

**THIAGO KURY MORENO DE SOUZA**

**Caracterização morfométrica, molecular e verificação  
da capacidade infectiva de cepas de *Trypanosoma  
cruzi*, isoladas de hospedeiros humanos e não  
humanos no estado de São Paulo, Brasil.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

**Área de Concentração:** Pesquisas Laboratoriais em Saúde Pública

**Orientador:** Prof. Dr. José Eduardo Tolezano

**SÃO PAULO  
2018**

## FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pelo Centro de Documentação – Coordenadoria de Controle de Doenças/SES-SP

©reprodução autorizada pelo autor, desde que citada a fonte

Souza, Thiago Kury Moreno de.

Caracterização morfológica, molecular e verificação da capacidade infectiva de cepas de *Trypanosoma cruzi*, isoladas de hospedeiros humanos e não humanos no estado de São Paulo, Brasil / Thiago Kury Moreno de Souza. - 2018.

Dissertação (Mestrado em Ciências) - Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças, São Paulo, 2018.

Área de concentração: Pesquisas Laboratoriais em Saúde.  
Orientação: Prof. Dr. José Eduardo Tolezano

1. *Trypanosoma cruzi* 2. Doença de Chagas. 3. Interações hospedeiro-patógeno. 4. Biometria. 5. Biologia molecular

SES/CCD/CD-385/2018

## **Dedicatória**

Dedico este trabalho à minha querida e inestimável família, em especial minha mãe Áurea; minhas tias: Meire, Samira e Selma; meus tios: Cláudio e Hermes; minhas primas: Aline e Maria Laura e minha saudosa avó Uginy.

A minha gratidão a todos pelo amor recebido e pelos valores éticos e morais que possuo, por sempre acreditarem em meu potencial e nunca terem medido esforços para investirem em minha educação e formação profissional, além dos alegres, divertidos, inesquecíveis e maravilhosos momentos que me proporcionaram e continuam me proporcionando todos os dias.

## **Agradecimentos**

A Deus, por tudo de maravilhoso que sempre tem proporcionado em minha abençoada vida.

À minha família, pelo apoio incondicional em todos os momentos e decisões que tomei e pelo investimento em minha formação pessoal e profissional.

Ao Prof. Dr. José Eduardo Tolezano, diretor do Centro de Parasitologia e Micologia do Instituto Adolfo Lutz, pela orientação e parceria durante todo esse tempo, bem como os aconselhamentos e sugestões valiosas que ajudaram em meu processo de amadurecimento profissional.

À Dra. Gabriela Motoie, diretora do Núcleo de Parasitoses Sistêmicas do Centro de Parasitologia e Micologia do Instituto Adolfo Lutz, pelo apoio, amizade, conselhos, recomendações e ensinamentos referentes à biologia molecular.

Aos queridos amigos e colegas do Setor de Doença de Chagas do Instituto Adolfo Lutz - Dr. Antônio Marcos Levy, Elizabeth Visone Westphalen e Sansão da Rocha Westphalen - pelo ótimo convívio, aprendizado e colaboração em importantes etapas deste trabalho.

À Dra. Helena Taniguchi e ao técnico de apoio à pesquisa Carlos Roberto Elias, do Setor de Leishmanioses do Instituto Adolfo Lutz, pela coleta, decorrente de atividades de campo, das amostras biológicas de animais silvestres utilizadas neste trabalho.

Aos amigos e colegas do Núcleo de Parasitoses Sistêmicas do Instituto Adolfo Lutz, pelo acolhimento durante todo o período em que estive desenvolvendo este trabalho.

À Profa. Dra. Maria Aparecida Shikanai-Yasuda, do Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo, pela colaboração em fornecer amostras de sangue de pacientes atendidos em diversos serviços de saúde, a partir das quais foi possível isolar cepas para as caracterizações.

À Profa. Dra. Vera Chioccola e toda sua equipe de pesquisadores, técnicos e alunos de pós-graduação, do Laboratório de Biologia Molecular do Centro de Parasitologia e Micologia do Instituto Adolfo Lutz, pelo acolhimento no setor e pela oportunidade em poder realizar a extração dos DNAs das amostras utilizadas.

Ao Prof. Dr. André Tempone e toda sua equipe de pesquisadores, técnicos e alunos de pós-graduação - em especial à Dra. Daiane Dias Ferreira - do Laboratório de Toxinologia Aplicada do Centro de Parasitologia e Micologia do Instituto Adolfo Lutz, pelo acolhimento no setor e pela capacitação e colaboração nas metodologias referentes ao cultivo de cepas de *Trypanosoma cruzi* em células LLC-MK2 e ao ensaio para a verificação da infectividade das referidas cepas em fibroblastos da linhagem NCTC.

À Profa. Dra. Marta Teixeira e toda sua equipe de pesquisadores, técnicos e alunos de pós-graduação - em especial à Dra. Paola Andrea Ortiz Vargas - do Laboratório de Filogenia e Taxonomia Molecular de Tripanossomatídeos do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, pelo acolhimento no setor, capacitação e colaboração na metodologia de caracterização molecular das cepas de *Trypanosoma cruzi*.

Aos meus queridos e inestimáveis amigos: Bruna, Fernando, Rafael e Rubens pelo apoio, torcida e inesquecíveis momentos de alegria, descontração e diversão, que me fizeram encarar e superar esta etapa da minha vida com leveza e humor.

Este trabalho teve o apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES - Bolsa de Mestrado.

## Resumo

A doença de Chagas acomete milhões de indivíduos na América Latina. A migração de pessoas infectadas facilitou sua disseminação para outros continentes. O protozoário parasito *Trypanosoma cruzi* é o agente etiológico da doença no homem, transmitido por insetos triatomíneos, conhecidos como “barbeiros”. Há, ainda, outras formas de transmissão, que incluem as vias: oral, transfusional, congênita e acidental em laboratório. A doença apresenta fases aguda e crônica e formas: indeterminada, cardíaca, digestiva ou mista. A diversidade biológica de *T. cruzi* poderia explicar a diversidade clínica e respostas dos hospedeiros. Sendo assim, os objetivos deste trabalho foram: caracterizar cepas de *T. cruzi* isoladas no estado de São Paulo, por análises morfométrica e molecular; correlacionar os resultados obtidos na morfometria com aqueles verificados na caracterização molecular; verificar a capacidade infectiva de cepas de *T. cruzi* em sistema de cultivo celular e ampliar o conhecimento sobre a diversidade das cepas de *T. cruzi*, isoladas no estado de São Paulo e as possíveis diferenças entre as mesmas. Foram selecionadas 44 amostras, provenientes de 25 hospedeiros humanos, 7 cães (7 alíquotas de sangue total e 7 esfregaços em lâmina), 2 animais silvestres (*Didelphis albiventris* e *Philander opossum*) e 3 triatomíneos (*Panstrongylus megistus*). As cepas foram isoladas por hemocultura e xenocultura/cultura do trato intestinal de triatomíneos. A análise molecular foi realizada em todas as amostras do trabalho, determinando as DTUs pelo FFLB. Deste total, 19 cepas foram caracterizadas morfometricamente e 12 foram utilizadas na infecção experimental em fibroblastos, linhagem NCTC. Na caracterização morfométrica, os resultados apresentaram valores dentro ou muito próximos dos intervalos de variação esperados para *T. cruzi* e certa homogeneidade para a maioria dos parâmetros; na caracterização molecular, foram determinadas as DTUs TcI (9 hospedeiros), TcII/VI (25 hospedeiros) e TcIII (1 hospedeiro), além de suspeita de infecção mista em alguns casos pela

presença de fragmentos sugestivos para outros tripanossomatídeos (*T. rangeli* e *Leishmania*); a correlação dos dados morfométricos e moleculares produziu resultados similares àqueles verificados na caracterização morfométrica e todas as cepas internalizaram e produziram amastigotas, quando inoculadas em células NCTC. Pode-se concluir que: a morfometria apresentou valores compatíveis para *T. cruzi*, pelos parâmetros observados, e isoladamente não permitiu diferenciar cepas deste parasito; as DTUs TcII/VI, associadas aos ciclos domésticos e em pacientes com doença de Chagas crônica, foram caracterizadas na maioria das cepas isoladas dos diferentes hospedeiros estudados; será necessário continuar os estudos em relação a hipótese de possíveis hospedeiros com infecção mista e a infecção em sistema de cultivo celular foi adequada e estável para os propósitos deste estudo, substituindo o modelo animal.

**Palavras-chave:** *Trypanosoma cruzi*, doença de Chagas, interações hospedeiro-patógeno, biometria, biologia molecular.



## Abstract

Chagas' disease affects millions of people in Latin America. The migration of infected people has facilitated their spread to other continents. The parasite protozoan *Trypanosoma cruzi* is the etiological agent of this disease in humans, transmitted by triatomines insects known as "kissing bugs". Other forms of transmission include: oral, transfusional, congenital and accidental in the laboratory. The disease presents acute and chronic phases, and indeterminate, cardiac, digestive or mixed forms. The biological diversity of *T. cruzi* might explain the clinical diversity and hosts responses. Thus, the objectives of this work were: to characterize strains of *T. cruzi* isolated in São Paulo state, through morphometric and molecular analyzes; to correlate the results obtained in the morphometry with those verified in the molecular characterization; to verify the infective capacity of *T. cruzi* strains in cell culture system and to expand the knowledge about the diversity of *T. cruzi* strains, isolated in the São Paulo state, and the possible differences among them. 44 samples were selected from 25 humans hosts, 7 dogs (7 aliquots of whole blood and 7 smears in slide), 2 sylvatic animals (*Didelphis albiventris* and *Philander opossum*) and 3 triatomines (*Panstrongylus megistus*). The strains were isolated by blood culture and xenoculture/culture of the intestinal tract of triatomines. The molecular analysis was performed on all samples of the work, determining the DTUs by FFLB. From these total, 19 strains were morphometrically characterized and 12 were used in the experimental infection in fibroblasts, NCTC lineage. In the morphometric characterization, the results showed values within or very close to the expected ranges of variation for *T. cruzi* and some homogeneity for most of the parameters; in the molecular characterization were determined the DTUs TcI (9 hosts), TcII/VI (25 hosts) and TcIII (1 host), besides suspicion of mixed infection in some cases, by the presence of fragments suggestive of other trypanosomatids (*T. rangeli* and *Leishmania*); the correlation of the morphometric and molecular data produced similar results for those verified

in the morphometric characterization and all strains internalized and produced amastigotes when inoculated into NCTC cells. It can be concluded that the morphometry presented compatible values for *T. cruzi*, by the observed parameters, and isolatedly did not allow to differentiate strains of this parasite; the DTUs TcII/VI, associated with the domestic cycles and in patients with chronic Chagas' disease were characterized in the majority of strains isolated from the different hosts studied; it will be necessary to continue the studies in relation to the hypothesis of possible hosts with mixed infection and the infection in cell culture system was adequate and stable for the purposes of this study, replacing the animal model.

**Keywords:** *Trypanosoma cruzi*, Chagas disease, host-parasite interactions, biometry, molecular biology.

## Lista de Abreviaturas e Siglas

ALAT .....	Alanina Aminotransferase
ANVISA .....	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ASAT .....	Aspartato Aminotransferase
BAB .....	<i>Blood Agar Base</i>
BOD .....	<i>Biochemical Oxygen Demand</i>
CEUA .....	Comissão de Ética para a Utilização Animal
CONITEC .....	Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias
DNA .....	Ácido Desoxirribonucleico
DTU .....	<i>Discrete Typing Unit</i>
EDTA .....	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
ELISA .....	Ensaio Imunoenzimático
FFLB .....	<i>Fluorescent Fragment Length Barcoding</i>
gRNA .....	RNA guia
HAI .....	Hemaglutinação Indireta
HC-Incor .....	Hospital das Clínicas - Instituto do Coração
IAL .....	Instituto Adolfo Lutz
ICB .....	Instituto de Ciências Biomédicas
IMT .....	Instituto de Medicina Tropical
IFI .....	Imunofluorescência Indireta
IgM .....	Imunoglobulina M
IgG .....	Imunoglobulina G
kDNA .....	DNA do cinetoplasto
LACEN .....	Laboratório Central
LIT .....	<i>Liver Infusion Tryptose</i>
LLC-MK2 .....	Célula epitelial renal de macaco <i>Rhesus</i>
LSUrDNA .....	Subunidade maior do DNA ribossomal
µg/mL .....	Microgramas por mililitro
µL .....	Microlitro
µm .....	Micrômetro

mL .....	Mililitro
min .....	Minuto
mRNA .....	RNA mensageiro
NCTC .....	Fibroblasto de tecido conectivo de camundongo
pb .....	Pares de bases
OPAS .....	Organização Panamericana de Saúde
PCR .....	Reação em Cadeia da Polimerase
RAPD .....	<i>Random Amplified Polymorphic DNA</i>
rDNA .....	DNA ribossomal
RFLP .....	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
RNA .....	Ácido Ribonucleico
RPMI-1640 .....	Meio <i>Roswell Park Memorial Institute</i> 1640
rRNA .....	RNA ribossomal
seg .....	Segundo
SSUrDNA .....	Subunidade menor do DNA ribossomal
TAE .....	Tampão Tris-Acetato-EDTA
USP .....	Universidade de São Paulo
WHO .....	<i>World Health Organization</i>

## Lista de Figuras

<b>Figura 1:</b> Formas evolutivas de <i>T. cruzi</i> .....	26
<b>Figura 2:</b> Ciclo biológico de <i>T. cruzi</i> .....	27
<b>Figura 3:</b> Representação dos parâmetros morfométricos para tripanossomatídeos, segundo Hoare (1972) .....	35
<b>Figura 4:</b> O gene ribossômico O gene ribossômico. Legenda: <b>ETS</b> - Espaçadores Transcritos Externos; <b>ITS</b> - Espaçadores Transcritos Internos. ....	42
<b>Figura 5:</b> Exemplos de picos (eletroferogramas) visualizados para <i>T. cruzi</i> , pelo FFLB. Eixo X: tamanho do fragmento, em pares de bases (pb); Eixo Y: intensidade da fluorescência.....	42
<b>Figura 6:</b> Distribuição geográfica aproximada das DTUs de <i>T. cruzi</i> em ciclos de transmissão domésticos e silvestres.....	44
<b>Figura 7:</b> Representação dos 2 principais modelos propostos para a origem das DTUs híbridas. <b>A:</b> modelo de “Duas Hibridizações”, proposto por Westenberger <i>et al.</i> , 2005; <b>B:</b> modelo de “Três Ancestrais”, proposto por de Freitas <i>et al.</i> , 2006. Os retângulos indicam DTUs distintas. As estruturas ovais representam a fusão de duas células e permutação gênica e contribuição parental indicada pelas setas vermelhas. ....	45
<b>Figura 8:</b> Fluxograma das etapas anteriores e correspondentes ao trabalho .....	47

**Figura 9:** Estruturas sugestivas de tripanossomatídeos, observadas em esfregaço sanguíneo dos pacientes provenientes de Ilhabela (aumento 1000x). **A - C:** G.A.B.L.; **D - F:** B.M.M. .... 51

**Figura 10:** Estruturas sugestivas de tripanossomatídeos, observadas em esfregaço sanguíneo dos cães de Ilhabela (aumento 1000x). **A e B:** Chiquita; **C e D:** Duque; **E e F:** Piriguete; **G e H:** Jean Pierre; **I:** Pipoca; **J:** Pequena; **K e L:** Gouda. .... 51

**Figura 11:** Representação dos parâmetros morfométricos em fotografia digital das cepas de *T. cruzi* estudadas. **A:** Comprimento total (L); **B:** Distância entre a extremidade posterior e o meio do cinetoplasto (PK); **C:** Distância entre o meio do cinetoplasto e o meio do núcleo (KN); **D:** Distância entre a extremidade posterior e o meio do núcleo (PN); **E:** Distância entre o meio do núcleo e a extremidade anterior do corpo (NA); **F:** Comprimento do flagelo livre (F). .... 55

**Figura 12:** Morfometria das cepas de *T. cruzi* isoladas de hospedeiros humanos, animais silvestres, triatomíneos e cepa Y (referência). Intervalos de variação mínimo e máximo, médias e desvios padrão, observados por cepa (30 parasitos), referentes aos parâmetros morfométricos estudados, em micrômetros ( $\mu\text{m}$ ) ..... 63

**Figura 13:** Caracterização morfométrica de cepas de *T. cruzi* isoladas de hospedeiros humanos (pacientes), animais silvestres e triatomíneos no estado de São Paulo, Brasil. Mensurações relativas ao comprimento total (L). **A:** Gráfico de colunas: médias; **B:** Gráfico de dispersão: medidas relativas aos 30 parasitos de cada hospedeiro, representadas por pontos . 65

**Figura 14:** Caracterização morfométrica de cepas de *T. cruzi* isoladas de hospedeiros humanos (pacientes), animais silvestres e triatomíneos no estado de São Paulo, Brasil. Mensurações relativas à distância da extremidade posterior ao meio do cinetoplasto (PK). **A:** Gráfico de colunas: médias; **B:** Gráfico de dispersão: medidas relativas aos 30 parasitos de cada hospedeiro, representadas por pontos..... 65

**Figura 15:** Caracterização morfométrica de cepas de *T. cruzi* isoladas de hospedeiros humanos (pacientes), animais silvestres e triatomíneos no estado de São Paulo, Brasil. Mensurações relativas à distância entre o meio do cinetoplasto e o meio do núcleo (KN). **A:** Gráfico de colunas: médias; **B:** Gráfico de dispersão: medidas relativas aos 30 parasitos de cada hospedeiro, representadas por pontos..... 66

**Figura 16:** Caracterização morfométrica de cepas de *T. cruzi* isoladas de hospedeiros humanos (pacientes), animais silvestres e triatomíneos no estado de São Paulo, Brasil. Mensurações relativas à distância entre a extremidade posterior e o meio do núcleo (PN). **A:** Gráfico de colunas: médias; **B:** Gráfico de dispersão: medidas relativas aos 30 parasitos de cada hospedeiro, representadas por pontos..... 66

**Figura 17:** Caracterização morfométrica de cepas de *T. cruzi* isoladas de hospedeiros humanos (pacientes), animais silvestres e triatomíneos no estado de São Paulo, Brasil. Mensurações relativas à distância entre o meio do núcleo e a extremidade anterior (NA). **A:** Gráfico de colunas: médias; **B:** Gráfico de dispersão: medidas relativas aos 30 parasitos de cada hospedeiro, representadas por pontos..... 67

**Figura 18:** Caracterização morfométrica de cepas de *T. cruzi* isoladas de hospedeiros humanos (pacientes), animais silvestres e triatomíneos no estado de São Paulo, Brasil. Mensurações relativas ao comprimento do flagelo livre (F). **A:** Gráfico de colunas: médias; **B:** Gráfico de dispersão: medidas relativas aos 30 parasitos de cada hospedeiro, representadas por pontos. .... 67

**Figura 19:** Caracterização morfométrica de cepas de *T. cruzi* isoladas de hospedeiros humanos (pacientes), animais silvestres e triatomíneos no estado de São Paulo, Brasil. Valor do Índice Nuclear (NI), correspondente à posição do núcleo no corpo do parasito. **A:** Gráfico de colunas: médias; **B:** Gráfico de dispersão: medidas relativas aos 30 parasitos de cada hospedeiro, representadas por pontos..... 68

**Figura 20:** Caracterização morfométrica de cepas de *T. cruzi* isoladas de hospedeiros humanos (pacientes), animais silvestres e triatomíneos no estado de São Paulo, Brasil. Valor do Índice Cinetoplasmático (KI), correspondente à posição do cinetoplasto em relação ao núcleo. **A:** Gráfico de colunas: médias; **B:** Gráfico de dispersão: medidas relativas aos 30 parasitos de cada hospedeiro, representadas por pontos. .... 68

**Figura 21:** Eletroforese em gel de agarose a 2% do DNA extraído das amostras de material de cultura e esfregaço sanguíneo (#1 - #37). Presença de bandas de aproximadamente 400 pb para 18S1 e 28S1 e de 300 pb para 18S3 e 28S2, em diferentes intensidades. **CN:** controle negativo; **Tcon 025E - CP 1 e 2:** controles positivos; ● canaleta sem amostra. .... 70

**Figura 22:** Eletroforese em gel de agarose a 2% do DNA extraído das amostras de sangue caninas (IB18 - IB24), de cultura (#14) e esfregaço (#24, #25, #26 e #30). Presença de bandas de aproximadamente 400 pb para 18S1 e 28S1 e de 300 pb para 18S3 e 28S2. **CN:** controles negativos..... 71



**Figura 23:** Dados morfométricos por DTU. Comparação dos valores da média e dispersão de medidas entre Tcl e TcII/VI, relativos ao comprimento total (L). **A:** Gráfico de colunas: médias; **B:** Gráfico de dispersão: medidas de cada parasito (representadas por pontos) pertencente às respectivas DTUs .....75

**Figura 24:** Dados morfométricos por DTU. Comparação dos valores da média e dispersão de medidas entre Tcl e TcII/VI, relativos à distância entre a extremidade posterior e o meio do cinetoplasto (PK). **A:** Gráfico de colunas: médias; **B:** Gráfico de dispersão: medidas de cada parasito (representadas por pontos) pertencente às respectivas DTUs. .... 75

**Figura 25:** Dados morfométricos por DTU. Comparação dos valores da média e dispersão de medidas entre Tcl e TcII/VI, relativos à distância entre o meio do cinetoplasto e o meio do núcleo (KN). **A:** Gráfico de colunas: médias; **B:** Gráfico de dispersão: medidas de cada parasito (representadas por pontos) pertencente às respectivas DTUs. .... 76

**Figura 26:** Dados morfométricos por DTU. Comparação dos valores da média e dispersão de medidas entre Tcl e TcII/VI, relativos à distância entre a extremidade posterior e o meio do núcleo (PN). **A:** Gráfico de colunas: médias; **B:** Gráfico de dispersão: medidas de cada parasito (representadas por pontos) pertencente às respectivas DTUs. .... 76

**Figura 27:** Dados morfométricos por DTU. Comparação dos valores da média e dispersão de medidas entre Tcl e TcII/VI, relativos à distância entre o meio do núcleo e a extremidade anterior (NA). **A:** Gráfico de colunas: médias; **B:** Gráfico de dispersão: medidas de cada parasito (representadas por pontos) pertencente às respectivas DTUs ..... 77

**Figura 28:** Dados morfométricos por DTU. Comparação dos valores da média e dispersão de medidas entre TcI e TcII/VI, relativos ao comprimento do flagelo livre (F). **A:** Gráfico de colunas: médias; **B:** Gráfico de dispersão: medidas de cada parasito (representadas por pontos) pertencente às respectivas DTUs..... 77

**Figura 29:** Dados morfométricos por DTU. Comparação dos valores da média e dispersão de medidas entre TcI e TcII/VI, relativos ao índice nuclear (NI), correspondente à posição do núcleo no corpo do parasito. **A:** Gráfico de colunas: médias; **B:** Gráfico de dispersão: medidas de cada parasito (representadas por pontos) pertencente às respectivas DTUs ..... 78

**Figura 30:** Dados morfométrico por DTU. Comparação dos valores da média e dispersão de medidas entre TcI e TcII/VI, relativos ao índice cinetoplasmático (KI), correspondente à posição do núcleo no corpo do parasito. **A:** Gráfico de colunas: médias; **B:** Gráfico de dispersão: medidas de cada parasito (representadas por pontos) pertencente às respectivas DTUs..... 78

**Figura 31:** Células NCTC utilizadas na verificação da capacidade infectiva das 12 cepas estudadas (aumento 400x). **A:** Controle Negativo; **B:** Cepa Y; **C** e **D:** triatomíneos de Taboão da Serra e Ilhabela, respectivamente; **E:** A.B.S.; **F:** E.M.; **G:** E.P; **H:** D.F.O.; **I:** A.P.N.; **J:** M.C.A.; **K:** L.S.A.R.; **L:** M.C.G.; **M:** E.R.S.B.; **N:** J.R ..... 79

## Lista de Tabelas

- Tabela 1:** Perfis de FFLB obtidos para tripanossomatídeos americanos..... 43
- Tabela 2:** Amostras utilizadas e exames realizados anteriormente ao trabalho ..... 50
- Tabela 3:** Primers 18S rDNA e 28 S rDNA utilizados para o FFLB..... 59
- Tabela 4:** Morfometria das cepas de *T. cruzi*, isoladas de hospedeiros humanos, animais silvestres, triatomíneos e cepa Y de referência. Intervalos de variação mínimo e máximo, médias e desvios padrão, observados por grupos de hospedeiros e correlacionados (geral), referentes aos parâmetros morfométricos estudados, em micrômetros ( $\mu\text{m}$ ) ..... 64
- Tabela 5:** Concentrações dos DNAs extraídos das amostras, em nanogramas por microlitro ( $\text{ng}/\mu\text{L}$ ) e grau de pureza (260/280 e 260/230).. 69
- Tabela 6:** Fragmentos amplificados para 18S1, 18S3, 28S1 e 28S2. Cada *primer* apresentou fragmentos de tamanhos específicos que, interpretados em conjunto, possibilitaram determinar as DTUs das cepas isoladas dos diferentes hospedeiros. Alguns resultados indicaram a possibilidade de hospedeiros com infecção mista, pela presença de fragmentos sugestivos para *T. rangeli* e *Leishmania*..... 72
- Tabela 7:** Cepas utilizadas na morfometria, agrupadas por DTUs verificadas na caracterização molecular ..... 73
- Tabela 8:** Intervalos de variação mínimo e máximo, médias e desvios padrão, observados por grupo de DTU e correlacionados (geral), referentes aos parâmetros morfométricos estudados, em micrômetros ( $\mu\text{m}$ ) ..... 74

# Índice

<b>1. Introdução</b> .....	<b>20</b>
1.1. Doença de Chagas .....	20
1.1.1. Epidemiologia .....	20
1.1.2. Transmissão .....	23
1.1.2.1. Por via oral.....	23
1.1.2.2. Transfusão sanguínea .....	24
1.1.2.3. Vertical ou congênita .....	24
1.1.2.4. Por transplante de órgãos.....	25
1.1.2.5. Por acidentes laboratoriais.....	25
1.1.3. Morfologia e ciclo biológico de <i>T. cruzi</i> .....	25
1.1.4. Patologia .....	27
1.1.5. Diagnóstico .....	29
1.1.5.1. Clínico .....	29
1.1.5.2. Parasitológico .....	29
1.1.5.3. Sorológico.....	31
1.1.5.4. Molecular .....	32
1.1.6. Tratamento.....	32
1.2. Caracterização de <i>T. cruzi</i> .....	33
1.2.1. Caracterização morfométrica .....	34
1.2.2. Caracterização biológica.....	37
1.2.3. Caracterização genética .....	39
<b>2. Objetivo</b> .....	<b>46</b>
2.1. Objetivo Geral.....	46
2.2. Objetivos Específicos.....	46
<b>3. Materiais e Métodos</b> .....	<b>47</b>
3.1. Amostras e Hospedeiros.....	48
3.2. Isolamento das Cepas .....	52
3.2.1. Hemocultura.....	52
3.2.2. Xenocultura/Cultura do Trato Intestinal de Triatomíneos .....	53

3.3. Cultura de Células .....	53
3.4. Caracterização Morfométrica .....	54
3.5. Caracterização Molecular .....	56
3.5.1. Extração do DNA .....	56
3.5.1.1. De amostras de sangue .....	56
3.5.1.2. De cultura de células e meio axênico .....	57
3.5.1.3. De esfregaços de sangue .....	57
3.5.2. Quantificação e armazenamento dos DNAs extraídos .....	58
3.5.3. Diagnóstico e identificação de tripanossomatídeos, pelo método FFLB .....	58
3.5.3.1. Leitura, em sequenciador, dos fragmentos amplificados .....	59
3.6. Agrupamento das Cepas por DTU, Comparação e Correlação dos Dados Morfométricos Entre os Grupos.....	60
3.7. Verificação da Capacidade Infectiva das Cepas, em Células NCTC .....	60
<b>4. Resultados .....</b>	<b>62</b>
4.1. Isolamento das Cepas .....	62
4.2. Cultura de Células .....	62
4.3. Caracterização Morfométrica .....	62
4.4. Quantificação dos DNAs Extraídos.....	69
4.5. Diagnóstico e Identificação de Tripanossomatídeos, pelo Método FFLB .....	70
4.6. Agrupamento das Cepas por DTU, Comparação e Correlação dos Dados Morfométricos Entre os Grupos.....	73
4.7. Verificação da Capacidade Infectiva das Cepas, em Células NCTC .....	79
<b>5. Discussão .....</b>	<b>80</b>
<b>6. Conclusões .....</b>	<b>88</b>
<b>7. Referências Bibliográficas .....</b>	<b>90</b>
<b>Anexo.....</b>	<b>105</b>

# 1. Introdução

## 1.1. Doença de Chagas

### 1.1.1. Epidemiologia

A doença de Chagas ou tripanossomíase americana é uma infecção parasitária causada pelo protozoário *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*, que pertence à classe Mastigophora, ordem Kinetoplastida e família Trypanosomatidae. Este parasito é transmitido de forma natural por insetos hematófagos popularmente conhecidos como “barbeiros”, pertencentes à ordem Hemiptera, família Reduviidae, subfamília Triatominae e cujos gêneros *Triatoma*, *Panstrongylus* e *Rhodnius* incluem a maioria das espécies transmissoras (Rey, 2010).

Originalmente, a infecção por *T. cruzi* se caracterizava como uma enzootia de animais silvestres, por meio da condição de interação parasito - vetor - hospedeiros animais. Secundariamente, à medida em que o homem invadiu e alterou os ecótopos de circulação do parasito, colocou-se em situação favorável à transmissão para os seres humanos. De maneira geral, para a América Latina, considerava-se entre essas alterações o desmatamento, as atividades de caráter extrativista, a agricultura extensiva e a pecuária ocorrida em fins do século XIX e grande parte do século XX. Nos dias atuais, estas atividades ainda estão presentes em áreas mais isoladas de muitos países americanos. Como consequência dessa interação (parasito - vetor - homem), a doença de Chagas transformou-se em uma antropozoonose, disseminando-se para grandes áreas e muitas regiões como uma doença de grande importância, principalmente nas comunidades mais pobres e desassistidas (Coura, 2007).

Hoje, a facilidade para o fluxo de pessoas de áreas endêmicas para países sem transmissão natural tem revelado grandes contingentes de

indivíduos portadores da doença no Canadá, Estados Unidos e em muitas outras regiões da Europa (Hidron *et al.*, 2010).

No estado de São Paulo, diferentemente do padrão epidemiológico encontrado em outros estados brasileiros e regiões da América Latina, a doença de Chagas se apresentou em 2 padrões específicos: o “sertanejo”, que ocorreu anteriormente ao desbravamento do sertão paulista pela cafeicultura e cujos vetores eram *P. megistus* e *T. sordida* e o de transmissão por *T. infestans*, que ocorreu após a introdução deste espécime no estado - provavelmente entre os séculos XVIII e XIX, pelos tropeiros que vinham do Sul do país até Sorocaba, por uma rota comercial de muares e equinos denominada “Caminho dos Muares” - e, de maneira efetiva, pela cafeicultura no Planalto Ocidental Paulista, no final do século XIX, que apresentou situação mais grave em relação à doença, nas décadas seguintes (Silva, 1986). Neste último caso, os principais responsáveis pelo favorecimento da endemia foram as elevadas taxas de densidade demográfica - provocadas pela mão-de-obra agrícola e pela mobilidade da população em comparação com outras áreas do interior brasileiro - e uma grande dispersão na organização de empreendimentos agrícolas (Keller, 1970; Monbeig, 1952).

