

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DOENÇAS INFECCIOSAS**

**MARIA AUGUSTA DARIO**

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE ISOLADOS DE *Trypanosoma cruzi*  
PROVENIENTES DE TRIATOMÍNEOS SILVESTRES COLETADOS NO ESTADO  
DO ESPÍRITO SANTO, BRASIL**

VITÓRIA  
2013

MARIA AUGUSTA DARIO

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE ISOLADOS DE *Trypanosoma cruzi*  
PROVENIENTES DE TRIATOMÍNEOS SILVESTRES COLETADOS NO ESTADO  
DO ESPÍRITO SANTO, BRASIL**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Doenças Infecciosas, do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Doenças Infecciosas.

Orientador: Prof. Dr. Aloísio Falqueto.

Coorientadora: Profa. Dra. Blima Fux.

**VITÓRIA**

**2013**

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)  
(Biblioteca Central da Universidade Federal do Espírito Santo, ES, Brasil)

---

Dario, Maria Augusta, 1986-

D218c      Caracterização molecular de isolados de *Trypanosoma cruzi*  
provenientes de triatomíneos silvestres coletados no estado do  
Espírito Santo, Brasil / Maria Augusta Dario. – 2013.

77 f. : il.

Orientador: Aloísio Falqueto.

Coorientador: Blima Fux.

Dissertação (Mestrado em Doenças Infecciosas) –  
Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da  
Saúde.

1. Tripanossoma cruzi. 2. Epidemiologia molecular. 3.  
Barbeiro (Triatomíneo). 4. Mata Atlântica. 5. Espírito Santo  
(Estado). I. Falqueto, Aloísio. II. Fux, Blima. III. Universidade  
Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências da Saúde. IV.  
Título.

CDU: 61

---



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DOENÇAS INFECCIOSAS

PARECER ÚNICO DA COMISSÃO JULGADORA DE  
DISSERTAÇÃO DE Mestrado

A mestranda MARIA AUGUSTA DARIO apresentou a dissertação intitulada “CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE ISOLADOS DE *Trypanosoma cruzi* PROVENIENTES DE TRIATOMÍNEOS SILVESTRES COLETADOS NO ESTADO DO ESPÍRITO SANTO” em sessão pública, no dia 06 de junho de 2013, como requisito final para obtenção do título de **Mestre em Doenças Infecciosas**, do Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo.

Considerando a apresentação oral dos resultados, a qualidade e relevância dos mesmos, a Comissão Examinadora decidiu (X) **aprovar** ( ) **reprovar** a dissertação para habilitar a farmacêutica MARIA AUGUSTA DARIO a obter o Grau de MESTRE EM DOENÇAS INFECCIOSAS.

Vitória, ES, 06 de junho de 2013

Prof.ª. Dra. Silvana Maria Fonseca Murta  
(Membro Externo)

Prof. Dr. Crispim Cerutti Junior  
(Membro Interno)

Prof. Dr. Aloísio Falquet  
(Orientador)

Prof.ª. Dra. Blima Fux  
(Coorientadora)

Aos meus pais, Lourdes e Cesar, pelo apoio, amor, incentivo. Não só neste, mas em todos os momentos da minha vida. Serei grata por tudo eternamente.

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Aloísio Falqueto, meu orientador, por ter me aceitado como sua aluna, por ter confiado a mim a execução desse projeto, pelos ensinamentos, incentivo e paciência. Obrigada pela oportunidade!

À Prof. Dra. Blima Fux, minha coorientadora, por ter me ajudado nos momentos de dúvidas, por ter me aconselhado em vários momentos de desespero, incentivando-me sempre a buscar o melhor.

Ao Dr. Adelton Alves Brandão, por ter aceitado participar desse projeto, por disponibilizar seu laboratório para realização dos experimentos de biologia molecular e por me ajudar nos momentos de dificuldade.

Ao Claudiney Biral dos Santos, funcionário do Ministério da Saúde, que muitas vezes me ajudou na execução desse projeto e momentos de dificuldades, sempre conversando comigo, dando dicas e contando piadas.

A todos os funcionários do Núcleo de Entomologia e Malacologia do estado do Espírito Santo (NEMES), por terem autorizado a utilização dos triatomíneos nesse estudo e por confiarem a mim o exame dos mesmos.

À Tassiane Servane, aluna de iniciação científica do laboratório de parasitologia, por ter me ajudado na execução desse projeto, principalmente nos momentos em que me ausentava do laboratório; espero que tenha aprendido muita coisa nesses quase dois anos.

Aos professores, funcionários e alunos do Laboratório de Parasitologia da Universidade Federal do Espírito Santo, pela companhia, conversas, momentos de alegria e de algumas discussões. Mas com certeza, só tem gente fera no que faz. Orgulho-me de cada um de vocês. Em especial, meu muito obrigado a Cynara, Julyana, Steven, Elisa, Adelson e Thaynnara.

Aos funcionários e alunos do Laboratório interdisciplinar em pesquisas médicas, Lipmed, do IOC-Fiocruz/RJ, por terem me recebido e me ajudado na execução da parte de biologia molecular do projeto de pesquisa. Em especial ao aluno de doutorado Franklyn Samudio, que me auxiliou na execução, e à aluna de doutorado Myllena Melo, por ter-me disponibilizado as cepas de referências utilizadas no estudo.

Ao Instituto de Defesa Agropecuária e Florestal do Espírito Santo (IDAF) e ao Biotério do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo (CCS/Ufes), por terem disponibilizado os camundongos utilizados nesse estudo.

À minha turma de mestrado em Doenças Infecciosas. Sem vocês isso não teria sido tão especial. Tive muita sorte de encontrar uma turma animada, que mesmo nos momentos difíceis tudo era encarado com bom humor.

À Prof. Dra. Cinthia Furst Leroy Gomes Buoleroni por ter me dado a oportunidade de estagiar no laboratório de parasitologia da Ufes, assim abrindo as portas para meu início na carreira acadêmica.

À Prof. Dra. Elenice Moreira Lemos e aos estudantes do Laboratório de Leishmaniose, do Núcleo de Doenças Infecciosas, pela ajuda quando precisava de algum material.

Ao Programa de Pós-graduação em Doenças Infecciosas por ter me aceitado como aluna e aos professores pelos ensinamentos adquiridos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoas de Nível Superior (Capes), pela bolsa de mestrado por esses dois anos e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Espírito Santo (Fapes), pela bolsa de estágio técnico-científico, que possibilitou minha ida ao Rio de Janeiro para execução dos experimentos de biologia molecular.

À minha família e amigos, pelo apoio e incentivo; compreensão pela ausência e por sempre estarem ao meu lado em todos os momentos.

O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.

***Jose de Alencar***



## RESUMO

Estudos moleculares têm sido utilizados para caracterização de diferentes isolados de *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico da doença de Chagas, que apresenta populações complexas. No estado do Espírito Santo, Brasil, foram isoladas amostras de *T. cruzi*, provenientes de triatomíneos silvestres, no período de junho de 2010 a maio de 2012, e o DNA de 89 amostras foi extraído. Foi realizada a amplificação da região intergênica do gene de calmodulina e para o gene TcSC5D. As amostras foram sequenciadas e analisadas pelo software Mega 5.05. Setenta e oito amostras foram amplificadas para a região intergênica do gene de calmodulina, sendo que destas, 66 amostras foram sequenciadas, identificando as linhagens TcII (19,7%), TcII-like (63,6%), TcIII (9,1%) e TcIV (7,6%). Sessenta e duas amostras foram amplificadas e sequenciadas para o gene TcSC5D, identificando linhagens TcI (1,6%), TcII (82,2%), TcIII (8,1%) e TcIV (8,1%). Neste estudo, foi possível observar que a população de *T. cruzi* que circula nas espécies de triatomíneos do ES é heterogênea, predominando a linhagem TcII e em menor proporção TcI, TcIII e TcIV. Sabe-se pouco sobre os animais reservatórios silvestres, onde essas populações circulam na mata Atlântica, dificultando a correlação destas nesse ambiente. A caracterização molecular permitiu identificar linhagens do protozoário procedentes da floresta, porém capazes de se adaptar a ciclos de transmissão domiciliar da doença de Chagas.

**Palavras-chave:** *Trypanosoma cruzi*, epidemiologia molecular, Triatominae, mata Atlântica, Espírito Santo-Brasil.

## ABSTRACT

Molecular studies have been used for characterization of the different *Trypanosoma cruzi* isolates, the etiologic agent of Chagas disease, which comprises a complex population. In Espírito Santo state, Brazil, *T. cruzi* isolates were obtained from sylvatic triatomines, from June 2010 to May 2012 and DNA was extracted from 89 samples. The amplifications of the intergenic region of the calmodulin gene and TcSC5D gene were performed. The samples were sequenced and analyzed by Mega 5.05 software. Seventy eight samples were amplified by the intergenic region of the calmodulin gene, however, 66 samples were sequenced, identifying TcII (19,7%), TcII-like (63,6%), TcIII (9,1%) and TcIV (7,6%) lineages. Sixty two samples were amplified and sequenced by the TcSC5D gene, identifying TcI (1,6%), TcII (82,2%), TcIII (8,1%) and TcIV (8,1%) lineages. In this study, was observed that the *T. cruzi* population circulating in triatomines species from ES is heterogeneous, predominating TcII and to a lesser extent TcI, TcIII and TcIV. It is not known, at the present, about the wild animals that act as reservoirs, where these populations circulate in the Atlantic rainforest, making difficult the correlation of these in this environment. Molecular characterization identified protozoan populations from the rainforest, but able to adapt to domiciliary transmission of Chagas disease.

**Keywords:** *Trypanosoma cruzi*, molecular epidemiology, Triatominae, Atlantic rainforest, Espírito Santo-Brazil.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Formas evolutivas de *Trypanosoma cruzi*: A: forma epimastigota; B: forma tripomastigota; C: forma amastigota. A seta indica a localização do flagelo. É possível observar a presença do cinetoplasto (kDNA). Fonte: REY, 2008.....18
- Figura 2 - Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi* em humanos e triatomíneos. Fonte: adaptado de [www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/TrypanosomiasisAmerican.htm](http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/TrypanosomiasisAmerican.htm).....19
- Figura 3 - Distribuição do *Trypanosoma cruzi* no Mundo. Fonte: WHO, 2009. ....20
- Figura 4 - Ocorrência de triatomíneos no estado do Espírito Santo. Fonte: LEITE *et al.*, 2011.....27
- Figura 5 - Eletroforese em gel de agarose a 1,0% dos produtos amplificados na região intergênica do gene de calmodulina: M – marcador de peso molecular de 100pb; I a VI – controles positivos; 16 a 122: amostras de DNA de *Trypanosoma cruzi* isoladas no estudo; N – controle negativo. Observa-se a amplificação de um fragmento de 860pb. ....44
- Figura 6 - Eletroforese em gel de agarose a 1,2% dos produtos amplificados para o gene TcSC5D: M - marcador de peso molecular de 100pb; I - controle positivo; N - controle negativo; 10 a 66 - amostras de DNA de *Trypanosoma cruzi*. O produto amplificado apresenta um fragmento de aproximadamente 832pb.....45
- Figura 7 - Distribuição das linhagens de *Trypanosoma cruzi* nos municípios do estado do Espírito Santo. ....51
- Gráfico 1 - Distribuição no Espírito Santo, das linhagens de *Trypanosoma cruzi*, classificadas a partir da análise molecular da região intergênica do gene de calmodulina. ....47
- Gráfico 2 - Distribuição no Espírito Santo, das linhagens de *Trypanosoma cruzi*, classificadas a partir da análise molecular do gene TcSC5D.....47

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Nova divisão da nomenclatura de <i>Trypanosoma cruzi</i> e sua equivalência com as divisões anteriores. Fonte: Zingales <i>et al.</i> , 2009.....	25
Tabela 2 - Mutações encontradas nas cepas de referências 3663 e 4167 pela análise da região intergênica do gene de calmodulina, para identificação das linhagens TcIII e TcIV.....	46
Tabela 3 - Classificação das linhagens de <i>Trypanosoma cruzi</i> pela região intergênica do gene de calmodulina e pelo gene TcSC5D. Distribuição por município do Espírito Santo e espécies de triatomíneos, das quais as amostras foram isoladas. ....	48

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3'UTR: região não traduzida três linha

5'UTR: região não traduzida cinco linha

12 SF: cepa 12 São Felipe

BHI: meio Brain Heart infusion

CaCl<sub>2</sub>: cloreto de cálcio

Cal: calmodulina

CEUA: comitê de ética animal

DMSO: dimetilsulfóxido

DNA: ácido desoxirribonucléico

dNTPs: desoxirribonucleotídeos fosfatados

DO: densidade óptica

DTUs: Unidades discretas de tipagem

ES: Espírito Santo

Fiocruz: Fundação Oswaldo Cruz

IgG: imunoglobulina G

KCl: cloreto de potássio

kDNA: DNA localizado no cinetoplasto

LB: meio Luria-Bertani

Km<sup>2</sup>: quilômetros quadrados

MgCl<sub>2</sub>: cloreto de magnésio

MLEE: do inglês, *multilocus enzyme electrophoresis*

Nemes: Núcleo de Entomologia e Malacologia da Secretaria Estadual de Saúde do Espírito Santo

NNN: meio Mac Neal, Novy e Nicole

pb: pares de base

PBS: solução fosfato-salino tamponado

PCR: reação em cadeia da polimerase

pH: potencial hidrogeniônico

RAPD: do inglês, *Randomly amplified polymorphic DNA*

RFLP: polimorfismo de tamanho de fragmento de restrição

RPM: rotações por minuto

RNA: ácido ribonucléico

TcSC5D: c-5 desaturase putativa do esterol de *Trypanosoma cruzi*

UFES: Universidade Federal do Espírito Santo

UTRs: regiões não traduzidas

UV: ultravioleta

X-gal: 5-bromo-4cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactopiranosídeo

Z: zimodema

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	18
1.1 <i>Trypanosoma cruzi</i> e a doença de Chagas.....	18
1.2 Diversidade genética e classificação das linhagens de <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	23
1.3 Marcadores moleculares utilizados na identificação dos isolados de <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	25
1.3.1 Região intergênica do gene de calmodulina .....	26
1.3.2 Gene TcSC5D.....	26
1.4 A doença de Chagas no Espírito Santo .....	26
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	31
2.1 Objetivo Geral .....	31
2.2 Objetivos Específicos.....	31
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	33
3.1 Área de estudo.....	33
3.2 Captura dos triatomíneos.....	33
3.3 Identificação, exame dos triatomíneos e inoculação em camundongo .....	33
3.4 Cultivo do parasito e congelamento do material .....	34
3.5 Extração do DNA: formas epimastigotas dos isolados de <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	34
3.6 Amplificação da região intergênica do gene de calmodulina pela PCR .....	35
3.6.1 Amplificação do fragmento menor .....	35
3.6.2 Obtenção do fragmento menor .....	36
3.7 Clonagem dos produtos amplificados das cepas de referência para região intergênica do gene de calmodulina.....	37
3.7.1 Preparação das células competentes.....	37

3.7.2 Clonagem .....	37
3.8 PCR colônia .....	38
3.9 Amplificação do gene TcSC5D pela PCR .....	39
3.10 Purificação do DNA e produtos amplificados pela PCR.....	39
3.10.1 Precipitação com acetato de sódio 3 molar (M) .....	39
3.10.2 Purificação com <i>kit</i> NucleoSpin® Extract II purification.....	40
3.11 Sequenciamento .....	40
3.12 Análise do resultado do sequenciamento.....	41
3.13 Comitê de ética .....	41
<b>4. RESULTADOS</b> .....	<b>43</b>
4.1 Taxa de captura e infecção natural dos triatomíneos.....	43
4.2 Parasitemia em camundongos e taxa de positividade em cultura.....	43
4.3 Amplificação da região intergênica do gene de calmodulina.....	43
4.4 Amplificação do gene TcSC5D .....	44
4.5 Análise do sequenciamento para a definição das linhagens de <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	45
4.5.1 Região intergênica do gene de calmodulina .....	45
4.5.1.1 Cepas de referência.....	45
4.5.2 Análise das amostras sequenciadas para região intergênica do gene de calmodulina e gene TcSC5D .....	46
<b>5. DISCUSSÃO</b> .....	<b>53</b>
5.1 Ocorrência e taxa de infecção das espécies de triatomíneos no Espírito Santo .....	53



5.2 Análise da região intergênica do gene de calmodulina em cepas de referências .....	54
5.3 Linagens de <i>Trypanosoma cruzi</i> identificadas no Espírito Santo.....	55
<b>6. CONCLUSÕES .....</b>	<b>60</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>61</b>
<b>ANEXOS. ....</b>	<b>76</b>

# INTRODUÇÃO

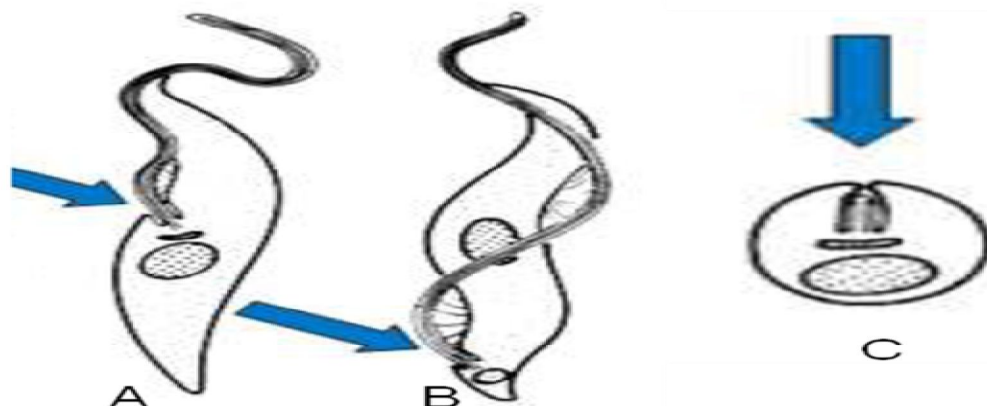
## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 *Trypanosoma cruzi* e a doença de Chagas

*Trypanosoma cruzi* Chagas, 1909 - agente etiológico da doença de Chagas - é um protozoário hemoflagelado pertencente à ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae. Apresenta uma mitocôndria única, que contém o cinetoplasto (kDNA), um DNA extracelular que corresponde ao genoma mitocondrial do parasito, localizado perto do flagelo (Figura 1). É transmitido por insetos, triatomíneos hematófagos, que pertencem à família Reduviidae, tendo como principais gêneros: *Panstrongylus*, *Rhodnius* e *Triatoma* (NEVES *et al.*, 2005).

