

**FIOCRUZ**

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**

**Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e  
Medicina Investigativa**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE CEPAS DE *TRYPANOSOMA CRUZI*  
ISOLADA NA ZONA URBANA DA CIDADE DE SALVADOR/BA**

**CARLOS GUSTAVO SILVA DOS SANTOS**

**Salvador – Bahia  
2014**

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ**  
**CENTRO DE PESQUISA GONÇALO MONIZ**

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE CEPAS DE *TRYPANOSOMA CRUZI***  
**ISOLADA NA ZONA URBANA DA CIDADE DE SALVADOR/BA**

**CARLOS GUSTAVO SILVA DOS SANTOS**

Orientador: Dr. Mitermayer Galvão dos Reis

Dissertação apresentada ao Curso da Pós-  
Graduação em Biotecnologia em Saúde e  
Medicina Investigativa para a obtenção  
do grau de Mestre

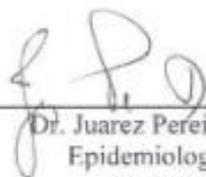
**Salvador – Bahia**  
**2014**

"CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE CEPAS DE TRIPANOSOMA CRUZI ISOLADA NA ZONA URBANA DA CIDADE DE SALVADOR/BA"

CARLOS GUSTAVO SILVA DOS SANTOS

FOLHA DE APROVAÇÃO

COMISSÃO EXAMINADORA



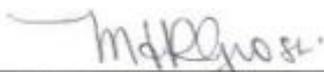
---

Dr. Juarez Pereira Dias  
Epidemiologista  
SESAB



---

Dr. Claudilson José de Carvalho Bastos  
Infectologista  
HCM



---

Dra. Maria Fernanda Rios Grassi  
Pesquisadora  
CPqGM

## **Dedico este trabalho**

**...a minha família!**

**... A minha esposa Sidelcina Rugieri Pacheco pelo companheirismo e principalmente pelo amor verdadeiro.**

**... A minha filha Agnes Rugieri Pacheco dos Santos por alegria tanto nossas vidas dando maior sentido a nossa existência.**

**...aos meus pais Antônio Carlos dos Santos e Maria Adélia Silva dos Santos, pelo amor incondicional, pelo apoio, pelas palavras, pelos conselhos.**

## **AGRADECIMENTOS**

Ao orientador Dr. Mitermayer Galvão dos Reis pelo apoio, confiança e orientação.

A Dra. Sonia Gumes Andrade pela orientação.

Ao amigo Gilmar Ribeiro Jr. pela ajuda na concretização do presente trabalho, nas análises dos resultados e coletas de campo.

Aos meus Irmão Fabiana Silva dos Santos, Fabiola Silva dos Santos, Fernanda Silva dos Santos, Rafael Silva dos Santos, Thiago Silva dos Santos e Aída Rafaela.

Aos meus amigos do LACEN-BA, em especial a Eduardo Oyama, Roberto Fonseca, José Carlos, Marilu de Carvalho, Orlando Marcos, Bruno Cova, Maria Dulcineia, Daniela Morato, Denilza Peixoto, Helena Rahy, Raquel Lima, Sílvia Góes, Francisca Santos, Ernesto Alves, Natali Alexandrino, Cristiane Mota.

Aos meus sogros Calixto Pacheco e Santina Rugieri Pacheco.

Ao diretor da Fiocruz-BA, Dr. Manoel Barral-Netto.

Á todos do LPBM e LACEI pelo apoio e amizade.

A todos os amigos que percorreram juntos essa etapa tão importante da concretização de um dos sonhos da minha vida, que possamos prosseguir juntos em outros sonhos.

Aos professores do curso de pós-graduação que contribuíram para a minha formação.

A Ianei Carneiro e Indira Trueb pela ajuda nas coletas dos marsupiais.

A todos os funcionários da Fiocruz-BA.

Aos colegas da pós-graduação, pela excelente convivência e amizade firmada durante as disciplinas.

A todos aqueles que direta ou indiretamente cooperaram para que fosse possível a realização desse trabalho.

*Quando fizeres algo nobre e belo e ninguém notar,*

*não fique triste.*

*Pois o sol toda manhã faz um lindo espetáculo e no entanto,*

*a maioria da plateia ainda dorme*

*Jonh Lennon*

SANTOS, Carlos Gustavo Silva dos. Caracterização molecular de cepas de *Trypanosoma Cruzi* isolada na zona urbana da cidade de Salvador/Ba. 69 f. il. Dissertação (Mestrado) – Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador, 2014.

## RESUMO

A Doença de Chagas é uma infecção parasitária causada pelo protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi*. As cepas de *T. cruzi* se constituem de uma população heterogênea, apresentando várias subpopulações. Essas populações circulam entre animais vertebrados domésticos, silvestres e humanos, além de insetos vetores. Devido a essas múltiplas relações, o *T. cruzi* demonstra uma grande variedade biológica, genética, bioquímica e imunológica. A caracterização das cepas de *T. cruzi* pode utilizar várias metodologias que pode ter foco biológico, bioquímico, isoenzimático e molecular. Dentre essas, a molecular vem ganhando destaque devido a rapidez, sensibilidade e precisão do método. Deste modo, com a presente pesquisa o objetivo foi caracterizar molecularmente as cepas de *Tripanosoma cruzi* (Chagas 1909) isoladas em vetores e reservatórios na zona urbana de Salvador. Foram incluídas neste estudo amostras de *T. cruzi* isoladas de triatomíneos e reservatórios provenientes de diversas localidades da cidade de Salvador, capturados entre Julho de 2007 e Junho de 2011, perfazendo um total de 4 anos de amostragem. Adotamos a técnica de tipagem molecular do *T. cruzi* sugerida por Zingales *et al.* (2009) em sistema de eletroforese capilar. Das 930 amostras de triatomíneos avaliados, 99,35% da espécie *Triatoma tibiamaculata*, 482 amostras (52%) não estavam em condições de análise. Das 448 amostras passíveis de análises foram randomizadas 192 amostras (43%) para avaliação das linhagens de *T. cruzi*. Dentre as amostras analisadas, 20 (10,4%) não apresentaram sinal satisfatório na eletroforese capilar e foram excluídas, restando 172 amostras. Foi detectado *T. cruzi* em 21,5% das amostras de triatomíneos (n=37). A tipagem revelou o seguinte perfil nas amostras positivas: *T. cruzi* 1 (32,4%), *T. cruzi* 2 (59,4%), *T. cruzi* 3 (2,7%). Foi detectado também triatomíneos com múltipla infecção com linhagens diferentes de *T. cruzi* 1 & 2 (5,4%). Adicionalmente, foram avaliados 78 marsupiais, *Didelphis spp.* A taxa de infecção nos marsupiais foi de 29,4%, e nas amostras positivas foi observado o seguinte perfil molecular de tipagem pelo *T. cruzi*: *T. cruzi* 1 (30,4%), *T. cruzi* 2 (60,8%), *T. cruzi* 1 e 2 (8,6%). A alta taxa de infecção dos vetores e reservatórios avaliados pode ser efeito da fragmentação florestal, causada pela expansão urbana. O *Triatoma tibiamaculata* já foi associado à transmissão oral do *T. cruzi* por alimentos infectados no Brasil e a ocorrência de exemplares infectados desta espécie no ambiente intradomicíliar na cidade de Salvador é fator de risco para a transmissão da doença de Chagas para a população local. Os dados obtidos na tipagem molecular das cepas isoladas em Salvador demonstrou maior prevalência do *T. cruzi* 2 em seguida do *T. cruzi* 1 nos vetores e reservatórios avaliados. A presença de triatomíneos e marsupiais infectados, coabitando e albergando diversas linhagens do *T. cruzi* em áreas de ocupação urbana é razão de alerta para os órgãos de vigilância em saúde locais.

**Palavras- chave:** *Trypanosoma cruzi*, Triatomíneos, Salvador.

SANTOS, Carlos Gustavo Silva dos. Molecular characterization of *Trypanosoma cruzi* strains isolated in the urban area of the city of Salvador / Ba. 69 f. il. Dissertação (Mestrado) – Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador, 2014.

## ABSTRACT

Chagas disease is a parasitic infection caused by the flagellate protozoan *Trypanosoma cruzi*. The *T. cruzi* strains constitute a heterogeneous population, with several subpopulations. These populations move between domestic vertebrate animals, wildlife and humans, and insect vectors. Because of these multiple relationships, *T. cruzi* demonstrates great biological diversity, genetic, biochemical and immunological. The characterization of *T. cruzi* strains can use various methodologies that may have biological, biochemical, and molecular isoenzyme focus. Among these, the molecular been gaining attention due to speed, sensitivity and precision of the method. Thus, the present study the objective was to characterize molecularly strains of *Trypanosoma cruzi* (Chagas 1909) isolated in vectors and reservoirs in the urban area of Salvador. Were included in this study *T. cruzi* samples of insects and shells from different localities of the city of Salvador, captured between July 2007 and June 2011, a total of four years of sampling. We adopt molecular typing technique of *T. cruzi* suggested by Zingales et al. (2009) in a capillary electrophoresis system. Of the 930 samples evaluated triatomine 99.35% of *Triatoma tibiamaculata*, 482 samples (52%) were not in analytical conditions. Of the 448 samples amenable to analysis 192 samples were randomized (43%) for evaluation of *T. cruzi* strain. Among the samples analyzed, 20 (10.4%) had no satisfactory signal in capillary electrophoresis and were excluded, leaving 172 samples. *T. cruzi* was detected in 21.5% of samples of insects (n = 37). The typing revealed the following profile in positive samples: *T. cruzi* 1 (32.4%) *T. cruzi* 2 (59.4%) *T. cruzi* 3 (2.7%). Triatominae was also detected with multiple infections with different strains of *T. cruzi* 1 & 2 (5.4%). Additionally, we evaluated 78 marsupials, *Didelphis* spp. The infection rate in marsupials was 29.4%, and the positive samples was observed the following molecular profile of typing *T. cruzi*: *T. cruzi* 1 (30.4%), *T. cruzi* 2 (60.8% ), *T. cruzi* 1 and 2 (8.6%). The high rate of infection vectors and reservoirs can be evaluated effect of forest fragmentation caused by urban sprawl. *Triatoma tibiamaculata* has been associated with oral transmission of *T. cruzi* by infected food in Brazil and the occurrence of infected specimens of this species within domestic environments in the city of Salvador is a risk factor for the transmission of Chagas disease to the local population. The data obtained in the molecular typing of strains isolated from Salvador showed a greater prevalence of *T. cruzi* 2 then 1 of *T. cruzi* in vectors and reservoirs evaluated. The presence of infected bugs and marsupials, co-habiting and harboring various strains of *T. cruzi* in urban areas of occupation is warning reason for the oversight bodies in local health..

**Keywords:** *Trypanosoma cruzi*, Triatominae, Salvador.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CCZ	Centro de Controle de Zoonoses
CO	Citocromo oxidase
DC	Doença de Chagas
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DTU	Discrete Typing Units
gRNA	Ácido ribonucleico guias
<i>kDNA</i>	Cinetoplasto Ácido desoxirribonucleico
MIT	Mitocôndria
n	Números de amostras
mRNAs	Ácido ribonucleico mensageiros
P.A.	Pró-análise
<i>P.megistus</i>	<i>Panstrongylus megistus</i>
pb	Pares de Base
PBS	Tampão fosfato-salino
PITs	Pontos de Informação de Triatomíneo
RNA	Ácido ribonucléico
rRNA	<i>Ácido ribonucleico ribossomal</i>
SUCAM	Superintendência de Campanhas de Saúde Pública
<i>T. cruzi</i>	<i>Tripanosoma cruzi</i>
<i>T. infestans</i>	<i>Triatoma infestans</i>
<i>T.sordida</i>	<i>Triatoma sordida</i>
TcI	<i>Tripanosoma cruzi I</i>
TcII	<i>Tripanosoma cruzi II</i>
TcIII	<i>Tripanosoma cruzi III</i>

TczI	<i>Tripanosoma cruzi I</i>
TczII	<i>Tripanosoma cruzi II</i>
TczIII	<i>Tripanosoma cruzi III</i>
UVP	Imaging Systems
Z1, Z2 e Z3	Zimodemas

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b>	Carlos Chagas, em seu laboratório no Instituto Oswaldo Cruz FONTE: Google.....	15
<b>Figura 2</b>	Distribuição de caso da Doença de Chagas no mundo 2006 a 2009 FONTE OMS 2010. ....	18
<b>Figura 3</b>	Ciclo de transmissão do Trypanosoma cruzi simplificado. FONTE: Vinício-Ribeiro (FIOCRUZ). ....	22
<b>Figura 4</b>	Principais espécies de triatomíneos FONTE: Google.....	25
<b>Figura 5</b>	Principais reservatórios domésticos e silvestres FONTE Google.....	29
<b>Figura 6</b>	Mapa da Cidade de Salvador Fonte: Google. ....	38
<b>Figura 7</b>	Fluxograma da amostragem	
<b>Gráfico 1</b>	Tipagem das amostras positivas para as linhagens de T.cruzi 1,(32,4%) T. cruzi 2 (59,4%), T. cruzi 3 (2,7%) e T. cruzi 1 & 2 (5,4).....	50
<b>Gráfico 2</b>	Distribuição das linhagens de T. cruzi nos bairros de Salvador.cruzi nos bairros de Salvador. ....	51
<b>Gráfico 3</b>	Linhagens de T. cruzi em marsupiais, T. cruzi 1 (30, 4 %) n= 7, T. cruzi 2 (60,8%) n=14 e T. cruzi 1 & 2 (8,6%) n=2 .....	51
<b>Gráfico 4</b>	Distribuição das linhagens de T.cruzi em alguns bairros de Salvador. T. cruzi 1 (n= 7), T. cruzi 2 (n=14) e T. cruzi 1 & 2 (n=2) .....	52
<b>Figura 8</b>	Locais de captura dos Triatomíneos e Marsupiais em Salvador. ....	41
<b>Figura 9</b>	Representação da eletroferogramas de T.cruzi, A=TCZI, B=TCZII , C=TCZIII e D= múltipla cepas .....	48
<b>Figura 10</b>	Sítios de ação da Enzima Alu I no gene da COII nas linhagens de T. cruzi .....	45
<b>Figura 11</b>	Esquema de Padronização de cepas em eletroforese convencional (agarose e acrilamida) .....	46
<b>Figura 12</b>	Sítios de ação da Enzima Alu I no gene da COII amplificado por primers marcados.....	46
<b>Figura 13</b>	Triatoma tibiamaculata (Pinto, 1926).....	49
<b>Figura 14</b>	Distribuição geográfica das Linhagens de T. cruzi entre triatomíneos e marsupiais na cidade de Salvador .....	53
<b>Tabela 1</b>	Primers marcados para eletroforese capilar. ....	44
<b>Tabela 2</b>	Distribuição das linhagens de T. cruzi nos bairros de Salvador. ....	51
<b>Gráfico 1</b>	Tipagem das amostras positivas para as linhagens de T.cruzi 1 (32,4%), T. cruzi 2 (59,4%), T. cruzi 3 (2,7%) e T. cruzi 1 & 2 (5,4).....	50
<b>Gráfico 2</b>	Distribuição das linhagens de T. cruzi nos bairros de Salvador.....	50
<b>Gráfico 3</b>	Linhagens de T. cruzi em marsupiais, T. cruzi 1 (30, 4 %) n= 7, T. cruzi 2 (60,8%) n=14 e T. cruzi 1 & 2 (8,6%) n=2 .....	51
<b>Gráfico 4</b>	Distribuição das linhagens de T.cruzi em alguns bairros de Salvador. T. cruzi 1 (n= 7), T. cruzi 2 (n=14) e T. cruzi 1 & 2 (n=2) 52	52

# SUMÁRIO

1	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	13
2	<b>REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	15
2.1	HISTÓRICO DA DOENÇA DE CHAGAS .....	15
2.2	EPIDEMIOLOGIA DA DOENÇA DE CHAGAS.....	17
2.3	AGENTE ETIOLÓGICO DA DOENÇA DE CHAGAS .....	20
2.4	MORFOLOGIA DO T. CRUZI.....	21
2.5	CICLO EVOLUTIVO DO T. CRUZI NO PARASITO .....	22
2.6	CICLO EVOLUTIVO DO T. CRUZI NO VETOR.....	23
2.7	CICLO EVOLUTIVO DO T. CRUZI NO HOSPEDEIRO VERTEBRADO.....	23
2.8	VETORES DO T. CRUZI.....	24
2.9	RESERVATÓRIO DO T. CRUZI .....	28
2.10	TIPOS DE TRANSMISSÃO DA DOENÇA DE CHAGAS .....	29
2.11	PATOGENIA DA DOENÇA DE CHAGAS .....	31
2.12	VARIABILIDADE BIOLÓGICA E BIOQUÍMICA DO T. CRUZI .....	32
3	<b>OBJETIVOS</b> .....	
3.1	GERAL .....	37
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	37
4	<b>METODOLOGIA</b> .....	38
4.1	DESENHO DO ESTUDO .....	38
4.2	ÁREA DE ESTUDO.....	38
4.3	COLETAS DE DADOS.....	39
4.3.1	Amostragem e processamento dos vetores e reservatórios.....	39
4.4.	EXTRAÇÃO DE DNA E REAÇÃO E CADEIA DA POLIMERASE .....	42
4.5	ELETROFORESE E FOTOGRAFIA.....	43
4.6	PADRONIZAÇÃO DO SISTEMA DE ELETROFORESE CAPILAR .....	43
4.7	DETECÇÃO E TIPAGEM MOLECULAR.....	44
5	<b>RESULTADOS</b> .....	49
5.1	VETORES E RESERVATÓRIOS.....	49
6	<b>DISCUSSÃO</b> .....	54
7	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	60
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	61

# 1 INTRODUÇÃO

A Doença de Chagas (DC) ou Tripanossomíase Americana é uma infecção parasitária causada pelo protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909). Passados mais de 100 anos da sua descoberta, considerada a doença parasitária mais importante na América Latina tendo um grande impacto pessoal, social e econômico em países emergentes (CHAGAS, 1909; 1922; COURA *et al.*, 1997).