Cabe ressaltar que a fronteira agrícola paulista avançou para dentro da maioria dos estados vizinhos, disseminando a transmissão da doença por *T. infestans* no Centro-sul brasileiro em áreas onde a cafeicultura foi estabelecida. Os estados afetados foram Paraná, Minas Gerais e Goiás (Silva, 1986).

A situação da endemia na região começou a se modificar em 1950, quando o estado de São Paulo, ao investir fortemente na reabilitação da decadente economia agrária, desenvolveu atividades de combate ao *T. infestans*. Entretanto, o declínio da transmissão começou a ocorrer somente a partir de 1960, quando as atividades foram intensificadas, depois que a malária deixou de apresentar a problemática que possuía na época (Silva *et al.*, 1998).

Somada às ações tomadas pelo estado, está a reestruturação do espaço agrário na região, com um significativo êxodo rural, verificado a partir de 1950, com o desaparecimento de cerca de 270 mil domicílios (IBGE, 1960; Silva, 1986). Concomitante a isto está o processo de modernização da agricultura, que apresentou maiores variedades de culturas e consumo de fertilizantes defensivos, bem como maior mecanização (IBGE, 1970).

Por volta de 1970, era possível afirmar que a transmissão natural da doença de Chagas havia sido interrompida, embora a doença não estivesse erradicada (Silva e Dias Jr., 1969).

Decorridos muitos anos de intensa atividade de controle e eliminação da transmissão natural da doença por *T. infestans*, o Brasil recebeu, em 1995, um parecer referente à eliminação desse triatomíneo no estado, emitida pela OPAS (Silva *et al.*, 1998) e, posteriormente, o certificado de eliminação, em 2014 (BEPA, 2014).

A eliminação do principal vetor promoveu um olhar sobre as espécies secundárias (*T. sordida* e *P. megistus*), mantendo a vigilância entomológica em constante atividade nas três principais frentes: encontro esporádico de exemplares de *T. infestans*, predominância de *T. sordida* e ocorrência de *P. megistus* (Silva *et al.*, 2011).

As estimativas de doença de Chagas, no Brasil, variam de 1,9 a 4,6 milhões de indivíduos infectados por *T. cruzi* (Hotez e Fujiwara, 2014; Martins-Melo *et al.*, 2014a), correspondendo a, aproximadamente, 1,0-2,4% da população (Dias *et al.*, 2016) e permanecendo como uma das principais causas de óbitos por doenças infecciosas e parasitárias (Martins-Melo *et al.*, 2016).

No que diz respeito à estimativa global, cerca de 6 a 7 milhões de indivíduos estão infectados por *T. cruzi* em todo o mundo, principalmente, na América Latina, permanecendo como um importante problema de saúde pública e provocando um número anual de óbitos superior a 10 mil (WHO, 2018).



### **1.1.2. Transmissão**

Além da já citada transmissão natural de *T. cruzi* pelos triatomíneos, há vários outros mecanismos conhecidos: por via oral, a partir da ingestão de alimentos contaminados; transfusão sanguínea; congênita; transplante de órgãos e acidentes laboratoriais (Dias, 1979).

#### **1.1.2.1. Por via oral**

Segundo Shikanai-Yasuda e Carvalho (2012), a transmissão oral da doença de Chagas tem se tornado o principal mecanismo de infecção por *T. cruzi* na Bacia Amazônica e em regiões cujo controle de triatomíneos domésticos e peridomésticos tem sido eficiente. Esta situação é corroborada pelo grande número de surtos ocorridos onde, entre os anos de 1965-2010, foram descritos 529 casos, distribuídos pelos estados do Acre, Amapá, Amazonas, Bahia, Ceará, Maranhão, Pará, Paraíba, Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Tocantins (Ferreira *et al.*, 2014).

No Brasil, este tipo de transmissão e, conseqüentemente, o surgimento de surtos envolve a ingestão de comidas, bebidas (caldo de cana, por exemplo), sopas e frutas (como o açaí) contaminadas com fezes e urina de triatomíneos infectados (Shikanai-Yasuda e Carvalho, 2012), além do consumo de carnes de animais silvestres, principalmente, de tatu e gambá, que são conhecidos reservatórios de *T. cruzi* (Sangenis *et al.*, 2015; Yeo *et al.*, 2005). Este último caso ainda permanece como uma prática comum entre as populações rurais, motivada, principalmente, por fatores de subsistência, mesmo com a caça sendo proibida por Lei (Sampaio, 2011).

### **1.1.2.2. Transfusão sanguínea**

Confirmada pela primeira vez no Brasil por Freitas *et al.* (1952). Até o final da década de 1970, estimava-se que, entre os 100 mil casos novos da doença por ano, 20 mil correspondiam a esta modalidade de transmissão (Dias, 2006).

Embora tenha ocorrido a implantação de hemocentros, a partir de 1977 (Junqueira *et al.*, 2005), e de legislação vigente para o controle de qualidade do sangue transfundido, durante a década de 1980, o risco de infecção por transfusão ainda não foi totalmente combatido (Silva e Luna, 2013).

Segundo Wendel (2005), os fatores envolvidos na problemática acima referida são: a deficiência na triagem clínica e sorológica do sangue, o nível de cobertura de sorologia de infecções por *T. cruzi*, a sensibilidade dos exames utilizados para diagnóstico sorológico e a prevalência da doença na região verificada.

### **1.1.2.3. Vertical ou congênita**

A definição de caso congênito em crianças nascidas de mães infectadas ocorre pela detecção do parasito no sangue do recém-nascido ou a presença de anticorpos não maternos em crianças após seis a sete meses de idade, desde que sejam excluídos outros mecanismos de transmissão (Ministério da Saúde, 2005).

Segundo Torrico *et al.* (2004), Salas *et al.* (2007) e Carlier *et al.* (2011), a estimativa global da prevalência da infecção por *T. cruzi* em gestantes varia de 1 a 40%.

No Brasil, esta forma de transmissão ainda apresenta relativa importância, devido a carência de ações preventivas para a mesma (Dias *et al.*, 2016). No país, a prevalência de infecção está estimada em 1,1%, com taxa de transmissão vertical de 1,7% (Martins-Melo *et al.*, 2014b).

#### **1.1.2.4. Por transplante de órgãos**

Esta circunstância pode ocorrer a partir do doador portador de doença de Chagas ou pela reativação da parasitemia de um receptor anteriormente infectado (Dias *et al.*, 2011).

Os primeiros relatos desta modalidade de transmissão datam do início da década de 1980, principalmente pelo transplante renal (Chocair *et al.*, 1981). Desde então, a veiculação do parasito já foi documentada em transplantes de diversos órgãos, como coração, fígado, pâncreas e medula óssea (Amato Neto *et al.*, 2000).

#### **1.1.2.5. Por acidentes laboratoriais**

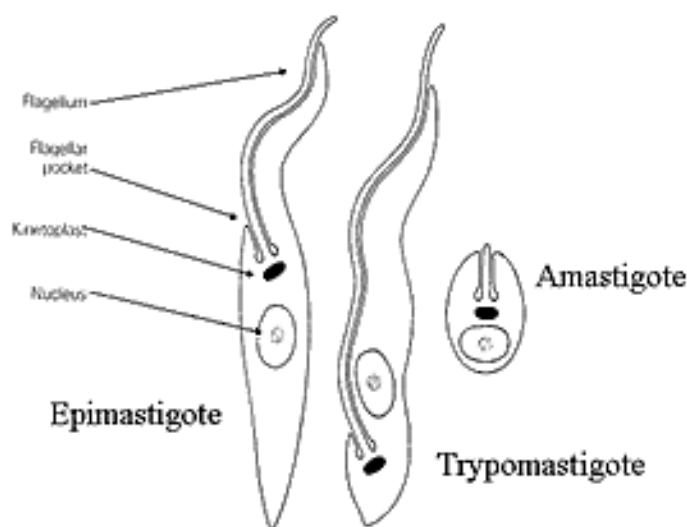
Este caso pode ocorrer entre profissionais de laboratório pela realização de trabalhos experimentais envolvendo mamíferos e triatomíneos infectados pelo parasito, culturas ou aerossóis provenientes de materiais contaminados. Além destes fatores, a veiculação pode ocorrer por contaminação cirúrgica, a partir de pacientes em fase aguda, e por ausência de boas práticas no transporte de materiais contaminados (Brener *et al.*, 1997; Amato Neto *et al.*, 2000).

Segundo Amato Neto (2000), os fatores de risco presentes nesta forma de transmissão são: desconhecimento, desatenção, utilização inadequada de equipamentos de proteção individual, instalações inadequadas e falta de capacitação por parte dos profissionais envolvidos.

#### **1.1.3. Morfologia e ciclo biológico de *T. cruzi***

Segundo de Lana e Tafuri (2005), os tripanossomatídeos apresentam um complexo fenômeno de diferenciação celular, derivado de mecanismos de adaptação fisiológica às condições ambientais em que estão submetidos. As principais estruturas presentes nesses protozoários são: flagelo, bolsa flagelar, cinetoplasto (região contendo o kDNA), núcleo e

membranas celulares. A posição destas estruturas ao longo do corpo do parasito, o seu formato celular, a existência e extensão da membrana ondulante determinam a forma evolutiva do mesmo. Assim sendo, *T. cruzi* apresenta as formas epimastigota (alongada, com cinetoplasto anterior e próxima ao núcleo e pequena membrana ondulante), tripomastigota (alongada, com cinetoplasto posterior ao núcleo e membrana ondulante extensa) e amastigota (arredondada ou oval, com flagelo curto e não aparente). A **Figura 1** mostra a representação esquemática das 3 formas evolutivas observadas em *T. cruzi*.

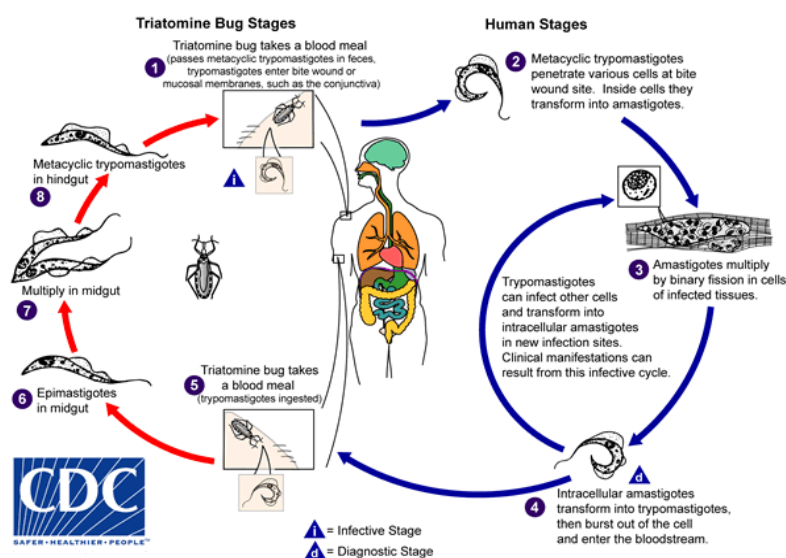


**Figura 1:** Formas evolutivas de *T. cruzi*. Disponível em: <[http://dna.kdna.ucla.edu/parasite\\_course-old/cruzi\\_files/subchapters/morphology\\_and\\_life\\_cycle.htm](http://dna.kdna.ucla.edu/parasite_course-old/cruzi_files/subchapters/morphology_and_life_cycle.htm)>

*T. cruzi* apresenta ciclo biológico do tipo heteroxênico (**Figura 2**), se multiplicando extracelularmente nos hospedeiros invertebrados - triatomíneos - e intracelularmente nos vertebrados (de Lana e Tafuri, 2005).

Nos invertebrados, o parasito, quando ingerido pelo triatomíneo durante o repasto sanguíneo deste, sofre transformações ao longo do tubo digestivo do inseto, diferenciando-se em epimastigotas. Quando estas formas atingem o intestino médio, multiplicam-se por divisão binária simples. Ao alcançarem o reto, transformam-se em tripomastigotas metacíclicas, que serão eliminadas nas fezes e urina (Brener, 1997).

Já nos vertebrados, qualquer que seja o mecanismo de transmissão do parasito, a forma tripomastigota necessita interagir e interiorizar em alguma célula para dar continuidade ao seu ciclo biológico. Desta forma, o parasito pode se introduzir em uma diversidade de tipos celulares, como macrófagos, células epiteliais e musculares. Após a interação e penetração na célula hospedeira, os tripomastigotas diferenciam-se em amastigotas e, decorrido um período de latência de, aproximadamente, 20 a 30 horas, multiplicam-se por divisão binária simples (Brener, 1997). Quando a célula estiver preenchida, as amastigotas diferenciam-se em tripomastigotas sanguíneas, rompendo a célula hospedeira e atingindo a circulação, infectando células de diversos órgãos ou tecidos existentes para cumprir novo ciclo biológico (de Lana e Tafuri, 2005).



**Figura 2:** Ciclo biológico de *T. cruzi*. Disponível em: < <https://www.cdc.gov/dpdx/trypanosomiasisamerican/index.html> >

#### 1.1.4. Patologia

A doença de Chagas apresenta as fases aguda e crônica. Compreendem-se na fase crônica as formas: indeterminada, cardíaca, digestiva e mista (Andrade *et al.*, 2011).

A fase aguda é caracterizada pela elevada parasitemia e processos inflamatórios focais, podendo ser sintomática ou assintomática, dependendo

do estado imunológico do hospedeiro (de Lana e Tafuri, 2005). Nos casos sintomáticos, os pacientes podem apresentar uma variedade de agravos, como o sinal de Romaña ou chagoma de inoculação - sinais de porta de entrada do parasito no hospedeiro, característicos da transmissão vetorial e provocadas por reação inflamatória - seguido de febre, adenopatia generalizada, miocardite, hepatoesplenomegalia e, nos quadros mais graves, meningoencefalite (Dias *et al.*, 1956). Este último caso ocorre, sobretudo, em situações de reativação, acometendo indivíduos imunocomprometidos (Ministério da Saúde, 2005, 2017).

Importante salientar que a fase aguda da doença, por transmissão oral, tem indicado diferenças quanto à sua evolução clínica, com relatos de exantema cutâneo, hemorragia digestiva e quadros mais graves e frequentes de insuficiência cardíaca. Além disso, a morbimortalidade dessa modalidade de transmissão é mais elevada em comparação com a vetorial (Ministério da Saúde, 2017).

Com relação à fase crônica, a forma indeterminada é caracterizada pela ausência de sinais e sintomas da doença, com os pacientes apresentando eletrocardiograma e radiografia de esôfago, cólon e coração normais, porém, sorologia positiva para *T. cruzi* (Coura, 2007). Segundo Andrade *et al.* (2011), esta forma pode persistir nos indivíduos infectados por um período entre trinta e quarenta anos, onde cerca de 30 a 40% dos casos evoluem para a forma cardíaca, digestiva ou mista.

A forma cardíaca, conhecida como cardiopatia chagásica crônica (CCC), é caracterizada pela destruição do tecido cardíaco e das células nervosas locais, por processo inflamatório. Estes danos, conseqüentemente, reduzem a força de contração do órgão, causam sua hipertrofia e, em estágios mais avançados da patologia, podem desenvolver nos pacientes um quadro de insuficiência cardíaca congestiva (ICC). Este quadro é caracterizado pela incapacidade do coração em bombear volumes adequados de sangue arterial - rico em oxigênio - para os demais órgãos e tecidos do corpo, o que compromete o metabolismo e promove sintomas clínicos variados, como insônia, dispnéia de esforço, congestão visceral e

edema nos membros inferiores. Posteriormente, os sintomas podem evoluir para dispneia contínua, anasarca e morte (Rey, 2010; Machado *et al.*, 2012).

Já a forma digestiva é representada pelo megaesôfago e megacólon, caracterizados como dilatações permanentes e difusas com alterações funcionais importantes, provocadas pela destruição dos tecidos e neurônios locais por processo inflamatório. Estas lesões promovem a inibição da contração, descoordenação motora e alterações nos processos de secreção e absorção dos órgãos (Matsuda *et al.*, 2009; Pinazo *et al.*, 2010). Segundo Coura (2007), o prognóstico para este tipo de manifestação é geralmente positivo e não progride a óbito, com exceção de complicações associadas e que, eventualmente, possam ocorrer, como câncer de esôfago e necrose do cólon, por exemplo.

### **1.1.5. Diagnóstico**

#### **1.1.5.1 Clínico**

A suspeita de fase aguda da doença de Chagas é determinada pelo contexto epidemiológico e manifestações clínicas dos pacientes, enquanto que a de fase crônica se dá através de alterações cardíacas e/ou digestivas, confirmadas pelo eletrocardiograma e raios-X, respectivamente. Entretanto, o diagnóstico laboratorial deve ser realizado para confirmar o diagnóstico clínico nos dois casos, mediante exames parasitológicos e sorológicos (de Lana e Tafuri, 2005).

#### **1.1.5.2. Parasitológico**

Modalidade diagnóstica mais indicada para a fase aguda da doença, baseando-se, essencialmente, na demonstração da presença do parasito no sangue periférico, com sua sensibilidade variando de acordo com o nível de parasitemia encontrado (Luquetti e Castro, 1997; Luquetti e Rassi, 2000; Ministério da Saúde, 2014, 2017). Entretanto, também pode ser realizada na

fase crônica, pela utilização dos métodos indiretos (Camargo e Takeda, 1979) relatados adiante.

Os exames realizados são: pesquisa a fresco de tripanossomatídeos, métodos de concentração (método de Strout, micro-hematócrito e creme leucocitário) e lâmina corada de gota espessa ou de esfregaço (Ministério da Saúde, 2005, 2013, 2014, 2017). Já os métodos parasitológicos indiretos são o xenodiagnóstico e a hemocultura (Camargo e Takeda, 1979).

A pesquisa a fresco é simples e de rápida execução, apresentando maior sensibilidade que o esfregaço corado e podendo ser realizada diretamente ao microscópio, com uma gota de sangue entre lâmina e lamínula. O ideal para a realização deste exame é a coleta com paciente febril e dentro de 30 dias do início dos sintomas (Luquetti e Schmuñis, 2017).

Os métodos de concentração apresentam baixo custo e são recomendados como diagnóstico de primeira escolha para casos sintomáticos superiores a 30 dias de evolução, pelo declínio da parasitemia ao longo do tempo (Luquetti e Schmuñis, 2017).

O exame direto de lâmina corada e de gota espessa ou esfregaço sanguíneo também pode ser realizado, porém, apresenta menor sensibilidade em relação aos métodos anteriormente descritos (Luquetti e Rassi, 2000; Ministério da Saúde, 2014, 2017).

Com relação aos métodos indiretos, estes podem ser realizados quando há escassez de parasitos circulantes em pacientes sorologicamente positivos. O xenodiagnóstico pode ser empregado no controle do tratamento específico e no isolamento de cepas de *T. cruzi*. Tradicionalmente, esta técnica é realizada 30 e 60 dias após o repasto do sangue dos pacientes, por ninfas de triatomíneos de 3<sup>o</sup> ou 4<sup>o</sup> estádios de desenvolvimento (espécies *Triatoma infestans*, *Panstrongylus megistus* e *Rhodnius prolixus*). As fezes e a urina destes triatomíneos, obtidas por compressão de seus abdômens com auxílio de uma pinça, são depositadas em lâmina de vidro contendo uma gota de solução fisiológica a 0,85% e examinadas ao microscópio óptico para a pesquisa de formas epimastigotas e



tripomastigotas metacíclicas de *T. cruzi*. Posteriormente, este procedimento foi modificado, com objetivo de permitir o fácil isolamento das cepas, auxiliar no controle de qualidade do xenodiagnóstico empregado em laboratórios e reduzir o tempo de exame para 25 a 30 dias após o repasto sanguíneo dos triatomíneos (Chiari e Galvão, 1997). Para tal propósito, o material biológico dos vetores - urina, fezes e intestino - foi semeado em meio LIT (Camargo, 1964) e denominado xenocultura (Bronfen *et al.*, 1989).

A hemocultura consiste na coleta de um grande volume de sangue de pacientes na fase crônica da doença, seguida de lavagem das hemácias, cultivo do sedimento em meio LIT e exame mensal em até 120 dias. Esta técnica permite o isolamento de cepas de *T. cruzi* provenientes de seres humanos, animais silvestres e domésticos, com a finalidade de caracterizá-los por meio de diferentes metodologias, como morfológicas, biológicas e moleculares (Chiari e Galvão, 1997).

Entretanto, a parasitemia subpatente da fase crônica da doença de Chagas torna os métodos parasitológicos indiretos pouco sensíveis, implicando em ausência de valor diagnóstico para resultados negativos (Castro *et al.*, 2002; Ministério da Saúde, 2005, 2014). Neste caso, o diagnóstico para esta fase da doença é, essencialmente, sorológico (Ministério da Saúde, 2005, 2013, 2014, 2017).

### **1.1.5.3. Sorológico**

O diagnóstico sorológico constitui-se de metodologias utilizadas para detecção de anticorpos anti-*T. cruzi* das classes IgM e IgG, circulantes no soro dos pacientes. Embora possa ser realizada na fase aguda da doença, é mais indicada para a fase crônica (Dias *et al.*, 2016).

No Brasil, a realização de testes sorológicos para a fase aguda da doença de Chagas é dificultada pela falta de *kits* comerciais aprovados pela ANVISA e escassez de controles positivos para anticorpos IgM (Ministério da Saúde, 2005, 2013, 2014). Assim, as metodologias utilizadas são: IFI (Camargo, 1966) para IgG, HAI (Cerisola *et al.*, 1962) e ELISA (Voller,

1975), além da recomendação para a implantação de IFI para IgM, em laboratórios de referência (Dias *et al.*, 2016).

Já para a fase crônica, deve-se realizar a detecção de anticorpos anti-*T. cruzi* da classe IgG pela utilização de um teste com elevada sensibilidade, em conjunto com outro de elevada especificidade: HAI, IFI e ELISA. O diagnóstico da doença é confirmado quando o paciente apresentar exame reagente em pelo menos 2 testes (Luquetti e Rassi, 2000; Ministério da Saúde, 2013, 2017).

#### **1.1.5.4. Molecular**

Utilizado de maneira complementar aos diagnósticos parasitológico e sorológico, o diagnóstico molecular por PCR ou por PCR em tempo real está em processo de padronização e refinamento, fornecendo ferramentas para detecção, quantificação e genotipagem de *T. cruzi*, em variedades de amostras biológicas (Duffy *et al.*, 2009; Ramírez *et al.*, 2015). Além disso, tem auxiliado no acompanhamento de pacientes em período de tratamento e na compreensão dos ciclos de transmissão do parasito (Dumonteil e Herrera, 2017).

Entretanto, a grande sensibilidade deste exame, somada à presença do DNA do parasito, com ausência de infecção por parasitos vivos, é propensa a fornecer resultados falsos positivos, dificultando a interpretação dos mesmos (Dumonteil e Herrera, 2017). Por outro lado, a genotipagem molecular, ainda, não é adequadamente sensível, principalmente, em amostras com baixa carga parasitária (Garcia *et al.*, 2017).

#### **1.1.6. Tratamento**

Os medicamentos benzonidazol e nifurtimox, ainda, permanecem como os fármacos de escolha para o tratamento etiológico da doença de Chagas, sendo mais recomendados para a fase aguda, com vistas à redução ou eliminação precoce da infecção, de maneira efetiva (Sales Junior

*et al.*, 2017). Diferentemente da eficácia observada na fase aguda, ambos os medicamentos apresentam índices de cura muito baixos na fase crônica (Coura, 2003).

O benzonidazol é o mais utilizado no contexto brasileiro, devido a maior experiência e disponibilidade no país (Dias *et al.*, 2016), diferentemente do nifurtimox, cuja disponibilidade é menor e apresenta poucas publicações avaliando seu uso (CONITEC, 2018).

Todavia, estes medicamentos podem trazer uma série de efeitos colaterais para os pacientes, como dermatites, polineuropatia, anorexia, entre outros, debilitando mais a saúde dos mesmos (Hidron *et al.*, 2010; Andrade *et al.*, 2011). Neste contexto, ainda há poucas drogas sendo testadas em ensaios clínicos, com vistas a tornar o tratamento mais seguro e produzir melhores resultados (Sales Junior *et al.*, 2017).

## **1.2. Caracterização de *T. cruzi***

Apesar dos múltiplos avanços no estudo sobre a doença de Chagas, não se dispõe, ainda, de um tratamento totalmente eficiente, tampouco se conhece a razão da diversidade dos quadros clínicos e respostas do hospedeiro. Uma das hipóteses pode estar relacionada à diversidade biológica das populações ou cepas<sup>1</sup> de *T. cruzi*. Esta heterogeneidade também pode explicar os resultados díspares, muitas vezes encontrados no diagnóstico e estudos com as diferentes cepas tem levado alguns autores a sugerir que o parasito deveria ser chamado de “complexo *cruzi*” (Devera *et al.*, 2003).

Segundo WHO (1991), a caracterização adequada de um isolado de *T. cruzi* é fundamental para determinar o papel que esta cepa possa desempenhar quanto à patogenicidade, suscetibilidade ao hospedeiro, apresentação clínica, morbidade e mortalidade, assim como sensibilidade à quimioterapia específica.

---

<sup>1</sup> Por definição, é uma população derivada de um isolado, que se reproduz de forma contínua por passagens seriadas mecânicas ou cíclicas, em animais de laboratório ou meios de cultura (Lumsden, 1970).

### 1.2.1. Caracterização morfométrica

A observação de variações morfológicas se constituiu numa das primeiras estratégias para a caracterização de *T. cruzi* (Brener, 1979).

Observou-se, inicialmente, que este parasito apresentava um polimorfismo caracterizado pela presença de formas largas e delgadas (Chagas, 1909). Silva (1959) afirmava que apenas as formas delgadas eram capazes de sobreviver no hospedeiro, quando inoculadas, ao passo que as formas largas sofriam degeneração. Segundo Brener (1969), as formas delgadas são mais virulentas, podendo penetrar mais rapidamente do que as formas largas. Howells e Chiari (1975) mostraram que as formas largas estariam mais habilitadas para infectar triatomíneos, desenvolvendo-se muito bem no inseto vetor.

Segundo Rossi (2007), Chagas já havia relatado o dualismo morfológico das formas tripomastigotas. Assim, haveria uma forma com um grande cinetoplasto, muito próximo ou exatamente na extremidade posterior do parasito, com maior diâmetro transversal e o núcleo grande e ovoide, no sentido longitudinal; ou menos esférico, muito menor, situado na extremidade posterior do organismo. A outra forma apresentar-se-ia mais larga do que a primeira, com um cinetoplasto mais ou menos esférico.

Ainda, segundo Rossi (2007), Chagas observara formas tripomastigotas com cinetoplasto muito distante da extremidade posterior e núcleo como longa faixa longitudinal. O pesquisador cogitou, então, que essa diferença traduzisse um dimorfismo sexual. O próprio Chagas veio, mais tarde, a desconsiderar esta hipótese.

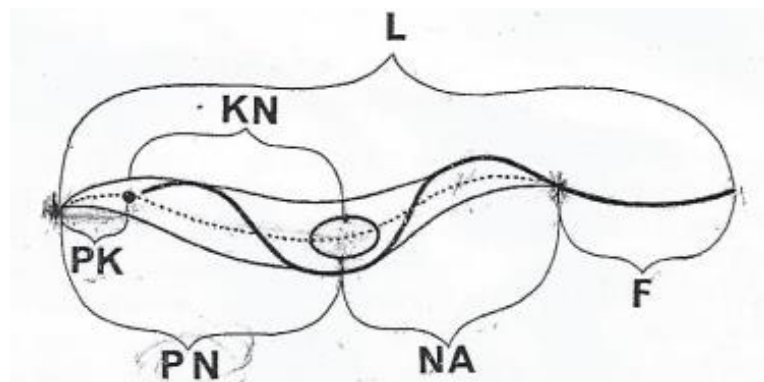
Os estudos de caracterização morfológica foram realizados por outros autores, tais como: Dias e Freitas Filho (1943), Barretto (1965), Belda Neto (1974) e Rimoldi *et al.* (2012). Basicamente, todos estes estudos utilizaram os métodos biométricos de Pearson (1914), Hoare e Broom (1938) e Hoare (1972), que se assentam sobre os parâmetros abaixo (**Figura 3**):

- L: comprimento total, constituído pela soma de PN, NA, F;
- PK: distância da extremidade posterior ao meio do cinetoplasto;

- KN: distância do meio do cinetoplasto ao meio do núcleo;
- PN: distância da extremidade posterior ao meio do núcleo constituído pela soma de PK e KN;
- NA: distância do meio do núcleo à extremidade anterior do corpo;
- F: comprimento do flagelo livre;
- NI: índice nuclear  $PN/NA =$  Quociente de divisão de PN por NA;
- KI: índice cinetoplasmático  $PN/KN =$  Coeficiente de divisão de PN por KN.

O NI determina a posição do núcleo, em relação ao corpo do parasito. Segundo Dias e Freitas Filho (1943), quando o resultado é igual a 1, significa que o núcleo se encontra na posição central do corpo do parasito; inferior a 1, está na posição posterior e superior a 1, na posição anterior.

Já o KI, proposto por Keymer (1967), determina a posição do cinetoplasto em relação ao corpo do parasito. Se o resultado for inferior a 2, o cinetoplasto está mais próximo da posição posterior terminal do que do núcleo; se igual a 2, está entre a porção posterior e o núcleo; superior a 2, próximo do núcleo.



**Figura 3:** Representação dos parâmetros morfológicos para tripanossomatídeos, segundo Hoare (1972).

Hoare (1972) resume os dados mensurais disponíveis de formas sanguíneas de *T. cruzi* pelas seguintes faixas, provadas para serem encontradas em humanos:

- L: 11,4  $\mu$ m a 30,4  $\mu$ m (variação de média de 16,3  $\mu$ m a 21,8  $\mu$ m);

- F: 2,0  $\mu\text{m}$  a 11,2  $\mu\text{m}$ ;
- Largura: 0,7  $\mu\text{m}$  a 5,9  $\mu\text{m}$ ;
- NI: 0,9  $\mu\text{m}$  a 1,7  $\mu\text{m}$ .

Estas medidas foram comparadas com as de organismos semelhantes à *T. cruzi*, encontrados em diversos e presumíveis reservatórios. Os resultados mostraram a mesma amplitude (Lumsden e Evans, 1979).

Os estudos morfométricos, além de permitirem a caracterização de *T. cruzi*, permitem diferenciá-lo de outros tripanossomas que possam ser encontrados parasitando mamíferos. Assim, Zeledón e Vieto (1958) utilizaram o índice nuclear médio para a distinção entre duas espécies: *T. cruzi* e *T. vespertilionis*.