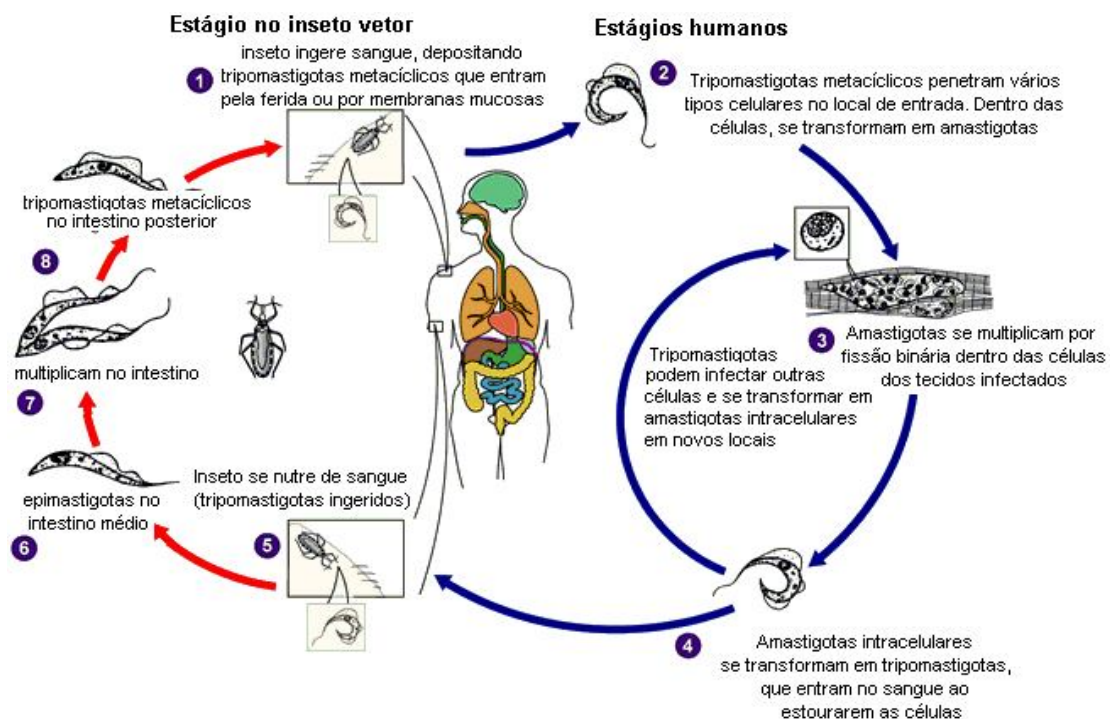
*T. cruzi* apresenta três formas evolutivas: epimastigota, tripomastigota e amastigota. Essas formas são classificadas de acordo com sua morfologia, da forma como o flagelo emerge do corpo do parasito e da localização do núcleo em relação ao cinetoplasto (BRENER, 1979). A forma epimastigota (Figura 1A) apresenta aspecto alongado, com cinetoplasto justanuclear e anterior ao núcleo, com o flagelo livre na porção anterior. Já as formas tripomastigotas (Figura 1B) são mais alongadas que a epimastigotas, o cinetoplasto é posterior ao núcleo e o flagelo se estende por todo o parasito, tornando-se livre na porção anterior. A forma amastigota (Figura 1C) é arredondada ou ovalada, com flagelo curto que não se exterioriza, com cinetoplasto localizado anterior ao núcleo (REY, 2001; NEVES *et al.*, 2005).

**Figura 1** - Formas evolutivas de *Trypanosoma cruzi*: A: forma epimastigota; B: forma tripomastigota; C: forma amastigota. A seta indica a localização do flagelo. É possível observar a presença do cinetoplasto (kDNA). Fonte: REY, 2008.



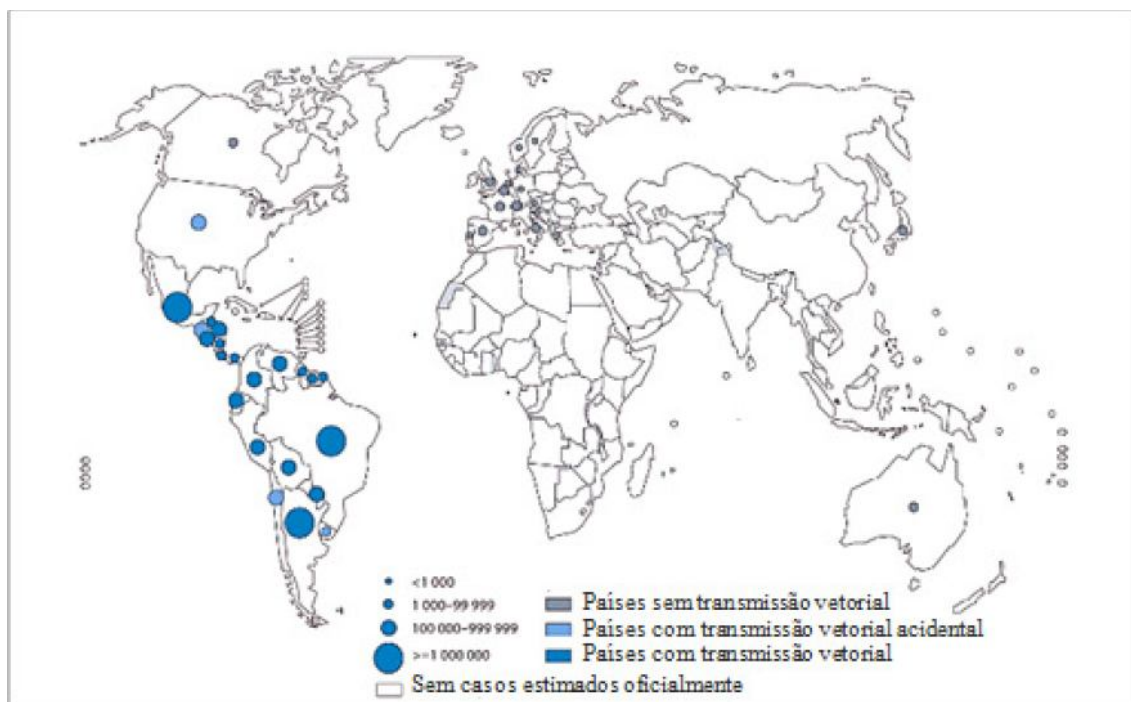
O ciclo de vida do *T. cruzi* é complexo, com várias formas de desenvolvimento no inseto vetor e em mamíferos. No vetor, o ciclo se inicia quando o mesmo se alimenta de sangue contaminado com formas tripomastigotas presentes em mamíferos infectados. Essas formas ingeridas sofrem diferenciação no estômago do triatomíneo, transformando-se em epimastigotas, que por sua vez, migram para o intestino médio, aonde irão se multiplicar por fissão binária. Com uma intensa replicação, as formas epimastigotas aderem ao epitélio do intestino posterior, onde sofrem diferenciação em formas tripomastigotas metacíclicas. As formas epimastigotas e as tripomastigotas metacíclicas são eliminadas juntamente com as fezes, durante um novo repasto sanguíneo, quando, em contato com um ferimento ou mucosa, levam à infecção do hospedeiro. As formas metacíclicas penetram nas células hospedeiras dos mamíferos, onde formam um vacúolo parasitário, podendo se diferenciar em formas amastigotas e proliferam no citoplasma celular. Com um aumento da população de amastigotas, estes se diferenciam em tripomastigotas sanguíneos, que são liberados no sangue devido ao rompimento celular, podendo invadir outras células ou serem ingeridos por outro triatomíneo (BRENER, 1979; DE SOUZA, 1984; TYLER & ENGMAN, 2001).

**Figura 2** - Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi* em humanos e triatomíneos. Fonte: adaptado de [www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/TrypanosomiasisAmerican.htm](http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/TrypanosomiasisAmerican.htm)



Atualmente, a doença de Chagas atinge pelo menos 10 milhões de pessoas na América Latina, onde se estima a morte de 13.000 pessoas por ano (WHO, 2010). *T. cruzi* está distribuído em mamíferos e vetores desde o sul dos Estados Unidos da América até os países do cone sul da América do Sul (Figura 3). Em humanos, a doença de Chagas é caracterizada por diversas manifestações clínicas, podendo ser uma infecção assintomática ou causar danos severos ao coração e trato digestivo (FERNANDES *et al.*, 1999; BRISSE *et al.*, 2001).

**Figura 3** - Distribuição do *Trypanosoma cruzi* no Mundo. Fonte: WHO, 2009.



A doença apresenta uma fase inicial ou aguda, com parasitemia evidente, que pode ser vista no exame direto do sangue a fresco do paciente. Na maioria das vezes, os pacientes na fase aguda não apresentam sintomas, porém nos casos sintomáticos, podem apresentar febre, adenopatia generalizada, edema, sinal de Romaña ou chagoma de inoculação, hepatoesplenomegalia e disfunção cardíaca (COURA, 2007). A letalidade nessa fase se deve aos casos de meningoencefalite e insuficiência cardíaca (RASSI *et al.*, 2000). Após a fase aguda, a maioria dos pacientes permanece na fase indeterminada da infecção Chagásica, com resultados de exames do coração, esôfago e cólon normais. Precocemente, a partir da fase aguda, ou tardiamente, na fase indeterminada, uma parcela dos pacientes pode

evoluir com distúrbios cardíacos ou digestivos, caracterizando a forma crônica da doença (DIAS, 2000; COURA, 2007).

Com a invasão do homem no ambiente natural onde circula o protozoário, a enzootia primitiva de animais silvestres transformou-se em uma antropozoonose. A ocupação predatória desses espaços pelo homem fez com que algumas espécies de triatomíneos fossem introduzidas, ativa ou passivamente, em suas habitações e estabelecessem novos ciclos de transmissão. Dessa maneira, o homem e os animais domésticos passaram a fazer parte da cadeia epidemiológica da doença, com possibilidade de circulação do *T. cruzi* entre os ciclos silvestres, peridomésticos e domésticos (BARRETTO, 1979; FORATTINI, 1980; FERNANDES *et al.*, 1994). A adaptação dos triatomíneos ao ambiente doméstico, em paralelo à circulação do parasito entre humanos, animais silvestres e animais domésticos é o fator principal para o estabelecimento de infecções nos seres humanos (COURA, 2007).

Mais de 130 espécies de triatomíneos são consideradas potenciais vetores de *T. cruzi*. Foram descritas 52 espécies no Brasil, sendo que cinco apresentam importância epidemiológica, devido a sua capacidade de se domiciliar: *Triatoma infestans* (Klug, 1834), *Panstrongylus megistus* (Burmeister, 1835), *Triatoma brasiliensis* (Neiva, 1911), *Triatoma pseudomaculata* (Correa & Espínola, 1964) e *Triatoma sordida* (Stal, 1859). As outras 47 espécies são silvestres e mantêm seu ciclo natural em animais silvestres (COURA & DIAS, 2009). Vários reservatórios silvestres para *T. cruzi* já foram descritos, entre eles marsupiais, roedores, quirópteros, carnívoros e primatas. Em relação aos reservatórios domésticos, é importante ressaltar cães, felinos e ratos. Também já foram encontrados infectados suínos e caprinos, porém aves, peixes e répteis são refratários ao parasito, devido à presença de lisinas, que destroem o protozoário (BARRETO, 1964; DEANE, 1964; DIAS & MACEDO, 2005; COURA, 2008).

A infecção pode ser transmitida pela inoculação das excretas no local da picada, quando o triatomíneo defeca após o repasto sanguíneo ou pelo contato de mucosas, por exemplo, ocular (BRENER, 1973). *T. infestans* é o principal vetor da doença de Chagas no Brasil, sendo alvo de programas de controle de sua disseminação no ambiente domiciliar, em áreas endêmicas. Em decorrência do controle contínuo

desse vetor, as populações domésticas de *T. infestans* foram eliminadas, com isso interrompendo a transmissão vetorial, por essa espécie (DIAS *et al.*, 2002).

A doença também pode ser transmitida por outros mecanismos como: transfusão sanguínea (COURA *et al.*, 1966; ROHWEDDER,1969); transmissão congênita (SCHENONE *et al.*, 1987); acidentes laboratoriais (BRENER, 1979) e por ingestão oral (AMATO NETO *et al.*, 2000), por meio de líquidos ou alimentos contaminados com *T. cruzi*. Esse tipo de transmissão é responsável por surtos regionais de infecção aguda, em áreas onde não existem vetores domiciliados (RASSI *et al.*, 2012), como exemplos, o surto que ocorreu no estado de Santa Catarina, em 2005, onde pessoas ingeriram caldo de cana-de-açúcar contaminado com o parasito e adquiriram a doença de Chagas (BRASIL, 2005). Outro exemplo é na região Amazônica, onde existem vários relatos de pessoas que adquiriram a doença devido ao consumo de açaí contaminado com as fezes de triatomíneos (VALENTE *et al.*, 1999; PINTO *et al.*, 2001).

O diagnóstico da doença na fase aguda baseia-se na detecção, através da microscopia óptica, das formas tripomastigotas no sangue. Já na fase crônica da doença, a parasitemia é baixa. Recomenda-se a utilização de testes sorológicos, para detecção de anticorpos imunoglobulina G (IgG) contra *T. cruzi*, para confirmação do diagnóstico. A reação em cadeia da polimerase (PCR) pode ser utilizada em casos de resultados de sorologia não conclusivos e no auxílio no monitoramento do tratamento (WHO, 2002; MS, 2005; GOMES *et al.*, 2009; BRITTO, 2009). É possível identificar falhas no tratamento, pela detecção de DNA do parasito, mas por esse método não é possível indicar o sucesso do tratamento da doença. Já a não detecção de DNA na PCR, não indica a cura parasitológica (RASSI *et al.*, 2010).

O tratamento utilizado na doença de Chagas tem como foco a doença na fase aguda, prevenir problemas nos órgãos na fase crônica assintomática e limitar a incapacidade, a morbidade e a mortalidade do paciente na fase crônica sintomática (RASSI *et al.*, 2009). Os fármacos utilizados são conhecidos como nifurtimox e benzonidazol.

## 1.2 Diversidade genética e classificação das linhagens de *Trypanosoma cruzi*

*T. cruzi* apresenta populações multiclonais complexas que se diferenciam em características genéticas, biológicas, patológicas e no seu comportamento nos hospedeiros vertebrados. A severidade e sintomas da doença variam em regiões geográficas diferentes e essa variedade pode ser resultante da heterogeneidade entre os isolados ou da resposta imune do hospedeiro (SOUTO *et al.*, 1996; ANDRADE & MAGALHÃES, 1997).

Os primeiros estudos relacionados à variabilidade genética foram feitos por Miles e colaboradores (1977, 1978), utilizando análise eletroforética de isoenzimas, indicando que *T. cruzi* poderia ser agrupado em três grupos distintos, denominados zimodemas (Z): Z1 e Z3, pertencentes ao ciclo silvestre; e Z2 ao ciclo domiciliar. A extensão desse estudo, por meio de uma análise maior de loci gênicos, ampliou a diversidade de isoenzimas ou *clonets* para 43 (TIBAYRENC *et al.*, 1986; TIBAYRENC & AYALA, 1988). À medida que os estudos avançaram, diferentes denominações foram recebendo essas populações: schizodemas (MOREL *et al.*, 1980), biodemas (ANDRADE, 1974; ANDRADE & MAGALHÃES, 1997), cladós (KAWASHITA *et al.*, 2001), haplótipos (FREITAS *et al.*, 2006; HERRERA *et al.*, 2007) e unidades discretas de tipagem - DTU, que tem como definição o conjunto de populações, que são geneticamente semelhantes e são identificadas por marcadores genéticos, imunológicos e moleculares em comum (TIBAYRENC, 1998).

Com o avanço da biologia molecular, novas técnicas foram desenvolvidas para um estudo melhor da heterogeneidade do parasito: RFLP (polimorfismo de tamanho de fragmentos de restrição) de kDNA (MOREL *et al.*, 1980), *fingerprint* de DNA (MACEDO *et al.*, 1992), RAPD (*Randomly amplified polymorphic DNA*) (TIBAYRENC *et al.*, 1993), avaliação do cariótipo molecular (HENRIKSSON *et al.*, 1995) e microssatélites (OLIVEIRA, 1998). A partir desses avanços, Tibayrenc (1995), evidencia que *T. cruzi* é um organismo diplóide, que não apresenta reprodução sexuada e com estrutura populacional clonal.

Souto e colaboradores (1996), a partir de estudos de caracterização utilizando o espaçador não-transcrito do gene mini-exon e sequências distintas da porção terminal 3' do gene 24S $\alpha$  do RNA ribossômico, demonstraram uma clara divisão do



*T. cruzi* em duas grandes linhagens, com alta diversidade genética: linhagem 1 e linhagem 2. Os autores observaram também a presença de isolados que apresentavam duas bandas de amplificação, sugerindo que essas cepas fossem híbridas (Tcl/TcII). Essas linhagens não albergaram o Z3, que mais tarde foi definido, junto com Tcl e TcII, pelo marcador do gene de mini-exon (FERNANDES *et al.*, 1998).

A existência de duas linhagens e de híbridos foi confirmada por vários outros marcadores moleculares e cada grupo de pesquisa designou conforme desejava, utilizando denominações diferentes (ZINGALES *et al.*, 1999). Na reunião em comemoração aos 90 anos do descobrimento da doença de Chagas, um grupo de pesquisadores revisou e propôs algumas recomendações. Segundo Anonymous (1999), a espécie foi subdividida em duas linhagens filogenéticas principais: *T. cruzi* I, associada ao ciclo silvestre e *T. cruzi* II, associada ao ciclo doméstico. Ambos, Tcl e TcII, estão associados com lesões cardíacas em infecções humanas, mas foi visto que apenas TcII está associado com lesões do trato digestivo. Já as cepas denominadas como Z3 ou que apresentavam características híbridas, não foram classificadas dentro desses dois grupos principais. Outras subdivisões foram sugeridas, utilizando marcadores moleculares com diferentes taxas de evolução, para obter uma classificação para esses isolados, que não foram classificados dentro das duas linhagens principais de *T. cruzi* (MACHADO & AYALA, 2001; STURM *et al.*, 2003; PEDROSO *et al.*, 2003).

A análise de marcadores *multilocus enzyme electrophoresis* (MLEE) e RAPD sugeriu a divisão de *T. cruzi* em seis linhagens (Tcl-TcIIe), sendo *T. cruzi* II subdividido em cinco subgrupos (TcIIa-TcIIe) (BRISSE *et al.*, 2000). Tcl corresponde à linhagem *T. cruzi* I e TcIIb a *T. cruzi* II. O restante, TcIIa, IIc-e, corresponde às cepas híbridas e às pertencentes ao grupo Z3. Um terceiro grupo ancestral, denominado *T. cruzi* III, foi proposto, a partir da análise de microsátélites e DNA mitocondrial (FREITAS *et al.*, 2006).

Observando a necessidade de uma padronização da nomenclatura das linhagens de *T. cruzi*, para facilitar a comunicação entre os pesquisadores, melhorando a discussão e a compreensão de características biológicas básicas, eco-epidemiológicas e de patogenicidade (ZINGALES, 2011), foi organizado um

simpósio em comemoração ao centenário da descoberta da doença de Chagas, onde esse assunto foi discutido e uma série de recomendações foi determinada.

As recomendações deste comitê foram descritas por Zingales e colaboradores (2009): *T. cruzi* seja dividido em seis linhagens (TcI-TcVI); cada linhagem seja denominada DTU (TIBAYRENC, 1998); TcI e TcII correspondem às duas linhagens descritas por Anonymous (1999), com exceção da cepa CL Brener, antes classificada como TcII e agora reclassificada como TcVI. Na tabela 1, observa-se como ficou a nova proposta de classificação das linhagens de *T. cruzi*.

**Tabela 1** - Nova divisão da nomenclatura de *Trypanosoma cruzi* e sua equivalência com as divisões anteriores. Fonte: ZINGALES *et al.*, 2009.

