

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE ARARAQUARA

**Estudo morfológico e molecular de quatro cepas de *Trypanosoma cruzi*
(Kinetoplastida, Trypanosomatidae) isoladas de *Triatoma melanica* e *Triatoma
sherlocki* (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae)**

Orientanda: Letícia Moreno Ambrozini

Orientador: Prof. Dr. João Aristeu da Rosa

Coorientação: Dra. Aline Rimoldi Ribeiro

Araraquara, SP

2021

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE ARARAQUARA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS E
BIOTECNOLOGIA APLICADAS À FARMÁCIA

Letícia Moreno Ambrozini

**Estudo morfológico e molecular de quatro cepas de *Trypanosoma cruzi*
(Kinetoplastida, Trypanosomatidae) isoladas de *Triatoma melanica* e *Triatoma
sherlocki* (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae)**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em **Biociências e Biotecnologia
Aplicadas à Farmácia**, área de concentração:
Parasitologia.

Orientador: Prof. Dr. João Aristeu da Rosa

Coorientação: Dra. Aline Rimoldi Ribeiro

Araraquara, SP

2021

A496e Ambrozini, Letícia Moreno.
Estudo morfológico e molecular de quatro cepas de *Trypanosoma cruzi* (Kinetoplastida, Trypanosomatidae) isoladas de *Triatoma melanica* e *Triatoma sherlocki* (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) / Letícia Moreno Ambrozini. – Araraquara: [S.n.], 2021.
70 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia. Área de concentração Parasitologia.

Orientador: João Aristeu da Rosa.
Coorientadora: Aline Rimoldi Ribeiro.

1. *Trypanosoma cruzi*. 2. DTU. 3. Caracterização. I. Rosa, João Aristeu da, orient. II. Ribeiro, Aline Rimoldi, coorient. III. Título.

Diretoria do Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP - Campus de Araraquara

CAPEs: 33004030081P7
Esta ficha não pode ser modificada

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Estudo morfológico e molecular de quatro cepas de *Trypanosoma cruzi* (Kinetoplastida, Trypanosomatidae) isoladas de *Triatoma melanica* e *Triatoma sherlocki* (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae)

AUTORA: LETÍCIA MORENO AMBROZINI

ORIENTADOR: JOAO ARISTEU DA ROSA

COORIENTADORA: ALINE RIMOLDI RIBEIRO

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em BIOCÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA APLICADAS À FARMÁCIA, área: Análises Clínicas pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. JOAO ARISTEU DA ROSA (Participação Virtual)

Departamento de Ciências Biológicas / Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Câmpus de Araraquara da UNESP

Prof. Dr. SÉRGIO DE ALBUQUERQUE (Participação Virtual)

Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas / Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP - Ribeirão Preto

Profa. Dra. MARA CRISTINA PINTO (Participação Virtual)

Departamento de Ciências Biológicas / Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Câmpus de Araraquara da UNESP

Araraquara, 19 de março de 2021

Dedico este trabalho aos meus pais, José e Maria da Graça, que com muito carinho sempre estiveram ao meu lado dando todo o apoio e suporte que necessário para que eu chegasse até aqui. Às minhas irmãs araraquenses, Mariely e Fernanda, que me ensinaram o verdadeiro significado de amizade.

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Parasitologia - Departamento de Ciências Biológicas - Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP, Araraquara, com apoio da CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), por meio de concessão de bolsa de estudos de mestrado pelo Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus, por ter me dado coragem, discernimento e sabedoria para enfrentar todos os desafios da pesquisa.

Ao meu orientador, Prof. Dr. João Aristeu da Rosa pela confiança depositada em mim e por todos os ensinamentos passados nesses anos de trabalho. O senhor é exemplo de determinação e amor à pesquisa.

À minha coorientadora, Dra. Aline Rimoldi Ribeiro pelos ensinamentos práticos e teóricos, por toda dedicação e suporte dados a mim, possibilitando que este trabalho fosse realizado com muito amor. Você é um exemplo de dedicação e determinação.

Agradeço aos meus colegas de laboratório: Rossana, Juliana, Gabriela, Heloísa, Vinicius, Tiago, Jader, André e Alef, obrigada a cada um, vocês fizeram com que os dias de trabalho fossem mais leves. Com vocês cresci muito pessoal e profissionalmente.

Aos meus colaboradores Me. Camila Maringolo e Me. Leandro da Costa Clementino, pelas contribuições e ajuda no aprendizado das técnicas de molecular e cultivo celular.

Gratidão aos meus pais, José e Maria da Graça, que sempre estiveram presentes e nunca mediram esforços para meu crescimento pessoal e profissional. Muito obrigada pelo apoio e por acreditarem que eu sou capaz de alcançar todos os meus objetivos.

Aos meus amigos, Fernanda, Mariely, Maria Vitória, Júlia, Heloísa e Felipe, pela amizade, carinho e companheirismo. Obrigada por sempre estarem ao meu lado, compartilhando momentos felizes e dificuldades.

À CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de pessoal de Nível Superior - pela concessão da bolsa de mestrado. Obrigada pela oportunidade e confiança, em mim e no meu trabalho.