Segundo Silva (1959), as formas tripomastigotas delgadas caracterizam-se pelo posicionamento do cinetoplasto extremamente afastado da extremidade posterior, contrastando com a posição proximal observada nas formas largas. Do mesmo modo, as formas largas apresentam o flagelo curto, em relação às formas delgadas que apresentam um flagelo mais longo. O núcleo das formas delgadas é difuso, enquanto que nas formas largas o núcleo apresenta-se ovoide. As formas intermediárias têm caracteres intermediários.

Brener e Chiari (1963) agruparam as formas morfológicas sanguíneas de *T. cruzi* em três padrões morfológicos:

- 1 - Padrão onde haveria predominância de formas delgadas;
- 2 - Padrão onde haveria predominância de formas consideradas classicamente como largas;
- 3 - Amostras que apresentam um grande número de formas anormalmente largas.

Por muito tempo, suspeitou-se que a variação morfológica poderia implicar em patologias mais ou menos graves. Belda Neto (1974), entretanto, ao estudar a existência de correlação entre os dados biométricos e o grau de patogenicidade de amostras de *T. cruzi*, não detectou correlação

entre os caracteres morfológicos, biológicos e patogênicos de diversas amostras de tripomastigotas.

Howells e Chiari (1975), utilizando camundongos *Swiss* como modelos experimentais, conseguiram obter populações praticamente puras de formas largas após período de 24 a 48 horas da inoculação dos parasitos, através da veia caudal. Estas formas largas circulantes mostraram-se, significativamente, menos infectantes para camundongos do que a população normal de tripomastigotas da mesma cepa, porém, ocasionaram altos índices de infecção em triatomíneos. Estes dados levaram os autores a afirmar que tais parasitos não são estágios de degeneração e, provavelmente, representam formas pré-adaptadas à evolução no vetor.

Apesar dos dados morfológicos serem importantes para a caracterização do parasito como *Trypanosoma* tipo *cruzi*, outros fatores devem ser levados em consideração para a caracterização de seus isolados, como fatores relacionados à sua biologia, taxa de sobrevivência e mortalidade, adaptação em meios de cultura, patogenicidade e patologia (de Sousa, 1999).

### **1.2.2. Caracterização biológica**

A caracterização biológica das cepas de *T. cruzi* é baseada na virulência, patogenicidade, curvas parasitêmicas, tropismo tissular e quadro histopatológico da infecção em animais de laboratório (Andrade e Andrade, 1979).

A virulência é compreendida como sendo a capacidade de multiplicação do parasito, podendo mudar de acordo com o estado imunológico do hospedeiro, sua idade, o inóculo, os intervalos entre passagens e outros fatores. Por sua vez, a patogenicidade é a capacidade de uma determinada cepa provocar determinadas lesões tissulares, independentemente, do tamanho do inóculo (Andrade e Andrade, 1979).

Os camundongos ainda são utilizados como modelo experimental, em razão das facilidades de criação, manejo e pela baixa agressividade. Além disso, as diferentes linhagens e variações genéticas, obtidas com camundongos, originam estudos que permitem simular a infecção em diferentes estados de imunossupressão. Diversos animais foram utilizados como modelos experimentais da doença de Chagas, entre eles: o rato (Silva *et al.*, 1987), o cão (de Lana *et al.*, 1992), o coelho (Silva *et al.*, 1996) e algumas espécies silvestres, como *Calomys callosus* (Borges *et al.*, 1982).

Andrade (1976), após diversos estudos em camundongos e com o objetivo de verificar as características biológicas de diferentes cepas, elaborou o esquema abaixo para a classificação das mesmas. A pesquisadora agrupou-as em tipos ou biotipos:

- Tipo I: cepas de multiplicação rápida, com picos parasitêmicos precoces e elevados entre 9 e 10 dias de infecção, alta virulência, alta mortalidade, reticulotropismo na infecção aguda e miotropismo na infecção crônica. Exemplos: cepas Y e Peruana;
- Tipo II: cepas de multiplicação lenta, com picos irregulares entre 12 e 20 dias de infecção, virulência variável, discreto reticulotropismo no início da infecção e tropismo para células cardíacas. Exemplo: cepa São Felipe;
- Tipo III: cepas de multiplicação lenta, com picos parasitêmicos elevados entre 20 e 30 dias, baixa virulência, baixa mortalidade e miotropismo durante toda a infecção. Exemplo: cepa Colombiana.

Entretanto, a cultura de células eucariotas também pode ser utilizada, dependendo do estudo realizado. Elas são modelos biológicos menos complexos, em comparação aos modelos animais, e tendem a fornecer resultados mais simplificados na resolução de determinadas problemáticas (Freshney, 2006).

Os dados produzidos, a partir deste modelo, podem ser muito úteis para estudos funcionais, bioquímicos e moleculares, bem como para análise de alvos farmacológicos e produção de anticorpos e vacinas, por exemplo (Freshney, 2005). Além disso, ele apresenta vantagens em relação à utilização de animais, no que diz respeito ao controle do ambiente e



homogeneidade da amostra. Com a implementação das CEUAs em instituições de ensino e pesquisa, tornou-se uma alternativa para a substituição do antigo modelo, desde que compatível/viável para a linha de pesquisa desenvolvida (Alves e Guimarães, 2010).

Por outro lado, a utilização desta metodologia demanda conhecimento prévio acerca das singularidades de cada linhagem, uma vez que a interpretação dos resultados obtidos seja particularmente dependente do perfil biológico da célula escolhida no estudo. Além disso, se faz necessária a utilização de técnicas assépticas rigorosas, para impedir a contaminação por micro-organismos indesejáveis e garantir a fidelidade dos resultados (Hesse e Wagner, 2000; Freshney, 2002).

### **1.2.3. Caracterização genética**

*T. cruzi* possui seu genoma organizado em 2 sítios, sendo um no núcleo e outro no cinetoplasto (Kikuchi, 2007). Este último é composto por 2 classes de moléculas de DNA circulares denominadas minicírculos e maxicírculos (Stuart e Feagin, 1992), que correspondem a aproximadamente 30% de todo o DNA celular do parasito (Vargas-Parada, 2010). Os minicírculos são encontrados em torno de 5 mil a 10 mil cópias por célula (Vargas-Parada, 2010) e compostos de 4 regiões conservadas e 4 regiões variáveis (Degraeve *et al.*, 1988). Nas regiões conservadas está o sítio de replicação do DNA, enquanto que nas regiões variáveis há a produção de gRNAs, envolvidos na editoração dos mRNAs das enzimas mitocondriais (Westenberger *et al.*, 2006). Os maxicírculos são encontrados em torno de 25 a 50 cópias por célula (Vargas-Parada, 2010) e possuem os genes de proteínas relacionadas com a respiração celular, além de rRNAs (Westenberger *et al.*, 2006). O tamanho do genoma varia, extensivamente, entre cepas e clones da mesma cepa (Henriksson *et al.*, 1996).

Os isolados de *T. cruzi*, provenientes de diversos hospedeiros humanos, animais - silvestres e domésticos - e vetores, foram inicialmente

agrupados através de perfis eletroforéticos de isoenzimas, de acordo com semelhanças e diferenças apresentadas por eles (Martins, 2014).

Toye (1974), através de estudos pioneiros que avaliaram o perfil de isoenzimas produzidos por dois sistemas enzimáticos (ASAT e ALAT), demonstrou perfis diferenciados de bandas para os grupos analisados, o que confirmou a existência de diversidade genética na espécie.

Miles *et al.* (1977), realizando outros estudos com isoenzimas, analisaram cepas do nordeste brasileiro e determinaram 2 grupos de cepas, denominados zimodemas. Estudos posteriores permitiram incluir um terceiro zimodema (Miles *et al.*, 1978, 1980, 1981a, b). O Zimodema 1 (Z1) agrupou cepas de transmissão silvestre, derivados de marsupiais e triatomíneos, enquanto que o Zimodema 2 (Z2) albergou isolados domésticos, provenientes de humanos e animais domiciliados. O Zimodema 3 (Z3) também estava associado à transmissão silvestre (Miles *et al.*, 1978, 1980, 1981a, b).

Com o advento da biologia molecular e, conseqüentemente, da técnica de PCR, inúmeros trabalhos foram desenvolvidos, amplificando diferentes alvos no genoma nuclear e mitocondrial de *T. cruzi*, com o objetivo de classificar as subpopulações dessa espécie de acordo com sua identidade genética (Oliveira, 2012).

Neste cenário, os estudos foram iniciados por Morel *et al.* (1980), utilizando a técnica de RFLP-PCR a partir do kDNA de cepas provenientes de vetores e pacientes humanos na América Latina. Os resultados mostraram padrões de bandas específicos para os grupos do parasito, denominados esquizodemas.

Posteriormente, foram realizados trabalhos de genética de populações pela utilização da técnica RAPD (Steindel *et al.*, 1993; Tibayrenc *et al.*, 1993) e estudos com isoenzimas (Tibayrenc *et al.*, 1981; Tibayrenc e Desjeux, 1983; Tibayrenc e Miles, 1983; Tibayrenc *et al.*, 1984, 1985, 1986a, 1986b; Tibayrenc e Ayala, 1987, 1988), até que, em 1999, foi organizada a primeira reunião para estabelecer uma padronização na classificação da

espécie, com o intuito de facilitar as correlações dos resultados obtidos em diferentes estudos (Anonymous, 1999).

Assim, as cepas de *T. cruzi* foram agrupadas em 3 linhagens, TcI, TcII e *T. cruzi*:

- TcI: incluía Zimodema 1 (Miles *et al.*, 1977); Tipo III (Andrade, 1974); Ribodemas II/III (Clark, Pung, 1994); Grupo 1 (Tibayrenc, 1995) e Linhagem 2 (Souto *et al.*, 1996);
- TcII: incluía Zimodema 2 (Miles *et al.*, 1977); Zimodema A (Romanha *et al.*, 1979); Tipo II (Andrade, 1974), Ribodema I (Clark e Pung, 1994); Grupo 2 (Tibayrenc, 1995) e linhagem 1 (Souto *et al.*, 1996);
- *T. cruzi*: isolados sem classificação. Incluía cepas híbridas ou com caracterização inconclusiva, como o Zimodema 3 (Miles *et al.*, 1978); Zimodema B (Romanha *et al.*, 1979); Tipo I (Andrade, 1974); grupo1/2 (Souto *et al.*, 1996); genótipo 39 (Tibayrenc, 1995).

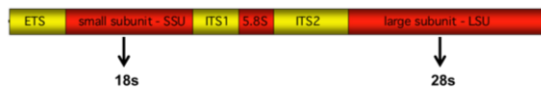
Conforme as metodologias para caracterização genética do parasito foram se desenvolvendo e modernizando, outras subdivisões puderam ser observadas no interior da espécie, evidenciando maiores variações entre membros das linhagens do parasito (Brisse *et al.*, 2000; Toledo *et al.*, 2002, 2003; de Freitas *et al.*, 2006; Miles *et al.*, 2009). Neste cenário, Brisse *et al.* (2000) propuseram que *T. cruzi* fosse subdividido em seis sublinhagens, denominadas DTUs: DTU I para a linhagem I, definida por Anonymous (1999); DTU IIb para a linhagem II e DTUs IIa, IIc, IId e IIe para os isolados inconclusivos, estabelecidos no consenso de 1999.

Tibayrenc (1998) havia proposto o termo DTU para distinguir distintas linhagens filogenéticas. Por definição, é um conjunto de isolados geneticamente semelhantes, que pode ser identificado por marcadores moleculares comuns.

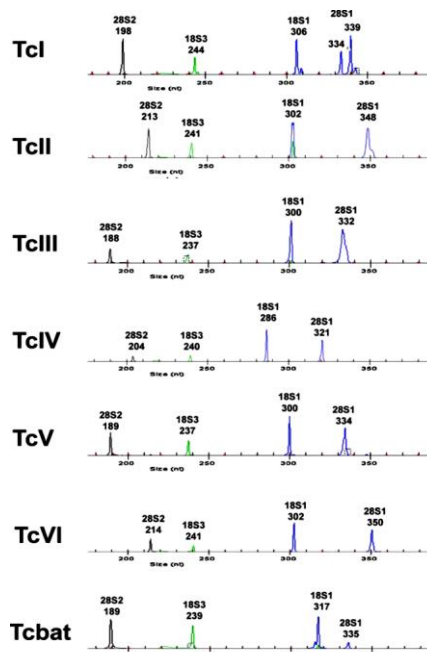
Em 2008, Hamilton *et al.* desenvolveram um novo método de identificação de espécies, denominado FFLB. Inicialmente, testado para tripanossomatídeos africanos, cujos resultados permitiram a descoberta de uma nova espécie dentro do subgênero *Trypanosoma brucei* (Hamilton *et al.*, 2008), foi, posteriormente, utilizado para a identificação e determinação

de linhagens genéticas de tripanossomatídeos americanos (Hamilton *et al.*, 2011).

Podendo ser utilizado em diversos tipos de amostras biológicas, o FFLB tem como alvo o gene ribossômico e o polimorfismo observado nas subunidades maior (LSU) e menor (SSU) do rDNA (**Figura 4**). Esta metodologia tem como finalidade a amplificação, por PCR, de 4 fragmentos altamente variáveis (18S1 e 18S3 no SSUrDNA e 28S1 e 28S2 no LSUrDNA), utilizando oligonucleotídeos marcados com fluoró cromos, denominados *primers*. Através deste ensaio, são obtidos fragmentos de DNA de tamanhos diferentes, que são observados como picos quando analisados por eletroforese capilar em sequenciador automático (**Figura 5**). Assim sendo, o conjunto de quatro picos constitui, em teoria, um perfil único para cada espécie analisada (Hamilton *et al.*, 2008), como apresentado na **Tabela 1**.



**Figura 4:** O gene ribossômico. Legenda: **ETS** - Espaçadores Transcritos Externos; **ITS** - Espaçadores Transcritos Internos. Fonte: Sonnenberg *et al.* (2007), modificado.



**Figura 5:** Exemplos de picos (eletroferogramas) visualizados para *T. cruzi*, pelo FFLB. Eixo X: tamanho do fragmento, em pares de bases (pb); Eixo Y: intensidade da fluorescência. Fonte: Hamilton *et al.* (2011), modificado.

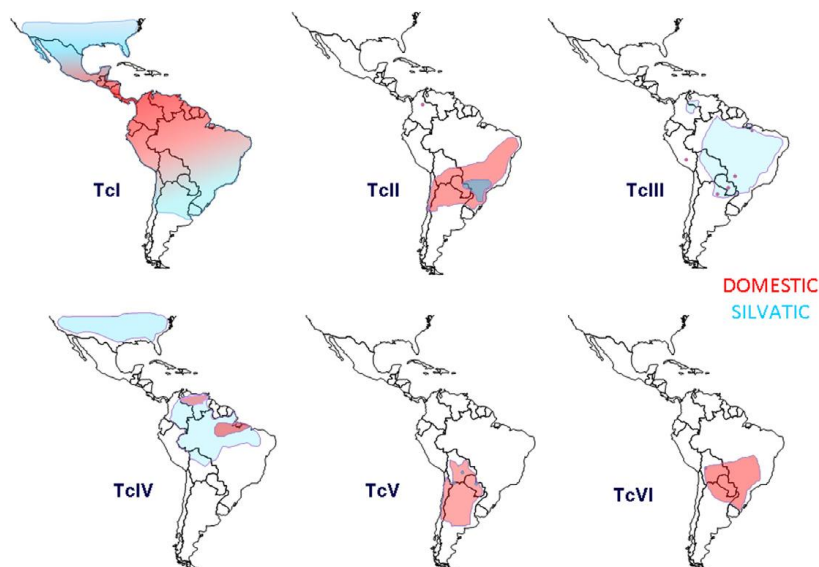
**Tabela 1:** Perfis de FFLB obtidos para tripanossomatídeos americanos. Fonte: Hamilton *et al.* (2011).

	Fragment lengths (bp)			
	18S1	18S3	28S1	28S2
<i>T. cruzi</i> TcI (formerly I)	294–309	242–246	334–349	197–199
<i>T. cruzi</i> TcII (formerly IIb)	302–303	240–241	348–351	213–215
<i>T. cruzi</i> TcIII (formerly IIc)	300–301	237	332–336	188–189
<i>T. cruzi</i> TcIV (formerly IIa)	286–288	239–240	321–325	204–207
<i>T. cruzi</i> TcV (formerly IId)	300	236–237	334	189–190
<i>T. cruzi</i> TcVI (formerly IIe)	302–303	240–241	350	214
<i>T. cruzi</i> TcBAT	317	239	335	189
<b>All <i>T. cruzi</i> cruzi</b>	<b>286–317</b>	<b>236–246</b>	<b>321–351</b>	<b>188–215</b>
<i>T. cruzi</i> <i>marinkellei</i>	280	236	311	196
<i>T. rangeli</i> TrA	267–269	223	297–298	193–194
<i>T. rangeli</i> TrB	261	224	298	188
<i>T. rangeli</i> TrC	266	223	302	191
<i>T. rangeli</i> TrD	268	223	305	191, 193
<i>T. rangeli</i> TrE	267	223	300	186
<b>All <i>T. rangeli</i></b>	<b>261–269</b>	<b>223–224</b>	<b>297–305</b>	<b>186–194</b>
Other trypanosomes/trypanosomatids found in South America				
<i>T. dionisii</i> -like	259–261	227	304–310	203–208
<i>T. theileri</i>	233–234	216	250–251	183
<i>T. evansi</i>	209	234	291–292	199
<i>T. lewisi</i>	239	216	266	195
<i>T. vivax</i>	189	199	-	172
Unidentified trypanosomatid	234	212	257	194
<i>Blastocrithidia triatoma</i>	344	222		

Os achados, obtidos pelos diversos estudos realizados ao longo da primeira década do século XXI, motivaram, em 2009 - ano do centenário da descoberta da doença de Chagas - a organização do segundo consenso taxonômico para *T. cruzi*, que estabeleceu uma nova classificação para a espécie. Este consenso levou em consideração os trabalhos de Tibayrenc (1998), determinando que o parasito fosse dividido em 6 grupos de DTUs: TcI, TcII, TcIII, TcIV, TcV e TcVI (Zingales *et al.*, 2009). Posteriormente, foi descoberto e incluído ao grupo um novo genótipo, denominado Tcbat, que está associado a morcegos antropogênicos (Marcili *et al.*, 2009; Zingales *et al.*, 2012; Lima *et al.*, 2015).

De acordo com Brenière *et al.* (2016), TcI é a DTU que apresenta ampla distribuição geográfica (sul dos Estados Unidos ao norte da Argentina), a mais frequentemente isolada em ciclos silvestres (também presente em ciclos domésticos) e a responsável pela transmissão da doença de Chagas em regiões localizadas ao norte da Bacia Amazônica; TcII, V e VI estão associadas aos ciclos domésticos e em pacientes do Cone Sul e Bolívia, com quadro de doença de Chagas crônica; TcIII e IV são encontradas em ciclos silvestres de floresta tropical (**Figura 6**) e Tcbat foi,

primeiramente, identificado em morcegos, sendo posteriormente encontrado em humanos (Marcilli *et al.*, 2009; Ramírez *et al.*, 2014a, 2014b). Além disso, diferentes DTUs podem co-existir num mesmo vetor ou hospedeiro (Brenière *et al.*, 1998; Devillers *et al.*, 2008).



**Figura 6:** Distribuição geográfica aproximada das DTUs de *T. cruzi* em ciclos de transmissão domésticos e silvestres. Fonte: Zingales *et al.* (2012).

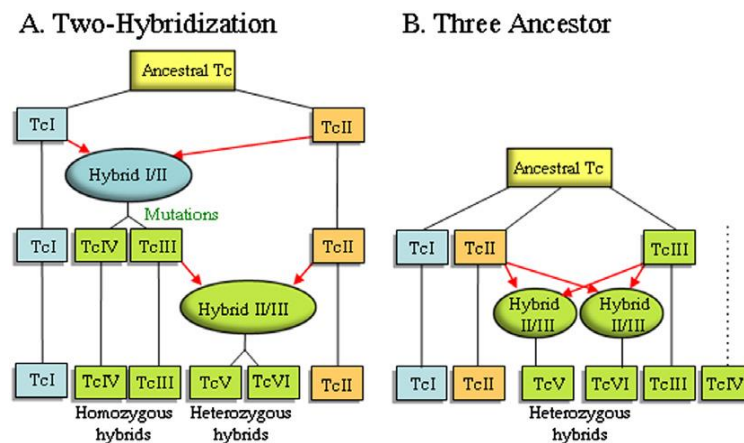
Diversos estudos também procuraram estabelecer diferenças nos comportamentos biológicos das DTUs (Télez-Meneses *et al.*, 2008; Suárez *et al.*, 2009; dos Reis *et al.*, 2012; Ragone *et al.*, 2012). Ragone *et al.* (2012) observaram que TcVI apresentou parasitemia superior a TcI, em modelos murinos.

Em uma revisão de Zingales (2011), foi observado que todas as DTUs podem promover a doença de Chagas; TcI não favorece a forma digestiva e TcII e V podem apresentar patogenicidade superior as demais, promovendo as formas cardíaca e digestiva. Outros resultados também apontaram uma virulência de TcI superior as outras DTUs (Zingales *et al.*, 2012). Entretanto, estas características ainda não podem ser consideradas definitivas, uma vez que foram observadas em amostragens pequenas, provenientes de determinadas regiões endêmicas (Zingales, 2011).

Para além do comportamento biológico das linhagens de *T. cruzi*, vários outros fatores também devem ser considerados, como: idade,

genética do hospedeiro, origem geográfica, entre outros (Burgos *et al.*, 2010).

No que diz respeito às relações evolutivas entre as DTUs, muito ainda necessita elucidar, embora, de acordo com Westenberger *et al.* (2005) e de Freitas *et al.* (2006), TcV e VI são linhagens híbridas, resultantes de processos de recombinação genética entre TcII e III (**Figura 7**). Além deste caso, TcIII e IV podem ter se originado a partir de recombinações entre TcI e II (Sturm *et al.*, 2003; Ramírez *et al.*, 2011). Com relação às TcI e II, estas permanecem como linhagens puras que evoluíram, de forma separada, a partir de um ancestral comum, em um período de, aproximadamente, 1 a 3 milhões de anos atrás (Sturm *et al.*, 2003; de Freitas *et al.*, 2006).



**Figura 7:** Representação dos 2 principais modelos propostos para a origem das DTUs híbridas. **A:** modelo de “Duas Hibridizações”, proposto por Westenberger *et al.*, 2005; **B:** modelo de “Três Ancestrais”, proposto por de Freitas *et al.*, 2006. Os retângulos indicam DTUs distintas. As estruturas ovais representam a fusão de duas células e permutação gênica e contribuição parental indicada pelas setas vermelhas. Fonte: Zingales *et al.* (2012).

Sendo assim, Brenière *et al.* (2016) afirmam que hospedeiros vetores e animais silvestres desempenham um importante papel na distribuição das DTUs, onde a relação diversidade de hospedeiros *versus* condições ambientais, provavelmente, mantém a diversidade do parasito e promove o surgimento de novas variantes, ao longo do tempo, por meio da seleção natural.

## **2. Objetivo**

### **2.1. Objetivo Geral**

Caracterizar cepas de *T. cruzi* isoladas no Setor de doença de Chagas do Instituto Adolfo Lutz (IAL), Laboratório Central de Saúde Pública (LACEN) do estado de São Paulo.

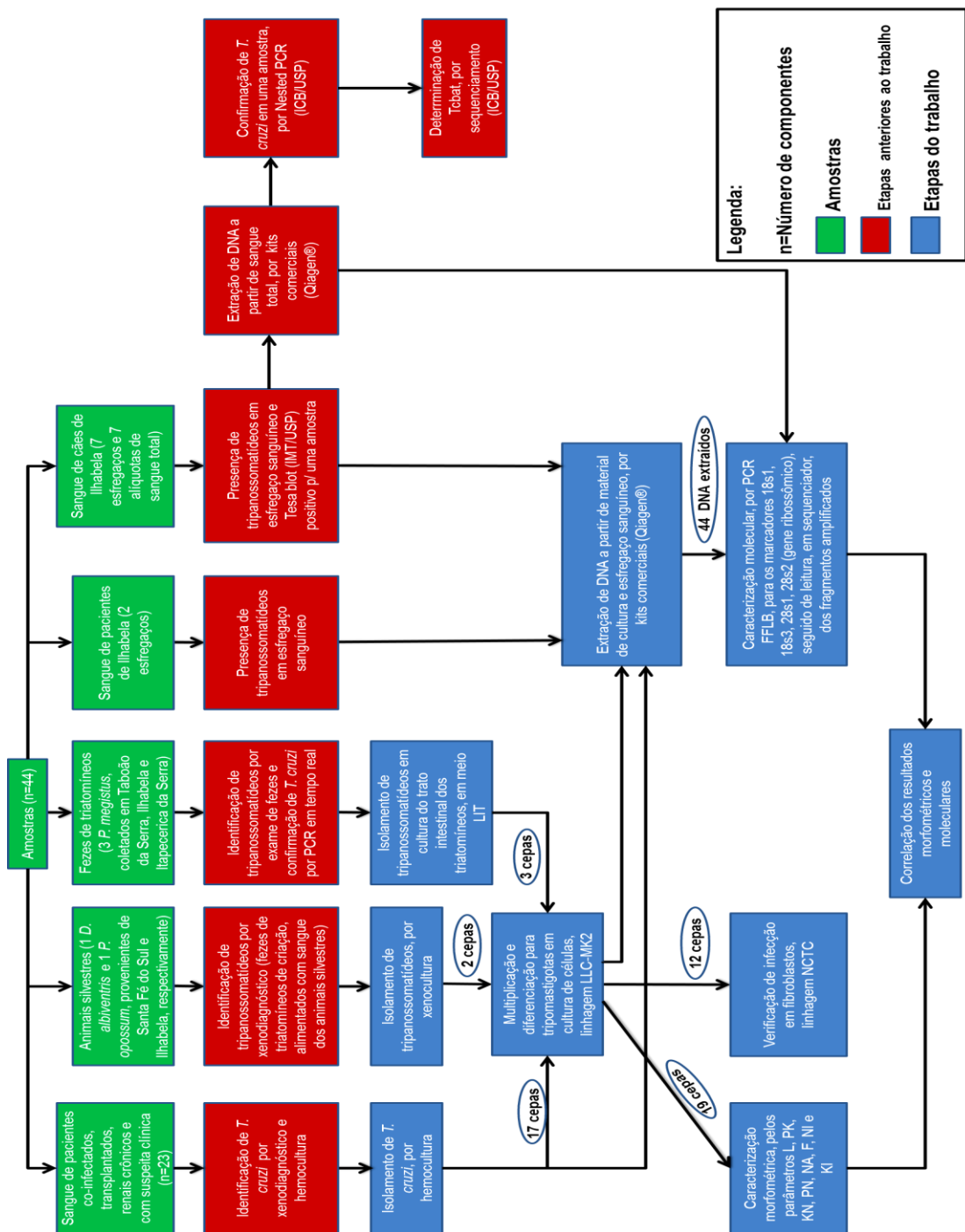
### **2.2. Objetivos Específicos**

- Realizar caracterização morfométrica e molecular em cepas de *T. cruzi*, isoladas de diferentes hospedeiros;
- Correlacionar os resultados obtidos na morfometria com aqueles verificados na caracterização molecular;
- Verificar a capacidade infectiva de cepas de *T. cruzi*, em sistema de cultivo celular;
- Ampliar o conhecimento sobre a diversidade das cepas de *T. cruzi*, isoladas no estado de São Paulo e as possíveis diferenças entre elas.



### 3. Materiais e Métodos

Todas as etapas, anteriores e correspondentes ao trabalho, estão representadas no fluxograma da **Figura 8**.



**Figura 8:** Fluxograma das etapas anteriores e correspondentes ao trabalho.

### 3.1. Amostras e Hospedeiros

O Setor de doença de Chagas do IAL Central realiza o diagnóstico laboratorial das amostras biológicas a ele encaminhadas - provenientes de diversos municípios e serviços de saúde - por meio de técnicas parasitológicas, sorológicas e moleculares. Além disso, desenvolve trabalhos de campo em diferentes regiões do estado de São Paulo, com o objetivo de estudar a ecoepidemiologia da doença, ao verificar a participação dos animais silvestres e domésticos na transmissão da mesma. O Setor também atende demandas para a identificação de triatomíneos silvestres ou encontrados em domicílios, provenientes de diferentes regiões, e sua possível infecção natural por *T. cruzi*.

Sendo assim, foram selecionadas 44 amostras encaminhadas ao setor de doença de Chagas do IAL Central, no período entre maio de 2014 a maio de 2017, cujo diagnóstico foi positivo para a presença de *T. cruzi*, ou sugestivo/não confirmatório para o encontro de tripanossomatídeos. Suas procedências foram de (**Tabela 2**):

- 23 pacientes atendidos em diferentes serviços de saúde (HC - Incor e Reumatologia; Casa da AIDS e Complexo Hospitalar Edmundo Vasconcelos), com quadros clínicos diversos (co-infectados, transplantados, renais crônicos e com suspeita clínica) e diagnóstico positivo para *T. cruzi*, por xenodiagnóstico e hemocultura realizados no IAL Central;
- 2 pacientes, residentes no município de Ilhabela, com suspeita de contato com *P. megistus* e presença de estruturas sugestivas de tripanossomatídeos no esfregaço sanguíneo de ambos (**Figura 9**). Entretanto, estes pacientes não apresentavam história pregressa da doença, nem registro de alterações eletrocardiográficas e sinais ou sintomas. Corroborando com estes quadros clínicos, os exames a fresco, sorologia anti-IgG e anti-IgM, xenodiagnóstico, hemocultura e PCR em tempo real, realizados no IAL Central, além de Nested PCR, realizado no ICB/USP, também foram negativos. Diante destes resultados, foi decidido

utilizar, neste trabalho, somente as amostras de esfregaço sanguíneo, para este grupo;

- 7 cães, também residentes de Ilhabela<sup>2</sup>, que apresentaram o mesmo diagnóstico dos dois pacientes acima descritos, no que diz respeito à presença de estruturas sugestivas de tripanossomatídeos no esfregaço sanguíneo (**Figura 10**) e negatividade em outros exames parasitológicos, sorológicos e moleculares, realizados no IAL Central. Entretanto e diferentemente dos pacientes, o Nested PCR foi positivo para presença de *T. cruzi* em um cão, mesmo resultado verificado na sorologia por Tesa blot, realizada no IMT/USP, apenas nas amostras de sangue caninas. Posteriormente, o DNA extraído da amostra positiva foi sequenciado e o parasito caracterizado como Tcbat, no ICB/USP. Diante dos resultados, foi decidido incluir, neste trabalho, tanto as alíquotas de sangue total, quanto o material de esfregaço em lâmina, totalizando quatorze amostras para este grupo;
- 2 animais silvestres - *Didelphis albiventris* e *Philander opossum* - capturados nos municípios de Santa Fé do Sul e Ilhabela, respectivamente, com xenodiagnóstico positivo para a presença de tripanossomatídeos, realizado no IAL Central;
- 3 exemplares de *Panstrongylus megistus*, coletados nos municípios de Taboão da Serra, Ilhabela e Itapeperica da Serra, com exame de fezes positivo para a presença de tripanossomatídeos e PCR em tempo real confirmatório para *T. cruzi*, realizados no IAL Central.