DTU	Abreviação	Equivalência a grupos de <i>T. cruzi</i> anteriores
<i>T. cruzi</i> I	TcI	<i>T. cruzi</i> I <sup>a,b</sup> e DTU I <sup>c</sup>
<i>T. cruzi</i> II	TcII	<i>T. cruzi</i> II <sup>a</sup> e DTU IIb <sup>c</sup>
<i>T. cruzi</i> III	TcIII	Z3/Z1 ASAT <sup>d</sup> , Z3-A <sup>e</sup> , DTU IIc <sup>c</sup> e <i>T. cruzi</i> III <sup>f</sup>
<i>T. cruzi</i> IV	TcIV	Z3 <sup>d</sup> , Z3-b <sup>e</sup> e DTU IIa <sup>c</sup>
<i>T. cruzi</i> V	TcV	Bolivian Z2 <sup>d</sup> , rDNA 1/2 <sup>g</sup> , clonet 39 <sup>h</sup> e DTU IIId <sup>c</sup>
<i>T. cruzi</i> VI	TcVI	Paraguayan Z2 <sup>i</sup> , Zimodema B <sup>j</sup> e DTU IIe <sup>c</sup>

a: Anonymous, 1999; b: Falla *et al.*, 2009; c: Brisse *et al.*, 2000; d: Miles *et al.*, 1981a; DTU: unidades discretas de tipagem; e: Mendonça *et al.*, 2002; f: Freitas *et al.*, 2006; g: Souto *et al.*, 1996; h: Tibayrenc & Ayala, 1991; i: Chapman *et al.*, 1984; j: Carneiro *et al.*, 1990.

Desta forma, ao longo dos anos, observamos uma alternância de tendências “taxonômicas” de classificação da diversidade genética do *T. cruzi*. Nos anos 70 e 80, um grande número de “linhagens” foi identificado; nos anos 90 e 2000, apenas duas linhagens principais (TcI-TcII); e, atualmente, seis linhagens (TcI-TcVI) (ZINGALES, 2011).

### **1.3 Marcadores moleculares utilizados na identificação dos isolados de *T. cruzi***

#### **1.3.1 Região intergênica do gene de calmodulina**

O gene de calmodulina é altamente conservado, em formato de *tandem*, podendo apresentar três cópias no genoma de *T. cruzi*. Na região intergênica estão presentes as regiões não traduzidas (UTRS) 5' e 3', e os sinais e sítios de *trans-splicing* (CHUNG & SWINDLE, 1990). Atua controlando atividades celulares, principalmente pela modulação do metabolismo de cálcio (HOEFLICH & IKURA, 2002; BRANDÃO, 2006).

Segundo Brandão & Fernandes (2006), foi demonstrado que o segmento 3'UTR apresenta mutações, que são específicas para identificar isolados de *T. cruzi* nas linhagens TcI, TcII e zimodema 3. Nenhum estudo foi realizado com esse marcador molecular para verificar se, por esse gene, é possível identificar as seis linhagens de *T. cruzi* (TcI-TcVI), classificadas segundo Zingales e colaboradores (2009).

#### **1.3.2 Gene TcSC5D**

O gene TcSC5D pertence à via de biossíntese de esteróis de *T. cruzi*, que codifica uma C-5 desaturase putativa do esterol (TcSC5D), presente como cópia única por genoma haplóide e está mapeado no cromossomo 22 do parasito. Apresenta polimorfismos, podendo ser utilizado como simples marcador, pela amplificação de um único locus, proporcionando um ensaio rápido para a identificação das linhagens de *T. cruzi* descritas até os dias de hoje (WEATHERLY *et al.*, 2009; COSENTINO & AGUERO, 2012).

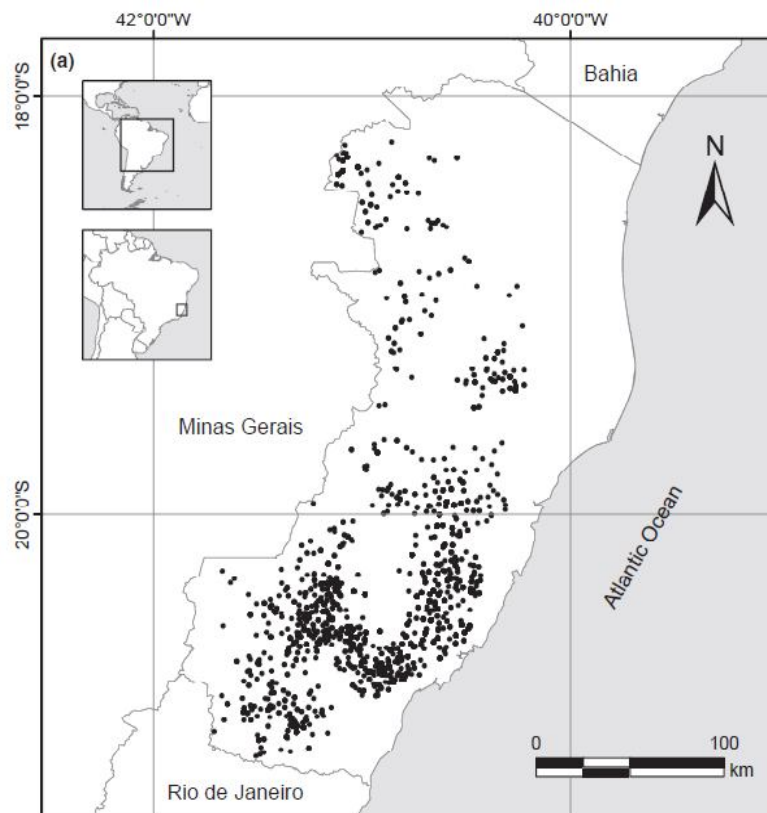
### **1.4 A doença de Chagas no Espírito Santo**

Segundo o Instituto de Pesquisa da Mata Atlântica – IPEMA (2004), durante o último século, florestas no estado brasileiro do Espírito Santo (ES) foram devastadas para exploração de madeira e plantio de diversas culturas agrícolas, deixando apenas 8,15% do território com cobertura natural. Isso provocou um desequilíbrio ambiental, que culminou na extinção de muitas espécies animais e adaptação de outras nas novas condições impostas pelo homem, onde encontram abrigos e fontes alimentares. Sabe-se que, no Brasil, a distribuição de triatomíneos associados com casas coincide com a colonização humana de áreas com vegetação natural de

cerrado ou de caatinga. Áreas da mata Atlântica geralmente não apresentam focos de domiciliação (FORATTINI, 1980; COURA, 2003).

No estado do ES, sete espécies de triatomíneos são registradas, todas de hábito silvestre: *Cavernicola pilosa* Barber, 1937; *Rhodnius domesticus* Neiva & Pinto, 1923; *Panstrongylus diasi* Pinto & Lent, 1946; *Panstrongylus geniculatus* (Latreille, 1811); *Panstrongylus megistus* (Burmeister, 1835); *Triatoma tibiamaculata* (Pinto, 1926) e *Triatoma vitticeps* (Stal, 1859) (GALVÃO *et al.*, 2003; SANTOS *et al.*, 2004). Apesar de aparentar incapacidade de colonizar habitações humanas (SANTOS *et al.*, 2005), exemplares adultos de triatomíneos procedentes de florestas remanescentes são capturados por moradores no ambiente domiciliar de áreas rurais, a maioria vinda das regiões montanhosas do estado do ES (Figura 4) (SANTOS *et al.*, 2006; LEITE *et al.*, 2011). Nesse contexto, *T. vitticeps* é a espécie mais frequente, exibindo elevados índices de infecção natural por *T. cruzi* (SESSA & CARIAS 1986; DIAS *et al.*, 1989; SANTOS *et al.*, 2004).

**Figura 4** - Ocorrência de triatomíneos no estado do Espírito Santo. Fonte: LEITE *et al.*, 2011.



É sabido que as maiores taxas de detecção domiciliar de *T. vitticeps* ocorrem no período entre novembro e fevereiro, que corresponde aos meses mais quentes e úmidos do ano (FERREIRA *et al.*, 1986). Sabe-se também que a maior captura é de fêmeas (DIAS *et al.*, 1989; GONÇALVES *et al.*, 1998). A alta taxa de infecção de *T. vitticeps* refere-se ao exame de espécimes adultos, sendo os resultados para as ninfas quase sempre negativos. Porém, um estudo realizado em dois municípios do ES, demonstrou a presença de colônias de *T. vitticeps* em residências, sendo que ninfas e espécimes adultos estavam infectados com formas flageladas semelhantes a *T. cruzi*. Os autores relatam que essas colônias foram encontradas em ambiente peridomiciliar e estavam associadas a ninhos de gambás da espécie *Didelphis aurita* (SANTOS *et al.*, 2005; SANTOS *et al.*, 2006).

Ainda que *T. vitticeps* tenha o hábito silvestre e de eliminar suas excretas tardiamente após o repasto sanguíneo, a presença marcante de adultos infectados por *T. cruzi* no intradomicílio e o contato frequente com o ser humano, incluem risco de transmissão do parasito (SANTOS *et al.*, 2004; SANTOS *et al.*, 2005). Mesmo com a baixa prevalência de doença de Chagas no Espírito Santo, demonstrada por inquéritos sorológicos (BARROS *et al.*, 1975; SESSA *et al.*, 2002), observa-se um alto índice de infecção natural por formas flageladas em *T. vitticeps* (SANTOS *et al.*, 2006), sendo que ainda existe pouca informação sobre a população do parasito em áreas não endêmicas (STEINDEL *et al.*, 1995).

A doença de Chagas apresenta um amplo espectro de manifestações clínicas, variando de infecções assintomáticas a infecções cardíacas graves e destruição do trato digestivo. As diferentes populações do parasito podem ter uma importante contribuição nesta variação clínica (MILES *et al.*, 1981a; BRISSE *et al.*, 2000). Algumas propriedades biológicas, dentre elas: virulência em camundongos, sensibilidade a fármacos, transmissão por triatomíneos e diferença de patogenicidade em humanos estão relacionadas a essas diferenças genéticas (MONTAMAT *et al.*, 1996; LAURENT *et al.*, 1997; DE LANA *et al.*, 1998; PINTO *et al.*, 1998; REVOLLO *et al.*, 1998).

Até os dias de hoje, não se tem conhecimento das linhagens de *T. cruzi* que circulam na mata Atlântica do ES. Pesquisadores realizaram alguns estudos

relacionados à doença de Chagas, ao vetor e seu comportamento, e a taxa de infecção do vetor, mas não existe relato na literatura de um estudo de caracterização desse protozoário, de forma que abrangesse uma boa parte do território do estado. Este estudo proporcionará melhor entendimento da dinâmica da transmissão, com possibilidade de avaliar o risco de disseminação da doença.

## **OBJETIVOS**

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

Identificar se as formas flageladas semelhantes a *Trypanosoma cruzi*, encontradas em triatomíneos silvetres, nos municípios do estado do Espírito Santo, representam formas evolutivas de *Trypanosoma cruzi*.

### **2.2 Objetivos Específicos**

- 1- Identificar as espécies de triatomíneos capturadas, no período de 2010 a 2012, no estado do Espírito Santo;
- 2 - Caracterizar os isolados de *Trypanosma cruzi* que circulam no estado do Espírito Santo, utilizando marcadores moleculares;
- 3- Determinar a heterogeneidade genética dos isolados de *Trypanosoma cruzi*;
- 4- Inferir o potencial de ocorrência da doença de Chagas no Espírito Santo, com base nas variantes genéticas encontradas.



# **MATERIAIS E MÉTODOS**

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1 Área de estudo**

O estado do Espírito Santo (ES) está localizado na região Sudeste do Brasil, entre as longitudes de 17°53'29"S-21°18'03"S e latitudes de 39°41'18"O-41°52'45"O. Sua área é de 46.095 km<sup>2</sup>, dividida em 78 municípios. Esses são agrupados em quatro macrorregiões (Metropolitana, Norte, Central e Sul) e 10 microrregiões (Metropolitana, Central Serrana, Sudoeste Serrana, Litoral Sul, Central Sul, Caparaó, Rio Doce, Centro-Oeste, Nordeste e Noroeste) (GOVERNO DO ESTADO DO ESPÍRITO SANTO, 2011; INSTITUTO JONES DOS SANTOS NEVES, 2011). O estado abrange o corredor central da mata Atlântica, que compreende uma das principais áreas de floresta densa dentro desse bioma (LEITE *et al.*, 2011).

#### **3.2 Captura dos triatomíneos**

Os agentes de saúde dos municípios do ES são treinados e orientados a visitar os moradores das áreas rurais, ensinando-os a reconhecer, capturar e manter a integridade dos triatomíneos que invadem suas residências, além de manipular de forma correta os insetos, evitando acidentes. Feita a captura na residência, o morador leva o triatomíneo a um posto de saúde mais próximo, ou entra em contato com o agente de saúde do município, que irá à sua residência buscar o inseto.

Os espécimes de triatomíneos, de diversas localidades do estado, foram coletados por moradores e entregues pelos agentes de saúde do município, no período de junho de 2010 a maio de 2012, ao Núcleo de Entomologia e Malacologia da Secretaria de Estado da Saúde do Espírito Santo (NEMES), localizado no Departamento de Patologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal Espírito Santo (UFES), onde foi realizado o preenchimento de ficha de captura, catalogando a coleta (Anexo A).

#### **3.3 Identificação, exame dos triatomíneos e inoculação em camundongo**

A identificação dos triatomíneos foi realizada seguindo a chave de identificação proposta por Lent & Wygodzinsky (1979). O trato digestivo foi dissecado com auxílio de pinças e tesoura, onde a ampola retal foi retirada. O material coletado foi diluído em solução salina 0,85% e examinado entre lâmina e lamínula, em microscópio

óptico, para pesquisa das formas flageladas semelhantes a *T. cruzi*. Quando o exame mostrou-se positivo, foi realizada a inoculação do material em camundongos suíços albinos. Para confirmação da parasitemia, os animais eram examinados a cada 15 dias, verificando-se a presença de formas tripomastigotas sanguíneas no sangue periférico. Os camundongos positivos foram sacrificados utilizando método recomendado pelo comitê de ética de animais, aplicação do barbitúrico Pentobarbital Sódico (40 mg/kg) por via intraperitoneal em doses excessivas, ou seja, no mínimo três vezes a dose recomendada para anestesia. O sangue desses camundongos foi coletado, por punção cardíaca, para cultivo em meio específico para crescimento de *T. cruzi*. Os demais foram examinados até o 60º dia e, em caso de negatividade, os animais foram sacrificados.

### **3.4 Cultivo do parasito e congelamento**

O sangue dos camundongos positivos foi semeado em tubos com meio NNN (Mac Neal, Novy e Nicole), contendo 2 ml de meio líquido BHI (Brain Heart Infusion) suplementado com 10% de soro fetal bovino, e estes incubados em estufa B.O.D. regulada a 28° C. As leituras das hemoculturas foram realizadas em microscópio óptico, a cada 15 dias, até o 60º dia; em seguida, as culturas foram descartadas. Após a comprovação das formas epimastigotas, as amostras foram lavadas com 1 ml de solução PBS (fosfato-salino tamponado pH 7,2) e centrifugadas a 2000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento armazenado em freezer a -20°C, até a realização da extração do DNA.

### **3.5 Extração do DNA: formas epimastigotas dos isolados de *Trypanosoma cruzi***

O método utilizado para extração do DNA foi um *salting out* rápido, segundo Aljanabi & Martinez (1997). As amostras, armazenadas em tubos de 15 ml, foram homogeneizadas em 400 µl de tampão estéril (NaCl 0,4 M, Tris-HCl 10 mM pH 8.0 e EDTA 2 mM pH 8.0). Em seguida, adicionaram-se 40 µl de SDS (dodecil sulfato de sódio) 20% (concentração final 2%) e 8 µl da enzima proteinase K (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) 20mg/ml (concentração final 400 µg/ml). As amostras foram incubadas à temperatura de 55-65°C por 1 hora e, após esse período, adicionaram-se em cada amostra 300 µl de solução saturada de NaCl 6 M, homogeneizadas em

vortex por 30 segundos, em velocidade máxima e centrifugadas por 30 minutos a 14000 rpm. Finalizada a centrifugação, o sobrenadante de cada amostra foi transferido para um tubo de 1,5 ml, onde um volume igual de isopropanol absoluto foi adicionado e as amostras incubadas a -20°C por 1 hora. Após essa etapa, as amostras foram centrifugadas por 20 minutos a 10000 rpm, a 4°C e seu sobrenadante descartado. Os sedimentos foram lavados em 1 ml de álcool 70%, centrifugados por 10 minutos a 14000 rpm, a 4°C, secados por 15 a 30 minutos à temperatura ambiente e ressuspensos em 60 µl de tampão TE 1X (10mM Tris-HCl; 1mM EDTA pH 8.0).

Após a etapa de precipitação, o DNA extraído foi visualizado por eletroforese em gel de agarose a 1,0%, preparado em tampão TBE 0,5X (0,89 M Tris; 0,02 M EDTA; 0,89 M ácido bórico). Foram utilizados 10 µl de DNA, misturados com tampão de amostra 6X (25 mg xileno ciano; 25 mg azul de bromofenol; 3 ml glicerol; TE pH 8,0) e também foi utilizado marcador de peso molecular na escala de 100pb (pares de bases) (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Após a corrida, o gel foi corado com brometo de etídio (250 mg/ml), os resultados visualizados sob luz UV e fotodocumentados em capturador de imagens (BioRad, Gel Doc 2000 system, Hercules, CA, USA), para verificação de sua integridade.

### **3.6 Amplificação da região intergênica do gene de calmodulina pela PCR**

#### **3.6.1 Amplificação do fragmento menor**

O gene de calmodulina está organizado em dois *loci* no genoma do *T. cruzi* (CHUNG & SWINDLE, 1990). Com isso, dois produtos são obtidos pela PCR: um fragmento menor de 860pb e um maior de 1600pb. Para a amplificação de sua região intergênica, foram utilizadas as condições descritas por Brandão & Fernandes (2006). O DNA das amostras, aproximadamente 100 ng (2 a 5 µl), foi submetido a PCR composta por tampão *in house* (100 mM Tris-HCl pH 9.2; 35 mM MgCl<sub>2</sub>; 250 mM KCl), para amplificação somente do fragmento menor (860pb). Já, para as amostras que não foram amplificadas por esse tampão, foram utilizados na PCR o tampão 10X do *kit* (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) e 50 mM de MgCl<sub>2</sub>, para a amplificação do fragmento menor (860pb) e maior (1600pb). Os demais reagentes foram os mesmos para as duas reações: 1U da enzima Taq polymerase DNA

recombinante (Invitrogen Carlsbad, CA, USA), 10 pmol dos *primers* 3utrcal (5'-GGTCAAATCAACTACGAGGA-3') e 5utrcal (5'-GGAGATCTGCTCGTTGGACA-3'), 5 mM de dNTP e água Milli-Q para completar o volume final de 50 µl. Os ciclos de amplificação foram realizados em termociclador PTC-100 Programmable Thermal Controller (MJ Research, Inc.) iniciando por um ciclo de desnaturação a 94°C por 3 minutos, 35 ciclos constituídos por três etapas: um ciclo de desnaturação a 96°C por 10 segundos, anelamento a 55°C por 30 segundos, extensão a 72°C por 30 segundos e extensão final a 72°C por 10 minutos. Para controle positivo da reação, foram utilizadas as seguintes cepas de referência do banco de cepas da Fundação Oswaldo Cruz: *T cruzi* I (G), *T cruzi* II (12 São Felipe-SF), *T cruzi* III (3663), *T cruzi* IV (4167), *T cruzi* V (LL014) e *T cruzi* VI (Tulahuen) e também foi utilizado um controle negativo, no caso água Milli-Q, para confirmação de não contaminação da reação.

