-V8 do gene SSU rDNA demonstraram que os isolados obtidos formam um grupo monofilético que compreende apenas espécies do subgênero *Schizotrypanum*. Os isolados desse subgênero foram segregados em três clados correspondentes as três espécies de tripanossomas identificadas nos morcegos. As diferentes espécies de tripanossomas puderam ser associadas com distintos padrões biogeográficos e filogeográficos (anexo 4). Isolados de *T. cruzi* de morcegos amazônicos foram tipados como TCI, os isolados provenientes de outras regiões foram genotipadas como TCIIb, formando uma nova linhagem em todas as análises filogenéticas, esta linhagem foi designada de TCbat. Tipagem baseada no ITS1 rDNA foi capaz de distinguir TCbat de todas as outras linhagens e ainda das demais espécies de *Schizotrypanum*. TCbat apresentou baixas parasitemia e virulência em camundongos e apresenta distintos padrões morfológicos e comportamento em triatomíneos (anexo 5). Além disso, nós identificamos dois isolados de *T. rangeli* em morcegos capturados na região Central do Brasil. A genotipagem baseada no gene de mini-exon classificou um isolado como pertencente a linhagem A e o outro a uma nova linhagem E de *T. rangeli*. Os dois isolados de *T. rangeli* isolados e caracterizados molecularmente nesse estudo são os primeiros de morcego e também os primeiros confirmados dessa espécie do Brasil Central. (anexo 6). Foram caracterizados isolados de *T. cruzi* da linhagem TCIIc provenientes de mamíferos e de triatomíneos capturados do Norte a Sul do Brasil confirmando a ampla distribuição geográfica desta linhagem. Análises filogenéticas inferidas com a utilização de seqüências dos genes de citocromo b e SSU rDNA separaram claramente TCIIc de TCIIa de acordo, respectivamente, com os ecótipos terrestre e arbóreo de seus hospedeiros mamíferos e vetores preferenciais. Normalmente indistinguíveis pelos métodos tradicionais de genotipagem, nossos dados demonstram que TCIIc, TCIIa da América do Sul (TCIIa SA) e TCIIa da América do Norte (TCIIa NA) correspondem a três linhagens independentes, que circulam em distintos hospedeiros e nichos ecológicos. Triatomíneos terrestres dos gêneros *Panstrongylus* e *Triatoma* foram confirmados como vetores da linhagem TCIIc. Seqüências de ITS1 rDNA agruparam os isolados TCIIc de acordo com a origem geográfica independente do seu hospedeiro de origem (anexo 7). TCIIc foi encontrado em *Triatoma rubrovaria*, espécie de triatomíneo envolvida em processo de domiciliação. Camundongos infectados com estes isolados apresentaram significativa virulência e taxas de infecção. Esta é a primeira descrição de TCIIc no ciclo silvestre no sul do Brasil (anexo 8). Assim, tais resultados indicam que a complexidade de *T. cruzi* é maior do que a atualmente conhecida e que análises filogenéticas são necessárias para o entendimento da história

evolutiva das linhagens e suas associações com o hospedeiro mamífero, vectores e ecótopo. Este estudo mostrou que as relações entre linhagens de *T. cruzi* estão longe de serem compreendidas. Uma análise mais aprofundada de novos locos polimórficos e a inclusão de mais isolados de vários hospederios e origens geográficas poderão ajudar a resolver a filogenia do *Trypanosoma cruzi*.

**Palavras-chave:** *Trypanosoma cruzi*; Linhagens; Filogenia; Mamíferos silvestres; triatomíneos; ecotopos.

## ABSTRACT

Marcili A. *Trypanosoma cruzi*: diversity, phylogenetics analysis and ecogeographic patterns of wild isolates [Thesis]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2008.

*T. cruzi* comprises highly phenotypic and genotypic heterogeneous populations classified as *T. cruzi* I (TCI) and *T. cruzi* II (TCIIa-e) lineages. It has been hypothesized that the evolutionary history of *T. cruzi* might be correlated with a long-standing association with its hosts. Ecobiological and phylogenetic analyses have suggested that ecotopes, mammalian hosts and vectors may be determining factors of *T. cruzi* lineages. However, in contrast to domestic cycles, data about sylvatic lineages are too limited, hampering to explore possible host and geographic associations. Unravelling the complexity of *T. cruzi* populations and the dynamics of transmission cycles is essential to understand the evolutionary history of *T. cruzi*, and to evaluate the risk of emergence of sylvatic lineages as important agents of human infections. With these purposes, in this study we characterized a large numbers of Brazilian *T. cruzi* isolates from wild mammals and vectors from a wide range of hosts and geographical origins, besides isolates from humans living in Amazonia. Phylogenetic analyses based on sequences of SSU rDNA and Cyb genes were inferred to understand the relationships among the lineages and to evaluate biogeographical patterns. Intralinear polymorphisms were evaluated by ITS1 rDNA and RAPD patterns. Our results provide phylogenetic and biogeographic evidence that TCI and TCIIa circulate among non-human primates in Brazilian Amazonia, and are transmitted by *Rhodnius* spp. in overlapping arboreal cycles. TCI is more prevalent than TCIIa in wild primates, *Rhodnius* spp., and humans with Chagas disease associated with oral transmission. All analysis clearly separated TCIIa from other lineages and revealed small intralinear polymorphisms of Amazonian isolates. In Amazonia, where most cases of autochthonous Chagas disease are associated with TCI, clinical manifestations ranged from fever to severe heart failure and included a growing number of fatal cases. These findings, along with several cases of acute and chronic cardiomyopathy in countries from Central and Northwest South America where TCI is the only or the most prevalent lineage infecting humans, indicate that this lineage may be responsible for severe disease without megasyndromes (anexo 1). We also characterized a *T. cruzi* isolate nested in endomyocardial biopsies of a chronic chagasic patient at end stage heart failure, from a rural village of Northwest Brazil, that was assigned to TCI (anexo 2). We also showed that *T. rangeli* is more prevalent in Amazonian monkeys than *T. cruzi*. This species and can infect humans in Amazonia and is transmitted by *Rhodnius* spp. in an arboreal transmission cycle that overlapped that of TCI and TCIIa (anexo 3). The subgenus *Schizotrypanum* comprises trypanosomes restricted to bats and *T. cruzi*, the only species of this taxon proven as pathogenic and

infective for mammalian orders besides Chiroptera. The lack of reliable taxonomy and the few isolates included in phylogenetic studies have prevented a real appreciation of the diversity and evolutionary history of bat trypanosomes. With these purposes, we carried out a large survey of trypanosomes in bats captured in the Brazilian biomes of Amazonia, the Pantanal, Cerrado and the Atlantic Forest. The diversity, phylogenetic relationships, and biogeographical patterns of bat trypanosomes were evaluated by examining 1043 bats (63 species from 7 families). The prevalence of infected bats was 12.9% and it was obtained 77 cultures of *T. cruzi* (14), *T. c. marinkellei* (38) and *T. dionisii* (25). All analyses revealed distinct patterns for each species, which was identified using a method developed in this study, and associated with morphology and behaviour in mice and triatomines. *T. dionisii* (32.4%) infected 12 species from 4 bat families captured in all biomes. *T. c. marinkellei* (49.3%) was restricted to Phyllostomidae from Amazonia and the Pantanal. *T. cruzi* (18.2%) was mainly from Vespertilionidae and Phyllostomidae from the Pantanal/Cerrado and the Atlantic Forest (anexo 4). *T. cruzi* isolates from Amazonian bats were assigned to TCI, whereas those from the other regions, genotyped as TCIIb, formed a new lineage in all phylogenetic analyses, and was designated TCbat. Genotyping using ITS1 rDNA distinguished TCbat from other lineages and also from other *Schizotrypanum* species. TCbat lacked virulence and yielded low parasitemias in mice, and showed distinctive morphological features and behaviour in triatomines (anexo 5). Moreover, we identified two isolates of *T. rangeli* from bats captured in Central Brazil. Genotyping based on spliced-leader gene classified one isolate into the lineage A and the other as the new lineage E of *T. rangeli*. To our knowledge, these isolates are the earliest *T. rangeli* from bats and from Central Brazil molecularly characterized (anexo 6). We also characterized isolates of *T. cruzi* lineage TCIIc from armadillos, terrestrial didelphids and rodents, and domestic dogs. Besides confirming distribution of this lineage from Northern to Southern Brazil, our analyses separated TCIIc from TCIIa accordingly, respectively, to terrestrial and arboreal ecotopes of mammalian hosts and vectors. Despite indistinguishable by traditional genotyping we showed that TCIIc and TCIIa from South and North Americas (generically Z3) correspond to independent lineages that circulate in distinct hosts and ecotopes. Terrestrial *Panstrongylus* and *Triatoma* were confirmed as vectors of TCIIc. Sequences of ITS1 rDNA clustered TCIIc isolates according to geographic origin independent of their host origin (anexo 7). TCIIc was found in *Triatoma rubrovaria*, a species involved in domiciliation process. Mice infected with these isolates showed significant virulence and mortality rates. This is the first description of TCIIc in the sylvatic cycle in Southern Brazil (anexo 8). Taken together, our findings indicate that the complexity of *T. cruzi* is larger than currently known, and that phylogenetic analysis are required to understand the evolutionary history of lineages and their association with mammals, vectors and ecotopes. This study showed that relationships among lineages of *T. cruzi* are

far from understood. Further analysis of new polymorphic loci and inclusion of more isolates from several host and geographic origin may help to resolve the phylogeny of *T. cruzi*.

**Keywords:** *Trypanosoma cruzi*; Lineages; Phylogeny; Wild mammals; Triatomines; Ecotopes.

## 1 INTRODUÇÃO



### 1.1 O gênero *Trypanosoma*

O gênero *Trypanosoma* pertence à Família Trypanosomatidae, que compreende protozoários flagelados pertencentes à ordem Kinetoplastida (Honigberg, 1963). Os cinetoplastídeos juntamente com os euglenóides (ordem Euglenida) formam o filo Euglenozoa (Cavalier-Smith, 1981, 1993). Os organismos da ordem Kinetoplastida estão divididos em duas subordens: a) Bodonina, que compreende parasita e espécie de vida livre; b) Trypanosomatina, que apresenta apenas a família Trypanosomatidae, cujos membros são todos parasitas.

A família Trypanosomatidae compreende parasita de invertebrados, plantas e todas as ordens de vertebrados, divididos em 8 gêneros. Destes, 6 compreendem parasitas monoxênicos de insetos (gêneros *Leptomonas*, *Herpetomonas*, *Crithidia* *Blastocrithidia*), heteroxênicos de insetos e plantas (gênero *Phytomonas*), heteroxênicos de hospedeiros invertebrados e vertebrados (gêneros *Leishmania*, *Endotrypanum* e *Trypanosoma*) (Wallace, 1966; 1979; Vickerman, 1976; Camargo, 1998). Dois gêneros de espécies monoxênicas foram propostos recentemente *Wallaceina* e *Sergeia* (Svobodova *et al.*, 2007; Podlipaev, 2001).

Os gêneros *Crithidia*, *Blastocrithidia*, *Leptomonas* e *Herpetomonas* são polifiléticos e necessitam de revisões taxonômicas. Apenas *Phytomonas* se revelou um gênero válido nas filogenias moleculares (Hollar e Maslov 1997; Merzlyac *et al.* 2001; Hughes e Piontkivska 2003; Piontkivska e Hughes 2005). O gênero *Endotrypanum* apresenta espécies exclusivas de preguiças encontradas no Brasil, Colômbia, Guiana Francesa e América Central que, assim como as espécies de *Leishmania*, são transmitidas por flebotomíneos. Preguiça, tamanduá, tatu, roedores e marsupiais são reservatórios de *Leishmania*, com várias espécies infectantes para o homem (Shaw, 1985).

O gênero *Trypanosoma* é constituído por espécies que infectam vertebrados de todas as ordens (peixes, anfíbios, répteis, aves e mamíferos), transmitidas por vários invertebrados hematófagos. As espécies de tripanossomas podem se apresentar sob as formas amastigota, epimastigota, tripomastigota e, raramente, promastigota em seus ciclos de vida. Estas formas são definidas em função da posição do cinetoplasto em relação ao núcleo e da presença ou não de flagelo livre e membrana ondulante (Hoare, 1972; Wallace, 1979; Vickerman, 1994).

Centenas de espécies de tripanossomas foram descritas em mamíferos, com mais de uma espécie podendo infectar o mesmo hospedeiro, muitas vezes em infecções mistas. Apenas *T. brucei gambiense* e *T. b. rhodesiense* na África e *T. cruzi* e *T. rangeli* nas Américas infectam o homem. Com

exceção de *T. rangeli*, essas espécies são consideradas patogênicas para o homem. Estes tripanossomas não estão restritos a infecções humanas e se mantêm na natureza no ciclo silvestre, infectando diversas ordens de mamíferos (antropozoonoses). A maioria das espécies de tripanossomas circula apenas no ciclo silvestre (zoonoses) e não é patogênica para seus hospedeiros. A maior parte das espécies se desenvolve em artrópodes hematófagos, que podem pertencer a diversas ordens e famílias, enquanto os parasitas de anfíbios e peixes são transmitidos por sanguessugas e insetos (Hoare, 1972; Simpson *et al.*, 2006; Hamilton *et al.*, 2007).

Os tripanossomas de mamíferos foram classificados em subgêneros e espécies com base em parâmetros taxonômicos clássicos: morfologia (principalmente das formas tripomastigotas sanguíneas) e ciclos de vida nos hospedeiros vertebrados e invertebrados (formas e locais de reprodução e de diferenciação). As formas sanguíneas ingeridas pelos hospedeiros invertebrados sofrem inúmeras alterações morfológicas e bioquímicas, além de estágios de replicação e diferenciação em formas infectantes para o hospedeiro vertebrado (tripomastigotas metacíclicas). O local de desenvolvimento e diferenciação das formas infectantes nos invertebrados determina a via de transmissão dos tripanossomas, que pode ser o tubo digestivo ou as glândulas salivares (Hoare, 1972). A maioria dos tripanossomas utiliza apenas uma destas vias de transmissão, exceto *T. rangeli*, que apresenta formas metacíclicas nas glândulas salivares (principal mecanismo) e, aparentemente, também no tubo digestivo (D'Alessandro, 1999).

De acordo com o desenvolvimento no hospedeiro invertebrado e, conseqüentemente, com a via de eliminação das formas infectantes pelo vetor, o gênero *Trypanosoma* foi dividido por Hoare (1964) nas Secções Stercoraria e Salivaria. A Secção Salivaria compreende as espécies que no inseto vetor (mosca tsétsé), se desenvolvem no tubo digestivo e glândulas salivares (exceto *T. vivax*), sendo transmitidas com a inoculação, durante a picada do vetor, de formas tripomastigotas metacíclicas presentes nas glândulas salivares. Esta Secção compreende os subgêneros *Duttonella*, *Trypanozoon*, *Pycnomonas* e *Nannomonas*, que abrangem todos os tripanossomas Africanos patogênicos para mamíferos. *T. vivax* (*Duttonella*), *T. evansi* e *T. equiperdum* (*Trypanozoon*) se adaptaram à transmissão mecânica e, por esta razão, são as únicas espécies deste grupo que ocorrem fora do continente Africano, inclusive nas Américas (Hoare, 1972; Ventura *et al.*, 2001; Cortez *et al.*, 2006).

Na Secção Stercoraria, que compreende os subgêneros *Schizotrypanum* (espécie-tipo *T. cruzi*), *Herpetosoma* (*T. lewisi*) e *Megatrypanum* (*T. theileri*) (Hoare, 1964, 1972), estão classificadas as espécies que se desenvolvem exclusivamente no tubo digestivo do inseto vetor, sendo

transmitidas pela contaminação com formas tripomastigotas metacíclicas eliminadas com as fezes dos vetores. Os tripanossomas desta Secção apresentam ampla distribuição geográfica. Entretanto, algumas espécies como *T. cruzi* (*Schizotrypanum*) e *T. rangeli* (*Herpetosoma*) são encontradas apenas nas Américas Central e do Sul (Hoare, 1972; Guhl e Vallejo, 2003). A maioria de espécies desta Secção não infecta o homem e não é patogênica para seus hospedeiros vertebrados, com exceção de *T. cruzi*.

## 1.2 Filogenia e evolução dos tripanossomas

O filo Euglenozoa é um dos maiores grupos de eucariotos, compreendendo flagelados com grande diversidade morfológica, genética e ecológica. Os membros desse filo apresentam múltiplos estilos de vida, incluindo organismos de vida-livre e parasitas de todas as classes de vertebrados, de invertebrados e de plantas. Esse filo contém espécies fotossintéticas autotróficas, como *E. gracilis*, espécies heterotróficas de vida livre como *Bodo saltans* e parasitas obrigatórios, como as espécies de *Trypanosoma* (Busse e Preisfeld, 2003; von der Heyden *et al.*, 2004; Simpson *et al.*, 2004, 2006).

Os membros da ordem Kinetoplastida apresentam uma única mitocôndria que contém uma região rica em DNA (kDNA) denominada cinetoplasto, constituída por moléculas dupla-fita circulares, minicírculos e maxicírculos, concatenados em uma única rede. Aparentemente, estes organismos divergiram dos demais eucariotos logo que o ancestral desta linhagem incorporou bactérias aeróbicas simbiotes que deram origem às mitocôndrias. As reconstruções filogenéticas sugerem que a origem evolutiva da rede concatenada de kDNA, que gerou o cinetoplasto, ocorreu no ancestral da família Trypanosomatidae, uma vez que os minicírculos dos bodonídeos não são concatenados (Simpson *et al.*, 2000, 2002; Lukes *et al.*, 2002).

Dentre os fenômenos funcionais mais característicos dos cinetoplastídeos, os mecanismos mais interessantes do ponto de vista evolutivo são os mecanismos de variação antigênica, "trans-splicing" e edição. Os mecanismos de ativação e regulação da expressão gênica ainda são pouco conhecidos nestes organismos. Ao contrário dos eucariotos em geral, os principais mecanismos de regulação da expressão gênica ocorreram após a transcrição, por processamento de moléculas de RNA por "trans-splicing" e edição (Vickerman, 1994; Simpson *et al.*, 2000, 2003; Uliel *et al.*, 2004; Siegel *et al.*, 2005; Jäger *et al.*, 2007; Helm *et al.*, 2008).

Os maxicírculos correspondem ao DNA mitocondrial dos eucariotos, codificando as proteínas necessárias para a atividade mitocondrial. Entretanto, a expressão dos genes codificadores das proteínas de maxicírculos é bastante complexa, sendo os RNAs transcritos dependentes de um processamento denominado edição de RNA (RNA editing). Este mecanismo é responsável pela formação de mRNAs mitocondriais com códons de iniciação e de terminação corretos e com fases abertas de leitura (Landweber e Gilbert, 1994; Simpson *et al.*, 2000, 2002; Lukes *et al.*, 2002; Worthey *et al.*, 2003; Roy *et al.*, 2007)

Devido à ausência de introns, os transcritos nos tripanossomatídeos são policistrônicos e os mRNAs unitários são gerados após processamento por "trans-splicing". Nesse processo pós-transcricional o mRNA é processado resultando na adição de uma seqüência com 39 nucleotídeos denominada "spliced-leader" ou mini-exon, na extremidade 5' de praticamente todos os mRNAs maduros dos Kinetoplastida (Agabian, 1990; Campbell *et al.*, 2000; Helm *et al.*, 2008). A maioria dos mRNAs dos tripanossomatídeos é processada por trans-splicing, porém, o processamento por "cis-splicing" foi identificado em alguns genes (Mair *et al.*, 2000; Palfi *et al.*, 2002).

Os tripanossomatídeos apresentam diversas peculiaridades de grande interesse filogenético e evolutivo, tais como: a presença e estrutura do cinetoplasto; a composição do citoesqueleto; o isolamento das enzimas glicolíticas nos glicossomas; proteínas de membrana ancorada por GPI; a endocitose e exocitose de macromoléculas via bolso flagelar, um nucleotídeo não usual denominado base J em seu DNA nuclear; a ausência de condensação cromossômica durante a mitose, variação antigênica; transcrição policistrônicas; o mecanismo de processamento de mRNAs por "trans-splicing"; edição de RNA mitocondrial; etc. O aparato nuclear destes flagelados apresenta uma série de características, incluindo a ausência de condensação da cromatina durante a mitose e a persistência da membrana nuclear durante a divisão celular (Vickerman, 1994; Dooijes *et al.*, 2000; Gull, 2001; Simpson *et al.*, 2003; Stuart *et al.*, 2005).

Os organismos do filo Euglenozoa na árvore filogenética universal tem sido posicionados em um grande táxon denominado Excavata. Esse posicionamento sugere que estes organismos estejam entre os primeiros eucariotos a divergir, provavelmente, logo após a separação da linhagem procariótica. A monofilia do filo Euglenozoa foi estabelecida por autapomorfias morfológicas e moleculares. Entretanto, a posição deste filo em relação aos outros protozoários, e as relações filogenéticas entre os principais grupos, são ainda bastante controversa. Recentemente, com o avanço do conhecimento sobre o filo Euglenozoa, especialmente das espécies de vida livre, e com

base em informações geradas em análises filogenéticas moleculares, esses organismos foram divididos em três classes: Kinetoplastida, Diplonemida e Euglenida (Preisfeld *et al.*, 2001; Moreira *et al.* 2001; Busse e Preisfeld, 2002, 2003). A hipótese mais apoiada é a de que os cinetoplastídeos são mais relacionados com os diplonemídeos do que com os euglenóides e os tripanossomatídeos, que formam um grupo monofilético que divergiu dos bodonídeos de vida livre (Moreira *et al.* 2004; Simpson e Roger 2004; Simpson *et al.*, 2006).

Análises filogenéticas, especialmente os mais recentes que incluíram um grande número de espécies de diversas classes do filo Euglenozoa, apóiam a hipótese de que os cinetoplastídeos são filogeneticamente mais próximos dos diplonemídeos do que dos euglenóides e que os tripanossomatídeos formam um grupo monofilético que evoluiu dos bodonídeos de vida livre. Entretanto, como as hipóteses são fundamentadas em reconstruções baseadas em filogenia molecular, diferentes histórias evolutivas têm sido propostas para os cinetoplastídeos, dependendo dos taxa, dos grupos externos utilizados, dos genes e seqüências analisadas e dos métodos utilizados para as inferências filogenéticas (Lukes *et al.*, 2002; Stevens e Rambault, 2001; Busse e Preisfeld, 2002; 2003; Hughes e Piontkivska, 2003a, b; von der Heyden *et al.*, 2004; Simpson e Roger, 2004; Hamilton *et al.*, 2004; Simpson *et al.*, 2006; Breglia *et al.*, 2007; Makiuchi *et al.*, 2008).

Algumas hipóteses tentam explicar a origem do parasitismo dos tripanossomatídeos. Estes flagelados podem ter parasitado inicialmente invertebrados que, a partir do surgimento da hematofagia, transmitiram seus parasitas para vertebrados, ou podem ter se originado em vertebrados e, destes, passaram a infectar invertebrados hematófagos. De acordo com os estudos filogenéticos, o parasitismo, a adoção de determinados hospedeiros invertebrados e vertebrados e o surgimento dos ciclos heteroxênicos ocorreram, independentemente, várias vezes ao longo da evolução dos tripanossomatídeos (Vickerman, 1994; Maslov e Simpson, 1995; Haag *et al.*, 1998; Wrigth *et al.*, 1999; Dolezel *et al.*, 2000; Stevens *et al.*, 1998, 2001; Lukes *et al.*, 2002; Hamilton *et al.*, 2007).

Estudos iniciais baseados em seqüências de SSUrRNA sugeriram que o gênero *Trypanosoma* era polifilético (Maslov *et al.*, 1996). Estudos posteriores com um número maior de taxa confirmaram a monofilia deste gênero (Haag *et al.*, 1998; Stevens *et al.*, 1999b; 2001). Embora um estudo baseado neste mesmo gene utilizando diferentes “outgroups” e análises filogenéticas tenha sugerido a polifilia do gênero *Trypanosoma* (Hughes e Piontkivska, 2003b), os mesmos autores concluíram depois que a monofilia é a hipótese mais provável (Piontkivska e Hughes, 2005).

Portanto, atualmente a hipótese mais apoiada tem sido a origem monofilética dos organismos do gênero *Trypanosoma*, com um ancestral comum para todas as espécies de mamíferos, aves, répteis, anfíbios e peixes (Hollar e Maslov, 1997; Wrigth *et al.*, 1999; Haag *et al.*, 1998; Stevens *et al.*, 1998, 1999b, 2001; Lukes *et al.*, 2002; Simpson *et al.*, 2002; Hamilton *et al.*, 2004). Nas árvores filogenéticas mais recentes (Hamilton *et al.*, 2004, 2005b, 2007; Simpson *et al.*, 2006) foram definidos três grandes clados: *T. brucei*, *T. cruzi* e clado aquático (tripanosomas de peixes e anfíbios). Clados menores foram também bem estabelecidos para outras espécies: *T. lewisi* (roedores) *T. theileri* (artiodátilos), *T. avium/T. corvi* (aves), tripanosomas de lagartos e cobras (Stevens *et al.*, 2001; Rodrigues *et al.*, 2003, 2006; Hamilton *et al.*, 2005a, 2007; Ferreira *et al.*, 2008; Viola *et al.*, 2008a,b).