A DC era exclusiva dos países do cone sul, que são os que apresentam as maiores taxas de prevalência da doença, que está intimamente ligada as condições precárias de moradia. Entretanto, com a migração intensa de latino-americanos para outros continentes, a doença se expandiu para os grandes centros urbanos, sendo registrada em todos os lugares do mundo (W.H.O, 2010; PÉREZ-AYALA *et al.*, 2011; CORTEZ *et al.*, 2012).

A DC era considerada uma enzootia, restrita a situação silvestre, circulando entre mamíferos principalmente através do inseto vetor. Devido a invasão do homem nos habitats naturais do parasita a DC tornou-se uma das mais importantes zoonoses humanas).

No Brasil, a DC é um problema de saúde pública, embora o perfil epidemiológico da doença tenha mudado nos últimos anos. Na década de 70, a principal forma de transmissão da doença era vetorial. Recentemente, há um novo cenário da DC, ocorrendo relatos de casos e surtos por via oral. Foram registrados entre 2000 a 2011, mais de 1.200 casos agudos da DC, com maior frequência na região da Amazônia Legal e também em estados, como da Bahia, Ceará, Piauí, Santa Catarina e São Paulo (VINHAES; DIAS, 2000).

Na Bahia, a situação da DC ainda é preocupante. Dos seus 417 municípios, 97 são considerados de alto risco para ocorrência da doença. O estado apresenta a maior variedade de espécie de triatomíneos, sendo o único estado do Brasil que ainda existe infestação do *Triatoma infestans* (Klug,1934). A capital do estado, Salvador, tem registrado crescente encontro da espécie *Triatoma tibiamaculata*, infectado por *T. cruzi* invadindo o intra e peridomicílio de residências próxima aos remanescentes florestais (BAHIA, 2006; BRASIL, 2010)

As cepas de *T. cruzi* compõe uma população heterogênea, apresentando várias subpopulações. Essas populações circulam entre animais vertebrados domésticos, silvestres, humanos e insetos vetores. Devido a essas múltiplas relações o *T. cruzi* demonstra uma grade variedade biológica, genética, bioquímica e imunológica. (TIBAYRENC; AYALA, 1991; BRENER *et al.*, 2000; DEVERA *et al.*, 2003) .

A caracterização das cepas de *T. cruzi* pode ser feita utilizando várias metodologias que podem ter como foco biológico, bioquímico, isoenzimático e molecular. Dentre essas, a caracterização molecular vem ganhando destaque devido a rapidez, sensibilidade e precisão do método (ZINGALES, 2011).

Deste modo, com este trabalho pretende-se caracterizar através de ferramentas de biologia molecular as linhagens e os subgrupos circulantes de *T. cruzi*, isoladas na zona urbana de Salvador. Esse trabalho é pioneiro na Bahia, com uma nova abordagem utilizando eletroforese capilar. Sendo assim, espera-se contribuir para o conhecimento científico através do levantamento das cepas circulantes, contribuindo na tomada de decisão para as políticas públicas.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 HISTÓRICO DA DOENÇA DE CHAGAS

Em 1909, o Dr. Carlos Ribeiro Justiniano das Chagas (Carlos Chagas) (Figura. 1) esclareceu todos os elos do ciclo de transmissão de uma moléstia, desde do agente etiológico, ciclo de transmissão, vetor e reservatório. Passado mais de 100 anos da sua descoberta, a DC apresenta-se ainda como uma das mais importantes endemias das Américas (CHAGAS, 1909; COURA *et al.*, 1997)



**Figura 1: Carlos Chagas, em seu laboratório no Instituto Oswaldo Cruz FONTE: Google 30 de outubro de 2014.**

Para reconstruir essa descoberta, dois anos antes, em 1907, Dr. Oswaldo Gonçalves Cruz designou seu aluno Carlos Chagas, como assistente para controlar a malária entre os trabalhadores da construção do programa da Estrada de Ferro Central do Brasil na região do Rio das Velhas, entre Corinto e Pirapora, no Norte do Estado de Minas Gerais. Em um vilarejo da cidade de Lassance, em Minas Gerais,

Carlos Chagas se instalou em um vagão de trem, ao mesmo tempo, sua residência e laboratório. Em horas vagas capturava anofelinos e examinava o sangue de animais domésticos e silvestres, procurando esclarecer aspectos de alguma doença desconhecida (COURA *et al.*, 1997; COUTINHO; DIAS, 1999)

Em 1908, um engenheiro da estrada de ferro, alertou Carlos Chagas para presença de insetos hematófagos conhecido naquela região como “barbeiros”. Chagas descobriu que os tais insetos eram encontrados nas frestas das paredes das choupanas que o classificando-os provisoriamente como *Conorrhinus sanguessuga*. Posteriormente, em seu laboratório Carlos Chagas investigou o conteúdo intestinal daqueles insetos e descobriu numerosas formas flageladas que identificou como "Chrithidias" hoje designado como formas epimastigotas (CHAGAS, 1922; DIAS, 1939; COURA *et al.*, 1997)

Chagas mandou exemplares dos insetos para seu mestre Oswaldo Cruz no Rio de Janeiro, para a realização de novos experimentos usando Calitrix como cobaia. Após três semanas, apresentaram tripanosoma no sangue. Carlos Chagas verificou que o tripanossomo do macaco era diferente do *Trypanosoma minasense* que foi encontrado anteriormente em outro pequeno macaco em Minas Gerais. Em homenagem ao seu mestre Oswaldo Cruz, Chagas deu o nome do tripanossomo de *Trypanosoma cruzi* (CHAGAS, 1922; DIAS, 1939; COURA *et al.*, 1997).

Sua descoberta obteve repercussão nacional e internacional fazendo que Carlos Chagas fosse agraciado com vários títulos entre eles: Membro Titular Extraordinário da Academia Nacional de Medicina, prêmio Schaudin, foi honorário da Societé de Pathologie Exotique da França, da Royal Society of Tropical Medicine da Inglaterra e das Academias de Medicina de Paris, Bruxelas, Roma e Nova York. Foi Diretor do Instituto Oswaldo Cruz após a morte de Oswaldo Cruz em 1917 e em

1919 também assumiu o cargo de Diretor do Departamento Nacional de Saúde Pública (DIAS, 1939; COURA *et al.*, 1997; COUTINHO; DIAS, 1999).

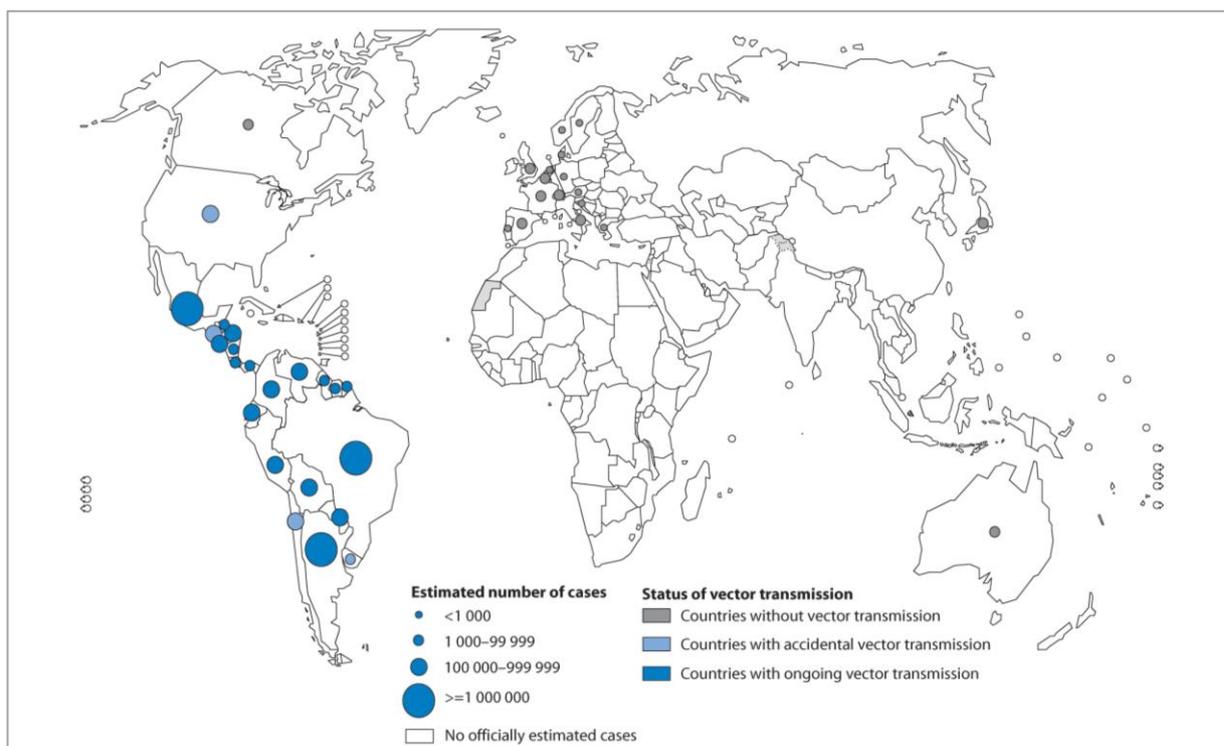
A descoberta da DC proporcionou uma nova visão do campo da pesquisa brasileira enaltecendo o Brasil por um grande feito pátrio, abrindo o diálogo com a comunidade científica mundial.

## 2.2 EPIDEMIOLOGIA DA DOENÇA DE CHAGAS

A DC ou tripanossomíase americana é uma infecção parasitária causada pelo protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi* (CHAGAS, 1909). Constitui a doença parasitária mais importante na América Latina principalmente aos 14 mil óbitos por ano (superando até mesmo a malária) apresentando um grande impacto pessoal, social e econômico em países emergentes (DIAS, 2007)

A ocorrência se estende desde o sul dos EUA até o sul da Argentina e Chile apresentando uma ampla distribuição geográfica (Figura 2) (LENT; WYGODZINSKY, 1979; W.H.O, 2010). Segundo dados da Organização Mundial de Saúde, foram diagnosticados 16 a 18 milhões de pessoas com infecção por *T. cruzi* e 120 milhões em risco de adquirir a infecção. No Brasil, a estimativa é de 4 milhões de pessoas infectadas pelo *T. cruzi* (W.H.O, 2010)

A DC é considerada uma enzootia restrita a situação silvestre, circulando entre mamíferos através de vetores. Devido a invasão do homem, os ecótopos naturais do parasita, incluindo o ciclo epidemiológico, passou a ser considerado uma zoonose por fornecer ao hemíptero vetor, domicílios de péssima qualidade, resultado de políticas sociais limitadas (BARRETTO, 1979; DIAS e BORGES-DIAS, 1979; DIAS; COURA, 1997).



**Figura 2: Distribuição de caso da Doença de Chagas no mundo 2006 a 2009 FONTE OMS, 2010.**

Classicamente uma enfermidade rural ligada diretamente as condições precárias de moradias, com a migração intensa de latino-americanos para outros continentes, a doença expandiu para os grandes centros urbanos, sendo registrada em todos os lugares do mundo. (PÉREZ-AYALA *et al.*, 2011)

São apontados casos em países não endêmicos tais como Austrália, Japão e EUA; e ainda Bélgica, França, Itália, Espanha, Suíça e Reino Unido, Áustria, Croácia, Dinamarca, Alemanha, Luxemburgo, Holanda, Noruega, Portugal, Roménia e Suécia. (W.H.O, 2010; PÉREZ-AYALA *et al.*, 2011)

Nos Estados Unidos estima-se em cerca de 300 mil o número de doentes. Na Europa, a projeção é de que em cerca de 200 mil indivíduos estejam infectados. A Espanha é o único país europeu que faz atualização estatística de números de

doentes com Chagas, devido alta imigração da América Latina com taxas de soro prevalência de 31% em imigrantes.

Como a doença é considerada exótica nesses países, existem portadores crônicos que podem transmitir a doença de Chagas através de transfusão de sangue, por não utilizar exames de rotina para triagem do *T. cruzi* em exames laboratórios deixando a população exposta a doença (SCHMUNIS; DIAS, 2000; COURA; DIAS, 2009; PÉREZ-AYALA *et al.*, 2011).

No Brasil, o perfil epidemiológico da doença vem mudando nos últimos anos, ocorrendo relatos de casos e surtos por via oral. Nos anos 70, a principal transmissão da doença era por via vetorial, que incluía 18 Estados e mais de 2,2 mil municípios. Ações de controle químico foram instituídas a partir de 1975 pelo Ministério da Saúde através da extinta Superintendência de Campanhas de Saúde Pública (Sucam). Conseqüentemente, houve uma redução expressiva do número de triatomíneos, principalmente do *T. infestans* (principal espécie domiciliar) (VINHAES; DIAS, 2000).

No período de 2000 a 2011 foram registrados no Brasil mais de mil e duzentos casos de Doença de Chagas Agudo (DCA), com maior frequência na Amazônia Legal e alguns registros em outros Estados, como da Bahia, Ceará, Piauí, Santa Catarina e São Paulo. A forma de transmissão da doença de Chagas que mais se destacou foi a oral, correspondendo a 76% dos registros, seguida pela transmissão ignorada representando 22% e por último a vetorial que foi de 2% (BRASIL, 2010)

Na Bahia, a situação da DC ainda é preocupante. Dos seus 417 municípios, 97 são considerados de alto risco para ocorrência da doença (BAHIA, 2006). O estado apresenta a maior variedade de espécie de triatomíneos, sendo o único

estado do Brasil que ainda existe infestação do *Triatoma infestans*. Recentemente foram descritos casos por transmissão oral no sudoeste deste Estado (DIAS *et al.*, 2006; DIAS *et al.*, 2008; BASTOS *et al.*, 2010).

Em Salvador, tem sido registrado o crescente encontro da espécie *Triatoma tibiamaculata* (Pinto, 1926), infectado por *T. cruzi* invadindo residências próxima aos remanescentes florestais. (DIAS-LIMA; SHERLOCK, 2000; RIBEIRO, 2012)

Essas espécies silvestres têm como habitat natural os ninhos de marsupiais e roedores, no entanto, em ocorrido um processo de domiciliação devido a destruição de seu ecossistema natural (SHERLOCK *et al.*, 1974; BARRETT *et al.*, 1980)

Atualmente, devido ao grande crescimento imobiliário e desmatamento com exploração dos remanescentes florestais de Salvador, o inseto sem alternativa, é forçado a buscar alimentação sanguínea nos domicílios (ou atraído pela luz), expondo a população humana ao risco de contrair a DC. (DIAS e BORGES-DIAS, 1979).

Pesquisadores da Fiocruz-BA analisaram mais de 900 exemplares de *T. tibiamaculata* que foram capturados no intra e peridomicílio de residências próximas de remanescentes de mata em Salvador, esses triatomíneos apresentaram uma média de infecção de cerca de 50%, quando analisadas as fezes à fresco. Através de técnicas moleculares, foi identificado as fontes alimentares, foi demonstrado que a fonte preferencial de alimentos eram as aves (45%) e os marsupiais (35%) (RIBEIRO, 2012).

### 2.3 AGENTE ETIOLÓGICO DA DOENÇA DE CHAGAS

A Doença de Chagas é causada pelo parasita *Trypanosoma cruzi*, flagelado da ordem KINETOPLASTEA, Sub-ordem: TRYPANOSOMATINA, Gênero:

Trypanosoma, Sub-gênero: Schizotrypanum, Espécie: *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*.

Dentre as principais características morfológicas, destacar-se um único flagelo e o cinetoplasto volumoso, usados frequentemente na identificação taxonômica para diferenciar de outros tripanossomos, como, por exemplo, o *Trypanosoma rangeli* (Tejera, 1920). As espécies dessa família podem apresentar de um a quatro flagelos e uma organela auto replicável que contém DNA, o cinetoplasto, e podem ser encontrados em diferentes insetos hemípteros, animais silvestres e domésticos (DIAS; COURA, 1997; LIU; ENGLUND, 2007)

## 2.4 MORFOLOGIA DO T. CRUZI

O *T. cruzi* possui uma mitocôndria tubular na qual se encontra o DNA que se distribui ao longo da mitocôndria e se concentra no cinetoplasto (k-DNA), cerca de 20% a 25% está organizado em mini-círculos e maxi-círculos, muitos desses círculos estão distribuído no cinetoplasto. Sabe-se que eles possuem muitas funções essenciais como codifica proteínas mitocondriais, proteínas do processo respiratório, RNAs guias (gRNA), auxiliando na editoração do mRNAs e viabilidade dos estágios evolutivos do *T.cruzi*. (DIAS; COURA, 1997; KLINGBEIL; ENGLUND, 2004)

O *T. cruzi* possui um flagelo que se exterioriza através do reservatório ou bolsa flagelar. O citoesqueleto é formado por micro-túbulos que tem funções importante como no processo de diferenciação dos diferentes estágios evolutivos e motilidade. Outras estruturas como complexo de Golgi, retículo endoplasmático e ribossomos estão presentes.

## 2.5 CICLO EVOLUTIVO DO T. CRUZI NO PARASITO

O *T. cruzi* apresenta três formas evolutivas no ciclo evolutivo, a depender do hospedeiro (Figura 3). Nos mamíferos são encontradas as formas amastigotas intracelulares e tripomastigotas sanguíneas, enquanto nos hospedeiros invertebrados são observados epimastigotas e tripomastigotas metacíclicas. Há outra forma encontrada no tubo digestivo dos insetos vetores e em meios artificiais de cultura, chamada de epimastigota. Essa forma é considerada uma transição entre amastigota e tripomastigotas (DIAS; MACEDO, 2005) .