“A persistência é o caminho do êxito”

Charles Chaplin

Lista de Figuras

Figura 1. Ciclo biológico de <i>Trypanosoma cruzi</i>	22
Figura 2. <i>Triatoma melanica</i>	24
Figura 3. <i>Triatoma sherlocki</i>	25
Figura 4. Compressão abdominal de ninfa de 5º estágio de <i>Triatoma sherlocki</i>	28
Figura 5. Parâmetros morfométricos estabelecidos por Rossi (2007) para formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i>	29
Figura 6. Parâmetros morfométricos estabelecidos por Rossi (2007) para formas tripomastigotas de <i>T. cruzi</i>	30
Figura 7. Diagrama de ensaio triplo recomendado para discriminar as DTUs de <i>T. cruzi</i>	31
Figura 8. Protocolo de digestão enzimática referente às enzimas Hha1 e EcoR V.	33
Figura 9. Representação gráfica do número de formas mensuradas e classificação de formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i> das cepas Tsh 12, Tsh 19, Tmel 8 e Tmel 44 quanto ao comprimento total do parasito e flagelo livre.....	38
Figura 10. Representação gráfica do número de formas mensuradas e classificação de formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i> das cepas Tsh 12, Tsh 19, Tmel 8 e Tmel quanto a área do cinetoplasto, largura do parasito , área do núcleo e índice nuclear.	38
Figura 11. Representação gráfica do número de formas mensuradas e classificação de formas tripomastigotas das cepas Tsh 12, Tmel 8 e Tmel 44 de <i>T. cruzi</i> quanto ao comprimento total do parasito e flagelo livre.	42
Figura 12. Representação gráfica do número de formas mensuradas e classificação de formas tripomastigotas das cepas Tsh 12, Tmel 8 e Tmel 44 de <i>T. cruzi</i> quanto a área do cinetoplasto, largura do cinetoplasto, área do núcleo e índice nuclear.	43
Figura 13. Amplificação do gene HSP60 para as cepas Tsh 12, Tsh 19, Tmel 8 e Tmel 44 de <i>T. cruzi</i> em gel de agarose a 1%, 60V por 90 minutos.	45

Figura 14. Amplificação do gene GPI para as cepas Tsh 12, Tsh 19, Tmel 8 e Tmel 44 de <i>T. cruzi</i> em gel de agarose a 3%, 40V por 80 minutos.	45
Figura 15. Amplificação do gene LSU (24Sα) para as cepas Tsh 12, Tsh 19, Tmel 8 e Tmel 44 de <i>T. cruzi</i> em gel de agarose a 3%, 50V por 80 minutos.	46
Figura 16. Micrografias representativas da análise microscópica (100x) de infecção celular de macrófagos da linhagem J774 pela cepa Tsh 12 de <i>T. cruzi</i> após 24, 48 e 72h de infecção. Setas indicam as formas amastigotas de <i>T. cruzi</i>.	47
Figura 17. Micrografias representativas da análise microscópica (100x) de infecção celular de macrófagos da linhagem J774 pela cepa Tsh 19 de <i>T. cruzi</i> após 24, 48 e 72h de infecção. Setas indicam as formas amastigotas de <i>T. cruzi</i>.	48
Figura 18. Taxa de infecção celular de macrófagos na linhagem J774 pelas cepas de <i>T. cruzi</i> Tsh 12 e Tsh 19.	48

Lista de Tabelas

Tabela 1. Tabela representativa de cepas correspondentes as Unidades de Tipagem Discreta (DTU)	18
Tabela 2. Resultado das mensurações em triplicata de 30 formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i> da cepa Tsh 12 obtidas de meio de cultura LIT	35
Tabela 3. Resultado das mensurações em triplicata de 30 formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i> da cepa Tsh 19 obtidas de meio de cultura LIT.	35
Tabela 4. Resultado das mensurações em triplicata de 30 formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i> da cepa Tmel 8 obtidas de meio de cultura LIT.....	36
Tabela 5. Resultado das mensurações em triplicata de 30 formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i> da cepa Tmel 44 obtidas de meio de cultura LIT.....	37
Tabela 6. Média dos parâmetros morfométricos de <i>T. cruzi</i> sob as formas epimastigotas das cepas Tsh 12, Tsh 19, Tmel 8 e Tmel 44 em meio LIT (n = 30). 37	
Tabela 7. Análise estatística por meio de ANOVA - One way (paramétrico) referente as mensurações das formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i> das cepas Tsh 12, Tsh 19, Tmel 8 e Tmel 44.....	39
Tabela 8. Resultado das mensurações em triplicata de 30 formas tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> da cepa Tsh 12 obtidas de meio de cultura LIT após 45 dias de cultivo. 40	
Tabela 9. Resultado das mensurações em triplicata de 30 formas tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> da cepa Tmel 8 obtidas de meio de cultura LIT após 45 dias de cultivo. 41	
Tabela 10. Resultado das mensurações em triplicata de 30 formas tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> da cepa Tmel 44 obtidas de meio de cultura LIT após 45 dias de cultivo. 41	
Tabela 11. Média dos parâmetros morfométricos de formas tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> das cepas Tsh 12, Tmel 8 e Tmel 44 de em meio LIT após 45 dias de cultivo (n = 30).	42

Tabela 12. Análise estatística por meio de ANOVA - One way (paramétrico) referente às mensurações das formas tripomastigotas das cepas Tsh 12, Tmel 8 e Tmel 44 de <i>T. cruzi</i>.....	44
Tabela 13. Taxa de infecção celular pelas cepas Tsh 12 e Tsh 19 de <i>T. cruzi</i> em células da linhagem J774.	49

Lista de abreviações

°C: Graus Celsius

μL: Microlitros

μm: Micrômetro

AC: Área do cinetoplasto

AN: Área do núcleo

ANOVA: Análise de variância

CC: Comprimento do cinetoplasto

CFSE: Carboxifluoresceína succinimidyl ester

CT: Comprimento total

DNA: Ácido desoxirribonucleico

dNTP: Desoxirribonucleotídeos fosfatos

DTU: Unidade de tipagem discreta

FL: Flagelo livre

g: Força gravitacional

GPI: Glicosil-fosfatidil-inositol

HSP60: *Heat shock proteins* (proteínas de choque termico)