No clado *T. brucei* foram posicionados os tripanosomas de origem africana, que divergem dos demais sugerindo uma história evolutiva separada, confinada à África e associada com moscas tsetsé. A divergência entre *T. cruzi* e *T. brucei* foi estimada em ~ 100 milhões de anos, com a separação da África e América do Sul (Stevens *et al.*, 1999, 2001; Simpson *et al.*, 2006).

O clado *T. cruzi* é constituído pelas espécies do subgênero *Schizotrypanum*, *T. cruzi* e tripanosomas exclusivos de morcegos do novo e velho mundos, além de um tripanosoma isolado de canguru na Austrália. *T. rangeli* e espécies denominadas *T. rangeli-like* formaram o clado *T. rangeli*, mais relacionado com o clado *T. cruzi* do que com outros clados (Stevens *et al.*, 1999b, 2001; Briones *et al.*, 1999; Hamilton *et al.*, 2004; 2007; Maia da Silva *et al.*, 2004b, 2007) (figura 1)

*T. cruzi* compartilha hospedeiros mamíferos com diversas espécies de tripanosomas. Entretanto, as mais importantes na América do Sul são *T. rangeli* e outras espécies do subgênero *Schizotrypanum* (exclusivas de morcegos). Essas espécies são comumente isoladas em tentativas de isolamento em cultura de *T. cruzi* e podem ser confundidas. Além disso, *T. rangeli* e algumas espécies de *Schizotrypanum* também compartilham vetores com *T. cruzi*. Portanto, estudos sobre *T. cruzi* em seus hospedeiros vertebrados e invertebrados silvestres geralmente revelam infecções com essas espécies, muitas vezes como infecções mistas, exigindo o diagnóstico diferencial entre essas espécies. Conhecer e comparar as espécies que compartilham hospedeiros e que são as mais filogeneticamente relacionadas é fundamental para entender a história evolutiva do *T. cruzi*.



### 1.3 *Trypanosoma rangeli*

*T. rangeli* infecta humanos e animais domésticos e silvestres ocorrendo da América Central ao sul da América do Sul compartilhando com *T. cruzi* a capacidade de infectar mamíferos de praticamente todas as ordens, parasitando primatas, inclusive o homem, roedores, marsupiais e edentados (D'Alessandro e Saravia, 1999; Guhl e Vallejo, 2003; Maia da Silva *et al.*, 2007). As infecções humanas causadas por *T. rangeli* são comuns na América Central, Colômbia e Venezuela, onde acarretam sérios problemas para o diagnóstico de *T. cruzi* (Guhl e Vallejo, 2003). No Brasil, *T. rangeli* foi descrito em diferentes mamíferos e triatomíneos (especialmente do gênero *Rhodnius*), principalmente na Amazônia, onde foram descritos os únicos casos humanos (Miles *et al.*, 1983; Coura *et al.*, 1996; Maia da Silva *et al.* 2004a,b, 2007).

Ao contrário de *T. cruzi*, *T. rangeli* não é patogênico para mamíferos, mas sim para o inseto vetor, gerando dificuldades no repasto sanguíneo e na ecdise. Muitas vezes letal para esses insetos. *T. cruzi* tem todo seu desenvolvimento restrito ao tubo digestivo, enquanto *T. rangeli* multiplica-se no tubo digestivo e completa seu desenvolvimento (processo de metaciclogênese) nas glândulas salivares do inseto vetor. Infecções naturais de *T. rangeli* em triatomíneos parecem estar restritas as glândulas salivares e sua transmissão se dá por inoculação durante o repasto sanguíneo de triatomíneos do gênero *Rhodnius* (Añez, 1984; Guhl e Vallejo, 2003).

O subgênero *Herpetosoma*, como tradicionalmente definido, compreende tripanossomas que não são patogênicos para seus hospedeiros mamíferos, divididos em dois grupos: *T. lewisi* (parasitas principalmente de roedores) e *T. rangeli* (Hoare, 1972). Análises filogenéticas baseadas nos genes SSU rDNA e gGAPDH indicaram que *T. rangeli* é mais relacionado com *T. cruzi* do que com os tripanossomas africanos, apesar de ser transmitido de forma inoculativa como os membros do clado *T. brucei* (Salivaria) (Stevens *et al.*, 1999, 2001; Maia da Silva *et al.*, 2004b, 2007). Estudos biológicos e moleculares de isolados de *T. rangeli* provenientes de diferentes hospedeiros e origens geográficas revelaram um grupo monofilético bastante relacionado ao subgênero *Schizotrypanum* (Stevens *et al.*, 1999; Maia da Silva *et al.*, 2004b, 2007). Apesar de muito relacionados, diversos marcadores moleculares separam *T. rangeli* de *T. cruzi* (Vallejo *et al.*, 2002, 2003; Urrea *et al.*, 2005; Maia da Silva *et al.*, 2004a,b, 2007).

Trabalhos realizados em nosso laboratório demonstraram com análises baseadas em padrões de RAPD e análises filogenéticas baseadas no gene ribossômico (SSU e ITS) que isolados



de *T. rangeli* de diferentes hospedeiros e regiões geográficas podem ser divididos em pelo menos 4 linhagens (A-D) (Maia da Silva *et al.*, 2004a, b), enquanto estudos anteriores baseados no gene de mini-exon e em padrões de minicírculos de kDNA revelaram apenas dois (Grisard *et al.*, 1999; Vallejo *et al.*, 2003; Urrea *et al.*, 2005). A comparação de seqüências do gene SL de um grande número de isolados de *T. rangeli* confirmou os 4 anteriormente definidos (Maia da Silva *et al.*, 2007).

De acordo com os resultados obtidos em nosso laboratório, a linhagem A é constituída por isolados da Venezuela, Colômbia, Honduras, Guatemala e Brasil (região oriental e ocidental da Amazônia). Esta linhagem foi ainda associada ao complexo *R. prolixus* (*R. robustus* e *R. neglectus*), a humanos, cães, macacos e gambás. A linhagem B contém exclusivamente isolados humanos, de triatomíneos e de macacos da Amazônia brasileira. O grupo C é formado por isolados de *R. pallenscens* da Colômbia e Panamá e isolados humanos da América Central. O isolado SC58 de um roedor da região Sul do Brasil é o único representante da linhagem D. Portanto, *T. rangeli* é composto por linhagens distintas, aparentemente relacionados com as espécies da tribo *Rhodnii* (D'Alessandro e Saravia, 1999; Machado *et al.*, 2001; Guhl e Vallejo, 2003; Vallejo *et al.*, 2003; Maia da Silva *et al.*, 2004b, 2007).

A congruência filogeográfica das linhagens de *T. rangeli* com os complexos das espécies de *Rhodnius* corroborou a hipótese de uma longa associação do parasita com seu vetor. A segregação dos isolados de *T. rangeli* de vetores de distintos complexos sugere que a evolução das linhagens de *T. rangeli* esta relacionada a ciclos de transmissão independentes, provavelmente ligados a ecótopos específicos de seus vetores (Maia da Silva *et al.*, 2007). Enquanto as linhagens de *T. rangeli* não parecem estar associadas com nenhum grupo de vertebrado, as linhagens de *T. cruzi* tem sido associadas com o hospedeiro vertebrado (Gaunt e Miles, 2000; Yeo *et al.*, 2005).

#### 1.4 Subgênero *Schizotrypanum*

Os tripanossomas do subgênero *Schizotrypanum*, exceto *T. cruzi*, foram descritos apenas em quirópteros. Além de *T. cruzi*, *T. cruzi marinkellei*; *T. dionisii*; *T. vespertilionis*; *T. hastatus*; etc. No velho mundo, apenas morcegos abrigam espécies deste subgênero: *T. dionisii* e *T. vespertilionis*. Morcegos têm sido encontrados infectados na África, Europa, Ásia e Américas por tripanossomas dos subgêneros *Herpetosoma*, *Schizotrypanum* e *Megatrypanum*. Mais de 70 espécies de quirópteros

albergam esses flagelados, principalmente Microchiroptera, e os insetívoros são os mais freqüentemente infectados (Hoare, 1972; Marinkelle, 1976; Molyneux, 1991).

A origem evolutiva de *T. cruzi* e de todo o subgênero *Schizotrypanum* tem sido bastante discutida. O posicionamento em árvores filogenéticas de um tripanossoma de canguru (Austrália) próximo do clado contendo *T. cruzi* e outras espécies do subgênero *Schizotrypanum*, sugere que essa espécie descende de um tripanossoma parasita de um ancestral dos marsupiais, existente antes da separação entre América do Sul e Austrália 70-100MYA (Stevens *et al.*, 1999, 2001).

O número de tripanossomas isolados de morcegos caracterizados biológica- e molecularmente é muito pequeno. Estudos filogenéticos sobre tripanossomas de morcegos são escassos e apenas *T. dionisii*, *T. vespertilionis*, *T. sp 60* (isolado na África) e *T. c. marinkellei* foram incluídos em árvores filogenéticas que agruparam os isolados das Américas e Europa com *T. cruzi*, formando o subgênero *Schizotrypanum*. Os isolados de *T. cruzi* formam um clado, mais próximo de *T. c. marinkellei* do que de *T. dionisii* (Stevens *et al.*, 1999, 2001; Hamilton *et al.*, 2007).

Análises filogenéticas sugeriram um cenário evolutivo onde um tripanossoma ancestral, restrito aos quirópteros e existente no Velho Mundo, teria dado origem a *T. cruzi*. Essa hipótese se baseia no fato de que as espécies de *Schizotrypanum* são exclusivas de morcegos e algumas são cosmopolitas, sendo *T. cruzi* a única generalista de mamíferos e restrita a América Latina (Brisse *et al.*, 2003). No entanto, nenhuma das hipóteses, que *T. cruzi* teria evoluído de um tripanossoma restrito a morcegos ou vice-versa, pode ser descartada. A distribuição atual das espécies de *Schizotrypanum* e a capacidade de dispersão dos morcegos por longas distâncias incluindo oceanos torna possível as duas hipóteses (Stevens *et al.*, 1999).

Os representantes do subgênero *Schizotrypanum* formam um grupo homogêneo, sendo as formas encontradas no sangue dos quirópteros praticamente indistinguíveis morfologicamente, todas muito semelhantes a *T. cruzi*. Por este motivo, todas as espécies desse subgênero são denominadas *T. cruzi*-like (Marinkelle, 1976; Molyneux, 1991). Devido à ausência de parâmetros taxonômicos confiáveis, a taxonomia desses tripanossomas sempre foi controversa. Apesar dos avanços de técnicas moleculares de diagnóstico, marcadores moleculares não são utilizados para o diagnóstico de tripanossomas de morcegos.

Levantamentos de tripanossomas em morcegos no Brasil foram realizados na Amazônia (Dias, 1942; Deane, 1961), São Paulo (Barreto, 1968; Funayama e Barretto, 1970a;b; 1973), Ceará (Alencar *et al.*, 1976; Fabian, 1991); Piauí (Pinto e Bento, 1986), Santa Catarina (Steindel *et al.*, 1998)

e Mato Grosso e Pará (Lisboa *et al.*, 2008). No Brasil, já foram descritas mais de 40 espécies de morcegos infectados com tripanossomas e mais de 10 espécies de tripanossomas.

Análises de zimodemas foram utilizadas na identificação de espécies de *Schizotrypanum* isolados de uma mesma espécie (Miles *et al.*, 1978, 1981a,b; Baker e Miles, 1979; Tibayrenc, 2003; Telleria *et al.*, 2004). Lectinas, GIPLs (glicoinositol fosfolipídeos), perfís de polipeptídeos e reatividade com anticorpos monoclonais distinguiram tripanossomas de morcegos (Taylor *et al.*, 1982; Schotellius *et al.*, 1983; Petry *et al.*, 1986, 1987; Barreto-Bergter *et al.*, 1996; Branquinha *et al.*, 1999). A ausência de parâmetros taxonômicos confiáveis, o pequeno número de espécies disponíveis em cultura e os poucos isolados incluídos em estudos filogenéticos impedem o conhecimento da diversidade e da história evolutiva dos tripanossomas de morcegos.

Embora muito relacionado com *T. cruzi*, *T. c. marinkellei* foi confirmado como espécie distinta por características biológicas, bioquímicas (Ebert, 1983; Baker *et al.*, 1978; Tibayrenc e Le Ray, 1984, Telleria *et al.*, 2004), imunológicas (Petry *et al.*, 1986, 1987) e moleculares (Stevens *et al.*, 2001; Barnabé *et al.*, 2003). Apesar de compartilharem muitos antígenos, camundongos imunizados com *T. c. marinkellei* ou outro *T. cruzi*-like não foram protegidos de infecção por *T. cruzi* (Marinkelle, 1982a,b; Nascentes *et al.*, 2008).

Triatomíneos que vivem em buracos de árvores e cavernas, telhados de folhas de palmeiras, tocas de animais silvestres, palmeiras, forros de residências e outros abrigos de morcegos podem ser vetores de *T. cruzi* entre os quirópteros. A maioria dos quirópteros infectados é insetívora, devendo a infecção ocorrer principalmente por via oral após a ingestão dos vetores infectados (Marinkelle, 1976).

Assim como *T. cruzi*, *T. c. marinkellei* é transmitido por triatomíneos, porém parece ser restrito ao gênero *Cavernicola*, cujas espécies vivem geralmente associados com colônias de morcegos em cavernas e palmeiras. *T. cruzi* se desenvolve em triatomíneos de praticamente todos os gêneros e espécies (Hoare, 1972; Marinkelle, 1976; 1982; Molyneux, 1991). As demais espécies que infectam morcegos são transmitidas por cimiécidos, flebotomíneos e carrapatos. Cimiécidos são vetores de *T. dionisii* e *T. vespertilionis*. Infecções experimentais demonstraram o desenvolvimento completo em cimiécidos (Gardner e Molyneux, 1988; Hoare, 1972; Molyneux, 1991).

*T. c. marinkellei* e *T. dionisii* apresentam ciclos de vida semelhantes ao de *T. cruzi*. O desenvolvimento intracelular de *T. dionisii* foi estudado em macrófagos (Baker e Liston, 1978; Liston e Baker, 1978) e em células não fagocíticas (Glauert e Baker, 1982). Este parasita, cuja capacidade de invadir células não fagocíticas é inibida por tratamento dessas com citocalasina e pela

imobilização dos parasitas por aquecimento, invade estas células sem ser interiorizados por pseudópodes, provavelmente, utilizando a mesma estratégia de *T. cruzi* (Baker, 1985) (Baker *et al.*, 1972; Glauert *et al.*, 1982; Baker, 1985; Molyneux, 1991; Mortara *et al.*, 2008).

A infecção e diferenciação *in vitro* também podem ser utilizadas como parâmetro taxonômico. As espécies de *Schizotrypanum* são as únicas descritas até o momento que infectam células de mamíferos e se multiplicam no interior destas como amastigotas. A capacidade de infectar camundongos pode ser utilizada para separar *T. cruzi* das demais espécies desse subgênero. O desenvolvimento desses tripanossomas em vetores (triatomíneos e cimiúdeos) pode ser utilizado para distinguir espécies (Hoare, 1972; Baker, 1985; Molyneux, 1991).

Como as demais espécies de *Schizotrypanum*, exceto *T. cruzi*, *T. dionisii* não infecta o homem, e alguns mecanismos de morte deste parasita foram propostos: morte extracelular de parasitas revestidos por anticorpos, por citotoxicidade mediada por linfócitos, na ausência de complemento (Mkwanzani *et al.*, 1976); destruição no interior dos fagossomas, sendo os neutrófilos mais eficientes que monócitos na fagocitose, que ocorre na presença ou não de anticorpos específicos, e na destruição dos parasitas fagocitados (Thorne *et al.*, 1979, 1981).

O desenvolvimento de *T. dionisii* nos morcegos é semelhante ao de *T. cruzi*, as formas amastigotas desenvolvem-se nos músculos cardíacos, estriados e do estômago (Hoare, 1972). Entretanto, diferente de *T. cruzi* e de *T. c. marinkellei*, *T. dionisii* produz pseudocistos de formas epimastigotas no coração, diafragma, músculos do esterno, na mucosa intestinal e no ovário, além de ninhos de formas amastigotas (Baker *et al.*, 1972; Molyneux, 1991).

Estudos comparativos futuros serão fundamentais para a compreensão das diferenças na relação parasita-hospedeiro entre as espécies de *Schizotrypanum*. Diversos aspectos da biologia destes tripanossomas, como a capacidade de infectar diferentes espécies de mamíferos e vetores são pouco compreendidos. Esse conhecimento é importante para a compreensão da relação parasita-hospedeiro e da evolução de *T. cruzi*.

## 1.5 *Trypanosoma cruzi*

### 1.5.1 Hospedeiros invertebrados – vetores

Os hospedeiros invertebrados e vetores de *T. cruzi* são insetos pertencentes à Ordem Hemiptera, subordem Heteroptera, família Reduviidae, subfamília Triatominae. Todos os triatomíneos são obrigatoriamente hematófagos. A maioria das espécies ocorre nas Américas, com exceção do gênero *Linshcosteus* na Índia e de *T. rubrofasciata* que está distribuído em todas as regiões tropicais. Estudos filogenéticos sugerem que a subfamília Triatominae evoluiu independentemente nas Américas, após a separação dos continentes (Schofield 1988, Schofield e Dolling 1993; Schofield, 2000).

A família Reduviidae é bastante antiga, registros fósseis sugerem que seus ancestrais são hemípteros fitófagos do período Permiano/Triássico (~230 ma). A adaptação a hematofagia é um processo relativamente recente que ocorreu gradativamente. A hipótese mais provável é que a hematofagia obrigatória tenha derivado de hábitos predadores seguidos de hematofagia facultativa (Schofield 1988, Schofield e Dolling 1993; Schofield, 2000).

O Novo Mundo é o centro de diversidade dos triatomíneos e, provavelmente, também o centro de origem (Tartarotti *et al.*, 2006). O tempo de divergência entre Triatomini e Rhodiniini foi estimado em ~48.9-64.4 mya, no terciário, quando a América do Sul começou a se separar da Antártica e Austrália (Bargues *et al.*, 2000). A atual distribuição geográfica das espécies de triatomíneos corrobora esta hipótese, uma vez que a distribuição de espécies e complexos está relacionada à geografia moderna do continente americano após o Pleistoceno. As exceções a esta distribuição são *R. prolixus*, *T. infestans* e *T. rubrofasciata*, que sofreram intervenção humana, e *T. maculata* (Venezuela) e *T. pseudomaculata* (nordeste do Brasil) associados à aves migratórias (Schofield 1988, Schofield e Dujardin 1999; Schofield, 2000).

Os triatomíneos são divididos em seis tribos com 18 gêneros: Triatomini (*Triatoma*, *Meccus*, *Dipetalogaster*, *Mepraia*, *Eratyrus*, *Panstrongylus*, *Hermanlenticia*, *Paratriatoma*), Rhodiniini (*Rhodnius*, *Psammolestes*), Cavernicolini (*Cavernicola*, *Torrealbaia*), Bolboderini (*Bolboder*, *Belminus*, *Parabelminus*, *Microtriatoma*), Linshcosteusini (*Linshcosteus*) e Alberprosenini (*Alberprosenia*). O grupo é formado por cerca de 140 espécies, 105 no Novo Mundo. A maior parte distribuída nas Américas e associadas a ciclos enzoóticos. Os gêneros mais importantes como

vetores da Doença de Chagas são *Rhodnius*, *Triatoma* e *Panstrongylus*. As teorias atuais sugerem uma origem polifilética para Triatominae. As tribos Rhodniini, Cavernicolini, Bolboderini, Linshcosteini e Alberproseniini são monofiléticas e Triatomini é polifilética (Hypsa *et al.*, 2002; Noireau *et al.*, 2005; Tartarotti *et al.*, 2006).

A tribo Rhodiini compreende os gêneros *Rhodnius* e *Psammolestes*. O gênero *Psammolestes* compreende espécies que vivem em ninhos de aves. Triatomíneos do gênero *Rhodnius* possuem uma história biogeográfica complexa e uma longa associação com espécies de palmeiras na América Latina. As espécies desse gênero estão distribuídas em três complexos de acordo com filogenias baseadas em zimodemas (Dujardin *et al.*, 1999) e seqüências de 16S mitocondrial rDNA, citocromo b e 28S rDNA (Lyman *et al.*, 1999; Hypsa *et al.*, 2002; Monteiro *et al.*, 2000, 2003; Paula *et al.*, 2006). Os complexos de *Rhodnius* estão associados com palmeiras simpátricas e possuem diferentes padrões filogeográficos: (1) complexo *R. pallescens* que compreende as espécies *R. pallescens*, *R. colombiensis* e *R. ecuadoriensis*, distribuído do oeste dos Andes a América Central, norte e noroeste da América do Sul; (2) complexo *R. brethesi*, constituído por *R. brethesi*, *R. pictipes* e *R. amazonicus*, restritos a região amazônica, e *R. stali*, encontrado na Bolívia e regiões vizinhas do Brasil (leste dos Andes); (3) complexo *R. prolixus*, composto por *R. prolixus*, *R. robustus*, *R. neglectus*, *R. nasutus*, *R. domesticus* e *R. neivai* (Galvão *et al.*, 2003).

*R. prolixus* é largamente distribuído e o principal vetor de doença de Chagas na América Central e noroeste da América do Sul, que apresentam três espécies domiciliadas: *R. prolixus*, *R. pallescens* e *R. ecuadoriensis*. No Brasil, todas as espécies do gênero *Rhodnius* são consideradas silvestres e a existência de colônias intradomiciliares nunca foi confirmada. Por outro lado, esses triatomíneos são atraídos pela luz e adultos têm sido encontrados dentro de casas. *R. brethesi* apresenta um comportamento peculiar de voar e atacar humanos durante a noite (Dujardin *et al.*, 1991; Coura *et al.*, 1996; Galvão *et al.*, 2003).

Triatomíneos do gênero *Triatoma* e *Panstrongylus* são encontrados predominantemente associados à habitats terrestres como rochas, abrigos de animais e ocos de árvores. Algumas espécies de *Panstrongylus* são encontradas também em habitats arbóreos (Gaunt e Miles 2000). O gênero *Panstrongylus* compreende 14 espécies amplamente distribuídas em todas as Américas com registros do México até a Argentina, algumas delas com grande importância epidemiológica como vetores da Doença de Chagas. As distâncias genéticas entre as espécies desse gênero sugerem que o grupo seja polifilético (Marcilla *et al.*, 2002).

Epidemiologicamente, *P. megistus* é uma das mais importantes espécies de triatomíneos no Brasil. Dados biogeográficos indicam que pode ter surgido há 18000 anos, com populações de Santa Catarina e Ceará separadas por barreiras geográficas como as Serras do Mar e da Mantiqueira. As populações do sudeste e nordeste são mais próximas geneticamente (Barbosa *et al.*, 2006). No Brasil, *P. geniculatus* é silvestre e encontrado na Amazônia, com insetos adultos com altas taxas de infecção por *T. cruzi* encontrados nas casas (Miles *et al.*, 1978). Esta espécie também é comum na Bolívia, Colômbia e na Venezuela, onde tem sido sugerida como substituta de *R. prolixus* como vetor da Doença de Chagas (Carrasco *et al.*, 2005).

*T. infestans* é o principal vetor da Doença de Chagas e alvo de programas de controle nos países do cone sul. O contínuo controle desses insetos em áreas endêmicas levou a eliminação de populações domésticas do vetor, com a interrupção da transmissão da doença (Dias *et al.*, 2002). Até o momento, a Bolívia é o único país com populações silvestres de *T. infestans* (Richer *et al.*, 2007). Estudos filogenéticos apóiam a origem de *T. infestans* nos planaltos bolivianos e sua dispersão em duas linhas, uma ao longo das regiões andinas da Bolívia e Peru e outra nas planícies do Chile, Paraguai, Argentina, Uruguai e Brasil (Bargues *et al.*, 2006).

Nas regiões secas da Caatinga, *T.* é o vetor mais importante, capaz de colonizar ambientes silvestres e domésticos, formando geralmente grandes colônias. Essa espécie tem grande capacidade de repovoamento a partir de regiões silvestres, aumentando o risco de introdução de novas linhagens de *T. cruzi* no ciclo doméstico da Doença de Chagas (Bargues *et al.*, 2006). *T. brasiliensis* é encontrado exclusivamente entre rochas. *T. pseudomaculata*, também comum no nordeste do Brasil, é encontrado em ninhos de pássaros. Ambas as espécies invadem o ambiente peridoméstico, porém, não colonizam habitações humanas (de La Fuente, 2008).

No Brasil, a colonização de habitações por triatomíneos humanas ocorreu em áreas de Caatinga e Cerrado. Na Mata Atlântica não existem espécies adaptadas ao ambiente doméstico. No entanto, casos autóctones de Doença de Chagas têm sido atribuídos à transmissão por adultos de *T. vitticeps*, que invadem casas vindos de áreas remanescentes de floresta, encontrados em ninhos de marsupiais com altas taxas de infecção por *T. cruzi* (dos Santos *et al.*, 2005).

A presença de *T. rubrovaria* no Brasil foi confirmada no Paraná e Rio Grande do Sul (RS), onde foram encontrados triatomíneos naturalmente infectados com *T. cruzi*. No ambiente silvestre essa espécie está associada a habitats rochosos, alimentando-se em baratas, répteis e mamíferos. Estudos indicam uma crescente invasão de ambientes domiciliares e peridomiciliares por *T.*

*rubrovaria* no RS desde o controle de *T. infestans*, embora sem indícios consistentes de colonização intradomiciliar (Ruas-Neto e Corseuiul, 2002; Martins *et al.*, 2006).