Foi realizada eletroforese em gel de agarose 1,0% preparado em tampão TBE 0,5X. Para análise dos produtos amplificados, tanto para os produtos de uma única banda, como para os de banda dupla, foram utilizados 10µl do produto de PCR, misturados com tampão de amostra 6X e marcador de peso molecular na escala de 100pb (Invitrogen Carlsbad, CA, USA). Após a corrida, o gel foi corado com brometo de etídio (250mg/ml), os resultados visualizados sob luz UV e fotodocumentados em capturador de imagens (BioRad, Gel Doc 2000 system, Hercules, CA, USA).

### **3.6.2 Obtenção do fragmento menor**

As amostras que possibilitaram a amplificação de fragmentos duplos foram submetidas a uma segunda eletroforese. Em um gel de agarose 1%, foram colocados nos respectivos poços: o marcador de peso molecular de 100pb (Invitrogen Carlsbad, CA, USA), uma amostra sabidamente positiva tanto para o fragmento menor quanto para o maior e nos demais poços, o produto amplificado das amostras, das quais se quer obter o fragmento menor. Foi realizada a eletroforese e, após essa etapa, as partes do gel que continham o marcador de pb e amostra positiva foram cortadas, coradas com brometo de etídio (250 mg/ml) e visualizadas sob luz UV, para a localização da banda de interesse desse estudo. Junto com uma régua graduada, foi feita a marcação da posição em que a banda se encontra no gel. A régua foi então colocada ao lado do gel que não foi corado e, com

base na marcação realizada, cortou-se o pedaço de gel que continha o fragmento de interesse. Esses foram colocados em tubo de 1,5 ml, lavados com solução Tris-HCl (pH 8.0), para retirar o excesso de ácido bórico, centrifugados a 14000 rpm por 10 minutos e o sobrenadante transferido para um tubo de 1,5 ml. As amostras foram congeladas a -20°C.

### **3.7 Clonagem dos produtos amplificados das cepas de referência para a região intergênica do gene de calmodulina**

#### **3.7.1 Preparação das células competentes**

Para preparar as células competentes utilizadas para clonagem, foi feita a transformação de bactérias da espécie *Escherichia coli*. Foi realizada semeadura de uma cultura de *E. coli* linhagem TOP 10 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) em placa de Petri, contendo o meio de cultura LB (Luria-Bertani) e agar bacteriológico sem adição de antibiótico. A placa foi incubada em estufa a 37°C *overnight*. No dia seguinte, uma colônia foi repicada em um tubo cônico de 50 ml contendo meio LB líquido sem adição de antibiótico, e incubado a 37°C, sob agitação. Após uma hora, foi realizada a primeira leitura da D.O. (densidade óptica) em espectrofotômetro, a 550 nanômetros, sendo depois realizada a leitura a cada 30 minutos até que atingisse a D.O. = 0.5, que é a fase log de crescimento celular. A cultura foi incubada no gelo por 10 minutos, centrifugada a 4000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspensionado em 25 ml CaCl<sub>2</sub> 100mM. A cultura foi novamente centrifugada a 4000 rpm por 10 minutos, o sobrenadante descartado e o sedimento ressuspensionado em 2 ml de solução de CaCl<sub>2</sub> 100mM, acrescido 70 µl de DMSO (dimetilsulfóxido). Após essa etapa, foram feitas alíquotas de 100 µl de células em tubos de 1,5 ml para estocagem. As células foram congeladas com gelo seco em etanol por um minuto e congeladas em *freezer* -80°C, até sua utilização.

#### **3.7.2 Clonagem**

Os produtos amplificados para a região intergênica do gene de calmodulina das cepas de referência *T cruzi* I (G), *T cruzi* II (12SF), *T cruzi* III (3663), *T cruzi* IV (4167), *T cruzi* V (LL014) e *T cruzi* VI (Tulahuen), foram ligados a um vetor (pGEM®-T Vector System I, Promega, Madison, WI, USA), de acordo com as instruções do fabricante. Em um tubo de 1,5 ml, para cada amostra, foram adicionados 5 µl do

tampão 2X T4 DNA ligase, 1 µl do vetor, 3 µl do produto da PCR e 1 µl T4 DNA ligase, tendo como volume final da reação igual a 10 µl. As amostras foram deixadas 1 hora à temperatura ambiente e depois a 4°C *overnight*. Após a ligação, as amostras foram estocadas a -20°C.

Para a preparação do meio sólido, foram pesados 2 gramas de meio LB e 1,5 gramas de agar bacteriológico, para cada 100 ml de meio LB. O meio foi autoclavado por 15 minutos e deixado em forno a 56°C até sua utilização. Foram adicionados ao meio autoclavado, 50mg/ml de antibiótico ampicilina (concentração final 100 µg/ml), sendo distribuídos 20 ml do meio com antibiótico em placas de Petri. Após a solidificação do meio, foram distribuídos 40 µl de X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosídeo) na sua superfície, deixando-o secar por 30 minutos.

Para a transformação, foram adicionados 2 µl da reação de clonagem em tubos de 1,5 ml contendo 100 µl de células competentes, onde foram incubadas no gelo por 20 minutos. Após essa etapa, os tubos sofreram um choque térmico a 42°C por 1,5 minutos. Em seguida, as células competentes foram transferidas para tubos de 15 ml, contendo 900 µl de meio LB líquido sem antibiótico, homogeneizadas com cuidado e incubadas em estufa a 37°C, sob agitação, por 1 hora. Após a incubação, foi realizada a semeadura das células, em placas de Petri contendo meio de cultura LB com ampicilina e X-gal, de 100 µl e 150 µl de cada amostra, com alças estéreis. As placas foram incubadas a 37°C por 18 horas. Foi verificado o crescimento de colônias brancas e azuis. As colônias brancas, contendo inserto, foram coletadas e diluídas em 10 µl de água milli-Q estéril, para realização da PCR colônia.

### **3.8 PCR colônia**

Para verificar a presença do inserto nas colônias transformadas, foi realizada PCR colônia utilizando o *primer* universal M13. Foram utilizados 10 µl da colônia diluída em água milli-Q estéril, tampão 10X (Invitrogen Carlsbad-CA, USA), 5 mM de dNTPs, 50 mM de MgCl<sub>2</sub>, 10 pmol do *primer* M13 no sentido *forward* e *reverse*, 5 U da enzima Taq DNA polimerase recombinante (Invitrogen Carlsbad-CA, USA) e água milli-Q estéril, tendo o volume final da reação igual a 50 µl. A reação foi realizada em termociclador Mastercycler gradient (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha), com o seguinte perfil térmico, um ciclo inicial de desnaturação a 95°C por 5 minutos, 40

ciclos constituídos de três etapas: um ciclo de desnaturação a 95°C por 1 minuto, um ciclo de anelamento a 55°C por 1,5 minutos, um ciclo de extensão a 72°C por 1 minuto e um ciclo final de extensão a 72°C por 5 minutos.

Para análise dos produtos, foi realizada eletroforese em gel de agarose 1,0% preparado em tampão TBE 0,5X. Foram utilizados 10 µl do produto de PCR, misturados em tampão de amostra 6X, e marcador de peso molecular na escala de 100pb (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Após a corrida, o gel foi corado com brometo de etídio (250 mg/ml), os resultados visualizados sob luz UV e fotodocumentados em capturador de imagens (BioRad, Gel Doc 2000 system, Hercules, CA, USA).

### **3.9 Amplificação do gene TcSC5D pela PCR**

A amplificação do gene TcSC5D foi realizada, segundo Cosentino & Agüero (2012). Uma amostra de 100 ng de DNA foi submetida a uma PCR composta por: 10 pmol dos *primers*, TcSC5D-*forward* (5'-GGACGTGGCGTTTGATTTAT-3') e TcSC5D-*reverse* (5'-TCCCATCTTCTTCGTTGACT-3'), 1,6 mM de MgCl<sub>2</sub>, tampão 10X (Invitrogen, Carlsbad-CA, USA), 200µM dNTPs, 2,5 U Taq polymerase DNA recombinante (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) e água milli-Q estéril para um volume final de 25 µl. A reação foi feita em termociclador Mastercycler gradient (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha), sendo um ciclo inicial de desnaturação a 94°C por 4,5 minutos, 35 ciclos constituídos por três etapas: um ciclo de desnaturação a 94°C por 30 segundos, um ciclo de anelamento a 58°C por 30 segundos e um ciclo de extensão a 72°C por 30 segundos, e um ciclo final de extensão a 72°C por 5 minutos.

A análise dos produtos amplificados foi realizada por eletroforese em gel de agarose 1,2% preparado em tampão TBE 0,5X. Foram utilizados 5 µl do produto de PCR, misturados em tampão de amostra 6X, e também foi utilizado marcador de peso molecular na escala de 100pb (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Após a corrida, o gel foi corado com brometo de etídio (250 mg/ml), os resultados visualizados sob luz UV e fotodocumentados em capturador de imagens (BioRad, Gel Doc 2000 system, Hercules, CA, USA).

### **3.10 Purificação do DNA e produtos amplificados pela PCR**

#### **3.10.1 Precipitação com acetato de sódio 3 molar (M)**



Para o DNA extraído e produtos amplificados para região intergênica do gene de calmodulina, foi realizada a precipitação das amostras com acetato de sódio 3 molar (M). Em cada amostra, adicionou-se 1/10 do volume inicial de acetato de sódio 3 M. As amostras foram misturadas, adicionados dois volumes de etanol absoluto e deixadas à temperatura ambiente por 10 minutos. Após esse tempo, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 14000 rpm, descartando-se os sobrenadantes. Os sedimentos foram lavados com 1 mL de álcool 70%, centrifugou-se novamente por 10 minutos a 10000 rpm, descartou-se os sobrenadantes e repetiu-se mais uma vez a etapa de lavagem. Após o segundo descarte do sobrenadante, os sedimentos foram secos por 30 minutos e ressuspensos em 60 µl de TE (10mM Tris-HCl; 1mM EDTA pH 8.0).

### **3.10.2 Purificação com *kit* NucleoSpin® Extract II purification**

Os produtos de PCR colônia e pelo gene TcSC5D amplificados por PCR foram purificados por coluna, utilizando-se o *kit* NucleoSpin® Extract II purification (Macherey-Nagel, Alemanha), de acordo com as instruções do fabricante.

### **3.11 Sequenciamento**

Após a purificação dos produtos da PCR, tanto para a região intergênica do gene de calmodulina, como para o gene TcSC5D, as amostras foram sequenciadas para detecção de possíveis mutações, que possam identificar as linhagens de *T. cruzi*. Com essa finalidade, foi utilizado o kit BigDye® terminator v3.1 cycle sequencing (Applied Biosystems, Foster city, CA, USA) de acordo com as instruções do fabricante. Em uma placa com 96 poços, 5 µl de produto foram adicionados, juntamente com 5µl da mistura contendo 1,5 µl do tampão 5X do kit, 1 µl de *primer* a 3,2 pmol, 1µl de BigDye® e 1,5µl de água milli-Q estéril, tendo volume final de 10µl. Para cada amostra, foram utilizados os *primers* da reação de PCR e o sequenciamento foi realizado, tanto no sentido *forward*, como *reverse*. A reação foi realizada com um ciclo a 94°C por 10 segundos, um ciclo a 50°C por 5 segundos e um ciclo a 60°C por 4 minutos, sendo essas etapas repetidas 40 vezes em termociclador Mastercycler gradient (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha).

As reações de precipitação e a eletroforese da reação de seqüenciamento (sequenciador capilar automático ABI Prism 3730) foram realizadas na Plataforma

de sequenciamento do PDTIS, localizada no pavilhão Leônidas Deane, da Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro (Fiocruz/RJ).

### **3.12 Análise do resultado do sequenciamento**

As sequências obtidas foram visualizadas, corrigidas, quando necessário, e alinhadas manualmente, utilizando o software Mega 5.05. Para analisar a região intergênica como marcador molecular, foram utilizadas as cepas de referência clonadas para análise e as publicadas por Brandão & Fernandes (2006). Para o gene TcSC5D foi realizada uma busca de sequências de cepas de referência para esse gene no GeneBank ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)).

### **3.13 Comitê de ética**

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética Animal (CEUA/UFES) da Universidade Federal do Espírito Santo, número do protocolo: 016/2010.

# **RESULTADOS**

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Taxa de captura e infecção natural dos triatomíneos

Durante o período de junho de 2010 a maio de 2012, foram capturados 394 triatomíneos, dos quais 371 eram adultos e 23 ninfas. Em relação aos espécimes adultos, 334 foram *T. vitticeps* (90,03%), esses capturados em 25 municípios do estado do ES. Trinta e três espécimes adultos de *P. geniculatus* (8,89%) foram capturados em 11 municípios do estado, dois espécimes eram de *P. megistus* (0,54%), capturados nos municípios de Anchieta e Viana, um de *P. diasi* (0,27%), no município de Itarana e um *T. tibiamaculata* (0,27%), capturado no município de Marechal Floriano. Em relação às ninfas, todas eram *T. vitticeps*. A maioria dos exemplares foi capturada no ambiente domiciliar, em municípios da região montanhosa, localizados no Centro-Sul do estado do ES.

Dos 394 triatomíneos capturados, 251 (67,65%) apresentaram as formas flageladas semelhantes a *T. cruzi*, sendo 241 *T. vitticeps* positivos, nove *P. geniculatus* e um *P. megistus*.

### 4.2 Parasitemia em camundongos e taxa de positividade em cultura

As excretas dos 251 triatomíneos que apresentavam formas flageladas semelhantes a *T. cruzi* foram inoculadas em camundongos albinos suíços. Desses, em 134 (53,39%) foram encontradas formas tripomastigotas sanguíneas no sangue periférico, sendo 127 de *T. vitticeps* (50,6%) e sete de *P. geniculatus* (2,79%).

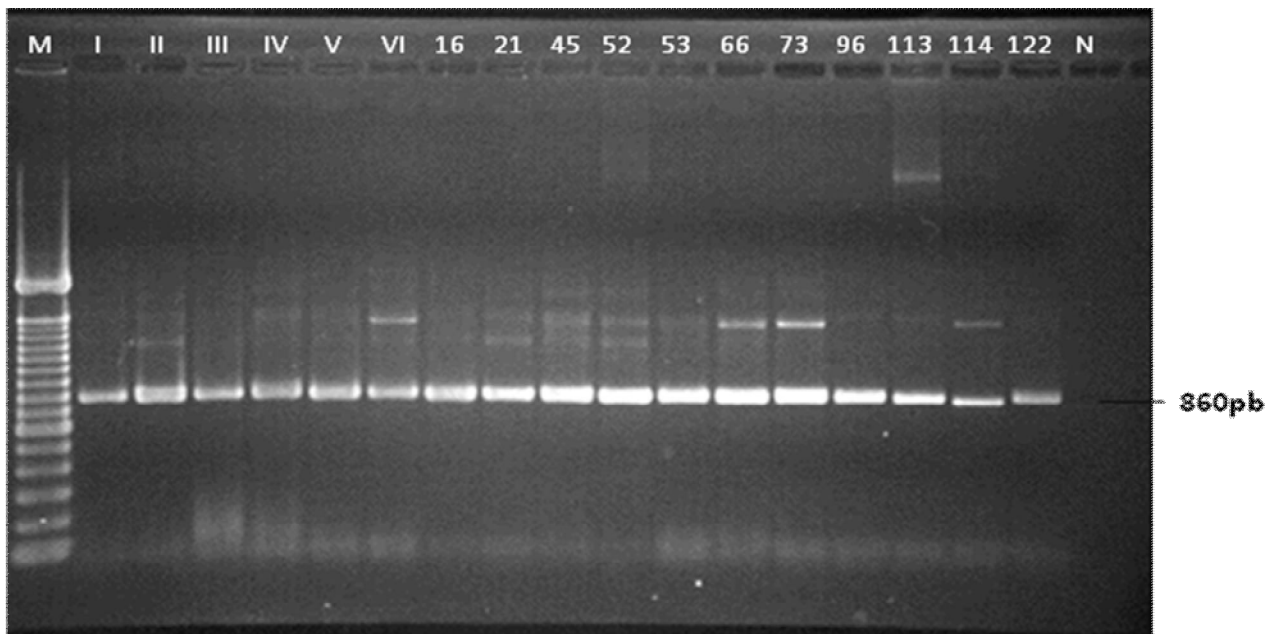
Das 134 amostras semeadas em cultura, 89 (66,42%) cresceram em meio NNN suplementado com BHI, sendo 85 amostras de *T. vitticeps* (63,43%) e 4 de *P. geniculatus* (2,99%).

### 4.3 Amplificação da região intergênica do gene de calmodulina

O DNA foi extraído de 89 amostras. A partir dessas, 78 apresentaram amplificação para a região intergênica do gene de calmodulina, apresentando um fragmento de 860pb (Figura 5). Como em nosso estudo, o fragmento de interesse para a identificação das linhagens de *T. cruzi* foi o de 860pb, as amostras que apresentaram amplificação dos fragmentos menor e maior foram submetidas a uma

nova eletroforese em gel de agarose, seguida de corte de fragmentos do gel de agarose, para obtenção desse fragmento.

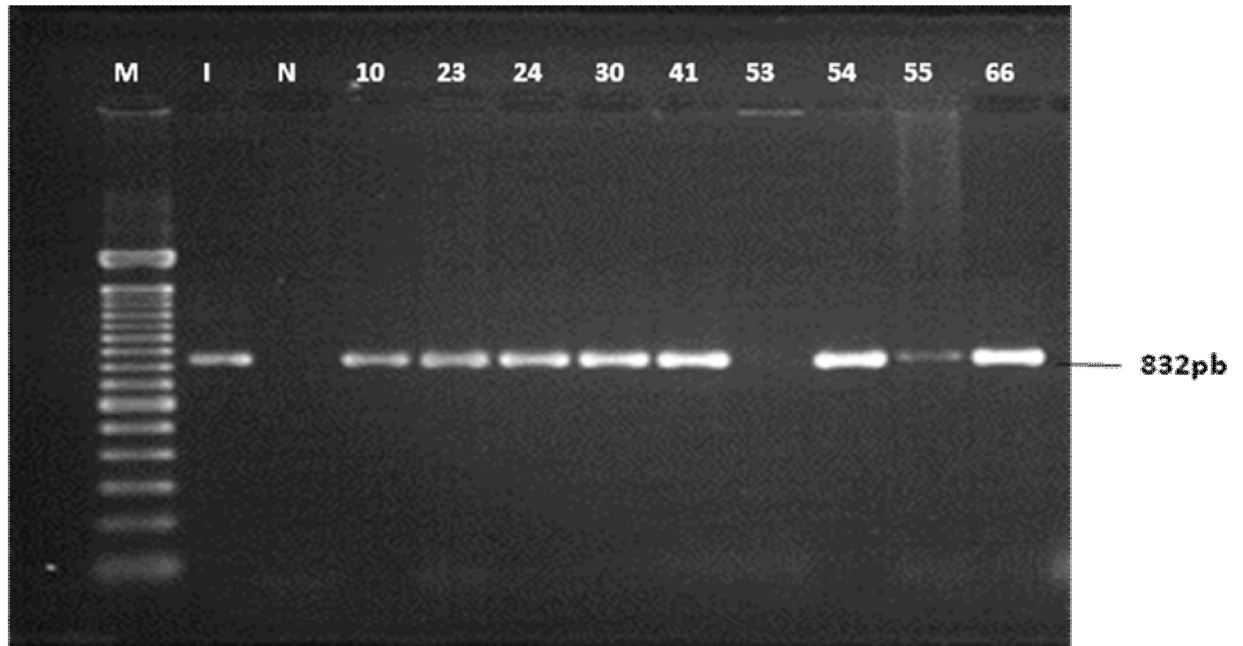
**Figura 5** - Eletroforese em gel de agarose a 1,0% dos produtos amplificados na região intergênica do gene de calmodulina: M – marcador de peso molecular de 100pb; I a VI – controles positivos; 16 a 122: amostras de DNA de *Trypanosoma cruzi* isoladas no estudo; N – controle negativo. Observa-se a amplificação de um fragmento de 860pb.