IN: Índice nuclear

K-DNA: DNA do cinetoplasto

L: Litro

LC: Largura

LIT: *Liver Infusion Tryptose*

MgCl₂: Cloreto de magnesio

mL: Mililitros

mmol: Milimol

ng: Nanograma

pb: Pares de base

PCR: Reação em cadeia de polimerase

pmol: Picomol

PN: Posterior ao núcleo

rDNA: DNA ribossômico

RFLP: *Restriction Fragment Length Polymorphism*

RNA: Ácido ribonucleico

rRNA: RNA ribossômico

SINAN: Sistema de Informação de Agravos de Notificação

SNC: Sistema Nervoso Central

Taq DNA polimerase: DNA polimerase termoestável

TcI: *Trypanosoma cruzi* I

TcII: *Trypanosoma cruzi* II

TcIII: *Trypanosoma cruzi* III

TcIV: *Trypanosoma cruzi* IV

TcV: *Trypanosoma cruzi* V

TcVI: *Trypanosoma cruzi* VI

TM: Tripomastigota metacíclica

ZI: Zimodema 1

ZII: Zimodema 2

ZIII: Zimodema 3

Sumário

1. Resumo.....	13
2. Abstract.....	14
3. Introdução	15
3.1. <i>Trypanosoma cruzi</i> :.....	15
3.2. Doença de Chagas:	18
3.3. Vetores:	23
4. Objetivos	26
5. Materiais e Métodos.....	27
5.1. Isolamento das cepas de <i>T. cruzi</i>	27
5.2. Fixação, coloração e mensuração das formas epimastigotas e tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> :	28
5.3. Caracterização Molecular:.....	30
5.3.1. Extração do DNA Genômico:.....	30
5.3.2. Amplificação dos Genes:	31
5.3.3. Digestão Enzimática:	32
5.4. Tempo de duplicação celular:	33
7. Resultados.....	34
7.1. Mensuração das formas epimastigotas e tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> :	34
7.1.1. Mensuração de formas epimastigotas das cepas Tsh 12, Tsh 19, Tmel 8 e Tmel 44 de <i>T. cruzi</i> :.....	34
7.2. Caracterização Molecular:.....	44
7.3. Tempo de duplicação celular de <i>T. cruzi</i> em linhagem celular J774	47
8. Discussão.....	50
8.1. Mensuração de formas epimastigotas e tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> :	50
8.2. Caracterização Molecular:.....	53
9. Conclusão.....	56

10. Referências	57
11. Anexo 1	67

1. Resumo

A doença de Chagas tem por agente etiológico o protozoário *Trypanosoma cruzi*. Tanto a doença como o protozoário foram descritos por Carlos Chagas em 1909. Atualmente, a doença de Chagas acomete em torno de 6 milhões de pessoas em todo o mundo, com média de 28 a 30 mil casos de transmissão vetorial por ano e é responsável por 2,7% da média anual de mortalidade brasileira. Assim, estudos que visam caracterizar cepas de *T. cruzi* que circulam em áreas endêmicas podem contribuir para o controle dessa zoonose. O presente trabalho tem por intuito estudar quatro cepas de *T. cruzi* isoladas de triatomíneos coletados nos estados de Minas Gerais e Bahia por parâmetros moleculares, morfométricos e taxa de infecção celular *in vitro*. As cepas Tmel 8 e Tmel 44 foram identificadas como pertencentes ao grupo TcI, a cepa Tsh 12 foi identificada como pertencente ao grupo TcII e a cepa Tsh 19 foi identificada como pertencente ao grupo TcIV. Foi possível observar igualdade de padrão morfométrico em relação às formas epimastigotas de todas as cepas mensuradas. A taxa de infecção celular apresentou resultados distintos dos esperados quando comparado a estudos presentes na literatura, apresentando taxa de infecção superior no período de 48h quando comparado à taxa de infecção em 72h para a cepa Tsh 19. Os resultados obtidos mostraram um novo subgrupo genotípico presente no estado da Bahia, portanto, existe a possibilidade de que possa haver subnotificação de doença de Chagas por esse subgrupo genotípico.

Palavras-chave: *Trypanosoma cruzi*; DTU; caracterização.

2. Abstract

Chagas disease is caused by the protozoan *Trypanosoma cruzi*. Both the disease and the protozoan were described by Carlos Chagas in 1909. Currently, Chagas disease affects around 6 million people worldwide, with an average of 28 to 30 thousand cases of vector transmission per year and is responsible for 2.7% of the annual Brazilian mortality average. Thus, studies that aim to characterize *T. cruzi* strains that circulate in endemic areas can contribute to the control of this zoonosis. The present work aims to study four strains of *T. cruzi* isolated from triatomines collected in the states of Minas Gerais and Bahia by molecular, morphometric parameters and in vitro cell infection rate. The Tmel 8 and Tmel 44 strains were identified as belonging to the TcI group, the Tsh 12 strain was identified as belonging to the TcII group and the Tsh 19 strain was identified as belonging to the TcIV group. It was possible to observe equality of morphometric pattern in relation to the epimastigote forms of all the measured strains. The rate of cell infection showed results different from those expected when compared to studies found in the literature, showing a higher rate of infection in the period of 48 hours when compared to the rate of infection in 72 hours for the Tsh 19 strain. In the state of Bahia, therefore, there is a possibility that Chagas disease may be underreported by this genotypic subgroup.

Keywords: *Trypanosoma cruzi*; DTU; characterization.

