

Trypanosoma cruzi: um parasita, dois parasitas ou vários parasitas da doença de chagas?

Trypanosoma cruzi: one parasite, two parasites or several parasites of chagas disease?

Bianca Zingales^{1,2}

¹Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo

²Disease Reference Group do TDR sobre doença de Chagas, Leishmaniose e Tripanossomíase Africana

Resumo. O *Trypanosoma cruzi* apresenta uma elevada heterogeneidade genética e muitos marcadores moleculares podem ser utilizados para a genotipagem das cepas do parasita em diversos subgrupos. Nesta revisão exploraremos a evolução e estrutura populacional de *T. cruzi*, bem como as implicações na epidemiologia da doença de Chagas

Palavras-chave. Diversidade genética, evolução, epidemiologia molecular.

Abstract. *Trypanosoma cruzi* shows extremely high levels of genetic diversity and many molecular markers can be used to genotype the parasite strains into various subgroups. Here, the evolution and population structure of *T. cruzi* are reviewed along with the implications in the epidemiology of Chagas disease.

Keywords. Genetic diversity, evolution, molecular epidemiology.

Contato do autor:

zingales@iq.usp.br

Recebido 20set10

Aceito 01mar11

Publicado 22jul11

História natural da doença de Chagas

A história natural da doença de Chagas iniciou há milhões de anos como uma doença enzoótica de animais silvestres. Quando o homem aventurou-se nos ecótopos naturais, a doença começou a ser transmitida acidentalmente ao homem como uma antroponose. A doença de Chagas endêmica estabeleceu-se como uma zoonose há 200-300 anos, como resultado do desmatamento provocado pela expansão da agricultura e agropecuária, que promoveu a adaptação de insetos silvestres ao ambiente doméstico, na procura de nova fonte alimentar. Hoje, estima-se que na América Latina cerca de 12 milhões de pessoas estejam infectadas com o *Trypanosoma cruzi* e que 75 milhões estejam expostas à infecção.

O protozoário *T. cruzi*, seus reservatórios mamíferos e insetos vetores triatomíneos existem na natureza há milhões de anos. O gambá, um dos reservatórios silvestres mais importantes, desempenha um papel relevante na epidemiologia da doença de Chagas, uma vez que este marsupial circula no ambiente silvestre, peridoméstico e doméstico em busca de alimento. Ao mesmo tempo, cães e gatos podem invadir o ambiente silvestre para caçar, adquirindo a infecção e trazendo-a também para o peridomicílio e domicílio. A adaptação dos insetos vetores triatomíneos às moradias certamente é o fator preponderante para o estabelecimento da infecção humana.

Em 15 de abril de 1909, um dia após ter detecta-

do flagelados na circulação de uma criança, Carlos Chagas escreveu uma nota anunciando a descoberta de uma nova tripanossomíase humana. A acuidade científica de Carlos Chagas permitiu-lhe descrever, em um curto espaço de tempo, o parasita, que ele denominou *T. cruzi*, seus reservatórios silvestres, seu desenvolvimento nos triatomíneos e as características clínicas da doença. Em 2009, em comemoração aos 100 anos desta descoberta memorável, foram publicadas várias revisões e um suplemento especial das Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, cuja leitura recomendamos aos interessados (Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 2009).

Levantamentos epidemiológicos realizados em países da América Latina indicam que a doença de Chagas tem diferentes apresentações clínicas: cerca de 70% dos indivíduos são assintomáticos, ao passo que cardiomiopatias severas, lesões digestivas e distúrbios neurológicos são observados em 30% dos indivíduos infectados. É importante mencionar que, anualmente, 2 a 3% dos indivíduos assintomáticos passam a apresentar as manifestações cardíacas ou digestivas, ou ambas. Os determinantes desta conversão são desconhecidos. A prevalência das manifestações da doença e sua suscetibilidade ao tratamento variam geograficamente. A comunidade científica há tempo debate se isto é o resultado da variabilidade genética do parasita, da imunogenética do hospedeiro humano, de fatores ambientais ou da ação combinada destes elementos.