De acordo com a importância epidemiológica e grau de associação com o homem, as espécies de triatomíneos podem ser classificadas em: a) primárias (*R. prolixus* e *T. infestans*), permanentemente colonizando habitações humanas em alta densidade, claramente antropofílicas e com altas taxas de infecção natural por *T. cruzi*. As espécies classificadas como secundárias são geralmente autóctones, como *T. brasiliensis* e *P. megistus*, ou ainda candidatas, como *T. sordida* e *T. pseudomaculata*, apesar de silvestres, apresentam tendências sinantrópicas, com capacidade de colonizar habitações humanas e potencial vetorial (Dias e Diotaiuti 1998; Noireau *et al.*, 1999).

Atualmente, a Amazônia é um desafio importante para o controle vetorial. Triatomíneos amazônicos incluem as tribos Rhodniini, Cavernicolini, e talvez *Eratyrus* e alguns Bolboderini. Três espécies amplamente distribuídas de *Panstrongylus* provavelmente ocuparam secundariamente a Amazônia, e algumas espécies de *Triatoma* ocorrem apenas regiões periféricas. *T. maculata* tem sido considerado um vetor potencial de *T. cruzi* na Amazônia, uma vez que apresenta uma capacidade de colonizar ecótopos naturais no peridomicílio (Abad-Franch e Monteiro, 2007).

A luta contra a Doença de Chagas exige um amplo sistema de vigilância capaz de detectar e controlar reinfestações por triatomíneos não domiciliados de residências já tratadas com inseticidas. No entanto, persistentem em regiões de florestas úmidas (Amazônia) a transmissão da Doença através de triatomíneos que não colonizam as habitações. Nestes casos, os estudos taxonômicos dos triatomíneos são essenciais para esclarecer e definir os padrões de risco. Os padrões ecológicos, de distribuição e preferências de cada espécie também necessitam de mais estudos. Os principais mecanismos de adaptação do inseto a ecótopos naturais ainda continuam mal compreendidos (Noireau *et al.*, 2000; Abadh-Franch *et al.*, 2008).

Um aspecto muito importante da história evolutiva do *T. cruzi* é a associação de populações (linhagens) com gêneros e espécies de triatomíneos, e seus respectivos ecótopos e nichos ecológicos. A tribo Cavernicolini é a mais divergente e está fortemente associada com morcegos. As espécies do gênero *Rhodnius* estão associadas com palmeiras. O gênero *Panstrongylus* é predominantemente encontrado em tocas de animais e ocos de árvores, já o gênero *Triatoma* é terrestre e está associado com habitats rochosos e tocas de roedores. Algumas espécies de *Triatoma* podem ser encontradas exclusivamente em ocos de árvores e/ou ninhos de pássaros (*T. maculata*, *T. platensis*, *T. delponteï*), outras exibem uma clara preferência por rochas ou cavernas.



Algumas espécies podem exibir uma relação estreita com um ecótopo (*R. brethesi* com a palmeira *Leopoldina piassaba*) enquanto outras apresentam uma gama de ecótopos (*P. megistus* e *T. dimidiata*). São raras as espécies de triatomíneos encontradas em árvores, apenas *T. infestans* e *T. sórdida*, cujas populações vivem em regiões de altitude onde habitam rochas, quando estão na região de várzea vivem em árvores (Dujardin *et al.*, 2000; Gaunt e Miles 2000; Noireau *et al.*, 2000)

### 1.5.2 Hospedeiros vertebrados – história dos mamíferos nas Américas

Os mamíferos são os únicos hospedeiros vertebrados do *T. cruzi*. Os primeiros mamíferos surgiram no período Triássico e eram animais pequenos e ecologicamente pouco representativos. Entretanto, no final do Jurássico e início do Cretáceo estes animais já apresentavam uma grande variedade de espécies, que viveram na Era Cenozóica conhecida como a “Era dos Mamíferos” (Pough, 2003). Na América do Sul, a “Era dos Mamíferos” foi no Paleoceno, com uma fauna diversificada de marsupiais, xenartros e ungulados, além de alguns insetívoros (Eisenberg e Redford, 1999; Nilsson *et al.*, 2004).

Os primeiros registros dos marsupiais nas Américas datam do cretáceo. Esses animais são os mais antigos e existia uma grande diversidade deles na América do Sul. De acordo com os registros fósseis, os primeiros marsupiais se originaram no continente Ásia-América há 80 ma. Da América do Norte, no Paleoceno, chegaram a América do Sul e, via Antártica, à Austrália. A ordem Didelphimorpha, que atualmente compreende diversas espécies de gambás e cuícas, divergiu no Paleoceno, inicialmente no supercontinente sul e depois restrita à América do Sul, de onde esses animais migraram no Pleistoceno (1-2 ma) em direção as Américas Central e do Sul (Eisenberg e Redford, 1999; Cox, 2000; Schofield, 2000; Nilsson *et al.*, 2004).

Os Xenartras, que compreendem atualmente os tatús, preguiças e tamanduás, possuem uma origem Gondwanica no Cretáceo superior, e sua radiação para a América do Sul ocorreu no Paleoceno-Eoceno (Delsuc *et al.*, 2001). Esses animais podem ter chegado ao continente Sul Americano pelo continente africano ou, ainda, via América do Norte, já que a megafauna de xenartras foi abundante nas Américas do Norte e Central (Eisenberg e Redford, 1999).

São do período Eoceno-Oligoceno (~30 ma) os primeiros registros de primatas cebóides, roedores caviomorfos e morcegos filostomídeos na América do Sul. Porém, a origem desses animais é controversa. Estudos paleontológicos sugerem que esses grupos vieram da América do Norte ou,

de acordo com teorias mais recentes, do Continente africano. Primatas e caviomorfos utilizaram pontes formadas por ilhas entre o norte da África e a América do Sul (Miyamoto e Goodman, 1986; Eisenberg e Redford, 1999; Cox, 2000; Murphy *et al.*, 2001; Nilsson *et al.*, 2004; Poux *et al.*, 2006).

Hipóteses baseadas em análises filogenéticas e biogeográficas sugerem que a África é o centro de origem das famílias de morcegos atuais, com a origem no Cretáceo (~65 ma). Dois cenários podem explicar a dispersão dos morcegos que ocorreu no Eoceno (45 ma): dispersão pelo norte via Eurásia, Beringia e América, ou por transatlântica via escalas de ilhas (Simmons, 2005; Eick *et al.*, 2005).

No Período Plioceno-Pleistoceno (~2 ma) havia uma completa ligação entre as Américas do Norte e do Sul. Com essa ligação, a família Procyonidae que compreende pequenos caranívoros como o Cangambá, comuns na América do Norte, inicia sua radiação para a América do Sul (Eisenberg e Redford, 1999). Atualmente distribuem-se da América do Norte a América do Sul.

Durante o Plioceno-Pleistoceno, uma variedade de famílias de mamíferos tiveram seus registros na América do Sul: Cricetidae, Mustelidae, Felidae, Canidae, Ursidae, Camelidae, Cervidae, Tayassuidae, Gomphotheridae, Equidae, Tapiridae, Leporidae, Soricidae e Sciuridae (Eisenberg e Redford, 1999). Atualmente, ocorrem na América do Sul 12 Ordens de mamíferos e, com exceção de Sirenia e Cetacea, todas são potencialmente reservatórios de *Trypanosoma cruzi* no ambiente silvestre.

### 1.5.3 Ciclo de vida do *T. cruzi*

O ciclo de vida do *T. cruzi* envolve um hospedeiro mamífero e um hospedeiro invertebrado (vetor), que são insetos hematófagos triatomíneos. Quando o triatomíneo ingere formas tripomastigotas sanguíneas circulantes juntamente com o repasto em um hospedeiro vertebrado infectado por *T. cruzi*, essas formas se transformam em epimastigotas que se multiplicam no intestino médio. Essas formas migram para o intestino posterior, onde se diferenciam para tripomastigotas metacíclicas, que são as formas infectantes para o hospedeiro vertebrado. Ao se alimentarem do sangue de um novo mamífero, os insetos defecam, depositando suas fezes com parasitas, sobre a pele ou mucosas do hospedeiro. A penetração dos parasitas pode se dar diretamente nas mucosas ou via lesão tecidual ocasionada pelo orifício ou por coceira no local da picada. Os tripomastigotas metacíclicos podem invadir uma variedade de tipos celulares,

diferenciando-se em amastigotas, que se multiplicam no citoplasma da célula. No final da fase de multiplicação, quando a célula está abarrotada de parasitas, os amastigotas diferenciam-se novamente em tripomastigotas, que escapam da célula hospedeira para os espaços intercelulares ou ganham a corrente sanguínea. Estes tripomastigotas, chamados de tripomastigotas metacíclicos, podem invadir novas células ou serem ingeridos por um inseto durante seu repasto sanguíneo (Brener, 1982, 1985) (Figura 2).

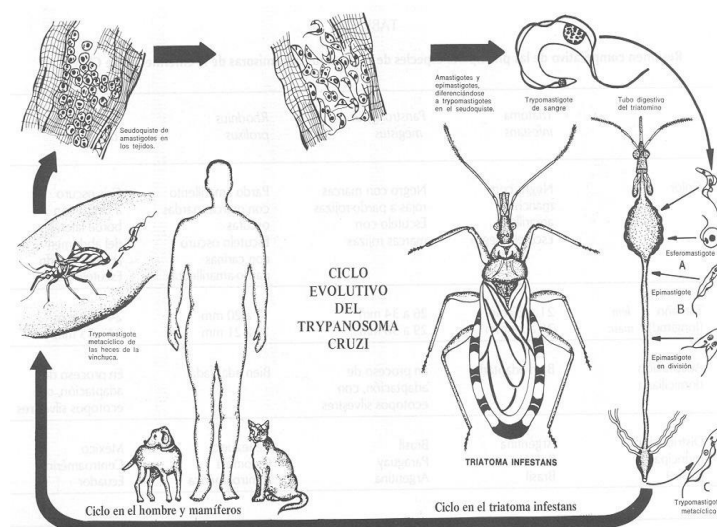


Figura 2. Ciclo Biológico de *Trypanosoma cruzi*.

O processo de invasão celular pelo *T. cruzi* é bastante complexo e envolve diversos eventos que podem ser divididos em adesão e interiorização. Diversas moléculas da célula hospedeira e do parasita, que diferem de acordo com a linhagem do *T. cruzi*, estão envolvidas no processo de adesão e invasão de *T. cruzi* (Yoshida, 2006; Yoshida e Cortez, 2008). Duas vias de invasão são descritas in vitro, dependente e independente de lisossomas. Na primeira, o parasita invade a célula utilizando-se do mecanismo natural de reparo da membrana plasmática e de vias de sinalização de cálcio para a fusão de lisossomas. A segunda via envolve a invaginação da membrana plasmática e subsequente fusão com os lisossomas, sem a polimerização de actina da célula hospedeira. Um evento fundamental nessas vias de invasão é a mobilização de  $Ca^{2+}$  da célula hospedeira pelas

formas tripomastigotas, essencial na reorganização do citoesqueleto e recrutamento de lisossomos (Il e Andrews, 2005; Yoshida, 2006; Mott e Burleigh, 2008).

#### 1.5.4 Mecanismos de transmissão da infecção por *T. cruzi*

Os principais mecanismos de transmissão da Doença de Chagas são: vetorial, transfusional, oral e transplacentário. A transmissão transfusional é ocasional e controlada pela triagem dos doadores em bancos de sangue. Dados recentes demonstram um decréscimo significativo desta via de transmissão no Brasil (Dias *et al.*, 2008). Entretanto, essa via de transmissão tem adquirido grande importância nos últimos anos nos Estados Unidos (Click Lambert *et al.*, 2008; Kjos *et al.*, 2008). A transmissão congênita vem sendo objeto de atenção em alguns países, especialmente na Bolívia e Argentina. A transmissão vetorial é a via mais importante para o homem e ocorre por contaminação fecal. O êxito desta via de infecção depende da frequência com que os triatomíneos defecam e se isso ocorre seguido ou não da alimentação (Silveira, 2000; Silveira *et al.*, 2002; Coura, 2007; Dias *et al.*, 2008).

No ciclo silvestre, a transmissão de *T. cruzi* é mantida por animais silvestres e triatomíneos que habitam palmeiras, fendas e ninhos em árvores e rochas, e abrigos de animais no solo. Em cada ecótopo e nicho ecológico desenvolve-se um ciclo de transmissão com hospedeiros vertebrados e invertebrados específicos. Do ponto de vista epidemiológico podem ser descritos três ciclos de transmissão vetorial de *T. cruzi*: silvestre, doméstico e peridoméstico. No ciclo silvestre, estão envolvidos somente os reservatórios silvestres (mamíferos silvestres) e triatomíneos que não se adaptaram ao domicílio. No ciclo doméstico, há o estreito relacionamento com o homem, animais domésticos e triatomíneos domiciliados. No ciclo peridoméstico ocorre uma sobreposição dos ciclos silvestre e doméstico através de animais silvestres que habitam o peridomicílio, ou via triatomíneos silvestres que, esporadicamente, são atraídos ao domicílio, geralmente pela luz (Coura *et al.*, 2002).

A transmissão oral é considerada a via mais importante para os animais silvestres, que se infectam ingerindo vetores e reservatórios infectados. A ingestão de carne infectada com *T. cruzi* não se mostrou infectante para guaxinins, comprovando dados anteriores que mostraram que as formas metacíclicas são mais infectantes do que as tripomastigotas do sangue (Roellig *et al.*, 2008b). Além da transmissão por via oral, no ambiente silvestre, a transmissão pelo vetor e mecanismos independentes de vetores (glândula anal de gambá) também são importantes ciclos de

transmissão naturais (Miles *et al.*, 1979, 2003; Schoffield, 2000; Gaunt e Miles, 2000). A via oral tem adquirido maior importância na infecção humana devido aos surtos ocorridos principalmente na região Amazônica, mas também no nordeste (Paraíba e Bahia) e sul (Santa Catarina) do Brasil (Lainson *et al.*, 1980; Shikanai-Yasuda *et al.*, 1991; Coura, 1996; Valente *et al.*, 1998; Steindel *et al.*, 2008, Dias *et al.*, 2008). Após o controle de *T. infestans* e a adoção de medidas preventivas nas transfusões de sangue, a infecção por via oral tornou-se a principal forma de aquisição da infecção humana por *T. cruzi* (Coura *et al.*, 2002; Coura, 2006; Aguilar *et al.*, 2007).

Na região Amazônica já foram descritos mais de 500 casos de Doença de Chagas aguda, a maioria nos Estados do Pará e Amazonas e atribuída a microepidemias causadas por infecção oral, que foram associadas ao hábito de ingerir polpa fresca de açaí e frutos de outras palmeiras (Valente *et al.*, 1999; Coura *et al.*, 2002; Coura, 2006; Aguilar *et al.*, 2007). Provavelmente, essas frutas são trituradas junto com triatomíneos infectados, que vivem nas palmeiras na Amazônia. Os surtos da Paraíba e de Santa Catarina foram relacionados à infecção oral pela ingestão de caldo de cana (Steindel *et al.*, 2008). Recentemente, foi descrito um surto de Doença de Chagas aguda associada com a ingestão de água contaminada com fezes de triatomíneos (Dias *et al.*, 2008).

Estudos experimentais de infecção oral por *T. cruzi* em camundongos demonstraram que as formas tripomastigotas ingeridas sobrevivem à ação do suco gástrico aderem à camada de mucina, principal constituinte da mucosa gástrica, para iniciar a travessia até as células-alvo subjacentes. Estudos realizados com diferentes cepas de *T. cruzi*, que expressam diferentes glicoproteínas de superfície (gp82, gp30, gp90), demonstraram diferenças na capacidade de invasão pela via oral, inclusive com cepas que levam a uma exacerbação da infecção quando camundongos são infectados por via oral (Cortez *et al.*, 2006; Covarrubias *et al.*, 2007; Yoshida *et al.*, 2008).

#### 1.5.5 Diversidade genética de *T. cruzi*

A tripanossomíase americana é uma zoonose causada pelo *T. cruzi*, parasita comum de mamíferos silvestres, com mais de 180 espécies já descritas infectadas, principalmente das Ordens Didelphimorpha, Rodentia, Primata e Xenarthra (Miles *et al.*, 1979; 2003).

Casos de infecção humana são encontrados em áreas bastante povoadas desde o México até o Sul da América do Sul. Entretanto, como enzootia, a tripanossomíase americana é mais amplamente distribuída do que a infecção humana, ocorrendo nos mais diversos ecótopos: altiplanos andinos; florestas Amazônica e Atlântica; cerrado; caatinga, etc. O ciclo silvestre do *T. cruzi* estende-

se do Sul dos USA até o Sul da Argentina na Patagonia (Miles *et al.*, 2003; Coura *et al.*, 2002; Aguilar *et al.* 2007, Coura, 2007).

*T. cruzi* compreende populações altamente heterogêneas de parasitas, que diferem em características morfológicas, biológicas (comportamento em vertebrados e triatomíneos), patológicas (virulência, mortalidade, tropismo celular, etc), clínicas (formas cardíaca e digestiva, com e sem megasíndromes), imunológicas e bioquímicas (Teixeira *et al.*, 2006; Coura *et al.*, 2007).

As populações de *T. cruzi* são também altamente heterogêneas geneticamente. Apesar do polimorfismo genético intraespecífico, diversos marcadores e metodologias permitem o agrupamento de isolados de *T. cruzi* em 2-3 linhagens principais. Análises de padrões de isoenzimas foram as primeiras a revelar três grupos de isolados que foram classificados como zimodemas Z1, Z2 e Z3 (Miles *et al.*, 1977; 1978). Posteriormente, esses grupos foram corroborados por marcadores baseados em seqüências dos genes ribossômicos e de mini-exon (spliced leader), revelando duas linhagens principais, *T. cruzi* I (TCI) e *T. cruzi* II (TC2) (Figura 3), que correspondem respectivamente aos zimodemas Z1 e Z2, e indicaram a existência de linhagens híbridas (TC1/2) (Souto *et al.*, 1996; Zingales *et al.*, 1998; Anônimo, 1999). Essas duas linhagens não acomodaram Z3 que foi, posteriormente, também foi definido com marcadores do gene de mini-exon (Fernandes *et al.*, 1998).

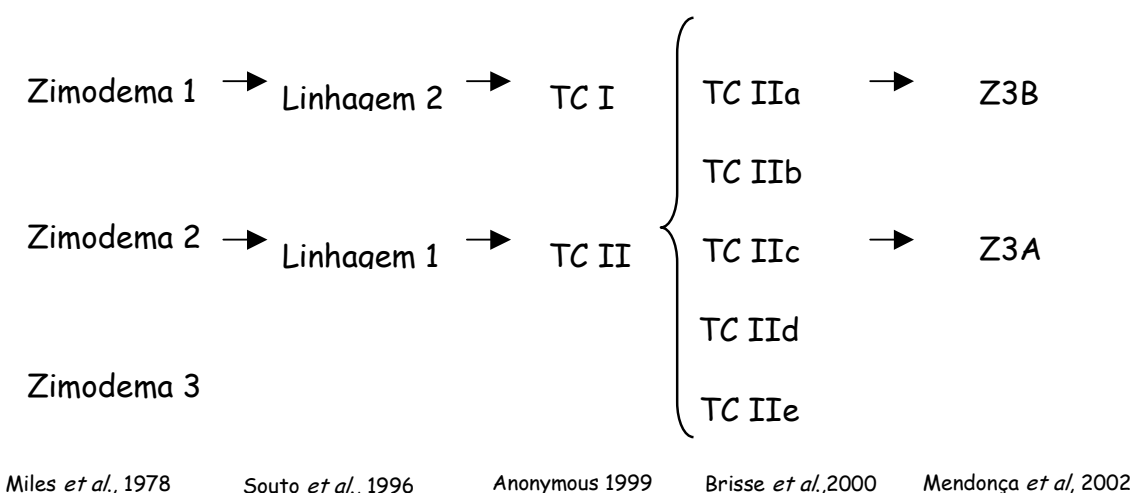


Figura 3. Nomenclatura de *Trypanosoma cruzi* de acordo com os diferentes autores.

Estudos realizados com outros marcadores moleculares, incluindo padrões de RAPD (Brisse *et al.*, 2000a,b), seqüências do gene SSUrDNA (Brisse *et al.*, 2001) e análises de um grande número de loci de isoenzimas (Breniere *et al.*, 2003) agruparam Z3 com TCII e sugeriram uma grande heterogeneidade da linhagem TCII, que foi subdividida em 5 linhagens (TCIIa-e): TCIIb e TCIIe (ambiente antroponótico do Brasil, Chile, Bolívia, Argentina); TCIIc (ambiente antroponótico do Chile e Bolívia), TCIIa (ambiente silvestre, principalmente na Amazônia e TCIIc (ambiente silvestre da Amazonia, Nordeste do Brasil, Paraguai e Argentina) (Barrett *et al.*, 1980; Miles *et al.*, 1981a; Pova *et al.*, 1984; Gaunt e Milles, 2000; Yeo *et al.*, 2005; Fernandes *et al.*, 1998a,b; Zingales *et al.*, 1999; Freitas *et al.*, 2006; Ceballos *et al.*, 2006; Cardinal *et al.*, 2008). As linhagens TCIIa e TCIIc correspondem, respectivamente, aos subgrupos Z3B e Z3A, baseados em polimorfismo de ITS rDNA (Mendonça *et al.*, 2002) (Figura 3). O agrupamento de isolados de *T. cruzi* nessas linhagens tem sido confirmado com análises de outros genes nucleares e mitocondriais (Brisse *et al.*, 2003; Sturm *et al.*, 2003; Westenberger *et al.*, 2005, 2006; Freitas *et al.*, 2006), Cariotipagem (Henriksson *et al.*, 2002; Brisse *et al.*, 2003; Pedroso *et al.*, 2003, 2007; Branche *et al.*, 2006), polimorfismo de loci de microssatélite (Machado e Ayala, 2001; Freitas *et al.*, 2006) etc.

Os métodos moleculares de genotipagem tradicionalmente utilizados não podem, isoladamente, identificar todas as seis linhagens de *T. cruzi*. O método mais utilizado, baseado no gene de mini-exon (Fernandes *et al.*, 2001) apenas distingue TCI, TCIIb e Z3. O método baseado no gene 24Sa rRNA (Souto *et al.*, 1996) distingue TCI, TCIIb, TCIIa e para as linhagens híbridas (TCIIc-e) resulta em dois fragmentos de tamanhos correspondentes às linhagens TCI e TCIIb. O método proposto por Brisse *et al.* (2001) utiliza os dois marcadores já descritos, mini-exon e 24Sa rRNA, que segregam cinco linhagens, exceto TCIIb e TCIIe, contudo agrega um outro marcador ribossômico, baseado no gene SSU rRNA possibilitando, assim, a diferenciação dessas duas linhagens.

Existem inúmeros estudos epidemiológicos e de estrutura populacional de isolados de *T. cruzi*, a maioria focada em isolados humanos e de triatomíneos e realizada em áreas endêmicas para Doença de Chagas das Américas Central e do Sul. Esses estudos indicaram que a estrutura populacional de *T. cruzi* é predominantemente clonal, sugerindo que eventos de recombinação são raros na natureza (Tibayrenc *et al.*, 1993), apesar da existência de processos sexuais complexos em *T. cruzi* (Gaunt *et al.*, 2003). A existência de linhagens híbridas naturais, que também se propagam de forma clonal, tem sido observada por: a) polimorfismo de microssatélites (Oliveira *et al.*, 1998;

Machado e Ayala, 2001; Freitas *et al.*, 2006); diferentes tipos de cistrons de rRNA (Stolf *et al.*, 2003); cariotipagem (Brisse *et al.*, 2003; Pedroso *et al.*, 2003), etc.

Análises baseadas em um grande número de loci de MLEE sugeriram que as linhagens TCIIId e TCIIe (heterozigóticas) são híbridos de TCIIb e TCIIc (Machado e Ayala, 2001; Sturm *et al.*, 2003; Brisse *et al.*, 2003; Westenberger *et al.*, 2005, 2006). Filogenias incongruentes baseadas em genes nucleares e mitocondriais sugeriram que TCIIa e TCIIc também teriam uma origem híbrida seguida da perda de heteroziguidade e que, exceto TCI e TCIIb, as linhagens de *T. cruzi* devem ser produtos de mais de um evento de hibridização (Sturm *et al.*, 2003; Westenberger *et al.*, 2005). Recentemente, análises de microssatélites e do gene citocromo oxidase II sugeriram que TCIIc seria uma terceira linhagem ancestral (TCIII), juntamente com TCI e TCII, e discordaram da origem híbrida de TCIIc. Esse estudo analisou apenas um isolado de TCIIa (CanIII), que não pode ser acomodado em nenhuma das três linhagens (Freitas *et al.*, 2006).

A maioria dos isolados humanos de áreas endêmicas do Cone Sul da América do Sul (Chile, Argentina, Bolívia, Uruguai, Paraguai e Brasil - exceto Amazônia) foi genotipada como TCIIb, IIId e IIe. Essas linhagens são domésticas e peridomésticas, transmitidas por triatomíneos domiciliados, principalmente *T. infestans* (Zingales *et al.*, 1999; Breniere *et al.*, 1998; Solari *et al.*, 2001; Barnabé *et al.*, 2001; Diosque *et al.*, 2003; Virreira *et al.*, 2006; Freitas *et al.*, 2006; Lages-Silva *et al.*, 2006; Valadares *et al.*, 2008).