3. Introdução

3.1. *Trypanosoma cruzi*:

Trypanosoma cruzi é um protozoário hemoflagelado. Inicialmente, em sua descrição, Carlos Chagas (1909) acreditou que as características do ciclo biológico do parasito não se assemelhavam aos tripanossomatídeos e relatou um novo gênero para descrevê-lo, *Schizotrypanum cruzi*. Posteriormente, em 1934 Dias questionou a designação genérica com base na forma de multiplicação do parasito e sugeriu a denominação que se conhece atualmente: *Trypanosoma cruzi* (CHAGAS, 1909, 1935; DIAS, 1934).

O protozoário *T. cruzi* se apresenta sob três formas predominantes: amastigota, epimastigota e tripomastigota. A distinção entre elas se faz pela posição do cinetoplasto em relação ao núcleo e pela extensão do flagelo. A forma epimastigota apresenta o cinetoplasto na região anterior ao núcleo e pouco desenvolvido. Por sua vez a forma tripomastigota exibe cinetoplasto localizado na região posterior. A forma amastigota é intracelular, o flagelo não se exterioriza e é a menor das três. É possível encontrar a forma epimastigota no sistema digestório de triatomíneo, que apresenta alta mobilidade e intensa atividade replicativa. A forma tripomastigota de *T. cruzi* é a forma evolutiva com capacidade infectante e não se multiplica, pode ser encontrada em seus vetores que são insetos da subfamília Triatominae, e no sangue circulante cerca de 150 espécies mamíferos que se constituem em seus hospedeiros, assim como nas glândulas anais de gambás (GIRARD-DIAS et al., 2012; MARTINS et al., 2012; SOUZA, 2009; WHO, 2007).

Parasitas intracelulares como *T. cruzi* realizam interação de superfície celular com o hospedeiro que o abriga e nesse caso, é importante entender a composição celular desse protozoário. *T. cruzi* possui uma bicamada lipídica e o glicocálice que reveste a célula, esse revestimento é formado por mucinas, transialidases e glicoproteínas da família Tc85. A membrana plasmática da forma epimastigota do parasito não é homogênea em termos de densidade, possui macrodomínios de membranas, cada um com microdomínios específicos. O citossomo é uma invaginação da membrana plasmática seguida de microtúbulos que podem chegar até a região do núcleo (MARTINEZ-PALOMO; SOUZA; GONZALEZ-ROBLES, 1976; SOUZA, 2009 GIRARD-DIAS et al., 2012).

O flagelo está presente nas três formas do parasito e possui uma matriz de nove microtúbulos periféricos e um par central. A região conhecida como paraflagelar (PFR) possui uma matriz complexa de filamentos ligados ao axonema, essa região possui proteínas altamente antigênicas e está associada à sobrevivência do parasito (BASTIN; GULL, 1999; SOUZA, 2009; GIRARD-DIAS et al., 2012).

O cinetoplasto está localizado no interior da mitocôndria, próximo ao núcleo e nas proximidades do corpo basal ou blefaroplasto. A posição em que o cinetoplasto se encontra define a região do corpo basal e conseqüentemente o início do flagelo, que por sua vez é constituído pela polimerização da tubulina, a forma e estrutura variam de acordo com o estágio de desenvolvimento que o parasito se encontra. Sabe-se que o DNA mitocondrial do protozoário possui uma estrutura densa conhecida como k-DNA (DNA do cinetoplasto) e se localiza dentro da matriz mitocondrial. A constituição do k-DNA se dá pela presença de maxicírculos e minicírculos que codificam RNAs (SOUZA, 2009; GIRARD-DIAS et al., 2012).

O parasito *T. cruzi* é caracterizado por apresentar vasta diversidade populacional demonstrada por sua variabilidade morfológica, bioquímica, biológica, imunológica e molecular (JUNQUEIRA; DEGRAVE; BRANDA, 2005). Diante disso, padronizou-se a nomenclatura de *T. cruzi* por meio do estabelecimento de Unidades de Tipagem Discretas (DTUs), definidas por Lewis et al., (2009); e Zingales et al., (2009).

Anteriormente ao estabelecimento das DTUs, Miles et al. (1978) realizaram os primeiros experimentos com eletroforese enzimática em cepas silvestres e domiciliares da região amazônica, e inicialmente consideraram que as cepas silvestres e domiciliares de *T. cruzi* apresentam heterogeneidade isoenzimática. As cepas de regiões silvestres foram classificadas como tipo I, enquanto as cepas domiciliares como tipo II. Posteriormente, Barrett (1980) classificou essas cepas introduzindo o termo Zimodemas, passando a ser então ZI e ZII (MILES et al., 1978; BARRETT et al., 1980).

Na década de noventa Souto (1993) utilizou o primeiro gene de rRNA conhecido, 24S α , que possibilitou diferenciar *T. cruzi* dos demais tripanossomatídeos. Posteriormente, Nunes e colaboradores (1997) mostraram que os grupos de cepas já classificados não eram de fato heterogêneos, mas haviam passado por hibridização. Os autores observaram divergência de sequenciamento do promotor do gene SL, o que

resultou uma nova divisão dos três grupos de cepas existentes em dois grupos principais, Tipo I e Tipo II (NUNES; CARVALHO; BUCK, 1997; SOUTO; ZINGALES, 1993).