Nesta revisão exploraremos o aspecto da diversidade genética do *T. cruzi*, sua possível origem evolutiva e im-

plicações na epidemiologia da doença de Chagas.

Diversidade genética do *T. cruzi*

A inusitada heterogeneidade biológica dos isolados do *T. cruzi*, quanto à sua morfologia, conteúdo de DNA, virulência, patogenicidade, suscetibilidade a drogas, e outros parâmetros, está amplamente documentada na literatura. Desde a década de 70, estas observações estimularam a busca de marcadores moleculares que pudessem correlacionar o genótipo do parasita com as manifestações clínicas da doença de Chagas. Desta forma, o *T. cruzi* tornou-se um modelo favorito para estudos de epidemiologia molecular e genética de população, sendo, possivelmente, o patógeno cuja evolução e estrutura populacional sejam mais conhecidas.

T. cruzi apresenta um padrão de evolução reticulada, com predomínio de propagação clonal (em que a progênie é geneticamente idêntica, ou muito semelhante, à linhagem parental) e eventos ocasionais de recombinação genética, que originam linhagens híbridas, estabilizadas, subsequentemente, por propagação clonal. Até o momento, um único laboratório foi capaz de demonstrar experimentalmente a capacidade de *T. cruzi* de realizar trocas genéticas, via um mecanismo pouco usual de fusão nuclear; formação de uma progênie poliplóide, que pode sofrer recombinação entre alelos e que, após perda cromossômica, pode retornar ao estado diplóide (Gaunt e col., 2003; Lewis e col., 2009). Este processo assemelha-se ao processo parasexual observado em fungos (Heitman, 2006).

Os primeiros estudos de genética de população do *T. cruzi* basearam-se na análise do perfil eletroforético de isoenzimas, historicamente utilizadas para explorar a diversidade genética de microorganismos. Tais estudos revelaram a presença de três grupos principais, denominados zimodemas (Miles e col., 1978; 1980). A análise subsequente de um número maior de loci genéticos em um número maior de isolados ampliou a diversidade para 43 zimodemas (Tibayrenc e Ayala, 1988). Estes estudos forneceram evidências convincentes de que *T. cruzi* é um organismo diplóide, que a reprodução sexual é inexistente e que a estrutura populacional é clonal (Tibayrenc e Ayala, 1988; Tibayrenc, 1995). A diversidade genética do parasita foi corroborada por análises de RAPD (“randomly amplified polymorphic DNA”), RFLP (“restriction fragment length polymorphism”), impressões digitais de DNA (“DNA fingerprinting”), microsátélites e cariótipo molecular (revisto em Zingales e col., 1999). Por outro lado, e conforme esperado dada a natureza destas metodologias baseada em marcadores genéticos de evolução rápida, tais abordagens não permitiram definir agrupamentos de parasitas que permitissem sua associação com características epidemiológicas.

Contrastando com a hipervariabilidade observada com aqueles marcadores, a análise de sequências de genes com menor taxa evolutiva, tais como genes de RNA ribossômico, marcadores clássicos de evolução e genes de mini-exon, marcadores taxonômicos de tripanossomatídeos, indicou um claro dimorfismo nos isolados de *T.*

cruzi, definindo dois grupos (Souto e col., 1996). Foram padronizados ensaios de amplificação por PCR, dirigidos para o domínio divergente D7 do LSU rDNA e região intergênica do mini-exon, permitindo uma tipagem molecular rápida, que passou a ser amplamente utilizada pela comunidade para fins epidemiológicos (Figura 1). Nestes ensaios, dois tamanhos de amplicons são observados para o gene do LSU (110 pb e 125 pb) e para o gene de mini-exon (350 pb e 300 pb). Curiosamente, em alguns isolados foi observada a presença dos dois amplicons do LSU, o que sugeriu que estes isolados poderiam ser híbridos (Souto e col., 1996; ver legenda da Figura 1). A análise de 50-60 loci por RAPD confirmou que os dois grupos correspondem a duas linhagens filogenéticas principais (Souto e col., 1996). Dentro de cada linhagem, os isolados apresentam 98-100% de similaridade da sequência do domínio D7 do LSU rDNA, ao passo que entre as linhagens a similaridade é de aproximadamente 80% (Souto e col., 1996). Isto sugere que a divergência entre as linhagens 1 e 2 ocorreu antes da divergência entre os isolados (isto é, que as linhagens são monofiléticas).