As populações de TCI ocorrem principalmente no ciclo silvestre, com ampla distribuição na América Latina (Miles *et al.*, 2003). Essa linhagem não foi, até o momento, dividida em sublinhagens. Entretanto, estudos recentes baseados em marcadores bastantes polimórficos (principalmente região intergênica do gene de mini-exon) demonstraram uma grande homogeneidade entre isolados de mesma região geográfica e um significativo polimorfismo entre isolados de regiões geográficas diferentes (Salazar *et al.*, 2006; O' Connor *et al.*, 2007, Herrera *et al.*, 2007).

Enquanto TCI é raramente encontrada em humanos nos países do Cone Sul, é a única, ou a mais freqüente, tanto em humanos quanto em animais silvestres, na América Central (do México ao Panamá) e no Noroeste da América do Sul (Venezuela e Colômbia). Nestes países, essa linhagem é transmitida ao homem em um ciclo doméstico que geralmente se justapõe ao ciclo silvestre porque *R. prolixus*, que é o principal vetor, pode ser domiciliado e silvestre (Miles *et al.*, 1981a,b, 2003)

Diferente das demais linhagens, TCIIc e TCIIa possuem um ciclo de transmissão quase que exclusivamente silvestre. Estas duas linhagens são genotipadas como Z3 devido ao padrão idêntico



gerado pela genotipagem do gene de mini-exon (Fernandes *et al.*, 1998, 2001; Lisboa *et al.*, 2004, 2008, Herrera *et al.*, 2007, Santos-Mallet *et al.*, 2008) ou classificadas como Z3B (TCIIa) e Z3A (TCIIc) (Mendonça *et al.*, 2002). A linhagem TCIIc, no ciclo silvestre, possui ampla distribuição geográfica, ocorrendo na Colômbia, Argentina, Paraguai e no Brasil. No entanto, apenas casos isolados foram relatados em humanos até o momento, na Amazônia (Estados do Amazonas e Pará) e no Sudeste (Minas Gerais) do Brasil (Miles *et al.*, 1981a; Freitas *et al.*, 2006). TCIIc foi proposto como a terceira grande linhagem que, junto com TCI e TCIIb, formariam as linhagens ancestrais de *T. cruzi* (Freitas *et al.*, 2006).

Todos os estudos demonstram uma forte associação da linhagem TCIIc com tatus e ecótopo terrestre. Esta linhagem, além de tatus, foi encontrada em didelídeos terrestres do gênero *Monodelphis* no Norte e Nordeste do Brasil e no Paraguai (Barrett *et al.*, 1980; Miles *et al.*, 1981a; Pova *et al.*, 1984; Gaunt e Miles, 2000; Fernandes *et al.*, 2001; Yeo *et al.*, 2005). Na Argentina foi descrito em Cangambás, um carnívoro terrestre que vive em tocas (Ceballos *et al.*, 2006; Cardinal *et al.*, 2008). Cães domésticos também foram encontrados infectados por TCIIc no Paraguai (Barnabé *et al.*, 2001) e Argentina (Cardinal *et al.*, 2008). Triatomíneos das espécies *Panstrongylus geniculatus* e *Triatoma infestans*, ambas de hábitos terrestres, são os vetores associados a TCIIc (Barrett *et al.*, 1980; Miles *et al.*, 1981a; Yeo *et al.*, 2005; Cardinal *et al.*, 2008). Casos humanos associados à linhagem Z3 foram inicialmente descritos na região Amazônica (Coura *et al.*, 2000; Aguilar *et al.*, 2007).

Isolados humanos de Minas Gerais, região endêmica no Brasil onde predomina TCIIb e casos graves de Doença de Chagas, foram identificados como linhagem TCIIc (TCIII), sugerindo que a utilização de novos marcadores capazes de separar as linhagens TCIIa e TCIIc poderá revelar mais isolados humanos e aumentar a distribuição geográfica dessas linhagens (Freitas *et al.*, 2006).

Os hospedeiros mamíferos naturais da linhagem TCIIa são praticamente desconhecidos. Essa linhagem foi previamente descrita em tatus e marsupiais do gênero *Monodelphis*, porém, esses dados são baseados em zimodemas (Miles *et al.*, 1981a) e nunca foram confirmados por marcadores moleculares. Os isolados confirmados são de *R. brethesi* da região Amazônica (Mendonça *et al.*, 2002). TCIIa também tem sido descrito em guaxinins, macacos e cães domésticos da América do Norte (Barnabé *et al.*, 2001; Roellig *et al.*, 2008). Portanto não há uma associação clara entre os isolados de TCIIa, seus hospedeiros e ecótopos.

### 1.5.6 História evolutiva do *T. cruzi*

Diferentes hipóteses foram também formuladas a fim de explicar a evolução intraespecífica de *T. cruzi*. Os estudos iniciais baseados em zimodemas sugeriram uma associação de TCI e *Didelphis*, enquanto a linhagem TCII estaria associada com animais terrestres (Miles *et al.*, 1981a; Povoia *et al.*, 1984; Gaunt e Miles, 2000). Diversos estudos sugerem que a linhagem TCI é nativa da América do Sul e está associada com marsupiais desde o final do Cretáceo (65 MYA), quando esse continente era uma ilha (Miles *et al.*, 1981a; Briones *et al.* 1999; Kawashita *et al.*, 2001; Gaunt e Miles, 2000). De acordo com alguns autores, as linhagens TCI e TCII devem ter divergido quando uma população ancestral de *T. cruzi* (TCI) parasita de um marsupial passou a infectar xenartros (mais antigos placentários da América do Sul) e que isso pode ter ocorrido quando esses animais eram os únicos na América do Sul (Gaunt e Miles, 2000).

Outra hipótese sugere que a linhagem TCIIb teria surgido no Plioceno (5 MYA), após a conexão com a América do Norte e a introdução de mamíferos placentários na Américas Central e do Sul, ou no Oligoceno (38 MYA) em associação com roedores e primatas (Briones *et al.*, 1999; Kawashita *et al.*; 2001). Estudos recentes sugerem que os primatas neotropicais, que provavelmente entraram nas Américas vindos da África, estão naturalmente associados com TCI na Amazônia e Mata Atlântica. Os casos de macacos infectados com TCII podem ter sido acidentais, causados pela infecção em cativeiro de micos leão-dourado que foram re-introduzidos na Mata Atlântica (Yeo *et al.*, 2005; Lisboa *et al.*, 2006). Os caviomorfos aparentemente chegaram as Américas na mesma época que os primatas e são, provavelmente, os mais antigos roedores hospedeiros de *T. cruzi*. Porém, também esses animais têm sido associados com TCI e somente quando capturados no peridomicílio de região endêmica da Doença de Chagas foram encontrados infectados por TCII (Herrera *et al.*, 2004). Isolados silvestres de *T. cruzi* dos USA (tatu, gambá e guaxinim) foram tipados como TCI ou Z3, mas nunca como TCIIb (Brisse *et al.*, 2001; Barnabé *et al.*, 2001; Roellig *et al.*, 2008a).

Além da associação preferencial com mamíferos, os ecótopos dos triatomíneos vetores e a associação destes com determinados mamíferos foram empregados a fim de sugerir histórias evolutivas para as linhagens de *T. cruzi*. O principal hospedeiro silvestre de TCI é o gambá *Didelphis marsupialis* que habita os ecótopos arbóreo e terrestre. Essa linhagem é transmitida por *Rhodnius* spp., que habitam somente ecótopos arbóreos, especialmente palmeiras. Apesar de associado preferencialmente a *Didelphis*, TCI tem sido descrito em outras espécies de marsupiais, roedores,

primatas (Miles *et al.*, 1981; Povia *et al.*, 1984; Herrera *et al.*, 2005; 2008; Lisboa *et al.*, 2004; 2006). TCIIb, TCIIc e TCIIId estão associadas a *Triatoma infestans*, que tem hábito terrestre, e ao ambiente doméstico (homem e animais domésticos e do peridomínio). Z3 foi associado com triatomíneos do gênero *Panstrongylus* (que habitam buracos e fendas de rochas) e principalmente com tatus, mas também foi encontrado em didelfídeos do gênero *Monodelphis*, todos animais de hábitos terrestres (Barrett *et al.*, 1980; Miles *et al.*, 1981; Gaunt e Miles, 2000; Yeo *et al.*, 2005).

A associação de *T. cruzi* e marsupiais parecer se bastante antiga, anterior a separação da Antártica e Austrália (~65 ma) (Stevens *et al.*, 1999; 2001), indicando que esse parasita já infectava marsupiais nas Américas muito antes do aparecimento dos hemípteros vetores. Estudos realizados por Deane *et al.* (1984) fornecem uma possível explicação para esse cenário, demonstrando a existência de um ciclo equivalente ao que ocorre no vetor nas glândulas anais de gambás (*D. marsupialis*). Estudos posteriores também demonstraram a presença de *T. cruzi* nas glândulas anais de *D. marsupialis* e *D. albiventris* naturalmente infectados (Steindel e Pinto, 1988; Fernandes *et al.*, 1989, 1991).

Esses dados lavaram a hipótese da existência de tripanossomatídeos ancestrais associados com didelfídeos existentes no supercontinente sul há cerca de 65 ma (Stevens *et al.*, 1999, 2001). Com a separação da América do Sul e Antártica (~40 ma) e as dispersão dos didelfídeos, esses tripanossomatídeos podem ter sido transmitidos diretamente entre os gambás através da secreção da glândula anal. No Pleistoceno (2,5 ma) os gambás, tatús, roedores cricetídeos e aves são comuns em toda a América do Sul, e os ninhos e abrigos destes animais devem ter sido atrativos para uma diversidade de reduvídeos predadores, que se tornaram hematófagos facultativos e, posteriormente, obrigatórios (triatomíneos), que foram responsáveis pela propagação dos tripanossomas a novos hospedeiros. Nas aves o *T. cruzi* não sobrevivem devido à lise mediada pelo complemento (Kierszenbaum *et al.*, 1976), mas em roedores, tatús e morcegos sobrevive e sofreu pressões seletivas que levaram ao aparecimento das diversas linhagens de *T. cruzi*.

### 1.5.7 Doença de Chagas

Tripanossomíase Americana, ou Doença de Chagas no homem, é o nome dado à infecção por *T. cruzi*. Estimava-se que existam 16 milhões de pessoas infectadas e que 70 a 90 milhões viviam sob risco de contaminação. Atualmente, com o controle da transmissão vetorial, esse número

foi estimado em ~9 milhões, ainda constituindo assim um grande problema de saúde pública (Dias, 2006; Schofield *et al.*, 2006; Coura, 2007; Dias *et al.*, 2008).

A Doença de Chagas, de acordo com estudos realizados em múmias, se estabeleceu com os primeiros humanos nas Américas, há cerca de 9000 anos, como sugerido pelo encontro de *T. cruzi* em múmias de ameríndios no Chile e Peru próximos ao deserto do Atacama (Aufderheide *et al.*, 2004). Recentemente múmias de Minas Gerais foram encontradas positivas e infectadas com a linhagem TCI (Fernandes *et al.*, 2008). A associação das diferentes formas clínicas da Doença de Chagas com origem geográfica é bem conhecida. A maioria dos isolados de pacientes com manifestações severas (miocardites e megasíndromes), que são provenientes de áreas endêmicas do Cone Sul da América do Sul (Chile, Argentina, Bolívia, Uruguai, Paraguai e Brasil - exceto Amazônia), foi genotipada como TCIIb, TCIIId e TCIIe, linhagens domésticas e peridomésticas transmitidas por triatomíneos domiciliados.

Duas teorias tentam explicar a patogênese das lesões na Doença de Chagas. A teoria da autoimunidade, que justifica a destruição de células na ausência de parasitas, e da persistência do parasita postula que as lesões são geradas pela ruptura das células parasitadas e subsequente processo de inflamação. Esses dois mecanismos parecem ser importantes na patologia da Doença de Chagas (Bilate e Cunha-Neto, 2008).

A Doença de Chagas pode ser dividida em fases aguda e crônica. A fase aguda pode ser assintomática, cerca de 95% dos casos, ou sintomática com manifestações clínicas leves como febre, sonolência, fadiga muscular, diarreia, edema e taquicardia, com remissão espontânea dos sintomas. Essa fase raramente é letal, apenas quando ocorre severas miocardite e meningoencefalite. A fase crônica, que pode ser totalmente assintomática, pode levar ao desenvolvimento de doença sintomática. Em 94,5% dos casos os sintomas são cardíacos e, em 4,5% dos casos, ocorrem mega-síndromes do aparelho digestório, ambas relacionadas a lesões no sistema nervoso simpático e parassimpático (Teixeira *et al.*, 2007).

A maioria dos pacientes com manifestações severas, miocardites e mega-síndromes, vivem em áreas endêmicas do Cone Sul da América do Sul (Chile, Argentina, Bolívia, Uruguai, Paraguai e Brasil - exceto Amazônia). Os isolados desses pacientes tem sido genotipados, na sua grande maioria, como TCIIb (em todos os países) ou TCIIId e TCIIe (principalmente na Bolívia e Paraguai). Devido a predominância da linhagem TCIIb em pacientes com formas graves, incluindo mega-síndromes, nessas regiões essa linhagem foi proposta como a única capaz de causar doença (Di

Noia *et al.*, 2002). Entretanto, apesar da ausência de mega-síndromes, pacientes chagásicos infectados com TCI podem apresentar formas clínicas severas. São preocupantes as taxas de mortalidade na fase aguda, na Venezuela (Miles *et al.*, 1981b; Ñez *et al.*, 2004), México (Salazar *et al.*, 2007) e Panamá (Sousa *et al.*, 2006). No Brasil, essa linhagem tem sido associada com infecção em áreas rurais e com a maioria dos casos agudos na Amazônia (Coura *et al.*, 2000; Aguilar *et al.*, 2007). Nessa região, a doença aguda apresenta sintomas muito variáveis e pode ser muito grave e fatal se não tratada rapidamente (Pinto *et al.*, 2004; Xavier *et al.*, 2006). Recentemente, foi demonstrada a presença de TCI em casos com forma cerebral da Doença de Chagas em pacientes com HIV na Colômbia (Burgos *et al.*, 2005) e, no Brasil, em pacientes infectados por TCII (Lages-Silva *et al.*, 2001).

A maioria dos isolados de pacientes com megacolon da Bolívia foi genotipada como TCIIId, com raros os casos associados a TCIIb (Virreira *et al.*, 2006). No Brasil, casos de megacolon foram associados a Z2 e TCII (Luquetti *et al.*, 1986; Lauria-Pires *et al.*, 1996; Freitas *et al.*, 2005; Lages-Silva *et al.*, 2006).

As formas clínicas de pacientes infectados com Z3 são pouco conhecidas. Na Amazônia, apenas casos assintomáticos foram comprovados. Casos de doença crônica com forma cardíaca-digestiva associados à Z3 foram descritos no Equador (Garzon *et al.*, 2002).

A característica comum dos casos de infecção oral é a severidade da doença, com vários casos resultando em morte. Nos diversos episódios, foram observadas infecções orais causadas por TCI e Z3 na Amazônia, TCI na Paraíba e por TCI e TCII em Santa Catarina (Coura *et al.*, 2002; Pinto *et al.*, 2004; Xavier *et al.*, 2006; Aguilar *et al.*, 2007; Steindel *et al.*, 2008).

A diversidade clínica da Doença de Chagas é ocasionada pela grande complexidade populacional, exibindo propriedades biológicas distintas. O desafio atual é correlacionar a variabilidade genética do parasita com as patologias causadas pelas diferentes populações. Os fatores que influenciam na diversidade clínica ainda não foram esclarecidos, mas é provável que a variabilidade genética do parasita e do hospedeiro sejam importantes (Macedo *et al.*, 2004; Buscaglia e Di Noia, 2003; Teixeira *et al.*, 2007). Diferentes clones de uma mesma cepa podem apresentar tropismo por diferentes tecidos (cardíaco, muscular, plexo mesentérico do esôfago e reto, etc) (Morel *et al.*, 1980; Macedo *et al.*, 2004). Vago *et al.* (2000) demonstrou que diferentes populações de *T. cruzi* podem estar associadas ao coração e esôfago de um único paciente.

Diversos marcadores moleculares têm sido investigados a fim permitir associações mais claras entre as diferentes manifestações da Doença de Chagas (formas clínicas, infecções congênitas, morbidade, etc) e as linhagens de *T. cruzi* (Virreira *et al.*, 2006; Baptista *et al.*, 2006; Burgos *et al.*, 2007; Coura, 2007). Um estudo com pacientes com Doença de Chagas crônica com formas assintomática e cardíaca empregando a técnica de microarray mostrou a expressão diferencial de genes, apontando para possíveis marcadores moleculares que podem representar um avanço na associação entre a genética e a patologia da doença (Baptista *et al.*, 2006).

Apesar de o Brasil ter sido declarado, em 2006, livre da transmissão doméstica da Doença de Chagas, essa condição exige uma eterna vigilância epidemiológica. Outra fonte de preocupação, além da colonização da Amazônia como fator de risco a domiciliação de triatomíneos, tem sido a possibilidade de substituição dos vetores domésticos por espécies silvestres que estão perdendo seus habitats. Devido às dificuldades de tratamento da Doença de Chagas, realizado apenas com benzonidazol que induz graves efeitos colaterais sendo útil na fase aguda, porém, pouco eficaz na fase crônica, existe um grande número de pessoas infectadas. Portanto, essa doença continua sendo um problema muito importante em toda a América Latina (Dias, 2006; Schofield *et al.*, 2006; Coura, 2007; Dias *et al.*, 2008).

## 1.6 Genes, seqüências e metodologias empregadas na análise de polimorfismo e de relações filogenéticas

### 1.6.1 Gene ribossômico

Seqüências do gene ribossômico têm sido amplamente utilizadas para inferir relações filogenéticas entre os tripanossomatídeos e entre estes e representantes de outras famílias da ordem Kinetoplastida e filo Euglenozoa (item 1.2).

Os genes nucleares de rDNA dos tripanossomatídeos possuem uma estrutura complexa e característica, com um dos mais complexos padrões de moléculas maduras de RNA. A estrutura do DNA ribossômico (rDNA) compreende uma unidade de repetição composta por unidades de transcrição (cistrons ribossômicos) e espaçadores intergênicos (IGS), que se repetem "in tandem" mais de 100 vezes no genoma. Estes genes são processados em uma única unidade de transcrição, o pré-rRNA, seguido por diversas etapas de processamento originando três moléculas de RNA

maduros: 18S (SSU ou subunidade menor), 5.8S e 24S (LSU ou subunidade maior). Nos tripanossomatídeos, a seqüência da subunidade 24S é interrompida por um espaçador interno, gerando duas moléculas, 24S $\alpha$  e 24S $\beta$ . As regiões transcritas não conservadas do pré-rRNA correspondem aos espaçadores transcritos internos (ITS) e externo (ETS). As unidades de transcrição dos genes ribossômicos são alternadas por uma região espaçadora, espaçador intergênico (IGS), com tamanho e seqüência altamente variáveis (Sogin *et al.*, 1986; Hernández *et al.*, 1990; Dietrich *et al.*, 1990) (Figura 4).

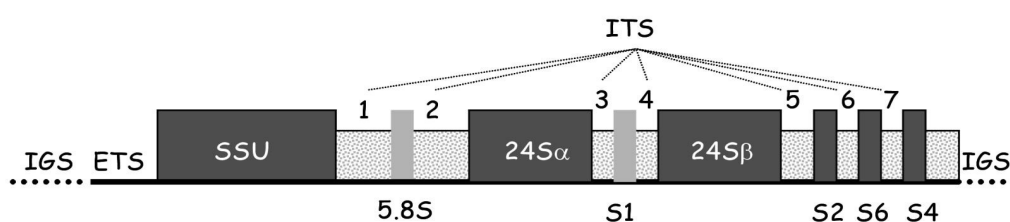


Figura 4. Representação esquemática do cistron ribossômico.

Os genes de rDNA têm se revelado bons marcadores para inferências de relacionamentos filogenéticos porque estão distribuídos universalmente e são funcionalmente equivalentes em todos os organismos conhecidos (Sogin *et al.*, 1986). A presença de diversas regiões, transcritas ou não, que exibem diferentes graus de variabilidade, acarretam um alto grau de polimorfismo dos cistrons ribossômicos e, por este motivo, têm se revelado excelente como ferramenta na identificação e em estudos filogenéticos dos tripanossomatídeos. Seqüências da subunidade menor, SSU, têm sido as mais utilizadas devido a diversas características, tais como o tamanho, a facilidade de obtenção (amplificação por PCR) e a presença de regiões variáveis flanqueadas por regiões conservadas que permitem alinhamentos altamente confiáveis. A subunidade SSU dos genes de rDNA de tripanossomatídeos possui oito regiões universalmente conservadas (U1-U8) e nove regiões variáveis (V1-V9) (Hernández *et al.*, 1990). Seqüências de SSU rDNA de diversas espécies e isolados do gênero *Trypanosoma* estão disponíveis em bancos, permitindo inferir o relacionamento de novas espécies, linhagens e isolados com as já estudadas.

Os espaçadores IGS são altamente variáveis comparadas com ITS que, por sua vez, são muito mais variáveis do que as regiões SSU e LSU.

Análises de polimorfismo de seqüências ribossômicas têm sido utilizadas na identificação e genotipagem de linhagens de *T. cruzi*. O primeiro marcador padronizado foi baseado na região 24Sa da LSU, utilizado como alvo para um método de PCR que distingue as linhagens *T. cruzi* I e *T. cruzi* II (Souto *et al.*, 1996). Outro ensaio utilizou os genes SSU e LSU rRNA, juntamente com o gene de mini-exon na distinção das 6 linhagens de *T. cruzi* (Brisse *et al.*, 2001). O método baseado no gene 24S LSU foi padronizado para PCR em tempo real e utilizado na identificação de linhagens de *T. cruzi* diretamente em tecidos de pacientes cronicamente infectados com formas gastrointestinal e cardíaca da doença de Chagas (Freitas *et al.*, 2005).

O gene ITS do rDNA é composto por três regiões, ITS1, 5.8S (que é altamente conservado) e ITS2. Os espaçadores ITS1 e ITS2 diferem inter e intra-especificamente, sendo excelentes para análises de organismos filogeneticamente próximos, assim como alvos para diagnóstico e como marcadores taxonômicos. Análises comparativas de ITS rDNA revelaram variabilidade inter e intraespecífica em *Leishmania* e *Endotrypanum* (Cupolillo *et al.*, 1995, 2000), *T. cruzi* (Mendonça *et al.*, 2002), *T. rangeli* (Maia da Silva *et al.*, 2004b), *T. theileri* (Rodrigues *et al.*, 2006), espécies de tripanossomas Africanos (Desquesnes *et al.*, 2001; Njiru *et al.*, 2005; Cortez *et al.*, 2006; Rodrigues *et al.*, 2008) e tripanossomas de anuros (Ferreira *et al.*, 2007). Linhagens de *T. cruzi* também foram diferenciadas com análises de polimorfismo de restrição e de seqüências de ITS rDNA, que permitiu distinguir TCI, TCII, e diferenciar Z3 em Z3A e Z3B (Mendonça *et al.*, 2002; Cuervo *et al.*, 2002; Santos *et al.*, 2002).

#### 1.6.2 Gene de mini-exon ou “spliced-leader”

Os genes de mini-exon ou “spliced leader” (SL) participam do mecanismo pós-traducional denominado “trans-splicing” responsável pelo processamento que resulta na adição de seqüências de 39 nucleotídeos, denominadas “spliced-leader” ou mini-exon, na extremidade 5’ de todos os mRNAs maduros dos Kinetoplastida (Agabian, 1990).

Devido a sua organização composta por regiões com diferentes graus de conservação os genes de mini-exon têm sido utilizados com finalidades taxonômicas e para diagnóstico. Cada unidade de repetição do gene SL pode ser dividida basicamente em três partes: um exon altamente conservado de 39 nucleotídeos; um intron de 50-100 nucleotídeos moderadamente conservado, e



uma região intergênica espaçadora que apresenta variações de tamanho e de seqüência entre espécies de tripanossomatídeos e linhagens de tripanossomas (Figura 5). Existem cerca de 200 cópias do gene SL repetidas “in tandem” no genoma dos tripanossomatídeos que são, assim, um bom alvo para diagnóstico (Agabian, 1990; Donelson e Zeng, 1990; Davis, 1996).

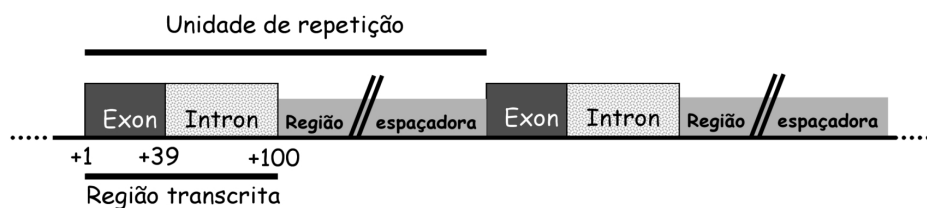


Figura 5. Representação esquemática da unidade de repetição do gene “Spliced leader”

A comparação de seqüências do gene SL de diversos tripanossomatídeos revelou regiões com diferentes graus de conservação entre gêneros e espécies. Entretanto, essas seqüências são úteis apenas para inferir graus de relacionamento genético entre espécies muito relacionadas, para análise de variabilidade genética e como alvo para diagnóstico de tripanossomatídeos, uma vez que são muito variáveis para permitir alinhamentos confiáveis entre organismos de espécies diferentes (Fernandes *et al.*, 1998; Serrano *et al.*, 1999b,c; Gibson *et al.*, 2000; Ventura *et al.*, 2001; Maia da Silva *et al.*, 2007).