#### 4.4 Amplificação do gene TcSC5D

Foi observado que, das 78 amostras que sofreram amplificação para a região intergênica do gene de calmodulina, 62 amostras sofreram amplificação para o gene TcSC5D. As amostras amplificadas apresentaram como produto um fragmento único de aproximadamente 832pb (Figura 6).

**Figura 6** - Eletroforese em gel de agarose a 1,2% dos produtos amplificados para o gene TcSC5D: M - marcador de peso molecular de 100pb; I - controle positivo; N - controle negativo; 10 a 66 - amostras de DNA de *Trypanosoma cruzi*. O produto amplificado apresenta um fragmento de aproximadamente 832pb.



#### 4.5 Análise do sequenciamento para a definição das linhagens de *Trypanosoma cruzi*

##### 4.5.1 Região intergênica do gene de calmodulina

###### 4.5.1.1 Cepas de referência

Nesse trabalho, foi realizada a amplificação para esse gene e o sequenciamento de cepas de referências representando as seis linhagens, classificadas por Zingales e colaboradores (2009). Pelas mutações observadas nas cepas de referência, foi possível diferenciar duas linhagens, que ainda não foram descritas para esse gene, no caso TcIII e TcIV (Figura 6). As mutações para identificação de TcI e TcII já foram descritas por Brandão & Fernandes (2006), não sendo possível identificar mutações que diferenciem as linhagens TcV e TcVI. Na tabela 2 podem ser visualizadas essas mutações e sua relação com a identificação das linhagens TcIII e TcIV.

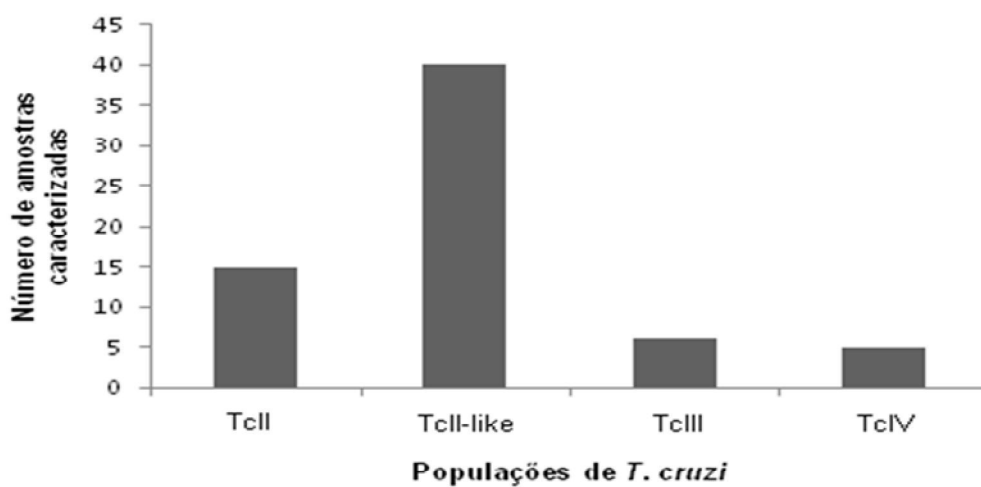
**Tabela 2** - Mutações encontradas nas cepas de referências 3663 e 4167 pela análise da região intergênica do gene de calmodulina, para identificação das linhagens TcIII e TcIV.

<b>Mutação</b>	<b>Linhagem de <i>T. cruzi</i></b>
<b>Nucleotídeo A – posição 28</b>	TcIII
<b>Nucleotídeo C – posição 117</b>	TcIII
<b>Nucleotídeo A – posição 158</b>	TcIII
<b>Deleção de 3 nucleotídeos – posições 286 a 288</b>	TcIII
<b>Dinucleotídeo AG – posições 51 e 52</b>	TcIV
<b>Nucleotídeo T – posição 79</b>	TcIV
<b>Nucleotídeo G – posição 98</b>	TcIV
<b>Nucleotídeo C – posição 102</b>	TcIV
<b>Nucleotídeo C – posição 125</b>	TcIV

#### **4.5.2 Análise das amostras sequenciadas para região intergênica do gene de calmodulina e gene TcSC5D**

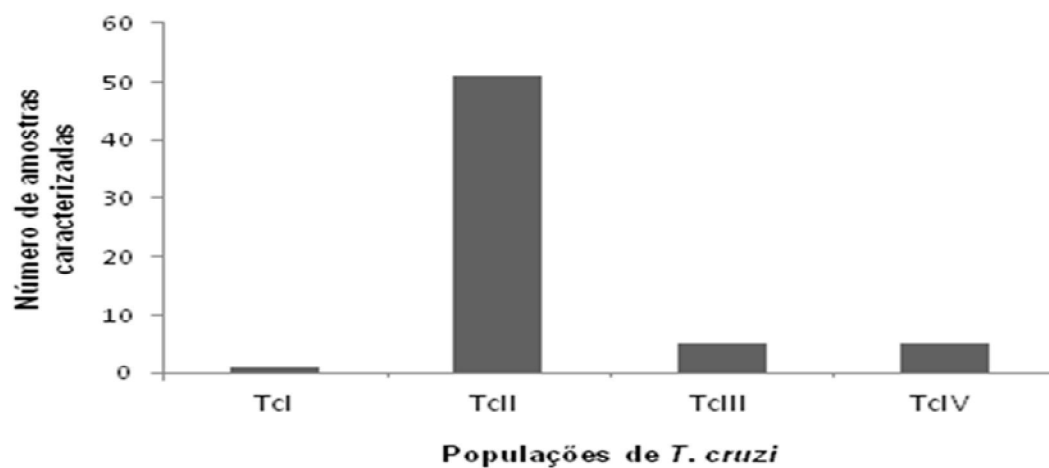
Durante a realização deste trabalho, foram sequenciadas 66 das 78 amostras amplificadas para a região intergênica do gene de calmodulina. Fazendo a análise das amostras, a partir das cepas de referência analisadas e observando as mutações para identificação das linhagens de *T. cruzi* em relação a 3'UTR, as linhagens que circulam no estado são: TcII (19,7%), TcII-like (63,6%)TcIII (9,1%) e TcIV (7,6%). As amostras que não apresentaram todas as mutações descritas por Brandão & Fernandes (2006), para linhagem TcII, foram consideradas TcII-like. No gráfico 1, observa-se a distribuição das linhagens de *T. cruzi*, classificadas pela análise da região intergênica do gene de calmodulina.

**Gráfico 1** - Distribuição no Espírito Santo, das linhagens de *Trypanosoma cruzi*, classificadas a partir da análise molecular da região intergênica do gene de calmodulina.



Em relação ao gene TcSC5D, todas as 62 amostras amplificadas foram sequenciadas. Fazendo a análise do sequenciamento nas amostras, a partir das sequências de cepas de referências buscadas no GeneBank e observando as mutações para identificação das linhagens de *T. cruzi*, segundo Cosentino & Aguero (2012), as linhagens circulantes no estado do ES são: TcI (1,6%), TcII (82,2%), TcIII (8,1%) e TcIV (8,1%). No gráfico 2, observa-se a distribuição das linhagens de *T. cruzi*, encontradas pela análise do gene TcSC5D.

**Gráfico 2** - Distribuição no Espírito Santo, das linhagens de *Trypanosoma cruzi*, classificadas a partir da análise molecular do gene TcSC5D.



Dos 61 isolados que foram sequenciados, a partir da região intergênica do gene de calmodulina e do gene TcSC5D, houve concordância entre 25 amostras analisadas.



As demais amostras, que haviam sido classificadas como TcII-like pelo gene de calmodulina, quando caracterizadas pelo gene TcSC5D foram confirmadas como TcII. Em nosso estudo, foi definido como padrão-ouro o método que utiliza o sequenciamento a partir do gene TcSC5D (COSENTINO & AGUERO, 2012), considerando que esse gene, sequenciado nas cepas de referência, permite a identificação das seis linhagens de *T. cruzi*. Na tabela 3, observa-se a classificação dos isolados, tanto para região intergênica do gene de calmodulina, como para o gene TcSC5D, sendo possível fazer a comparação entre os resultados obtidos. Na figura 7, é possível ver a distribuição por município, das linhagens que circulam no ES.

**Tabela 3** - Classificação das linhagens de *Trypanosoma cruzi* pela região intergênica do gene de calmodulina e pelo gene TcSC5D. Distribuição por município do Espírito Santo e espécies de triatomíneos, das quais as amostras foram isoladas.

Isolados	Município	Espécie de triatomíneo	População de <i>T. cruzi</i> <sup>1</sup>	População de <i>T. cruzi</i> <sup>2</sup>
1	Santa Leopoldina	<i>T. vitticeps</i>	TcII-like	TcII
3	Itaguaçu	<i>T. vitticeps</i>	TcII-like	TcII
10	Iconha	<i>T. vitticeps</i>	TcII-like	TcII
11	Vargem Alta	<i>T. vitticeps</i>	TcII	TcII
16	Rio Novo do Sul	<i>T. vitticeps</i>	TcII-like	TcII
19	Vargem Alta	<i>T. vitticeps</i>	TcII	TcII
21	Anchieta	<i>T. vitticeps</i>	TcII-like	TcII
21-E	Vargem Alta	<i>T. vitticeps</i>	TcII	TcII
23	Alfredo Chaves	<i>T. vitticeps</i>	TcII	TcII
23-E	Cariacica	<i>T. vitticeps</i>	TcII	TcII
24	Iconha	<i>T. vitticeps</i>	TcII	TcII
25	Alfredo Chaves	<i>T. vitticeps</i>	TcII-like	TcII
29	Linhares	<i>T. vitticeps</i>	TcII-like	TcII
30	Santa Leopoldina	<i>T. vitticeps</i>	TcII-like	TcII
31	Itaguaçu	<i>T. vitticeps</i>	TcII-like	TcII

---

32	Rio Novo do Sul	<i>T. vitticeps</i>	TcII-like	TcII
34	Alfredo Chaves	<i>P. geniculatus</i>	TcII-like	TcII
41	Guarapari	<i>T. vitticeps</i>	TcII-like	TcII
45	Muniz Freire	<i>T. vitticeps</i>	TcII	TcII
49	Iconha	<i>P. geniculatus</i>	TcIII	TcIII
52	Alfredo Chaves	<i>T. vitticeps</i>	TcII	TcII
53	Santa Leopoldina	<i>T. vitticeps</i>	TcIII	NA
54	Santa Leopoldina	<i>T. vitticeps</i>	TcIII	TcIII
55	Guarapari	<i>T. vitticeps</i>	TcII-like	TcII
62	Castelo	<i>T. vitticeps</i>	TcIV	TcIV
64	Venda Nova do Imigrante	<i>T. vitticeps</i>	TcIV	TcIV
65	Iconha	<i>T. vitticeps</i>	TcIII	TcIII
66	Muniz Freire	<i>T. vitticeps</i>	TcIV	TcIV
67	Ecoporanga	<i>T. vitticeps</i>	TcII-like	TcII
73	Conceição do Castelo	<i>T. vitticeps</i>	TcII-like	TcII
75	Anchieta	<i>T. vitticeps</i>	TcII-like	TcII
83	Alfredo Chaves	<i>T. vitticeps</i>	TcII-like	TcII
86	Muqui	<i>T. vitticeps</i>	TcII-like	TcII
96	Muqui	<i>T. vitticeps</i>	TcII-like	NA
109	Anchieta	<i>T. vitticeps</i>	TcII-like	TcII
113	Alfredo Chaves	<i>T. vitticeps</i>	TcII	TcII
114	Alfredo Chaves	<i>T. vitticeps</i>	TcII-like	NA
115	Linhares	<i>T. vitticeps</i>	NA	TcI
122	Iconha	<i>T. vitticeps</i>	TcII-like	NA
127	Alfredo Chaves	<i>T. vitticeps</i>	TcII-like	NA
127-E	Rio Bananal	<i>T. vitticeps</i>	TcII	TcII

---

---

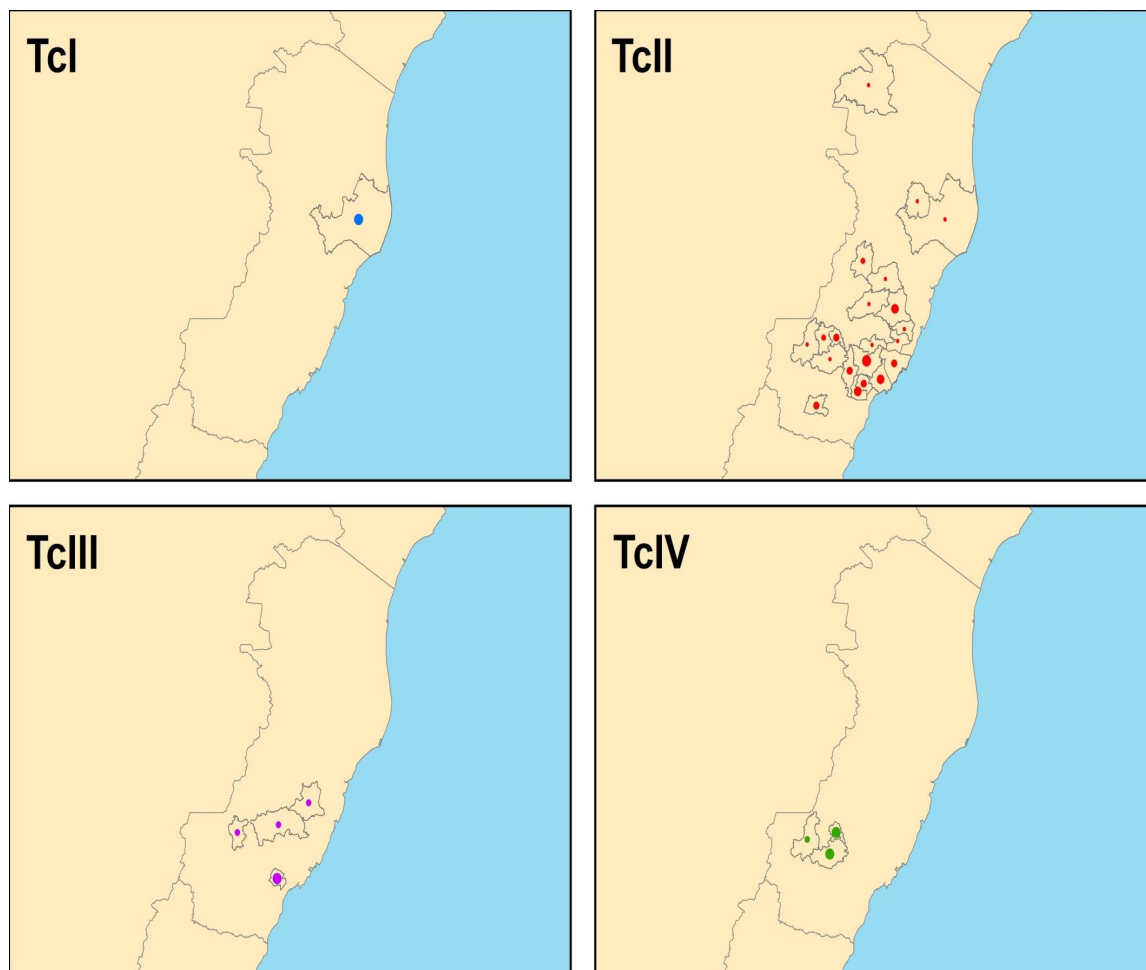
<b>129</b>	Muqui	<i>T. vitticeps</i>	TcII-like	TcII
<b>132</b>	Alfredo Chaves	<i>T. vitticeps</i>	TcII-like	TcII
<b>134-E</b>	Santa Teresa	<i>T. vitticeps</i>	TcII-like	TcII
<b>138</b>	Marechal Floriano	<i>T. vitticeps</i>	TcII-like	TcII
<b>143</b>	Domingos Martins	<i>P. geniculatus</i>	TcIII	TcIII
<b>152</b>	Anchieta	<i>T. vitticeps</i>	TcII-like	TcII
<b>153</b>	Guarapari	<i>T. vitticeps</i>	TcII-like	TcII
<b>156</b>	Alfredo Chaves	<i>T. vitticeps</i>	TcII-like	TcII
<b>159</b>	Venda Nova do Imigrante	<i>T. vitticeps</i>	TcII	TcII
<b>160</b>	Venda Nova do Imigrante	<i>T. vitticeps</i>	TcII-like	TcII
<b>165</b>	Alfredo Chaves	<i>T. vitticeps</i>	TcII-like	TcII
<b>168</b>	Alfredo Chaves	<i>P. geniculatus</i>	TcII-like	TcII
<b>196</b>	Venda Nova do Imigrante	<i>T. vitticeps</i>	TcII	TcII
<b>201</b>	Santa Leopoldina	<i>T. vitticeps</i>	TcII-like	TcII
<b>203</b>	Santa Leopoldina	<i>T. vitticeps</i>	TcII	TcII
<b>205</b>	Viana	<i>T. vitticeps</i>	TcII	TcII
<b>209</b>	Iconha	<i>T. vitticeps</i>	TcII-like	TcII
<b>210</b>	Castelo	<i>T. vitticeps</i>	TcIV	TcIV
<b>214</b>	Muqui	<i>T. vitticeps</i>	TcII-like	TcII
<b>215</b>	Venda Nova do Imigrante	<i>T. vitticeps</i>	TcIV	TcIV
<b>217</b>	Santa Maria de Jetibá	<i>T. vitticeps</i>	TcII-like	TcII
<b>221</b>	Rio Novo do Sul	<i>T. vitticeps</i>	TcII-like	TcII

---

229	Conceição do Castelo	<i>T. vitticeps</i>	TcIII	TcIII
231	Castelo	<i>T. vitticeps</i>	TcII-like	TcII
235	Rio Novo do Sul	<i>T. vitticeps</i>	TcII	TcII
241	Conceição do Castelo	<i>T. vitticeps</i>	TcII-like	TcII

1- Isolados de *Trypanosoma cruzi* amplificadas pela região intergênica do gene de calmodulina; 2- Isolados amplificadas pelo gene TcSC5D; NA - Isolados não amplificadas.