No entanto, Brisse (1999; 2000) identifica e questiona quantas subdivisões filogenéticas de fato são relevantes. A genética evolutiva possibilita explorar a origem do polimorfismo genético de *T. cruzi* e revela que trocas genéticas ausentes ou raras geram clones estáveis. Baseado na isoenzima e no DNA polimórfico, o autor propõe a subdivisão dos clones naturais de *T. cruzi* em dois clados geneticamente heterogêneos. O clado 1 é composto pelas cepas ZI. O clado 2 é apresentado em cinco subdivisões filogenéticas em que as cepas foram isoladas tanto de fase aguda quanto crônica, possuem alto alcance ecológico e são oriundas de áreas silvestres e domésticas. Os resultados desses trabalhos mostram que a evolução é o principal parâmetro responsável pela diversidade genética do parasito, sendo a hibridização uma possibilidade entre os grupos de DTUs (Unidades de Tipagem Discreta) (TIBAYRENC, 1995; BRISSE; BARNABÉ; TIBAYRENC, 1998, 2000).

Em 1995, Tibayrenc propôs uma distinção fundamental entre microrganismos. Segundo o autor, microrganismos estruturados e caracterizados pela existência de discreta evolução de linhagem eram distinguidos por Unidades de Tipagem Discreta (DTUs). Zingales e colaboradores em 2009 alcançaram um consenso ao estabelecer que as cepas de *T. cruzi* deveriam ser referidas por DTUs subdivididas em seis grupos, a fim de unificar e melhorar a comunicação entre a comunidade científica (TIBAYRENC, 1995; LEWIS et al., 2009; ZINGALES et al., 2009).

Estudos genotípicos mostraram seis DTUs distintas que se dividem em dois grupos principais, DTU I e DTU II. *T. cruzi* DTU II é subdividido em cinco DTUs: TcII, TcIII, TcIV, TcV e TcVI. Mostraram-se maior também as evidências de hibridização, sendo os grupos DTU IId e DTU IIe resultado de pelo menos dois eventos de hibridização. A última classificação das cepas segundo Zingales e colaboradores é referida abaixo (Fig. 4) (ZINGALES et al., 2009; ZINGALES, 2011). Um sétimo subgrupo de DTU foi descrito em morcegos por Marcili *et. al* no ano de 2009, conhecido como TcBat (MARCILI et al., 2009).

Tabela 1. Tabela representativa de cepas correspondentes às Unidades de Tipagem Discreta (DTU)

DTUs designadas	Abreviação	Equivalência de formas de cepas de <i>T. cruzi</i>
<i>T. cruzi</i> I	TcI	<i>T. cruzi</i> I e DTU I
<i>T. cruzi</i> II	TcII	<i>T. cruzi</i> II e DTU IIb
<i>T. cruzi</i> III	TcIII	Z3/Z1 ASAT, Z3-A, DTU IIc e <i>T. cruzi</i> III
<i>T. cruzi</i> IV	TcIV	Z3, Z3-B e DTU IIa
<i>T. cruzi</i> V	TcV	Bolivian Z2, rDNA ½, clonet 39 e DTU II d
<i>T. cruzi</i> VI	TcVI	Paraguayan Z2, Zymodeme B e DTU IIe
<i>T. cruzi</i> Bat	TcBat	Subgrupo descrito em morcegos

Fonte: Zingales et al., 2009.

3.2. Doença de Chagas:

A doença de Chagas ou tripanossomíase americana tem como agente etiológico o protozoário *T. cruzi*. Tanto a doença como o protozoário, foram descritos por Carlos Ribeiro Justiniano das Chagas em 1909, quando enviado para a campanha anti-palúdica nos serviços de construção da Estrada de Ferro Central do Brasil, na região Norte de Minas Gerais. Chagas observou na região a presença de um hematófago, conhecido como barbeiro (*Conorhinus megistus*) pelos habitantes locais, denominado atualmente por *Panstrongylus megistus*, que se alojava nas frestas das paredes e coberturas das casas e à noite se alimentava do sangue das pessoas, identificando o vetor do protozoário, assim como a cadeia epidemiológica dessa doença (CHAGAS, 1909; LENT; WYGODZINSKY, 1979).

Os primeiros estudos laboratoriais da doença foram realizados em *Callithrix penicillata*. Os saguis serviram de fonte alimentar para o vetor e após 20 ou 30 dias foram encontrados “tripanozómidas” em grande quantidade no sangue periférico dos animais. O quadro clínico observado por Chagas em pacientes da região possibilitou que a doença fosse classificada como sendo causa de entidade mórbida (CHAGAS, 1909).

A doença de Chagas se apresenta sob duas fases, aguda e crônica. A fase aguda da doença pode ser sintomática ou assintomática, os sinais são aparentes e inespecíficos e sinalizam a entrada do parasito no hospedeiro. Alguns dos sintomas observados são: mal-estar, febre, aumento dos gânglios linfáticos, fígado e baço. Podem ser observados também os sinais de Romaña e chagoma de inoculação, que são os sinais característicos da patologia chagásica transmitida pelo vetor. Nessa fase, a manifestação clínica cessa após 4 a 8 semanas em quase 90% dos infectados. A manifestação clínica em fase aguda varia de acordo com a região geográfica, cerca de 60-70% dos pacientes permanecem assintomáticos, no entanto, 20-35% dos infectados sintomáticos desenvolvem lesões irreversíveis do sistema nervoso em órgãos como coração, cólon e esôfago, bem como meningoencefalopatias (RASSI JR; RASSI; LITTLE, 2000; STEINDEL et al., 2008; RASSI JR; RASSI; MARIN-NETO, 2010; PÉREZ-MOLINA; MOLINA, 2018).

A fase crônica da doença pode ser desenvolvida de diferentes formas, desde a ausência de sintomas (fase indeterminada), doença grave e morte prematura, 35% dos pacientes com doença de Chagas evoluem para a fase crônica (CAMPBELL; WESTENBERGER; STURM, 2005; RASSI JR; RASSI; MARIN-NETO, 2010).