Até o momento da utilização neste trabalho, parte das amostras estava preservada em nitrogênio líquido a -200°C<sup>3</sup>, enquanto outras estavam incubadas em estufa BOD a 25°C<sup>4</sup>.

---

<sup>2</sup> Inicialmente, as amostras de Ilhabela não estavam incluídas na relação deste trabalho. Entretanto, por terem sido provenientes de um caso que se revelou complexo e de difícil conclusão, foram posteriormente incluídas e submetidas à caracterização, na busca por respostas.

<sup>3</sup> Provenientes dos dois animais silvestres e de alguns pacientes.

<sup>4</sup> Provenientes dos três triatomíneos e de alguns pacientes.

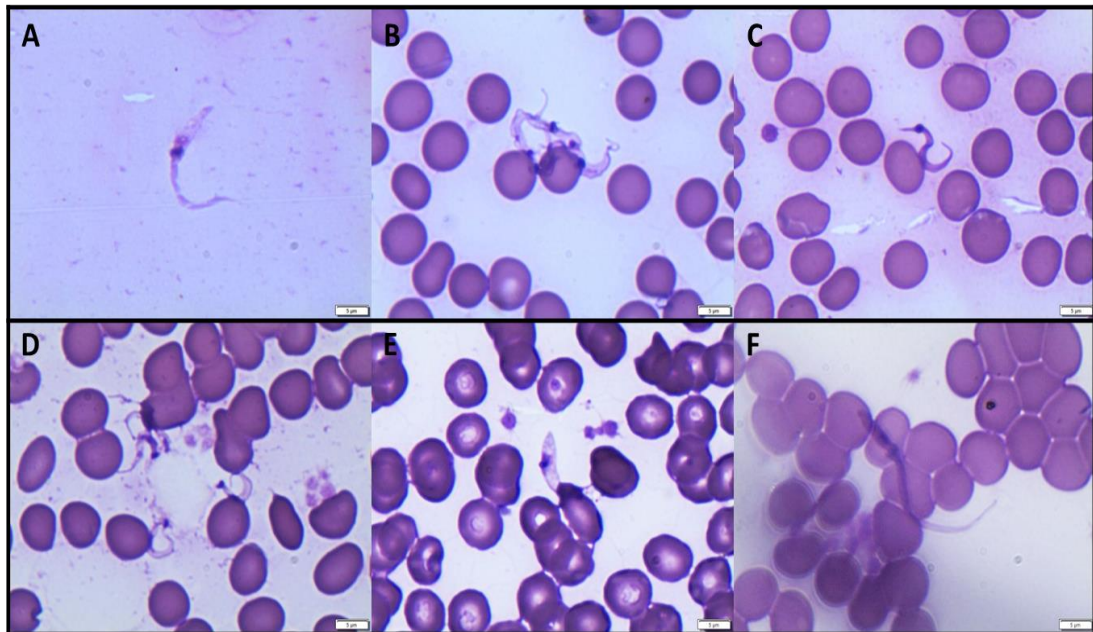
**Tabela 2:** Amostras utilizadas e exames realizados anteriormente ao trabalho.

Código	Hospedeiro	Procedência	Material	EXAMES REALIZADOS						
				Parasitológico				Sorológico		Molecular
				Direto a Fresco	Esfregaço em Lâmina	Hemocultura	Xenodiagnóstico	TESA blot	PCR	Sequenciamento
1	E.P.	HC-Incor	Sangue Total		X	X**				
2	M.C.G.	Reumatologia	Sangue Total		X	X**				
3	A.B.S.	HC-Incor	Sangue Total		X	X**				
4	E.M.	HC-Incor	Sangue Total		X	X**				
5	D.F.O.	HC-Incor	Sangue Total		X	X**				
6	L.S.A.R.	CHEV	Sangue Total		X	X**			X	
7	M.C.B.	HC-Incor	Sangue Total		X	X**				
8	I.M.	Casa-AIDS	Sangue Total		X	X**	X**			
9	J.D.O.	Casa-AIDS	Sangue Total		X	X**	X**			
10	M.L.B.S.	HC-Incor	Sangue Total		X	X**				
11	L.M.P.	Reumatologia	Sangue Total		X	X**				
12	V.P.S.L.	Casa-AIDS	Sangue Total		X	X**	X**			
13	U.J.A.	Casa-AIDS	Sangue Total		X	X**	X			
14	J.M.S.	Casa-AIDS	Sangue Total		X	X**	X			
15	I.C.P.	Casa-AIDS	Sangue Total		X	X**	X			
16	J.R.	HC-Incor	Sangue Total		X	X**				
17	E.R.S.B.	HC-Incor	Sangue Total		X	X**				
18	A.P.N.	HC-Incor	Sangue Total		X	X**				
19	D.S.F.	Casa-AIDS	Sangue Total		X	X**	X**			
20	A.J.A.	Casa-AIDS	Sangue Total		X	X**	X**			
21	M.C.A.	Reumatologia	Sangue Total		X	X**				
22	J.S.C.	HC-Incor	Sangue Total		X	X**				
23	A.E.S.	HC-Incor	Sangue Total		X	X**				
24	G.A.B.L.	Emílio Ribas	Esfregaço de Sangue		X*					
25	B.M.M.	Emílio Ribas	Esfregaço de Sangue		X*					
26	Piriguete	Ilhabela	Esfregaço de Sangue		X*					
IB24	Piriguete	Ilhabela	Sangue Total	X		X	X	X**	X**	X***
27	Pequena	Ilhabela	Esfregaço de Sangue		X*					
IB18	Pequena	Ilhabela	Sangue Total	X		X	X	X	X	
28	Pipoca	Ilhabela	Esfregaço de Sangue		X*					
IB21	Pipoca	Ilhabela	Sangue Total	X		X	X	X	X	
29	Chiquita	Ilhabela	Esfregaço de Sangue		X*					
IB22	Chiquita	Ilhabela	Sangue Total	X		X	X	X	X	
30	Jean Pierre	Ilhabela	Esfregaço de Sangue		X*					
IB20	Jean Pierre	Ilhabela	Sangue Total	X		X	X	X	X	
31	Duque	Ilhabela	Esfregaço de Sangue		X*					
IB23	Duque	Ilhabela	Sangue Total	X		X	X	X	X	
32	Gouda	Ilhabela	Esfregaço de Sangue		X*					
IB19	Gouda	Ilhabela	Sangue Total	X		X	X	X	X	
33	<i>Philander opossum</i>	Ilhabela	Fezes de Triatomíneos		X		X*			
34	<i>Didelphis albiventris</i>	Santa Fé	Fezes de Triatomíneos		X		X*			
35	<i>P. megistus</i>	Taboão da Serra	Fezes	X*					X**	
36	<i>P. megistus</i>	Ilhabela	Fezes	X*					X**	
37	<i>P. megistus</i>	Itapeçerica da Serra	Fezes	X*					X**	

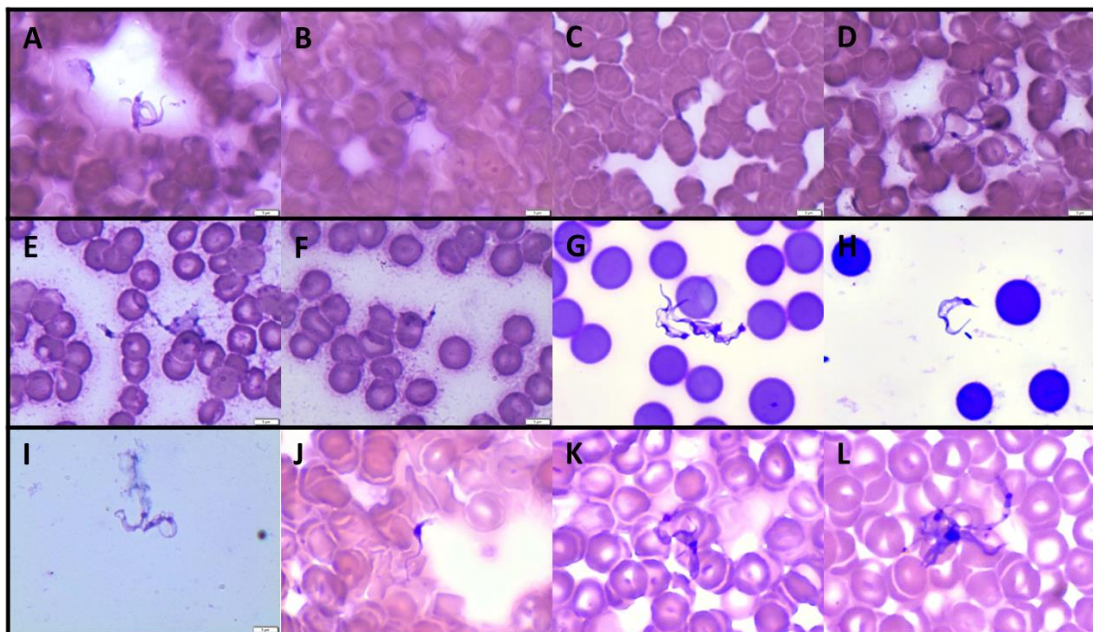
**Legenda:**   Pacientes;   Cães;   Animais Silvestres;   Triatomíneos; **X:** Exames realizados.

**Resultados:** \*Presença de tripanossomatídeos; \*\*Positivo p/ *T. cruzi*; \*\*\*Tcbat.

**Código:** Numeração estabelecida na caracterização molecular para representar as amostras na eletroforese.



**Figura 9:** Estruturas sugestivas de tripanossomatídeos, observadas em esfregaço sanguíneo dos pacientes de Ilhabela (aumento 1000x). **A - C:** G.A.B.L.; **D - F:** B.M.M.



**Figura 10:** Estruturas sugestivas de tripanossomatídeos, observadas em esfregaço sanguíneo dos cães de Ilhabela (aumento 1000x): **A e B:** Chiquita; **C e D:** Duque; **E e F:** Piriguete; **G e H:** Jean Pierre; **I:** Pipoca; **J:** Pequena; **K e L:** Gouda.

### 3.2. Isolamento das Cepas

Do total de amostras utilizadas neste estudo, as técnicas para o isolamento das cepas de *T. cruzi* foram aplicadas naquelas que apresentaram positividade para este parasito e tripanossomatídeos em geral, pelos exames parasitológicos - xenodiagnóstico, hemocultura<sup>5</sup> e exame a fresco das fezes dos triatomíneos silvestres - realizados anteriormente ao trabalho. Sendo assim, em 28 amostras, divididas entre 23 pacientes, 2 animais silvestres e 3 triatomíneos, procedeu-se o isolamento das cepas, por meio das técnicas de hemocultura e xenocultura/cultura do trato intestinal de triatomíneos.

A hemocultura foi realizada nas amostras provenientes dos 23 pacientes que apresentaram quadros clínicos diversos, suspeita clínica ou diagnóstico positivo para *T. cruzi*.

A xenocultura/cultura do trato intestinal de triatomíneos foi realizada nas amostras de animais silvestres, a partir das fezes de triatomíneos de criação (*Rhodnius neglectus*), alimentados em campo com sangue dos referidos animais e nas amostras provenientes de triatomíneos silvestres (*Panstrongylus megistus*), coletados nos 3 municípios anteriormente citados.

#### 3.2.1. Hemocultura

Utilizou-se a técnica baseada na descrita por Chiari *et al.* (1989), com modificações. Foram coletados 10-30 mL de sangue de cada paciente em tubos heparinizados, transferidos para tubos de 50 mL e, imediatamente, centrifugados a 2465 x g a 4°C por 10 minutos. Os plasmas foram transferidos para tubos de 15 mL para serem estocados e utilizados em reações sorológicas posteriores. O sedimento das hemácias, contendo a camada leucocitária, foi lavado uma vez com meio LIT (centrifugado a 1150 x g a 4°C por 20 minutos) e ressuspendido em 10 mL do meio de cultura,

---

<sup>5</sup> A hemocultura foi utilizada tanto para o exame parasitológico quanto para o isolamento de cepas.

sendo, posteriormente, distribuído em seis tubos de 15 mL contendo 4 mL de LIT cada e incubado em estufa BOD a 25°C. Foram examinadas, mensalmente, alíquotas de 10 µL da suspensão de cada tubo, entre lâmina e lamínula, durante 120 dias, ao microscópio óptico, aumento de 400x.

### **3.2.2. Xenocultura/Cultura do Trato Intestinal de Triatomíneos**

Utilizou-se a técnica descrita por Bisugo *et al.* (1998) e Chiari e Galvão (1997), onde foi retirado o trato intestinal dos triatomíneos positivos para *T. cruzi* e colocado em tubo contendo meio bifásico (BAB ou Ducrey, acrescido de 2 mL de caldo BHI com 200 µL/mL de gentamicina e 5% de urina humana estéril).

Os tubos semeados foram incubados em estufa BOD a 25°C, com a primeira leitura realizada no 4º dia de semeadura. Leituras subsequentes foram realizadas uma vez por semana, por 30 dias.

### **3.3. Cultura de Células**

Das 28 cepas anteriormente isoladas, 22 foram inoculadas em cultura de células LLC-MK2 (pacientes: A.B.S., A.J.A., A.P.N., D.F.O., D.S.F., E.M., E.P., E.R.S.B., I.M., J.R., L.S.A.R., M.C.A., M.C.B., M.C.G., V.P.S.L., L.M.P. e J.S.C.; animais silvestres: *P. opossum* - Ilhabela - e *D. albiventris* - Santa fé do Sul; triatomíneos: *P. megistus* - Taboão da Serra, Itapeçerica da Serra e Ilhabela). Para tanto, utilizou-se a técnica descrita por Kesper *et al.* (2000) e Reimão *et al.* (2008), para a multiplicação dos isolados, obtenção de um maior número de formas tripomastigotas, posterior caracterização morfométrica e verificação da capacidade infectiva em células NCTC.

Foi inoculado 1 mL de cada cepa em células LLC-MK2 previamente estabelecidas, contendo 9 mL de meio RPMI-1640 e suplementadas com 2% de soro fetal bovino. As garrafas foram mantidas em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>, com trocas diárias do meio (10 mL de RPMI-1640 e 2% de soro fetal

bovino), até que apresentassem quantidades suficientes de formas tripomastigotas<sup>6</sup>, para a realização de esfregaços em lâminas.

### 3.4. Caracterização Morfométrica

Procedimento técnico utilizado para a obtenção das medidas dos parasitos, em micrômetros.

Das 22 cepas inoculadas em LLC-MK2, em 19<sup>7</sup> foi realizada a morfometria (pacientes: A.B.S., A.J.A., A.P.N., D.F.O., D.S.F., E.P., E.R.S.B., I.M., J.R., L.S.A.R., M.C.A., M.C.B., M.C.G. e V.P.S.L.; animais silvestres: *P. opossum* - Ilhabela - e *D. albiventris* - Santa fé do Sul; triatomíneos: *P. megistus* - Taboão da Serra, Itapeceira da Serra e Ilhabela). Para tanto, uma alíquota do material de cultura de células, contendo formas tripomastigotas de cada parasito isolado, foi submetida a um esfregaço em lâmina e corada pelo método panótico rápido (Cardoso *et al.*, 2000), com o kit comercial Instant - Prov (Newprov). A lâmina corada foi observada em microscópio óptico Olympus® CX31 (Olympus Corporation), com aumento de 1000x. Os parasitos na forma tripomastigota foram fotografados pela câmera digital Olympus® SC30 (Olympus Corporation), de 3,3 megapixels de resolução, acoplada ao microscópio e medidos pelo software Olympus cellSens™ Microscope Imaging (Olympus Corporation).

A morfometria foi realizada com base nos parâmetros indicados por Hoare (1972):

- L: comprimento total, constituído pela soma de PN, NA, F;
- PK: distância entre a extremidade posterior e o meio do cinetoplasto;
- KN: distância entre o meio do cinetoplasto e o meio do núcleo;
- PN: distância entre a extremidade posterior e o meio do núcleo, constituído pela soma de PK e KN;

---

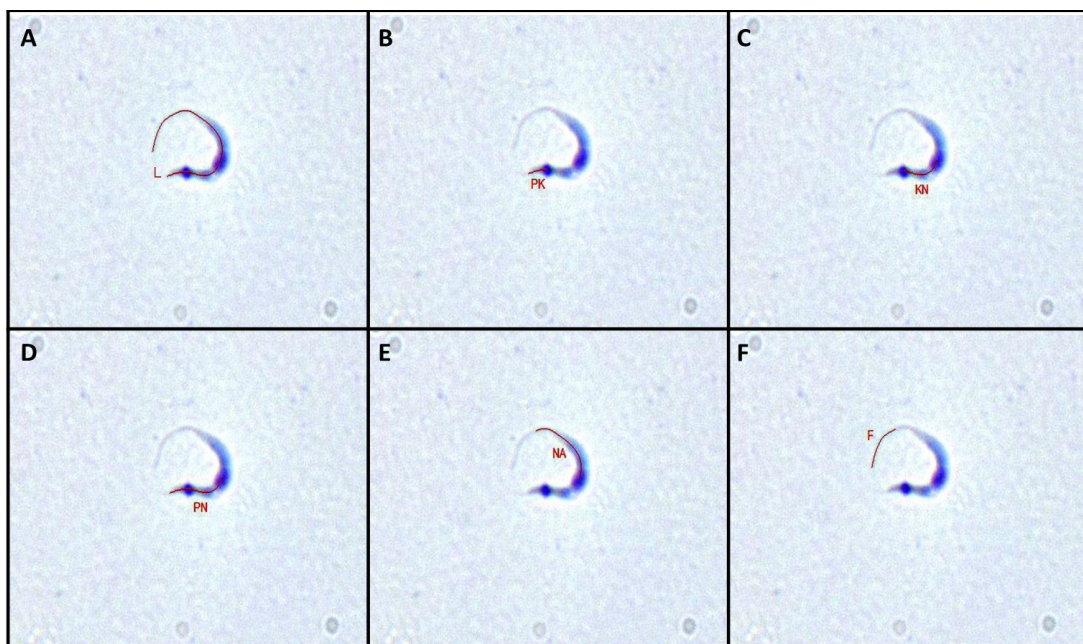
<sup>6</sup> Não houve um período de tempo pré-estabelecido e padronizado, em dias, para o cultivo das cepas em células LLC-MK2, na metodologia aqui aplicada, uma vez que o tempo para diferenciação e proliferação das formas tripomastigotas é variável de isolado para isolado.

<sup>7</sup> Não foi possível realizar a morfometria em todas as cepas provenientes da cultura celular, por falta de tempo hábil para a conclusão deste trabalho.



- NA: distância entre o meio do núcleo e a extremidade anterior do corpo;
- F: comprimento do flagelo livre;
- NI: índice nuclear  $PN/NA =$  Coeficiente de divisão de PN por NA;
- KI: índice cinetoplasmático  $PN/KN =$  Coeficiente de divisão de PN por KN.

A **Figura 11** representa os limites de cada parâmetro morfométrico, sobre uma fotografia modelo de *T. cruzi* utilizada neste estudo e registrada pela câmera digital anteriormente referida.



**Figura 11:** Representação dos parâmetros morfométricos em fotografia digital das cepas de *T. cruzi* estudadas. **A:** Comprimento total (L); **B:** Distância entre a extremidade posterior e o meio do cinetoplasto (PK); **C:** Distância entre o meio do cinetoplasto e o meio do núcleo (KN); **D:** Distância entre a extremidade posterior e o meio do núcleo (PN); **E:** Distância entre o meio do núcleo e a extremidade anterior do corpo (NA); **F:** Comprimento do flagelo livre (F).

Foram selecionados 30 parasitos, por cepa, critério baseado no quantitativo estabelecido por Belda Neto (1974), Martins (2005) e Martins *et al.* (2008). As medidas foram registradas em planilhas do Excel 2010 (Microsoft Corporation®), de onde se obtiveram as médias, os desvios padrão e os intervalos de variação mínimo e máximo, por cepa e entre todas as cepas utilizadas no estudo (seiscentos parasitos). Em seguida, os valores

da média para cada parâmetro morfométrico e a dispersão dos valores, por parasito, foram representados em gráficos, produzidos pelo programa Past, versão 3.21.

Uma amostra de cepa Y foi incluída na relação das amostras mensuradas, para atribuir valores de referência aos resultados obtidos.

### **3.5. Caracterização Molecular**

Todas as 44 amostras do trabalho foram submetidas à extração de DNA e posterior caracterização molecular.

#### **3.5.1. Extração do DNA**

##### **3.5.1.1. De amostras de sangue**

Procedimento realizado nas 7 amostras de sangue caninas, por meio do *kit* QIAamp® DNA Mini *Kit* (Qiagen®).

As amostras de sangue, coletadas em EDTA, foram transferidas para tubos de 15 mL e centrifugadas a 845 x g por 15 minutos. Após a retirada do plasma, foram adicionados 8 mL de PBS, seguido de centrifugação a 845 x g por 15 minutos. Após este tempo, os sobrenadantes foram retirados e aos sedimentos de hemácias foi adicionado tampão ACK, na proporção de três vezes em relação ao volume de hemácias contido nos tubos. As misturas foram incubadas sob agitação lenta, até a lise total das hemácias. Após mais uma centrifugação a 845 x g por 15 minutos e com posterior retirada do sobrenadante, os precipitados foram transferidos para tubos de 1,5 mL e a eles adicionados 20 µL de proteinase K e 200 µL de buffer AL. As misturas foram agitadas em vórtex por 15 segundos e incubadas em banho-maria a 56°C, por 10 minutos. Após esta etapa, a purificação do DNA foi realizada de acordo com as recomendações do fabricante. Foram adicionados 200 µL de etanol (96-100%), seguido de homogeneização por 15 segundos. As misturas foram transferidas para

colunas Qlamp Mini Spin e centrifugadas a 6000 x g por 1 minuto. Em seguida, as colunas foram transferidas para um novo tubo de 2 mL, adicionados 500 µL de buffer AW1 e centrifugadas a 6000 x g por 1 minuto. As mesmas foram novamente transferidas para outro tubo e adicionados 500 µL de buffer AW2 e centrifugadas a 20000 x g, por 3 minutos. Posteriormente, foram colocadas em tubos de 1,5 mL, adicionados 50 µL de buffer AE e incubadas em temperatura ambiente por 5 minutos, seguido de centrifugação a 6000 x g por 1 minuto.

#### **3.5.1.2. De cultura de células e meio axênico**

Procedimento realizado em 28 amostras, provenientes de 23 pacientes, 2 animais silvestres e 3 triatomíneos, por meio do *kit* QIAamp® DNA Mini Kit (Qiagen®).

As amostras foram transferidas para tubos de 1,5 mL e centrifugadas a 6000 x g por 1 minuto. Os sobrenadantes foram retirados e os *pellets* ressuspensos em 1 mL de PBS, com posterior centrifugação a 6000 x g, por 1 minuto. Após esta etapa, foram adicionados às amostras 200 µL de buffer AL e 20 µL de proteinase K. As misturas foram agitadas por vórtex e incubadas em banho-maria a 56°C, por 30 minutos. A purificação dos DNAs foi realizada de acordo com as instruções do fabricante, descritas no item **3.5.1.1**.

#### **3.5.1.3. De esfregaços de sangue**

Procedimento realizado nos 9 esfregaços de sangue, provenientes dos 2 pacientes de Ilhabela e dos 7 cães, por meio do *kit* QIAamp® DNA Mini Kit (Qiagen®).

As lâminas foram colocadas sobre uma placa de Petri e adicionadas gotas de PBS sobre esfregaço, para amolecer as estruturas. Posteriormente, os esfregaços foram raspados com bisturi e depositados em tubos de 1,5 mL, contendo 50 µL de PBS, para diluição das amostras. Foram adicionados

180 µL de buffer ATL e 20 µL de proteinase K, seguido de incubação em banho-maria a 56°C, por 30 minutos. Após este tempo, foram adicionados 200 µL de buffer AL, seguido de agitação por vortex e incubação em banho-maria a 70°C, por 10 minutos. A purificação dos DNAs foi realizada de acordo com as instruções do fabricante, descritas no item **3.5.1.1**.

### **3.5.2. Quantificação e armazenamento dos DNAs extraídos**

As concentrações e qualidade dos DNAs extraídos das amostras foram avaliadas por espectrofotometria em Nanodrop ND100 (Thermo Scientific®), em comprimento de onda 260 e 280 nm. Os DNAs foram armazenados a -20°C, até o momento da utilização.

### **3.5.3. Diagnóstico e identificação de tripanossomatídeos, pelo método FFLB**

Etapa desenvolvida em colaboração com o Laboratório de Filogenia e Taxonomia Molecular de Tripanossomatídeos (ICB/USP), onde as quarenta e quatro amostras do trabalho foram testadas para os marcadores 18S1, 18S3, 28S1 e 28S2.

As reações de PCR foram realizadas, separadamente, em 15 µL de volume final, contendo 0,5 µL (100 pmoles/µL) de *primers forward* e *reverse* de cada marcador, sendo um deles marcado com fluoróforo (**Tabela 3**), 13 µL de Master mix (Invitrogen™ Platinum™ PCR SuperMix) e 1 µL de DNA extraído das amostras. Controles positivos - Tcon 025E<sup>8</sup> - e negativos foram incluídos em cada reação para garantir a confiabilidade dos resultados. As misturas foram homogeneizadas por vórtex e submetidas ao PCR, na condição de 35 ciclos (95°C 45 seg., 62°C 30 seg., 72°C 60 seg.), com desnaturação inicial e extensão final de 95°C 3 min. e 72°C 10 min.,

---

<sup>8</sup> *Trypanosoma conorhini*, parasito de *Rattus* sp. Por ser um tripanossomatídeo diferente dos utilizados neste estudo, teve como propósito garantir resultados confiáveis, ao minimizar riscos de contaminação das amostras por utilização de controles positivos de DNA de parasitos de mesma espécie.

respectivamente, em termociclador Mastercycler™ Nexus Gradient (Eppendorf™).

Posteriormente, 5 µL de cada reação, incluindo marcador de peso molecular (Thermo Scientific™ GeneRuler™ DNA Ladder Mix, ready-to-use [100-10000pb]), foram homogeneizados em 4 µL de Sample buffer/GelRed™ (Biotium), diluição 1:2 (conforme especificações do fabricante) e analisados por eletroforese em gel de agarose a 2% (3 g de agarose + 150 mL de buffer TAE 1x). Fotografias dos géis foram obtidas em transiluminador de luz UV.

**Tabela 3:** Primers 18S rDNA e 28 S rDNA utilizados para o FFLB. Fonte: Hamilton *et al.* (2008), modificado.

Primer	Primer sequence. IUBC/IUB base codes: W = A or T, R = A or G
<b>18S1</b>	
18S-1f	ACCGWTTCCGGCTTTTGTGG
18S-2r (blue) *	CGGTCTAAGAAATTCACCTC
<b>18S3</b>	
18S-3f	GACCRITGTAGTCCACACTG
18S-4r (green) *	CCCCCTGAGACTGTAACCTC
<b>28S1</b>	
28S-1f (blue) *	GAAAGAGAGTGACATAGAAC
28S-2r	TGTTTCAAGACGGGTGGGGGC
<b>28S2</b>	
28S-2f (black) *	CCCCACCCGTCTTGAAACA
28S-3r	GGGTCCAAACAGGCACACTC

**Legenda:** \* Cor do fluoróforo.

### 3.5.3.1. Leitura, em sequenciador, dos fragmentos amplificados

Para a realização desta etapa, os produtos da PCR foram, previamente, diluídos com água<sup>9</sup>, proporcionalmente à intensidade de banda verificada na eletroforese<sup>10</sup>.

Utilizaram-se placas de 96 poços onde, em cada poço, foram adicionados 9 µL de mix de marcador de peso molecular (Formamida +

<sup>9</sup> Exceto naqueles em que não foi possível visualizar bandas.

<sup>10</sup> Este procedimento foi necessário para que os picos produzidos pelo sequenciador não extrapolassem em intensidade de fluorescência e dificultassem a interpretação dos resultados.

GeneScan™ 500 ROX™ dye Size Standard [Applied Biosystems™], diluição 1:30) e 1,5 µL de DNA amplificado, seguido de homogeneização por vórtex.

A leitura da placa foi realizada em sequenciador automático Applied Biosystems™ 3500 Genetic Analyzer (Life Technologies™, São Paulo, SP, Brasil) e os picos obtidos foram analisados no software Gene mapper (Applied Biosystems™).

### **3.6. Agrupamento das Cepas por DTU, Comparação e Correlação dos Dados Morfométricos Entre os Grupos**

Procedeu-se, em planilha do Excel 2010 (Microsoft Corporation®), o agrupamento das 19 cepas utilizadas na morfometria, de acordo com a DTU verificada na caracterização molecular. Nos grupos foram determinadas: as médias, os desvios padrão e os intervalos de variação mínimo e máximo, sobre os valores, anteriormente, obtidos na morfometria, relativos aos oito parâmetros estudados (L, PK, KN, PN, NA, F, NI e KI). Em seguida, as cepas foram analisadas em conjunto, pelos mesmos procedimentos acima descritos.

Os valores da média para cada parâmetro morfométrico e a dispersão dos valores, por parasito, foram representados em gráficos, produzidos pelo programa Past, versão 3.21.

### **3.7. Verificação da Capacidade Infectiva das Cepas, em Células NCTC**

Técnica baseada na descrita por Martínez-Díaz *et al.* (2001) e Romanha *et al.* (2010), com modificações. Das 22 cepas inoculadas em LLC-MK2, 12 foram selecionadas para este procedimento (pacientes: A.B.S., E.M., E.P., D.F.O., A.P.N., M.C.A., L.S.A.R., M.C.G., E.R.S.B. e J.R; triatomíneos: *P. megistus* - Taboão da Serra e Ilhabela), incluindo cepa Y de referência. Para o ensaio, foram adicionados 500 µL de meio RPMI-1640 (Sigma-Aldrich®), contendo  $4 \times 10^3$  células NCTC clone 929 (ATCC® CCL-1™)/poço, suplementadas com 10% de soro fetal bovino, em placa de 24

poços, sobre lamínulas arredondadas estéreis. Após incubação *overnight* em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>, foram adicionados 200 µL da suspensão de parasitos contendo 4x10<sup>4</sup> tripomastigotas/poço. Para cada cepa estudada, foram utilizados controles negativos, em que não foi adicionada a suspensão de parasitos no poço contendo as células. A placa foi incubada durante 2 horas e, após este período, o meio, contendo parasitos que não penetraram nas células, foi retirado e substituído por 500 µL de meio novo. A placa foi novamente incubada, desta vez por um período de 72 horas, para a estabilização da infecção. Ao final deste tempo e confirmada a infecção, o meio foi retirado e metanol adicionado em cada poço, para a fixação da cultura por 5 minutos. Em seguida, o metanol foi retirado e o corante Giemsa, na diluição 1:10, foi adicionado por 4 minutos. Após este tempo, o excesso de corante foi retirado com H<sub>2</sub>O.

Com a placa seca, as lamínulas, contendo os parasitos e os controles negativos corados, foram vedadas com resina sobre lâminas de vidro e visualizadas em microscópio óptico Olympus® CX31 (Olympus Corporation), em aumento de 400x, para a verificação da internalização dos parasitos e sua transformação em amastigotas. As imagens foram registradas pela câmera digital Olympus® SC30 (Olympus Corporation), através do software Olympus cellSens™ Microscope Imaging (Olympus Corporation) e aprimoradas pelo programa Adobe® Photoshop CS3 (Adobe Systems Incorporated).