**Figura 7** - Distribuição das linhagens de *Trypanosoma cruzi* nos municípios do estado do Espírito Santo.



# **DISCUSSÃO**

## 5. DISCUSSÃO

### 5.1 Ocorrência e taxa de infecção de espécies de triatomíneos no Espírito Santo

Muito se questiona a ocorrência das sete espécies de triatomíneos encontradas no estado do ES, principalmente em relação à espécie *C.pilosa*. Sua ocorrência foi descrita, porém não há relatos de encontro da mesma no ambiente. Em nosso estudo, foram coletadas cinco espécies de triatomíneos, sendo essas as mesmas encontradas nos estudos realizados por Leite e colaboradores (2011).

Em relação à taxa de infecção natural de triatomíneos por formas flageladas semelhantes a *T. cruzi*, foi observado que 67,65% dos triatomíneos apresentaram-se positivos. Santos e colaboradores (2006) estudaram a taxa de infecção natural de triatomíneos da espécie *T. vitticeps*, observando que 86,2% dos espécimes coletados apresentaram formas flageladas semelhantes a *T. cruzi* na ampola retal. Em nosso estudo, analisando a partir do número total de triatomíneos positivos, 64,96% estavam infectados com formas flageladas. Esses altos índices de infecção demonstram uma relação entre *T. vitticeps* e mamíferos silvestres, indicando a capacidade da espécie de manter o ciclo silvestre da doença de Chagas no ES (SANTOS *et al.*, 2005; SANTOS *et al.*, 2006). Apesar de *T. vitticeps* apresentar altos índices de infecção e ser encontrado com frequência no ambiente intradomiciliar (GONÇALVES *et al.*, 2000), é baixa a incidência da doença de Chagas no estado do ES, devido à espécie não ser um bom vetor da doença. Isso se deve ao hábito tardio de eliminar suas excretas após o repasto sanguíneo (SANTOS *et al.*, 2004).

Outras duas espécies, *P. geniculatus* e *P. megistus*, também foram encontradas infectadas com formas flageladas semelhantes a *T. cruzi*, porém com uma taxa de infecção menor. Estudo realizado por Cardoso de Paula e colaboradores (2010) no estado de Minas Gerais, mostrou uma taxa de infecção em *P. megistus* de 8.3%. Sabe-se que *P. megistus* é um bom vetor da doença de Chagas e ele se apresenta domiciliado nas regiões de cerrado e caatinga, transmitindo o protozoário para humanos. Não se tem uma explicação concreta, porque essa espécie não apresenta capacidade de se adaptar ao ambiente doméstico na região de mata Atlântica (BARBOSA *et al.*, 2006).

Estudo realizado no ES (SANTOS *et al.*, 2006) relata a infecção natural de triatomíneos por formas flageladas morfológicamente semelhantes a *T. cruzi* encontradas no trato digestivo dos insetos. Em nosso estudo, a parasitemia causada pelos flagelados em camundongos comprova que esses são verdadeiramente formas evolutivas de *T. cruzi*, mesmo que não tenha sido realizado o exame histopatológico do músculo cardíaco dos camundongos infectados. Martins (2006), por sua vez, observou ninhos de amastigotas no músculo cardíaco de camundongos infectados por formas flageladas encontradas no trato digestivo de *T. vitticeps*, sendo a maioria dos triatomíneos capturada nos mesmos municípios em que foram coletados os exemplares utilizados em nosso estudo.

## **5.2 Análise da região intergênica do gene de calmodulina**

A região intergênica do gene de calmodulina, mais especificamente a região 3'UTR, demonstra ser um marcador molecular para tipagem de isolados de *T. cruzi*, de acordo com a classificação TcI, TcII e Z3, sendo observadas mutações características, as quais distinguem esses três grupos, segundo Brandão & Fernandes (2006). Em nosso trabalho, foi feita análise de cepas de referência para classificação atual das linhagens de *T. cruzi* (ZINGALES *et al.*, 2009) pela região intergênica do gene de calmodulina.

Em nosso estudo, observaram-se mutações específicas no segmento 3'UTR de cepas de referência (3663 e 4167), antes classificadas como Z3 (MENDONÇA *et al.*, 2002; CAMPBELL *et al.*, 2004). O resultado permite identificá-las como TcIII e TcIV, respectivamente, conforme classificação já estabelecida por Zingales e colaboradores (2009). Em relação às cepas de referência de populações TcV e TcVI, as mutações foram semelhantes, dificultando a identificação de mutações características de cada população.

Mesmo que o sequenciamento da região intergênica do gene de calmodulina permita identificar diferentes linhagens de *T. cruzi*, em nosso estudo foi possível identificar somente mutações referentes a quatro grupos (TcI-TcIV). Estudos mais apurados, com um número maior de cepas de referência, seriam necessários para definir se esse marcador é capaz de identificar as seis linhagens de *T. cruzi*.

### 5.3 Linhagens de *Trypanosoma cruzi* no Espírito Santo

Estudos realizados no Brasil revelaram a existência de uma população heterogênea de *T. cruzi* (STURM *et al.*, 2010), com a ocorrência das seis linhagens de *T. cruzi* (I-VI), em diversas regiões do país (COURA *et al.*, 2002; MILES *et al.*, 2003). Por meio de nosso estudo, foi possível observar que a linhagem de *T. cruzi* que circula nas espécies de triatomíneos da mata Atlântica do ES é heterogênea, ocorrendo um predomínio de TcII e o aparecimento de TcI, TcIII e TcIV.

TcII é encontrado nas regiões centrais e sul da América do Sul, porém sua existência não está bem esclarecida (ZINGALES *et al.*, 2012). É raramente encontrado no ciclo silvestre e seu nicho ecológico ainda deve ser definido (MILES *et al.*, 2009). Em estudos realizados na mata Atlântica do estado do Rio de Janeiro, onde foi isolado *T. cruzi* de reservatórios e triatomíneos silvestres, observou-se uma adaptação de TcII a primatas, levando a crer que são os hospedeiros primários de TcII (FERNANDES *et al.*, 1999; LISBOA *et al.*, 2004; LISBOA *et al.*, 2006). Essa linhagem também pode ser encontrada em outros mamíferos (PINHO *et al.*, 2000). Em estudos realizados no Chaco paraguaio, TcII foi isolado de tatu-peba (*Euphractus sexcinctus*). Por isso, seria importante o isolamento de *T. cruzi* de edentados e marsupiais terrestres na região da mata Atlântica (YEO *et al.*, 2005). TcII está associado à fase crônica da doença de Chagas, ao aparecimento de manifestações cardíacas e digestivas (megaesôfago e megacólon) (LAGES-SILVA *et al.*, 2006).

Apesar de vetores da doença de Chagas no estado do ES não apresentarem capacidade de se tornarem domiciliados (SANTOS *et al.*, 2006), o aparecimento de TcII foi predominante no ambiente silvestre. *T. cruzi* circula em mais de 200 espécies de mamíferos no continente Americano (BRENER, 1973) e sua circulação no ambiente silvestre já existia antes mesmo da domiciliação dos triatomíneos. Muito provável, TcII está relacionado ao ciclo de transmissão domiciliar, devido à circulação em triatomíneos que se adaptaram a esse ambiente, como *T. infestans* e *P. geniculatus*, daí seu predomínio nos casos humanos da doença de Chagas na região Centro-Sul da América do Sul (FERNANDES *et al.*, 1999).



Em Linhares, município do norte do estado do ES, apenas um isolado foi identificado como TcI. Essa linhagem é encontrada principalmente nos países da América Central, na região norte da América do Sul e na região amazônica do Brasil (MILES *et al.*, 1981a). Apresenta como principais reservatórios terrestres mamíferos arborícolas, marsupiais da espécie *Didelphis marsupialis*, mas também já foi isolado de primatas na região Amazônica e na mata Atlântica no estado do Rio de Janeiro, tendo, como principais vetores, triatomíneos do gênero *Rhodnius*, a maioria associada à ecótopos onde aparecem palmeiras (PÓVOA *et al.*, 1984; YEO *et al.*, 2005; LISBOA *et al.*, 2006; LLEWELLYN *et al.*, 2009; MARCILI *et al.*, 2009a; ARAÚJO *et al.*, 2011). Pode-se dizer que TcI está associado ao ciclo de transmissão arborícola, porém existem linhagens de TcI encontradas em regiões áridas e rochosas, como relatado no estado do Piauí (HERRERA *et al.*, 2005).

Observa-se que TcI é predominantemente silvestre e sua ligação com o ciclo doméstico acontece devido à invasão de abrigos por roedores no período de seca (LUQUETTI *et al.*, 1986). Em países da América Central, como Panamá (SAMUDIO *et al.*, 2007), e norte da América do Sul, como Colômbia (MONTILLA *et al.*, 2002; ZAFRA *et al.*, 2008) e Venezuela (ANEZ *et al.*, 2004), os pacientes chagásicos apresentam infecção com a linhagem TcI. Nesses países, não se observou a ocorrência de megaesôfago e megacólon em pacientes na fase crônica (MILES *et al.*, 1981a).

TcIII foi encontrado nos seguintes municípios do ES: Iconha, Santa Leopoldina, Domingos Martins e Conceição do Castelo, região centro-sul do estado. Essa linhagem é considerada um híbrido de TcI e TcII (WESTENBERG *et al.*, 2005). Apresenta ampla distribuição geográfica, é raramente isolada de humanos, porém existem casos encontrados na Amazônia e no Sudeste brasileiro (GAUNT & MILES, 2000; MILES *et al.*, 2009; MARCILI *et al.*, 2009b). Apresenta como reservatórios animais terrestres, principalmente o tatu da espécie *Dasyurus novemcinctus*, mas, também, essa linhagem pode ser isolada de outros animais terrestres como marsupiais do gênero *Monodelphis*, jaritaca do gênero *Conepatus* e roedores terrestres (YEO *et al.*, 2005; CARDINAL *et al.*, 2008; MARCILI *et al.*, 2009b). Estudo realizado por Umezawa e colaboradores (2009), possibilitou o isolamento dessa linhagem em cães no estado do Mato Grosso do Sul, sendo também isolada em cães no Paraguai e na Argentina (CHAPMAN *et al.*, 1984; BARNABÉ *et al.*, 2001;

CARDINAL *et al.*, 2008). Esse fato pode ser preocupante para os agentes de saúde, pois a presença do cão como reservatório de TcIII no ambiente domiciliar, poderia gerar um surto da doença, devido ao seu contato muito próximo com o ser humano. Triatomíneos terrestres são os principais vetores de TcIII, tendo como a principal espécie *P. geniculatus* (MILES *et al.*, 1981b; GAUNT & MILES, 2000). Outros vetores relatados são *T. rubrovaria* no sul do Brasil (MARTINS *et al.*, 2008) e *T. infestans* na Argentina (CARDINAL *et al.*, 2008). Esses achados corroboram nosso estudo, onde foi encontrado TcIII em espécies de *P. geniculatus* e em *T. vitticeps*, ambos apresentando como fontes alimentares marsupiais, edentados e roedores (CARCAVALHO *et al.*, 1998).

A linhagem TcIV foi encontrada nos municípios de Castelo, Venda Nova do Imigrante e Muniz Freire, região centro-sul do ES. Poucos isolados de TcIV estão disponíveis e pouco se sabe sobre seus nichos ecológicos. Há relatos de TcIV ter sido isolado de tatus da espécie *Dasypus novemcinctus*, de marsupiais do gênero *Monodelphis* e de alguns primatas dos gêneros *Saguinus*, *Aotus* e *Cebus*, todos esses na região Amazônica (MILES *et al.*, 2009; MARCILLI *et al.*, 2009a). Está também associada a vetores do gênero *Rhodnius* (*R. robustus* e *R. brethesi*), circulando na transmissão arbórea do parasito (MARCILLI *et al.*, 2009a). Em nosso estudo, esta população foi isolada de *T. vitticeps*, mostrando que tanto *Triatoma* como *Rhodnius* apresentam fontes alimentares semelhantes (CARCAVALHO *et al.*, 1998). Essa linhagem, junto com TcI, são endêmicas na região Norte do país, como relatado por Monteiro e colaboradores (2012), onde pacientes da região Amazônica que estavam na fase aguda da doença de Chagas apresentaram infecção por *T. cruzi* da linhagem TcIV.

Mesmo relatando os reservatórios silvestres das linhagens TcI, TcII, TcIII e TcIV, em outras regiões do país, não se sabe quais são os reservatórios dessas, na região de mata Atlântica do ES. Pouco se conhece sobre possíveis reservatórios do parasito entre os animais que circulam nesse ambiente, dificultando estabelecer a origem dessas linhagens. O único relato sobre um possível reservatório de *T. cruzi* foi feito por Santos e colaboradores (2005), onde foram observadas colônias de *T. vitticeps* junto a ninhos de gambá da espécie *Didelphis aurita*, em ambiente domiciliar. Porém, na época, não foi realizada a caracterização molecular dos parasitos isolados desses triatomíneos. O comportamento sinantrópico do gambá,

considerado fonte alimentar para o *T. vitticeps*, aumenta a chance de TcII circular no ambiente doméstico. Tal fato pode ter contribuído para o surto ocorrido em Navegantes, Santa Catarina, área não endêmica para doença de Chagas, onde *Didelphis sp.* foi encontrado infectado por *T. cruzi* e triatomíneos silvestres albergavam TcII (ROQUE *et al.*, 2008). No município de Teresópolis, Rio de Janeiro, Araújo e colaboradores (2011) identificaram TcI e TcII de um mesmo isolado, originário de um marsupial da espécie *D. aurita*. Nessa região, é comum o encontro de *T. vitticeps* procedente do ambiente silvestre (CARCAVALHO *et al.*, 1999; LOROSA *et al.*, 2003).

O aparecimento de TcIV, na região da mata Atlântica do ES ressalta a teoria do “enclave amazônico”, sustentada pela hipótese de que, há milhares de anos, a mata Atlântica e a floresta Amazônica seriam ligadas (COSTA, 2003). O aparecimento de espécies da região Amazônica na Mata Atlântica do ES também foi relatado por Pinto e colaboradores (2010) e Silva e colaboradores (2013), em estudos sobre flebotomíneos e anofelinos, respectivamente. Agora mais uma vez, essa teoria é reforçada com aparecimento de população de *T. cruzi* que ocorre tanto na região Amazônica como na mata Atlântica do ES.

Este trabalho foi pioneiro no estado do ES, pois, poucos estudos foram feitos em relação a *T. cruzi* que circula na mata Atlântica. Uma complementação desse estudo deve ser feita, para um melhor entendimento da existência dessas linhagens, considerando a falta de conhecimento dos possíveis reservatórios do parasito na região.

# **CONCLUSÕES**

## 6. CONCLUSÕES

- As formas flageladas semelhantes a *T. cruzi* encontradas no trato digestivo dos triatomíneos silvestres em nosso trabalho são de fato *T. cruzi*;
- Os isolados de *T. cruzi* provenientes desses triatomíneos foram caracterizadas tanto pela região intergênica do gene de calmodulina, como pelo gene TcSC5D, sendo classificadas como TcI, TcII, TcIII e TcIV, com um predomínio de população TcII nesta região. Uma mesma espécie de triatomíneo alberga diferentes linhagens de *T. cruzi*, mostrando que podem circular diferentes parasitos em um mesmo vetor;
- O aparecimento da linhagem TcIV, reforça a teoria do “enclave amazônico”, sustentada pela hipótese de que as florestas Amazônica e Atlântica teriam sido ligadas, há milhares de anos;
- O predomínio de TcII no ES pode elevar o potencial para desenvolvimento da forma mais grave da doença de Chagas em humanos. Contudo, o vetor da doença, *T. vitticeps*, não é considerado um bom transmissor, por não apresentar a capacidade de se tornar domiciliado.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALJANABI S.M.; MARTINEZ I. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. **Nucleic Acids Research**, v. 25, n 22, p. 4692-4693, 1997.

AMATO NETO, V.; CHIEFFI, P. P.; NISIDA, I. V. V.; UMEZAWA, E. S.; SABINO, E. C.; RUOCCO, R. M. S. A.; LOPES, M. H.; DIAS, J. C. P. Prevenção referente às modalidades alternativas de transmissão do *Trypanosoma cruzi*. **Revista de medicina**, v. 79, n. 1, p. 12-26, 2000.

ANDRADE, S. G. Caracterização de cepas do *Trypanosoma cruzi* isoladas no Recôncavo Baiano. **Revista de Patologia Tropical**, v. 3, p. 65-121, 1974.

ANDRADE, S. G.; MAGALHÃES, J. B. Biodemes and zymodemes of *Trypanosoma cruzi* strains: correlations with clinical data and experimental pathology. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 30, p. 27-53, 1997.

ANEZ, N.; CRISANTE, G.; SILVA, F. M. D.; ROJAS, A.; CARRASCO, H.; UMEZAWA, E. S.; STOLF, A. M. S.; RAMIREZ, J. L.; TEIXEIRA, M. M. G. Predominance of lineage I among *Trypanosoma cruzi* isolates from Venezuelan patients with different clinical profiles of acute Chagas disease. **Tropical Medicine & International Health**, v.9, p.1319–1326, 2004.

ANONYMOUS. Recommendations from a satellite meeting. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94, p. 429-432, 1999.

ARAÚJO, C.A.C.; WANIEK, P.J.; XAVIER, S.C.C.; JANSEN, A.M. Genotype variation of *Trypanosoma cruzi* isolates from different Brazilian biomes. **Experimental Parasitology**, v. 127, p. 308-312, 2011.

BARBOSA, S. E.; BELISÁRIO, C. J.; SOUZA, R. C. M.; PAULA, A. S.; LINARDI, P. M.; ROMANHA, A. J.; DIOTAIUTI, L. Biogeography of Brazilian populations of *Panstrongylus megistus* (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) based on molecular marker and paleo vegetational data. **Acta Tropica**, v. 99, p. 144-154, 2006.

BARNABÉ, C.; YAEGER, R.; PUNG, O.; TIBAYRENC, M. *Trypanosoma cruzi*: a considerable phylogenetic divergence indicates that the agent of Chagas disease is indigenous to the native fauna of the United States. **Experimental Parasitology**, v. 99, p. 73-79, 2001.

BARRETO, MP. Reservatórios de *Trypanosoma cruzi* nas Américas. **Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais**, v.16, p. 527-552, 1964.

BARRETTO, M.P.; RIBEIRO, R.D.; ROCHA, G.M. Forest reservoirs and vectors of *Trypanosoma cruzi*. LXXVIII. Geographical distribution of triatomids in the Paranaíba River valley, Brazil. **Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais**, v. 32, p. 1-8, 1979.

BARROS, G.C.; MAYRINK, W.; SALGADO, A.A.; BARROS, R.C.G.; SESSA, P.A. Contribuição para o conhecimento da doença de Chagas autóctone no estado do Espírito Santo. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 17, p. 319-329, 1975.

BRANDÃO, A.; FERNANDES, O. *Trypanosoma cruzi*: Mutations in the 3' untranslated region of calmodulin gene are specific for lineages *T. cruzi* I, *T. cruzi* II and the Zymodeme III isolates. **Experimental Parasitology**, v. 112, p. 247-252, 2006.

BRANDÃO, A. The untranslated regions of genes from *Trypanosoma cruzi*: perspectives for functional characterization of strains and isolates. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, n.7, p. 775-777, 2006.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. **Nota técnica doença de Chagas aguda relacionada à ingestão de caldo de cana em Santa Catarina**. Brasília: MS, p. 2, 2005.