A fase indeterminada da doença de Chagas tem início após semanas ou meses do fim dos sintomas na fase aguda e as formas tripomastigotas não são detectadas na corrente sanguínea, é possível detectar formas amastigotas no tecido cardíaco e muscular. Essa fase pode durar alguns anos ou persistir por toda a vida do paciente, é caracterizada por disfunções cardíacas, arritmias, afinamento do tecido cardíaco, cardiomiopatias e pode levar o indivíduo a morte por ataque cardíaco (CAMPBELL; WESTENBERGER; STURM, 2005).

As manifestações da doença de Chagas na fase crônica estão relacionadas com o acometimento cardíaco, esofágico e/ou de cólon, que são agrupadas em três formas, sendo cardíaca, digestiva e cardiodigestiva. A forma digestiva ocorre em 10-15% dos pacientes em fase crônica, com sintomatologia característica como epigastriano, regurgitação, desnutrição, obstipação prolongada, distensão abdominal e ocasionalmente obstrução intestinal. Pacientes com megaesôfago têm prevalência considerável de câncer de esôfago, no entanto, não há relatos de câncer de colo retal em pacientes com megacólon. A forma cardíaca é mais comum, presente em 15-45% dos pacientes, acarretando anomalias do sistema de condução sanguínea, taquicardia, aneurismas apicais,

tromboembolismos e morte súbita. Em países em desenvolvimento o megaeosôfago geralmente precede as doenças cardíacas e de cólon. Indivíduos com AIDS ou que fazem uso de imunossuppressores, em sua maioria, sofrem exacerbação da infecção pelo aumento da parasitemia e replicação intracelular, além de terem maior predisposição a lesões no SNC e meningoencefalites (RASSI JR; RASSI; MARIN-NETO, 2010; PÉREZ-MOLINA; MOLINA, 2018).

Segundo dados da Organização Pan-Americana de Saúde (2019), 21 países são endêmicos para doença de Chagas, e estima-se cerca de 28mil casos anuais da forma aguda da doença transmitida pela via vetorial e 8 mil casos por transmissão congênita, em que 20-30% dos contaminados apresentam lesões cardíacas ou digestivas na América Latina. Estima-se que ocorram 806.000 mortes anuais devido à doença de Chagas, por outro lado, o gasto anual com pacientes chagásicos é estimado em US\$ 627 milhões, 80% acima do gasto com inseticidas (OPAS, 2018; WHO, 2020).

Devido aos avanços no controle da doença, 17 dos 21 países endêmicos controlaram a transmissão vetorial domiciliar em todo seu território, e todos os 21 países fazem campanhas nacionais para detecção da doença de Chagas nos doadores de sangue. No entanto, estima-se que apenas 1% dos infectados por *T. cruzi* recebam diagnóstico e tratamento adequado, em consequência à escassez de profissionais capacitados para executar o diagnóstico correto, uma vez que, grande parte dos acometidos pela doença vivem em zonas rurais (OPAS, 2018).

No Brasil, entre 2012 e 2016 o Sistema de Informação de Agravos de Notificação - SINAN registrou 19.914 casos suspeitos de doença de Chagas aguda, dos quais 1.190 casos confirmados, dentre esses, 17 mulheres gestantes. A faixa etária mais acometida foi entre 20 - 49 anos. A incidência média anual foi de 0,1 casos/100 mil habitantes, com incidência maior nos estados do Pará e Amapá onde a incidência foi de 2,9 e 1,5 casos/100 mil habitantes, respectivamente. Nesse período foram registrados 18 óbitos pela doença em fase aguda, com taxa de letalidade anual de 1,5% (SVS, 2019).

Foram registrados casos de doença de Chagas aguda em 105 municípios brasileiros, dos quais 82% na região Norte do país, 7,6% na região Nordeste, 3,8% na região Sudeste, 3,8% região na Sul e 2,8% na região Centro-Oeste. Entre os municípios da região Norte, 12% registraram casos de infecção por cinco anos consecutivos, sendo nove no estado do Pará, e um no estado do Amapá. Entre os casos de doença de Chagas

agudos 52% foram registrados na área urbana. A infecção oral foi a mais frequente e a transmissão vetorial foi de 8,9% (SVS, 2019).

Entre 2008 e 2019 foram notificados 996 novos casos de doença de Chagas aguda no estado da Bahia, com maior número de casos notificados nos anos de 2017 e 2018. Entre 2008 e 2017 o estado notificou 6337 óbitos não fetais em decorrência à doença de Chagas (SVS, 2019).

Inicialmente, acreditava-se que a doença de Chagas era transmitida ao homem apenas quando ao sugar sangue, os triatomíneos eliminavam fezes com formas tripomastigotas metacíclicas (TM) de *T. cruzi*, que por sua vez penetravam pela pele ou mucosa no ato de coçar (CHAGAS, 1909; RIMOLDI et al., 2012; STEINDEL et al., 2008). Posteriormente as transmissões por via oral, transfusional, por acidente de trabalho, manuseio de carcaça de animais e congênita foram comprovadas (STEINDEL et al., 2008).

Em 1991, a criação da *Iniciativa do Cone Sul* na América Latina estabeleceu medidas de controle vetorial que visavam eliminar o principal vetor domiciliar da doença, *Triatoma infestans*, pelo uso de inseticidas de ação residual, e ainda reduzir e eliminar a transmissão transfusional com controle efetivo dos doadores em bancos de sangue (PINTO DIAS; SCHOFIELD, 1998; SILVEIRA, 2000). No entanto, a transmissão oral tem sido a maior fonte de contaminação da população (STEINDEL et al., 2008; FERREIRA; BRANQUINHO; LEITE, 2014; SVS, 2019).