A existência das duas linhagens e a presença de isolados híbridos foi confirmada por uma série de marcadores moleculares e cada laboratório as designou com nomenclaturas diferentes (revisto em Zingales e col., 1999). Visando padronizar esta nomenclatura, um comitê de expertos decidiu que as linhagens fossem denominadas “grupos” *T. cruzi* I e *T. cruzi* II (Anônimo, 1999). O comitê não atribuiu nenhuma classificação taxonômica aos “grupos”, ou seja, se os dois grupos constituem subespécies, espécies crípticas ou quase-espécies. O comitê também decidiu não classificar os isolados híbridos em nenhum grupo e recomendou que estudos adicionais fossem realizados para melhor caracterizar estes organismos.

A relevância epidemiológica da divisão de *T. cruzi* em dois grupos foi investigada, inicialmente, em países

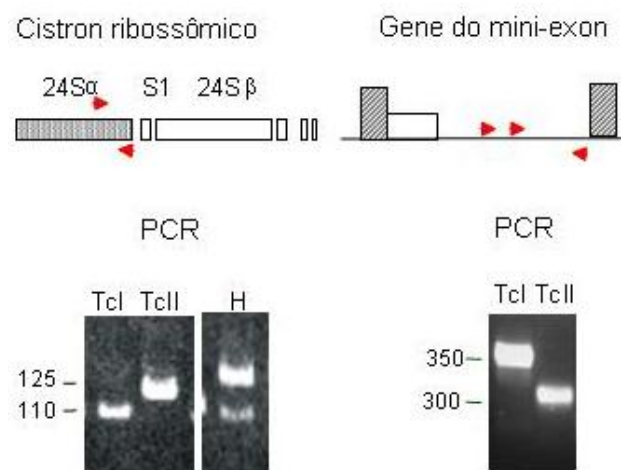


Figura 1. Tipagem molecular de isolados de *T. cruzi*. PCR dirigida para o domínio D7 do LSU rDNA (24S rDNA) e espaçador intergênico do gene de mini-exon (ME). Linhagem TcI: 110 pb rDNA; 350 pb ME; Linhagem TcII: 125 pb rDNA; 300 pb ME; Híbrido (H): 110 e 125 pb rDNA; 300 pb ME. Iniciadores da PCR: setas vermelhas (Souto e col., 1996).

do Cone Sul, concluindo-se que *T. cruzi* II predomina no ciclo doméstico da transmissão, sendo responsável pela doença de Chagas em humanos (Breniere e col., 1998; Fernandes e col., 1998; Zingales e col., 1998). A genotipagem de isolados de reservatórios silvestres e triatomíneos da Mata Atlântica do Rio de Janeiro mostrou um fato interessante, ou seja, a adaptação preferencial de *T. cruzi* I a gambás e de *T. cruzi* II a primatas. Nos triatomíneos, os dois grupos foram observados (Fernandes e col., 1999). O conjunto de informações nos levou a propor os possíveis ciclos de transmissão dos dois grupos de parasitas, representados na Figura 2. Maiores informações podem ser obtidas em Zingales e col. (1998).



Figura 2. Ciclos de transmissão do *T. cruzi*. *T. cruzi* I predomina nos reservatórios silvestres, ao passo que *T. cruzi* II é responsável pela doença de Chagas no ciclo doméstico. A ligação entre os dois ciclos é feita por insetos vetores que carregam *T. cruzi* II para o domicílio (Zingales e col., 1998).