## 4. Resultados

### 4.1. Isolamento das Cepas

Em todas as amostras submetidas à hemocultura e xenocultura foi possível isolar as cepas.

### 4.2. Cultura de Células

Todas as cepas inoculadas em LLC-MK2 infectaram as células e produziram formas tripomastigotas suficientes para a realização da caracterização morfométrica e verificação da capacidade infectiva em células NCTC.

### 4.3. Caracterização Morfométrica

Os dados mensurais e estatísticos, isolados de 14 hospedeiros humanos, 2 animais silvestres, 3 triatomíneos e da cepa Y de referência, que correspondem aos parâmetros morfométricos L, PK, KN, PN, NA, F, NI, KI, para as formas tripomastigotas de *T. cruzi*, estão apresentados na **Figura 12** e **Tabela 4**.

No estudo, foram analisadas as médias, desvios padrão e intervalos de variação mínimo e máximo obtidos por cepa - 30 parasitos - e entre todas as 600 formas tripomastigotas analisadas, distribuídas segundo os grupos de hospedeiros e cepa Y.

Nas **Figuras 13-20**, estão representadas as médias para cada parâmetro morfométrico observado, por cepa, e as dispersões de medida, verificadas em cada uma das 30 formas tripomastigotas, por hospedeiro e da cepa Y.



Cepa Y									Paciente L.S.A.R.								
	L	PK	KN	PN	NA	F	NI	KI		L	PK	KN	PN	NA	F	NI	KI
Médias	15,48	1,55	3,56	5,12	6,84	3,52	0,76	1,44	Médias	16,3	1,18	4,38	5,56	7,39	3,35	0,76	1,28
Desvios Padrão	1,598	0,45	0,48	0,78	1,02	0,6	0,14	0,12	Desvios Padrão	1,819	0,51	0,77	0,96	1,03	0,68	0,13	0,13
Máx.	18,46	2,89	4,52	7,39	8,58	4,85	1,02	1,65	Máx.	20,64	2,28	5,68	7,83	9,65	5,02	1,17	1,6
Mín.	12,14	0,77	2,7	3,88	4,42	2,29	0,55	1,24	Mín.	12,79	0,61	2,85	4,13	5,28	2,34	0,56	1,11

Paciente A.B.S.									Paciente M.C.A.								
	L	PK	KN	PN	NA	F	NI	KI		L	PK	KN	PN	NA	F	NI	KI
Médias	16,88	1,19	4,52	5,71	6,84	4,34	0,84	1,27	Médias	17,13	1,32	4,3	5,62	7,08	4,43	0,81	1,32
Desvios Padrão	1,295	0,35	0,72	0,66	0,77	0,74	0,12	0,11	Desvios Padrão	1,952	0,4	0,8	0,81	0,95	0,83	0,15	0,13
Máx.	19,86	2,14	6,7	7,49	8,55	6,16	1,18	1,64	Máx.	21,74	2,13	5,98	7,51	8,69	5,91	1,37	1,62
Mín.	14,28	0,72	3,26	4,51	5,15	2,96	0,64	1,12	Mín.	13,79	0,72	2,88	4,23	3,99	3,14	0,59	1,15

Paciente A.J.A.									Paciente M.C.B.								
	L	PK	KN	PN	NA	F	NI	KI		L	PK	KN	PN	NA	F	NI	KI
Médias	14,57	0,92	3,98	4,9	5,76	3,91	0,87	1,24	Médias	14,24	0,84	3,61	4,45	5,95	3,84	0,76	1,24
Desvios Padrão	1,635	0,41	0,75	0,8	0,94	0,75	0,17	0,12	Desvios Padrão	1,75	0,39	0,74	0,92	1,02	0,69	0,16	0,1
Máx.	18,33	2,77	5,93	6,84	7,45	6,39	1,2	1,68	Máx.	18,92	2,33	5,05	7,32	8	5,31	1,05	1,52
Mín.	11,69	0,62	2,98	3,72	4,02	2,57	0,63	1,12	Mín.	11,44	0,51	2,25	2,96	4,04	2,42	0,49	1,11

Paciente A.P.N.									Paciente M.C.G.								
	L	PK	KN	PN	NA	F	NI	KI		L	PK	KN	PN	NA	F	NI	KI
Médias	16,58	1,59	4,03	5,61	6,89	4,07	0,82	1,4	Médias	14,98	1,2	4,07	5,27	5,79	3,93	0,92	1,3
Desvios Padrão	2,014	0,61	0,6	0,91	1,05	0,88	0,13	0,15	Desvios Padrão	1,314	0,39	0,61	0,7	0,78	0,72	0,12	0,12
Máx.	19,97	3,12	5,11	7,22	9,01	6,28	1,08	1,78	Máx.	17,54	2,29	5	6,96	7,62	5,56	1,16	1,68
Mín.	12,63	0,72	2,74	4,19	4,66	1,95	0,59	1,18	Mín.	12,1	0,76	2,69	4,17	4,06	3,02	0,61	1,17

Paciente D.F.O.									Paciente V.P.S.L.								
	L	PK	KN	PN	NA	F	NI	KI		L	PK	KN	PN	NA	F	NI	KI
Médias	16,72	1,7	3,91	5,61	7,65	3,46	0,74	1,44	Médias	12,9	0,85	4,05	4,9	4,87	3,13	1,04	1,22
Desvios Padrão	1,741	0,54	0,63	0,91	0,83	0,79	0,12	0,14	Desvios Padrão	1,368	0,21	0,6	0,62	0,91	0,87	0,22	0,07
Máx.	19,36	2,87	5,43	7,21	9,45	5,16	0,96	1,76	Máx.	15,74	1,49	5,23	5,93	6,99	5,62	1,65	1,44
Mín.	13,36	0,73	2,8	3,94	6,06	2,02	0,49	1,19	Mín.	10,15	0,56	2,72	3,47	3,47	1,78	0,69	1,11

Paciente D.S.F.									<i>Dipelphis albiventris</i> - Santa Fé do Sul, SP								
	L	PK	KN	PN	NA	F	NI	KI		L	PK	KN	PN	NA	F	NI	KI
Médias	16,29	0,93	4,66	5,59	6,34	4,36	0,9	1,21	Médias	17,42	1,36	4,76	6,12	7,44	3,87	0,84	1,31
Desvios Padrão	1,605	0,32	0,78	0,83	1,01	0,64	0,16	0,08	Desvios Padrão	1,939	0,53	1,1	1,11	1,22	0,83	0,19	0,15
Máx.	19,73	2,02	6,43	7,34	8,65	5,68	1,3	1,44	Máx.	21,33	2,95	6,6	8,31	10,8	5,49	1,16	1,73
Mín.	13,31	0,64	3,2	3,88	4,17	2,98	0,64	1,12	Mín.	13,78	0,72	2,87	4,54	5,12	2,02	0,55	1,14

Paciente E.P.									<i>Philanderopossum</i> - Ilhabela, SP								
	L	PK	KN	PN	NA	F	NI	KI		L	PK	KN	PN	NA	F	NI	KI
Médias	15,37	1,19	3,9	5,09	6,99	3,3	0,74	1,31	Médias	17,12	0,99	4,8	5,79	6,98	4,35	0,85	1,21
Desvios Padrão	2,085	0,54	1,01	1,32	1,18	0,64	0,19	0,12	Desvios Padrão	1,957	0,28	0,96	1,02	1,02	0,92	0,21	0,07
Máx.	18,62	2,62	5,95	7,48	8,67	4,58	1,1	1,59	Máx.	21,01	1,98	6,84	7,74	9,05	6,64	1,57	1,38
Mín.	10,97	0,64	2,33	3,07	4,58	2,15	0,44	1,12	Mín.	13,99	0,59	3,04	4,05	4,07	2,43	0,55	1,13

Paciente E.R.S.B.									<i>Panstrongylus megistus</i> - Taboão da Serra, SP								
	L	PK	KN	PN	NA	F	NI	KI		L	PK	KN	PN	NA	F	NI	KI
Médias	15,29	1	3,96	4,96	6,13	4,2	0,83	1,26	Médias	16,63	1,46	4,15	5,61	7,3	3,72	0,79	1,37
Desvios Padrão	1,303	0,4	0,6	0,65	0,94	0,81	0,18	0,12	Desvios Padrão	1,755	0,5	0,85	0,83	1,41	0,9	0,19	0,15
Máx.	18,17	2,12	5,17	5,96	8,7	5,34	1,32	1,71	Máx.	19,9	3,02	6,16	7,19	10,8	5,75	1,32	1,72
Mín.	12,74	0,55	2,92	3,59	4,13	2,23	0,5	1,11	Mín.	13,19	0,66	2,71	4,17	5,01	2,11	0,53	1,13

Paciente I.M.									<i>Panstrongylus megistus</i> - Ilhabela, SP								
	L	PK	KN	PN	NA	F	NI	KI		L	PK	KN	PN	NA	F	NI	KI
Médias	14,69	0,85	3,62	4,47	6,3	3,93	0,72	1,24	Médias	14,68	1,22	3,97	5,18	6,03	3,47	0,87	1,32
Desvios Padrão	1,442	0,31	0,61	0,79	0,96	0,71	0,13	0,08	Desvios Padrão	2,411	0,41	1,12	1,3	1,19	0,66	0,21	0,11
Máx.	18,96	2,13	5,76	7,08	8,21	5,13	0,96	1,47	Máx.	21,09	2,17	6,32	7,65	10	4,86	1,4	1,54
Mín.	12,47	0,55	2,72	3,45	5,01	2,82	0,48	1,14	Mín.	10,44	0,72	2,71	3,58	4,31	2,31	0,51	1,15

Paciente J.R.									<i>Panstrongylus megistus</i> - Itapeerica da Serra, SP								
	L	PK	KN	PN	NA	F	NI	KI		L	PK	KN	PN	NA	F	NI	KI
Médias	15,52	0,98	3,85	4,83	6,51	4,17	0,76	1,27	Médias	13,44	1,04	2,93	3,97	5,58	3,89	0,73	1,35
Desvios Padrão	2,066	0,45	0,73	0,81	1,11	0,93	0,16	0,13	Desvios Padrão	1,812	0,4	0,51	0,79	1,1	0,79	0,18	0,12
Máx.	19,57	2,43	5,71	6,3	8,5	6,77	1,29	1,67	Máx.	18,4	2,24	4,52	6,76	7,87	5,83	1,15	1,7
Mín.	11,06	0,54	2,41	3,31	4,58	2,96	0,44	1,1	Mín.	10,32	0,54	2,02	2,82	3,69	2,61	0,47	1,2

**Figura 12:** Morfometria das cepas de *T. cruzi* isoladas de hospedeiros humanos, animais silvestres, triatomíneos e cepa Y (referência). Intervalos de variação mínimo e máximo, médias e desvios padrão, observados por cepa (30 parasitos), referentes aos parâmetros morfométricos estudados, em micrômetros ( $\mu\text{m}$ )<sup>11</sup>.

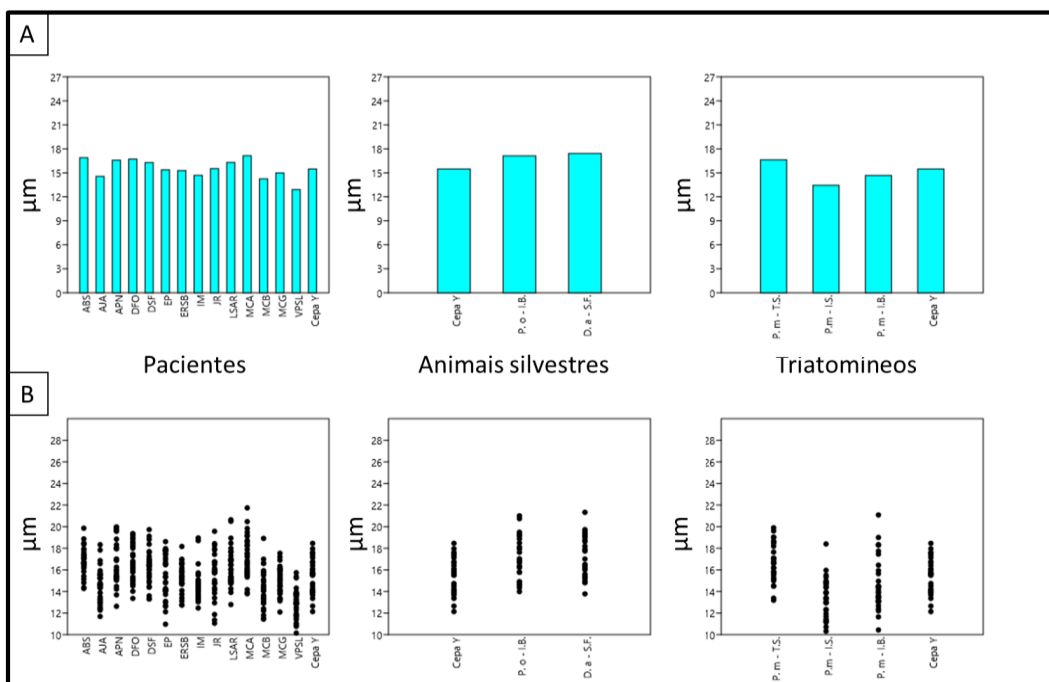
<sup>11</sup> Com exceção dos Índices.

**Tabela 4:** Morfometria das cepas de *T. cruzi*, isoladas de hospedeiros humanos, animais silvestres, triatomíneos e cepa Y de referência. Intervalos de variação mínimo e máximo, médias e desvios padrão, observados por grupos de hospedeiros e correlacionados (geral), referentes aos parâmetros morfométricos estudados, em micrômetros ( $\mu\text{m}$ )<sup>12</sup>.

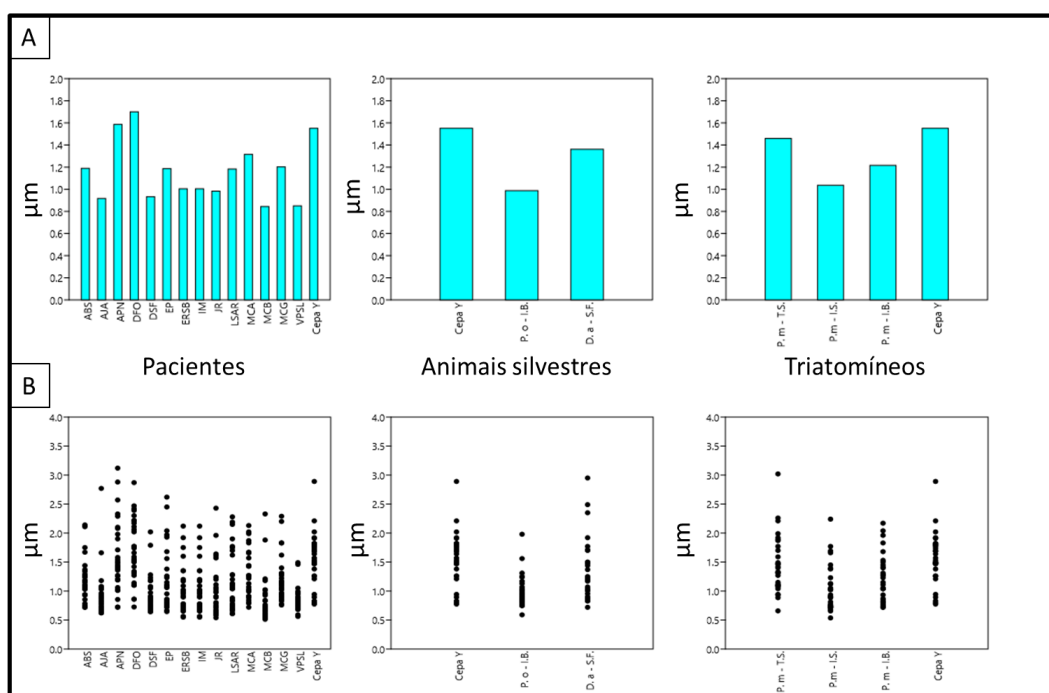
Parâmetros Morfométricos	Parâmetros Estatísticos	Cepa Y ( $\mu\text{m}$ )	Hospedeiros ( $\mu\text{m}$ )			
			Humanos (n=14)	Animais Silvestres (n=2)	Triatomíneos (n=3)	Geral (n=20)
L	Int. de Variação (Min. - Máx.)	12,14 - 18,46	10,15 - 21,74	13,78 - 21,33	10,32 - 21,09	10,15 - 21,74
	Médias	15,48	15,53	17,27	14,92	15,61
	Desvios Padrão	1,6	2,03	1,94	2,39	2,14
PK	Int. de Variação (Min. - Máx.)	0,77 - 2,89	0,51 - 3,12	0,59 - 2,95	0,54 - 3,02	0,51 - 3,12
	Médias	1,55	1,12	1,17	1,24	1,17
	Desvios Padrão	0,45	0,5	0,46	0,47	0,49
KN	Int. de Variação (Min. - Máx.)	2,7 - 4,52	2,25 - 6,7	2,87 - 6,84	2,02 - 6,32	2,02 - 6,84
	Médias	3,56	4,06	4,78	3,68	4,05
	Desvios Padrão	0,48	0,77	1,02	1,01	0,87
PN	Int. de Variação (Min. - Máx.)	3,88 - 7,39	2,96 - 7,83	4,05 - 8,31	2,82 - 7,65	2,82 - 8,31
	Médias	5,12	5,18	5,95	4,92	5,22
	Desvios Padrão	0,78	0,94	1,07	1,21	1,02
NA	Int. de Variação (Min. - Máx.)	4,42 - 8,58	3,47 - 9,65	4,07 - 10,75	3,69 - 10,79	3,47 - 10,79
	Médias	6,84	6,46	7,21	6,3	6,53
	Desvios Padrão	1,02	1,19	1,14	1,43	1,24
F	Int. de Variação (Min. - Máx.)	2,29 - 4,85	1,78 - 6,77	2,02 - 6,64	2,11 - 5,83	1,78 - 6,77
	Médias	3,52	3,89	4,11	3,69	3,86
	Desvios Padrão	0,6	0,86	0,9	0,8	0,85
NI	Int. de Variação (Min. - Máx.)	0,55 - 1,02	0,44 - 1,65	0,55 - 1,57	0,47 - 1,4	0,44 - 1,65
	Médias	0,76	0,82	0,84	0,8	0,82
	Desvios Padrão	0,14	0,18	0,2	0,2	0,18
KI	Int. de Variação (Min. - Máx.)	1,24 - 1,65	1,1 - 1,78	1,13 - 1,73	1,13 - 1,72	1,1 - 1,78
	Médias	1,44	1,29	1,26	1,35	1,3
	Desvios Padrão	0,12	0,13	0,13	0,13	0,14

**Legenda:**  Valores relativos a L;  Valores relativos a PK;  Valores relativos a KN;  
 Valores relativos a PN;  Valores relativos a NA;  Valores relativos a F;  
 Valores relativos a NI;  Valores relativos a KI; **n:** número de hospedeiros.

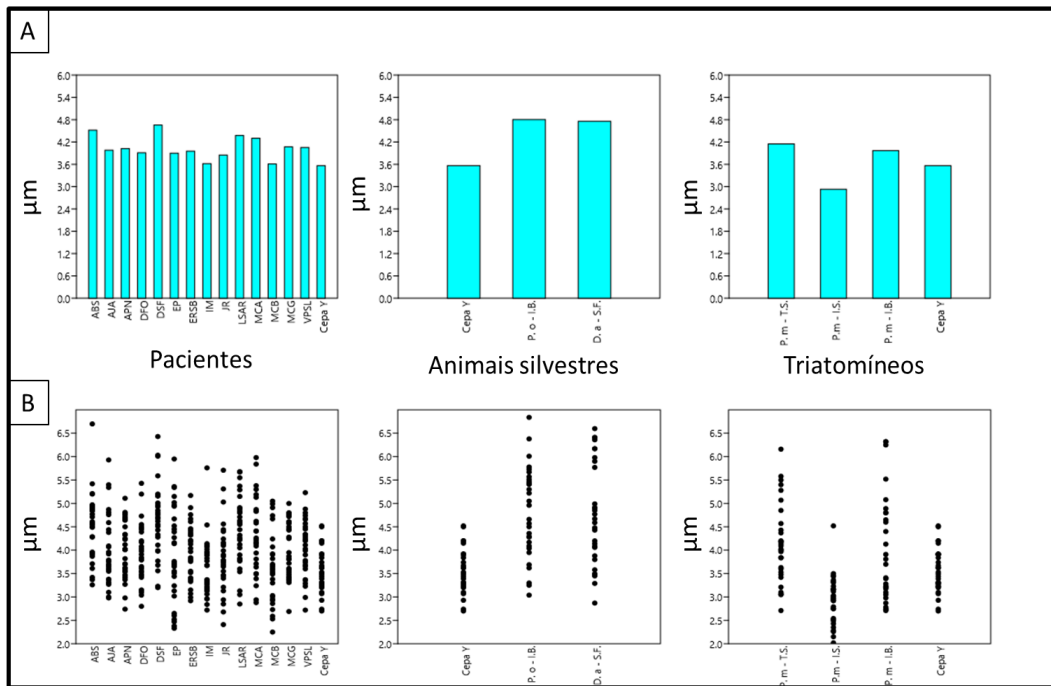
<sup>12</sup> Com exceção dos Índices.



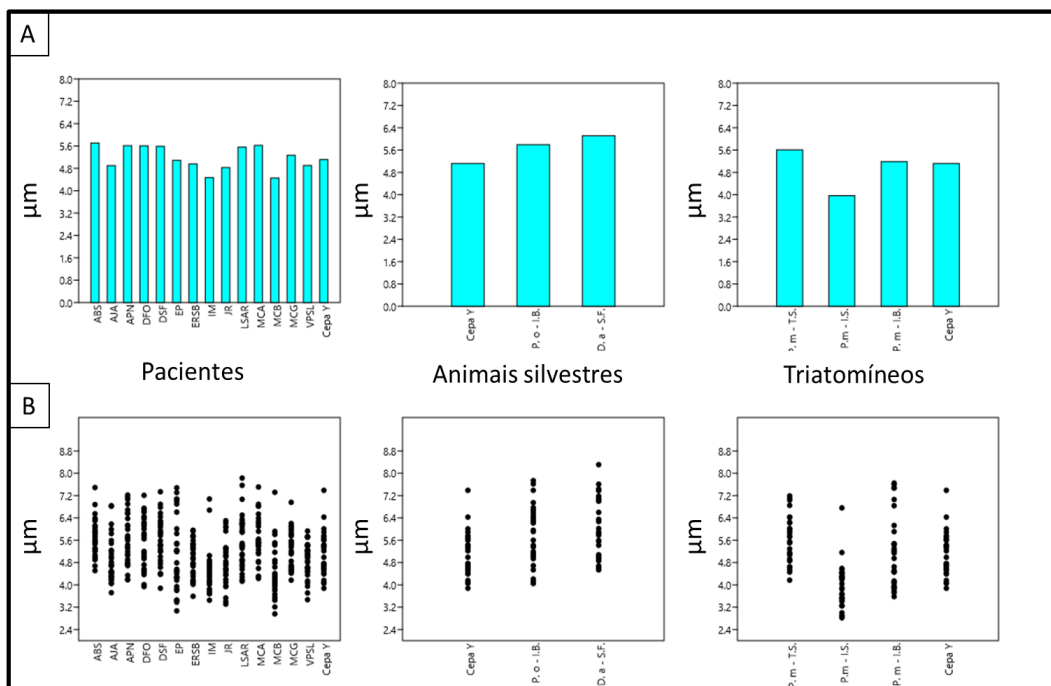
**Figura 13:** Caracterização morfométrica de cepas de *T. cruzi* isoladas de hospedeiros humanos (pacientes), animais silvestres e triatomíneos no estado de São Paulo, Brasil. Mensurações relativas ao comprimento total (L). **A:** Gráfico de colunas: médias; **B:** Gráfico de dispersão: medidas relativas aos 30 parasitos de cada hospedeiro, representadas por pontos.



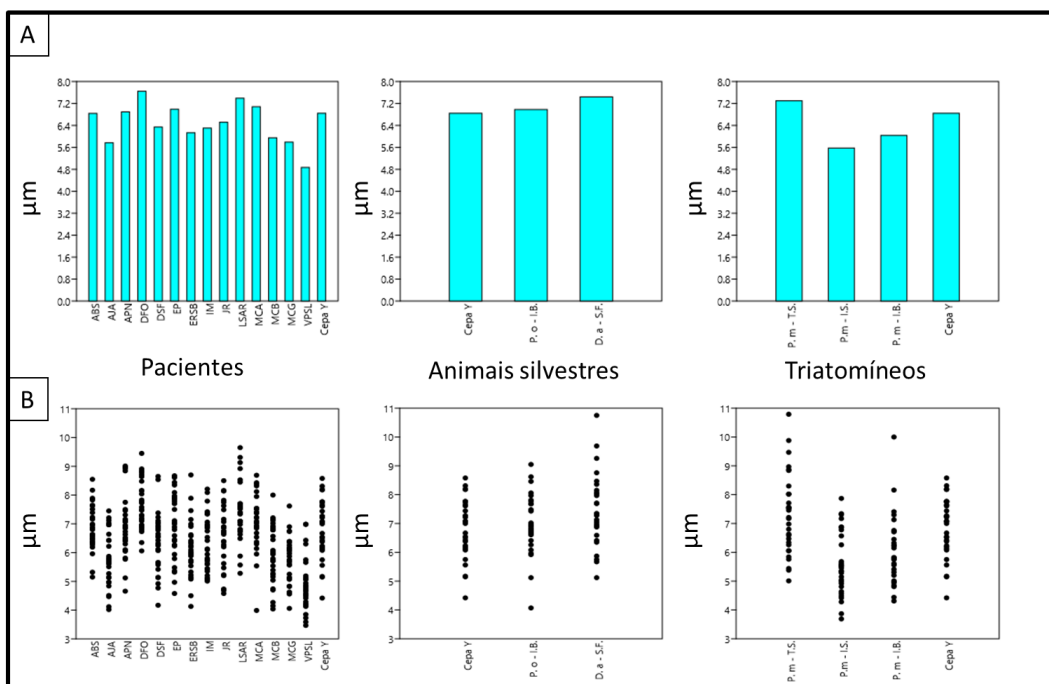
**Figura 14:** Caracterização morfométrica de cepas de *T. cruzi* isoladas de hospedeiros humanos (pacientes), animais silvestres e triatomíneos no estado de São Paulo, Brasil. Mensurações relativas à distância entre a extremidade posterior e o meio do cinetoplasto (PK). Gráfico de colunas: médias e desvios padrão. **A:** Gráfico de colunas: médias; **B:** Gráfico de dispersão: medidas relativas aos 30 parasitos de cada hospedeiro, representadas por pontos.



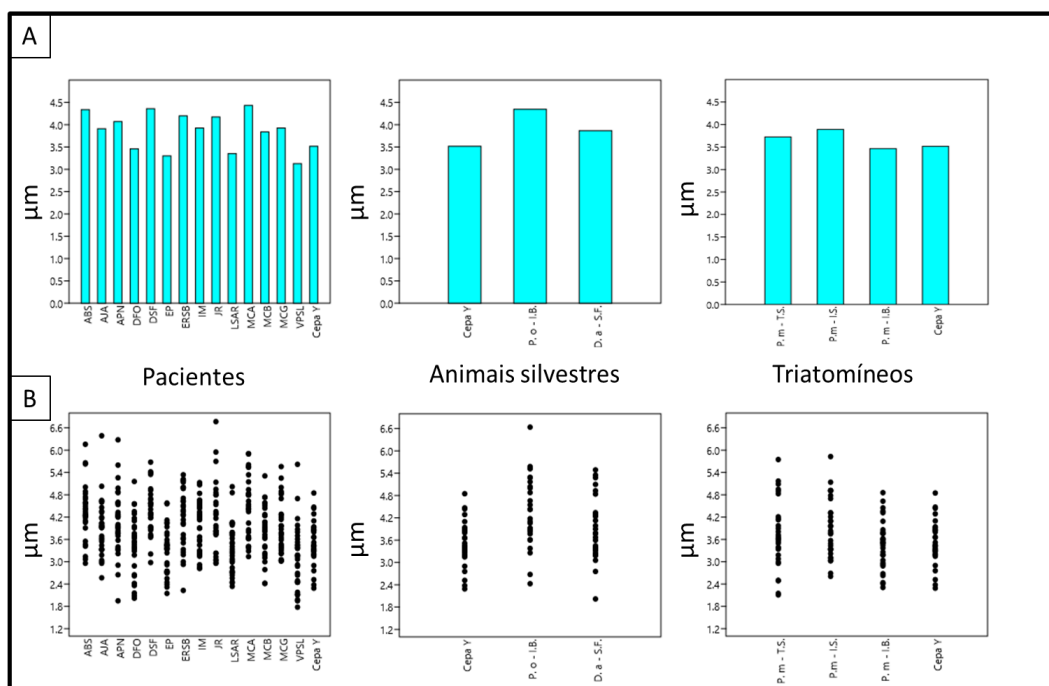
**Figura 15:** Caracterização morfométrica de cepas de *T. cruzi* isoladas de hospedeiros humanos (pacientes), animais silvestres e triatomíneos no estado de São Paulo, Brasil. Mensurações relativas à distância entre o meio do cinetoplasto e o meio do núcleo (KN). **A:** Gráfico de colunas: médias; **B:** Gráfico de dispersão: medidas relativas aos 30 parasitos de cada hospedeiro, representadas por pontos.



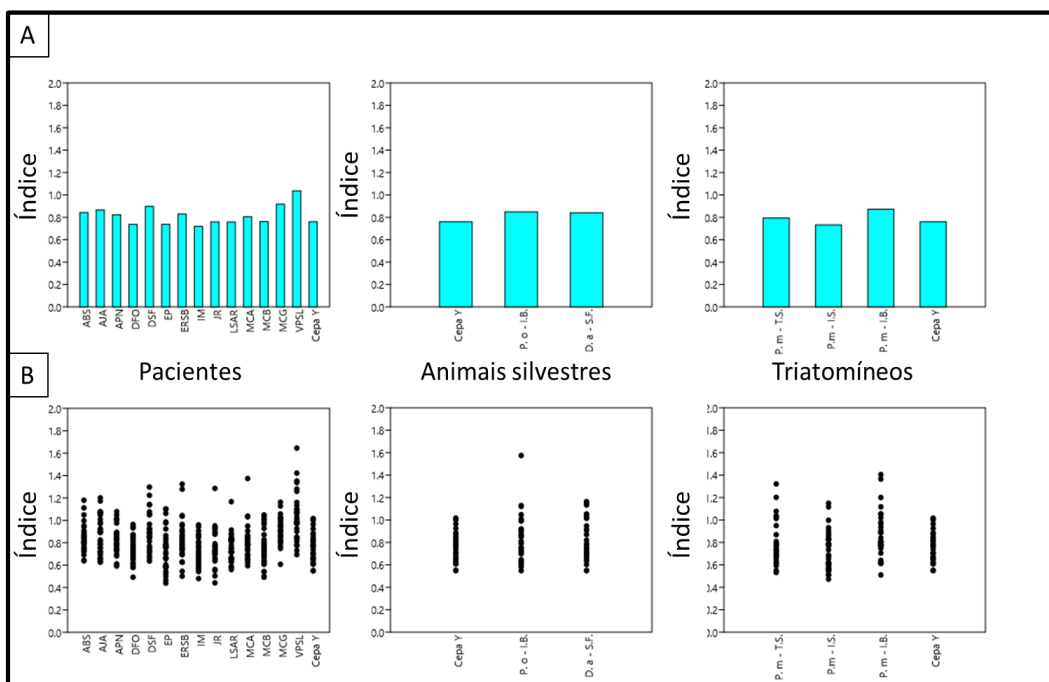
**Figura 16:** Caracterização morfométrica de cepas de *T. cruzi* isoladas de hospedeiros humanos (pacientes), animais silvestres e triatomíneos no estado de São Paulo, Brasil. Mensurações relativas à distância entre a extremidade posterior e o meio do núcleo (PN). Gráfico de colunas: médias e desvios padrão. **A:** Gráfico de colunas: médias; **B:** Gráfico de dispersão: medidas relativas aos 30 parasitos de cada hospedeiro, representadas por pontos.