O ciclo de infecção natural da doença por meio de triatomíneo tem início com a picada do inseto infectado no indivíduo saudável no momento do repasto sanguíneo. Assim, se o vetor defecar próximo ao local da picada e se nessas fezes existirem formas tripomastigotas metacíclicas de *T. cruzi* ocorre a infecção (CORDERO et al., 2019; DEMEU et al., 2019).

Após o protozoário alcançar o organismo do hospedeiro, as glicoproteínas 82 e 85 (gp82 e gp85) são responsáveis pelas interações celulares. A gp82 se liga a mucina gástrica, enquanto a gp85 se liga aos componentes da matriz extracelular como a fibrina e a laminina, ambas incluídas na superfamília *T. cruzi* gp85/sialidase. Essas glicoproteínas possuem propriedades adesivas diferenciais e interagem com diferentes

receptores das células-alvo da infecção. A produtividade da infecção dependerá de qual molécula de superfície estará predominantemente envolvida (YOSHIDA, 2006).

Algumas TMs, para se ligar e penetrar em células hospedeiras, utilizam a gp82 para disparar a sinalização de Ca^{2+} , outras ainda dependem principalmente da gp35/50 para sua internalização nas células. As moléculas gp35/50 não apresentam tanta eficácia quanto a gp82 para promover invasão celular, devido à sua fraca atividade na indução de canais de Ca^{2+} . Quando a interação com as células do hospedeiro ocorre mediada pela gp90 a infecção é improdutiva, isso ocorre porque essa é desprovida de atividade de sinalização de Ca^{2+} (YOSHIDA, 2006). Nos macrófagos os TMs se diferenciam em amastigotas que se multiplicam por fissão binária e novamente ao evadir-se da célula assumem a forma tripomastigota. O alto número de protozoários no interior dos macrófagos faz com que esses se rompam e os parasitos sejam liberados na corrente sanguínea. Desse modo, o parasito é fagocitado por outro macrófago ou permanece na corrente sanguínea e é ingerido por um triatomíneo não contaminado que passa a veicular o protozoário (Fig. 1) (TYLER; ENGMAN, 2001).

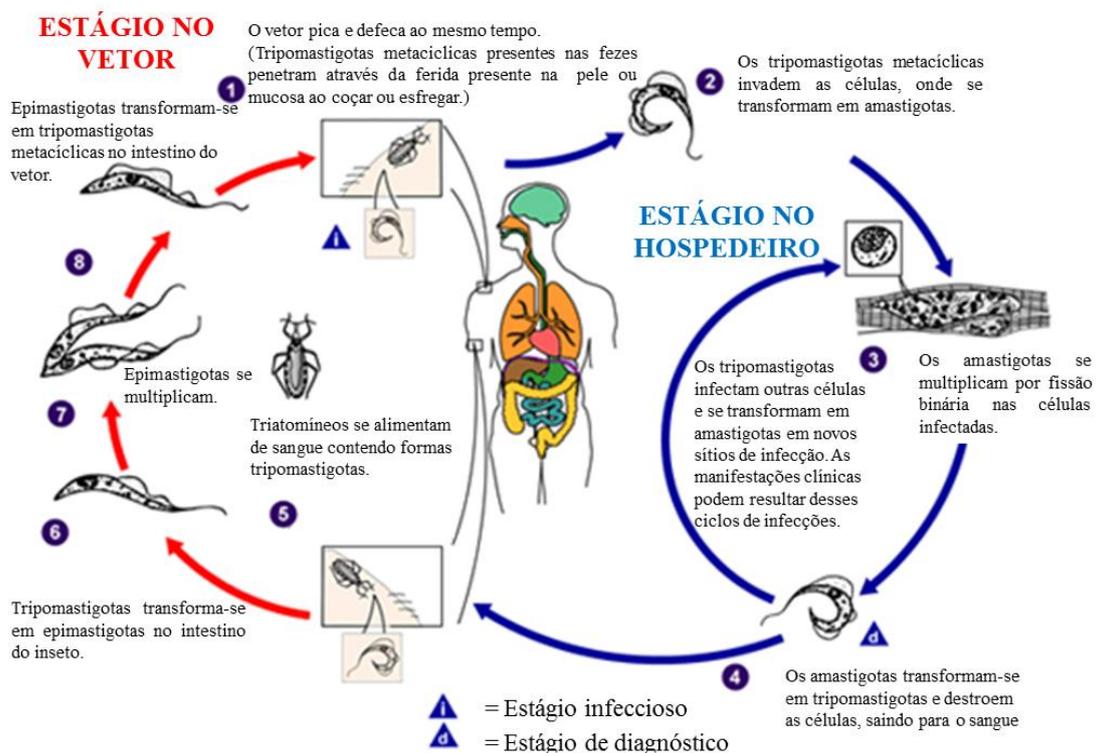


Figura 1. Ciclo biológico de *Trypanosoma cruzi* (Fonte: CDC, modificado).

3.3. Vetores:

A transmissão vetorial de *T. cruzi* ocorre por meio de três ciclos; silvestre, domiciliar e peridomiciliar. O ciclo domiciliar é tido como o de maior importância epidemiológica, uma vez que os triatomíneos habitam residências e se alimentam dos animais e humanos que residem no local, fazendo desses, reservatórios da doença. No ciclo silvestre enzoótico os triatomíneos se alimentam de animais silvestres e habitam troncos de árvores, ninhos de mamíferos, abaixo de rochas e contaminam o homem apenas quando invade o território silvestre. O ciclo peridoméstico é intermediário aos ciclos silvestre e doméstico. Os triatomíneos habitam regiões próximas a residências de humanos ou locais anexos às residências como galinheiros e estábulos, e se alimentam com o sangue dos animais domesticados e humanos que habitam o local (COURA; PINTO DIAS, 2009).