Seqüências do gene SL vêm sendo utilizadas na identificação de diferentes gêneros da família Trypanosomatidae. A heterogeneidade de seqüências de introns e regiões intergênicas do gene SL tem sido útil na identificação de espécies de *Leishmania* (Hassan *et al.*, 1993; Fernandes *et al.*, 1994; Harris *et al.*, 1998), *Endotrypanum* (Fernandes *et al.*, 1993) *Crithidia* (Fernandes *et al.*, 1997) e *Phytomonas* (Teixeira *et al.*, 1996; Serrano *et al.*, 1999 a,b). Estas seqüências também são úteis na identificação de tripanossomas africanos (Sturm *et al.*, 1998; Ventura *et al.*, 2001) e linhagens de *T. rangeli* (Maia da Silva *et al.*, 2007).

A identificação de linhagens de *T. cruzi* (genotipagem) utilizando métodos de PCR baseados em seqüências do gene de mini-exon tem sido amplamente utilizada (Souto *et al.*, 1996; Fernandes *et al.*, 1998a, b; Fernandes *et al.*, 1999; Brisse *et al.*, 2001). A utilização de métodos de PCR para genotipagem baseados nos genes de mioni-exon e ribossômicos possibilitou a segregação de *T.*

*cruzi* em duas grandes linhagens: *T. cruzi* I e *T. cruzi* II (Souto *et al.*, 1996). Posteriormente, o método baseado em mini-exon foi modificado (novos primers) tornando possível a identificação da linhagem Z3, além de TCI e TCII (Fernandes *et al.*, 1998), e ainda foi possível segregar isolados de *T. rangeli* com esta metodologia (Fernandes *et al.*, 2001).

Recentemente, o polimorfismo de seqüências da região do espaçador do gene de SL propiciou a segregação dos isolados de *T. cruzi* genotipados como TCI em três grupos, de acordo com origem geográfica e hospedeiro de origem (O'Connor *et al.*, 2007). Com base nessa mesma região, isolados de diversas regiões da Colômbia foram separados em quatro haplótipos (Herrera *et al.*, 2007).

### 1.6.3 Genes mitocondriais

O DNA mitocondrial nos tripanossomatídeos é denominado de DNA do cinetoplasto (kDNA) e representa ~20-25% do DNA celular total. Os maxicírculos correspondem ao DNA mitocondrial dos eucariotos, codificando as proteínas necessárias para a atividade mitocondrial. Os minicírculos codificam as moléculas de RNAs-guias utilizadas na edição de transcritos de maxicírculos (Simpson *et al.*, 1987). Os maxicírculos de *T. cruzi* possuem cerca de 22 kb (Figura 6) (Westenberger *et al.*, 2006).

Uma característica importante no DNA mitocondrial é sua alta taxa de, que se acredita ser 10 vezes superior a de um gene de cópia única nuclear (Meyer, 1993). A taxa de evolução do DNA mitocondrial não é homogênea entre os seus diferentes genes. Alguns genes acumulam mutações mais rapidamente, dentre os quais podemos citar os genes codificadores das subunidades da NADH desidrogenase, citocromo c oxidase e dos RNAs transportadores, enquanto os genes de citocromo b estão entre os mais conservados. A ausência de recombinação e sua alta taxa de evolução, heterogênea entre seus genes, fazem com que o DNA mitocondrial seja um excelente marcador para taxonomia e estudos filogenéticos (Meyer, 1993).

O gene citocromo b (Cyb) (~1080 pb) codifica uma proteína transportadora de elétrons (ferro-protoporfirina) presente em uma única cópia por maxicírculo (Westenberger *et al.*, 2006). Um estudo baseado na região 5' não-editada desse gene permitiu separar *T. rangeli* das espécies do subgênero *Schizotrypanum* (*T. cruzi*, *T.c. marinkellei* e *T. dionisii*), confirmou a monofilia de *T. cruzi* e *T. c. marinkellei* e segregou os isolados de *T. c. marinkellei* em dois grupos (Barnabé *et al.*, 2003a).

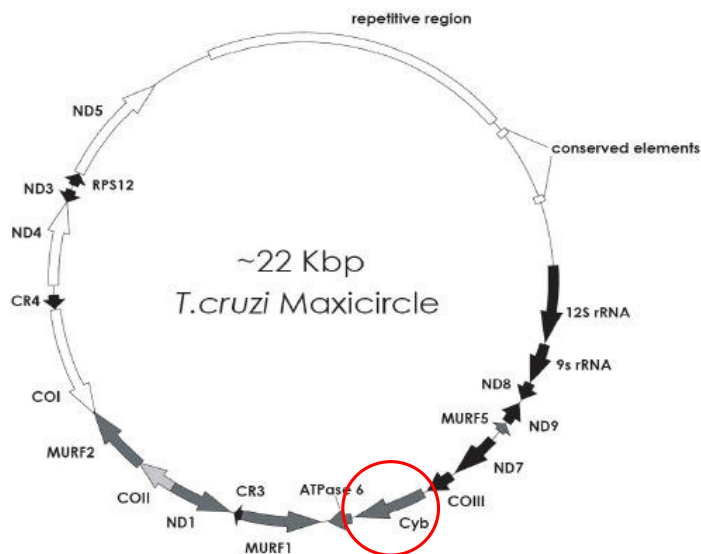


Figura 6. Representação esquemática do maxicírculo de kDNA com o gene de citocromo b (Cyb) em destaque.

Análises conjuntas de genes nucleares e um gene mitocondrial (citocromo oxidase II) revelaram filogenias incongruentes. Porém, as topologias demonstraram a existência de híbridos e geraram hipóteses sobre eventos de trocas genéticas. Esse estudo sugeriu baseado em divergências de seqüências que a separação das principais linhagens de *T. cruzi* ocorreu durante o Mioceno-Plioceno (3-16 ma) (Machado e Ayala, 2001). A utilização de seqüências do gene Cyb e do promotor rRNA de isolados de *T. cruzi* das 6 linhagens também resultou em filogenias incongruentes. As seqüências de CYb e rRNA foram agrupadas em três e quatro linhagens, respectivamente (Brisse *et al.*, 2003).

A comparação de seqüências de três genes mitocondriais, Cyb, citocromo oxidase II e NADH desidrogenase, permitiu separar os isolados de *T. cruzi* em três grupos TCI, TCII e TCIII. Esse último grupo compreende os isolados da linhagem TCIIc (Freitas *et al.*, 2006). Análises de genes nucleares e mitocondriais (COII and ND1) também demonstraram trocas genéticas entre linhagens divergentes de TCII, assim como polimorfismo da linhagem TCI entre isolados da América do Sul. Entretanto, trocas genéticas não foram observadas entre populações de TCI das Américas Central e do Sul (Iwagami *et al.*, 2007). Isolados chilenos de *T. cruzi* foram incluídos junto com outros isolados Americanos em filogenias baseadas em seqüências de Cyb que diferenciaram

isolados de TCI, revelando um genótipo ainda não descrito, associado com roedores caviomorfos e designado DTU Ib (Spotorno *et al.*, 2008).

O estudo comparativo (microarray) de isolados de *T. cruzi* humanos assintomáticos e com forma cardíaca revelou transcritos expressos diferencialmente entre esses dois grupos de isolados, principalmente o do gene ND7 (NADH dehydrogenase subunit 7). A presença de uma deleção nesse gene permitiu padronizar um PCR para o diagnóstico diferencial de cepas de *T. cruzi* (Baptista *et al.*, 2006). A comparação de sequências completas de maxicírculos das cepas CL Brener e Esmeraldo revelou genes dispostos na mesma ordem que *T. brucei* e *L. tarentolae*. Esse estudo revelou a existência de seqüências, em regiões não codificadoras, espécie e cepa-específicas, com potencial para utilização como marcadores taxonômicos (Westenberger *et al.*, 2006).

#### 1.6.4 DNA do cinetoplasto – kDNA

Os tripanossomatídeos apresentam uma única mitocôndria que contém uma região rica em DNA (kDNA) denominada cinetoplasto. O kDNA consiste de moléculas dupla-fita circulares, cada organismo contendo de 5.000-10.000 minicírculos e 40-50 maxicírculos, concatenados em uma única rede (Simpson, 1987; Stuart e Feagin, 1992). Os minicírculos dos tripanossomatídeos são extremamente heterogêneos no tamanho e na seqüência, exceto pela presença de uma região conservada composta por três blocos (CSBs1, 2 e 3). O bloco CSB-3 consiste de uma região de 12 nucleotídeos, praticamente invariável nos tripanossomatídeos (“Universal minicircle sequence”), que corresponde à origem de replicação dos minicírculos, e *T. cruzi* possui 4 cópias (Degraeve *et al.*, 1988).

Interespecificamente os minicírculos diferem em tamanho e seqüência. Intraespecificamente, estas moléculas diferem na seqüência, mas são homogêneas em tamanho e sempre hibridizam cruzadamente. Os padrões de digestão de kDNA por endonucleases de restrição (esquizodemas) são característicos de espécies, subespécies, cepas e clones de tripanossomatídeos (Morel e Simpson, 1980; Morel *et al.*, 1980). Devido ao grande número de cópias ( $\sim 10^4$ ) e ao polimorfismo entre espécies e isolados, minicírculos de kDNA são excelentes alvos para diagnóstico por PCR.

Os padrões de digestão de minicírculos de kDNA por enzimas de restrição (esquizodemas) são característicos de isolados de *T. cruzi* (Morel *et al.*, 1986; Torres *et al.*, 2004). Amplificação por PCR de minicírculos de kDNA resulta nos métodos de diagnósticos mais sensíveis para *T. cruzi*

(Sturm *et al.*, 1989; Ávila *et al.*, 1990, 1993; Wincker *et al.*, 1994; Junqueira *et al.*, 1996; Gomes *et al.*, 1999; Rozas *et al.*, 2005; Burgos *et al.*, 2005; Zulantay *et al.*, 2007; Silva Manoel-Caetano *et al.*, 2008; Brito *et al.*, 2008).

A homogeneidade de tamanho destas moléculas entre isolados de *T. cruzi* facilita o diagnóstico (Wincker *et al.*, 1994; Junqueira *et al.*, 1996; Gomes *et al.*, 1999; Lane *et al.*, 2003; Virreira *et al.*, 2003; Elias *et al.*, 2003; Junqueira *et al.*, 2005), além de permitir separar esta espécie de *T. rangeli* (Vallejo *et al.*, 1999).

A técnica de PCR baseada em seqüências de kDNA em baixa estringência com um único “primer” (“low stringency single specific primer LSSP-PCR”) é muito sensível na detecção de polimorfismos. Diversos isolados analisados com essa técnica revelaram altos graus de polimorfismo intraespecíficos, inclusive entre isolados TCI de uma mesma região geográfica (Brito *et al.*, 2008; Salazar *et al.*, 2006). Análise de polimorfismo de restrição de uma DNA empregada na comparação de isolados de casos congênitos revelou padrões idênticos para isolados das mães e filhos (Burgos *et al.*, 2007).

#### 1.6.5 Random Amplification of Polymorphic DNA” (RAPD)

Este método tem sido amplamente utilizado no estudo de variabilidade genética entre organismos muito relacionados, permitindo a identificação e análise de polimorfismo entre tripanossomatídeos através de perfis de fragmentos amplificados por PCR (“fingerprints”). Outra aplicação deste método tem sido o isolamento de seqüências a partir da identificação de fragmentos sinapomórficos para fins diagnósticos e taxonômicos (Oury *et al.*, 1997, Ventura *et al.*, 2000; Rodrigues *et al.*, 2003).

A técnica de RAPD baseia-se na amplificação de fragmentos de seqüências polimórficas de DNA utilizando-se, como “primers”, oligonucleotídeos de 8-10 nucleotídeos escolhidos arbitrariamente. Esta metodologia tem permitido detecção de polimorfismo genético entre tripanossomatídeos muito próximos filogeneticamente, sendo utilizada para inferir relações filogenéticas entre subespécies de *Leishmania* (Noyes *et al.*, 1997; Schönian *et al.*, 2000; Zemanova *et al.*, 2004), espécies de tripanossomas africanos (Ventura *et al.*, 2001; Lun *et al.*, 2004), isolados de *T. theileri* (Rodrigues *et al.*, 2003) e linhagens de *T. rangeli* (Steindel *et al.*, 1994; Maia da Silva *et al.*, 2004a).

Análises com diversos isolados de *T. cruzi* pela técnica de RAPD possibilitou a separação nas principais linhagens TCI e TCII (Steidel *et al.*, 1993; Brisse *et al.*, 1998; Gomes *et al.*, 1998; Zalloum *et al.*, 2005; Pacheco *et al.*, 2005). Esse método não permitiu detectar perfis distintos de RAPD relacionados a diferentes formas clínicas da Doença de Chagas (Dávila *et al.*, 2006).

Em um estudo abrangente baseado na análise de 83 isolados de *T. cruzi* por RAPD foram identificadas e seqüenciadas fragmentos de DNA que serviram como alvos para o desenho de três pares primers (SCARS). A combinação dos perfis de RAPD gerados com esses primers resultou em padrões distintos para cada uma das 6 linhagens de *T. cruzi*, portanto, com uma total concordância com resultados baseados em diversos outros marcadores (Brisse *et al.*, 2000).

#### 1.6.6 Microsatélites

As seqüências repetitivas representam cerca de 44% do genoma nuclear e podem aparecer agrupadas ou dispersas no genoma do *T. cruzi*, a maioria das seqüências repetitivas não é codificadora (Silveira, 2000). Muitas seqüências repetitivas estão organizadas em tandem (micro e minissatélites). Os microsatélites são seqüências pequenas de DNA (~ 6 nucleotídeos) com elevado grau de polimorfismo do número de repetições em um dado locus. Por esse motivo, os microsatélites são extremamente úteis em estudos filogenéticos, taxonômicos e genéticos (Requena, 1996).

A análise de microsatélites de 53 populações monoclonais de *T. cruzi* demonstrou um grande polimorfismo genético e confirmou a divisão dos isolados em duas grandes linhagens (Macedo *et al.*, 2001). Análises de loci de microsatélites permitiram checar se um isolado de *T. cruzi* representa uma população monoclonal ou multiclonal. A utilização desta técnica demonstrou que a porcentagem de populações multiclonais diminui progressivamente quando são comparados isolados do ciclo silvestre com isolados de casos humanos, confirmando a hipótese de que a infecção no homem seleciona populações do parasita (Oliveira *et al.*, 1998, 1999; Macedo *et al.*, 2001).

Estudo realizado por análises de microsatélites com um grande número de isolados de diferentes hospedeiros, demonstrou a existência de um terceiro grupo filogenético de *T. cruzi*, denominado TCIII, composto por isolados tipados como TCIIc e alguns isolados humanos de região endêmica (Minas Gerais) (Freitas *et al.*, 2006). Recentemente, a utilização de novos loci de

microsatélites permitiu detectar e diferenciar cepas *T. cruzi* diretamente em amostras clínicas, incluindo coração, sangue, líquido e tecidos da pele de pacientes em fases aguda e crônica da doença de Chagas (Valadares *et al.*, 2008).

#### 1.6.7 Cariotipagem molecular (PFGE)

A análise do cariótipo de tripanossomatídeos, por padrões de cromossomos separados por eletroforese de campo pulsado (PFGE), também tem sido empregada com finalidades taxonômicas para espécies, subespécies e cepas. Estes organismos não condensam seus cromossomos e, assim, não podem ser analisados pelos métodos tradicionais de cariotipagem. Este método separa os cromossomos gerando perfis de bandas de acordo com o tamanho e número de cromossomos (Van der Ploeg *et al.*, 1984).

Os padrões gerados com esta metodologia revelaram uma acentuada heterogeneidade de número e tamanho de cromossomos entre espécies de *Trypanosoma*. As espécies do grupo *T. brucei* apresenta cromossomos divididos em 3 classes: minicromossomos (50 a 150 Kb), cromossomos intermediários (200 a 900 Kb) e megacromossomos (1 a 6 Mb) (van der Ploeg *et al.*, 1984; Dickin e Gibson, 1989). Os cariótipos de *T. cruzi* revelaram cerca de 20 a 25 bandas cromossômicas, com tamanhos em torno de 300 Kb a 2 Mb, e um grande polimorfismo no tamanho dos cromossomos de diferentes cepas e clones (Engman *et al.*, 1987; Wagner e So, 1990; Cano *et al.*, 1995). Padrões gerados por PFGE com subsequente hibridização realizado em nove isolados de *T. cruzi* das principais linhagens, TCI e TCII, apresentaram um número variável de bandas cromossômicas (17-22) compreendidas entre 0,4 e 3,3 Mpb (Vargas *et al.*, 2004).

Nos diferentes isolados de *T. cruzi* são observados polimorfismos de tamanho cromossômico, bem como em clones de um mesmo isolado, apesar deste polimorfismo são raros grandes rearranjos cromossômicos. Estudo realizado com 26 isolados de *T. cruzi* resultou em um alto grau de polimorfismo e os caracteres cromossômicos são importantes em análises evolutivas. Além disso foi demonstrada uma correlação entre os padrões cromossômicos e de isoenzimas (Henriksson *et al.*, 2002). Análises do tamanho de cromossomos homólogos indicaram a origem das linhagens TCII d e TCII e através de hibridizações entre as linhagens TCII b e TCII c (Brisse *et al.*, 2003). Outro estudo revelou que populações híbridas possuem diferenças nos tamanhos dos cromossomos homólogos em comparação as linhagens não-híbridas, demonstrando a importância

dos cromossomos na identificação de grupos evolutivos principalmente as linhagens híbridas (Pedroso *et al.*, 2002)

*T. cruzi* Ille CL Berner (cepa de referência do projeto genoma) e duas cepas *T. cruzi* I (Sylvio X10/7 e CAI/72) foram utilizados em um estudo comparativo de seus cariótipos. Grandes diferenças de tamanho em cromossomos homólogos foram observados, indicando grandes arranjos cromossômicos (Branche *et al.*, 2006). Outro estudo recente, demonstra através de uma análise numérica dos padrões cromossômicos que o grupo Z3B (TCIIa) forma um outro grupo distinto as demais linhagens (Pedroso *et al.*, 2007).



## REFERÊNCIAS

Abad-Franch F, Monteiro FA, Jaramillo O N, Gurgel-Gonçalves R, Dias FB, Diotaiuti L. Ecology, evolution, and the long-term surveillance of vector-borne Chagas disease: A multi-scale appraisal of the tribe Rhodniini (Triatominae). *Acta Trop.* 2008 Jun 21 (Epub ahead of print)

Abad-Franch F, Monteiro FA. Biogeography and evolution of Amazonian triatomines (Heteroptera: Reduviidae): implications for Chagas disease surveillance in humid forest ecoregions. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2007; 102 (1):57-70.

Albuquerque JR, Funayama GK. Estudos sobre reservatórios e vetores silvestres do *Trypanosoma cruzi*. XXVII. Infecção natural de quirópteros por *T. vesperilionis* Battaglia, 1904. *Revta bras. Biol.* 1968; 28 (2): 147-55.

Alencar JE, Barros NN, Piccinini RS, Pinto VM, Tomé GS. Estudo sobre a epidemiologia da doença de Chagas no Ceará. V. Quirópteros infectados com tripanossomos tipo *cruzi*. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 1976; 10, 311-312.

Agabian N. Trans splicing of nuclear pre-mRNAs. *Cell.* 1990; 61(7):1157-60.

Aguilar HM, Abad-Franch F, Dias JC, Junqueira ACV, Coura JR. Chagas disease in the Amazon region. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2007; 102 Suppl 1:47-56.

Andrade LO, Andrews NW. The *Trypanosoma cruzi*-host-cell interplay: location, invasion, retention. *Nat Rev Microbiol.* 2005; 3(10):819-23.

Añez N, Crisante G, Rojas A. Update on Chagas disease in Venezuela-a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2004; 99(8):781-7.

Anonymous. Recommendations from a satellite meeting. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1999; 94 Suppl. 1:429-432.

Aufderheide AC, Salo W, Madden M, Streitz J, Buikstra J, Guhl F, Arriaza B, Renier C, Wittmers LE Jr, Fornaciari G, Allison M. A 9,000-year record of Chagas' disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004; 101(7):2034-9.

Avila HA, Pereira JB, Thiemann O, De Paiva E, DeGrave W, Morel CM, Simpson L. Detection of *Trypanosoma cruzi* in blood specimens of chronic chagasic patients by polymerase chain reaction amplification of kinetoplast minicircle DNA: comparison with serology and xenodiagnosis. *J Clin Microbiol.* 1993; 31(9):2421-6.

Avila HA, Goncalves AM, Nehme NS, Morel CM, Simpson L. Schizodeme analysis of *Trypanosoma cruzi* stocks from South and Central America by analysis of PCR-amplified minicircle variable region sequences. *Mol Biochem Parasitol.* 1990; 42(2):175-87.

Baptista CS, Vêncio RZ, Abdala S, Carranza JC, Westenberger SJ, Silva MN, Pereira CA, Galvão LM, Gontijo ED, Chiari E, Sturm NR, Zingales B. Differential transcription profiles in *Trypanosoma cruzi* associated with clinical forms of Chagas disease: Maxicircle NADH dehydrogenase subunit 7 gene truncation in asymptomatic patient isolates. *Mol Biochem Parasitol.* 2006; 150(2):236-48.

Baker JR. Bat trypanosome models for *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol Today.* 1985; 4:111-3.

Baker JR, Miles MA, Godfrey DG, Barrett TV. Biochemical characterization of some species of *Trypanosoma* (*Schizotrypanum*) from bats (Microchiroptera). *Am J Trop Med Hyg.* 1978; 27(3):483-91.

Baker JR, Liston AJ. *Trypanosoma* (*Schizotrypanum*) *dionisii*: effect of various agents on attachment and entry to macrophages in vitro and on morphogenesis. *J Gen Microbiol.* 1978; 104(1):79-89.

De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. Available from: <http://www.icmje.org> [2007 May 22].

- Baker JR, Green SM, Chaloner LA, Gaborak M. *Trypanosoma (Schizotrypanum) dionisii* of *pipistrellus pipistrellus* (chiroptera): intra- and extracellular development in vitro. *Parasitology*. 1972; 65(2):251-63.
- Barbosa SE, Belisário CJ, Souza RC, Paula AS, Linardi PM, Romanha AJ, Diotaiuti L. Biogeography of Brazilian populations of *Panstrongylus megistus* (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) based on molecular marker and paleo-vegetational data. *Acta Trop*. 2006; 99(2-3):144-54.
- Bargues MD, Klisiowicz DR, Panzera F, Noireau F, Marcilla A, Perez R, Rojas MG, O'Connor JE, Gonzalez-Candelas F, Galvão C, Jurberg J, Carcavallo RU, Dujardin JP, Mas-Coma S. Origin and phylogeography of the Chagas disease main vector *Triatoma infestans* based on nuclear rDNA sequences and genome size. *Infect Genet Evol*. 2006; 6(1):46-62.
- Bargues MD, Marcilla A, Dujardin JP, Mas-Coma S. *Triatomine* vectors of *Trypanosoma cruzi*: a molecular perspective based on nuclear ribosomal DNA markers. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2002; 96 Suppl 1:S159-64.
- Bargues MD, Marcilla A, Ramsey JM, Dujardin JP, Schofield CJ, Mas-Coma S. Nuclear rDNA-based molecular clock of the evolution of triatominae (Hemiptera: reduviidae), vectors of Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2000; 95(4):567-73.
- Barnabé C, Tibayrenc M. *Trypanosoma cruzi*: long-term sub-cultures in two different culture media do not confirm the existence of highly versatile multilocus genotypes. *Int J Parasitol*. 2004; 34(7):779-84.
- Barnabe C, Brisse S, Tibayrenc M. Phylogenetic diversity of bat trypanosomes of subgenus *Schizotrypanum* based on multilocus enzyme electrophoresis, random amplified polymorphic DNA, and cytochrome b nucleotide sequence analyses. *Infect Genet Evol*. 2003; 2(3):201-8.
- Barnabé C, Neubauer K, Solari A, Tibayrenc M. *Trypanosoma cruzi*: presence of the two major phylogenetic lineages and of several lesser discrete typing units (DTUs) in Chile and Paraguay. *Acta Trop*. 2001; 78(2):127-37.
- Barrett TV, Hoff RH, Mott KE, Miles MA, Godfrey DG, Teixeira R, Almeida de Souza JA, Sherlock IA. Epidemiological aspects of three *Trypanosoma cruzi* zymodemes in Bahia State, Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1980; 74(1):84-90.
- Barreto-Bergter E, Branquinha MH, Pohlentz G, Vermelho AB. Monohecosylceramides of *Trypanosoma dionisii*. *J Eukaryot Microbiol*. 1996; 43(6):486-8.
- Bilate AM, Teixeira PC, Ribeiro SP, Brito T, Silva AM, Russo M, Kalil J, Cunha-Neto E. Distinct outcomes of *Trypanosoma cruzi* infection in hamsters are related to myocardial parasitism, cytokine/chemokine gene expression, and protein expression profile. *J Infect Dis*. 2008; 198(4):614-23.
- Branche C, Ochaya S, Aslund L, Andersson B. Comparative karyotyping as a tool for genome structure analysis of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol*. 2006; 147(1):30-8.
- Branquinha MH, Vermelho AB, Almeida IC, Mehlert A, Ferguson MA. Structural studies on the polar glycoinositol phospholipids of *Trypanosoma (Schizotrypanum) dionisii* from bats. *Mol Biochem Parasitol*. 1999; 102(1):179-89.
- Breglia SA, Slamovits CH, Leander BS. Phylogeny of phagotrophic euglenids (Euglenozoa) as inferred from hsp90 gene sequences. *J Eukaryot Microbiol*. 2007; 54(1):86-92.
- Brener Z. Host-parasite relations in Chagas disease: mechanisms of infection and disease. *Ann Soc Belg Med Trop*. 1985; 65 Suppl 1:9-13.
- Brener Z. Recent developments in the field of Chagas' disease. *Bull World Health Organ*. 1982; 60(4):463-73.