BRENER, Z. Biology of *Trypanosoma cruzi*. **Annual Review of Microbiology**. v. 27, p. 347-382, 1973.

BRENER, Z.; ANDRADE, Z (Eds). ***Trypanosoma cruzi e a doença de Chagas***. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 1-41, 1979.

BRISSE, S.; BARNABÉ, C.; TIBAYRENC, M. Identification of six *Trypanosoma cruzi* phylogenetic lineages by random amplified polymorphic DNA and multilocus enzyme electrophoresis. **International Journal for Parasitology**, v. 39, p. 963-973, 2000.

BRISSE, S.; VERHOEF, J.; TIBAYRENC, M. Characterization of large and small subunit rRNA and mini-exon genes further supports the distinction of six *Trypanosoma cruzi* lineages. **International Journal for Parasitology**, v.31, p. 1218-1226, 2001.

BRITTO, CC. Usefulness of PCR-based assays to assess drug efficacy in Chagas disease chemotherapy: value and limitations. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.104, supl 1, p. 122-135, 2009.

CAMPBELL, D.A.; WESTENBERGER S.J.; STURM N.R. The determinants of Chagas Disease: Connecting parasite and host genetics. **Current Molecular Medicine**, v. 4, p. 549-562, 2004.

CARCAVALHO, R.U.; GIRÓN, I.G.; JURBERG, J.; LENT, H. **Atlas dos Vetores da Doença de Chagas nas Américas**. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, v. 2, 733 p, 1998.

CARCAVALHO, R.U.; GIRÓN, I.G.; JURBERG, J.; LENT, H. **Atlas dos Vetores da Doença de Chagas nas Américas**. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, v. 3, p.747-792, 1999.

CARDOSO DE PAULA, M.B.; DA COSTA, I.N.; FREITAS, P.A.; LIMONGI, J.E.; PAJUABA NETO, A.A.; PINTO, R.M.C.; GONÇALVES, A.L.R.; COSTA-CRUZ, J.M. Occurrence of positivity for *Trypanosoma cruzi* in triatomine from municipalities in Southeastern Brazil, from 2002 to 2004. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, n. 1, p. 9-14, 2010.

CARDINAL, M.V.; LAURICELLA, M.A.; CEBALLOS, L.A.; LANATI, L.; MARCET, P.L.; LEVIN, M.J.; KITRON, U.; GÜRTLER, R.E.; SCHIJMAN, A.G. Molecular epidemiology of domestic and sylvatic *Trypanosoma cruzi* infection in rural northwestern Argentina. **International Journal for Parasitology**, v.38, p. 1533-1543, 2008.

CARNEIRO, M.; CHIARI, E.; GONÇALVES, A.M.; DA SILVA PEREIRA, A.A.; MOREL, C.M.; ROMANHA, A. Changes in the isoenzyme and kinetoplast DNA patterns of *Trypanosoma cruzi* strains induced by maintenance in mice. **Acta Tropica**, v. 47, p. 35-45, 1990.

CDC, Centers of Diseases Control and Prevention. **Disease: Chagas disease**. Disponível em: <[www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/TrypanosomiasisAmerican.htm](http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/TrypanosomiasisAmerican.htm)> Acesso em: 11 de janeiro de 2013.

CHAGAS, C. Nova tripanosomiase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova morbidade do homem. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 1, p. 159-218. 1909.

CHAPMAN, M.D.; BAGGALEY, R.C.; GODFREY-FAUSSETT, P.F.; MALPAS, T.J.; WHITE, G.; CANESE, J.; MILES, M.A. *Trypanosoma cruzi* from the Paraguayan Chaco: isoenzyme profiles of strains isolated at Makthlawaiya. **Journal of Protozoology**, v. 31, p. 482-486, 1984

CHUNG, S.H.; SWINDLE, J. Linkage of the calmodulin and ubiquitin loci in *Trypanosoma cruzi*. **Nucleic Acids Research**. v.18, p. 4561-4569, 1990.

COSENTINO, R.O.; AGÜERO, F. A simple strain typing assay for *Trypanosoma cruzi*: Discrimination of major evolutionary lineages from a single amplification product. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v.6. n.7, e1777, 2012.



COSTA, L. P. The historical bridge between the Amazon and the Atlantic forest of Brazil: a study of molecular phylogeography with small mammals. **Journal of Biogeography**, v. 30, p. 71-86, 2003.

COURA, J. R.; NOGUEIRA, E. S.; SILVA, J. R. Índices de transmissão da doença de Chagas por transfusão de sangue de doadores na fase crônica da doença. **O Hospital**, v. 69, p. 115-122, 1966.

COURA, J.R.; JUNQUEIRA, A.C.V.; FERNANDES, O.; VALENTE, S.A.S.; MILES, M.A., Emerging Chagas disease in Amazonian Brazil. **Trends in Parasitology**, v. 18, p. 171–176, 2002.

COURA, J.R. Tripanossomose, doença de Chagas. **Revista Ciência e Cultura**, v. 55, p. 30-33, 2003.

COURA, J.R. Chagas disease: what is known and what is needed - A background article. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, supl I, p. 113-122, 2007.

COURA, J.R. Doença de Chagas. In: Coura, J.R. **Síntese das doenças infecciosas e parasitárias**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.12-18, 2008.

COURA, J.R.; DIAS, J.C.P. Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease - 100 years after its Discovery. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, supl. I, p. 31-40, 2009.

DEANE, L.M. Animals reservoirs of *Trypanosoma cruzi* in Brazil. **Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais**, v. 16, p. 27-48, 1964.

DE LANA, M.; PINTO, A.; BARNABÉ, C.; QUESNEY, V.; NOÉL, S.; TIBAYRENC, M. *Trypanosoma cruzi*: compared vectorial transmissibility of three major clonal genotypes by *Triatoma infestans*. **Experimental Parasitology**, v. 90, p. 20-25, 1998.

DE SOUZA, W. Cell biology of *Trypanosoma cruzi*. **International Review of Cytology**, v. 86, p. 197-285, 1984.

DIAS, J.C.P.; FEITOSA, V.R.; FILHO, A.N.F.; RODRIGUES, V.L.C.; ALENCAR, A.S.; SESSA, P.A. Fonte alimentar e potencial vetorial de *Triatoma vitticeps* (Stal, 1859) com relação à doença de Chagas humana no estado do Espírito Santo, Brasil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 84, p. 165-173, 1989.

DIAS, J.C.P. Epidemiologia. In: Brener, Z.; Andrade, Z.; Barral-Neto, M. ***Trypanosoma cruzi* e a doença de Chagas**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p 48-74, 2000.

DIAS, J.C.; SILVEIRA, A.C.; SCHOFIELD, C.J. The impact of Chagas disease control in Latin America: a review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n.5, p. 603-612, 2002.

DIAS, J.C.P.; MACEDO, V.O. Doença de Chagas. In: Coura, J.R. **Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 557-593, 2005.

FALLA, A.; HERRERA, C.; MONTILLA, M.; VALLEJO, G.A.; GUHL, F. Haplotype identification within *Trypanosoma cruzi* I in Colombian isolates from several reservoirs, vectors and humans. **Acta Tropica**, v. 110, p. 15-21, 2009.

FERNANDES, A.J.; LUZ, Z.M.P.; VITOR, R.W.A.; DIOTAIUTI, L.; CHIARI, E. Possibilidade de autocura em gambá (*Didelphis albiventris*) naturalmente infectado pelo *Trypanosoma cruzi*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, v. 36, p. 471-473, 1994.

FERNANDES, O.; STURM, N.R.; DERRE, R.; CAMPBELL, D.A. The mini-exon gene: a genetic marker for zymodeme III of *Trypanosoma cruzi*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 95, p. 129-133, 1998.

FERNANDES, O.; MANGIA, R.H.; LISBOA, C.V.; PINHO, A.P.; MOREL, C.M.; ZINGALES, B.; CAMPBELL, D.A.; JANSEN, A.M. The complexity of the sylvatic cycle of *Trypanosoma cruzi* in Rio de Janeiro state (Brasil) revealed by the non-transcribed spacer of mini-exon gene. **Parasitology**, v. 118, p. 161-166, 1999.

FERREIRA, E.; SOUZA, P. S. A.; FILHO, M.F.; ROCHA, I. Nota sobre a distribuição geográfica do *Triatoma vitticeps* Stal, 1859 (Hemiptera, Reduviidae) no estado do Rio de Janeiro Brasil. **Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais**, v. 38, p. 11-14, 1986.

FORATINI, O. P. Biogeografia, origem e distribuição da domiciliação de triatomíneos no Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 14, p. 265-299. 1980.

FREITAS, J.M.; AUGUSTO-PINTO, L.; PIMENTA, J.R.; BASTOS-RODRIGUES, L.; GONÇALVES, V.F.; TEXEIRA, S.M.R.; CHIARI, E.; JUNQUEIRA, A.C.V.; FERNANDES, O.; MACEDO, A.M.; MACHADO, C.R.; PENA, S.D.J. Ancestral genomes, sex and the population structure of *Trypanosoma cruzi*. **Plos Pathogens**, v.2, n. 3, e24, 2006.

GALVÃO, C.; CARCAVALHO, R.; ROCHA, D.S.; JURBERG, J. A checklist of the current valid species of the subfamily Triatominae Jeannel, 1909 (Hemiptera, Reduviidae) and their geographical distribution, with nomenclatural and taxonomic notes. **Zootaxa**, v. 202, p. 1-36, 2003.

GAUNT, M.; MILES, M. The ectopes and evolution of triatomines bugs (Triatominae) and their associated trypanosomes. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 95, p. 557-565, 2000.

GOMES, Y.M.; LORENA, V.M.; LUQUETTI, A.O. Diagnosis of Chagas disease: what has been achieved? What remains to be done with regard to diagnosis and follow up studies? **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.104, supl I, p. 115-121, 2009.

GONÇALVES, T.C.; DE OLIVEIRA, E.; DIAS, L.S.; ALMEIDA, M.D.; NOGUEIRA, W.O.; PIRES, F.D. An investigation on the ecology of *Triatoma vitticeps* (Stal, 1859) and its possible role in the transmission of *Trypanosoma cruzi*, in the locality of Triunfo, Santa Maria Madalena municipal district, state of Rio de Janeiro, Brazil. **Memória do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 93, p. 711-717, 1998.

GONÇALVES, T.C.M.; ROCHA D.S.; CUNHA, R.A. Feeding patterns of *Triatoma vitticeps* in the state of Rio de Janeiro, Brazil. **Revista de Saúde Pública**, v. 34, p. 448-352, 2000.

GOVERNO DO ESTADO DO ESPÍRITO SANTO. **ES em dados-2011**. Disponível em: [www.es.gov.br/EspiritoSanto/code/Paginas/EspiritoSanto\\_em\\_dados.aspx](http://www.es.gov.br/EspiritoSanto/code/Paginas/EspiritoSanto_em_dados.aspx). Acesso em: 05 de janeiro de 2013.

HENRIKSSON, J.; PORCEL, B.; RYDAKER, M.; RUIZ, A.; SABAJ, V.; GALANTI, N.; CAZZULO, J.J.; FRASCH, C.; PETTERSSON, U. Chromosome specific markers reveal conserved linkage groups in spite of extensive chromosomal size variation in *Trypanosoma cruzi*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 73, p. 63-74, 1995.

HERRERA, L.; D'ANDREA, P.S.; XAVIER, S.C.; MANGIA, R.H.; FERNANDES, O.; JANSEN, A.M. *Trypanosoma cruzi* infection in wild mammals of the National Park "Serra da Capivara" and its surrounding (Piauí, Brazil), an area endemic for Chagas disease. **Transactions of Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 99, p. 379-388, 2005.

HERRERA, L.; D'ANDREA, P.S.; XAVIER, S.C.C.; MANGIA, R.H.; FERNANDES, O.; JANSEN, A.M. Identifying four *Trypanosoma cruzi* I isolate haplotypes from different geographic regions in Colombia. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 7, p. 535-539, 2007.

HOEFLICH, K.P.; IKURA, M. Calmodulin in action: diversity in target recognition and activation mechanisms. **Cell**, v. 108, p. 739-742, 2002.

INSTITUTO DE PESQUISAS DA MATA ATLÂNTICA. **Conservação da Mata Atlântica no Estado do Espírito Santo**: Cobertura Florestal, Unidades de Conservação e Fauna Ameaçada (Programa Centros para a Conservação da Biodiversidade - Conservação Internacional do Brasil). Vitória, 2004, 112 p.

INSTITUTO JONES DOS SANTOS NEVES. **Espírito Santo em mapas-2011**. Disponível em: [www.ijnsn.es.gov.br/sitio/index.php?option=com\\_wrapper&view=wrapper&Itemid=109](http://www.ijnsn.es.gov.br/sitio/index.php?option=com_wrapper&view=wrapper&Itemid=109). Acesso em: 05 de janeiro de 2013.

KAWASHITA, S.Y.; SANSON, G.F.O.; FERNANDES, O.; ZINGALES, B.; BRIONES, M.R.S. Maximum-likelihood divergence data estimates based on rRNA gene sequences suggest two scenarios of *Trypanosoma cruzi* intraspecific evolution. **Molecular Biology and Evolution**, v. 18, p. 2250-2259, 2001.

LAGES-SILVA, E.; RAMÍREZ, L. E.; PEDROSA, A. L.; CREMA, E.; GALVÃO, L. M. C.; PENA, S. D. J. Variability of kinetoplast DNA gene signatures of *Trypanosoma cruzi* II strains from patients with different clinical forms of Chagas' disease in Brazil. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n.6, p. 2167-2171, 2006.

LAURENT, J.P.; BARNABÉ, C.; QUESNEY, V.; NOÉ, L. S.; TIBAYRENC, M. Impact of clonal evolution on the biological diversity of *Trypanosoma cruzi*. **Parasitology**, v. 114, p. 213-221, 1997.

LEITE, G.R.; SANTOS, C.B.; FALQUETO, A. Influence of the landscape on dispersal of sylvatic triatomines to anthropic habitats in the Atlantic Forest. **Journal of Biogeography**, v. 38, p. 651-663, 2011.

LENT, H.; WYGODZINSKY, P. Triatominae. **Bulletin of the American Museum of Natural History**, v. 163, p. 496-497, 1979.

LISBOA, C.V.; MANGIA, R.H.; DE LIMA, N.R.; MARTINS, A.; DIETZ, J.; BAKER, A.J.; RAMON-MIRANDA, C.R.; FERREIRA, L.F.; FERNANDES, O.; JANSEN, A.M. Distinct patterns of *Trypanosoma cruzi* infection in *Leontopithecus rosalia* in distinct Atlantic coastal rainforest fragments in Rio de Janeiro-Brazil. **Parasitology**, v. 129, p. 703-711, 2004.

LISBOA, C.V.; MANGIA, R.H.; LUZ, S.L.B.; KLUCZKOVSKIA, A.Jr.; FERREIRA, L.F.; RIBEIRO, C.T.; FERNANDES, O.; JANSEN, A.M. Stable infection of primates with *Trypanosoma cruzi* I e II. **Parasitology**, v. 133, p. 603-611, 2006.

LLEWELLYN, M.S.; MILES, M.A.; CARRASCO, H.J.; LEWIS, M.D.; YEO, M.; VARGAS, J.; TORRICO, F.; DIOSQUE, P.; VALENTE, V.; VALENTE, S.A.; GAUNT, M. W. Genome-scale multilocus microsatellite typing of *Trypanosoma cruzi* discrete typing unit I reveals phylogeographic structure and specific genotypes linked to human infection. **PLoS Pathogens**, v. 5, e1000410, 2009.

LOROSA, E.S.; VALENTE, M.V.M.P.; CUNHA, V.; LENT, H.; JURBERG, J. Foco de doença de Chagas em Arcádia, Estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, p.885-887, 2003.

LUQUETTI, A. O.; MILES, M. A.; RASSI, A.; DE REZENDE, J. M.; DE SOUZA, A. A.; PÓVOA, M. M.; RODRIGUES, I. *Trypanosoma cruzi* zymodemes associated with acute and chronic Chagas disease in central Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 80, p. 462-470, 1986.

MACEDO, A.M.; MARTINS, M.S.; CHIARI, E.; PENA, S.D. DNA fingerprinting of *Trypanosoma cruzi*: a new tool for characterization of strains and clones. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 55, p. 147-153, 1992.

MACHADO, C.A.; AYALA, F.J. Nucleotide sequences provide evidence of genetic exchange among distantly related lineages of *Trypanosoma cruzi*. **Proceeding of the National Academy of Science of the United States of America**, v. 98, p. 7396-7401, 2001.

MARCILLI, A.; VALENTE, V.C.; VALENTE, S.A.; JUNQUEIRA, A.C.V.; SILVA, F.M.; PINTO, A.Y.N.; NAIFF, R.D.; CAMPANER, M.; COURA, J.R.; CAMARGO, E.P.; MILES, M.A.; TEIXEIRA, M.M.G. *Trypanosoma cruzi* in Brazilian Amazonia: Lineages TcI and TcIIa in wild primates, *Rhodnius spp.* and in humans with Chagas disease associated with oral transmission. **International Journal for Parasitology**, v. 39, p. 615-623, 2009a.

MARCILLI, A.; LIMA, L.; VALENTE, V.C.; VALENTE, S.A.; BATISTA, J.S.; JUNQUEIRA, A.C.V.; SOUZA, A.I.; ROSA, J.A.; CAMPANER, M.; LEWIS, M.D.; LLEWELLYN, M.S.; MILES, M.A.; TEIXEIRA, M.M.G. Comparative phylogeography of *Trypanosoma cruzi* TcIIc: New hosts, association with terrestrial ecotopes and spatial clustering. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 9, p. 1265-1274, 2009b.

MARTINS, L.M. **Infecção natural por *Trypanosoma cruzi* em *Triatoma vitticeps* capturados em ambiente domiciliário no estado do Espírito Santo, Brasil.** [Trabalho de Conclusão de Curso]. Universidade Federal do Espírito Santo, 2006.

MARTINS, L.P.; MARCILI, A.; CASTANHO, R.E.; THEREZO, A.L.; DE OLIVEIRA, J.C.; SUZUKI, R.B.; TEIXEIRA, M.M.; DA ROSA, J.A.; SPERANC, A.M.A. Rural *Triatoma rubrovaria* from southern Brazil harbors *Trypanosoma cruzi* of lineage IIc. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 79, p. 427-434, 2008.

MENDONÇA, M. B.; NEHME, N. S.; SANTOS, S. S.; CUPOLILLO, E.; VARGAS, N.; JUNQUEIRA, A.; NAIFF, R.D.; BARRETT, T.V.; COURA, J.R.; ZINGALES, B.; FERNANDES, O. Two main clusters within *Trypanosoma cruzi* zymodeme 3 are defined by distinct regions of the ribosomal RNA cistron. **Parasitology**, v. 124, p. 177-184, 2002.

MILES, M.A.; TOYE, P.J.; OSWALD, S.C.; GODFREY, D.G. The identification by isoenzyme patterns of two distinct strain-group of *Trypanosoma cruzi*, circulating in a rural area of Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 71, n. 3, p. 217-225, 1977.