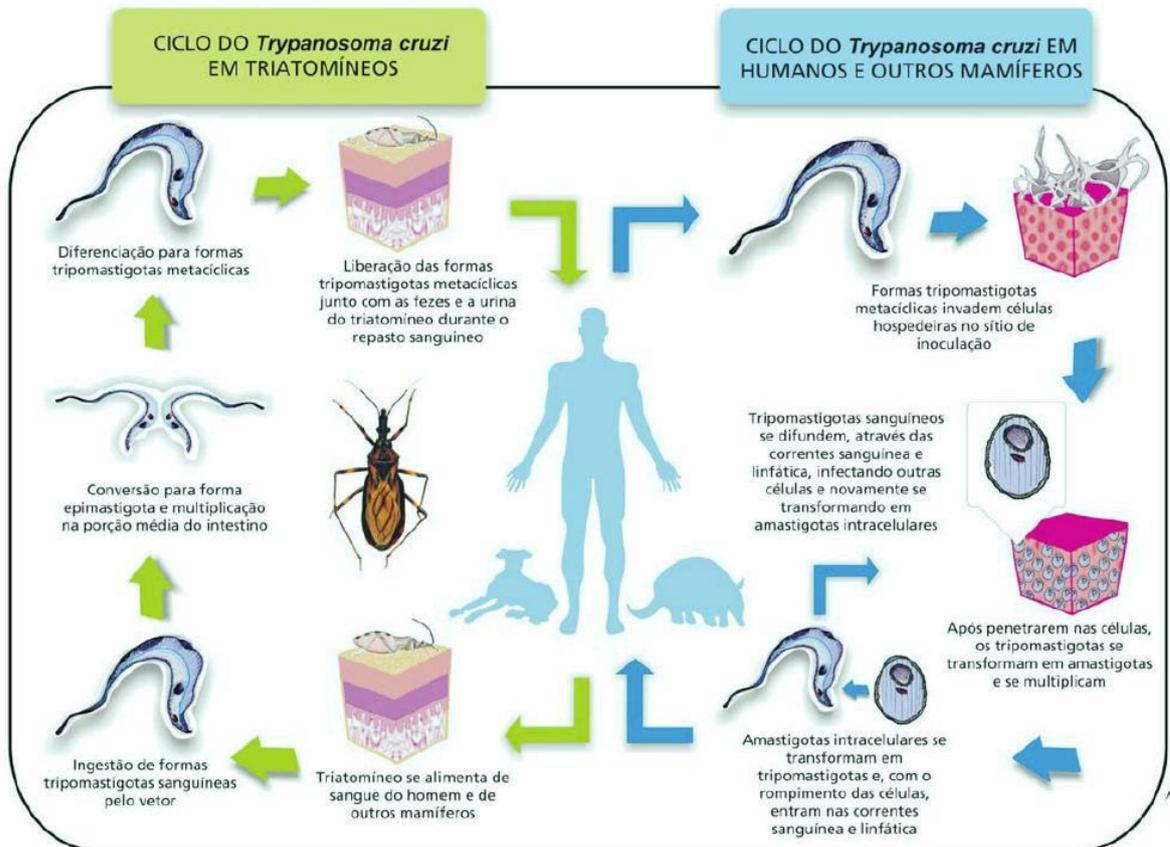


Figura 3: Ciclo de transmissão do *Trypanosoma cruzi* simplificado. FONTE: Vinício Ribeiro (FIOCRUZ) Google 30 de outubro de 2014 .

A forma tripomastigota (estágio infectante do parasita) tem aproximadamente 25µm de comprimento, núcleo na região trêz central, e seu cinetoplasto é localizado na porção posterior da célula e tem presença de membrana ondulante.

As formas amastigotas (estágios evolutivos que se multiplicam dentro das células hospedeiras), tem aproximadamente 5µm de comprimento, caracterizar-se pelo formato arredondado com o cinetoplasto visível e corpo achatado com um flagelo interno, não possui membrana ondulante (TYLER; ENGMAN, 2001) .

## 2.6 CICLO EVOLUTIVO DO T. CRUZI NO VETOR

O *T. cruzi* apresenta um ciclo de vida heteróxico, ou seja, precisa de um hospedeiro invertebrado e vertebrado. Ao ser ingerido pelo repasto sanguíneo do vetor, o *T. cruzi* na sua forma tripomastigota passa por encadeamento de transformações ao longo do tubo digestivo do inseto, começando pelo arredondamento da sua última forma no estômago do triatomíneo, transformando-se em esferomastigotas, que mais tarde transforma-se em epimastigotas, e se acoplando à superfície do intestino médio e posterior, multiplicando-se intensamente (BRENER *et al.*, 2000).

## 2.7 CICLO EVOLUTIVO DO T. CRUZI NO HOSPEDEIRO VERTEBRADO

Na liberação das excreções durante o repasto sanguíneo na pele do vertebrado, são liberadas as formas infectantes (tripomastigotas metacíclicas) que penetram nas células e diferenciam em amastigota que, após período de latência de

20 a 30 horas, inicia o processo de divisão binária intracelular, o qual ocorre a cada 12 horas. (BRENER *et al.*, 2000; TYLER; ENGMAN, 2001) .

As formas amastigotas transformam-se em tripomastigotas, as quais rompem as células hospedeira e atingem a corrente sanguínea infectando assim novas células. Devido a esse processo, há um aumento exponencial do número de tripomastigotas circulantes e de células parasitadas que pode levar o hospedeiro à morte ou, há um controle gradativo do sistema imune nato a proliferação parasitária, dando assim à fase crônica, na qual a parasitemia é subpatente. Nessa fase pode ocorrer também ingestão de formas metacíclicas por triatomíneos na ocasião de um novo repasto sanguíneo, reiniciando assim, o ciclo do parasita (COURA *et al.*, 1997; BRENER *et al.*, 2000; TYLER; ENGMAN, 2001).

## 2.8 VETORES DO T. CRUZI

Os Triatomíneos são insetos hematófagos obrigatórios também chamados chupões, chupanças, bicudos, finções ou procotós, pertencentes à ordem Hemiptera, subordem Heteroptera, família Reduviidae e subfamília Triatominae, família Reduviidae, a subfamília Triatominae (LENT; WYGODZINSKY, 1979).

Até o presente momento, foram descritas cerca de 140 espécies descritas distribuídas em 6 tribos, das quais 111 são encontrados nas Américas. São insetos que podem variar de tamanho dependendo de seu estágio evolutivo (hemimetábolos) dividido em ninfas de primeiro a quinto estágio e adultos. O adulto mede entre 0,5 a 4,0 cm de comprimento. (CARCAVALLO, 1999)

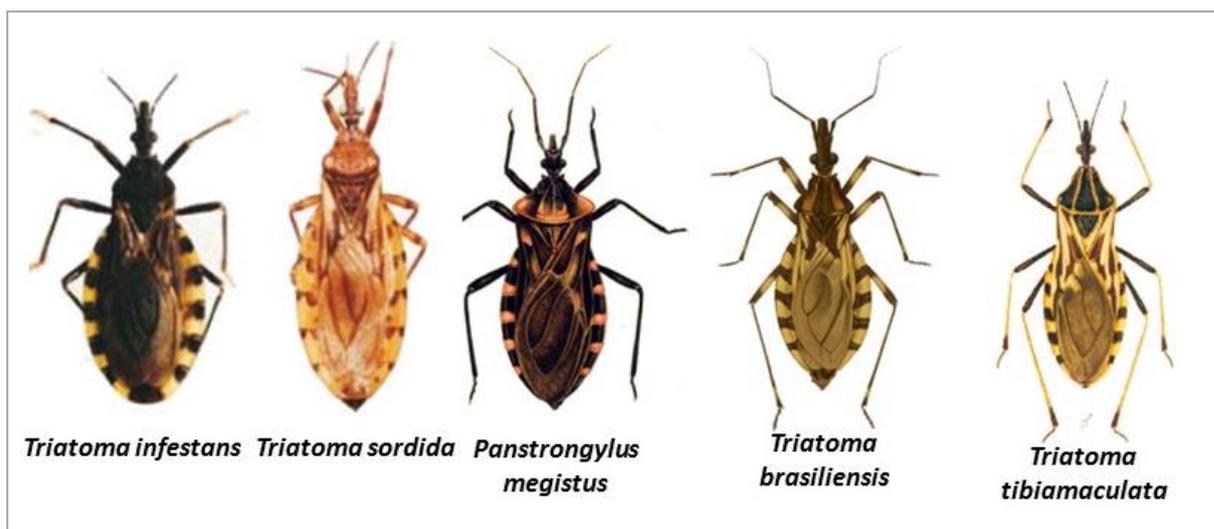
Vivem em média 1 a 2 anos, tem a cabeça em geral alongada, provida de um par de antenas com 4 artículos, inseridas lateralmente em tubérculos anteníferos e

possuem hábitos geralmente noturno (LENT; WYGODZINSKY, 1979; CARCAVALLO, 1999; GALVÃO, 2003; J. JURBERG *et al.*, 2009).

O triatomíneo é susceptível a infecção pelo *T. cruzi* em todos os seus estágios evolutivos ao sugar um mamífero infectado. Porém três gêneros tem maior importância epidemiológica, são eles: *Triatoma* LAPORTE, 1832, *Panstrongylus*, BERG, 1879 e *Rhodnius*, STAL, 1859 (COURA *et al.*, 1997).

O Brasil é considerado o país que possui o maior número de espécie de importância epidemiológica, dentre eles encontra-se o *Triatoma infestans* Klug, 1834, *Triatoma sordida* Stal, 1859 *Triatoma tibiamaculata* Pinto, 1926, *Panstrongylus megistus* Burmeister, 1835, *Triatoma brasiliensis* Neiva, 1911,

*Triatoma pseudomaculata* Corrêa e Espínola, 1964, *Rhodnius robustus* Larrousse, 1927, *Panstrongylus geniculatus* Latreille, 1811, *Panstrongylus rufotuberculatus* Champion, 1773 (Figura 4) (KOPP *et al.*, 2009).



**Figura 4: Principais espécies de triatomíneos FONTE: KOPP, 2009.**

Resumidamente, as características básicas de algumas das principais espécies de triatomíneos de importância epidemiológica em relação à Doença de Chagas são a seguinte:

- *Triatoma tibiamaculata* (Pinto, 1926), vem sendo captura cada vez mais em zonas urbanas do Brasil. Principalmente no litoral. É uma espécie silvestre que tem como habitat natural os ninhos de marsupiais e roedores em bromeliáceas. Devido a ação do homem sobre a cobertura florestal está causando a invasão dessa espécie às residências. Tem a capacidade de colonizar ecótopos artificiais, sendo considerada uma espécie em processo de domiciliação. (SHERLOCK; SERAFIM, 1974)
- *Triatoma infestans* Klug, 1834, é a espécie mais domiciliada e apresenta elevado grau de antropofilia. Por essa razão é o triatomíneo de maior importância epidemiológica. Dispersou-se do Vale de Cochabamba, na Bolívia e se distribuiu do Sul da América Meridional, desde o sul do Nordeste do Brasil e o sul do Peru até a parte norte da Patagônia.(COURA *et al.*, 1997).
- *Panstrongylus megistus* Burmeister, 1835, é considerado um dos maiores vetores da DC devido sua distribuição geográfica.. No Brasil, apresenta comportamento ecológico singular sendo encontrado domiciliado, principalmente na Bahia, e estritamente silvestre em Santa Catarina (FORATTINI, O., 1980; DIAS; COURA, 1997).
- *Rhodnius prolixus*, Stal, 1859, é originário da palmeira, tem o hábito de viver em casas cobertas de palha. Tem grande capacidade de proliferação e antropofilia. Possui grande mobilidade e é encontrado no Intradomicílio, Peridomicílio e no ambiente silvestre (DIAS; COURA, 1997; CARLIER *et al.*, 2002; SILVEIRA, 2007) .

- *Triatoma brasiliensis* Neiva, 1911: tem como habitat zonas semiáridas e de clima quente, típica das áreas secas do Nordeste Brasileiro. Vivem geralmente em locas de pedras circulando entre roedores como mocos, mas frequentemente é encontrado colonizando domicílios em paredes, camas, e no Peridomicílio em galinheiros e cercas. É uma espécie ativa, deslocando-se com agilidade. (LUCENA, 1958)

Outras espécie de interesse médico no Brasil são: *Triatoma sordida*, *Triatoma pseudomaculata*, Corrêa e Espínola, 1964, *Rhodnius robustus*, Larrousse, 1927, *Panstrongylus geniculatus*, Latreille, 1811 (KOPP *et al.*, 2009)

A maioria dos triatomíneos vive distante do homem. Geralmente são nativos de uma região, mas devido a invasão do homem aos seus ecótopos naturais algumas espécies frequentemente invadem as residências atraídos à noite pela luz, ou por fontes alimentares ou abrigos. Nesse contexto, existe uma classificação conforme a sua proximidade com o homem: os triatomíneos silvestres são aqueles que vivem na mata, os peridomésticos são espécie de triatomíneos que encontra-se em transição entre a mata e o domicílio, e a doméstica são espécies de triatomíneos que se adaptaram totalmente ao domicílio (FORATTINI, O. P., 1980; DIAS, 1987; SILVEIRA; REZENDE, 1994)

Devido essa “invasão” dos triatomíneos as residências, colocando o homem no ciclo da doença, foi criado programas de controle da doença de Chagas trazendo bons resultados, embora, apresentando falhas, como a erradicação de apenas uma espécie de triatomíneo (*T. infestans*). Porém, os outros gêneros de importância epidemiológica continuam vinculando o ciclo do parasita (ABAD-FRANCH; MONTEIRO, 2005)

O estudo entomológico dos vetores pode contribuir para esclarecimento da ecologia e epidemiologia de novas rumos da transmissão da doença de Chagas. (DIAS, 1987)

## 2.9 RESERVATÓRIO DO T. CRUZI

Os reservatórios do *T. cruzi* constituem uma gama de mamíferos, que cumprem um papel fundamental na manutenção do ciclo silvestre e doméstico. A condição de reservatório é dinâmica, ou seja, depende de cada ecótopo para formar modalidades distintas de focos naturais da parasitose. Assim, diferentes espécies de mamíferos podem sustentar diferentes ciclos de transmissão, os quais podem estar isolados ou conectados. Esse caráter é particular e único para cada localidade (BARRETTO, 1979; DIAS, 1987; OPAS, 2009)

Os principais tipos de reservatórios e animais caracterizados com o parasito são:

- Reservatórios domésticos: são os principais como os cães e gatos e diversas espécies de ratos domésticos (Figura 5). A circulação do *T.cruzi* no ciclo doméstico é bastante dinâmica, infectando-se os reservatórios comumente em idades jovens, a partir de contatos com triatomíneos domiciliados (BARRETTO, 1979; OPAS, 2009) .
- Reservatórios silvestres: marsupiais, desdentados, roedores, quirópteros (Figura 5). Alguns animais silvestres podem aproxima-se dos domicílios sendo considerados espécies sinantrópica, as vezes, silvestre, deste modo, essas espécies podem servir como fonte de infecção ao triatomíneos que ocupam o mesmo habitat dos humanos. (DIAS; COURA, 1997; OPAS, 2009)



**Figura 5: Principais reservatórios domésticos e silvestres FONTE Google.**

Outros animais que não se infectam com o parasito exercem um papel importante de fonte alimentar para muitos triatomíneos. Por exemplo colônias de *T.sordida* e de *P.megistus* que vivem preferencialmente em galinheiros e pombais, de onde podem invadir se instalarem em domicílios. Contudo, ainda existe meio de dispersão de alguns triatomíneos em aves silvestres, através de substâncias adesivas em seus ovos, como por exemplo do gênero *Rhodnius* (Stal, 1859). Esses ovos colam nas plumagens dessas aves aumentando assim o grau de dispersão desse gênero (BARRETTO, 1979; DIAS, 1987; SCHOFIELD; DIAS, 1991).

## 2.10 TIPOS DE TRANSMISSÃO DA DOENÇA DE CHAGAS

A transmissão vetorial é por meio das fezes dos triatomíneos, que defecam após o repasto sanguíneo, eliminando formas infectantes de tripomastigotas metacíclicas que penetram pelo orifício da picada, ou através de penetração do parasita em mucosas como da boca e dos olhos. A transmissão transfusional ou por transplante, pode ocorrer pela transfusão de sangue e/ou hemocomponentes ou transplante de órgãos de doadores infectados a receptores sadios (DIAS, 1987; OPAS, 2009).

Na década de 1970, quando menos dos 50% dos serviços de hemoterapia realizavam triagem sorológica de *T. cruzi*, estimava-se a incidência de cerca de 20.000 novos casos de doença de Chagas no Brasil. Após o controle dos bancos de sangue, esse cenário mudou sendo a média de doadores infectados abaixo de 0,8% (DIAS; JATENE, 1992)

A transmissão transfusional ganhou destaque epidemiológico nas últimas décadas, devido a Imigração de indivíduos infectados para grandes centros urbanos, principalmente para outros países, onde não existe o controle em banco de sangue, contribuindo assim para a disseminação da doença além das áreas endêmicas (LEIBY *et al.*, 2002; OPAS, 2009).

Recentemente outras formas de transmissão que tem ganhado destaque na literatura científica como a vertical, acidental e oral. Na transmissão vertical ou congênita, ocorre a passagem de parasitas de mulheres infectadas pelo *T. cruzi* para seus bebês durante a gestação ou o parto, podendo causar aborto e nascimento prematuro. É o terceiro forma mais importante para a disseminação da doença (SCHENONE *et al.*, 1987).

A transmissão acidental pode ocorrer pelo contato da pele ferida ou de mucosas com material contaminado (sangue de doentes ou de animais, excretas de triatomíneos); por manipulação inadequada no laboratório (acidental), em geral sem o uso adequado de equipamentos de proteção individual. (OPAS, 2009)

A transmissão oral pode ocorrer pela ingestão de alimentos contaminados com parasitas provenientes de triatomíneos infectados.

Recentemente, é meio de transmissão que está ganhando mais destaque, sendo hoje um dos principais meios de contaminação. Ocorreu no Brasil em 2005 no estado de Santa Catarina, devido a ingestão de caldo de cana-de-açúcar contaminado. Nos Estados do Amazonas, Pará e Amapá enfrentam esse problema devido ao consumo do açaí in natura (LEWINSOHN, 2005; OPAS, 2009)

## 2.11 PATOGENIA DA DOENÇA DE CHAGAS

A doença de Chagas apresenta duas fases, a aguda e a crônica. Na fase aguda, o parasita encontra-se em quantidade significativa circulante no sangue nos primeiros meses de infecção. As manifestações clínicas podem ser sintomáticas ou assintomáticas. Os indivíduos podem apresentar quadro febril inespecífico que pode durar por até 12 semanas. A fase aguda ocorre nos primeiros quatro meses, tem curta duração e elevada parasitemia. Os sintomas podem desaparecer espontaneamente evoluindo para a fase crônica ou progredir na fase aguda grave podendo o indivíduo a morte (DIAS; COURA, 1997; OPAS, 2009).