- Breniere SF, Barnabe C, Bosseno MF, Tibayrenc M. Impact of number of isoenzyme loci on the robustness of intraspecific phylogenies using multilocus enzyme electrophoresis: consequences for typing of *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology*. 2003; 127(3):273-81.
- Breniere SF, Morochi W, Bosseno MF, Ordonez J, Gutierrez T, Vargas F, Yaksic N, Noireau F. *Trypanosoma cruzi* genotypes associated with domestic *Triatoma sordida* in Bolivia. *Acta Trop*. 1998;71(3):269-83.
- Briones MR, Souto RP, Stolf BS, Zingales B. The evolution of two *Trypanosoma cruzi* subgroups inferred from rRNA genes can be correlated with the interchange of American mammalian faunas in the Cenozoic and has implications to pathogenicity and host specificity. *Mol Biochem Parasitol*. 1999;104(2):219-32.
- Brisse S, Henriksson J, Barnabe C, Douzery EJ, Berkvens D, Serrano M, De Carvalho MR, Buck GA, Dujardin JC, Tibayrenc M. Evidence for genetic exchange and hybridization in *Trypanosoma cruzi* based on nucleotide sequences and molecular karyotype. *Infect Genet Evol*. 2003; 2(3):173-83.
- Brisse S, Verhoef J, Tibayrenc M. Characterisation of large and small subunit rRNA and mini-exon genes further supports the distinction of six *Trypanosoma cruzi* lineages. *Int J Parasitol*. 2001; 31(11):1218-26.
- Brisse S, Dujardin JC, Tibayrenc M. Identification of six *Trypanosoma cruzi* lineages by sequence-characterised amplified region markers. *Mol Biochem Parasitol*. 2000a; 111(1):95-105.
- Brisse S, Barnabe C, Tibayrenc M. Identification of six *Trypanosoma cruzi* phylogenetic lineages by random amplified polymorphic DNA and multilocus enzyme electrophoresis. *Int J Parasitol*. 2000b; 30(1):35-44.
- Brisse S, Barnabé C, Tibayrenc M. *Trypanosoma cruzi*: How Many Relevant Phylogenetic Subdivisions are There? *Parasitol Today*. 1998; 14(5):178-9.
- Brito CM, Lima MM, Sarquis O, Pires MQ, Coutinho CF, Duarte R, Pacheco RS. Genetic polymorphism in *Trypanosoma cruzi* I isolated from Brazilian Northeast triatomines revealed by low-stringency single specific primer-polymerase chain reaction. *Parasitol Res*. 2008; 103(5):1111-7.
- Burgos JM, Altcheh J, Bisio M, Duffy T, Valadares HM, Seidenstein ME, Piccinali R, Freitas JM, Levin MJ, Macchi L, Macedo AM, Freilij H, Schijman AG. Direct molecular profiling of minicircle signatures and lineages of *Trypanosoma cruzi* bloodstream populations causing congenital Chagas disease. *Int J Parasitol*. 2007; 37(12):1319-27.
- Burgos JM, Begher SB, Freitas JM, Bisio M, Duffy T, Altcheh J, Teijeiro R, Lopez Alcoba H, Deccarlini F, Freilij H, Levin MJ, Levalle J, Macedo AM, Schijman AG. Molecular diagnosis and typing of *Trypanosoma cruzi* populations and lineages in cerebral Chagas disease in a patient with AIDS. *Am J Trop Med Hyg*. 2005; 73(6):1016-8.
- Buscaglia CA, Di Noia JM. *Trypanosoma cruzi* clonal diversity and the epidemiology of Chagas' disease. *Microbes Infect*. 2003; 5(5):419-27.
- Busse I, Preisfeld A. Unusually expanded SSU ribosomal DNA of primary osmotrophic euglenids: molecular evolution and phylogenetic inference. *J Mol Evol*. 2002; 55:757-67.
- Busse I, Preisfeld A. Application of spectral analysis to examine phylogenetic signal among euglenid SSU rDNA data sets (Euglenozoa). *Org Divers Evol*. 2003; 3:1-12.
- Camargo EP. Phytomonas and other Trypanosomatid parasites of plants and fruit. *Adv Parasit*. 1998; 42:29-112.
- Campbell DA, Sturm NR, Yu MC. The phlebotomine sandfly-protozoan parasite community of central California grasslands. *Parasitol Today*. 2000;16:78-82.

- Cano MI, Gruber A, Vazquez M, Cortés A, Levin MJ, González A, Degraeve W, Rondinelli E, Zingales B, Ramirez JL, Alonso C, Requena JM, Silveira JF. Molecular karyotype of clone CL Brener chosen for the *Trypanosoma cruzi* genome. *Mol Biochem Parasitol*. 1995; 71(2):273-8.
- Cardinal MV, Lauricella MA, Ceballos LA, Lanati L, Marcet PL, Levin MJ, Kitron U, Gürtler RE, Schijman AG. Molecular epidemiology of domestic and sylvatic *Trypanosoma cruzi* infection in rural northwestern Argentina. *Int J Parasitol*. 2008; *in press*.
- Carrasco HJ, Torrellas A, García C, Segovia M, Feliciangeli MD. Risk of *Trypanosoma cruzi* I (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) transmission by *Panstrongylus geniculatus* (Hemiptera: Reduviidae) in Caracas (Metropolitan District) and neighboring States, Venezuela. *Int J Parasitol*. 2005; 35(13):1379-84.
- Cavalier-Smith T. Eukaryote kingdoms: seven or nine? *Biosystems*. 1981;14:461-81.
- Cavalier-Smith T. Kingdom protozoa and its 18 phyla. *Microbiol Rev*. 1993; 57(4):953-94.
- Ceballos LA, Cardinal MV, Vazquez-Prokopec GM, Lauricella MA, Orozco MM, Cortinas R, Schijman AG, Levin MJ, Kitron U, Gürtler RE. Long-term reduction of *Trypanosoma cruzi* infection in sylvatic mammals following deforestation and sustained vector surveillance in northwestern Argentina. *Acta Trop*. 2006; 98(3):286-96.
- Click Lambert R, Kolivras KN, Resler LM, Brewster CC, Paulson SL. The potential for emergence of Chagas disease in the United States. *Geospat Health*. 2008; 2(2):227-39.
- Cortez AP, Ventura RM, Rodrigues AC, Batista JS, Paiva F, Anez N, Machado RZ, Gibson WC, Teixeira MMG. The taxonomic and phylogenetic relationships of *Trypanosoma vivax* from South America and Africa. *Parasitology*. 2006; 133(2):159-69.
- Cortez M, Silva MR, Neira I, Ferreira D, Sasso GR, Luquetti AO, Rassi A, Yoshida N. *Trypanosoma cruzi* surface molecule gp90 downregulates invasion of gastric mucosal epithelium in orally infected mice. *Microbes Infect*. 2006; 8(1):36-44.
- Coura JR. Chagas Disease: What is know and what is needed – A background article. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2007; 102 Suppl. 1: 113-122.
- Coura JR. Transmission of chagasic infection by oral route in the natural history of Chagas disease *Rev Soc Bras Med Trop*. 2006; 39 (3):113-7.
- Coura JR, Junqueira AC, Fernandes O, Valente SA, Miles MA. Emerging Chagas disease in Amazonian Brazil. *Trends Parasitol*. 2002; 18(4):171-6.
- Coura JR. Current prospects of specific treatment of Chagas' disease *Bol Chil Parasitol*. 1996; 51(3-4):69-7
- Coura JR, Fernandes O, Arboleda M. Human infection by *Trypanosoma rangeli* in the Brazilian Amazon. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1996; 90, 278–279.
- Covarrubias C, Cortez M, Ferreira D, Yoshida N. Interaction with host factors exacerbates *Trypanosoma cruzi* cell invasion capacity upon oral infection. *Int J Parasitol*. 2007; 37(14):1609-16.
- Cox, CB. Plate tectonics, seaways and climate in the historical biogeography of mammals. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2000; 95(4):509-516.
- Cuervo P, Cupolillo E, Segura I, Saravia N, Fernandes O. Genetic diversity of Colombian sylvatic *Trypanosoma cruzi* isolates revealed by the ribosomal DNA. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2002; 97(6):877-80.
- Davis RE. Spliced Leader RNA trans splicing in Metazoa. *Parasitol Today*. 1996; 12:33-40.

D'Alessandro A, Saraiva NG. *Trypanosoma rangeli*. In: Gilles HM, editor. Parasitic Protozoal diseases. London: Arnold; 1999. p.398-412.

da Silva Manoel-Caetano F, Carareto CM, Borim AA, Miyazaki K, Silva AE. kDNA gene signatures of *Trypanosoma cruzi* in blood and oesophageal mucosa from chronic chagasic patients. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2008

de la Fuente AL, Dias-Lima A, Lopes CM, Emperaire L, Walter A, Ferreira A, Sherlock I, Noireau F. Behavioral plasticity of Triatominae related to habitat selection in northeast Brazil. J Med Entomol. 2008; 45(1):14-9.

Deane L. Tripanossomídeos de mamíferos da Região Amazônica. I. Alguns flagelados encontrados no sangue de mamíferos silvestres do Estado do Pará. Rev Inst Méd Trop de São Paulo. 1961; 3: 15.

Deane MP, Lenzi HL, Jansen A. *Trypanosoma cruzi*: vertebrate and invertebrate cycles in the same mammal host, the opossum *Didelphis marsupialis*. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1984; 79 (4):513-5.

Degrave W, Fragoso SP, Britto C, van Heuverswyn H, Kidane GZ, Cardoso MA, Mueller RU, Simpson L, Morel CM. Peculiar sequence organization of kinetoplast DNA minicircles from *Trypanosoma cruzi*. Mol Biochem Parasitology. 1988; 1;27(1):63-70.

Delsuc F, Catzeflis FM, Stanhope MJ, Douzary EJP. The evolution of armadillos, anteaters and sloths depicted by nuclear and mitochondrial phylogenies: implications for the status of the enigmatic fossil Eurotamandua. Proc R Soc Lond. 2001; 268:1605-1615.

Desquesnes M, McLaughlin G, Zoungrana A, Dávila AMR. Detection and identification of *Trypanosoma* of African livestock through a single PCR based on internal transcribed spacer 1 of rDNA. Int J Parasitol. 2001; (31):610-4.

Dias E, Mello GB, Costa D, Damasceno R, Azevedo M. Investigações sobre esquizotripanose de morcegos no Estado do Pará. Encontro do barbeiro "*Cavernicola pilosa*" como transmissor. Rev Bras Biol. 1942; 2:103-110.

Dias JP, Bastos C, Araújo E, Mascarenhas AV, Martins Netto E, Grassi F, Silva M, Tatto E, Mendonça J, Araújo RF, Shikanai-Yasuda MA, Aras R. Acute Chagas disease outbreak associated with oral transmission. Rev Soc Bras Med Trop. 2008; 41 (3):296-300.

Dias JC, Prata A, Correia D. Problems and perspectives for Chagas disease control: in search of a realistic analysis. Rev Soc Bras Med Trop. 2008; 41(2):193-6.

Dias JC. Notes about of *Trypanosoma cruzi* and yours bio-ecology characteristics with agents of the transmission by meals. Rev Soc Bras Med Trop. 2006; 39(4):370-5.

Dias JC, Silveira AC, Schofield CJ. The impact of Chagas disease control in Latin America: a review. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2002; 97 (5):603-12.

Dias JCP, Diotaiuti L. Vetores secundários de la enfermedad de Chagas en el Brasil y perspectivas para su control. In: Control de Tripanosomiasis Americana y Leishmaniosis: Aspectos Biológicos, Genéticos y Moleculares (F. Guhl & C. A. Jaramillo, eds.), 1998. pp. 154-159, Santafé de Bogotá: Universidad de los Andes.

Dickin SK, Gibson WC. Hybridisation with a repetitive DNA probe reveals the presence of small chromosomes in *Trypanosoma vivax*. Mol Biochem Parasitol. 1989; 33(2):135-42.

Dietrich P, Soares MB, Affonso MH, Floeter-Winter LM. The *Trypanosoma cruzi* ribosomal RNA-encoding gene: analysis of promoter and upstream intergenic spacer sequences. Gene. 1993; 125(1):103-7.

- Di Noia JM, Buscaglia CA, De Marchi CR, Almeida IC, Frasch AC. A *Trypanosoma cruzi* small surface molecule provides the first immunological evidence that Chagas' disease is due to a single parasite lineage. *J Exp Med*. 2002; 195(4):401-13.
- Diosque P, Barnabe C, Padilla AM, Marco JD, Cardozo RM, Cimino RO, Nasser JR, Tibayrenc M, Basombrio MA. Multilocus enzyme electrophoresis analysis of *Trypanosoma cruzi* isolates from a geographically restricted endemic area for Chagas' disease in Argentina. *Int J Parasitol*. 2003; 33(10):997-1003.
- dos Santos CB, Ferreira AL, Leite GR, Ferreira GE, Rodrigues AA, Falqueto A. Peridomestic colonies of *Triatoma vitticeps* (Stal, 1859) (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) infected with *Trypanosoma cruzi* in rural areas of the state of Espírito Santo, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2005;100(5):471-3.
- Dolezel D, Jirku M, Maslov DA, Lukes J. Phylogeny of the bodonid flagellates (Kinetoplastida) based on small-subunit rRNA gene sequences. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2000; 50:1943–51.
- Donelson JE, Zeng W. A comparison of trans-RNA splicing in trypanosomes and nematodes. *Parasitol Today*. 1990; 6(10):327-34.
- Dooijes D, Chaves I, Kieft R, Dirks-Mulder A, Martin W, Borst P. Base J originally found in Kinetoplastida is also a minor constituent of nuclear DNA of *Euglena gracilis*. *Nucleic Acids Res*. 2000; 28:3017–21.
- Dujardin JP, Chavez T, Moreno JM. Comparison of isoenzyme electrophoresis and morphometric analysis for phylogenetic reconstruction of the Rhodniini (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *J Med Entomol*. 1999; 36, 653–659.
- Dujardin JP, Garcia-Zapata MT, Jurberg J. Which species of *Rhodnius* is invading houses in Brazil? *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1991; 85, 679–680.
- Dujardin JP, Schofield CJ, Panzera F. Les vecteurs de la maladie de Chagas. *Recherches Taxinomiques Biologiques et Genetiques*. *Acad R Scienc Natur Med*. 2000; 24(5):162.
- Ebert F. Comparison of isoenzymes of some species of the subgenus *Schizotrypanum* from bats by isoelectrofocusing. *Trop Parasitol*. 1983; 34 (2):93-7.
- Eick GN, Jacobs DS, Matthee CA. A nuclear DNA phylogenetic perspective on the evolution of echolocation and historical biogeography of extant bats (Chiroptera). *Mol Biol Evol*. 2005; 22: 1869-86.
- Eisenberg JF, Redford KH. *Mammals of the Neotropics: The central Neotropics Ecuador, Peru Bolivia Brazil*. Chicago: Chicago Press; 1999. vol. 3.
- Elias FE, Vigliano CA, Laguens RP, Levin MJ, Berek C. Analysis of the presence of *Trypanosoma cruzi* in the heart tissue of three patients with chronic Chagas' heart disease. *Am J Trop Med Hyg*. 2003; 68(2):242-7.
- Engman DM, Reddy LV, Donelson JE, Kirchhoff LV. *Trypanosoma cruzi* exhibits inter- and intra-strain heterogeneity in molecular karyotype and chromosomal gene location. *Mol Biochem Parasitol*. 1987; 22(2-3):115-23.
- Fabián ME. Contribuição ao estudo da infecção de morcegos por hemoflagelados do gênero *Trypanosoma* Gruby, 1843. *Cadernos de Saúde Pública*, Rio de Janeiro. 1991; 7 (1):69-81
- Felsenstein J. *Phylip (Phylogeny Inference Package) version 3.5c*. Washington, Seattle: Department of Genetics; 1993.
- Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*. 1985; 39:783-91.

Fernandes A, Iñiguez AM, Lima VS, Souza SM, Ferreira LF, Vicente AC, Jansen AM. Pre-Columbian Chagas disease in Brazil: *Trypanosoma cruzi* I in the archaeological remains of a human in Peruaçu Valley, Minas Gerais, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2008; 103(5):514-6.

Fernandes AJ, Diotaiuti L, Dias JC, Romanha AJ, Chiari E. Natural infection of the anal glands of the opossum (*Didelphis albiventris*) by *Trypanosoma cruzi* in the municipality of Bambuí-MG, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1989; 84(1):87-93.

Fernandes AJ, Chiari E, Rodrigues RR, Dias JC, Romanha AJ. The importance of the opossum (*Didelphis albiventris*) as a reservoir for *Trypanosoma cruzi* in Bambuí, Minas Gerais State. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1991; 86(1):81-5.

Fernandes AP, Nelson K, Beverley SM. Evolution of nuclear ribosomal RNAs in kinetoplastid protozoa: perspectives on the age and origins of parasitism. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1993; 90(24):11608-12.

Fernandes O, Santos SS, Cupolillo E, Mendonça B, Derre R, Junqueira AC, Santos LC, Sturm NR, Naiff RD, Barret TV, Campbell DA, Coura JR. A mini-exon multiplex polymerase chain reaction to distinguish the major groups of *Trypanosoma cruzi* and *T. rangeli* in the Brazilian Amazon. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2001; 95(1):97-9.

Fernandes O, Mangia RH, Lisboa CV, Pinho AP, Morel CM, Zingales B, et al. The complexity of the sylvatic cycle of *Trypanosoma cruzi* in Rio de Janeiro state (Brazil) revealed by the non-transcribed spacer of mini-exon gene. *Parasitology*. 1999; 118:161-6.

Fernandes O, Sturm NR, Derre R, Campbell DA. The mini-exon gene: a genetic marker for zymodeme III of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol*. 1998a; 95:129-33.

Fernandes O, Souto RP, Castro JA, Pereira JB, Fernandes NC, Junqueira AC, Naiff RD, Barrett TV, Degraeve W, Zingales B, Campbell DA, Coura JR. Brazilian isolates of *Trypanosoma cruzi* from humans and triatomines classified into two lineages using mini-exon and ribosomal RNA sequences. *Am J Trop Med Hyg*. 1998b; 58(6):807-11.

Fernandes O, Teixeira MMG, Sturm NR, Sousa MA, Camargo EP, Degraeve WM, et al. Mini-exon gene sequences define six groups within the genus *Crithidia*. *J Euk Microbiol*. 1997; 44:535-9.

Fernandes O, Murthy VK, Kurath U, Degraeve WM, Campbell DA. Mini-exon gene variation in human pathogenic *Leishmania* species. *Mol Biochem Parasitol*. 1994; 66:261-71.

Ferreira RC, Campaner M, Viola LB, Takata CS, Takeda GF, Teixeira MMG. Morphological and molecular diversity and phylogenetic relationships among anuran trypanosomes from the Amazonia, Atlantic Forest and Pantanal biomes in Brazil. *Parasitology*. 2007; 19:1-16.

Freitas JM, Augusto-Pinto L, Pimenta JR, Bastos-Rodrigues L, Gonçalves, VF, Teixeira SMR, Chiari E, Junqueira ACV, Fernandes O, Macedo CR, Pena SDJ. Ancestral genomes, sex, and the population structure of *Trypanosoma cruzi*. *Plos Path*. 2006; 2 (3).

Freitas JM, Lages-Silva E, Crema E, Pena SD, Macedo AM. Real time PCR strategy for the identification of major lineages of *Trypanosoma cruzi* directly in chronically infected human tissues. *Int J Parasitol*. 2005; 35(4):411-7.

Funayama GK, Barreto MP. Studies of wild reservoirs and vectors of *Trypanosoma cruzi*. LIV. Natural bat infection, *Eptesicus brasiliensis brasiliensis* (Desmarest, 1819) by *T. cruzi* *Rev Bras Biol*. 1973; 33 (3):439-44.



- Funayama GK, Barretto MP. Estudo sobre reservatórios e vetores silvestres do *Trypanosoma cruzi*. XXXVIII. Infecção natural do morcego *Desmodus rotundus rotundus* (Geoffroy, 1810) pelo *T. cruzi*. Revta Bras. Biol. 1970a. 30 (1): 13-19.
- Funayama GK, Barretto MP. Estudo sobre reservatórios e vetores silvestres do *Trypanosoma cruzi*. XLI. Infecção natural do morcego *Tadarida laticaudata* (Geoffroy, 1805) pelo *T. cruzi*. Revta bras. Biol 1970b. 30; (3): 439-45.
- Galvão C, Carcavallo R, Rocha DS, Jurberg J. A checklist of the current valid species of the subfamily Triatominae Jeannel, 1919 (Hemiptera, Reduviidae) and their geographical distribution, with nomenclatural and taxonomic notes. Zootaxa. 2003; 202: 1–36.
- Garzón EA, Barnabé C, Córdova X, Bowen C, Paredes W, Gómez E, Ouaisi A, Tibayrenc M, Guevara AG. *Trypanosoma cruzi* isoenzyme variability in Ecuador: first observation of zymodeme III genotypes in chronic chagasic patients. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2002; 96(4):378-82.
- Gardner RA, Molyneux DH. *Trypanosoma (Megatrypanum) incertum* from *Pipistrellus pipistrellus*: development and transmission by cimicid bugs. Parasitology. 1988; 96, 433-47.
- Gaunt M, Miles M. The ecotopes and evolution of triatomine bugs (triatominae) and their associated trypanosomes. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2000; 95(4):557-65.
- Gaunt MW, Yeo M, Frame IA, Stothard JR, Carrasco HJ, Taylor MC, et al. Mechanism of genetic exchange in American trypanosomes. Nature. 2003; 421(6926):936-9.
- Gibson W, Bingle L, Blendeman W, Brown J, Wood J, Stevens J. Structure and sequence variation of the trypanosome spliced leader transcripts. Mol Biochem Parasitol. 2000; 107:269-77.
- Glauert AM, Baker JR, Selden LF. Mechanism of entry and development of *Trypanosoma dionisii* in non-phagocytic cells. J Cell Sci. 1982;56:371-87.
- Gomes ML, Macedo AM, Pena SD, Chiari E. Genetic relationships between *Trypanosoma cruzi* strains isolated from chronic chagasic patients in southern Brazil as revealed by RAPD and SSR-PCR analysis. Acta Trop. 1998; 69(2):99-109.
- Gomes ML, Galvao LM, Macedo AM, Pena SD, Chiari E. Chagas' disease diagnosis: comparative analysis of parasitologic, molecular, and serologic methods. Am J Trop Med Hyg. 1999; 60(2):205-10.
- Grisard EC, Campbell DA, Romanha AJ. Miniexon-gen sequence polymorphism among *Trypanosoma rangeli* strains isolated from distinct geographical regions. Parasitology. 1999; 118: 375-382.
- Guhl F, Vallejo GA. *Trypanosoma (Herpetosoma) rangeli* Tejera, 1920 - An updated review. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2003; 98:435-42.
- Gull K. The biology of kinetoplastid parasites: insights and challenges from genomics and post-genomics. Int J Parasitol. 2001; 31:443-52.
- Haag J, O'Huigin C, Overath P. The molecular phylogeny of trypanosomes: evidence for an early divergence of the Salivaria. Mol Biochem Parasitol. 1998; 91(1):37-49.
- 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(1):15-25.
- Hamilton PB, Stevens JR, Gaunt MW, Gidley J, Gibson WC. Trypanosomes are monophyletic: evidence from genes for glyceraldehyde phosphate dehydrogenase and small subunit ribosomal RNA. Int J Parasitol. 2004; 34(12):1393-404.