Evolução dos grupos *T. cruzi* I e *T. cruzi* II

Há um consenso de que a dispersão e isolamento de parasitas sejam limitados pela dispersão de seus hospedeiros, os quais, no caso do *T. cruzi*, são diversas ordens de mamíferos e insetos vetores das famílias Reduviidae e Triatominae. A evolução dos dois grupos de *T. cruzi* foi investigada a partir da análise de sequências do SSU rDNA (Briones e col., 1999). Árvores filogenéticas sugerem que os grupos *T. cruzi* I e *T. cruzi* II divergiram entre 88 e 37 milhões de anos atrás. A correlação entre esta datação e a história evolutiva da fauna de mamíferos terrestres das Américas sugere que o grupo *T. cruzi* I seja indígena da América do Sul, ao passo que *T. cruzi* II tenha sido introduzido na América do Sul mais recentemente, juntamente com os placentários da América do Norte, após a conexão das Américas no Plioceno (há 5 milhões de anos) ou com roedores caviomorfos e primatas no Oligoceno (há 38 milhões de anos) (Briones e col., 1999). De acordo com esta suposição, os dois grupos teriam co-evoluído nas Américas com marsupiais (*T. cruzi* I) e placentários (*T. cruzi* II) durante o Cenozóico. Outros autores, baseados na sequência de dois genes específicos de tripanossomas, estimaram entre 16 e 3 milhões de anos atrás a divergência dos dois grupos (Machado e Ayala, 2001). Acreditamos que este tema seja de especial interesse para biólogos e recomendamos a leitura dos artigos citados.

Classificação atual dos grupos de *T. cruzi*

Nos dez anos que sucederam o consenso do comitê de expertos, a comunidade científica continuou ex-

plorando a diversidade dos isolados de *T. cruzi*. Os estudos foram centrados na análise de sequências gênicas de isolados híbridos, sugerindo que dois eventos discretos de trocas genéticas originaram 4 grupos distintos de isolados (revisto em Sturm e Campbell, 2009). Deve ser mencionado que a cepa CL Brener, referência do Projeto Genoma de *T. cruzi*, é um organismo híbrido, que apresenta os dois haplótipos parentais, com uma divergência média de sequência de 5,4% (El-Sayed e col., 2005).

A análise de marcadores anônimos de MLEE (“multilocus enzyme electrophoresis”) e de RAPD sugeriu a divisão do grupo *T. cruzi* II em cinco sub-grupos, que incluem os 4 grupos híbridos mencionados acima (Brisse e col., 2000). Um terceiro grupo ancestral, denominado *T. cruzi* III, foi proposto a partir da análise de microsátelites e DNA mitocondrial (Freitas e col., 2006).

Em 2009, a comunidade científica sentiu a necessidade de padronizar mais uma vez a nomenclatura dos grupos de *T. cruzi*, para facilitar a comunicação entre os pesquisadores, visando o entendimento de questões de biologia básica, de características eco-epidemiológicas e de patogenicidade dos grupos. Assim, em comemoração ao centenário da descoberta da doença de Chagas, foi organizado um simpósio com um comitê de expertos, muitos dos quais estavam presentes na reunião de 1999. As recomendações deste comitê podem ser vistas em Zingales e col. (2009). Basicamente, o comitê recomenda que: (i) *T. cruzi* seja dividido em seis grupos (*T. cruzi* I–VI); (ii) cada grupo seja denominado DTU (“discrete typing unit”), onde DTU é definido com um conjunto de isolados que é geneticamente semelhante e que pode ser identificado por marcadores moleculares ou imunológicos comuns (Tibayrenc, 1998); (iii) as DTUs *T. cruzi* I e *T. cruzi* II correspondem aos dois grupos originalmente definidos na primeira reunião de expertos (Anônimo, 1999).

Em nossa visão e conforme discutido abaixo, as DTUs III–VI correspondem a organismos híbridos, originados a partir de diferentes eventos de trocas genéticas.

Desta forma, ao longo dos anos, observamos uma alternância de tendências “taxonômicas” de classificação da diversidade genética do *T. cruzi*. Nos anos 70 e 80, um grande número de “grupos” foi identificado; nos anos 90 e 2000, apenas dois grupos principais; e, atualmente, seis grupos.