Na fase crônica, raros parasitas circulante são encontrados no sangue. Pode esta fase ser subdividida em indeterminada, cardíaca e digestiva. A indeterminada ocorre quando o paciente assintomático apresenta-se sem alteração eletrocardiográficas e radiológicas do coração e do tubo digestivo. Tem como característica a sorologia reagente e/ou xenodiagnóstico positivo. Na maioria dos casos, o prognóstico é bom a curto e a médio prazo. É a forma mais frequente na população de áreas endêmicas. O paciente poderá permanecer nesse quadro por toda sua vida ou pode evoluir tardiamente para outras formas (MACEDO, 1997).

A fase cardíaca, é caracterizada inicialmente por três síndromes principais: arritmias (mais frequente), insuficiência cardíaca e tromboembolismo. O ecocardiograma evidencia cardiomegalia, quanto maior esse órgão pior é o prognóstico. A forma cardíaca pode evoluir para miocardiopatia dilatada e insuficiência cardíaca congestiva. Ocorre em 30% em casos crônicos e é responsável por grande impacto social por perda de produtividade devido ao impedimento do trabalho e custos com tratamento e cirurgias. (RASSI; LUQUETTI, 1992).

A forma ocorre no Brasil em 10% de casos, podendo evoluir para megacólon ou megaesôfago. O megaesôfago acomete pacientes entre vinte e quarenta anos de idade, suas manifestações clínicas são disfagia, epigastralgia, soluços e salivação aumentada causando dificuldade na alimentação (BOYCE; BAKHEET, 2005).

A retenção do bolo fecal pode durar dias levando a dilatação da parede do cólon e conseqüentemente a acometimento da região sigmoide e o reto, suas principais complicações são o fecaloma, impaction fecal e torção da alça sigmoide (ADAD *et al.*, 2002; MENEGHELLI *et al.*, 2005)

## 2.12 VARIABILIDADE BIOLÓGICA E BIOQUÍMICA DO *T. CRUZI*

O *T. cruzi* é composto por populações heterogêneas, apresentando várias subpopulações de cepas. Essas populações circulam entre animais vertebrados domésticos, silvestres, humanos e insetos vetores. Devido a essas múltiplas relações o *T. cruzi* demonstra uma grande variedade biológica, genética, bioquímica e imunológica. (TIBAYRENC; AYALA, 1991; DEVERA *et al.*, 2003)

Vários estudos foram e são realizados com o intuito de descobrir a interação entre o parasita, reservatórios e vetores. Dentre esses estudos podemos destacar o de Andrade (1974) que observou parâmetros comuns em modelos experimentais como tropismo tecidual, virulência, morfologia de formas sanguíneas e patogenicidade de algumas cepas de diferentes áreas geográficas, classificando-as Tipo I, II e III estabelecendo critérios para caracterização das cepas de *T. cruzi* (ANDRADE, 1974)

Em 1977, Miles e colaboradores analisando polimorfismo dos perfis eletroforéticos de seis enzimas em *T. cruzi*, classificaram em três perfis grupos denominados de Zimodemas: Z1, Z2 e Z3 (MILES *et al.*, 1977; MILES *et al.*, 1978).

Em 1982, Romanha classificou amostras de *T. cruzi* através do perfil isoenzimático de pacientes com DC em 4 zimodemas, denominados ZA, ZB, ZC e ZD. Em comparação dos zimodemas entre Miles, Z2 e ZA são equivalentes, admitindo dessa forma seis principais zimodemas encontrado no Brasil, são eles Z1, Z2 ou ZA, Z3, ZB, ZC e ZD. Portanto, em estudos epidemiológicos Z2 estaria circulando no ciclo doméstico, e Z1 e o Z3 estão associados em vetores e animais no ciclo silvestre (MILES *et al.*, 1977; MILES *et al.*, 1978; BARRETT *et al.*, 1980)

Tibayrenc colaboradores. (1986) estudando 15 perfis isoenzimático com um número maior de locos de uma variedade de insetos vetores e vertebrados de uma ampla distribuição geográfica, observaram uma grande variedade genética, identificando no mínimo 43 tipos de cepas diferentes denominado de “clonets” devido à grande variabilidade genética (TIBAYRENC *et al.*, 1986; ZHANG *et al.*, 1988)

Em análise do polimorfismo do gene 18S rRNA, Clark e colaboradores em 1994 classificou cepas de *T. cruzi* em três grupos distintos denominados de “ribodemes” I, II e III (CLARK; PUNG, 1994)

Em 1996 começaram os primeiros trabalhos utilizando biologia molecular, inicialmente com Souto et al. (1996) que dividiu as cepas de *T. cruzi* em duas linhagens principais (denominada Linhagem 1 e Linhagem 2) devido à amplificação do espaçador não transcrito do gene do mini-éxon e da região divergente correspondente ao terminal 3' do gene 24S $\alpha$ . A Linhagem 1 produzia fragmentos de DNA amplificados de 125 pb e 300 pb, enquanto na linhagem 2 eram observados fragmentos de DNA amplificados de 110 pb e 350 pb (SOUTO *et al.*, 1996).

Andrade e Magalhães em 1997, em um estudo extenso sobre comportamento biológico de 138 cepas de *T. cruzi* em modelos experimentais com base em critérios como tropismo tecidual, taxa de mortalidade, predomínio de formas largas ou delgadas e comportamento histopatológico agruparam as cepas de *T. cruzi* em três Biodemas (I, II e III) correspondendo ao Zimodemas pela observação dos autores (ANDRADE, 1997).

O Biodema I é composto por cepas com predomínio de formas largas ou delgadas, multiplicação rápida e macrotropismo na fase inicial da infecção.

O Biodema II tem predominância de formas largas com multiplicação lenta, miocardiotropismo e parasitemia irregular entre 12<sup>o</sup> e 22<sup>o</sup> dias após a infecção com alta mortalidade nesse período. O protótipo é a cepa São Felipe. Biodema III multiplicação lenta, com predomínio de formas largas, pico tardio de parasitemia entre 20<sup>o</sup> e o 30<sup>o</sup> dias após a infecção, tropismo para musculatura esquelética e baixa taxa de tardia de mortalidade. O protótipo é a cepa Colombiana (ANDRADE, 1997)

A caracterização das cepas de *T. cruzi* tinha então, um leque de metodologias que poderiam ser utilizadas sendo elas a bioquímica, isoenzimática e molecular. Em 1999, aconteceu o Simpósio Internacional Comemorativo da Descoberta da Doença de Chagas, que tinha como objetivo padronizar as linhagens de *T. cruzi*. Foi adotada a subdivisão da espécie *T. cruzi* em duas linhagens principais, denominadas *T. cruzi I* (TcI) e *T. cruzi II* (TcII) (ANONYMOUS, 1999).

As pesquisas continuaram, e Brisse e colaboradores em 2000, analisando outros marcadores genéticos propuseram a subdivisão do grupo TcII em cinco subgrupos, denominados TcIIa-TcIIe (BRISSE *et al.*, 2000a; BRISSE *et al.*, 2000b).

Apesar da nova padronização da nomenclatura das cepas de *T. cruzi* em 1999, no Simpósio Internacional Comemorativo da Descoberta da Doença de Chagas, novas abordagens sugeriram para caracterizar a estrutura populacional de *T. cruzi*, incluindo novas nomenclaturas dos subgrupos. Pode-se destacar “clades” (KAWASHITA *et al.*, 2001) e os Discrete Typing Units -DTU (TIBAYRENC, 1998) e haplótipos (FREITAS *et al.*, 2006; HERRERA *et al.*, 2007)

Recentemente em 2009, no Second Satellite Meeting, foi proposto uma nova revisão da nomenclatura, desta vez os subgrupos foram classificados como grupos independentes, referido como DTU (Discrete Typing Units). A nova nomenclatura foi classificada em TcI e TcIIb correspondem, respectivamente, aos grupos TcI e TcII seguindo ainda a antiga recomendação do último simpósio em 1999, e que os subgrupos TcIIa, TcIIc, TcIId e TcIIe sejam denominados TcIV, TcIII, TcV e TcVI (TIBAYRENC, 1998; ZINGALES *et al.*, 2009)

Contudo, foi observado ao longo dos anos uma alternância em relação a classificação da diversidade genética do *T. cruzi*. Possuindo assim um grande número de linhagens como nos anos 70 e 80, apenas duas linhagens nos anos 90 e 2000 (TcI-TcII) e, atualmente, seis linhagens principais (TcI-TcVI) (ZINGALES, 2011).

Nesse contexto, a caracterização das cepas de *T. cruzi* é de suma importância para avaliar o papel da diversidade da origem do parasito local da doença de Chagas. Estudos tem demonstrado variações intra-específicas de cepas, tanto em estudo da morfo-biologia e seus perfis histopatológico em animais experimentais (ANDRADE, 1974; BRENER, 1977; ANDRADE, 1997), bem como em análise bioquímicas, molecular e genéticas (MOREL *et al.*, 1980)

Esta abordagem possibilita a melhor sistematização dos isolados do *T. cruzi* obtidos de indivíduos infectados, de outros hospedeiros vertebrados ou de vetores naturalmente infectados. Além disto, permite demonstrar a predominância de uma mesma cepa em uma mesma área geográfica, o que poderia ser responsável pelas diferenças manifestações da doença de Chagas em diferentes regiões.

### **3 OBJETIVO**

#### **3.1 OBJETIVO GERAL**

Caracterizar molecularmente as cepas de *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909) isoladas em reservatórios e vetores na zona urbana de Salvador.

#### **3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Validar o sistema de tipagem do *T. cruzi* descrito por Zingales (2009) para sistema em eletroforese capilar;
- Determinar os subgrupos das cepas de *T. cruzi* isoladas dos triatomíneos na área de estudo;
- Determinar os subgrupos das cepas de *T. cruzi* isoladas de animais silvestres na área de estudo;

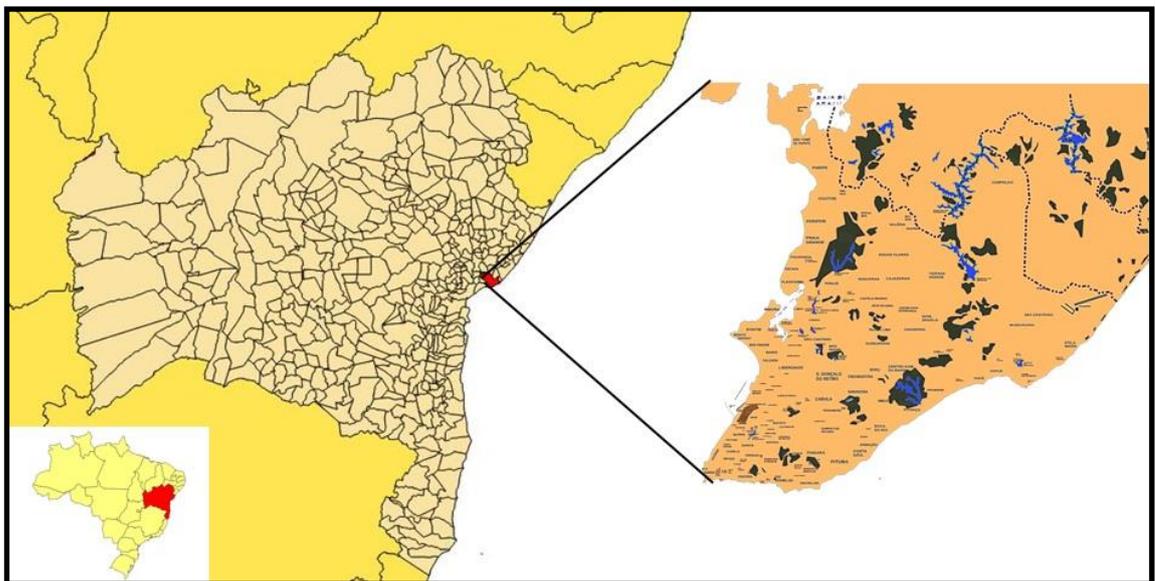
## 4 METODOLOGIA

### 4.1 DESENHO DO ESTUDO

O presente estudo possui um componente exploratório, representado pelo estudo de corte–transversal que visa caracterizar molecularmente as linhagens de *Trypanosoma cruzi* (Chagas 1909) isoladas nos vetores e reservatórios na zona urbana de Salvador.

### 4.2 ÁREA DE ESTUDO

O estudo foi realizado no município de Salvador (Figura 6), capital do estado da Bahia. O município compreende uma área de 693,276 km<sup>2</sup> Segundo dados do IBGE a população é estimada em 2,8 milhões de habitantes, sendo considerado o município mais populoso do Nordeste (IBGE, 2014).



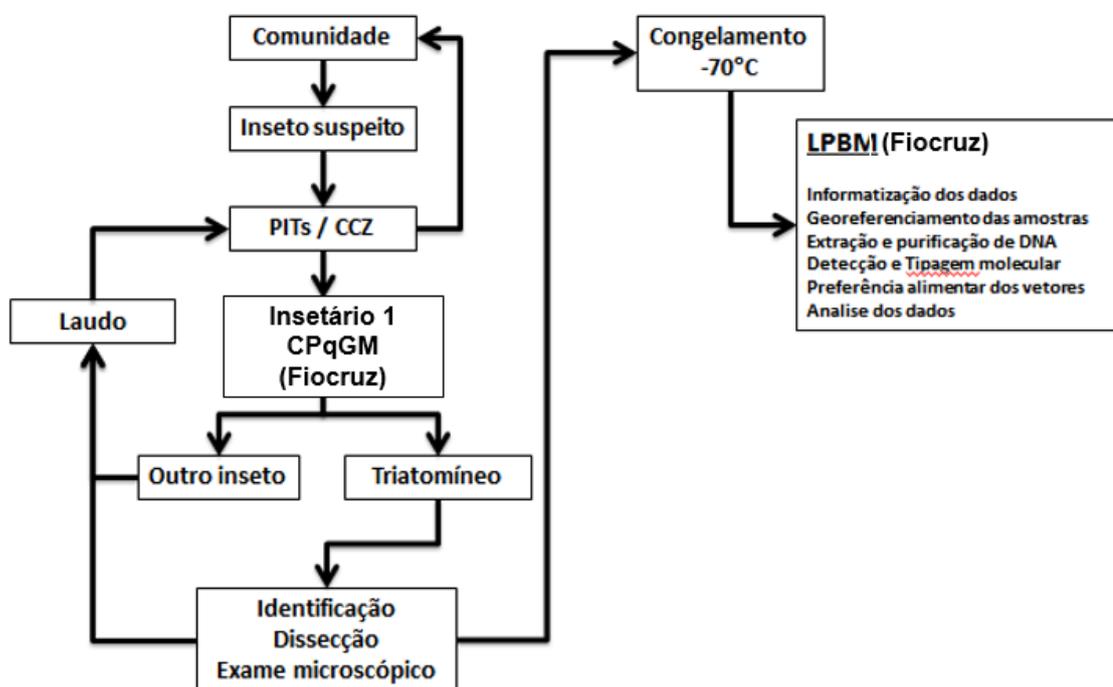
**Figura 6: Mapa da Cidade de Salvador Fonte: Google.**

### 4.3 COLETAS DE DADOS

#### 4.3.1 Amostragem e processamento dos vetores e reservatórios.

Das 448 amostras passíveis de análises, foram randomizadas 192 amostras (43%) para avaliação das linhagens de *T. cruzi*.

Sendo assim, foram incluídos no presente estudo 192 triatomíneos provenientes de algumas localidades da cidade de Salvador (Figura 8) capturados entre Julho de 2007 e Junho de 2011, perfazendo um total de 4 anos de amostragem. As amostras foram provenientes de um acordo entre o Centro de Controle de Zoonoses da Secretaria Municipal de Saúde de Salvador (CCZ) em que todos os insetos existentes nos PITs (Pontos de Informação de Triatomíneo) da cidade de Salvador seguiam o fluxo de informação da (Figura 7).