- Hamilton PB, Stevens JR, Gidley J, Holz P, Gibson WC. A new lineage of trypanosomes from Australian vertebrates and terrestrial bloodsucking leeches (Haemadipsidae). *Int J Parasitol.* 2005a; 35(4):431-43.
- Hamilton PB, Stevens JR, Holz P, Boag B, Cooke B, Gibson WC. The inadvertent introduction into Australia of *Trypanosoma nabiasi*, the trypanosome of the European rabbit (*Oryctolagus cuniculus*), and its potential for biocontrol. *Mol Ecol.* 2005b; 14(10):3167-75.
- Harris E, Kropp G, Belli A, Rodriguez B, Agabian N. Single-step multiplex PCR assay for characterization of New World *Leishmania* complexes. *J Clin Microbiol.* 1998; 36(7):1989-95.
- Hassan MQ, Ghosh A, Ghosh SS, Gupta M, Basu D, Mallik KK, Adhya S. Enzymatic amplification of mini-exon-derived RNA gene spacers of *Leishmania donovani*: primers and probes for DNA diagnosis. *Parasitology.* 1993; 107,5:509-17.
- Helm JR, Wilson ME, Donelson JE. Different trans RNA splicing events in bloodstream and procyclic *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol.* 2008; 159(2):134-7.
- Henriksson J, Dujardin JC, Barnabe C, Brisse S, Timperman G, Venegas J, Pettersson U, Tibayrenc M, Solari A. Chromosomal size variation in *Trypanosoma cruzi* is mainly progressive and is evolutionarily informative. *Parasitology.* 2002; 124(Pt 3):277-86.
- Hernández R, Rios P, Valdés AM, Piñero D. Primary structure of *Trypanosoma cruzi* small-subunit ribosomal RNA coding region: comparison with other trypanosomatids. *Mol Biochem Parasitol.* 1990; 41(2):207-12.
- Herrera HM, Rademaker V, Abreu UG, D'Andrea PS, Jansen AM. Variables that modulate the spatial distribution of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma evansi* in the Brazilian Pantanal. *Acta Trop.* 2007; 102(1):55-62.
- Herrera C, Bargues MD, Fajardo A, Montilla M, Triana O, Vallejo GA, Guhl F. Identifying four *Trypanosoma cruzi* isolate haplotypes from different geographic regions in Colombia. *Infect Genet Evol.* 2007; 7: 535-9.
- Herrera L, Das Chagas Xavier S, Viegas C, Martinez C, Cotias PM, Carrasco H, Urdaneta-Morales S, Jansen AM. *Trypanosoma cruzi* in a caviomorph rodent: parasitological and pathological features of the experimental infection of *Trichomys apereoides* (Rodentia, Echimyidae). *Exp Parasitol.* 2004; 107(1-2): 78-88.
- Hoare CA. Morphological and taxonomic studies on Mammalian Trypanosomes. X. Revision of the Systematics. *J Protozool.* 1964; 11(2):200-7.
- Hoare CA. The trypanosomes of mammals: a zoological monograph. Oxford: Blackwell Scientific Publications; 1972.
- Hollar L, Maslov DA. A phylogenetic view on the genus *Phytomonas*. *Mol Biochem Parasit.* 1997; 89:295-9.
- Honigberg BM. A contribution to systematics of the non-pigmented flagellates. In: Ludvik J, Lom J, Vavra J, editors. *Progress in Protozoology*. New York: Academic Press; 1963. p.68.
- Hughes AL, Piontkivska H. Molecular phylogenetics of Trypanosomatidae: contrasting results from 18S rRNA and protein phylogenies. *Kinetoplastid Biol Dis.* 2003a; 2:15.
- Hughes AL, Piontkivska H. Phylogeny of Trypanosomatidae and Bodonidae (Kinetoplastida) based on 18S rRNA: evidence for paraphyly of *Trypanosoma* and six other genera. *Mol Biol Evol.* 2003b; 20(4):644-52.
- Hypsa V, Tietz DF, Zrzavý J, Rego RO, Galvao C, Jurberg J. Phylogeny and biogeography of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae): molecular evidence of a New World origin of the Asiatic clade. *Mol Phylogenet Evol.* 2002; 23(3):447-57.

- Iwagami M, Higo H, Miura S, Yanagi T, Tada I, Kano S, Agatsuma T. Molecular phylogeny of *Trypanosoma cruzi* from Central America (Guatemala) and a comparison with South American strains. *Parasitol Res.* 2007; 102(1):129-34.
- Jäger AV, De Gaudenzi JG, Cassola A, D'Orso I, Frasch AC. mRNA maturation by two-step trans-splicing/polyadenylation processing in trypanosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007; 104(7):2035-42.
- Junqueira AC, Degraive W, Brandão A. Minicircle organization and diversity in *Trypanosoma cruzi* populations. *Trends Parasitol.* 2005; 21(6):270-2.
- Junqueira AC, Chiari E, Wincker P. Comparison of the polymerase chain reaction with two classical parasitological methods for the diagnosis of Chagas disease in an endemic region of north-eastern Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1996; 90(2):129-32.
- Kawashita SY, Sanson GF, Fernandes O, Zingales B, Briones MR. Maximum-likelihood divergence date estimates based on rRNA gene sequences suggest two scenarios of *Trypanosoma cruzi* intraspecific evolution. *Mol Biol Evol.* 2001; 18(12): 2250-9.
- Kierszenbaum F, Ivanyi J, Budzko DB. Mechanisms of natural resistance to trypanosomal infection. Role of complement in avian resistance to *Trypanosoma cruzi* infection. *Immunology.* 1976; 30(1):1-6.
- Kjos SA, Snowden KF, Olson JK. Biogeography and *Trypanosoma cruzi* Infection Prevalence of Chagas Disease Vectors in Texas, USA. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2008
- Lages-Silva E, Ramírez LE, Pedrosa AL, Crema E, da Cunha Galvão LM, Junho Pena SD, Macedo AM, Chiari E. Variability of kinetoplast DNA gene signatures of *Trypanosoma cruzi* II strains from patients with different clinical forms of Chagas' disease in Brazil. *J Clin Microbiol.* 2006; 44(6):2167-71.
- Lages-Silva E, Crema E, Ramirez LE, Macedo AM, Pena SD, Chiari E. Relationship between *Trypanosoma cruzi* and human chagasic megaesophagus: blood and tissue parasitism. *Am J Trop Med Hyg.* 2001; 65(5):435-41.
- Landweber LF, Gilbert W. Phylogenetic analysis of RNA editing: a primitive genetic phenomenon. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1994; 91(3): 918-21.
- Lane JE, Ribeiro-Rodrigues R, Olivares-Villagómez D, Vnencak-Jones CL, McCurley TL, Carter CE. Detection of *Trypanosoma cruzi* DNA within murine cardiac tissue sections by in situ polymerase chain reaction. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2003; 98(3):373-6.
- Lainson R, Shaw JJ, Naiff RD. Chagas' disease in the Amazon basin: speculations on transmission per os. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 1980; 22(6):294-7.
- Lauria-Pires L, Bogliolo AR, Teixeira AR. Diversity of *Trypanosoma cruzi* stocks and clones derived from Chagas disease patients. II. Isozyme and RFLP characterizations. *Exp Parasitol.* 1996 Mar;82(2):182-90.
- Lisboa CV, Pinho AP, Herrera HM, Gerhardt M, Cupolillo E, Jansen AM. *Trypanosoma cruzi* (kinetoplastida, Trypanosomatidae) genotypes in neotropical bats in Brazil. *Vet Parasitol.* 2008; 156(3-4):314-8.
- Lisboa CV, Mangia RH, Luz SL, Kluczkovski A Jr, Ferreira LF, Ribeiro CT, Fernandes O, Jansen AM. Stable infection of primates with *Trypanosoma cruzi* I and II. *Parasitology.* 2006; 133(Pt 5):603-11.
- Lisboa CV, Mangia RH, Rubião E, de Lima NR, das Chagas Xavier SC, Picinatti A, Ferreira LF, Fernandes O, Jansen AM. *Trypanosoma cruzi* transmission in a captive primate unit, Rio de Janeiro, Brazil. *Acta Trop.* 2004; 90(1):97-106.

Liston AJ, Baker JR. Entry of *Trypanosoma (Schizotrypanum) dionisii* to macrophages in vitro and its subsequent fate therein. *J Gen Microbiol.* 1978;107(2):253-62.

Lukes J, Guilbride DL, Votycka J, Zikova A, Benne R, Englund PT. Kinetoplast DNA network: evolution of an improbable structure. *Eukaryot Cell.* 2002; 1: 495–502.

Lun ZR, Li AX, Chen XG, Lu LX, Zhu XQ. Molecular profiles of *Trypanosoma brucei*, *T. evansi* and *T. equiperdum* stocks revealed by the random amplified polymorphic DNA method. *Parasitol Res.* 2004; 92(4):335-40.

Luquetti AO, Miles MA, Rassi A, de Rezende JM, de Souza AA, Póvoa MM, Rodrigues I. *Trypanosoma cruzi*: zymodemes associated with acute and chronic Chagas' disease in central Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1986; 80(3):462-70.

Lyman DF, Monteiro FA, Escalante AA, Cordon-Rosales C, Wesson DM, Dujardin JP, Beard CB. Mitochondrial DNA sequence variation among triatomine vectors of Chagas' disease. *Am J Trop Med Hyg.* 1999; 60(3): 377-86.

Machado PE, Eger-Mangrich I, Rosa G, Koerich LB, Grisard EC, Steindel M. Differential susceptibility of triatomines of the genus *Rhodnius* to *Trypanosoma rangeli* strains from different geographical origins. *Int J Parasitology.* 2001; 31(5-6):632-4.

Machado CA, Ayala FJ. Nucleotide sequences provide evidence of genetic exchange among distantly related lineages of *Trypanosoma cruzi*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001; 98:7396-401.

Maia da Silva, F., Junqueira, A. C., Campaner, M., Rodrigues, A. C., Crisante, G., Ramirez, L. E., Caballero, Z. C., Monteiro, F. A., Coura, J. R., Añez, N. and Teixeira, M. M. G. Comparative phylogeography of *Trypanosoma rangeli* and *Rhodnius* (Hemiptera: Reduviidae) supports a long coexistence of parasite lineages and their sympatric vectors. *Mol Ecol.* 2007; 16, 3361-73

Maia da Silva F, Noyes H, Campaner M, Junqueira AC, Coura JR, Anez N. Phylogeny, taxonomy and grouping of *Trypanosoma rangeli* isolates from man, triatomines and sylvatic mammals from widespread geographical origin based on SSU and ITS ribosomal sequences. *Parasitology.* 2004b; 129(5):549-61.

Maia da Silva F, Rodrigues AC, Campaner M, Takata CSA, Brigido MC, Junqueira ACV, Coura JR, Takefa GF, Shaw JJ, Teixeira MMG. Randomly amplified polymorphic DNA analysis of *Trypanosoma rangeli* and allied species from human, monkeys and other sylvatic mammals of the Brazilian Amazon disclosed a new group and a species-specific marker. *Parasitology.* 2004a; 128:283–94.

Mair G, Shi H, Li H, Djikeng A, Aviles HO, Bishop JR, Falcone FH, Gavrilescu C, Montgomery JL, Santori MI, Stern LS, Wang Z, Ullu E, Tschudi C. A new twist in trypanosome RNA metabolism: cis-splicing of pre-mRNA. *RNA.* 2000; 6(2):163-9.

Makiuchi T, Annoura T, Hashimoto T, Murata E, Aoki T, Nara T. Evolutionary analysis of synteny and gene fusion for pyrimidine biosynthetic enzymes in Euglenozoa: an extraordinary gap between kinetoplastids and diplomonids. *Protist.* 2008; 159(3):459-70.

Macedo AM, Machado CR, Oliveira RP, Pena SD. *Trypanosoma cruzi*: genetic structure of populations and relevance of genetic variability to the pathogenesis of chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2004; 99 (1):1-12.

Macedo AM, Pimenta JR, Aguiar RS, Melo AI, Chiari E, Zingales B, Pena SD, Oliveira RP. Usefulness of microsatellite typing in population genetic studies of *Trypanosoma cruzi*. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2001; 96(3):407-13.

- Marcilla A, Bargues MD, Abad-Franch F, Panzera F, Carcavallo RU, Noireau F, Galvão C, Jurberg J, Miles MA, Dujardin JP, Mas-Coma S. Nuclear rDNA ITS-2 sequences reveal polyphyly of *Panstrongylus* species (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae), vectors of *Trypanosoma cruzi*. *Infect Genet Evol.* 2002; 1(3):225-35.
- Marinkelle CJ. Biology of the trypanosomes of bats. In WHR Lumsden, DA Evans, *Biology of the Kinetoplastida*, vol 1, Academic Press, London.1976; pp 175-216
- Marinkelle CJ. Developmental stages of *Trypanosoma cruzi*-like flagellates in *Cavernicola pilosa*. *Rev Biol Trop.* 1982a; 30:107-111.
- Marinkelle CJ. Prevalence of *Trypanosoma cruzi*-like infection of Colombian bats. *Ann Trop Med Parasitol.* 1982b; 76, 125-134.
- Martins LP, Castanho RE, Casanova C, Caravelas DT, Frias GT, Ruas-Neto AL, Rosa JA. Rupestrian triatomines infected by Trypanosomatidae, collected in Quarai, Rio Grande do Sul, 2003. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2006; 39(2):198-202.
- Maslov DA, Lukes J, Jirku M, Simpson L. Phylogeny of trypanosomes as inferred from the small and large subunit rRNAs: implications for the evolution of parasitism in the trypanosomatid protozoa. *Mol Biochem Parasitol.* 1996; 75(2):197-205.
- Maslov DA, Simpson L. Evolution of parasitism in kinetoplastid protozoa. *Parasitol Today.* 1995; 11(1):1995.
- Mendonca MB, Nehme NS, Santos SS, Cupolillo E, Vargas N, Junqueira A, Naiff RD, Barrett TV, Coura JR, Zingales B, Fernandes O. Two main clusters within *Trypanosoma cruzi* zymodeme 3 are defined by distinct regions of the ribosomal RNA cistron. *Parasitology.* 2002; 124(Pt 2):177-84.
- Merzlyak E, Yurchenko V, Kolesnikov AA, Alexandrov K, Podlipaev SA, Maslov DA. Diversity and phylogeny of insect trypanosomatids based on small subunit rRNA genes: polyphyly of *Leptomonas* and *Blastocrithidia*. *J Euk Microbiol.* 2001; 48 (2):161-9.
- Meyer A. Evolution of mitochondrial DNA in fishes. In: Hochchka, HN, Mommsen, GT: *Biochemistry and molecular biology of fishes.* 1993. vol. 2.
- Miyamoto MM, Goodman M. Biomolecular systematics os eutherian mammals: phylogenetic patterns and classification. *Syst Zool.* 1996, 35(2):230-240
- Miles MA, Feliciangeli MD, de Arias AR. American trypanosomiasis (Chagas' disease) and the role of molecular epidemiology in guiding control strategies. *BMJ.* 2003; 326(7404):1444-8.
- Miles MA, Povoá MM, de Souza AA, Lainson R, Shaw JJ, Ketteridge DS. Chagas's disease in the Amazon Basin: li. The distribution of *Trypanosoma cruzi* zymodemes 1 and 3 in Pará State, north Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1981a, 75(5): 667-74.
- Miles MA, Cedillos RA, Póvoa MM, de Souza AA, Prata A, Macedo V. Do radically dissimilar *Trypanosoma cruzi* strains (zymodemes) cause Venezuelan and Brazilian forms of Chagas' disease? *Lancet.* 1981b; 20;1(8234):1338-40
- Miles MA, Marsden PD, Pettitt LE, Draper CC, Watson S, Seah SK, Hutt MS, Fowler JM. Experimental *Trypanosoma cruzi* infection in rhesus monkeys 111. Electrocardiographic and histopathological findings. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1979; 73(5): 528-32.
- Miles MA, Souza A, Povoá M, Shaw JJ, Lainson R, Toye PJ. Isozymic heterogeneity of *Trypanosoma cruzi* in the first autochthonous patients with Chagas' disease in Amazonian Brazil. *Nature.* 1978; 272(5656): 819-21.

- Miles MA, Toye PJ, Oswald SC, Godfrey DG. The identification by isoenzyme patterns of two distinct strain-groups of *Trypanosoma cruzi*, circulating independently in a rural area of Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1977; 71(3): 217-25.
- Miles MA, Arias JR, Valente SA, Naiff RD, de Souza AA, Povoá MM, Lima JA, Cedillos RA. Vertebrate hosts and vectors of *Trypanosoma rangeli* in the Amazon Basin of Brazil. *Am J Trop Med Hyg.* 1983; 32(6):1251-9.
- Mkwanzani JB, Franks D, Baker JR. Cytotoxicity of antibody-coated trypanosomes by normal human lymphoid cells. *Nature.* 1976;259 (5542):403-4
- Mkwanzani JB, Franks D, Baker JR. Cytotoxicity of antibody-coated trypanosomes by normal human lymphoid cells. *Nature.* 1976; 259(5542):403-4.
- Molyneux DH. Trypanosomes of bats. In "Parasitic Protozoa". Academic Press, London. 2<sup>nd</sup> ed; 1991; pp 195-223.
- Monteiro FA, Wesson DM, Dotson EM, Schofield CJ, Beard CB. Phylogeny and molecular taxonomy of the Rhodniini derived from mitochondrial and nuclear DNA sequences. *Am J Trop Med Hyg.* 2000; 62, 460–465.
- Monteiro FA, Barrett TV, Fitzpatrick S, Cordon-Rosales C, Feliciangeli D, Beard CB. Molecular phylogeography of the Amazonian Chagas disease vectors *Rhodnius prolixus* and *R. robustus*. *Mol Ecol.* 2003; 12: 997–1006.
- Moreira D, Lopez-Garcia P, Rodriguez-Valera F. New insights into the phylogenetic position of diplomonads: G+C content bias, differences of evolutionary rate, and a new environmental sequence. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2001; 51: 2211–9.
- Moreira D, López-García P, Vickerman K. An updated view of kinetoplastid phylogeny using environmental sequences and a closer outgroup: proposal for a new classification of the class Kinetoplastea. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2004; 54: 1861-75.
- Morel C, Chiari E, Camargo EP, Mattei DM, Romanha AJ, Simpson L. Strains and clones of *Trypanosoma cruzi* can be characterized by pattern of restriction endonuclease products of kinetoplast DNA minicircles. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1980; 77(11): 6810-4.
- Morel C, Simpson L. Characterization of pathogenic trypanosomatidae by restriction endonuclease fingerprinting of kinetoplast DNA minicircles. *Am J Trop Med Hyg.* 1980; 29(5 Suppl): 1070-4.
- Mortara RA, Andreoli WK, Fernandes MC, da Silva CV, Fernandes AB, L'Abbate C, da Silva S. Host cell actin remodeling in response to *Trypanosoma cruzi*: trypomastigote versus amastigote entry. *Subcell Biochem.* 2008; 47:101-9.
- Mott GA, Burleigh BA. The role of host cell lysosomes in *Trypanosoma cruzi* invasion. *Subcell Biochem.* 2008; 47:165-73.
- Murphy WJ, Eizirik E, O'Brien SJ, Madsen O, Scally M, Douady CJ, Teeling E, Ryder OA, Stanhope MJ, Jong WW, Springer MS. Resolution of the early placental radiation using Bayesian phylogenetics. *Science.* 2001; 294(5550): 2348-51.
- Nascentes GA, Meira WS, Lages-Silva E, Ramírez LE. Absence of experimental cross-protection induced by a *Trypanosoma cruzi*-like strain isolated from bats. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2008; 41(2):152-7.
- Nilsson, MA, Arnason, U, Spencer, PBS, Janke, A. Marsupial relationships and a timeline for marsupial radiation in South Gondwana. *Gene.* 2004; 340:189-196.
- Njiru ZK, Constantine CC, Guya S, Crowther J, Kiragu JM, Thompson RC, Davila AM. The use of ITS1 rDNA PCR in detecting pathogenic African trypanosomes. *Parasitol Res.* 2005; 95(3):186-92.

- Noireau F, Carbajal-de-la-Fuente AL, Lopes CM, Diotaiuti L. Some considerations about the ecology of Triatominae. *An Acad Bras Cienc.* 2005; 77 (3):431-6.
- Noireau F, Flores R, Gutierrez T, Abad-Franch F, Flores E, Vargas F. Natural ecotopes of *Triatoma infestans* dark morph and other sylvatic triatomines in the Bolivian Chaco. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2000; 94(1):23-7.
- Noireau F, Zegarra M, Ordoñez J, Gutierrez T, Dujardin JP. Genetic structure of *Triatoma sordida* (Hemiptera: Reduviidae) domestic populations from Bolivia: application on control interventions. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1999; 94 (3):347-51.
- Noyes HA, Arana BA, Chance ML, Maingon R. The *Leishmania hertigi* (Kinetoplastida; Trypanosomatidae) complex and the lizard Leishmania: their classification and evidence for a neotropical origin of the *Leishmania-Endotrypanum* clade. *J Eukaryot Microbiol.* 1997; 44(5):511-7.
- O'Connor O, Bosseno MF, Barnabé C, Douzery EJ, Brenière SF. Genetic clustering of *Trypanosoma cruzi* I lineage evidenced by intergenic miniexon gene sequencing. *Infect Genet Evol.* 2007; 7(5):587-93.
- Oliveira RP, Melo AI, Macedo AM, Chiari E, Pena SD. The population structure of *Trypanosoma cruzi*: expanded analysis of 54 strains using eight polymorphic CA-repeat microsatellites. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1999; 94 Suppl 1:65-70.
- Oliveira RP, Broude NE, Macedo AM, Cantor CR, Smith CL, Pena SD. Probing the genetic population structure of *Trypanosoma cruzi* with polymorphic microsatellites. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998, 95(7):3776-80.
- Oury B, Dutrait N, Bastrenta B, Tibayrenc M. *Trypanosoma cruzi*: evaluation of a RAPD synapomorphic fragment as a species-specific DNA probe. *J Parasitol.* 1997; 83(1):52-7.
- Pacheco RS, de Brito CM, Sarquis O, Pires MQ, Borges-Pereira J, Lima MM. Genetic heterogeneity in *Trypanosoma cruzi* strains from naturally infected triatomine vectors in northeastern Brazil: epidemiological implications. *Biochem Genet.* 2005; 43(9-10):519-30.
- Palfi Z, Lane WS, Bindereif A. Biochemical and functional characterization of the cis-spliceosomal U1 small nuclear RNP from *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol.* 2002; 121(2):233-43.
- Paula AS, Diotaiuti L, Galvão C. Systematic and biogeography of *Rhodiniini* (Heteroptera: Reduviidae: Triatominae) based on 16S mitochondrial rDNA sequences. *J Biogeogr.* 2006; 34, 699–712.
- Pedroso A, Cupolillo E, Zingales B. *Trypanosoma cruzi*: exploring the nuclear genome of ymodeme 3 stocks by chromosome size polymorphism. *Exp Parasitol.* 2007; 116(1):71-6
- Pedroso A, Cupolillo E, Zingales B. Evaluation of *Trypanosoma cruzi* hybrid stocks based on chromosomal size variation. *Mol Biochem Parasitol.* 2003; 129(1):79-90.
- Petry K, Baltz T, Schottelius J. Differentiation of *Trypanosoma cruzi*, *T. cruzi marinkellei*, *T. dionisii* and *T. vespertilionis* by monoclonal antibodies. *Acta Tropica.* 1986; 43:5-13.
- Petry K, Voisin P, Baltz T. Complex lipids as common antigens to *Trypanosoma cruzi*, *T. dionisii*, *T. vespertilionis* and nervous tissue (astrocytes, neurons). *Acta Trop.* 1987; 44(4):381-6.
- Pinto AY, Valente SA, Valente V da C. Emerging acute Chagas disease in Amazonian Brazil: case reports with serious cardiac involvement. *Braz J Infect Dis.* 2004; 8(6):454-60
- Pinto AS, Bento DN. *Trypanosoma cruzi*-like bloodstream trypomastigotes in bats from the State of Piauí, Northeastern Brazil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 1986; 19: 31-34.

- Piontkivska H, Hughes AL. Environmental kinetoplastid-like 18S rRNA sequences and phylogenetic relationships among Trypanosomatidae: paraphyly of the genus *Trypanosoma*. *Mol Biochem Parasitol*. 2005; 144(1):94-9.
- Pough, FH, Janis CM, Heiser JB. *A Vida dos Vertebrados*. São Paulo: Atheneu; 2003.
- Preisfeld A, Busse I, Klingberg M, Talke S, Ruppel HG. Phylogenetic position and inter-relationships of the osmotrophic euglenids based on SSU rDNA data, with emphasis on the Rhabdomonadales (Euglenozoa). *Int J Syst Evol Microbiol*. 2001; 51:751–8.
- Podlipaev SA. Catalogue of World Fauna of Trypanosomatidae (Protozoa). *Proc. Zool. Inst. USSR Acad. Sci. Leningrad*. 1990; 217: 1-177.
- Poux C, Chevret P, Huchon D, de Jong WW, Douzery EJ. Arrival and diversification of caviomorph rodents and platyrrhine primates in South America. *Syst Biol*. 2006;55(2):228-44.
- Póvoa MM, de Souza AA, Naiff RD, Arias JR, Naiff MF, Biancardi CB, Miles MA. Chagas' disease in the Amazon basin IV. Host records of *Trypanosoma cruzi* zymodemes in the states of Amazonas and Rondonia, Brazil. *Ann Trop Med Parasitol*. 1984; 78(5):479-87.
- Requena JM, López MC, Alonso C. Genomic repetitive DNA elements of *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol Today*. 1996; 12(7):279-83.
- Richer W, Kengne P, Cortez MR, Perrineau MM, Cohuet A, Fontenille D, Noireau F. Active dispersal by wild *Triatoma infestans* in the Bolivian Andes. *Trop Med Int Health*. 2007;12(6):759-64.
- Rodrigues AC, Neves L, Garcia HA, Viola LB, Marcili A, Da Silva FM, Sigauque I, Batista JS, Paiva F, Teixeira MM. Phylogenetic analysis of *Trypanosoma vivax* supports the separation of South American/West African from East African isolates and a new *T. vivax*-like genotype infecting a nyala antelope from Mozambique. *Parasitology*. 2008; 135(11):1317-28.
- Rodrigues AC, Paiva F, Campaner M, Stevens JR, Noyes HA, Teixeira MM. Phylogeny of *Trypanosoma (Megatrypanum) theileri* and related trypanosomes reveals lineages of isolates associated with artiodactyl hosts diverging on SSU and ITS ribosomal sequences. *Parasitology*. 2006; 132(Pt 2):215-24.
- Rodrigues AC, Campaner M, Takata CS, Dell' Porto A, Milder RV, Takeda GF, Texeira MMG. Brazilian isolates of *Trypanosoma (Megatrypanum) theileri*: diagnosis and differentiation of isolates from cattle and water buffalo based on biological characteristics and randomly amplified DNA sequences. *Vet Parasitol*. 2003; 116(3):185-207.
- Roellig DM, Ellis AE, Yabsley MJ. Oral transmission of *Trypanosoma cruzi* with opposing evidence for the theory of carnivory. *J Parasitol*. 2008; 2:1.
- Roellig DM, Brown EL, Barnabé C, Tibayrenc M, Steurer FJ, Yabsley MJ. Molecular typing of *Trypanosoma cruzi* isolates, United States. *Emerg Infect Dis*. 2008; 14(7):1123-5.
- Rozas M, Botto-Mahan C, Coronado X, Ortiz S, Cattán PE, Solari A. Coexistence of *Trypanosoma cruzi* genotypes in wild and peridomestic mammals in Chile. *Am J Trop Med Hyg*. 2007; 77(4):647-53.
- Roy J, Faktorová D, Lukes J, Burger G. Unusual mitochondrial genome structures throughout the Euglenozoa. *Protist*. 2007;158(3):385-96.
- Ruas Neto AL, Corseuil E. Hábitos, distribuição geográfica e potencialidade dos triatomíneos rupestres como vetores da doença de Chagas no Rio Grande do Sul, Brasil. *Entomol. Vect*. 2002; 9:231-249.
- Salazar A, Schijman AG, Triana-Chávez O. High variability of Colombian *Trypanosoma cruzi* lineage I stocks as revealed by low-stringency single primer-PCR minicircle signatures. *Acta Trop*. 2006; 100(1-2):110-8.