Características epidemiológicas das DTUs

Uma revisão parcial da literatura sobre a distribuição das DTUs em humanos indica a prevalência da DTU I em pacientes do México, América Central, países do Norte da América do Sul e Amazônia (referências em Carranza e col., 2009). Nestes pacientes são observadas as formas indeterminada e cardíaca da doença de Chagas. Para outros países da América do Sul, a distribuição das DTUs em humanos é mostrada na Figura 3, onde se indica a prevalência das manifestações cardíaca e digestiva (referências em Carranza e col., 2009).

As principais conclusões destas observações são:

As DTUs apresentam distribuição geográfica distinta;
Todas as DTUs são capazes de promover a doença

de Chagas, embora haja pouquíssimos relatos da DTU IV em humanos;

A DTU I não favorece a forma digestiva;

As DTUs II e V aparentemente seriam mais “patogênicas”, promovendo as manifestações cardíaca e digestiva.

Este panorama não pode ser considerado definitivo, uma vez que foi compilado a partir de amostras de tamanho reduzido, originárias de algumas regiões endêmicas.

Outras informações sobre a epidemiologia dos seis grupos podem ser obtidas em Miles e col. (2009).

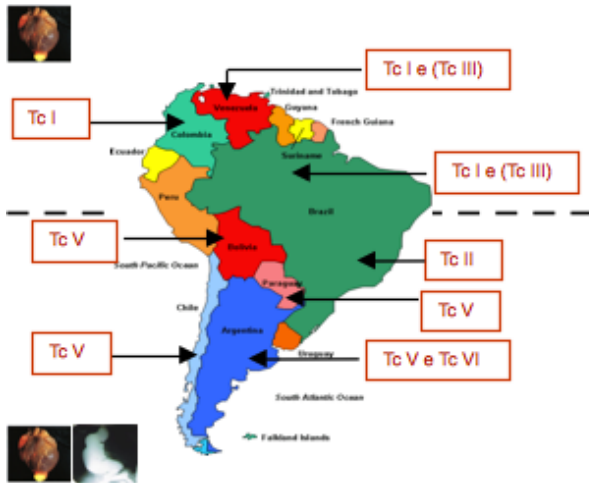


Figura 3. Distribuição epidemiológica das DTUs em humanos da América do Sul. Prevalência das formas cardíaca e assintomática nos países ao Norte da linha pontilhada e das formas cardíaca, digestiva e assintomática, ao Sul.

Uma espécie ou duas espécies

Um aspecto que vem sendo bastante debatido é se os grupos *T. cruzi* I e *T. cruzi* II correspondem a duas espécies distintas. Análises filogenéticas, baseadas na sequência do LSU rDNA, indicam que a distância entre os dois grupos é maior do que a distância média entre diferentes espécies de *Leishmania* (Briones e col., 1999). Tal nível de divergência sugere a evolução independente das duas linhagens por um longo período de tempo.

A distribuição de haplótipos de cinco genes nucleares e de um DNA satélite foi analisada em isolados representativos das seis DTUs no contexto de genealogias em rede (“network genealogies”) e filogenias Bayesianas. Os dados indicam que as DTUs *T. cruzi* I e *T. cruzi* II são monofiléticas e que as demais DTUs apresentam diferentes combinações dos haplótipos *T. cruzi* I e *T. cruzi* II e haplótipos DTU-específicos (Tomazi e col., 2009; Jenne e col., 2010). Uma das interpretações para esta observação é que *T. cruzi* I e *T. cruzi* II são duas espécies distintas e que as DTUs II-IV são híbridos, resultantes de eventos independentes de hibridização/recombinação genômica.