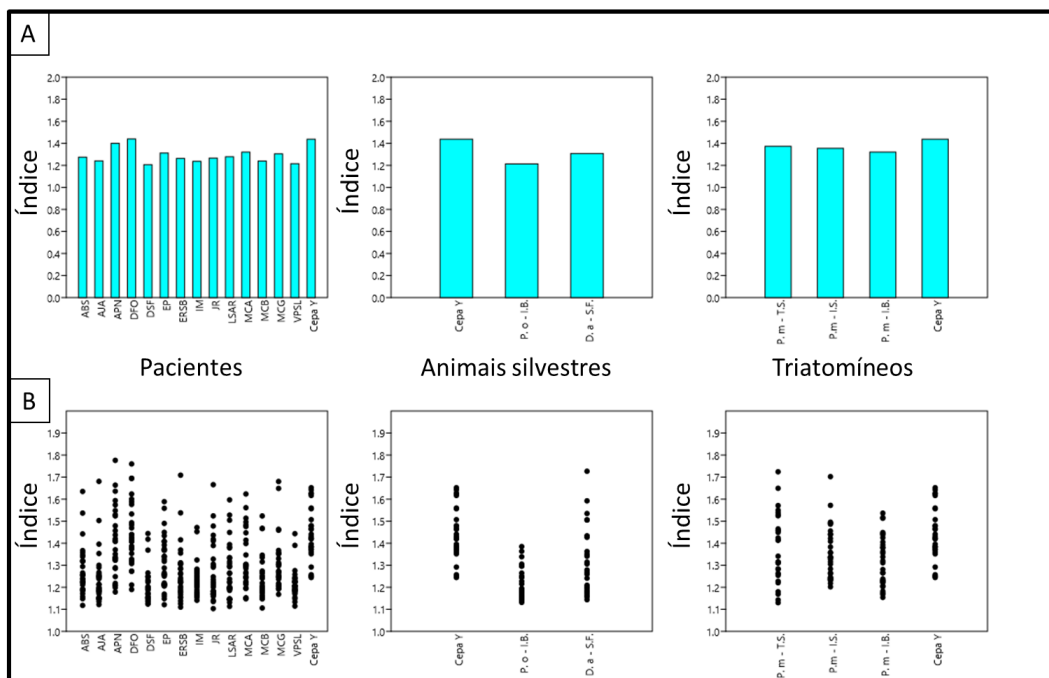
**Figura 17:** Caracterização morfométrica de cepas de *T. cruzi* isoladas de hospedeiros humanos (pacientes), animais silvestres e triatomíneos no estado de São Paulo, Brasil. Mensurações relativas à distância entre o meio do núcleo e a extremidade anterior (NA). Gráfico de colunas: médias e desvios padrão. **A:** Gráfico de colunas: médias; **B:** Gráfico de dispersão: medidas relativas aos 30 parasitos de cada hospedeiro, representadas por pontos.



**Figura 18:** Caracterização morfométrica de cepas de *T. cruzi* isoladas de hospedeiros humanos (pacientes), animais silvestres e triatomíneos no estado de São Paulo, Brasil. Mensurações relativas ao comprimento do flagelo livre (F). **A:** Gráfico de colunas: médias; **B:** Gráfico de dispersão: medidas relativas aos 30 parasitos de cada hospedeiro, representadas por pontos.



**Figura 19:** Caracterização morfométrica de cepas de *T. cruzi* isoladas de hospedeiros humanos (pacientes), animais silvestres e triatomíneos no estado de São Paulo, Brasil. Valor do índice nuclear (NI), correspondente à posição do núcleo no corpo do parasito. Gráfico de colunas: médias e desvios padrão. **A:** Gráfico de colunas: médias; **B:** Gráfico de dispersão: medidas relativas aos 30 parasitos de cada hospedeiro, representadas por pontos.



**Figura 20:** Caracterização morfométrica de cepas de *T. cruzi* isoladas de hospedeiros humanos (pacientes), animais silvestres e triatomíneos no estado de São Paulo, Brasil. Valor do índice cinetoplasmático (KI), correspondente à posição do cinetoplasto em relação ao núcleo. Gráfico de colunas: médias e desvios padrão; **A:** Gráfico de colunas: médias; **B:** Gráfico de dispersão: medidas relativas aos 30 parasitos de cada hospedeiro, representadas por pontos.

#### 4.4. Quantificação dos DNAs Extraídos

As concentrações e qualidade dos DNAs extraídos das amostras estão representadas na **Tabela 5**.

**Tabela 5:** Concentrações dos DNAs extraídos das amostras, em nanogramas por microlitro (ng/ $\mu$ L) e grau de pureza (260/280 e 260/230).

Código	Hospedeiro	Concentração (ng/ $\mu$ L)	260/280	260/230
1	E.P.	18,63	1,8	9,92
2	M.C.G.	16,82	1,69	-5,76
3	A.B.S.	15,34	1,8	-8,06
4	E.M.	12,59	1,52	-2,31
5	D.F.O.	5,87	1,43	-1,04
6	L.A.S.R.	10,63	1,56	-2,64
7	M.C.B.	16,65	1,55	0,58
8	I.M.	48,68	1,31	0,71
9	J.D.O.	4,53	1,89	0,34
10	M.L.B.S.	4,71	2,6	0,13
11	L.M.P.	50,01	1,42	0,93
12	V.P.S.L.	8,12	1,95	0,3
13	U.J.A.	18,37	1,44	0,38
14	J.M.S.	8,97	2,25	0,26
15	I.C.P.	13,81	1,6	0,73
16	J.R.	4,97	5,96	0,32
17	E.R.S.B.	15,74	2,05	0,16
18	A.P.N.	3,45	93,96	0,09
19	D.S.F.	7,67	2,07	0,57
20	A.J.A.	13,4	1,49	0,63
21	M.C.A.	5,24	3,25	0,23
22	J.S.C.	19,92	1,75	0,76
23	A.E.S.	3,82	2,48	0,27
24	G.A.B.L.	7,96	1,34	0,3
25	B.M.M.	0,43	0,58	-0,24
26	Piriguete	2,05	1,21	0,14
IB24	Piriguete	99,87	1,89	1,85
27	Pequena	1,92	0,8	-0,53
IB18	Pequena	77,75	1,92	1,67
28	Pipoca	-0,77	0,84	-0,05
IB21	Pipoca	94,65	1,92	1,69
29	Chiquita	0,13	1,37	0,01
IB22	Chiquita	81,03	1,89	1,59
30	Jean Pierre	0,55	1,76	0,03
IB20	Jean Pierre	92,54	1,93	1,74
31	Duque	-0,26	0,51	-0,02
IB23	Duque	87,94	1,93	1,8
32	Gouda	-0,16	0,31	-0,01
IB19	Gouda	86,46	1,9	1,71
33	<i>Philander opossum</i>	35,82	2,29	1,44
34	<i>Didelphis albiventris</i>	20,25	2,48	0,45
35	<i>P. megistus</i>	11,64	1,84	2,33
36	<i>P. megistus</i>	17,28	1,77	2,14
37	<i>P. megistus</i>	12,86	2,65	0,5

**Legenda:**   Pacientes;   Cães;   Animais Silvestres;   Triatomíneos;

260/280: Relacionado à presença (DNA com índice inferior a 1,8) ou ausência (DNA com índice superior a 1,8) de proteínas;

260/230: Relacionado à presença (DNA com índice inferior a 2,0) ou ausência (DNA com índice entre 2,0 e 2,2) de inibidores;

**Código:** Numeração estabelecida na caracterização molecular para representar as amostras na eletroforese.

#### 4.5. Diagnóstico e Identificação de Tripanossomatídeos, pelo Método FFLB

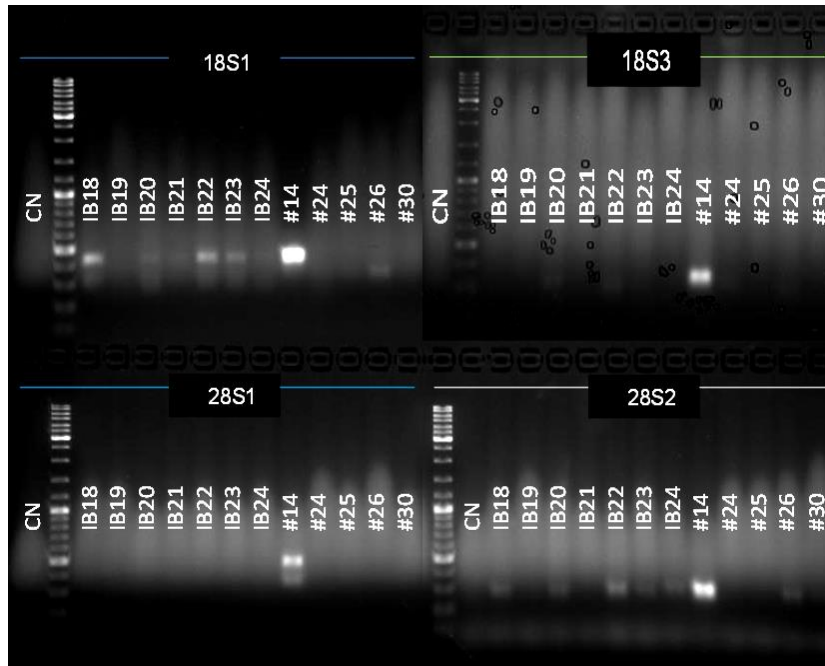
Os resultados da eletroforese para as regiões 18S1<sup>13</sup>, 18S3, 28S1 e 28S2 estão apresentados na **Figuras 21 e 22**.



**Figura 21:** Eletroforese em gel de agarose a 2% do DNA extraído das amostras de material de cultura e esfregaço sanguíneo (#1 - #37). Presença de bandas de, aproximadamente, 400 pb para 18S1 e 28S1 e de 300 pb para 18S3 e 28S2, em diferentes intensidades. **CN:** controle negativo; **Tcon 025E - CP 1 e 2:** controles positivos; ● canaleta sem amostra.

<sup>13</sup> Inicialmente, o marcador 18S1 foi utilizado como triagem, selecionando apenas amostras com bandas visíveis na eletroforese para utilização nos demais marcadores. Entretanto, devido a complexidade verificada no diagnóstico das amostras de Ilhabela e problemas com a positividade de alguns controles negativos, foi decidido re-introduzir algumas amostras no estudo e repetir outras. Estas foram corridas juntamente com as sete amostras de sangue caninas. As informações e resultados estão apresentados na **Figura 24**.





**Figura 22:** Eletroforese em gel de agarose a 2% do DNA extraído das amostras de sangue caninas (IB18 - IB24), de cultura (#14) e esfregaço (#24, #25, #26 e #30). Presença de bandas de, aproximadamente, 400 pb para 18S1 e 28S1 e de 300 pb para 18S3 e 28S2. **CN:** controles negativos.

Com relação aos resultados obtidos pela leitura em sequenciador dos fragmentos amplificados, estes foram comparados a dados obtidos de cepas previamente caracterizadas, registradas e organizadas pelo ICB/USP, pela metodologia do FFLB.

A **Tabela 6** mostra o tamanho dos fragmentos amplificados para cada *primer*, em pares de bases, e as DTUs verificadas, por hospedeiro.

**Tabela 6:** Fragmentos amplificados para 18S1, 18S3, 28S1 e 28S2. Cada *primer* apresentou fragmentos de tamanhos específicos que, interpretados em conjunto, possibilitaram determinar as DTUs das cepas isoladas dos diferentes hospedeiros. Alguns resultados indicaram a possibilidade de hospedeiros com infecção mista, pela presença de fragmentos sugestivos para *T. rangeli* e *Leishmania*.

Código	Hospedeiro	Tamanho do Fragmento (pb)				Resultados
		18S1	18S3	28S1	28S2	
1	E.P.	299, 300	241, 242	346, 347, 349, 350, 351	212, 213	<i>T. cruzi</i> II/VI
2	M.C.G.	304, 305	245, 246	338, 339, 340, 341	196, 197	<i>T. cruzi</i> I
3	A.B.S.	299, 300, 301	241, 242	349, 350	212, 213	<i>T. cruzi</i> II/VI
4	E.M.	299, 300	241, 242	349, 350	212, 213	<i>T. cruzi</i> II/VI
5	D.F.O.	299, 300	241, 242	349, 350	212, 213	<i>T. cruzi</i> II/VI
6	L.S.A.R.	299, 300	241, 242	348, 349, 350	212, 213	<i>T. cruzi</i> II/VI
7	M.C.B.	299, 300	241, 242	347, 348, 349, 350	212, 213	<i>T. cruzi</i> II/VI
8	I.M.	299, 300	241, 242	●●●	212, 213	<i>T. cruzi</i> II/VI
9	J.D.O.	300	241, 242	347, 348, 351, 352	212, 213	<i>T. cruzi</i> II/VI
10	M.L.B.S.	300	241, 242	346, 347, 349, 350	212, 213	<i>T. cruzi</i> II/VI
11	L.M.P.	300	241, 242	346, 348, 349, 350	212, 213	<i>T. cruzi</i> II/VI
12	V.P.S.L.	299, 300	241, 242	347, 348, 349, 350	212, 213	<i>T. cruzi</i> II/VI
13	U.J.A.	299, 300	241, 242	347, 348, 349, 350	212, 213	<i>T. cruzi</i> II/VI
14	J.M.S.	299, 305	236, 244, 245	333, 334, 336, 338, 339	189, 196, 197	<i>T. cruzi</i> I; <i>T. cruzi</i> III
15	I.C.P.	300	241, 242	347, 348, 349, 350	211, 213	<i>T. cruzi</i> II/VI
16	J.R.	299, 300	241, 242	346, 347, 348, 350	212, 213	<i>T. cruzi</i> II/VI
17	E.R.S.B.	300	241, 242	348, 349, 350	212, 213	<i>T. cruzi</i> II/VI
18	A.P.N.	300	241, 242	348, 349, 350, 351	212, 213	<i>T. cruzi</i> II/VI
19	D.S.F.	300	241, 242	346, 347	212, 213	<i>T. cruzi</i> II/VI
20	A.J.A.	300	241, 242	347, 348, 349, 350	212, 213	<i>T. cruzi</i> II/VI
21	M.C.A.	299, 300	241, 242	349, 350	212, 213	<i>T. cruzi</i> II/VI
22	J.S.C.	299, 300	241, 242	344, 345, 347, 348, 349, 350	212, 213	<i>T. cruzi</i> II/VI
23	A.E.S.	300	241, 242	348, 349, 350	212, 213	<i>T. cruzi</i> II/VI
24	G.A.B.L.	236	214, 216, 232, 242	●●●	●●●	<i>T. cruzi</i> ; <i>Leishmania</i> (?)
25	B.M.M.	236	●●●	●●●	180	<i>Leishmania</i> (?)
26	Cão Piriquete (Esfregaço)	236	212	●●●	185, 194	<i>Leishmania</i> (?)
IB24	Cão Piriquete (Sangue)	299	245	●●●	181, 204, 213	<i>T. cruzi</i>
27	Cão Pequena (Esfregaço)	●●●	●●●	●●●	●●●	●●●
IB18	Cão Pequena (Sangue)	218, 226, 299, 305	199, 200, 201, 214, 225, 246	●●●	181, 190, 194, 197, 198, 203	<i>T. cruzi</i> I; <i>T. rangeli</i> ; <i>Leishmania</i> (?)
28	Cão Pipoca (Esfregaço)	●●●	●●●	●●●	●●●	●●●
IB21	Cão Pipoca (Sangue)	218, 299	236	●●●	●●●	<i>T. cruzi</i>
29	Cão Chiquita (Esfregaço)	●●●	●●●	●●●	●●●	●●●
IB22	Cão Chiquita (Sangue)	211, 218, 299, 305	225, 241, 242, 245, 246	●●●	181, 188, 190, 191, 204, 213	<i>T. cruzi</i> I; <i>T. cruzi</i> II/VI; <i>T. cruzi</i> ; <i>T. rangeli</i>
30	Cão Jean Pierre (Esfregaço)	●●●	●●●	●●●	198	<i>T. cruzi</i> I
IB20	Cão Jean Pierre (Sangue)	217, 226, 294, 296, 299	199, 241, 242, 245	●●●	181, 196, 198	<i>T. cruzi</i> I; <i>T. cruzi</i> (II/VI)
31	Cão Duque (Esfregaço)	●●●	●●●	●●●	●●●	●●●
IB23	Cão Duque (Sangue)	217, 225, 299	199, 201, 225, 236, 245	●●●	181, 188, 190, 197, 204	<i>T. cruzi</i> I; <i>T. cruzi</i> ; <i>T. rangeli</i>
32	Cão Gouda (Esfregaço)	●●●	●●●	●●●	●●●	●●●
IB19	Cão Gouda (Sangue)	●●●	237	●●●	●●●	●●●
33	<i>Philander opossum</i> - I.B.	300	241, 242	348, 349	212, 213	<i>T. cruzi</i> II/VI
34	<i>Didelphis albiventris</i> - S.F.	299, 300	241, 242	347, 348, 349, 350	212, 213	<i>T. cruzi</i> II/VI
35	<i>P. megistus</i> - T.S.	299, 304, 305	244, 245	333, 335, 336, 338, 339, 340	196	<i>T. cruzi</i> I
36	<i>P. megistus</i> - I.B.	299, 300	241, 242	348, 349, 350, 351	212, 213	<i>T. cruzi</i> II/VI
37	<i>P. megistus</i> - I.S.	299, 305	244, 245	332, 334, 335, 338, 339, 340	196, 197	<i>T. cruzi</i> I

**Legenda:** ■ TcI; ■ TcII/VI; ■ TcIII; ■ *T. cruzi* (não foi possível determinar DTU, especificamente)

■ Sugestivo para *T. rangeli*; ■ Sugestivo para *Leishmania*;

●●● Fragmentos não detectados; ●●● Não foi realizado PCR; ■■■ Resultados inconclusivos.

#### 4.6. Agrupamento das Cepas por DTU, Comparação e Correlação dos Dados Morfométricos Entre os Grupos

As cepas agrupadas por DTU e utilizadas na morfometria estão representadas na **Tabela 7**. Os dados morfométricos dos grupos, relativos aos 8 parâmetros estudados (L, PK, KN, PN, NA, F, NI e KI), estão representados na **Tabela 8**.

Nas **Figuras 23-30**, estão representadas as médias para cada parâmetro morfométrico observado e as dispersões de medida de cada parasito estudado, por DTU.

**Tabela 7:** Cepas utilizadas na morfometria, agrupadas por DTUs verificadas na caracterização molecular.

CÓDIGO	HOSPEDEIRO	DTU	Nº DE HOSPEDEIROS	TOTAL DE PARASITOS MENSURADOS/GRUPO
2	M.C.G.	Tcl	3	90
35	<i>P. megistus</i> - T.S.			
37	<i>P. megistus</i> - I.S.			
1	E.P.	TclII/VI	16	480
3	A.B.S.	TclII/VI		
5	D.F.O.	TclII/VI		
6	L.S.A.R.	TclII/VI		
7	M.C.B.	TclII/VI		
8	I.M.	TclII/VI		
12	V.P.S.L.	TclII/VI		
16	J.R.	TclII/VI		
17	E.R.S.B.	TclII/VI		
18	A.P.N.	TclII/VI		
19	D.S.F.	TclII/VI		
20	A.J.A.	TclII/VI		
21	M.C.A.	TclII/VI		
33	<i>Philander opossum</i> - I.B.	TclII/VI		
34	<i>Didelphis albiventris</i> - S.F.	TclII/VI		
36	<i>P. megistus</i> - I.B.	TclII/VI		

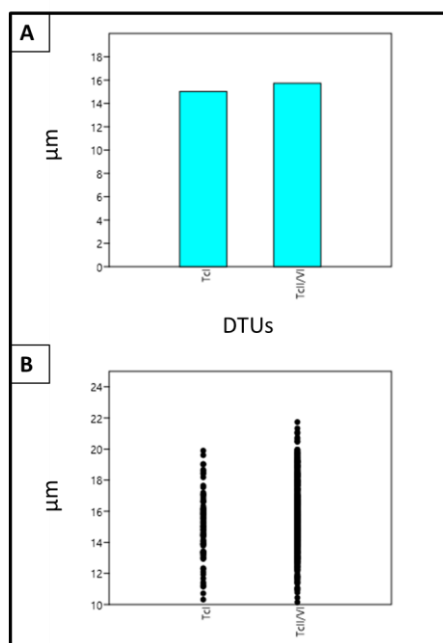
**Legenda:** ■ Cepas Tcl; ■ Cepas TcII/VI.

**Tabela 8:** Intervalos de variação mínimo e máximo, médias e desvios padrão, observados por grupo de DTU e correlacionados (geral), referentes aos parâmetros morfométricos estudados, em micrômetros ( $\mu\text{m}$ )<sup>14</sup>.

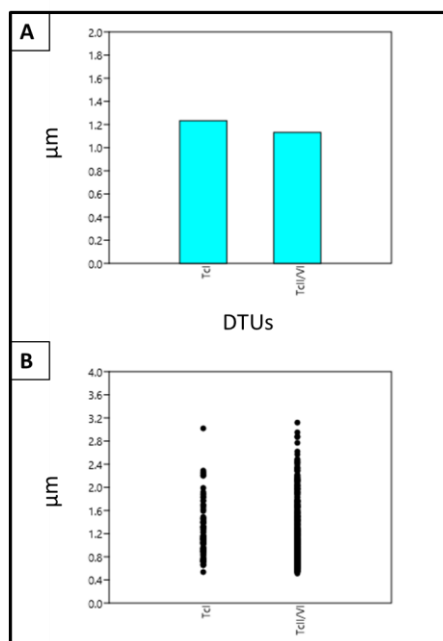
Parâmetros Morfométricos	Parâmetros Estatísticos	DTUs		
		Tcl (n=3)	Tcl/VI (n=16)	Geral (n=19)
L	Int. de Variação (Min. - Máx.)	10,32 - 19,9	10,15 - 21,74	10,15 - 21,74
	Médias	15,02	15,73	15,62
	Desvios Padrão	2,09	2,16	2,16
PK	Int. de Variação (Min. - Máx.)	0,54 - 3,02	0,51 - 3,12	0,51 - 3,12
	Médias	1,23	1,13	1,15
	Desvios Padrão	0,46	0,49	0,49
KN	Int. de Variação (Min. - Máx.)	2,02 - 6,16	2,25 - 6,84	2,02 - 6,84
	Médias	3,72	4,14	4,08
	Desvios Padrão	0,87	0,87	0,88
PN	Int. de Variação (Min. - Máx.)	2,82 - 7,19	2,96 - 8,31	2,82 - 8,31
	Médias	4,95	5,27	5,22
	Desvios Padrão	1,05	1,03	1,04
NA	Int. de Variação (Min. - Máx.)	3,69 - 10,79	3,47 - 10,75	3,47 - 10,79
	Médias	6,22	6,57	6,52
	Desvios Padrão	1,35	1,22	1,25
F	Int. de Variação (Min. - Máx.)	2,11 - 5,83	1,78 - 6,77	1,78 - 6,77
	Médias	3,85	3,89	3,88
	Desvios Padrão	0,8	0,87	0,86
NI	Int. de Variação (Min. - Máx.)	0,47 - 1,32	0,44 - 1,65	0,44 - 1,65
	Médias	0,81	0,82	0,82
	Desvios Padrão	0,18	0,18	0,18
KI	Int. de Variação (Min. - Máx.)	1,13 - 1,72	1,1 - 1,78	1,1 - 1,78
	Médias	1,34	1,28	1,29
	Desvios Padrão	0,13	0,13	0,13

**Legenda:** ■ Valores relativos a L; ■ Valores relativos a PK; ■ Valores relativos a KN;  
■ Valores relativos a PN; ■ Valores relativos a NA; ■ Valores relativos a F;  
■ Valores relativos a NI; ■ Valores relativos a KI; n: número de hospedeiros.

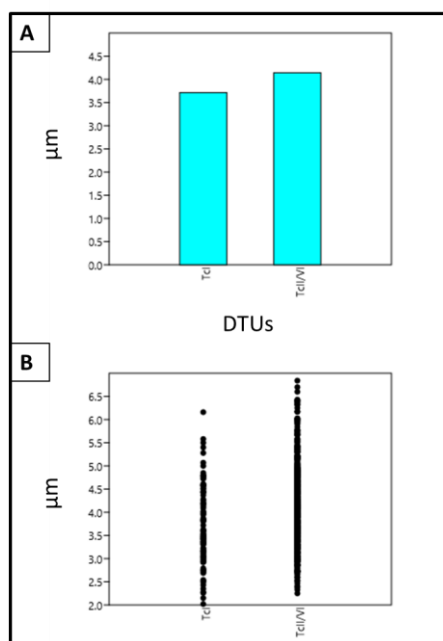
<sup>14</sup> Com exceção dos índices.



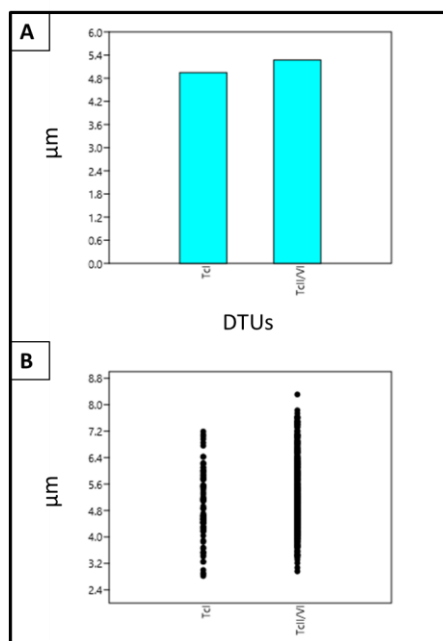
**Figura 23:** Dados morfométricos, por DTU. Comparação dos valores da média e dispersão de medidas entre TcI e TcII/VI, relativos ao comprimento total (L). **A:** Gráfico de colunas: médias; **B:** Gráfico de dispersão: medidas de cada parasito (representadas por pontos) pertencente às respectivas DTUs.



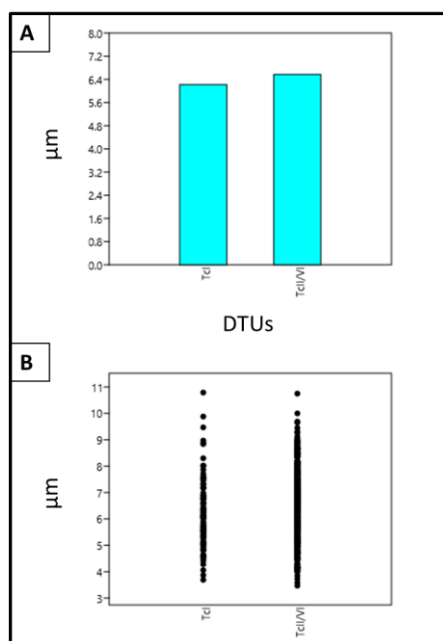
**Figura 24:** Dados morfométricos, por DTU. Comparação dos valores da média e dispersão de medidas entre TcI e TcII/VI, relativos à distância entre a extremidade posterior e o meio do cinetoplasto (PK). **A:** Gráfico de colunas: médias; **B:** Gráfico de dispersão: medidas de cada parasito (representadas por pontos) pertencente às respectivas DTUs.



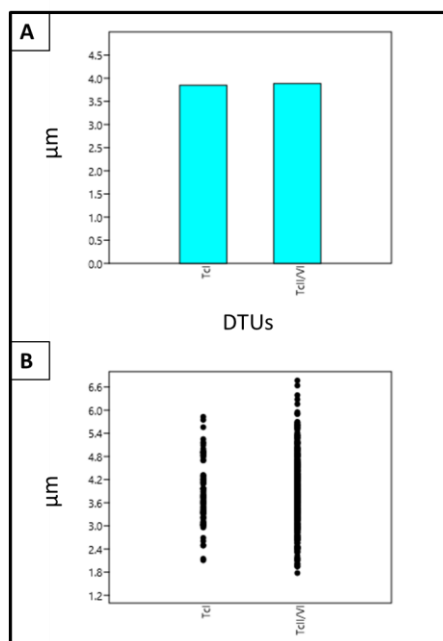
**Figura 25:** Dados morfométricos, por DTU. Comparação dos valores da média e dispersão de medidas entre Tcl e TcII/VI, relativos à distância entre o meio do cinetoplasto e o meio do núcleo (KN). **A:** Gráfico de colunas: médias; **B:** Gráfico de dispersão: medidas de cada parasito (representadas por pontos) pertencente às respectivas DTUs.



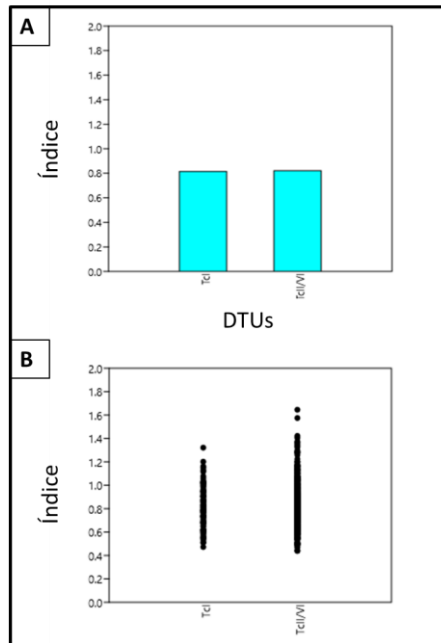
**Figura 26:** Dados morfométricos, por DTU. Comparação dos valores da média e dispersão de medidas entre Tcl e TcII/VI, relativos à distância entre a extremidade posterior e o meio do núcleo (PN). **A:** Gráfico de colunas: médias; **B:** Gráfico de dispersão: medidas de cada parasito (representadas por pontos) pertencente às respectivas DTUs.