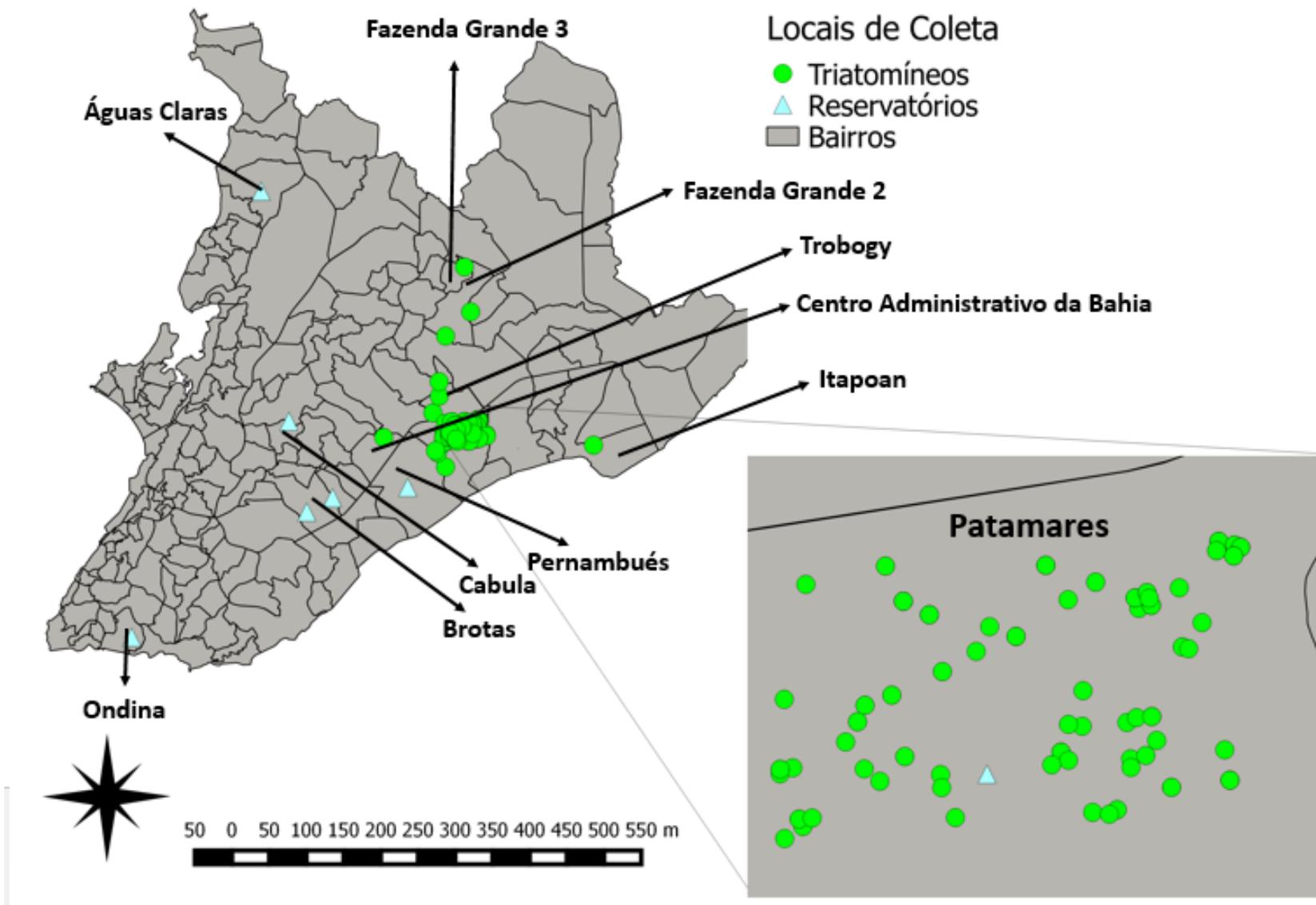


**Figura 7: Fluxograma da amostragem**

Os triatomíneos foram analisados quanto ao sexo e forma evolutiva, (adulto e ninfas de 1° a 5° estágio) e identificado seguindo-se a chave de identificação existente no livro de triatomíneos (DIOTAIUTI *et al.*, 2008). Nos triatomíneos passíveis de análise do conteúdo intestinal, foi realizada a dissecação abdominal individual e coleta das fezes e de todo o seu conteúdo intestinal. Este material foi suspenso em PBS, acondicionado em tubo de microcentrifuga com capacidade de 1.5mL autoclavados e posteriormente congelamento à temperatura de -70°C até o momento da extração de DNA.

As coletas de animais silvestres foram realizadas em remanescentes de mata Atlântica vizinhos a ocupações humanas (figura 8), utilizando-se de armadilhas do tipo Tomahawk® iscadas com abacaxi e bacon. As armadilhas permaneceram em cada ponto de coleta por 7 dias sendo verificada diariamente no início de cada manhã para substituição das iscas e ou coleta dos reservatórios capturados. As armadilhas foram instaladas em transectos a cada 20m nos pontos de coleta.

Os animais coletados foram anestesiados no local de captura por veterinário treinado, e amostras de sangue foram coletadas. Após o procedimento os animais foram soltos no ambiente natural. As amostras sanguíneas dos animais foram levados para o Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz-Fiocruz - Ba.



*Figura 8: Locais de captura dos Triatomíneos e Marsupiais em Salvador.*

#### 4.4. EXTRAÇÃO DE DNA E REAÇÃO E CADEIA DA POLIMERASE

Para o processo de detecção e tipagem do *T. cruzi*, foi realizado o isolamento do DNA utilizando-se o método DNAzol® (Invitrogen, EUA) com modificações. Em cada tubo contendo o produto da dissecação do intestino dos triatomíneos foram adicionados 500µl do reagente DNAzol®. O homogeneizado foi centrifugado por 10min. à 12.000 rpm à 4°C para sedimentação dos debris celulares.

A fase sobrenadante viscosa foi transferida para um tubo novo contendo 500 µl de álcool P.A. A amostra foi misturada por inversão do tubo por alguns segundos e foi mantida no gelo por 5 min. O DNA foi precipitado do lisado/homogeneizado por centrifugação por 10min. à 12.000 rpm à 4°C. O sobrenadante foi removido do tubo por inversão, tomando-se cuidado para não perder o precipitado. O precipitado foi lavado pelo menos uma vez em 1ml de etanol 75%.

Durante a lavagem, o precipitado foi suspenso por inversão do tubo algumas vezes. Finalmente, a amostra foi centrifugada por 10min. à 12.000 rpm à 4°C, o sobrenadante alcoólico foi removido por inversão do tubo e o precipitado contendo o DNA foi redissolvido em 70µL de NaOH 8mM.

A concentração final do DNA de cada amostra foi quantificada no espectrofotômetro Nanodrop-1000® (Nanodrop, EUA) e a concentração de DNA ajustada para cerca de 100ng/ µl e mantidas à -20°C até a realização das ampliações de DNA-alvo através da PCR. O volume final da reação de PCR foi de 25 µl contendo cerca de 100 ng/µl do DNA, 0,5 mM de cada primer, 0,2 mM de dNTPs, 1X do tampão da enzima, 5,0 % de DMSO, 1-1.5 mM de MgCl<sub>2</sub> e 1U de enzima Taq DNA polimerase.

## 4.5 ELETROFORESE E FOTOGRAFIA

Para a realização da eletroforese foi utilizado 5-10µl do produto de PCR, correndo em gel de agarose à concentração 1,5% nas PCRs simples e 3% nas PCR multiplex, corados com brometo de etídio, visualizado sobre luz ultra violeta e fotografado em fotodocumentador MultiDoc-It™ (UVP, Imaging Systems – EUA). Um ladder de DNA com 100bp foi aplicado como referência de tamanho das bandas.

## 4.6 PADRONIZAÇÃO DO SISTEMA DE ELETROFORESE CAPILAR

A eletroforese é definida como o transporte, em solução eletrolítica, de compostos carregados eletricamente sob a influência de um campo elétrico, em microcapilares com diâmetros internos extremamente pequenos. Nos capilares, os fragmentos separados por campo elétrico, tem seu tamanho reconhecido pela fluorescência que emite e interpolação dos valores obtidos um padrão de tamanhos de fragmentos também marcado com fluorescência que é analisado na mesma amostra.

No caso de recortes em um fragmento, apenas o que contém o primer marcado é reconhecido. As eletroforeses foram realizadas em sequenciador ABI 3100 da plataforma PDTIS do CPqGM – FIOCRUZ/BA.

Para a padronização em sistema de eletroforese capilar os primers foram marcados de acordo com a tabela 1:

Nome do Primer	Sequências	Tipo de Marcação
COII-F	5'- CCA TAT ATT GTT GCA TTA TT -3'	SEM MARC.
COII-R	5'- TTG TAA TAG GAG TCA TGT TT -3'	PET
Miniexon-F	5'- AAG GTG CGT CGA CAG TGT GG -3'	SEM MARC.
Miniexon-R	5'- TTT TCA GAA TGG CCG AAC AGT -3'	VIC
Rdna-F	5'- CTC CCC AGT GTG GCC TGG G -3'	SEM MARC.
Rdna-R	5'- CGT ACC AAT ATA GTA CAG AAA CTG -3'	6FAM

**Tabela 1: Primers marcados para eletroforese capilar.**

## 4.7 DETECÇÃO E TIPAGEM MOLECULAR

Foi adotada a técnica de tipagem sugerida por (ZINGALES *et al.*, 2009), no entanto propomos algumas inovações a fim de garantir reprodutibilidade dos resultados e simplicidade de interpretação. O processo está descrito abaixo:

Para realização do processo de tipagem molecular foram necessárias três etapas resumidamente esquematizada nas figuras abaixo:

No passo 1 (PCR1 – COII) utiliza-se um par de primer que produz uma banda específica de 375pb. Este fragmento é em seguida recortado com a Enzima Alu I gerando 3 padrões de bandas: mitocôndrias A (MIT. A) = *T. cruzi* 1 (alelos: 30 + 81 +264), MIT. C = *T.cruzi* II (Alelos: 81 + 82 + 212) e MIT. B = *T. cruzi* III, IV, V e VI (Alelos: 81 + 294) (Figura 9), necessitando de mais duas ampliações (mini-exon e rDNA 24S), em caso de Mit. B, para finalizar a tipagem.

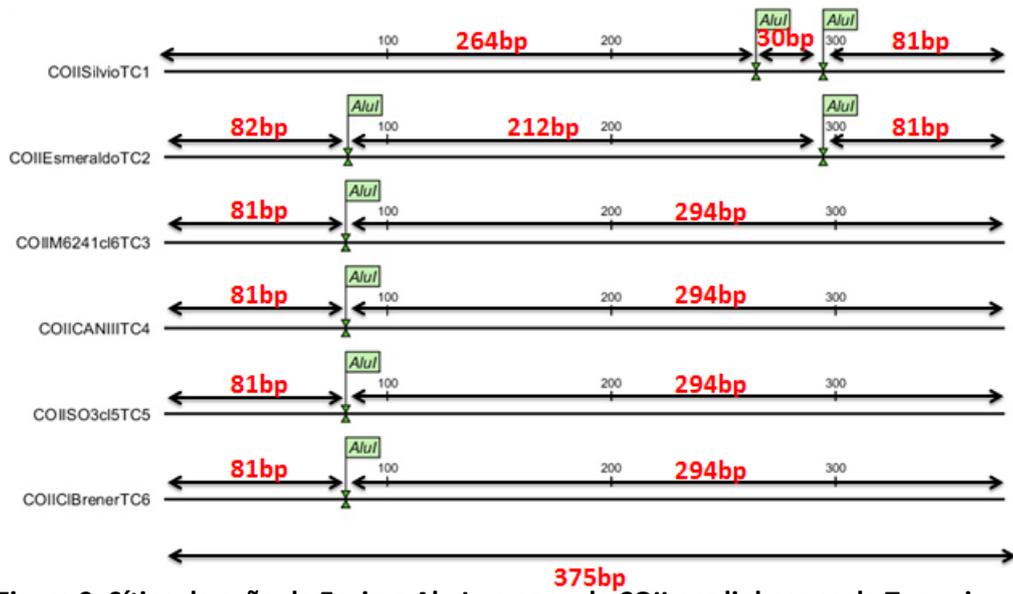


Figura 9: Sítios de ação da Enzima Alu I no gene da COII nas linhagens de *T. cruzi*

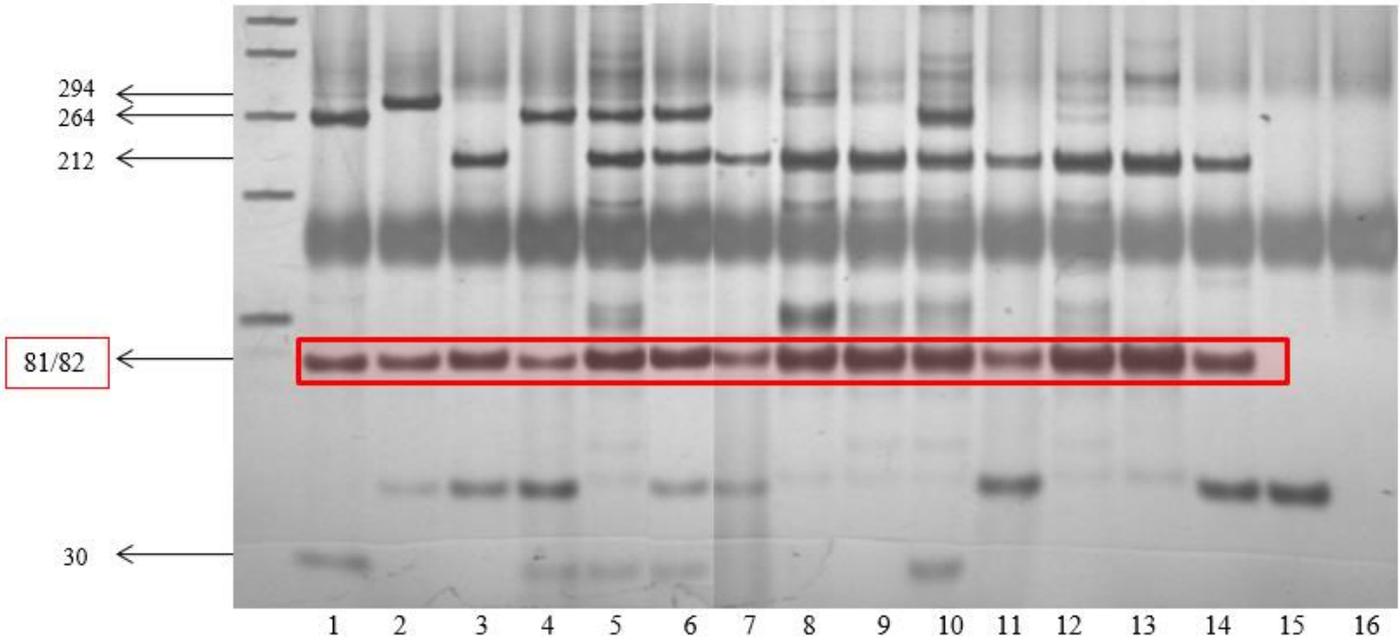
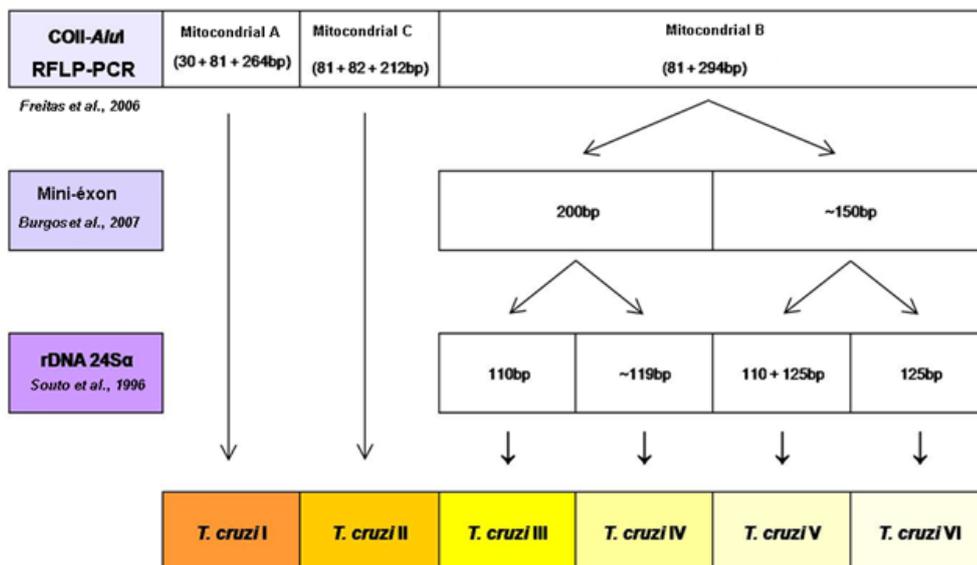
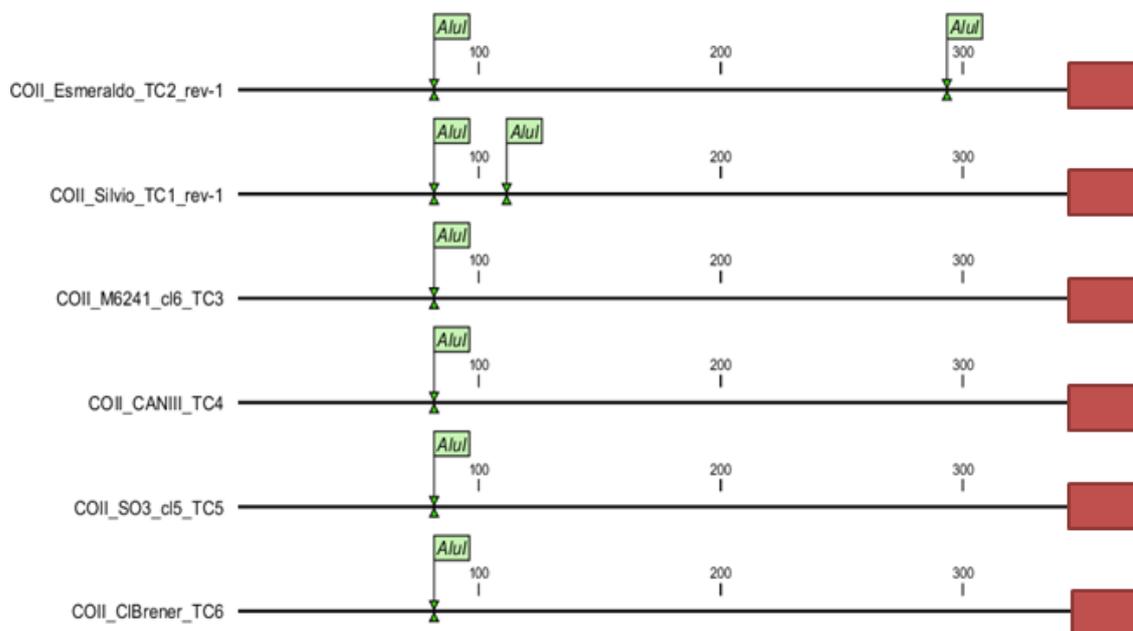


Figura 10: Gel de acrilamida demonstrando a diferença mínima entre as bandas dificultando a interpretação da análise.



**Figura 91: Esquema de Padronização de cepas em eletroforese convencional (agarose e acrilamida)**

A proposta é substituir os primers convencionais por um par de primers marcados com fluorescência (apenas um deles) de acordo com o esquema (figura 12).



**Figura 102: Sítios de ação da Enzima Alu I no gene da COII amplificado por primers marcados.**

Com primer “*reverso*” marcado, dentro do sistema de eletroforese capilar, obtemos simplificação da técnica, com análise de apenas um dos fragmentos/alelos gerados após a digestão do PCR1 pela enzima de restrição ALU I. Para MIT. A (T. cruzi 1) = 264pb, para MIT. C (T.cruzi 2) = 82pb e para MIT. B (T.cruzi 3, 4, 5, 6) = 294 .