Aqueles que favorecem a hipótese de duas espécies, o fazem baseados em evidências quantitativas e perguntam: “Por que *Leishmania donovani* e *Leishmania chagasi*, separadas por uma distância genética menor do que aquela entre os dois grupos de *T. cruzi* são consideradas duas espécies e *T. cruzi*, não?”. “Uma vez que o conceito de espécie é bastante controverso, qual o critério para

se considerar *T. cruzi* uma única espécie?”. Por outro lado, aqueles que preferem considerar *T. cruzi* uma única espécie utilizam argumentos qualitativos de que todas as DTUs são capazes de provocar a doença de Chagas e que novas espécies de patógenos devem ser propostas apenas quando critérios filogenéticos e médico-fenotípicos forem claramente estabelecidos.

Em nossa avaliação mais pragmática, no momento, é fundamental desenvolver uma metodologia simples e direta para a tipagem das DTUs, que possa ser utilizada por pesquisadores de países endêmicos e que permita estabelecer as características epidemiológicas e clínicas dos isolados, tendo como possível aplicação o prognóstico da evolução da doença de Chagas (conversão de indivíduos assintomáticos para sintomáticos) e seu tratamento.

Bibliografia

- Anônimo (1999). Recommendations from a satellite meeting. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 94, (Suppl. 1), 429-432.
- Breniere, S.F., Bosseno, M-F, Telleria, J., Bastrenta, B., Yacsik, N., Noireau, E., Alcazar, J. L., Barnabé, C., Wincker, P., Tibayrenc, M. (1998). Different behavior of two *Trypanosoma cruzi* major clones: transmission and circulation in young bolivian patients. *Experimental Parasitology* 89, 285-295.
- Briones, M. R. S., Souto, R. P., Stolf, B. S., Zingales, B. (1999). 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. *Molecular and Biochemical Parasitology* 104, 219-232.
- Brisse, S., Barnabé, C., Tibayrenc, M. (2000). Identification of six *Trypanosoma cruzi* phylogenetic lineages by random amplified polymorphic DNA and multilocus enzyme electrophoresis. *International Journal for Parasitology* 30, 34-44.
- Carranza, J. C., Valadares, H. M. S., D’Ávila, D. A., Baptista, R. P., Moreno, M., Galvão, L. M. C., Chiari, E., Sturm, N. R., Gontijo, E. D., Macedo, A. M., Zingales, B. (2009). *Trypanosoma cruzi* maxicircle heterogeneity in Chagas disease patients from Brazil. *International Journal for Parasitology* 39, 963-973.
- El-Sayed, N. M., Myler, P. J., Bartholomeu, D. C. et al. (2005). The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. *Science* 309, 409-415.
- Fernandes, O., Souto, R. P., Castro, J. A., Borges, J., Carrara, N., Junqueira, A. C., Naiff, R., Barret, T.V., Degraive, W., Zingales, B., Campbell, D. A., Coura, J. R. (1998). Brazilian isolates of *Trypanosoma cruzi* from humans and triatomines classified into two lineages using mini-exon and ribosomal RNA sequences. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 58, 807-811.
- Fernandes, O., Mangia, R. H., Lisboa, C. V., Pinho, A. P., Morel C. M., Zingales, B., Campbell, D. A., Jansen, A. M. (1999). 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* 118, 161-166.
- Freitas, J. M., Augusto-Pinto, L., Pimenta, J. R., Bastos-Rodrigues, L., Gonçalves, V. F., Teixeira, S. M. R., Chiari, E., Junqueira, A. C. V., Fernandes, O., Macedo, A. M., Machado, C. R., Pena, S. D. J. (2006). Ancestral genomes,