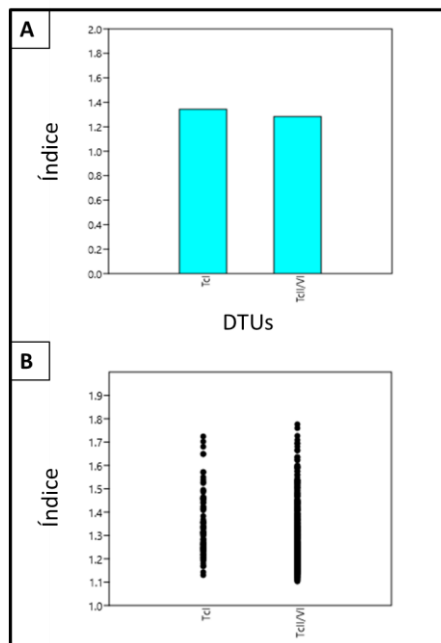
**Figura 27:** Dados morfométricos, por DTU. Comparação dos valores da média e dispersão de medidas entre TcI e TcII/VI, relativos à distância entre o meio do núcleo e a extremidade anterior (NA). **A:** Gráfico de colunas: médias; **B:** Gráfico de dispersão: medidas de cada parasito (representadas por pontos) pertencente às respectivas DTUs.



**Figura 28:** Dados morfométricos, por DTU. Comparação dos valores da média e dispersão de medidas entre TcI e TcII/VI, relativos ao comprimento do flagelo livre (F). **A:** Gráfico de colunas: médias; **B:** Gráfico de dispersão: medidas de cada parasito (representadas por pontos) pertencente às respectivas DTUs.



**Figura 29:** Dados morfométricos, por DTU. Comparação dos valores da média e dispersão de medidas entre TcI e TcII/VI, relativos ao índice nuclear (NI), correspondente à posição do núcleo no corpo do parasito. **A:** Gráfico de colunas: médias; **B:** Gráfico de dispersão: medidas de cada parasito (representadas por pontos) pertencente às respectivas DTUs.

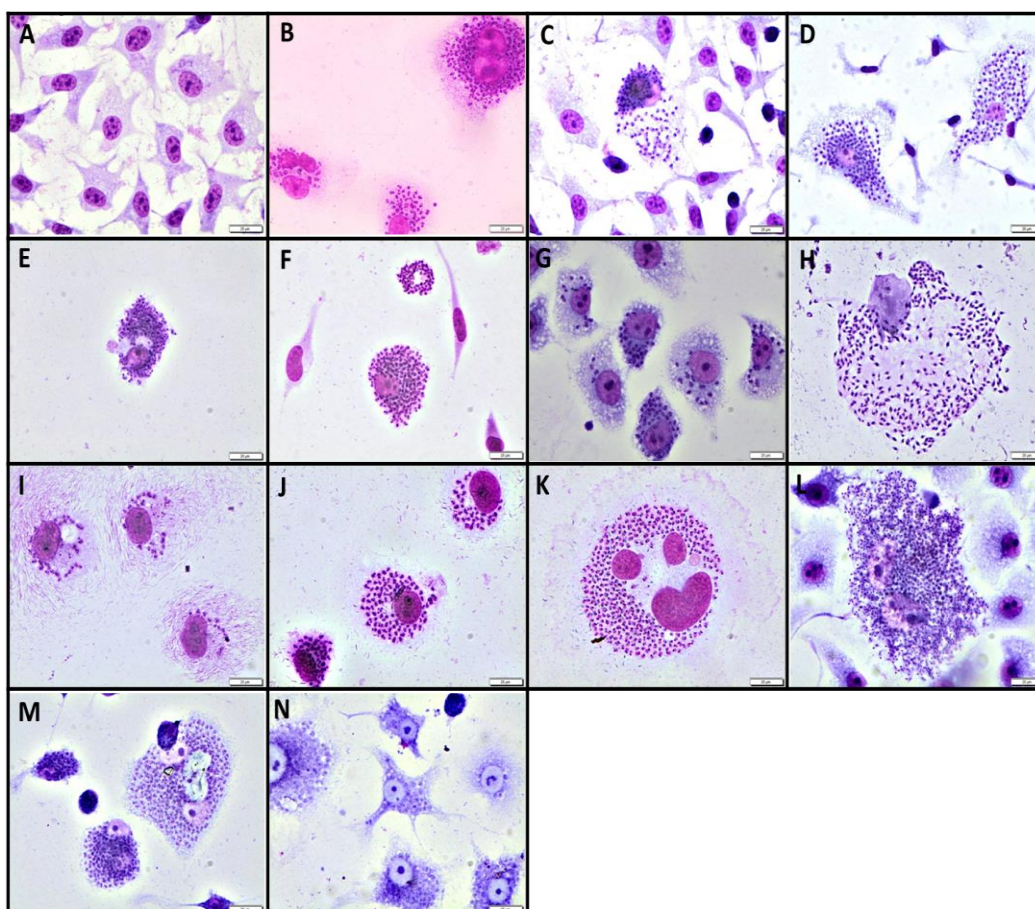


**Figura 30:** Dados morfométricos, por DTU. Comparação dos valores da média e dispersão de medidas entre TcI e TcII/VI, relativos ao índice cinetoplasmático (KI), correspondente à posição do núcleo no corpo do parasito. **A:** Gráfico de colunas: médias; **B:** Gráfico de dispersão: medidas de cada parasito (representadas por pontos) pertencente às respectivas DTUs.



#### 4.7. Verificação da Capacidade Infectiva das Cepas, em Células NCTC

Na **Figura 31**, são apresentadas as imagens correspondentes aos ensaios de infecção experimental em células NCTC, a partir de formas tripomastigotas obtidas do cultivo de cepas de *T. cruzi*, em sistema celular LLC-MK2, isoladas de 12 hospedeiros naturalmente infectados (2 triatomíneos e 10 humanos). No estudo, também, foram incluídos um controle negativo - sem infecção por *T. cruzi* - e cepa Y de referência.



**Figura 31:** Células NCTC utilizadas na verificação da capacidade infectiva das 12 cepas estudadas (aumento 400x). **A:** Controle Negativo; **B:** Cepa Y; **C** e **D:** triatomíneos de Taboão da Serra e Ilhabela, respectivamente; **E:** A.B.S.; **F:** E.M.; **G:** E.P.; **H:** D.F.O.; **I:** A.P.N.; **J:** M.C.A.; **K:** L.S.A.R.; **L:** M.C.G.; **M:** E.R.S.B.; **N:** J.R.

Verificou-se que todas as cepas inoculadas internalizaram e produziram formas amastigotas.

## 5. Discussão

Desde a descrição de *T. cruzi* por Chagas (1909), variações das características morfológicas da forma tripomastigota foram observadas por inúmeros pesquisadores (Dias e Freitas Filho, 1943; Brener e Chiari, 1963; Barretto, 1965; Silva, 1959; de Sousa, 1999).

Embora a morfometria constitua um importante método para a caracterização biológica das cepas, ainda não há um consenso sobre a relação do polimorfismo das formas tripomastigotas de *T. cruzi* com sua parasitemia e/ou patogenicidade (Martins *et al.*, 2008). De acordo com Ferrioli Filho *et al.* (1968), as razões para esta problemática podem estar relacionadas à falta de padronização de equipamentos, técnicas utilizadas e formas de observação. Com isto, restam, somente, as observações e análises pessoais de cada pesquisador (Martins *et al.*, 2008).

No presente estudo, foram utilizados os parâmetros morfométricos indicados por Hoare (1972), compostos pelas variáveis L, PK, KN, PN, NA e F e pelos índices nuclear e cinetoplasmático (NI e KI, respectivamente). A partir das medidas obtidas, foram calculados parâmetros estatísticos, com objetivos de estabelecer possíveis correlações e verificar semelhanças ou diferenças significativas entre as cepas estudadas. Os parâmetros estatísticos utilizados foram: média, desvio padrão e intervalo de variação mínimo e máximo (valores mínimo e máximo obtidos para cada parâmetro morfométrico estudado).

Este conjunto de metodologias permitiu, assim, realizar a caracterização morfométrica de 19 isolados de *T. cruzi*, além de cepa Y de referência, totalizando o estudo de 600 parasitos. Os resultados obtidos para a média, sobre os parâmetros morfométricos estudados, foram: L=15,61  $\mu\text{m}$  (variação de 10,15  $\mu\text{m}$  a 21,74  $\mu\text{m}$ ); PK=1,17  $\mu\text{m}$  (variação de 0,51  $\mu\text{m}$  a 3,12  $\mu\text{m}$ ); KN=4,05  $\mu\text{m}$  (variação de 2,02  $\mu\text{m}$  a 6,84  $\mu\text{m}$ ); PN=5,22  $\mu\text{m}$  (variação de 2,82  $\mu\text{m}$  a 8,31  $\mu\text{m}$ ); NA=6,53  $\mu\text{m}$  (variação de 3,47  $\mu\text{m}$  a 10,79

$\mu\text{m}$ );  $F=3,86 \mu\text{m}$  (variação de  $1,78 \mu\text{m}$  a  $6,77 \mu\text{m}$ );  $NI=0,82$  (variação de  $0,44$  a  $1,65$ ) e  $KI=1,3$  (variação de  $1,1$  a  $1,78$ ).

Em uma análise individual das cepas, que correspondeu a 30 parasitos para cada uma, pode-se determinar aquelas que tiveram as menores e maiores médias, por parâmetro verificado:  $12,9 \mu\text{m}$  (V.P.S.L.) e  $17,42 \mu\text{m}$  (*D. albiventris*) para L;  $0,84 \mu\text{m}$  (M.C.B.) e  $1,7$  (D.F.O.) para PK;  $2,93 \mu\text{m}$  (*P. megistus* - Itapecerica da Serra) e  $4,8 \mu\text{m}$  (*P. opossum*) para KN;  $3,97 \mu\text{m}$  (*P. megistus* - Itapecerica da Serra) e  $6,12 \mu\text{m}$  (*D. albiventris*) para PN;  $4,87 \mu\text{m}$  (V.P.S.L.) e  $7,65 \mu\text{m}$  (D.F.O.) para NA;  $3,13 \mu\text{m}$  (V.P.S.L.) e  $4,43 \mu\text{m}$  (M.C.A.) para F;  $0,72$  (I.M.) e  $1,04$  (V.P.S.L.) para NI e  $1,21$  (D.S.F. e *P. opossum*) e  $1,44$  (D.F.O.) para KI.

Estes resultados, quando comparados aos intervalos de variação de Hoare (1972) para L ( $11,4 \mu\text{m}$  a  $30,4 \mu\text{m}$ ), F ( $2,0 \mu\text{m}$  a  $11,2 \mu\text{m}$ ) e NI ( $0,9 \mu\text{m}$  a  $1,7 \mu\text{m}$ ), encontraram-se dentro ou muito próximos a estas faixas, indicando concordância com as variações morfométricas observadas em *T. cruzi*, no passado. As pequenas diferenças verificadas podem ser explicadas por 2 importantes fatores: **a)** as formas tripomastigotas utilizadas nos dados verificados por Hoare (1972) foram provenientes do sangue de mamíferos, enquanto que as deste estudo foram obtidas a partir de cultura de células LLC-MK2 e anteriormente submetidas a passagens em meios de cultura axênicos (LIT); **b)** *T. cruzi* pode apresentar distintos perfis de infecção e comportamentos biológicos, relacionados a fatores intrínsecos dos hospedeiros, dos próprios parasitos e do ambiente (Roque e Jansen, 2014). Este último item também pode explicar, em parte, as diferenças morfométricas observadas entre as cepas isoladas a partir dos grupos de hospedeiros compreendidos nessa metodologia, que foram humanos, animais silvestres e triatomíneos.

Contribuindo com os dados acima mencionados, o desvio padrão que, por definição, expressa o quanto um conjunto de dados é uniforme (quanto mais próximo de zero, mais homogêneos são os dados), apresentou resultados que indicaram homogeneidade para os parâmetros morfométricos PK (0,49), KN (0,87), F (0,85), NI (0,18) e KI (0,14). Mesmo PN e NA terem

apresentado valores acima destes (1,02 e 1,24, respectivamente) e indicando uma homogeneidade menor, ainda permaneceram próximos e não discrepantes, principalmente, levando-se em consideração que foram mensurados 600 parasitos, provenientes de diferentes hospedeiros e organismos, incluindo pacientes com quadros clínicos diversos (co-infectados, transplantados e renais crônicos). O parâmetro menos homogêneo verificado foi L (2,14  $\mu\text{m}$ ). Entretanto, este resultado é esperado para *T. cruzi*, uma vez que o parasito, como anteriormente mencionado, constitui populações altamente heterogêneas e polimórficas, apresentando uma faixa muito ampla para esta variável, conforme já verificada por Hoare (1972).

A partir do levantamento de outros estudos envolvendo morfometria (Brenner e Chiari, 1963; Belda Neto, 1974; Martins, 2005; Rossi, 2007; Martins *et al.*, 2008), pode-se observar que os resultados apresentados por eles, também, se encontraram dentro ou próximos da variação de Hoare (1972) e não foram conflitantes com aqueles aqui obtidos, no sentido de apresentarem valores próximos e/ou não discrepantes das médias e intervalos de variação para os parâmetros que foram possíveis de comparação em cada estudo realizado. Todavia, cabem as mesmas ressalvas apontadas quando da comparação dos resultados aqui verificados com os valores apresentados por Hoare (1972), uma vez que os autores acima referidos realizaram suas observações em formas tripomastigotas provenientes do sangue de mamíferos, especificamente, camundongos, e não das obtidas em culturas celulares.

Importante ratificar que o parâmetro largura não foi aqui estudado e, portanto, as cepas não foram classificadas quanto à sua forma, ou seja, entre fina, intermediária ou larga. Isto se deveu, exclusivamente, pela linha de trabalho adotada, que seguiu os parâmetros de Hoare (1972). Contudo, será interessante incorporar esta variável em estudos posteriores, com vistas a fornecer maiores subsídios aos resultados.

A heterogeneidade dos isolados de *T. cruzi*, no que diz respeito à morfologia, patogenicidade, virulência, conteúdo genético, entre outras

características, tem sido observada há décadas e estimulou, ao longo do tempo, diversos estudos de epidemiologia molecular e de genética de populações, tornando o parasito um dos principais modelos utilizados para estas linhas de pesquisa. Consequentemente, tornou-se um dos modelos mais notórios, quanto à sua evolução e estrutura populacional (Zingales, 2011).

Este parasito possui um padrão evolutivo, predominantemente, clonal, em que os descendentes - progênie - apresentam identidade genética igual ou muito semelhante à linhagem parenteral (Zingales, 2011). Porém, podem ocorrer, de maneira ocasional, eventos de recombinação genética, promovendo o surgimento de linhagens híbridas (Gaunt *et al.*, 2003; Lewis *et al.*, 2009). Até o momento, são reconhecidos 6 grupos de DTUs (TcI-VI), além do genótipo Tcbat. Dentre estes, há um consenso por parte das 2 principais teorias de formação das DTUs, que TcV e VI são linhagens híbridas, resultantes de eventos de recombinação genética entre TcII e TcIII (Westenberger *et al.*, 2005; de Freitas *et al.*, 2006).

Estas teorias podem explicar, em grande parte, a dificuldade em diferenciar linhagens parenterais das linhagens híbridas, ao serem utilizadas técnicas moleculares para a determinação das DTUs. Como exemplo, há o caso de TcII e VI, visto que não podem ser diferenciadas pelo FFLB por apresentarem fragmentos de DNA de mesmo tamanho (Hamilton *et al.*, 2011).

Os resultados moleculares deste trabalho corroboraram com as teorias propostas por Westenberger *et al.* (2005) e de Freitas *et al.* (2006), visto que o FFLB, mesmo utilizando *primers* altamente sensíveis, não permitiu diferenciar TcII e VI, justamente por estas linhagens apresentarem fragmentos de DNA de mesmo tamanho. Por outro lado, esta técnica molecular permitiu diferenciar TcIII e V. Além disso, o predomínio das linhagens TcII e VI verificado no grupo de cepas estudadas - majoritariamente isoladas de hospedeiros humanos - confirmou o que foi anteriormente descrito na literatura (Zingales *et al.*, 2012; Brenière *et al.*, 2016) sobre o padrão de transmissão e perfil de hospedeiros característicos

para estas DTUs, relacionadas aos ciclos de transmissão domésticos e pacientes com quadro de doença de Chagas crônica. Todavia, não foi possível incluir neste trabalho informações referentes aos municípios de origem dos pacientes cujas amostras foram utilizadas, nem as vias de transmissão pelas quais adquiriram a infecção. Estes dados enriqueceriam os achados moleculares, fornecendo parâmetros de correlação mais amplos para esta análise.

Quanto às DTUs verificadas nas cepas isoladas dos 3 triatomíneos e 2 animais silvestres, os resultados obtidos corresponderam aos padrões epidemiológicos relatados por Barretto (1979) e Coura (2007), que se referem aos ciclos silvestres em um ambiente de equilíbrio entre vetores e hospedeiros, seguido de perturbação e alteração destes ciclos pela introdução de construções e domicílios em áreas de mata, promovendo, assim, modificação das dinâmicas de transmissão para um padrão doméstico ou peridoméstico. Neste cenário e no que diz respeito à TcI, cujo padrão é, predominantemente, silvestre, os 2 exemplares de *P. megistus*, verificados para esta DTU e provenientes dos municípios de Taboão da Serra e Itapeperica da Serra, foram encontrados e coletados no interior de domicílios localizados em áreas de preservação ambiental. Uma característica de destaque dos condomínios que albergam estes domicílios é a espacialização das residências, mais distantes entre si se comparadas com áreas urbanas. Esta transformação ambiental, com o estabelecimento de verdadeiras “ilhas”, favorece o risco ou possibilidade de manifestação de comportamentos sinantrópicos por reservatórios silvestres e vetores de *T. cruzi* nos domicílios, ou seja, o encontro de espécimes do inseto no interior e ao redor das habitações.

Já TcII/VI, verificada nas cepas isoladas de *P. opossum* e *D. albiventris* capturados nos municípios de Ilhabela e Santa Fé do Sul, respectivamente, e em um dos exemplares de *P. megistus*, também proveniente de Ilhabela, pode ser compreendida por 2 fatores: **a)** a modificação do ambiente, acima mencionada, conseqüentemente, altera a dinâmica dos ciclos de transmissão, promovendo a inclusão de hospedeiros

humanos neste processo e **b**) a sinantropia, característica destes animais silvestres, favorece o deslocamento do inseto vetor para onde estes mamíferos estão, por serem sua fonte de alimentação. Sendo assim, tanto os animais quanto os vetores podem acessar o ambiente urbano, modificando o ciclo e favorecendo um novo padrão de transmissão.

Os demais resultados da caracterização molecular levantaram a hipótese de possíveis hospedeiros com infecção mista, envolvendo diferentes DTUs de *T. cruzi* e outros tripanossomatídeos (Tcl e TcIII; *T. cruzi* e *Leishmania*; Tcl, *T. rangeli* e *Leishmania*; Tcl, TcII/VI, *T. cruzi* e *T. rangeli*; Tcl e *T. cruzi* [TcII/VI]; Tcl, *T. cruzi* e *T. rangeli*). Entretanto, para a maioria destes resultados, a falta de evidências apresentada pelos 4 marcadores utilizados - ausência ou quantidade insuficiente de fragmentos de DNA detectados pelo sequenciador - não permitiu determinar, com precisão, todas as DTUs de *T. cruzi* que este grupo de hospedeiros poderia apresentar, além de não confirmar, totalmente, a presença de outros tripanossomatídeos (*T. rangeli* e *Leishmania*). Neste contexto, os DNAs, extraídos a partir das amostras de sangue total caninas, apresentaram maior número de fragmentos detectados entre os marcadores, em comparação àqueles extraídos de esfregaços sanguíneos, cujos resultados revelaram escassez ou ausência de fragmentos. Isto pode ter ocorrido devido a pouca quantidade de material de esfregaço e a perda gradativa do mesmo durante as etapas de extração e purificação do DNA, além da provável presença de inibidores de PCR, provenientes do corante utilizado (panótico rápido). Esta interferência dos corantes em reações moleculares já fora observada por Barea *et al.* (2004).

Importante salientar que, embora a caracterização molecular tenha determinado as DTUs de todas as cepas isoladas em cultura, de maneira conclusiva, meios de cultura ou organismos de seres vivos podem selecionar uma determinada população de parasitos e, com o tempo, eliminar outra que também possa estar presente. Esta característica já havia sido observada por Morel *et al.* (1986) ao analisarem os perfis eletroforéticos de DNA de diferentes cepas de *T. cruzi*, isoladas por hemocultura e inoculadas em

modelos murinos, que foram acompanhados por um período de 2 anos. Os resultados do referido estudo mostraram que, após determinado período de tempo, o perfil inicialmente observado foi substituído por outro, indicando seletividade por parte do organismo dos animais.

Em outras palavras, não se pode afirmar que as amostras, aqui utilizadas e que foram cultivadas em meios axênicos e celulares, albergavam, originalmente, uma única população de *T. cruzi*. Seria necessário extrair o DNA das amostras a partir do material original - sangue de hospedeiros vertebrados e fezes de triatomíneos - e, posteriormente, proceder a caracterização molecular, numa tentativa de verificar quantas DTUs, de fato, poderiam existir.

No que diz respeito à correlação entre os resultados morfométricos e moleculares, agrupando as cepas mensuradas de acordo com a DTU verificada, observou-se que os grupos apresentaram médias muito próximas para todos os parâmetros morfométricos estudados: 15,02  $\mu\text{m}$  (Tcl) e 15,73 (TcII/VI) para L; 1,23  $\mu\text{m}$  (Tcl) e 1,13  $\mu\text{m}$  (TcII/VI) para PK; 3,72  $\mu\text{m}$  (Tcl) e 4,14  $\mu\text{m}$  (TcII/VI) para KN; 4,95  $\mu\text{m}$  (Tcl) e 5,27  $\mu\text{m}$  (TcII/VI) para PN; 6,22  $\mu\text{m}$  (Tcl) e 6,57  $\mu\text{m}$  (TcII/VI) para NA; 3,85  $\mu\text{m}$  (Tcl) e 3,89 (TcII/VI) para F; 0,81 (Tcl) e 0,82 (TcII/VI) para NI; e 1,34 (Tcl) e 1,28 (TcII/VI) para KI. Quando as cepas foram analisadas em conjunto, os resultados obtidos para média e desvio padrão foram, respectivamente, L=15,62  $\mu\text{m}$  e 2,16; PK=1,15  $\mu\text{m}$  e 0,49; KN=4,08  $\mu\text{m}$  e 0,88; PN=5,22  $\mu\text{m}$  e 1,04; NA=6,52  $\mu\text{m}$  e 1,25; F=3,88  $\mu\text{m}$  e 0,86; NI=0,82 e 0,16; e KI=1,29 e 0,13. Estes valores são muito semelhantes aos anteriormente descritos na caracterização morfométrica, uma vez que a única diferença destes para aqueles está na exclusão da cepa Y de referência dos cálculos, produzindo resultados discretamente diferentes. Assim sendo, a homogeneidade entre as cepas permaneceu inalterada.

Estas observações permitiram concluir que a caracterização morfométrica, se utilizada de maneira isolada, não possibilita diferenciar cepas de *T. cruzi*, independentemente, da linhagem genética à qual



pertencem, necessitando, assim, correlacionar diferentes metodologias para produzir uma caracterização adequada dos isolados obtidos.

A infecção experimental em fibroblastos da linhagem NCTC, por algumas cepas de *T. cruzi*, foi realizada apenas em caráter qualitativo para verificar a capacidade infectiva destes isolados, no que se refere à penetração nas células, diferenciação para formas amastigotas e multiplicação por reprodução assexuada. Os resultados mostraram que todas as cepas infectaram os fibroblastos, satisfazendo os objetivos propostos nesta abordagem. Contudo, não foi possível avaliar a virulência das cepas por um viés quantitativo, uma vez que fibroblastos apresentam alto potencial de proliferação. Conseqüentemente, as incontáveis células produzidas se sobrepunham e dificultavam a visualização, tornando inviável estabelecer um quantitativo de células infectadas e a carga parasitária que albergavam. O reduzido número de cepas utilizado para este propósito foi devido ao tempo decorrido para a produção de formas tripomastigotas - variável de cepa para cepa - e o período necessário até a finalização do experimento, aproximadamente, 4 dias. Além disso, para cada ensaio utilizou-se apenas duas cepas previamente inoculadas em LLC-MK2, por questão de controle do experimento para evitar riscos de contaminação ou resultados inadequados. Esta metodologia foi, posteriormente, descontinuada, pelo exíguo tempo para o desenvolvimento deste trabalho e a necessidade de ser incluído um maior número de cepas para a caracterização morfológica.

## 6. Conclusões

A partir dos resultados obtidos, pode-se concluir que:

- Na caracterização morfométrica, os valores observados estiveram de acordo com o intervalo de variação esperado para *T. cruzi* e apresentaram certa homogeneidade pelo desvio padrão, para a maioria dos parâmetros analisados. Ao serem agrupadas as cepas mensuradas, de acordo com as DTUs obtidas, resultados similares foram verificados;
- Isoladamente, a caracterização morfométrica não permitiu diferenciar cepas de *T. cruzi*. Foi necessário correlacionar diferentes metodologias para produzir uma caracterização adequada dos isolados obtidos;
- O sistema de cultivo em linhagem celular LLC-MK2 foi adequado e estável, em substituição ao modelo animal, para a produção de formas tripomastigotas, com vistas à caracterização morfométrica e infecção em células NCTC;
- As formas tripomastigotas, cultivadas em células LLC-MK2, infectaram células NCTC, diferenciando-se em amastigotas e multiplicando-se intracelularmente;
- Na caracterização molecular das cepas de *T. cruzi* estudadas foram determinadas as DTUs TcI, TcII/VI, TcIII;
- Para 21 das 25 cepas isoladas de hospedeiros humanos com diagnóstico ou suspeita de infecção por *T. cruzi* foram caracterizadas as DTUs TcII/VI, associadas aos ciclos domésticos e pacientes com quadro de doença de Chagas crônica;
- Alguns hospedeiros - principalmente os pacientes e cães de Ilhabela - apresentaram resultados sugestivos para a presença de infecção mista, envolvendo diferentes DTUs de *T. cruzi* e outros tripanossomatídeos (TcI e TcIII; *T. cruzi* e *Leishmania*; TcI, *T. rangeli* e *Leishmania*; TcI, TcII/VI, *T. cruzi* e *T. rangeli*; TcI e *T. cruzi* [TcII/VI]; TcI, *T. cruzi* e *T. rangeli*). Entretanto, será necessário continuar os estudos em relação a esta hipótese;

- Das cepas isoladas nas amostras provenientes da fauna silvestre, 2 foram caracterizadas como TcI (*P. megistus* de Taboão da Serra e Itapeçerica da Serra) e 3 como TcII/VI (*P. megistus* e *P. opossum* de Ilhabela e *D. albiventris* de Santa Fé do Sul), estando associadas aos ciclos silvestres e domésticos, respectivamente.

## 7. Referências Bibliográficas

Alves EA, Guimarães ACR. Cultivo celular. In: Conceitos e Métodos para a Formação de Profissionais em Laboratórios de Saúde. Rio de Janeiro: Fiocruz; 2010. v.2. p.215-53.

Amato Neto V, Chieffi PP, Nisida IVV, Umezawa ES, Sabino EC, Ruocco RMSA *et al.* Prevenção referente às modalidades alternativas de transmissão do *Trypanosoma cruzi*. Revista de Medicina. 2000; 79(1):12-26.

Andrade JP, Neto JAM, Paola AAV, Vilas-Boas F, Oliveira GMM, Bacal F *et al.* I diretriz latino-americana para o diagnóstico e tratamento da cardiopatia chagásica. Resumo executivo. Arq Bras Cardiol. 2011; 96(6):434-42.

Andrade SG. Caracterização de cepas do *Trypanosoma cruzi* isoladas no Recôncavo Baiano. Rev Pat Trop. 1974; 3:65-121.

Andrade SG. Tentative for grouping different *Trypanosoma cruzi* strains in some types. Rev Inst Med Trop S Paulo. 1976; 18(2):140-1.

Andrade ZA, Andrade SG. Patologia. In: *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1979. p.199-248.

Anonymous. Recommendations from a satellite meeting. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1999; 94(Supl.1):429-32.

Barea JA, Pardini MIMC, Gushiken T. Extração de DNA de materiais de arquivo e fontes escassas para utilização em reação de polimerização em cadeia (PCR). Rev Bras Hematol Hemoter. 2004; 26(4):274-81.

Barretto MP. Tripanossomos semelhantes ao *Trypanosoma cruzi* em animais silvestres e sua identificação com o agente etiológico da doença de Chagas. Rev Inst Med Trop S Paulo. 1965; 7(5):305-15.

Barretto MP. Epidemiologia. In: *Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1979. p.89-151.

Belda Neto FM. Estudo sobre a existência de correlação entre os dados biométricos e o grau de patogenicidade de amostras humanas do *Trypanosoma cruzi*, Chagas, 1909. Rev Soc Bras Med Trop. 1974; 8(1):27-36.

Bisugo MC, Araújo MFL, Westphalen EVN, Cunha EA, Oliveira Junior OC, Guilherme CS *et al.* Isolamento de *Trypanosoma cruzi* por xenocultura após aplicação de xenodiagnóstico in Vivo e/ou in Vitro em pacientes na fase crônica da doença de Chagas e na co-infecção pelo HIV. Rev Inst Adolfo Lutz. 1998; 57(2):89-96.

Boletim Epidemiológico Paulista (BEPa). Certificação de eliminação de *Triatoma infestans* do Estado de São Paulo. Bepa. 2014; 11(Esp.):131-2.

Borges MM, Mello DA, Teixeira ML. Infecção experimental de *Calomys callosus* (Rodentia Cricetidae) com *Trypanosoma cruzi*. Rev Saúde Pública. 1982; 16(4):233-42.

Brener Z. The behaviour of slender and stout forms of *Trypanosoma cruzi* in the bloodstream of normal and immune mice. Ann Trop Med Parasitol. 1969; 63(2):215-20.

Brener Z. O Parasito: Relações Hospedeiro-parasito. In: *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1979. p.1-42.

Brener Z. *Trypanosoma cruzi*: morfologia e ciclo evolutivo. In: Clínica e terapêutica da doença de Chagas: uma abordagem prática para o clínico geral. Rio de Janeiro: Fiocruz; 1997. p.25-31.

Brener Z, Alquezar AS, Luqueti A. Normas de segurança para infecções acidentais com *Trypanosoma cruzi*, agente causador da doença de Chagas. Rev Patol Trop. 1997; 26:129-30.

Brener Z, Chiari, E. Variações morfológicas observadas em diferentes amostras de *Trypanosoma cruzi*. Rev Inst Med Trop S Paulo. 1963; 5(5):220-4.

Brenière SF, Bosseno MF, Telleria J, Bastrenta B, Yacsik N, Noireau F *et al.* Different behavior of two *Trypanosoma cruzi* major clones: transmission and circulation in young Bolivian patients. Exp Parasitol. 1998; 89(3):285-95.

Brenière SF, Waleckx E, Barnabé C. Over Six Thousand *Trypanosoma cruzi* Strains Classified into Discrete Typing Units (DTUs): Attempt at an Inventory. PLoS Negl Trop Dis. 2016; 10(8):1-19.

Brisse S, Barnabé C, Tibayrenc M. Identification of six *Trypanosoma cruzi* phylogenetic lineages by random amplified polymorphic DNA and multilocus enzyme electrophoresis. Int J Parasitol. 2000; 30(1):35-44.