Para os PCRs 2 e 3 (mini-exon e Rdna 24s), apenas um dos primers deve ser marcado (independente de qual) seguindo com a eletroforese capilar convencional sem recorte com enzimas, respeitando o proposto por Zingales (2009).

Na figura 13 pode-se visualizar eletroferogramas do processo de validação da tipagem na eletroforese capilar.

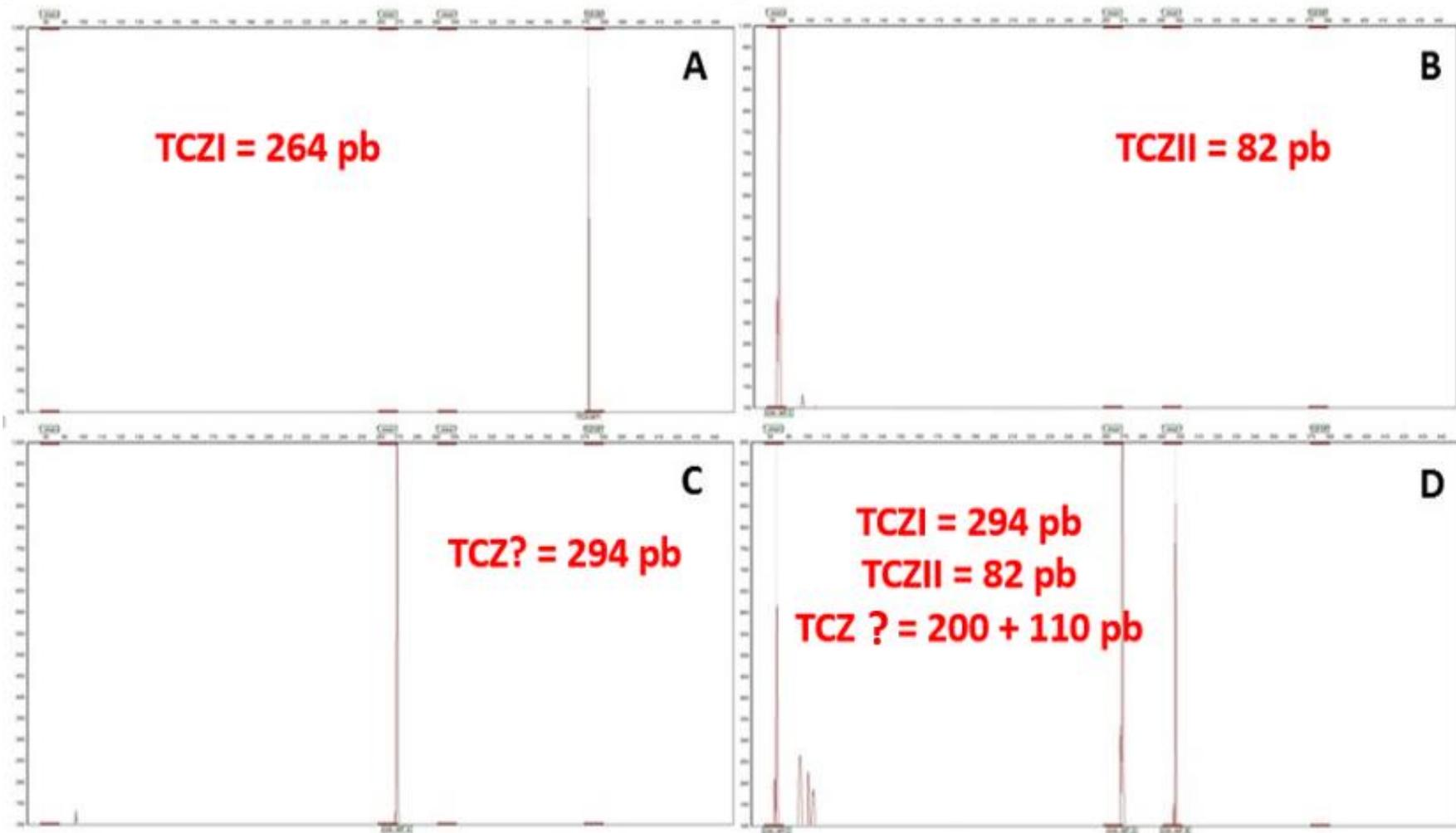


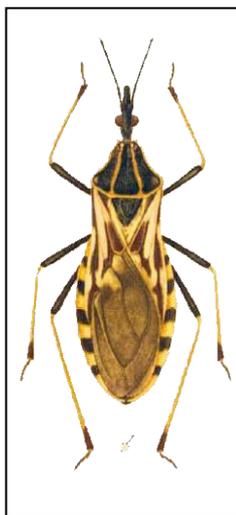
Figura 13: Representação da eletroferogramas de T.cruzi, A=TCZI 264 pb, B=TCZII 82pb, C= TCZ? 294 +110pb e D = múltipla cepas.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 VETORES E RESERVATÓRIOS

Durante o período de Julho de 2007 a Junho de 2011, foram registradas notificações de triatomíneos na cidade, principalmente oriundas dos bairros Patamares, Itapoan, Fazenda Grande II e III, Centro Administrativo e Trobogy. .

Dentre os triatomíneos notificados, a grande maioria, 99,35% (n=924) se tratava da espécie *Triatoma tibiamaculata* (Figura 15). Das 930 amostras avaliadas, 482 amostras não estavam em condições de análise devido ao ressecamento das fezes no intestino do inseto.



**Figura 11** *Triatoma tibiamaculata* (Pinto, 1926)

Dentre as amostras analisadas, 20 (10,4%) não apresentaram sinal satisfatório na eletroforese capilar e foram excluídas, restando 172 amostras. Foi detectado *T. cruzi* em 21,5% das amostras (n=37). A tipagem revelou que das amostras positivas, *T. cruzi* 1 (32,4%), *T. cruzi* 2 (59,4%), *T. cruzi* 3 (2,7%). Foi detectado também triatomíneos com múltipla infecção com linhagens diferentes de *T. cruzi* 1 & 2 (5,4%) (Gráfico 1).

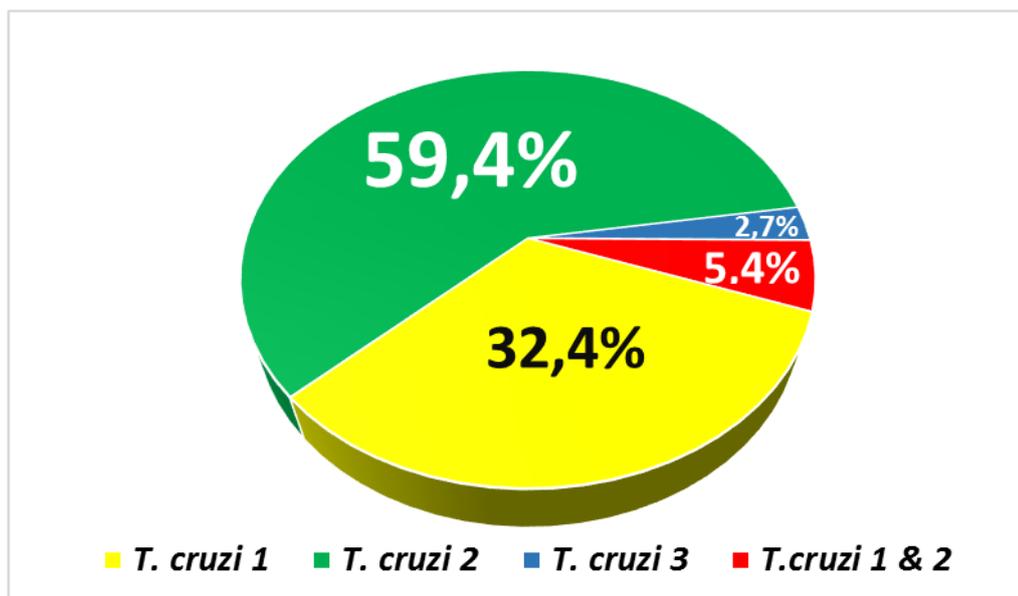
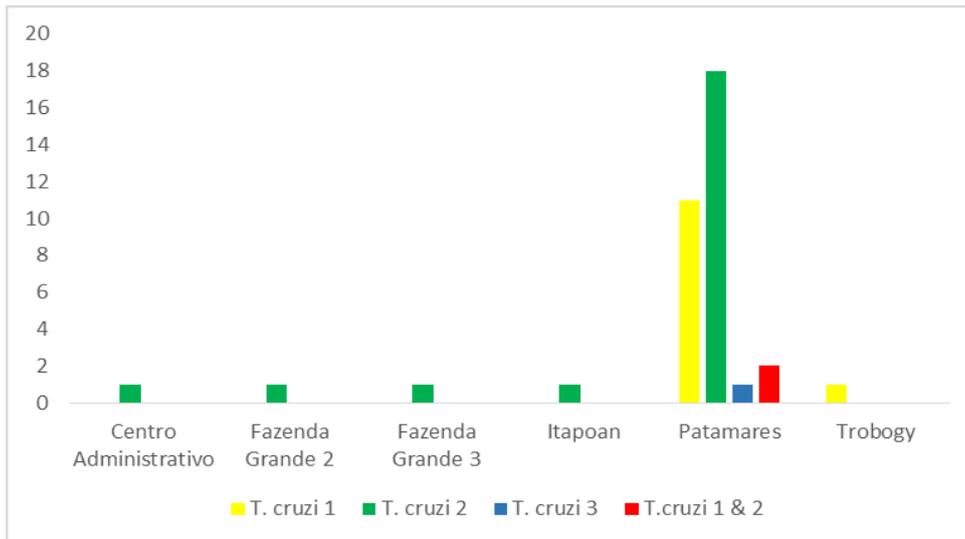


Gráfico 1: Tipagem das amostras positivas para as linhagens de *T. cruzi* 1 (32,4%), *T. cruzi* 2 (59,4%), *T. cruzi* 3 (2,7%) e *T. cruzi* 1 & 2 (5,4).

Na tabela 1 foi demonstrado as distribuições das linhagens de *T. cruzi* em Salvador conforme os bairros de captura. O bairro que apresentou uma maior prevalência de triatomíneos infectados foi Patamares com 32 registros, sendo que destes (n=18) foram tipados como *T. cruzi* 2, (n=11) foram tipados como *T. cruzi* 1, (n=1) como *T. cruzi* 3 e (n=2) como *T. cruzi* 1 & 2. Os outros bairros, Centro Administrativo, Fazenda Grande 2 e 3, Itapoan e Trobogy tiveram apenas 1 registro. No gráfico 2 foi demonstrado a distribuição das linhagens de *T. cruzi* de acordo com a ocorrência nos bairros.

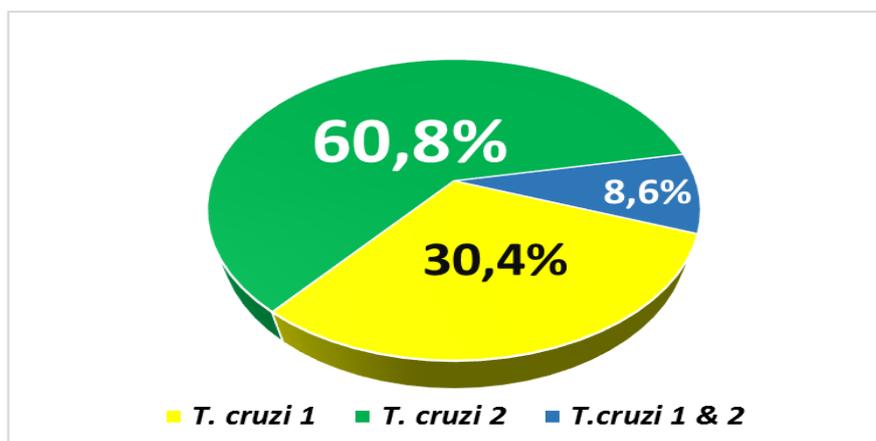
Tabela 2: Distribuição das linhagens de *T. cruzi*

Bairros de Salvador	<i>T. cruzi</i> 1	<i>T. cruzi</i> 2	<i>T. cruzi</i> 3	<i>T. cruzi</i> 1 & 2
Centro Administrativo		1		
Fazenda Grande 2		1		
Fazenda Grande 3		1		
Itapoan		1		
Patamares	11	18	1	2
Trobogy	1			
<b>Total:</b>	<b>12</b>	<b>22</b>	<b>1</b>	<b>2</b>



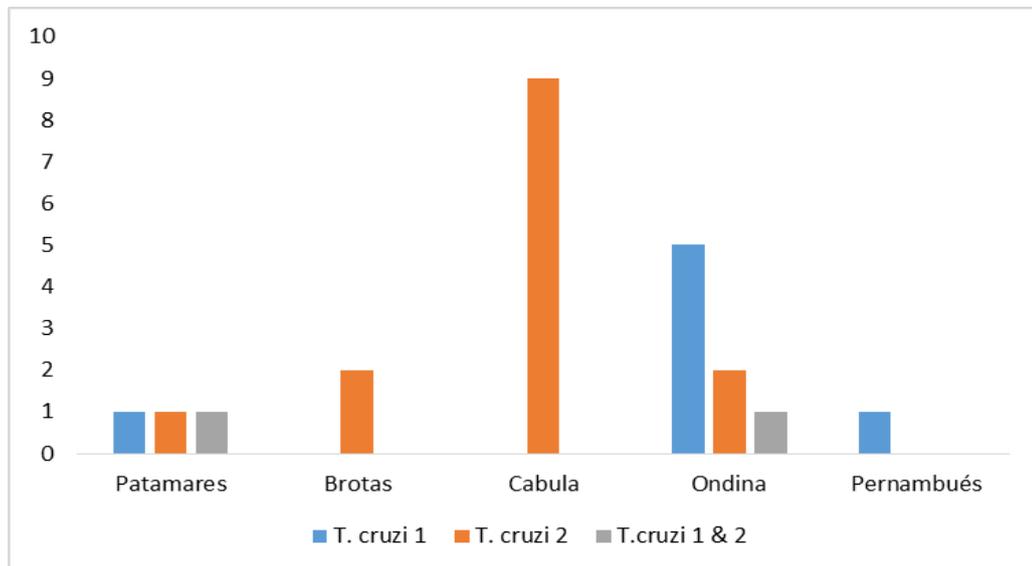
**Gráfico 2: Distribuição das linhagens de *T. cruzi* nos bairros de Salvador.**

Também foram realizadas campanhas para coleta de reservatórios em 14 localidades, em remanescentes florestais vizinhos a ocupações humanas da cidade de Salvador entre abril de 2010 a janeiro de 2012, totalizando 4.368 horas de coleta, o que resultou na captura de 78 exemplares de *Didelphis spp.*, destes 55,41% (n=41) eram fêmeas e 44,59% (n=33) machos. Dos 78 exemplares 23 estavam infectados com as linhagens de *T. cruzi* 1 (30,4%) n= 7, *T. cruzi* 2 (60,8%) n=14 e *T. cruzi* 1 & 2 (8,6%) n=2.



**Gráfico 3: Linhagens de *T. cruzi* em marsupiais, *T. cruzi* 1 (30,4%) n= 7, *T. cruzi* 2 (60,8%) n=14 e *T. cruzi* 1 & 2 (8,6%) n=2**

Dos 23 exemplares *Didelphis spp.*, que estavam infectados estavam distribuídos nos seguintes bairros: Patamares, Brotas, Cabula, Ondina e Pernambués. Os bairros que apresentaram maior número de *Didelphis spp.*, infectados por *T.cruzi* foram Cabula seguido pelo bairro de Ondina (gráfico 3).



**Gráfico 4: Distribuição das linhagens de T.cruzi em alguns bairros de Salvador. T. cruzi 1 (n= 7), T. cruzi 2 (n=14) e T. cruzi 1 & 2 (n=2)**

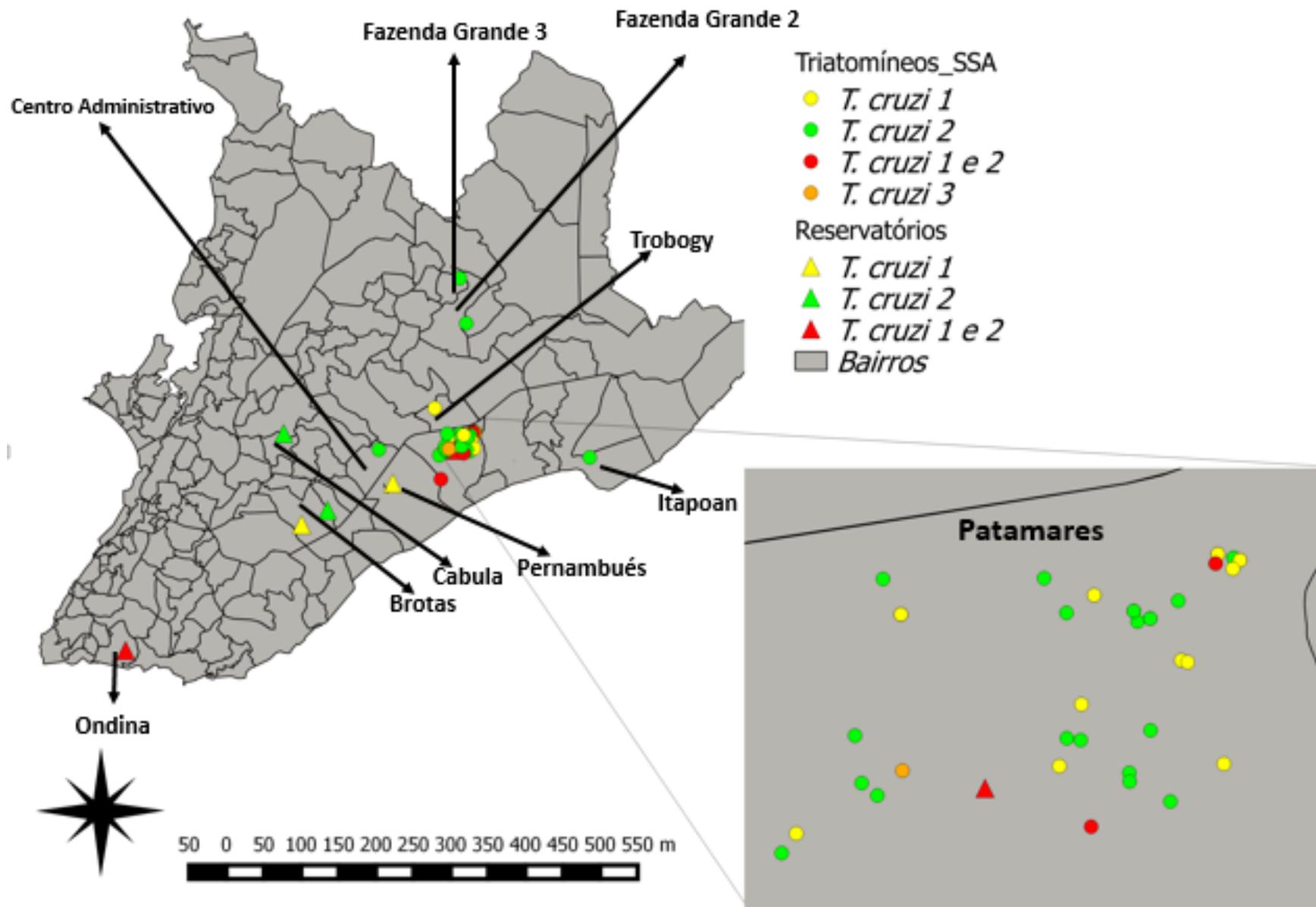


Figura 12: Distribuição geográfica das Linhagens de *T. cruzi* entre triatomíneos e marsupiais na cidade de Salvador

## 6 DISCUSSÃO

O presente trabalho traz uma nova abordagem entre as ferramentas de biologia molecular disponíveis para a caracterização de cepa de *T. cruzi*. Até então, nenhum trabalho científico foi publicado, utilizando o sistema de eletroforese capilar nesse tema.