MILES, M.A.; SOUZA, A.; POVOA, M.; SHAW J.J.; LAINSON, R.; TOYE, P.J. Isozymic heterogeneity of *Trypanosoma cruzi* in the first autochthonous patient with Chagas disease in Amazonian Brazil. **Nature**, v. 272, 819-821, 1978.

MILES, M.A.; POVOA, M.M.; PRATA, A.; CEDILLOS, R.A.; DE SOUZA, A.A.; MACEDO, V. Do radically dissimilar *Trypanosoma cruzi* strains (zymodemes) cause Venezuelan and Brazilian forms of Chagas' disease?. **Lancet**, v. 20, n. 1, p. 1338-1340, 1981a.

MILES, M.A.; POVOA, M.M.; DE SOUZA, A.A.; LAINSON, R.; SHAW, J.J.; KETTERIDGE, D.S. Chagas disease in the Amazon Basin: II. The distribution of *Trypanosoma cruzi* zymodeme 1 and 3 in Pará State, North Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 75, p. 667-674, 1981b.

MILES, M.A.; YEO, M.; GAUNT, M. Genetic diversity of *Trypanosoma cruzi* and the epidemiology of Chagas disease. In: Kelly, J.M. **Molecular Mechanisms in the Pathogenesis of *Trypanosoma cruzi***. New York: Kluwer Academic/Plenum, 2003.

MILES, M.A.; LLEWELLYN, M.S.; LEWIS, M.D.; YEO, M.; BALEELA, R.; FITZPATRICK, S.; GAUNT, M.W.; MAURICIO, I.L. The molecular epidemiology and phylogeography of *Trypanosoma cruzi* and parallel research on *Leishmania*: looking back and to the future. **Parasitology**, v. 136, p. 1509-1528, 2009.

MINISTÉRIO DA SAÚDE; SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. Brazilian consensus on Chagas disease. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 38, supl 3, p. 7-29, 2005.

MONTAMAT, E.E.; DE LUCA D'ORO, G.M.; GALLERANO, R.H.; SOSA, R.; BLANCO, A. Characterization of *Trypanosoma cruzi* populations by zymodemes: correlation with clinical picture. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 55, p. 625-628, 1996.

MONTEIRO, W.M.; MAGALHÃES, L.K.C.; SÁ, A.R.N.; GOMES, M.L.; TOLEDO, M.J.O.; BORGES, L.; PIRES, I.; GUERRA, J.A.O.; SILVEIRA, H.; BARBOSA, M.G.V. *Trypanosoma cruzi* IV causing outbreaks of acute Chagas disease and infections by different haplotypes in the western Brazilian Amazonia. **Plos one**, v. 7, n.7, e41284, 2012.

MONTILLA, M.M.; GUHL, F.; JARAMILLO, C.; NICHOLLS, S.; BARNABÉ, C.; BOSSENO, M.F.; BRENIÈRE, S.F. Isoenzyme clustering of Trypanosomatidae Colombian populations. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 66, p. 394-400, 2002.

MOREL, C.M.; CHIARI, E.; CAMARGO, E.P.; MATTEI, D.M.; ROMANHA, A.J.; SIMPSON, L. Strains and clones of *Trypanosoma cruzi* can be characterized by pattern of restriction endonuclease products of kinetoplast DNA minicircles.

**Proceeding of the National Academy of Science of the United States of America**, v. 7, p. 6810-6814, 1980.

NEVES, D.P.; MELO, A.L.; LINARDI, P.M.; VITOR, R.W.A. **Parasitologia Humana**. 11 ed. São Paulo: Atheneu, 2005.

OLIVEIRA, R.P.; BROUDE, N.E.; MACEDO, A.M.; CANTOR, C.R.; SMITH, C.L.; PENA, S.D. Probing the genetic population structure of *Trypanosoma cruzi* with polymorphic microsatellites. **Proceeding of the National Academy of Science of the United States of America**, v. 95, n.7, p. 3776-3780. 1998.

PEDROSO, A.; CUPOLILLO, E.; ZINGALES, B. Evaluation of *Trypanosoma cruzi* hybrid stocks based on chromosomal size variation. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 129, n.1, p. 79-90, 2003.

PINHO, A. P.; CUPOLILLO, E.; MANGIA, R. H.; FERNANDES, O.; JANSEN, A. M. *Trypanosoma cruzi* in the sylvatic environment: distinct transmission cycles involving two sympatric marsupials. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 94, p. 509-514, 2000.

PINTO, A.; DE LANA, M.; BASTRENTA, B.; Barnabé, C.; Quesney, V.; Noel, S.; Tibayrenc, M. Compared vectorial transmissibility of pure and mixed clonal genotypes of *Trypanosoma cruzi* in *Triatoma infestans*. **Parasitology Research**, v. 84, p. 348-353, 1998.

PINTO, A.Y.N.; HARADA G.S.; VALENTE, V.C.; ABUD, J.E.A.; GOMES, F.S.; SOUZA, G.C.R.; VALENTE, S.A.S. Acomentimentos cardíacos em pacientes com doença de Chagas aguda em microepidemia familiar, em Abaetuba, na Amazônia Brasileira. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 34, p. 413-419, 2001.

PINTO, I.S.; SANTOS, C.B.; FERREIRA, A.L.; FALQUETO, A. Richness and diversity of sand flies (Diptera, Psychodidae) in an Atlantic rainforest reserve in southeastern Brazil. **Journal of Vector Ecology**, v. 35, n. 2, p. 325-331, 2010.

PÓVOA, M.M.; DE SOUZA, A.A.; NAIFF, R.D.; ARIAS, J.R.; NAIFF, M.F.; BIANCARDI, C.B.; MILES, M.A. Chagas' disease in the Amazon basin IV. Host records of *Trypanosoma cruzi* zymodemes in the states of Amazonas and Rondonia, Brazil. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 78, p. 479-487, 1984.

RASSI, A.; RASSI, J. A.; RASSI, G. G. Fase aguda. In: Brener, Z.; Andrade, Z.; Barral-Neto, M. ***Trypanosoma cruzi* e a doença de Chagas**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p 231-245, 2000.

RASSI, A. JR.; DIAS, J.C.; MARIN-NETO, J.A.; et al. Challenges and opportunities for primary, secondary, and tertiary prevention of Chagas' disease. **Heart**, v. 95, p. 524-534, 2009.

RASSI, A.J.; RASSI, A.; MARIN-NETO, J.A. Chagas disease. **Lancet**, v. 375, p. 1388-1402, 2010.

RASSI, J. A.; RASSI, A.; REZENDE, J.M. American Trypanosomiasis (Chagas disease). **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 26, p. 275-291, 2012.

REVOLLO, S.; OURY, B.; LAURENT, J.P.; BARNABÉ, C.; QUESNEY, V.; CARRIÈRE, V.; NOËL, S.; TIBAYRENC, M. *Trypanosoma cruzi*: impact of clonal evolution of the parasite on its biological and medical properties. **Experimental Parasitology**, v. 89, p.30-39, 1998.

REY, L. Parasitologia: parasitos e doenças parasitárias do homem nas Américas e na África. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

REY, L. **Parasitologia, Parasitos e Doenças Parasitárias do homem nos Trópicos Ocidentais**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 884, 2008.

ROHWEDDER, R.W. Infección chagásica en dadores de sangre y las probabilidades de transmitirla por medio de la transfusión. **Boletín Chileno de Parasitología**, v. 24, p. 88-93. 1969.

ROQUE, A.L.R.; XAVIER, S.C.C.; ROCHA, M.G.; DUARTE, A.C.M.; D'ANDREA, P.S.; JANSEN, A.M. *Trypanosoma cruzi* Transmission Cycle Among Wild and Domestic Mammals in Three Areas of Orally Transmitted Chagas Disease Outbreaks. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 79, n.5, p. 742-749, 2008.

SAMUDIO, F.; ORTEGA-BARRÍA, E.; SALDAÑA, A.; CALZADA, J. Predominance of *Trypanosoma cruzi* I among Panamanian sylvatic isolates. **Acta Tropica**, v. 101, p. 178-181, 2007.

SANTOS, C.B.; LEITE, G.R.; SESSA, P.A.; FERREIRA, A.L.; FERREIRA, G.E.M.; FALQUETO, A. Potencial vetorial de *Triatoma vitticeps* (Stal, 1859) (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) na transmissão do *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909) (Kinetoplastidae, Trypanosomatidae) no estado do Espírito Santo, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 37, n. 1, p. 186, 2004.

SANTOS, C.B.; FERREIRA, A.L.; LEITE, G.R.; FERREIRA, G.E.M.; RODRIGUES, A.A.F.; FALQUETO, A. Peridomestic colonies of *Triatoma vitticeps* (Stal, 1859) (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) infected with *Trypanosoma cruzi* in rural areas



of the State of Espírito Santo, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, p. 471-473, 2005.

SANTOS, C.B.; LEITE, G.R.; FERREIRA, G.E.M.; FERREIRA, A.L. Infecção natural de *Triatoma vitticeps* (Stal, 1859) por flagelados semelhantes à *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909) no estado do Espírito Santo. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, n. 1, p. 89-91, 2006.

SCHENONE, H.; IGLESIAS, J.; SCHENONE, S.; CONTRERAS, M.C. Infección chagásica congénita de segunda generación. **Boletín Chileno de Parasitología**, v. 42, p. 71-73, 1987.

SESSA, P.A.; CARIAS, V.R.D. Infecção natural de triatomíneos do Espírito Santo por flagelados morfológicamente semelhantes ao *Trypanosoma cruzi*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 19, p. 99-100, 1986.

SESSA, P.A.; PIMENTEL, R.R.; FERREIRA, A.L.; FALQUETO, A. Soroprevalência da doença de Chagas em crianças em idade escolar do Estado do Espírito Santo, Brasil, em 1999-2000. **Caderno de Saúde Pública**, v. 18, p. 1765-1769, 2002.

SILVA, K.S.; PINTO, I.S.; LEITE, G.R.; VIRGENS, T.M.; SANTOS, C.B.; FALQUETO, A. Ecology of anopheline mosquitoes (Diptera:Culicidae) in the central Atlantic Forest biodiversity corridor, southeastern Brazil. **Journal of Medical Entomology**, v. 50, n. 1, p. 24-30, 2013.

SOUTO, R.P.; FERNANDES, O.; MACEDO, A.M.; CAMPBELL, D.A.; ZINGALES, B. DNA markers define two major phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 83, p. 141-152, 1996.

STEINDEL, M.; TOMA, H.K.; ISHIDA, M.I.; MURTA, S.M.F.; PINTO, C.J.C.; GRISARD, E.C.; SCHLEMPERJR, B.R.; RODRIGUES, R.R.; ROMANHA, A.J. Biological and isoenzymatic characterization of *Trypanosoma cruzi* strains isolated from sylvatic reservoirs and vectors from the state of Santa Catarina, Southern Brazil. **Acta Tropica**, v. 60, p. 167-177, 1995.

STURM, N.R.; VARGAS, N.S.; WESTENBERGER, S.J.; ZINGALES, B.; CAMPBELL, D. A. Evidence for multiple hybrid groups in *Trypanosoma cruzi*. **International Journal of Parasitology**, v. 33, n.3, p. 269-79, 2003.

STURM, N.; CAMPBELL, D.A. Alternative lifestyles: the population structure of *Trypanosoma cruzi*. **Acta Tropica**, v. 115, p. 35-43, 2010.

TIBAYRENC, M.; WARD, P.; MOYA, A.; AYALA, F.J. Natural populations of *Trypanosoma cruzi*, the agente of Chagas disease, have a complex multiclonal

structure. **Proceeding of the National Academy of Science of the United States of America**, v. 83, p. 442-447, 1986

TIBAYRENC, M.; AYALA, F.J. Isoenzyme variability in *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease: genetical, taxonomical and epidemiological significance. **Evolution**, v. 42, p. 277-292, 1988.

TIBAYRENC, M.; AYALA, F.J. Towards a population genetics of microorganisms: the clonal theory of parasitic protozoa. **Parasitology Today**, v. 7, p.228-232, 1991.

TIBAYRENC, M.; NEUBAUER, K.; BARNABÉ, C.; GUERRINI, F.; SKARECKY, D.; AYALA, F.J. Genetic characterization of six parasitic protozoa: parity between random –primer DNA typing and multilocus enzyme electrophoresis. **Proceeding of the National Academy of Science of the United States of America**, v. 90, p. 1335-1339, 1993.

TIBAYRENC, M. Population genetics of parasitic protozoa and other microorganisms. **Advances in Parasitology**, v. 36, p. 47-115, 1995.

TIBAYRENC, M. Genetic epidemiology of parasitic protozoa and other infectious agents: the need for an integrated approach. **International Journal for Parasitology**, v. 28, p. 85-104, 1998.

TIBAYRENC, M.; AYALA, F. Isozyme variability of *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas' disease: genetical, taxonomical and epidemiological significance. **Evolution**, v. 42, p. 277-292, 1988.

TYLER, K.M; ENGMAN, D.M . The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. **International Journal for Parasitology**. v. 31, p. 472-481. 2001.

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

VALENTE, S.A.S; VALENTE, V.C.; FRAIHA NETO, H. Considerations on the epidemiology and transmission of Chagas' disease in the Brazilian Amazon. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94, supl. I, p. 395-398, 1999.

WEATHERLY, B.D.; BOEHLKE, C.; TARLETON, R.L. Chromosome level assembly of the hybrid *Trypanosoma cruzi* genome. **BMC Genomics**, v. 10, p. 255, 2009.

WESTENBEG, S.J.; BARNABÉ, C.; CAMPBELL, D.A.; STURM, N.R. Two hybridization events define the population structure of *Trypanosoma cruzi*. **Genetics**, v. 171, p. 527-543, 2005.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **World Health Report**. Geneva, 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Disponível em: [http://gamapserver.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Global\\_chagas\\_2009.png](http://gamapserver.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Global_chagas_2009.png). Acesso em: 01 de março de 2013.

YEO, M.; ACOSTA, N.; LLEWELLYN, M.; SÁNCHEZ, H.; ADAMSON, S.; MILES, G.A.; LÓPEZ, E.; GONZÁLEZ, N.; PATTERSON, J.S.; GAUNT, M.W.; DE ARIAS, A.R.; MILES, M.A. Origins of Chagas disease: Didelphis species are natural hosts of *Trypanosoma cruzi* I and armadillos hosts of *Trypanosoma cruzi* II, including hybrids. **International Journal for Parasitology**, v. 35, p. 225–233, 2005.

ZAFRA, G.; MANTILLA, J.C.; VALADARES, H.M.; MACEDO, A.M.; GONZÁLEZ, C.I. Evidence of *Trypanosoma cruzi* II infection in Colombian chagasic patients. **Parasitology Research**, v. 103, p. 731–734, 2008.

ZINGALES, B.; STOLF, B.S.; SOUTO, R.P.; FERNANDES, O.; BRIONES, M.R.S. Epidemiology, biochemistry and evolution of *Trypanosoma cruzi* lineages based on ribosomal RNA sequences. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94, p. 811-814, 1999.

ZINGALES, B.; ANDRADE, S.G.; BRIONES, M.R.; CAMPBELL, D.A.; CHIARI, E.; FERNANDES, O.; GUHL, F.; LAGES-SILVA, E.; MACEDO, A.M.; MACHADO, C.R.; MILES, M.A.; ROMANHA, A.J.; STURM, N.R.; TIBAYRENC, M.; SCHIJMAN, A.G. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, p. 1051-1054, 2009.

ZINGALES, B. *Trypanosoma cruzi*: um parasita, dois parasitas ou vários parasitas da doença de Chagas? **Revista da Biologia**, v. 6b, p. 44-48, 2011.

ZINGALES, B.; MILES, M.A.; CAMPBELL, D.A.; TIBAYRENC, M.; MACEDO, A.M.; TEIXEIRA, M.M.G.; SCHIJMAN, A.G.; LLEWELLYN, M.S.; LAGES-SILVA, E.; MACHADO, C.R.; ANDRADE, S.G.; STURM, N.R. The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: Rationale, epidemiological relevance and research applications. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 12, p. 240-253, 2012.

# **ANEXOS**

## ANEXO A - Ficha de captura de triatomíneos.

MINISTÉRIO DA SAÚDE  
SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE DO ESPÍRITO SANTO  
NÚCLEO ESPECIAL DE VIGILÂNCIA AMBIENTAL



Nº PIT ou US

## FICHA DE CAPTURA DE TRIATOMÍNEOS

REGIONAL: \_\_\_\_\_  
MUNICÍPIO: \_\_\_\_\_ LOCALIDADE DE CAPTURA: \_\_\_\_\_  
Nº DA CASA: \_\_\_\_\_ Nº DE HABITANTES \_\_\_\_\_ Nº DE CÔMODOS: \_\_\_\_\_ Nº DE ANEXOS: \_\_\_\_\_  
TIPO DE CONSTRUÇÃO DA CASA / PAREDE: \_\_\_\_\_ TETO: \_\_\_\_\_ PISO: \_\_\_\_\_  
DISTÂNCIA DOS ANEXOS EM RELAÇÃO À CASA: \_\_\_\_\_ m USO DE DESALOJANTE:  SIM  NÃO  
Nº DE EXEMPLARES CAPTURADOS/ DENTRO DE CASA: \_\_\_\_\_ FORA DE CASA (CASA): \_\_\_\_\_ TOTAL: \_\_\_\_\_  
LOCAL DE CAPTURA / INTRADOMICÍLIO (Dentro de Casa): QUARTO  SALA  COZINHA  OUTROS   
LOCAL DE CAPTURA/PERIDOMICÍLIO (Fora de Casa): GALINHEIRO  CHIQUEIROS  PAIOL  OUTROS   
CONDIÇÕES DOS EXEMPLARES ENCAMINHADOS AO LABORATÓRIO/ VIVOS: \_\_\_\_\_ MORTOS: \_\_\_\_\_ TOTAL: \_\_\_\_\_  
PRESENÇA DE OVOS:  SIM  NÃO  
NOME DO CAPTURADOR (OU INFORMANTE): \_\_\_\_\_ DATA DA CAPTURA: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

## LABORATÓRIO DE IDENTIFICAÇÃO E EXAME

## TRIAMOMÍNEOS COM CAPTURA INTRA-DOMICILIAR

ESPÉCIE																
	ESTÁDIO	EXA.	POS.	NEG.	SCE.	TOT.	EXA.	POS.	NEG.	SCE.	TOT.	EXA.	POS.	NEG.	SCE.	TOT.
ADULTO - FÊMEA																
ADULTO - MACHO																
NINFA 5º ESTÁDIO																
NINFA 4º ESTÁDIO																
NINFA 3º ESTÁDIO																
NINFA 2º ESTÁDIO																
NINFA 1º ESTÁDIO																
TOTAL																

## TRIAMOMÍNEOS COM CAPTURA PERI-DOMICILIAR

ESPÉCIE																
	ESTÁDIO	EXA.	POS.	NEG.	SCE.	TOT.	EXA.	POS.	NEG.	SCE.	TOT.	EXA.	POS.	NEG.	SCE.	TOT.
ADULTO - FÊMEA																
ADULTO - MACHO																
NINFA 5º ESTÁDIO																
NINFA 4º ESTÁDIO																
NINFA 3º ESTÁDIO																
NINFA 2º ESTÁDIO																
NINFA 1º ESTÁDIO																
TOTAL																

EXA= examinados, POS= positivos, NEG= negativos, SCE= sem condições de exame, TOT= total

LABORATORISTA

DATA