- sex, and the population structure of *Trypanosoma cruzi*. PLoS Pathogen 2, 226-235 (e24).
- Gaunt, M. W., Yeo, M., Frame, I. A., Stothard, J. R., Carrasco, H. J., Taylor, M. C., Mena, S. S., Veazey, P., Miles, G. A. J., Acosta, N., Arias, A. R., Miles, M. (2003). Mechanism of genetic exchange in American trypanosomes. Nature 421, 936-939.
- Heitman, J. (2006). Sexual reproduction and the evolution of microbial pathogens. Current Biology 16, R711-725.
- Inne, S., Pedroso, A., Carmona e Ferreira, R., Briones, M. R. S., Zingales, B. (2010). Network genealogy of 195-bp satellite DNA supports the superimposed hybridization hypothesis of *Trypanosoma cruzi* evolutionary pattern. Infection, Genetics and Evolution 10, 601-606.
- Lewis, M. D., Llewellyn, M. S., Gaunt, M. W., Yeo, M., Carrasco, H. J., Miles, M. A. (2009). Flow cytometric analysis and microsatellite genotyping reveal extensive DNA content variation in *Trypanosoma cruzi* populations and expose contrasts between natural and experimental hybrids. International Journal for Parasitology 39, 1305-1317.
- Machado, C. A., Ayala, F. J. (2001). Nucleotide sequences provide evidence of genetic exchange among distantly related lineages of *Trypanosoma cruzi*. Proceedings of the National Academy of Sciences. USA 98, 7396-7401.
- Memórias do Instituto Oswaldo Cruz (2009) 104, (Suppl. 1), 332 páginas.
- Miles, M. A., Llewellyn, M. S., Lewis, M. D., Yeo, M., Baleela, R., Fitzpatrick, S., Gaunt, M. W., Mauricio, I. L. (2009). The molecular epidemiology and phylogeography of *Trypanosoma cruzi* and parallel research on *Leishmania*: looking back and to the future. Parasitology 136, 1509-1528.
- Miles M. A., Souza, A., Póvoa, M., Shaw, J. J., Lainson, R., Toyé, P. J. (1978). Isozymic heterogeneity of *Trypanosoma cruzi* in the first autochthonous patient with Chagas disease in Amazonian Brazil. Nature 272, 819-821.
- Miles, M. A., Lanham, S. M., Souza, A. A., Póvoa, M. (1980). Further enzymic characters of *Trypanosoma cruzi* and their evaluation for strain identification. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 74, 221-237.
- Souto, R. P., Fernandes, O., Macedo, A. M., Campbell, D. A., Zingales, B. (1996). DNA markers define two major phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi*. Molecular and Biochemical Parasitology. 83, 141-152.
- Sturm, N. R., Campbell D. A. (2009). Alternative lifestyles: The population structure of *Trypanosoma cruzi*. Acta Tropica. doi:10.1016/j.actatropica.2009.08.018.
- Tibayrenc, M. (1995). Population genetics of parasitic protozoa and other microorganisms. Advances in Parasitology 36, 47-115.
- Tibayrenc, M., Ayala, F. J. (1988). Isoenzyme variability in *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease: genetical, taxonomical and epidemiological significance. Evolution 42, 277-292.
- Tibayrenc, M. (1998). Genetic epidemiology of parasitic protozoa and other infectious agents: the need for an integrated approach. International Journal for Parasitology 28, 85-104.
- Tomazi, L., Kawashita, S. Y., Pereira, P. M., Zingales, B., Briones, M. R. S. (2009). Haplotype distribution of five nuclear genes based on network genealogies and Bayesian inference indicates that *Trypanosoma cruzi* hybrid strains are polyphyletic. Genetics and Molecular Research 8, 458-476.
- Zingales, B., Andrade, S. G., Briones, M. R. S., Campbell, D. A., Chiari, E., Fernandes, O., Guhl, F., Lages-Silva, E., Macedo, A. M., Machado, C. R., Miles, M. A., Romanha, A. J., Sturm, N. R., Tibayrenc, M., Schijman, A. G. (2009). A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 104, 1051-1054.
- Zingales B., Souto, R. P., Mangia, R. H., Lisboa, C. V., Campbell, D. A., Coura, J. R., Jasen, A., Fernandes, O. (1998). Molecular epidemiology of american trypanosomiasis in Brazil based on dimorphism of rRNA and mini-exon gene sequences. International Journal for Parasitology 28, 105-112.
- Zingales, B., Stolf, B. S., Souto, R. P., Fernandes, O., Briones, M. R. S. (1999). Epidemiology, biochemistry and evolution of *Trypanosoma cruzi* lineages based on ribosomal RNA sequences. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 94, 811-814.