Durante o processo de validação da tipagem do *T. cruzi* no sistema de eletroforese capilar, foi possível verificar que esta técnica pode trazer grande vantagem em relação ao método convencional em gel de agarose e acrilamida.

Dentre as principais vantagens observadas, pode-se destacar a sensibilidade da técnica devido grande eficiência de separação de cada nucleotídeo de DNA por vez, através dos capilares, demonstrando assim uma alta sensibilidade, como por exemplo aconteceu com algumas amostras. A grande dificuldade no sistema convencional a gel foi avaliar os fragmentos recortados na amplificação do PCR 1 em agarose ou acrilamida devido às pequenas diferenças de 81 e 82pb (Figura 10) dentre os fragmentos gerados, o que pode dificultar a caracterização em caso de cepa multiclonal.

Aparentemente essas amostras não amplificaram no gel de agarose (figura 11), mas foram detectadas na eletroforese capilar com pequena diferença de tamanho como de 81 e 82pb para diferenciar Tc1 e Tc2, permitindo aumentar a especificidade e sensibilidade do método.

Outro ponto importante foi a detecção de múltipla linhagem em um mesmo exemplar como aconteceu com os triatomíneos (*T. cruzi* I & II 5,4%) e marsupiais (*T. cruzi* I & II 8,6%) demonstrando a composição heterogênea das subpopulações de cepas (TIBAYRENC; AYALA, 1991; DEVERA *et al.*, 2003)

Outra vantagem em relação a outros métodos tradicionais é a rapidez na análise com um tempo médio de 3 horas para uma placa com 96 amostras.

Para realizar a técnica precisa de uma pequena quantidade de produto de PCR ( $\pm 3$  a  $5 \mu\text{L}$ ) para uma satisfatória interpretação dos resultados. Ao contrário do gel de eletroforese com agarose ou acrilamida que precisa de uma quantidade de em torno de 10 a  $15 \mu\text{L}$  para se alcançar o padrão de bandas visualmente desejado.

Como a técnica exige mão de obra especializada devido à complexidade de manipulação dos equipamentos e softwares relacionados à tipagem, pode-se considerar um fator limitante, apesar da rapidez no resultado e segurança nos dados obtidos.

Durante o período abrangido no presente trabalho os triatomíneos identificados em Salvador são da espécie *Triatoma tibiamaculata*. O trabalho de Ítalo Sherlock e *col* realizado em 1970 também na cidade de Salvador, foram identificados e examinados exemplares de triatomíneos da espécie, *P. megistus* e *T. rubrofasciata*, dos quais, 16% (96 triatomíneos), estavam infectados pelo *T. cruzi*.

Em relação ao triatomíneo da espécie *Triatoma tibiamaculata* que foram encontrados em 99,35% dos exemplares analisados, são relatados em trabalhos científicos em áreas de mata (SHERLOCK *et al.*, 1974). Esse triatomíneo tem como habitat natural os ninhos de marsupiais e roedores e vem sendo considerada como uma espécie em processo de domiciliação na cidade do Salvador (SHERLOCK *et al.*, 1974).

Os bairros onde foram coletados os triatomíneos, possuem remanescentes de mata e também estão em expansão urbana com bastante atividade imobiliária, podendo ser consideradas áreas de transição, extra e peridomicílio.

O *Triatoma tibiamaculata* já foi associado à transmissão oral do *T. cruzi* por alimentos infectados no Brasil e a ocorrência de exemplares infectados desta espécie no ambiente intradomiciliar na cidade de Salvador é fator de risco para a transmissão da doença de Chagas para a população local.

Em relação as linhagens; a linhagem *T. cruzi I* foi encontrado no presente estudo infectando 32,4% dos *Triatoma tibiamaculata* e 30,4 % dos marsupiais, sendo a segunda linhagem mais prevalente encontrada, podendo haver um favorecimento do ciclo de transmissão entre vetor e reservatório nestes locais.

Geralmente esse tipo de linhagem é mais comum em espécies de triatomíneos silvestres como do gênero *Rhodnius* que são os principais vetores da Amazônia Brasileira. Na Venezuela e Colômbia o *R. prolixus* é o principal vetor de *T. cruzi I* habitando os ambientes silvestre e domiciliar (DA SILVA VALENTE *et al.*, 1999; MARCILI *et al.*, 2009)

A literatura descreve que a linhagem de *T. cruzi I*, está associada ao ciclo de transmissão silvestre, sendo encontrada em países ao norte da Bacia Amazônica como Colômbia, México, Peru, Equador, Costa Rica e Venezuela, ligada diretamente as infecções humanas destes países (MILES *et al.*, 1981; BOSSENO *et al.*, 2002)

No Brasil mais precisamente no Nordeste brasileiro foi constatado um caso crônico de infecção oral por *T. cruzi I* em um indivíduo (TEIXEIRA *et al.*, 2006)

A linhagem de *T. cruzi II* foi a mais prevalentes entre o *Triatoma tibiamaculata* e marsupiais (59,4%) e (60,8%) respectivamente no presente trabalho, corroborando com os achados de (YEO *et al.*, 2005) que isolou essa linhagem de edentados e marsupiais terrestres na região da mata Atlântica. Em nossos achados o aparecimento de *T. cruzi II* foi predominante no ambiente silvestre.

Essa linhagem está associada ao ciclo de transmissão doméstica sendo raramente encontrada no ciclo selvagem, entretanto sua origem não está bem esclarecida (MILES *et al.*, 2009; ZINGALES *et al.*, 2012)

Provavelmente, *T. cruzi II* está relacionado ao ciclo de transmissão domiciliar, devido adaptação de algumas espécies de triatomíneos como o *T. infestans* e *P. megistus* ao domicílio sendo a linhagem predominantemente nos casos humanos da região Centro-Sul da América do Sul (FERNANDES *et al.*, 1999)

Animais silvestres podem ser o hospedeiro primário dessa linhagem como foi observado em estudos realizados na Mata Atlântica do Estado do Rio de Janeiro, onde foi isolada linhagem de *T. cruzi II* de triatomíneos e reservatórios silvestre e inoculados em primatas, havendo uma adaptação dessa linhagem nesses animais, supondo-se que esses hospedeiros podem ser primários dessa linhagem (FERNANDES *et al.*, 1999; LISBOA *et al.*, 2004; LISBOA *et al.*, 2006; LISBOA *et al.*, 2007)

Outros estudos realizados no Chaco paraguaio foram encontrados tatupeba (*Euphractus sexcinctus*) naturalmente infectado com *T. cruzi II* evidenciando que essa linhagem pode ser encontrada em outros mamíferos selvagem (PINHO *et al.*, 2000).

Possivelmente a circulação de *T. cruzi II* já existia no ambiente silvestre até antes mesmo da domiciliação dos triatomíneos, foi encontrada evidências de 200 espécies de mamíferos silvestres no continente Americano infectando com essa linhagem (BRENER, 1973).

Em relação as manifestações clínicas dessa linhagem, torna-se importante destacar que está intimamente relacionada à fase crônica da doença, responsável

pelo aparecimento da forma grave cardíaca e/ou digestiva (megaesôfago e megacólon) da DC (ANONYMOUS, 1999; LAGES-SILVA *et al.*, 2006).

A linhagem de *T. cruzi III* é considerada um híbrido de *T. cruzi I* e *T. cruzi II* (WESTENBERGER *et al.*, 2005). Apresenta ampla distribuição geográfica e tem como reservatórios animais terrestres como tatu, marsupiais e roedores (YEO *et al.*, 2005; CARDINAL *et al.*, 2008; MARCILI *et al.*, 2009);

Foi encontrada infectando humanos na Amazônia e no Sudeste brasileiro, entretanto é raramente isolada em indivíduos (GAUNT; MILES, 2000; MARCILI *et al.*, 2009)

No Estado do Mato Grosso do Sul, (UMEZAWA *et al.*, 2009) isolou essa linhagem em cães corroborando com os achados no Paraguai e Argentina. Como o *T. cruzi III* foi encontrado em cães, pode existir um risco transmissão da doença de Chagas a população devido à proximidade desses animais nos domicílios (BARNABE *et al.*, 2001; CARDINAL *et al.*, 2008).

Um ponto interessante em relação aos bairros, foi que em Brotas não houve registro de triatomíneos, entretanto, dentro os marsupiais analisados foram encontrados infectados por *T. cruzi*. Esse fato pode ser explicado devido aos marsupiais serem o reservatório natural do *T. cruzi* no ambiente silvestre, mantendo o ciclo enzoótico devido seus hábitos, como por exemplo: o habito de comer insetos, e por acidente, triatomíneos infectados (PINHO *et al.*, 2000). Um estudo mais detalhado sobre os marsupiais de Salvador poderia gerar evidencias mais sucintas e dados mais confiáveis.

Destacando a importância epidemiológica dessa linhagem, estudos em animais domésticos, como no caso dos cães, podem fornecer valores reais do risco

de transmissão da Doença de Chagas, visto que o presente trabalho foi realizado em animais silvestres.

Em relação as espécies de triatomíneos que foram identificadas infectadas pelo *T. cruzi III*, (MARTINS *et al.*, 2008) encontraram *P. geniculatus* e *T. rubrovaria* . Em Salvador, o *T. cruzi III* foi encontrado em apenas 1%, na espécie *Triatoma tibiamaculata*.

Os dados obtidos na tipagem molecular das cepas isoladas em Salvador demonstrou maior prevalência do *T. cruzi II* em seguida do *T. cruzi I* nos vetores e reservatórios avaliados. A presença de triatomíneos e marsupiais infectados, co-habitando e albergando diversas linhagens do *T. cruzi* em áreas de ocupação urbana é razão de alerta para os órgãos de vigilância em Saúde Pública locais, devido a sua importância epidemiológica.

## 7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O processo de tipagem das linhagens de *T. cruzi* pela eletroforese capilar dentro do sistema apresentado se mostrou útil, simplificando o processo de interpretação dos resultados.

A linhagem predominante na cidade de Salvador foi TcII tanto nos triatomíneos e marsupiais analisados no presente trabalho.

Devido à importância epidemiológica da Doença de Chagas, a técnica de biologia molecular utilizando como ferramenta a eletroforese capilar, podem ser utilizadas devido a sua sensibilidade, rapidez da análise para a tipagem das linhagens de *T. cruzi*, tendo como ponto de partida os exemplares de triatomíneos e os animais silvestres do presente trabalho, podendo ser utilizada para a identificação de linhagens de outros reservatórios.

## REFERÊNCIAS

- ABAD-FRANCH, F.; MONTEIRO, F. A.. Molecular research and the control of Chagas disease vectors. **An. Acad. Bras. Cienc.**, v. 77, n. 3, p. 437-454, 2005.
- ADAD, S. J. et al. Association of chagasic megacolon and cancer of the colon: case report and review of the literature. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 35, n. 1, p. 63-68, 2002.
- ANDRADE, S. G. Caracterização de cepas do *Trypanosoma cruzi* isoladas no Recôncavo Baiano (Contribuição ao estudo da patologia geral da doença de Chagas em nosso meio). **Rev. Patol. Trop.**, v. 3, p. 65-121, 1974.
- ANDRADE, S. G. M. Biodemes and zymodemes of *Trypanosoma cruzi* strains: correlations with clinical data and experimental pathology. **Rev. Soc. Brás. Med. Trop.**, v. 30, p. 27-35, 1997.
- ANONYMOUS. Recommendations from a satellite meeting. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 94, p. 429-432, 1999.
- BAHIA. Secretaria de Saúde do Estado da Bahia (SESAB). Superintendência de Vigilância em Saúde. **Informe da situação do controle da Doença de Chagas, com especial referência aos avanços logrados na interrupção da transmissão vetorial por *Triatoma infestans***. Salvador. 2006
- BARNABE, C. et al. *Trypanosoma cruzi*: a considerable phylogenetic divergence indicates that the agent of Chagas disease is indigenous to the native fauna of the United States. **Exp. Parasitol.**, v. 99, n. 2, p.73-79, 2001.
- BARRETT, T. et al. Epidemiological aspects of three *Trypanosoma cruzi* zymodemes in Bahia State, Brazil. **Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 74, n. 1, p. 84-90, 1980.
- BARRETTO, M. P. Epidemiologia. In: Z. BRENER, Z.; ANDRADE, Z. (Eds.). ***Trypanosoma cruzi e doença de Chagas***: Guanabara Koogan. 1979
- BASTOS, C. J. et al. Clinical outcomes of thirteen patients with acute chagas disease acquired through oral transmission from two urban outbreaks in northeastern Brazil. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 4, n. 6, p. e711, 2010.
- BOSSENO, M. F. et al. Predominance of *Trypanosoma cruzi* lineage I in Mexico. **J. Clin. Microbiol.**, v. 40, n. 2, p. 627-632, 2002.
- BOYCE, H. W. e M. R. BAKHEET. Sialorrhoea: a review of a vexing, often unrecognized sign of oropharyngeal and esophageal disease. **J. Clin. Gastroenterol.**, v. 39, n. 2, p. 89-97, 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. **Vigilância em saúde: panoramas, conjunturas, cartografias: gestão 2009-2010**. Brasília: Ministério da Saúde, 2010

BRENER, Z. Biology of *Trypanosoma cruzi*. **Annu Rev Microbiol**, v.27, p.347-82. 1973.

\_\_\_\_\_. [Symposium on new approaches in research on American trypanosomiasis]. **Bol Oficina Sanit Panam**, v.83, n.2, Aug, p.106-18. 1977.

BRENER, Z.; Z. ANDRADE & M. BARRAL-NETTO. **Trypanosoma cruzi e doença de Chagas, 2ª edição**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2000

BRISSE, S.; C. BARNABE & M. TIBAYRENC. Identification of six *Trypanosoma cruzi* phylogenetic lineages by random amplified polymorphic DNA and multilocus enzyme electrophoresis. **Int J Parasitol**, v.30, n.1, Jan, p.35-44. 2000a.

BRISSE, S.; J. C. DUJARDIN & M. TIBAYRENC. Identification of six *Trypanosoma cruzi* lineages by sequence-characterised amplified region markers. **Mol Biochem Parasitol**, v.111, n.1, Nov, p.95-105. 2000b.

CARCAVALLO, R. U. Climatic factors related to Chagas disease transmission. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.94 Suppl 1, p.367-9. 1999.

CARDINAL, M. V.; M. A. LAURICELLA; L. A. CEBALLOS; L. LANATI; P. L. MARCET; M. J. LEVIN; U. KITRON; R. E. GURTLER & A. G. SCHIJMAN. Molecular epidemiology of domestic and sylvatic *Trypanosoma cruzi* infection in rural northwestern Argentina. **Int J Parasitol**, v.38, n.13, Nov, p.1533-43. 2008.

CARLIER, Y.; DIAS JCP; LUQUETTI AO; HONTEBEYRIE M; TORRICO F & T. C. Trypanosomiase Américaine ou maladie de Chagas. **Enciclop Méd Chirurg** v.8, p.505-520. 2002.

CHAGAS, C. Nova tripanozomíaze humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiolojico de nova entidade morbida do homem. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.1, p.159-218. 1909.

\_\_\_\_\_. Descoberta do Tripanozoma Cruzi e verificação da Tripanozomíaze Americana: retrospecto historico. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.15, p.67-76. 1922.

CLARK, C. & O. PUNG. Host specificity of ribosomal DNA variants in sylvatic *Trypanosoma cruzi* from North America. **Mol Biochem Parasitol** v. 66, p.175-179. 1994.

CORTEZ, J.; E. RAMOS; C. VALENTE; J. SEIXAS & A. VIEIRA. A Expressão Global da Doença de Chagas--Oportunidades Emergentes e Impacto em Portugal. **Acta Médica Portuguesa**, v.25, n.5. 2012.

COURA, J.; J. DIAS & J. COURA. Síntese histórica e evolução dos conhecimentos sobre a doença de Chagas. 1997.

COURA, J. R. & J. C. DIAS. Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease: 100 years after its discovery. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.104 Suppl 1, Jul, p.31-40. 2009.

COUTINHO, M. & J. DIAS. A descoberta da doença de Chagas. **Cadernos de Ciência & Tecnologia**. 1999.

DA SILVA VALENTE, S. A.; V. DE COSTA VALENTE & H. F. NETO. Considerations on the epidemiology and transmission of Chagas disease in the Brazilian Amazon. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.94 Suppl 1, p.395-8. 1999.