- Salazar PM, Rojas G, Bucio M, Cabrera M, García G, Ruiz A, Guevara Y, Tapia R. Seroprevalence of *Trypanosoma cruzi* antibodies and associated risk factors among the population under 18 years of age in Veracruz, Mexico. *Rev Panam Salud Publica*. 2007; 22(2):75-82.
- Santos-Mallet JR, Silva CS, Gomes SA, Oliveira DL, Santos CL, Sousa DM, Pinheiro NL, Junqueira AC, Gonçalves TC. Molecular characterization of *Trypanosoma cruzi* sylvatic isolates from Rio de Janeiro, Brazil. *Parasitol Res*. 2008; 103(5):1041-5.
- Santos SS, Cupolillo E, Junqueira A, Coura JR, Jansen A, Sturm NR, et al. The genetic diversity of Brazilian *Trypanosoma cruzi* isolates and the phylogenetic positioning of zymodeme 3, based on the internal transcribed spacer of the ribosomal gene. *Ann Trop Med Parasit*. 2002; 96(8):755-64.
- Schofield CJ, Jannin J, Salvatella R. The future of Chagas disease control. *Trends Parasitol*. 2006; 22(12):583-8.
- Schofield C. *Trypanosoma cruzi* - the vector-parasite paradox. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2000; 95(4):535-44.
- Schofield CJ e Dujardin JP. Theories on the evolution of *Rhodnius*. *Actual. Biol*. 1999; 21:183-197.
- Schofield CJ e Dolling WR. Bedbugs and kissing-bugs (bloodsucking Hemiptera). In: *Medical Insects and Arachnids* (R.P. Lane & R.W. Crosskey, eds.) 1993; pp. 483-516, London: Chapman & Hall.
- Schofield CJ. The biosystematics of Triatominae. In: *Biosystematics of Haematophagous Insects* (M.W. Service, ed.). 1988; pp. 284-312, special volume 37, Oxford: Systematics Association/ Clarendon Press.
- Schonian G, Akuffo H, Lewin S, Maasho K, Nylen S, Pratlong F, Eisenberger CL, Schnur LF, Presber W. Genetic variability within the species *Leishmania aethiopica* does not correlate with clinical variations of cutaneous leishmaniasis. *Mol Biochem Parasitol*. 2000; 106(2):239-48.
- Schottelius J, Uhlenbruck G. Comparative studies of *Trypanosoma cruzi* and *T. cruzi*-like stocks from different South American countries using lectins. *Z Parasitenkd*. 1983; 69(6):727-36.
- Serrano MG, Camargo EP, Teixeira MMG. *Phytomonas*: Analysis of polymorphism and genetic relatedness between isolates from plants and phytophagous insects from different geographic regions by RAPD fingerprints and synapomorphic markers. *J Eukaryot Microbiol*. 1999a; 46(6):618-25.
- Serrano MG, Nunes LR, Campaner M, Buck GA, Camargo EP, Teixeira MMG. Trypanosomatidae: *Phytomonas* detection in plants and phytophagous insects by PCR amplification of a genus-specific sequence of the spliced leader gene. *Exp Parasitol*. 1999b; 91(3):268-79.
- Serrano MG, Campaner M, Buck GA, Teixeira MM, Camargo EP. PCR amplification of the spliced leader gene for the diagnosis of trypanosomatid parasites of plants and insects in methanol-fixed smears. *FEMS Microbiol Lett*. 1999c; 176(1):241-6.
- Shaw JJ. The hemoflagellates of sloths, vermilinguas (anteaters), and armadillos. In *The evolution and ecology of armadillos, sloths and vermilingues* (ed. Montgomery, G.G.), 1985. pp. 279-292. Smithsonian Institute Press, Washington DC.
- Shikanai-Yasuda MA, Marcondes CB, Guedes LA, Siqueira GS, Barone AA, Dias JC, Amato Neto V, Tolezano JE, Peres BA, Arruda Júnior ER, et al. Possible oral transmission of acute Chagas' disease in Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1991; 33 (5):351-7.
- Siegel TN, Tan KS, Cross GA. Systematic study of sequence motifs for RNA trans splicing in *Trypanosoma brucei*. *Mol Cell Biol*. 2005; 25(21):9586-94.

- Silveira AC, Arias AR, Segura E, Guillén G, Russomando G, Schenone H, et al. El control de la enfermedad de Chagas en los Países del Cono Sur de América. Uberaba: Faculdade de Medicina do Triângulo Mineiro; 2002.
- Silveira AC. Situação do controle da doença de Chagas nas Américas. *Cadernos de Saúde Pública* 2000; 16:35-42.
- Simmons NB. Order Chiroptera. In: Wilson, D.E., Reeder, D.M. (Eds.), *Mammal Species of the World: a Taxonomic and Geographic Reference*. 2005; 3rd edn. Smithsonian Institution Press, Washington DC.
- Simpson AGB, Stevens JR, Lukes J. The evolution and diversity of kinetoplastid flagellates. *Trends Parasitol.* 2006; 22(4):168-74.
- Simpson AG, Roger AJ. Protein phylogenies robustly resolve the deep-level relationships within Euglenozoa. *Mol Phylogenet Evol.* 2004; 30:201-12.
- Simpson L, Sbicego S, Aphasizhev R. Uridine insertion/deletion RNA editing in trypanosome mitochondria: A complex business. *RNA*. 2003;9:265-76.
- Simpson AGB, Lukes J, Roger AJ. The evolutionary history of kinetoplastids and their kinetoplasts. *Mol Biol Evol.* 2002; 19:2071-83.
- Simpson L, Theimann OH, Savill NJ, Alfonzo JD. Evolution of RNA editing in trypanosomes mitochondria. *Proc Nat Acad Sci USA*. 2000; 97:6986-93.
- Simpson L. The mitochondrial genome of kinetoplastid protozoa: genomic organization, transcription, replication, and evolution. *Annu Rev Microbiol.* 1987; 41:363-82.
- Sogin ML, Ingold A, Karlok M, Nielsen H, Engberg J. Phylogenetic evidence for the acquisition of ribosomal RNA introns subsequent to the divergence of some of the major Tetrahymena groups. *EMBO J.* 1986; 5(13):3625-30.
- Solari A, Campillay R, Ortiz S, Wallace A. Identification of *Trypanosoma cruzi* genotypes circulating in Chilean chagasic patients. *Exp Parasitol.* 2001; 97(4):226-33.
- Sousa OE, Samudio F, de Juncá C, Calzada JE. Molecular characterization of human *Trypanosoma cruzi* isolates from endemic areas in Panama. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2006; 101(4):455-7.
- Souto RP, Fernandes O, Macedo AM, Campbell DA, Zingales B. DNA markers define two major phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol.* 1996; 83(2):141-52.
- Spotorno O AE, Córdova L, Solari I A. Differentiation of *Trypanosoma cruzi* I subgroups through characterization of cytochrome b gene sequences. *Infect Genet Evol.* 2008.
- Steindel M, Kramer Pacheco L, Scholl D, Soares M, de Moraes MH, Eger I, Kosmann C, Sincero TC, Stoco PH, Murta SM, de Carvalho-Pinto CJ, Grisard EC. Characterization of *Trypanosoma cruzi* isolated from humans, vectors, and animal reservoirs following an outbreak of acute human Chagas disease in Santa Catarina State, Brazil. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2008; 60(1):25-32.
- Steindel M, Grisard EC, Carvalho Pinto CJ, Cordeiro FD, Ribeiro-Rodrigues R, Romanha AJ. Characterization of trypanosomes from the Subgenus *Schizotrypanum* isolated from bats *Eptesicus* sp. (Chiroptera: Vespertilionidae) captured in Florianópolis, Santa Catarina State, Brazil. *J. Parasitol.* 1998; 84, 601-607.
- Steindel M, Dias Neto E, Pinto CJ, Grisard EC, Menezes CL, Murta SM, Simpson AJ, Romanha AJ. Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) and isoenzyme analysis of *Trypanosoma rangeli* strains. *J Eukaryot Microbiol.* 1994; 41(3):261-7.

- Steindel M, Dias Neto E, de Menezes CL, Romanha AJ, Simpson AJ. Random amplified polymorphic DNA analysis of *Trypanosoma cruzi* strains. *Mol Biochem Parasitol.* 1993; 60(1):71-9.
- Steindel M, Pinto CJ. *Trypanosoma cruzi* development in the anal glands of experimentally infected *Lutreolina crassicaudata* (Marsupialia, Didelphidae). *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1988; 83(3):397.
- Stevens JR, Noyes HA, Schofield CJ, Gibson W. The molecular evolution of Trypanosomatidae. *Adv Parasit.* 2001; 48:1-56.
- Stevens J, Rambaut A. Evolutionary rate differences in trypanosomes. *Infect Genet Evol.* 2001; 1(2):143-50.
- Stevens JR, Gibson WC. The molecular evolution of trypanosomes. *Parasitol Today.* 1999a; 15(11):432-7.
- Stevens JR, Gibson WC. The evolution of pathogenic trypanosomes. *Cad Saude Publica.* 1999b; 15(4):673-84.
- Stevens JR, Noyes HA, Dover GA, Gibson WC. The ancient and divergent origins of the human pathogenic trypanosomes, *Trypanosoma brucei* and *T. cruzi*. *Parasitology.* 1999c; 118:107-16.
- Stevens J, Noyes H, Gibson W. The evolution of trypanosomes infecting humans and primates. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1998; 93(5):669-76.
- Stolf BS, Souto RP, Pedroso A, Zingales B. Two types of ribosomal RNA genes in hybrid *Trypanosoma cruzi* strains. *Mol Biochem Parasitol.* 2003; 126(1):73-80.
- Strimmer KN, Von Haeseler A. Quartet puzzling: a quartet maximum likelihood method for reconstructing tree topologies. *Mol Biol Evol.* 1996; 13:964-969.
- Stuart KD, Schnauffer A, Ernst NL, Panigrahi AK. Complex management: RNA editing in trypanosomes. *Trends Biochem Sci.* 2005; 30(2):97-105.
- Stuart K, Feagin JE. Mitochondrial DNA of kinetoplastids. *Int Rev Cytol.* 1992; 141:65-88.
- Sturm NR, Vargas NS, Westenberger SJ, Zingales B, Campbell DA. Evidence for multiple hybrid groups in *Trypanosoma cruzi*. *Int J Parasitol.* 2003; 33(3):269-79.
- Sturm NR, Murthy VK, Garside L, Campbell DA. The mini-exon gene of *Trypanosoma (Nannomonas) simiae*: sequence variation between isolates and a distinguishing molecular marker. *Acta Trop.* 1998; 71(2):199-206.
- Sturm NR, Degraeve W, Morel C, Simpson L. Sensitive detection and schizodeme classification of *Trypanosoma cruzi* cells by amplification of kinetoplast minicircle DNA sequences: use in diagnosis of Chagas' disease. *Mol Biochem Parasitol.* 1989; 33(3):205-14.
- Svobodová M, Zídková L, Cepicka I, Oborník M, Lukes J, Votýpka J. *Sergeia podlipaevi* gen. nov., sp. nov. (Trypanosomatidae, Kinetoplastida), a parasite of biting midges (Ceratopogonidae, Diptera). *Int J Syst Evol Microbiol.* 2007; 57(2):423-32.
- Swofford DL, Olsen GJ, Wadell PJ, Hillis DM. In Hillis DM, Moritz C, Mable BK, editors. *Molecular systematics*. Sunderland, MA: Sinauer Associates; 1996; 407-514.
- Swofford JR. PAUP: Phylogenetic analysis using parsimony. Version 4b6. Sunderland: Sinauer Associates; 1998.
- Tartarotti E, Azeredo-Oliveira MT, Ceron CR. Phylogenetic approach to the study of Triatomines (Triatominae, Heteroptera). *Braz J Biol.* 2006; 66(2B):703-8.
- Teixeira AR, Nitz N, Guimaro MC, Gomes C, Santos-Buch CA. Chagas disease. *Postgrad Med J.* 2006; 82(974):788-98. Review.

- Teixeira MMG, Serrano MG, Nunes LR, Campaner M, Buck GA, Camargo EP. Trypanosomatidae: a spliced-leader-derived probe specific for the genus *Phytomonas*. *Exp Parasitol*. 1996; 84(3):311-9.
- Telleria J, Barnabé C, Hide M, Bañuls AL, Tibayrenc M. Predominant clonal evolution leads to a close parity between gene expression profiles and subspecific phylogeny in *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol*. 2004; 137(1):133-41.
- Thorne KJ, Glauert AM, Svvennsen RJ, Thomas H, Morris J, Franks D. Evasion of the oxidative microbicidal activity of human monocytes by trypomastigotes of *Trypanosoma dionisii*. *Parasitology*. 1981; 83(Pt 1):115-23.
- Thorne KJ, Glauert AM, Svvennsen RJ, Franks D. Phagocytosis and killing of *Trypanosoma dionisii* by human neutrophils, eosinophils and monocytes. *Parasitology*. 1979; 79(3):367-79.
- Tibayrenc M. Genetic subdivisions within *Trypanosoma cruzi* (Discrete Typing Units) and their relevance for molecular epidemiology and experimental evolution. *Kinetoplastid Biol Dis*. 2003; 2(1):12.
- Tibayrenc M, Neubauer K, Barnabe C, Guerrini F, Skarecky D, Ayala FJ. Genetic characterization of six parasitic protozoa: parity between random-primer DNA typing and multilocus enzyme electrophoresis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1993; 90(4):1335-9.
- Tibayrenc M, Le Ray D. General classification of the isoenzymic strains of *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* and comparison with *T. (S.) c. marinkellei* and *T. (Herpetosoma) rangeli*. *Ann La Soc Bel Med Trop*. 1984; 64: 239-48.
- Torres JP, Ortiz S, Muñoz S, Solari A. *Trypanosoma cruzi* isolates from Chile are heterogeneous and composed of mixed populations when characterized by schizodeme and Southern analyses. *Parasitology*. 2004; 128(Pt 2):161-8.
- Uliel S, Liang XH, Unger R, Michaeli S. Small nucleolar RNAs that guide modification in trypanosomatids: repertoire, targets, genome organisation, and unique functions. *Int J Parasitol*. 2004; 34:445-54.
- Urrea DA, Carranza JC, Cuba CA, Gurgel-Goncalves R, Guhl F, Schofield CJ, Triana O, Vallejo GA. Molecular characterisation of *Trypanosoma rangeli* strains isolated from *Rhodnius ecuadoriensis* in Peru, *R. colombiensis* in Colombia and *R. pallenscens* in Panama, supports a co-evolutionary association between parasites and vectors. *Infect. Genet. Evol*. 2005; 5(2):123-9.
- Vago AR, Andrade LO, Leite AA, d'Avila Reis D, Macedo AM, Adad SJ, Tostes S Jr, Moreira MC, Filho GB, Pena SD. Genetic characterization of *Trypanosoma cruzi* directly from tissues of patients with chronic Chagas disease: differential distribution of genetic types into diverse organs. *Am J Pathol*. 2000; 156(5):1805-9.
- Valadares HM, Pimenta JR, de Freitas JM, Duffy T, Bartholomeu DC, Oliveira R de P, Chiari E, Moreira Mda C, Filho GB, Schijman AG, Franco GR, Machado CR, Pena SD, Macedo AM. Genetic profiling of *Trypanosoma cruzi* directly in infected tissues using nested PCR of polymorphic microsatellites. *Int J Parasitol*. 2008; 38(7):839-50.
- Valente VC, Valente SA, Noireau F, Carrasco HJ, Miles MA. Chagas disease in the Amazon Basin: association of *Panstrongylus geniculatus* (Hemiptera: Reduviidae) with domestic pigs. *J Med Entomol*. 1998; 35 (2):99-103.
- Vallejo GA, Guhl F, Carranza JC, Moreno J, Triana O, Grisard EC. Parity between kinetoplast DNA and mini-exon gene sequences supports either clonal evolution or speciation in *Trypanosoma rangeli* strains isolated from *Rhodnius colombiensis*, *R. pallenscens* and *R. prolixus* in Colombia. *Infect. Genet. Evol*. 2003; 3(1):39-45.
- Vallejo GA, Guhl F, Carranza JC, Lozano LE, Sanchez JL, Jaramillo JC, Gualtero D, Castaneda N, Silva JC, Steindel M. kDNA markers define two major *Trypanosoma rangeli* lineages in Latin-America. *Acta Trop*. 2002; 81(1):77-82.

- Vallejo GA, Guhl F, Chiari E, Macedo AM. Species specific detection of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* in vector and mammalian hosts by polymerase chain reaction amplification of kinetoplast minicircle DNA. *Acta Trop.* 1999; 72(2):203-12
- Van der Ploeg LH, Cornelissen AW, Barry JD, Borst P. Chromosomes of kinetoplastida. *EMBO J.* 1984; 3(13):3109-15.
- Vargas N, Pedroso A, Zingales B. Chromosomal polymorphism, gene synteny and genome size in *T. cruzi* I and *T. cruzi* II groups. *Mol Biochem Parasitol.* 2004;138(1) :131-41.
- Ventura RM, Paiva F, Silva RAMS, Takeda G, Buck GA, Teixeira MMG. *Trypanosoma vivax*: Characterization of the spliced leader gene of a Brazilian stock and species-specific detection by PCR amplification of an intergenic spacer sequence. *Exp Parasitol.* 2001; 99:37-48.
- Vickerman K. The diversity of the kinetoplastid flagellates. In: Lumsden, WHR, Evans DA. Editors. *Biology of the kinetoplastida*. New York: Academic; Press 1976. p. 1-34.
- Vickerman K. The evolutionary expansion of the trypanosomatid flagellates. *Int J Parasitol.* 1994; 24(8):1317-31.
- Viola LB, Almeida RS, Ferreira RC, Campaner M, Takata CSA, Rodrigues AC, Paiva F, Camargo EP, Teixeira MMG. Evolutionary history of trypanosomes from South American caiman (*Caiman yacare*) and African crocodiles inferred by phylogenetic analyses using SSU rDNA and *gGAPDH* genes. *Parasitology, in press*
- Viola LB, Campaner M, Takata CSA, Ferreira RC, Rodrigues AC, Freitas RA, et al. Phylogeny of Snake Trypanosomes Inferred by SSU rDNA Sequences, their Possible Transmission by Phlebotomines, and Taxonomic Appraisal by Molecular, Cross-Infection and Morphological Analysis. *Parasitology.* 2008a; 135(5): 595-605.
- Virreira M, Serrano G, Maldonado L, Svoboda M. *Trypanosoma cruzi*: typing of genotype (sub) lineages in megacolon samples from bolivian patients. *Acta Trop.* 2006; 100(3):252-5.
- Virreira M, Torrico F, Truyens C, Alonso-Vega C, Solano M, Carlier Y, Svoboda M. Comparison of polymerase chain reaction methods for reliable and easy detection of congenital *Trypanosoma cruzi* infection. *Am J Trop Med Hyg.* 2003; 68(5):574-82.
- von der Heyden S, Chao EE, Vickerman K, Cavalier-Smith T. Ribosomal RNA phylogeny of bodonid and diplomonid flagellates and the evolution of euglenozoa. *J Eukaryot Microbiol.* 2004; 51(4):402-16.
- Xavier SS, Sousa AS, Viñas PA, Junqueira AC, Bóia MN, Coura JR. Chronic chagasic cardiopathy in the Rio Negro, Amazon State. Report of three new autochthonous cases confirmed by serology, clinical examination, chest X-rays, electro and echocardiography. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2006; 39(2):211-6
- Wagner W, So M. Genomic variation of *Trypanosoma cruzi*: involvement of multicopy genes. *Infect Immun.* 1990; 58(10):3217-24.
- Wallace FG. The trypanosomatid parasites of insects and arachnids. *Exp Parasitol.* 1966; 18:124-93.
- Wallace FG. Biology of the Kinetoplastida of Arthropods. In: Lumsden WHR, Evans DA, editors. *Biology of the Kinetoplastida*. New York: Academic Press; 1979. p. 213-40.
- Westenberger SJ, Sturm NR, Campbell DA. *Trypanosoma cruzi* 5S rRNA arrays define five groups and indicate the geographic origins of an ancestor of the heterozygous hybrids. *Int J Parasitol.* 2006; 36(3):337-46.
- Westenberger, S. J., Barnabé, C., Campbell, D. A. and Sturm, N. R. Two hybridization events define the population structure of *Trypanosoma cruzi*. *Genetics.* 2005; 171:527-543.

- Wincker P, Britto C, Pereira JB, Cardoso MA, Oelemann W, Morel CM. Use of a simplified polymerase chain reaction procedure to detect *Trypanosoma cruzi* in blood samples from chronic chagasic patients in a rural endemic area. *Am J Trop Med Hyg.* 1994; 51(6):771-7.
- Worthey EA, Schnauffer A, Mian IS, Stuart K, Salavati R. Comparative analysis of editosome proteins in trypanosomatids. *Nucleic Acids Res.* 2003; 31:6392-408.
- Wright AD, Li S, Feng S, Martin DS, Lynn DH. Phylogenetic position of the kinetoplastids, *Cryptobia bullocki*, *Cryptobia catostomi*, and *Cryptobia salmositica* and monophyly of the genus *Trypanosoma* inferred from small subunit ribosomal RNA sequences. *Mol Biochem Parasitol.* 1999; 15; 99(1):69-76.
- Yeo M, Acosta N, Llewellyn M, Sánchez H, Adamson S, Miles GA, López E, González N, Patterson JS, Gaunt MW, de Arias AR, Miles MA. Origins of Chagas disease: *Didelphis* species are natural hosts of *Trypanosoma cruzi* I and armadillos hosts of *Trypanosoma cruzi* II, including hybrids. *Int J Parasitol.* 2005; 35(2):225-33
- Yoshida N, Cortez M. *Trypanosoma cruzi*: parasite and host cell signaling during the invasion process. *Subcell Biochem.* 2008; 47:82-91.
- Yoshida N. *Trypanosoma cruzi* infection by oral route: how the interplay between parasite and host components modulates infectivity. *Parasitol Int.* 2008; 57(2):105-9.
- Yoshida N. Molecular basis of mammalian cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. *An Acad Bras Cienc.* 2006; 78(1):87-111.
- Zalloum L, Gomes ML, Kinoshita AT, Toledo MJ, Prioli AJ, de Araújo SM. *Trypanosoma cruzi*: two genetic groups in Paraná state, Southern Brazil. *Exp Parasitol.* 2005; 111(1):55-8.
- Zemanová E, Jirků M, Mauricio IL, Miles MA, Lukes J. Genetic polymorphism within the *Leishmania donovani* complex: correlation with geographic origin. *Am J Trop Med Hyg.* 2004; 70(6):613-7.
- Zingales B, Stolf BS, Souto RP, Fernandes O, Briones MR. Epidemiology, biochemistry and evolution of *Trypanosoma cruzi* lineages based on ribosomal RNA sequences. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1999; 94 Suppl 1:159-64.
- Zingales B, Souto RP, Mangia RH, Lisboa CV, Campbell DA, Coura JR, Jansen A, Fernandes O. Molecular epidemiology of American trypanosomiasis in Brazil based on dimorphisms of rRNA and mini-exon gene sequences. *Int J Parasitol.* 1998; 28(1):105-12.
- Zulantay I, Apt W, Gil LC, Rocha C, Mundaca K, Solari A, Sánchez G, Rodríguez C, Martínez G, De Pablos LM, Sandoval L, Rodríguez J, Vilchez S, Osuna A. The PCR-based detection of *Trypanosoma cruzi* in the faeces of *Triatoma infestans* fed on patients with chronic American trypanosomiasis gives higher sensitivity and a quicker result than routine xenodiagnosis. *Ann Trop Med Parasitol.* 2007; 101(8):673-9.