Bronfen E, Rocha FSA, Machado GBN, Perillo MM, Romanha AJ, Chiari E. Isolamento de amostras do *Trypanosoma cruzi* por xenodiagnóstico e hemocultura de pacientes na fase crônica da doença de Chagas. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1989; 84(2):237- 40.

Burgos JM, Diez M, Vigliano C, Bisio M, Risso M, Duffy T *et al.* Molecular Identification of *Trypanosoma cruzi* Discrete Typing Units in End-Stage Chronic Chagas Heart Disease and Reactivation after Heart Transplantation. Clin Infect Dis. 2010; 51(5):485-95.

Camargo EP. Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi*. I. Origin of metacyclic trypanosomes in liquid media. Rev Inst Med Trop. S Paulo. 1964; 6:93-100.

Camargo ME. Fluorescent antibody test for the serodiagnosis of American trypanosomiasis. Technical modification employing preserved culture forms of *Trypanosoma cruzi* in a slide test. Rev Inst Med Trop S Paulo. 1966; 8(5):227-35.

Camargo ME, Takeda GKF. Diagnóstico de Laboratório. In: *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1979. p.175-98.

Cardoso CVP, Marques MAP, Araújo-Jorge TC, Castro SL, Rivera MT. Controle da qualidade dos animais antes da infecção experimental. In: Doença de chagas: manual para experimentação animal. Rio de Janeiro: Fiocruz; 2000. p.203-14.

Carlier Y, Torrico F, Sosa-Estani S, Russomando G, Luquetti A, Freilij H, *et al.* Congenital Chagas disease: recommendations for diagnosis, treatment and control of newborns, siblings and pregnant women. PLoS Negl Trop Dis. 2011; 5(10):e1250.

Castro AM, Luquetti AO, Rassi A, Rassi GG, Chiari E, Galvão LMC. Blood culture and polymerase chain reaction for the diagnosis of the chronic phase of human infection with *Trypanosoma cruzi*. Parasitol Res. 2002; 88(10):894-900.

Cerisola JA, Chaben MF, Lazari JO. Test de hemaglutinación para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas. Prensa Méd Argent. 1962;49:1761-67.

Chagas C. Nova tripanozomíaze humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1909; 1(2):159-218.

Chiari E, Dias JCP, de Lana M, Chiari CA. Hemocultures for the parasitological diagnosis of human chronic chagas' disease. Rev Soc Bras Med Trop. 1989; 22(1):9-23.

Chiari E, Galvão LMC. Diagnóstico parasitológico da doença de chagas. In: Clínica e terapêutica da doença de Chagas: uma abordagem prática para o clínico geral. Rio de Janeiro: Fiocruz; 1997. p.85-97.

Chocair PR, Sabbaga E, Amato Neto V, Shiroma M, Góes GM. Transplante de rim: nova modalidade de transmissão da doença de Chagas. Rev Inst Med Trop S Paulo. 1981; 23:280-2.

Clark CG, Pung OJ. Host specificity of ribosomal DNA variation in sylvatic *Trypanosoma cruzi* from North America. Mol Biochem Parasitol. 1994; 66(1):175-9.

Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias no SUS (CONITEC). Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas Doença de Chagas Relatório de Recomendação. Ministério da Saúde. Brasília (DF); 2018.

Coura JR. Tripanosomose, doença de Chagas. Cienc Cult. 2003; 55(1):30-3.

Coura JR. Chagas disease: what is known and what is needed - A background article. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2007; 102(Supl.1):113-22.

Degrave W, Fragoso SP, Britto C, van Heuverswyn H, Kidane GZ, Cardoso MA *et al.* Peculiar sequence organization of kinetoplast DNA minicircles from *Trypanosoma cruzi*. Mol Biochem Parasitol. 1988; 27(1):63-70.

de Freitas JM, Augusto-Pinto L, Pimenta JR, Bastos-Rodrigues L, Goncalves VF, Teixeira SM, *et al.* Ancestral Genomes, Sex, and the Population Structure of *Trypanosoma cruzi*. PLoS Pathog. 2006; 2(3):e24.

de Lana M, Chiari E, Tafuri WL. Experimental Chagas' disease in dogs. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1992; 87(1):59-71.

de Lana M, Tafuri WL. *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. In: Parasitologia humana. 11ª ed. São Paulo: Atheneu; 2005. p.85-108.

de Sousa MA. Morphobiological characterization of *Trypanosoma cruzi* Chagas, 1909 and its distinction from other trypanosomes. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1999; 94(Supl.1):205-10.

Devera R, Fernandes O, Coura JR. Should *Trypanosoma cruzi* be called "cruzi" complex? A review of the parasite diversity and the potential of selecting population after in Vitro culturing and mice infection. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2003; 98(1):1-12.

Devillers H, Lobry JR, Menu F. An agent-based model for predicting the prevalence of *Trypanosoma cruzi* and II in their host and vector populations J Theor Biol. 2008; 255(3):307-15.

Dias E, Freitas Filho L. Introdução ao estudo biométrico dos hemoflagelados do gênero *Schizotrypanum*. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1943; 38(3):427-36.

Dias E, Laranja FS, Miranda A, Nobrega G. Chagas' disease; a clinical, epidemiologic, and pathologic study. Circulation. 1956; 14(6):1035-60.

Dias JCP. Mecanismos de transmissão. In: *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1979. p.153-74.

Dias JCP. Doença de Chagas e transfusão de sangue no Brasil: vigilância e desafios. Rev Bras Hematol Hemoter. 2006; 28(2):81-7.

Dias JCP; Amato Neto V; Luna EJA. Mecanismos alternativos de transmissão do *Trypanosoma cruzi* no Brasil e sugestões para sua prevenção. Rev Soc Bras Med Trop. 2011; 44(3):375-9.

Dias JCP, Ramos AN Jr, Gontijo ED, Luquetti A, Shikanai-Yasuda MA, Coura JR *et al*. Consenso Brasileiro em Doença de Chagas, 2015. Epidemiol Serv Saúde. 2016; 25:7-86.

dos Reis D, Monteiro WM, Bossolani GDP, Teston APM, Gomes ML, Araújo SM *et al*. Biological behaviour in mice of *Trypanosoma cruzi* isolates from Amazonas and Paraná, Brazil. Exp Parasitol. 2012; 130(4):321-9.

Duffy T, Bisio M, Altcheh J, Burgos JM, Diez M, Levin MJ *et al*. Accurate real-time PCR strategy for monitoring bloodstream parasitic loads in chagas disease patients. PLoS Negl Trop Dis. 2009; 3:e419.

Dumonteil E, Herrera C. Ten years of Chagas disease research: Looking back to achievements, looking ahead to challenges. PLoS Negl Trop Dis. 2017; 11(4):e0005422.

Ferreira RTB, Branquinho MR, Leite PC. Transmissão oral da doença de Chagas pelo consumo de açaí: um desafio para a Vigilância Sanitária. Vig Sanit Debate. 2014; 2(4):4-11.

Ferriolli Filho F, Barreto MP, Carvalheiro JR. Estudos sobre reservatórios e vectores silvestres do *Trypanosoma cruzi*. XXIV. Variação dos dados biométricos obtidos em amostras do *T. cruzi* isolados de casos humanos da Doença de Chagas. Rev Soc Bras Med Trop. 1968; 2(1):1-8.

Freitas JLP, Amato Neto V, Sonntag R, Biancalana A, Nussenzweig V, Barreto JG. Primeiras verificações de transmissão acidental da moléstia de Chagas ao homem por transfusão de sangue. Rev Paul Med. 1952; 40:36-40.

Freshney RI. Cell line provenance. Cytotechnology. 2002; 39(2):55-67.



Freshney RI. Laboratory Design and Layout. In: Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique. 5<sup>a</sup> ed. New York: Wiley-Liss; 2005. p.43-53.

Freshney RI. Basic Principles of Cell Culture. In: Culture of Cells for Tissue Engineering. New Jersey: John Wiley & Sons; 2006. p.3-22.

Fundação IBGE. Censo demográfico de 1960; São Paulo. In: IBGE. VII recenseamento geral do Brasil. Série regional. Rio de Janeiro; 1960. v.1, t.13.

Fundação IBGE. Censo agropecuário; São Paulo. In: IBGE. VIII recenseamento geral 1970. Rio de Janeiro; 1973. v.3, t.18, pt.1.

Garcia MN, Burroughs H, Gorchakov R, Gunter SM, Dumonteil E, Murray KO *et al.* Molecular identification and genotyping of *Trypanosoma cruzi* DNA in autochthonous Chagas disease patients from Texas, USA. *Infect Genet Evol.* 2017; 49:151-6.

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.

Hamilton PB, Adams ER, Malele II, Gibson WC. A novel, high-throughput technique for species identification reveals a new species of tsetse-transmitted trypanosome related to the *Trypanosoma brucei* subgenus, *Trypanozoon*. *Infect Genet Evol.* 2008; 8(1):26-33.

Hamilton PB, Lewis MD, Cruickshank C, Gaunt MW, Yeo M, Llewellyn MS *et al.* Identification and lineage genotyping of South American trypanosomes using fluorescent fragment length barcoding. *Infect Genet Evol.* 2011; 11(1):44-51.

Henriksson J, Åslund L, Pettersson U. Karyotype variability in *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol Today.* 1996; 12(3):108-14.

Hesse F, Wagner R. Developments and improvements in the manufacturing of human therapeutics with mammalian cell cultures. *Trends Biotechnol.* 2000; 18(4):173-80.

Hidron A, Vogenthaler N, Santos-Preciado JI, Rodriguez-Morales AJ, Franco-Paredes C, Rassi Jr. A. Cardiac involvement with parasitic infections. *Clin Microbiol Rev.* 2010; 23(2):324-49.

Hoare CA. The trypanosomes of mammals: a zoological monograph. Oxford: Blackwell Scientific Publications; 1972.

Hoare CA, Broom JC. Morphological and taxonomic study on mammalian trypanosomes: IV. Biometrical study of the relationship between *Trypanosoma uniforme* and *T. vivax*. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1938; 31(5):517-34.

Hotez PJ, Fujiwara RT. Brazil's neglected tropical diseases: an overview and a report card. Microbes Infect. 2014; 16(8):601-6.

Howells RE, Chiari E. Observations on two strains of *Trypanosoma cruzi* in laboratory mice. Ann Trop Med Parasitol. 1975; 69(4):435-48.

Junqueira PC, Rosenblit J, Hamerschlak N. História da hemoterapia no Brasil. Rev Bras Hematol Hemoter. 2005; 27(3):201-7.

Keller ECS. O *habitat* rural. In: Brasil: a Terra e o Homem. A vida humana. São Paulo: Cia. Ed. Nacional; 1970. v.2. p.291-345.

Kesper Jr. N, de Almeida KA, Stolf AM, Umezawa ES. Immunoblot analysis of trypomastigote excreted-secreted antigens as a tool for the characterization of *Trypanosoma cruzi* strains and isolates. J Parasitol. 2000; 86(4):862-7.

Keymer, IF. *Trypanosoma (Megatrypanum) spp.* Hoare, 1964 of ruminants. Vet Rec. 1967; 80:286.

Kikuchi SA. Análise do perfil protéico de cepas de *Trypanosoma cruzi* pertencentes ao zimodema III. [dissertação]. Rio de Janeiro: Instituto Oswaldo Cruz; 2007.

Lewis MD, Llewellyn MS, Gaunt MW, Yeo M, Carrasco HJ, Miles MA. Flow cytometric analysis and microsatellite genotyping reveal extensive DNA content variation in *Trypanosoma cruzi* populations and expose contrasts between natural and experimental hybrids. Int J Parasitol. 2009; 39(12):1305-17.

Lima L, Espinosa-Álvarez O, Ortiz PA, Trejo-Varón JA, Carranza JC, Pinto CM *et al.* Genetic diversity of *Trypanosoma cruzi* in bats, and multilocus phylogenetic and phylogeographical analyses supporting Tcbat as an independent DTU (discrete typing unit). Acta Trop. 2015; 151:166-77.

Luquetti AO, Castro AM. Diagnóstico sorológico da doença de Chagas. In: Clínica e terapêutica da doença de Chagas: uma abordagem prática para o clínico geral. Rio de Janeiro: Fiocruz; 1997. p.99-113.

Luquetti AO, Rassi A. Diagnóstico laboratorial da infecção pelo *Trypanosoma cruzi*. In: *Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan; 2000. p.344-78.

Luquetti AO, Schmuñis GA. Diagnosis of *Trypanosoma cruzi* infection. In: American Trypanosomiasis Chagas disease: one hundred years of research. 2 ed. Amsterdam: Elsevier; 2017. p. 687-722.

Lumsden WHR. Biological aspects of tripanosomiasis research, 1965; a retrospect. 1969. Adv Parasitol. 1970; 8:227-49.

Lumsden WHR, Evans DA. Biology of the Kinetoplastida. v.2. Londres: Academic Press Inc. LTD; 1979.

Machado FS, Jelicks LA, Kirchhoff LV, Shirani J, Nagajyothi F, Mukherjee S *et al.* Chagas heart disease: report on recent developments. Cardiol Rev. 2012; 20(2):53-65.

Marcili A, Lima L, Cavazzana M, Junqueira AC, Veludo HH, Maia Da Silva F, Campaner M *et al.* A new genotype of *Trypanosoma cruzi* associated with bats evidenced by phylogenetic analyses using SSU rDNA, cytochrome b and Histone H2B genes and genotyping based on ITS1 rDNA. Parasitology. 2009;136(6):641-55.

Martínez-Díaz RA, Escario JA, Nogal-Ruiz JJ, Gómez-Barrio A. Biological Characterization of *Trypanosoma cruzi* Strains. Mem Inst Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro. 2001; 96(1):53-9.

Martins K. Caracterização molecular do *Trypanosoma cruzi* isolado de pacientes chagásicos, triatomíneos e reservatórios silvestres procedentes do semiárido do Estado do Rio Grande do Norte. [dissertação]. Natal: Universidade Federal do Rio Grande do Norte; 2014.

Martins LPA. Isolamento e caracterização de cepas de *Trypanosoma cruzi* Chagas, 1909 (Kinetoplastida, Trypanosomatidae) a partir de triatomíneos silvestres do Estado do Rio Grande do Sul. [tese]. Araraquara: Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista; 2005.

Martins LPA, Castanho RP, de Gusmão AS, da Rosa JA. Morfometria de tripomastigotas sanguíneos de *Trypanosoma cruzi* Chagas, 1909 (Kinetoplastidae, Trypanosomatidae). Rev Patol Reg. 2008; 37(2):143-50.

Martins-Melo FR, Lima Mda S, Ramos AN Jr, Alencar CH, Heukelbach J. Prevalence of Chagas disease in pregnant women and congenital transmission of *Trypanosoma cruzi* in Brazil: a systematic review and meta-analysis. Trop Med Int Health. 2014b; 19(8):943-57.

Martins-Melo FR, Ramos AN Jr, Alencar CH, Heukelbach J. Prevalence of Chagas disease in Brazil: a systematic review and meta-analysis. Acta Trop. 2014a; 130:167-74.

- Martins-Melo FR, Ramos AN Jr, Alencar CH, Heukelbach J. Mortality from neglected tropical diseases in Brazil, 2000-2011. *Bull World Health Organ.* 2016; 94(2):103-10.
- Matsuda NM, Miller SM, Evora PRB. The Chronic Gastrointestinal Manifestations of Chagas Disease. *Clinics.* 2009; 64(12):1219-24.
- Miles MA, Cedillos RA, Póvoa MM, de Souza AA, Prata A, Macedo V. Do radically dissimilar *Trypanosoma cruzi* (Zymodemes) cause Venezuelan and Brazilian form of Chagas' disease? *Lancet.* 1981a; 317(8234):1338-40.
- Miles MA, Lanham SM, de Souza AA, Póvoa M. Further enzymic characters of *Trypanosoma cruzi* and their evaluation for strain identification. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1980; 74(2):221-42.
- Miles MA, Llewellyn MS, Lewis MD, Yeo M, Baleela R, Fitzpatrick S *et al.* The molecular epidemiology and phylogeography of *Trypanosoma cruzi* and parallel research on *Leishmania*: looking back and to the future. *Parasitology.* 2009; 136(12):1509-28.
- Miles MA, Povoia MM, de Souza AA, Lainson R, Shaw JJ, Ketteridge DS. Chagas's disease in the Amazon Basin: II. The distribution of *Trypanosoma cruzi* zymodemes 1 and 3 in Pará State, north Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1981b; 75(5):667-74.
- Miles MA, Souza A, Povoia 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.
- Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Consenso Brasileiro em Doença de Chagas. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2005; 38(Supl.3):1-29.
- Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Recomendações sobre o diagnóstico parasitológico, sorológico e molecular para confirmação da doença de Chagas aguda e crônica. *Rev Patol Trop.* 2013; 42(4):475-8.
- Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Guia de Vigilância em Saúde. Brasília (DF); 2014.
- Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Guia de Vigilância em Saúde. Brasília (DF); 2017.
- Monbeig P. *Pionniers et planteurs de São Paulo.* Paris: Armand Colin; 1952.

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 CM, Deane MP, Gonçalves AM. The Complexity of *Trypanosoma cruzi* Populations revealed by Schizodeme Analysis. Parasitol Today. 1986; 2(4):97-101.

Oliveira MT. Genotipagem de amostras de *Trypanosoma cruzi* isoladas de pacientes chagásicos de dois municípios da região do Vale do Jequitinhonha, MG, Brasil. [dissertação]. Minas Gerais: Universidade Federal de Ouro Preto; 2012.

Pearson K. On the probability that two independent distributions of frequency are really samples of the same population, with special reference to recent work on the identity of trypanosome strains. Biometrika. 1914; 10(1):85-143.

Pinazo MJ, Cañas E, Elizalde JI, García M, Gascón J, Gimeno F *et al.* Diagnosis, management and treatment of chronic Chagas' gastrointestinal disease in areas where *Trypanosoma cruzi* infection is not endemic. Gastroenterol Hepatol. 2010; 33(3):191-200.

Ragone PG, Pérez Brandán C, Padilla AM, Monje Rumi M, Lauthier JJ, Alberti D'Amato AM *et al.* Biological behavior of different *Trypanosoma cruzi* isolates circulating in an endemic area for Chagas disease in the Gran Chaco region of Argentina. Acta Trop. 2012; 123(3):196-201.

Ramírez JC, Cura CI, da Cruz Moreira O, Lages-Silva E, Juiz N, Velázquez e *et al.* Analytical Validation of Quantitative Real-Time PCR Methods for Quantification of *Trypanosoma cruzi* DNA in Blood Samples from Chagas Disease Patients. J Mol Diagn. 2015; 17:605-15.

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

Ramírez JD, Hernández C, Montilla M, Zambrano P, Flórez AC, Parra E *et al.* First report of human *Trypanosoma cruzi* infection attributed to Tcbat genotype. Zoonoses Public Health. 2014b; 61(7):477–9.

Ramírez JD, Tapia-Calle G, Muñoz-Cruz G, Poveda C, Rendón LM, Hincapié E *et al.* Trypanosome species in neo-tropical bats: biological, evolutionary and epidemiological implications. Infect Genet Evol. 2014a. 22: 250-6.

Reimão JQ, Migotto AE, Kossuga MH, Berlinck RG, Tempone AG. Antiprotozoan activity of Brazilian marine cnidarian extracts and of a modified steroid from the octocoral *Carijoa riisei*. Parasitol Res. 2008; 103(6):1445-50.

Rey L. Bases da parasitologia médica. 3ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2010.

Rimoldi A, Tomé Alves R, Ambrósio DL, Fernandes MZ, Martinez I, De Araújo RF *et al.* Morphological, biological and molecular characterization of three strains of *Trypanosoma cruzi* Chagas, 1909 (Kinetoplastida, Trypanosomatidae) isolated from *Triatoma sordida* (Stal) 1859 (Hemiptera, Reduviidae) and a domestic cat. *Parasitology*. 2012; 139(1):37-44.

Romanha AJ, Castro SL, Soeiro Mde N, Lannes-Vieira J, Ribeiro I, Talvani A *et al.* In vitro and in vivo experimental models for drug screening and development for Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2010; 105(2):233-8.

Romanha AJ, da Silva Pereira AA, Chiari E, Kilgour V. Isoenzyme patterns of cultured *Trypanosoma cruzi*: changes after prolonged subculture. *Comp Biochem Physiol B*. 1979; 62(2):139-42.

Roque ALR, Jansen AM. Reservatórios do *Trypanosoma cruzi* e sua relação com os vetores. In: Vetores da doença de chagas no Brasil. Curitiba: Sociedade Brasileira de Zoologia; 2014. p.75-87.

Rossi LRL. Estudo biométrico de formas epimastigotas e tripomastigotas de quatro cepas de *Trypanosoma cruzi*, Chagas 1909 (Kinetoplastidae, Trypanosomatidae). [dissertação]. Araraquara: Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista; 2007.

Salas NA, Cot M, Schneider D, Mendoza B, Santalla JA, Postigo J, *et al.* Risk factors and consequences of congenital Chagas disease in Yacuiba, South Bolivia. *Trop Med Int Health*. 2007; 12(12):1498-505.

Sales Junior PA, Molina I, Fonseca Murta SM, Sánchez-Montalvá A, Salvador F, Corrêa-Oliveira R *et al.* Experimental and Clinical Treatment of Chagas Disease: A Review. *Am J Trop Med Hyg*. 2017; 97(5):1289-1303.

Sampaio DT. A caça ilegal de animais silvestres na Mata Atlântica, Baixada Litorânea do estado do Rio de Janeiro, Brasil: eficiência de proteção de reservas biológicas e triangulação do perfil da caça. [tese]. Rio de Janeiro: Centro de Biociências e Biotecnologia: Universidade Estadual do Norte Fluminense; 2011.

Sangenis LH, Saraiva RM, Georg I, de Castro L, dos Santos Lima V, Roque AL *et al.* Autochthonous transmission of Chagas disease in Rio de Janeiro State, Brazil: a clinical and eco-epidemiological study. *BMC Infect Dis*. 2015; 15:4.

Shikanai-Yasuda MA, Carvalho NB. Oral transmission of Chagas disease. *Clin Infect Dis*. 2012; 54(6):845-52.

Silva AM, Ramirez LE, Vargas M, Chapadeiro E, Brener Z. Evaluation of the rabbit as a model for Chagas disease - II: histopathologic studies of the heart, digestive tract and skeletal muscle. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1996; 91(2):199-206.

Silva EOR, Dias Jr. J. Suspensão do rociado no combate ao *Triatoma infestans* em áreas do Estado de São Paulo, Brasil. Rev Saúde Pública. 1969; 3(2):173-81.

Silva EOR, Rodrigues VLCC, Silva R, Wanderley DMV. Programa de Controle da Doença de Chagas no estado de São Paulo, Brasil: o controle e a vigilância da transmissão vetorial. Rev Soc Bras Med Trop. 2011; 44(Supl.2):74-84.

Silva EOR, Wanderley DMV, Rodrigues VLCC. *Triatoma infestans*: importância, controle e eliminação da espécie no Estado de São Paulo, Brasil. Rev Soc Bras Med Trop. 1998; 31(1):73-88.

Silva LHP. Observações sobre o ciclo evolutivo do *Trypanosoma cruzi*. Rev Inst Med Trop S Paulo. 1959; 1:99-118.

Silva LJ. Desbravamento, agricultura e doença: a doença de Chagas no Estado de São Paulo. Cad Saúde Pública. 1986; 2(2):124-40.

Silva ME, Evangelista EA, Nicoli JR, Bambilra EA, Vieira EC. American trypanosomiasis (Chagas' disease) in conventional and germfree rats and mice. Rev Inst Med Trop S Paulo. 1987; 29(5):284-8.

Silva VLC, Luna EJA. Prevalência de infecção pelo *T. cruzi* em doadores de sangue nos hemocentros coordenadores do Brasil em 2007. Epidemiol Serv Saúde. 2013; 22(1):103-10.

Sonnenberg R, Nolte AW, Tautz D. An evaluation of LSU rDNA D1-D2 sequences for their use in species identification. Front Zool. 2007; 4:6.

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.

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):71-80.

Stuart K, Feagin JE. Mitochondrial DNA of Kinetoplastids. Int Rev Citol. 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.

Suárez N, Cabrera R, Cartagena L, Ayaqui R. Características biológicas de una cepa de *Trypanosoma cruzi* en un modelo murino y análisis de supervivencia. Rev Peru Med Exp Salud Publica. 2009; 26(2):187-92.

Téllez-Meneses J, Mejía-Jaramillo AM, Triana-Chávez O. Biological characterization of *Trypanosoma cruzi* stocks from domestic and sylvatic vectors in Sierra Nevada of Santa Marta, Colombia. Acta Trop. 2008; 108(1):26-34.

Tibayrenc M. Population genetics of parasitic protozoa and other microorganisms. Adv Parasitol. 1995; 36:47-115.

Tibayrenc M. Genetic epidemiology of parasitic protozoa and other infectious agents: the need for an integrated approach. Int J Parasitol. 1998; 28(1):85-104.

Tibayrenc M, Ayala FJ. Forte correlation entre classification isoenzymatique et variabilite del'AND kinetoplastique chez *Trypanosoma cruzi*. Comp Rend S Acad Sci Paris. 1987; 304:89-92.

Tibayrenc M, Ayala, FJ. Isoenzyme variability in *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas' disease: genetically, taxonomic and epidemiological significance. Evolution. 1988; 42:277-92.

Tibayrenc M, Cariou ML, Solignac M. Interpretation genetique des zymogrammes de flagelles des genres *Trypanosoma* et *Leishmania*. Comp Rend S Acad Sci Paris. 1981; 292:623-5.

Tibayrenc M, Cariou ML, Solignac M, Dedet JP, Poch O, Desjeux P. New electrophoretic evidence of genetic variation and diploidy in *Trypanosoma cruzi*, the causative agent of Chagas' disease. Genetica. 1985; 67:223-30.

Tibayrenc M, Desjeux P. The presence in Bolivia of two distinct zymodemes of *Trypanosoma cruzi*, circulating sympatrically in a domestic transmission cycle. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1983; 77(1):73-5.

Tibayrenc M, Echalar L, Dujardin JP, Poch O, Desjeux P. The microdistribution of isoenzymic strains of *Trypanosoma cruzi* in Southern Bolivia: New isoenzyme profiles and further arguments against Mendelian sexuality. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1984; 78(4):519-25.



Tibayrenc M, Hoffmann A, Poch O, Echalar L, Le Pont F, Lemesre JL *et al.* Additional data on *Trypanosoma cruzi* isozymic strains encountered in Bolivian domestic transmission cycles. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1986a; 80(3):442-7.

Tibayrenc M, Miles MA. A genetic comparison of Brazilian and Bolivian zymodemes of *Trypanosoma cruzi*. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1983; 77(1):76-83.

Tibayrenc M, Neubauer K, Barnabé C, Guerrini F, Sarkeski D, Ayala FJ. Genetic characterization of six parasitic protozoa: parity of random-primer DNA typing and multilocus isoenzyme electrophoresis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1993; 90(4):1335-9.

Tibayrenc M, Ward P, Moya A, Ayala FJ. Natural populations of *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas' disease, have a complex multiclonal structure. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1986b; 83(1):115-9.

Toledo MJ, Bahia MT, Carneiro CM, Martins-Filho OA, Tibayrenc M, Barnabé C *et al.* Chemotherapy with benznidazole and itraconazole for mice infected with different *Trypanosoma cruzi* clonal genotypes. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003; 47(1):223-30.

Toledo MJ, de Lana M, Carneiro CM, Bahia MT, Machado-Coelho GL, Veloso VM *et al.* Impact of *Trypanosoma cruzi* clonal evolution on its biological properties in mice. *Exp Parasitol.* 2002; 100(3):161-72.

Torrico F, Alonso-Vega C, Suarez E, Rodriguez P, Torrico MC, Dramaix M *et al.* Maternal *Trypanosoma cruzi* infection, pregnancy outcome, morbidity, and mortality of congenitally infected and non-infected newborns in Bolivia. *Am J Trop Med Hyg.* 2004; 70(2):201-9.

Toye PJ. Isoenzyme variation in isolates of *Trypanosoma cruzi*. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1974; 68:147-58.

Vargas-Parada L. Kinetoplastids and Their Networks of Interlocked DNA. *Nature Education.* 2010; 3(9):63

Voller A, Draper C, Bidwell DE, Bartlett A. Microplate enzyme-linked immunosorbent assay for Chagas disease. *Lancet.* 1975; 305(7904):426-8.

Wendel S. Risco residual da transmissão da infecção por *Trypanosoma cruzi* por via transfusional no Brasil. [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 2005.

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

Westenberger SJ, Cerqueira GC, El-Sayed NM, Zingales B, Campbell DA, Sturm NR. *Trypanosoma cruzi* mitochondrial maxicircles display species- and strain-specific variation and a conserved element in the non-coding region. BMC Genomics. 2006; 7:60.

World Health Organization. Control of Chagas Disease: Report of WHO Expert Committee. Geneva; 1991.

World Health Organization. Chagas disease (American trypanosomiasis). Disponível em: < [http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis))> . Acesso em: 26/08/2018.

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

Zeledón R, Vieta PL. Comparative Study of *Schizotrypanum cruzi* Chagas, 1909 and *S. vespertilionis* (Battaglia, 1904) from Costa Rica. J Parasitol. 1958; 44(5):499-502.

Zingales B. *Trypanosoma cruzi*: um parasita, dois parasitas ou vários parasitas da doença de Chagas? Rev Biol. 2011; 6b:44-48.

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

Zingales B, Miles MA, Campbell DA, Tibayrenc M, Macedo AM, Teixeira MM *et al.* The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: Rationale, epidemiological relevance and research applications. Infect Genet Evol. 2012; 12(2):240-53.

## Anexo



**SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE**  
COORDENAÇÃO DE CONTROLE DE DOENÇAS  
**INSTITUTO ADOLFO LUTZ**  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA  
CEPIAL

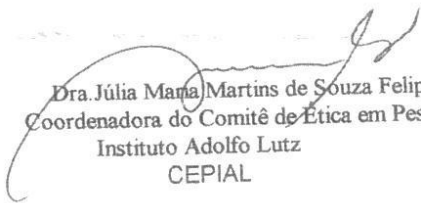
São Paulo, 15 de fevereiro de 2007.

Ilmo. (a) Sr.(a): **JEFFREY JON SHAW**  
**JOSÉ EDUARDO TOLEZANO**

Coordenador (a) do Projeto de Pesquisa: **ESTUDOS ESTRATÉGICOS DAS LEISHMANIOSES E DA DOENÇA DE CHAGAS NAS REGIÕES NORDESTE, CENTRO-OESTE E SUDESTE DO BRASIL.**

O Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Adolfo Lutz (CEPIAL), em reunião ordinária do mês **FEVEREIRO**, apresentou o **PARECER**, enquadrando o referido projeto na categoria **APROVADO**, de acordo com a Resolução 196/96 sobre Pesquisas Envolvendo Seres Humanos / CNS / MS, Brasília, 1996.

Atenciosamente

  
Dra. Júlia Maria Martins de Souza Felipe  
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa  
Instituto Adolfo Lutz  
CEPIAL