DEVERA, R.; O. FERNANDES & J. R. COURA. 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**, v.98, n.1, Jan, p.1-12. 2003.

DIAS-LIMA, A. & I. SHERLOCK. Sylvatic vectors invading houses and the risk of emergence of cases of Chagas disease in Salvador, State of Bahia, Northeast Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.95, n.5, p.611-613. 2000.

DIAS, E. O gênero *Schizotrypanum* Chagas, 1909. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.34, p.193-227. 1939.

DIAS, J. Control of Chagas'disease in Brazil **ParasitologyToday**, v.3, p.336-341. 1987.

DIAS, J. Globalização, iniquidade e doença de Chagas. **Cadernos de Saúde Pública**, v.23. 2007.

DIAS, J. & J. COURA. **Clínica e terapêutica da doença de Chagas: uma abordagem prática para o clínico geral**: Editora FIOCRUZ. 1997

DIAS, J. & V. MACEDO. **Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2005. 557-593 p.

DIAS, J. C. P. & R. & BORGES-DIAS. Aspectos sociais, econômicos e culturais da doença de Chagas. **Ciência e Cultura**, v.31, p.105-118. 1979.

DIAS, J. C. P. & A. D. JATENE. Doença de Chagas no Brasil: situação atual e perspectivas : . **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.25, p.6-8. 1992.

DIAS, J. P.; C. BASTOS; E. ARAÚJO; A. V. MASCARENHAS; E. MARTINS NETTO, F. GRASSI; M. SILVA; E. TATTO; J. MENDONÇA; R. F. ARAÚJO; M. A. SHIKANAI-YASUDA & R. ARAS. Acute Chagas disease outbreak associated with oral transmission. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.41, p.296-300. 2008.

DIAS, J. P.; C. BASTOS; E. G. DE ARAUJO; A. V. MASCARENHAS; E. NETTO; F. GRASSI; M. SILVA; E. TATTO; J. MENDONCA; R. F. DE ARAUJO; M. T. OBARA; M. P. SILVA; C. FURUCHO & R. ARAS. [Outbreak of acute Chagas disease occurred in the state of Bahia, Brazil]. **Rev Soc Bras Med Trop**, v.39 Suppl 3, p.135-7. 2006.

DIOTAIUTI, L.; M. A. D. OLIVEIRA & J. P. D. SANTOS. **Triatomíneos**. Belo Horizonte: Ed. Fiocruz, v.1. 2008. 271 p.

FERNANDES, O.; R. H. MANGIA; C. V. LISBOA; A. P. PINHO; C. M. MOREL; B. ZINGALES; D. A. CAMPBELL & A. M. JANSEN. The complexity of the sylvatic cycle of *Trypanosoma cruzi* in Rio de Janeiro state (Brazil) revealed by the non-transcribed spacer of the mini-exon gene. **Parasitology**, v.118 ( Pt 2), Feb, p.161-6. 1999.

FORATTINI, O. Biogeografia, origem e distribuição da domiciliação de triatomíneos no Brasil. **Rev Saúde Pública** v.14, p.265 - 289. 1980.

FORATTINI, O. P. Biogeography, origin and distribution of Triatominae domicile dispersal in Brazil. **Rev Saude Publica**, v.14, n.3, Sep, p.265-99. 1980.

FREITAS, J.; AUGUSTO-PINTO L; PIMENTA JR; BASTOS-RODRIGUES L; GONÇALVES V.F.; TEIXEIRA S.M.; CHIARI E.; JUNQUEIRA A.C.; FERNANDES O.; MACEDO A.M.; MACHADO C.R. & P. S. . Ancestral genomes, sex and the population structure of *Trypanosoma cruzi*. . **PLoS Pathogens**, v.2, p.24. 2006.

GALVÃO, C. A.; SISTEMÁTICA DOS TRIATOMÍNEOS (HEMIPTERA, REDUVIIDAE), DE GEER AO DNA. **Entomol. Vect.** , v.10, p.511-530. 2003.

GAUNT, M. & M. MILES. The ecotopes and evolution of triatomine bugs (triatominae) and their associated trypanosomes. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.95, p.557-565. 2000.

HERRERA, C.;BARGUES M.D.; FAJARDO. A.; MONTILLA. M.; TRIANA. O.; VALLEJO G.A. & GUHL F. Identifying four *Trypanosoma cruzi* isolate haplotypes from different geographic regions in Colombia. **Infect Genet Evol**, v.7, p. 535-539. 2007.

IBGE. **Censo demográfico: resultados preliminares**. 2014.

J. JURBERG; ROCHA. D. S. & GALVÃO. C. *Rhodnius zeledoni* sp. nov. afm de *Rhodnius paraensis* Sherlock, Guitton & Miles, 1977 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). **Biota Neotrop**, vol. 9. 2009.

KAWASHITA, S. Y.; G. F. SANSON; O. FERNANDES; B. ZINGALES & M. R. BRIONES. Maximum-likelihood divergence date estimates based on rRNA gene sequences suggest two scenarios of *Trypanosoma cruzi* intraspecific evolution. **Mol Biol Evol**, v.18, n.12, Dec, p.250-9. 2001.

KLINGBEIL, M. & P. ENGLUND. Closing the gaps in kinetoplast DNA network replication. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.101, n.13, p.4333-4334. 2004.

KOPP R. L.; V. THOMAZ-SOCCOL D. D. R.; KLISIEWICZ N.; MEMBRIVE J. M. S.; BARATA J.; JURBERG M.; STEINDEL D. C. T.; KOPP E. A.; D. CASTRO & E. LUZ. Phenetic analysis of *Panstrongylus megistus* Burmeister, 1835 (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) in the State of Paraná-Brazil. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.52, p.349-357. 2009.

LAGES-SILVA, E.; L. E. RAMIREZ; A. L. PEDROSA; E. CREMA; L. M. DA CUNHA GALVAO; S. D. PENA; A. M. MACEDO & E. CHIARI. Variability of kinetoplast DNA gene signatures of *Trypanosoma cruzi* II strains from patients with different clinical forms of Chagas' disease in Brazil. **J Clin Microbiol**, v.44, n.6, Jun, p.2167-71. 2006.

LEIBY, D. A.; R. M. HERRON, JR.; E. J. READ; B. A. LENES & R. J. STUMPF. *Trypanosoma cruzi* in Los Angeles and Miami blood donors: impact of evolving donor demographics on seroprevalence and implications for transfusion transmission. **Transfusion**, v.42, n.5, May, p.549-55. 2002.

LENT, H. & P. W. WYGODZINSKY. Revision of the Triatominae (Hemiptera, Reduviidae), and their significance as vectors of Chagas' disease. Bulletin of the AMNH; v. 163, article 3. **New York: American Museum of Natural History**. 1979.

LEWINSOHN, R. Do caldo de cana ao suco de açaí (Parte I). **Jornal da Unicamp**, n. 2, p.283. 2005.

LISBOA, C. V.; R. H. MANGIA; E. RUBIAO; N. R. DE LIMA; S. C. DAS CHAGAS XAVIER; A. PICINATTI; L. F. FERREIRA; O. FERNANDES & A. M. JANSEN. *Trypanosoma cruzi* transmission in a captive primate unit, Rio de Janeiro, Brazil. **Acta Trop**, v.90, n.1, Mar, p.97-106. 2004.

LISBOA, C. V.; A. P. PINHO; R. V. MONTEIRO & A. M. JANSEN. *Trypanosoma cruzi* (kinetoplastida Trypanosomatidae): biological heterogeneity in the isolates derived from wild hosts. **Exp Parasitol**, v.116, n.2, Jun, p.150-5. 2007.

LISBOA, M. P.; D. BONATTO; D. BIZANI; J. A. HENRIQUES & A. BRANDELLI. Characterization of a bacteriocin-like substance produced by *Bacillus amyloliquefaciens* isolated from the Brazilian Atlantic forest. **Int Microbiol**, v.9, n.2, Jun, p.111-8. 2006.

LIU, Y. & P. ENGLUND. The rotational dynamics of kinetoplast DNA replication. **Molecular microbiology**, v.64, n.3, p.676-690. 2007.

LUCENA, D. T. Epidemiologia da Doença de Chagas em Pernambuco. II nota sobre as espécies de triatomíneos. **Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais**, v.4, p.355-368. 1958.

MACEDO, V. O. **Forma indeterminada da doença de Chagas. In: Dias JCP, Coura JR (eds). Clínica e terapêutica da doença de Chagas.** Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ 1997. 135-151 p.

MARCILI, A.; V. C. VALENTE; S. A. VALENTE; A. C. JUNQUEIRA; F. M. DA SILVA; A. Y. PINTO; R. D. NAIFF; M. CAMPANER; J. R. COURA; E. P. CAMARGO; M. A. MILES & M. M. TEIXEIRA. *Trypanosoma cruzi* in Brazilian Amazonia: Lineages TCI and TCIIa in wild primates, *Rhodnius* spp. and in humans with Chagas disease associated with oral transmission. **Int J Parasitol**, v.39, n.5, Apr, p.615-23. 2009.

MARTINS, L. P.; A. MARCILI; R. E. CASTANHO; A. L. THEREZO; J. C. DE OLIVEIRA; R. B. SUZUKI, M. M. TEIXEIRA; J. A. DA ROSA & M. A. SPERANCA. Rural *Triatoma rubrovaria* from southern Brazil harbors *Trypanosoma cruzi* of lineage IIc. **Am J Trop Med Hyg**, v.79, n.3, Sep, p.427-34. 2008.

MENEGHELLI, U. G.; F. M. PERIA; F. M. DAREZZO; F. H. ALMEIDA; C. M. RODRIGUES; L. R. APRILE & R. O. DANTAS. Clinical, radiographic, and manometric evolution of esophageal involvement by Chagas' disease. **Dysphagia**, v.20, n.1, Winter, p.40-5. 2005.

MILES, M. A.; A. A. DE SOUZA & M. POVOA. Chagas' disease in the Amazon basin III. Ecotopes of ten triatomine bug species (Hemiptera: Reduviidae) from the vicinity of Belem, Para State, Brazil. **J Med Entomol**, v.18, n.4, Jul, p.266-78. 1981.

MILES, M. A.; M. S. LLEWELLYN; M. D. LEWIS; M. YEO; R. BALEELA, S. FITZPATRICK; M. W. GAUNT & I. L. MAURICIO. The molecular epidemiology and phylogeography of *Trypanosoma cruzi* and parallel research on *Leishmania*: looking back and to the future. **Parasitology**, v.136, n.12, Oct, p.1509-28. 2009.

MILES, M. A.; A. SOUZA; M. POVOA; J. J. SHAW; R. LAINSON & P. J. TOYE. Isozymic heterogeneity of *Trypanosoma cruzi* in the first autochthonous patients with Chagas' disease in Amazonian Brazil. **Nature**, v.272, n.5656, Apr 27, p.819-21. 1978.

MILES, M. A.; P. J. TOYE; S. C. OSWALD & D. G. GODFREY. 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**, v.71, n.3, p.217-25. 1977.

MOREL, C.; E. CHIARI; E. P. CAMARGO; D. M. MATTEI; A. J. ROMANHA & L. SIMPSON. Strains and clones of *Trypanosoma cruzi* can be characterized by pattern of restriction endonuclease products of kinetoplast DNA minicircles. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.77, n.11, Nov, p.6810-4. 1980.

OPAS. **Guia para vigilância, prevenção, controle e manejo clínico da doença de Chagas aguda transmitida por alimentos** Rio de Janeiro: PANAFTOSA-VP/OPAS/OMS. 2009

PÉREZ-AYALA, A.; J. PÉREZ-MOLINA; F. NORMAN; M. NAVARRO; B. MONGE-MAILLO; M. DÍAZ-MENÉNDEZ; J. PERIS-GARCÍA; M. FLORES; C. CAÑAVATE &

R. LÓPEZ-VÉLEZ. Chagas disease in Latin American migrants: a Spanish challenge. **Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v.17, n.7, p.1108-1113. 2011.

PINHO, A. P.; E. CUPOLILLO; R. H. MANGIA; O. FERNANDES & A. M. JANSEN. *Trypanosoma cruzi* in the sylvatic environment: distinct transmission cycles involving two sympatric marsupials. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v.94, n.5, Sep-Oct, p.509-14. 2000.

RASSI, A. & A. LUQUETTI. **Therapy of chagas disease. In: Wendel S, Brener Z, Camargo ME, Rassi A. Chagas disease -American Trypanosomiasis: its impact on transfusion and Clinical Medicine** São Paulo: Sociedade Brasileira de Hematologia e Hemoterapia. 1992

RIBEIRO, G. Alterações ambientais e risco de re-emergência da doença de chagas na cidade do Salvador-BA: Uma abordagem da ecologia vetorial e epidemiológica. 2012.

SCHENONE, H.; J. IGLESIAS; S. SCHENONE & M. C. CONTRERAS. [Congenital Chagas' infection of 2d generation]. **Bol Chil Parasitol**, v.42, n.3-4, Jul-Dec, p.71-3. 1987.

SCHMUNIS, G. A. & J. C. DIAS. Health care reform, decentralization, prevention and control of vector-borne diseases. **Cad Saude Publica**, v.16 Suppl 2, p.117-23. 2000.

SCHOFIELD, C. J. & J. C. P. DIAS. A cost-benefit analysis of chagas disease control. **Mem. Inst. Oswaldo**, v.86, p.285-295. 1991.

SHERLOCK, A. Í. & E. M. SERAFIM. Fauna triatomenae do estado da Bahia, Brasil: VI - prevalência geográfica da infecção dos tratomíneos por *T. cruzi*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.8. 1974.

SHERLOCK, Í. A.; E. M. SERAFIM & N. GUITTON. Fauna triatominae do Estado da Bahia, Brasil II - o gênero *Rhodnius*, com estudos sobre a genitália (Hemiptera, reduviidae, Triatominae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.72, p.81-89. 1974.

SILVEIRA, A. C. Group discussion: epidemiological and social determinants of Chagas disease and its control in the Amazon countries. **Mem. Inst. Oswaldo**, v.102, p.71-74. 2007.

SILVEIRA, A. C. & D. REZENDE. Epidemiologia e controle da transmissão vetorial da doença de Chagas no Brasil. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 27 p.11-22. 1994.

SOUTO, R. P.; O. FERNANDES; A. M. MACEDO; D. A. CAMPBELL & B. ZINGALES. DNA markers define two major phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi*. **Mol Biochem Parasitol**, v.83, n.2, Dec 20, p.141-52. 1996.

TEIXEIRA, A. R.; N. NITZ, M. C. GUIMARO; C. GOMES & C. A. SANTOS-BUCH. Chagas disease. **Postgrad Med J**, v.82, n.974, Dec, p.788-98. 2006.

TIBAYRENC, M. Integrated genetic epidemiology of infectious diseases: the Chagas model. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.93, n.5, Sep-Oct, p.577-80. 1998.

TIBAYRENC, M. & F. J. AYALA. Towards a population genetics of microorganisms: The clonal theory of parasitic protozoa. **Parasitol Today**, v.7, n.9, Sep, p.228-32. 1991.

TIBAYRENC, M.; A. HOFFMANN, O. POCH; L. ECHALAR; F. LE PONT; J. L. LEMESRE; P. DESJEUX & F. J. AYALA. Additional data on *Trypanosoma cruzi* isozymic strains encountered in Bolivian domestic transmission cycles. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v.80, n.3, p.442-7. 1986.

TYLER, K. & D. ENGMAN. The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. **International journal for parasitology**, v.31, n.5-6, p.472-481. 2001.

UMEZAWA, E. S.; A. I. SOUZA; V. PINEDO-CANCINO; M. MARCONDES; A. MARCILI; L. M. CAMARGO; A. A. CAMACHO; A. M. STOLF & M. M. TEIXEIRA. TESA-blot for the diagnosis of Chagas disease in dogs from co-endemic regions for *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma evansi* and *Leishmania chagasi*. **Acta Trop**, v.111, n.1, Jul, p.15-20. 2009.

VINHAES, M. C. & J. C. P. DIAS. Doença de Chagas no Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v.16. 2000.

W.H.O. Control and prevention of chagas disease in Europe: report of a WHO informal consultation (jointly organized by WHO headquarters and the WHO Regional Office for Europe), Geneva, Switzerland 17-18 December 2009. **World Health Organization**. 2010.

WESTENBERGER, S. J.; C. BARNABE; D. A. CAMPBELL & N. R. STURM. Two hybridization events define the population structure of *Trypanosoma cruzi*. **Genetics**, v.171, n.2, Oct, p.527-43. 2005.

YEO, M., N. ACOSTA; M. LLEWELLYN; H. SANCHEZ; S. ADAMSON; G. A. MILES; E. LOPEZ; N. GONZALEZ; J. S. PATTERSON; M. W. GAUNT; A. R. DE ARIAS & M. A. MILES. 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**, v.35, n.2, Feb, p.225-33. 2005.

ZHANG, Q., M. TIBAYRENC & F. J. AYALA. Linkage disequilibrium in natural populations of *Trypanosoma cruzi* (flagellate), the agent of Chagas' disease. **J Protozool**, v.35, n.1, Feb, p.81-5. 1988.

ZINGALES, B.; S. ANDRADE; M. BRIONES; D. CAMPBELL; E. CHIARI; O. FERNANDES; F. GUHL, E. LAGES-SILVA; A. MACEDO; C. MACHADO; M. MILES; A. ROMANHA; N. STURM; M. TIBAYRENC; A. SCHIJMAN & M. SECOND SATELLITE. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature:

second revision meeting recommends TcI to TcVI. **Mem. Inst. Oswaldo**, v.104, n.7, p.1051-1054. 2009.

ZINGALES, B.; M. A. MILES; D. A. CAMPBELL; M. TIBAYRENC, A. M. MACEDO; M. M. TEIXEIRA; A. G. SCHIJMAN; M. S. LLEWELLYN; E. LAGES-SILVA; C. R. MACHADO; S. G. ANDRADE & N. R. STURM. The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: rationale, epidemiological relevance and research applications. **Infect Genet Evol**, v.12, n.2, Mar, p.240-53. 2012.