Ainda hoje as campanhas de controle vetorial são vistas como de grande eficiência para a diminuição do número de indivíduos com a doença, uma vez que, tem o intuito de reduzir e controlar a transmissão domiciliar da doença de Chagas pelo uso de inseticidas de ação residual em áreas domiciliares e seus anexos (COURA; PINTO DIAS, 2009; SILVEIRA, 2000). Sabe-se que a erradicação dessa doença é praticamente impossível, uma vez que é de caráter enzoótico e possui cerca de 97 espécies como reservatórios animais nos biomas brasileiros; na região Neotropical já foram identificadas 150 espécies de 24 famílias de reservatórios silvestres e domésticos (WHO, 2007; COURA; PINTO DIAS, 2009; JANSEN; XAVIER; ROQUE, 2018).

Atualmente são admitidos seis tribos, 18 gêneros e 156 espécies de triatomíneos, das quais três fósseis (ALEVI et al., 2020; GALVÃO et al., 2020, ZHAO et al., 2021). Alguns grupos de triatomíneos apresentam similaridade morfológica e proximidade molecular, portanto, por funcionalidade, esses conjuntos de espécies e subespécies são agrupadas em complexos específicos. Atualmente são admitidos nove complexos e nove subcomplexos (USINGER; WYGODZINSKY; RYCKMAN, 1966; WYGODZINSKY, 1979; LUCENA, 1970; CARCAVALLO et al., 2000; DUJARDIN; SCHOFIELD; PANZERA, 2002; LENT; SCHOFIELD; GALVÃO, 2009; ALEVI et al., 2017).

Assim, em 2009, Schofield e Galvão admitiram as espécies *T. brasiliensis*, *T. juazeirensis*, *T. melanica*, *T. melanocephala*, *T. petrochii*, *T. lenti*, *T. sherlocki* como

pertencentes ao complexo *Triatoma brasiliensis* (SCHOFIELD; GALVÃO, 2009; OLIVEIRA, 2015).

Triatoma melanica (Figura 2) foi inicialmente denominado *Triatoma brasiliensis melanica* por Neiva & Lent (1941) e assim como *T. macromelassoma* Galvão (1956) foi descrito como forma melânica sub espécie de *T. brasiliensis*. Lent & Wygodzinski (1979) consideraram ambas as espécies sinônimos de *T. brasiliensis* como formas que se “intercalavam” no ambiente rural (COSTA; ARGOLO; FELIX, 2006; GALVÃO, 1956; LENT; WYGODZINSKY, 1979; NEIVA; LENT, 1941). Em 2006, Costa e colaboradores elevaram *T. melanica* ao *status* de espécie, para tanto pautaram-se em estudos morfológicos, biológicos, ecológicos, experimentos de cruzamento, aloenzimas e sequencias de mtDNA. Esses estudos foram feitos comparativamente com outras espécies do complexo *T. brasiliensis*. Os resultados obtidos pelos pesquisadores mostraram padrão de cores estável e homogêneo, com alta distância genética entre as demais espécies (COSTA; ARGOLO; FELIX, 2006).



Figura 2. *Triatoma melanica* (Imagem autoral).

Com o estudo pioneiro feito por Cerqueira em 1982 (dados não publicados), *T. sherlocki* (Figura 3) foi considerado uma subespécie de *T. brasiliensis*, inicialmente denominado *T. brasiliensis santinacensis* e de hábito silvestre, que eventualmente invade ambientes domiciliares (MENDONÇA et al., 2009). Os espécimes utilizados para a descrição foram coletados em Santo Inácio, município de Gentio do Ouro – BA. *T. sherlocki* apresenta anéis de cor alaranjada nos fêmures e manchas no conexivo, que os assemelha a *T. lenti*. A diferenciação de *T. lenti* se faz por pequenas variações claras no conexivo, variações de tamanho e tonalidade de amarelo a vermelho, diferenças em pronoto, escutelo e cabeça (PAPA et al., 2002). A consideração de que *T. sherlocki*

pertença ao complexo *T. brasiliensis* sugere que seja espécie irmã de *T. melanica* (MENDONÇA et al., 2009). Há relatos de colonização de *T. sherlocki* em habitações humanas no estado da Bahia, Brasil. Esses registros podem ser atribuídos às suas pernas longas e asas mais curtas, que podem estar relacionados à capacidade de invasão de domicílios por dispersão ativa (ALMEIDA et al., 2012).



Figura 3. *Triatoma sherlocki* (Imagem autoral).

4. Objetivos

4.1. Objetivo Geral

Avaliar os caracteres biológicos, morfológicos e moleculares de quatro cepas de *Trypanosoma cruzi*, das quais duas isoladas de espécimes de *T. melanica* coletados na região de Porteirinha – MG e duas de *T. sherlocki* do distrito de Santo Inácio – BA.

4.2. Objetivos Específicos

- Avaliar formas tripomastigotas de *T. cruzi* das cepas Tmel 8, Tmel 44 e Tsh 12 obtidas de meio de cultura LIT após 45 dias de cultivo, por meio de dados morfométricos;
- Avaliar formas epimastigotas de *T. cruzi* das cepas Tmel 8, Tmel 44, Tsh 12 e Tsh 19 obtidas de meio de cultura LIT, por meio de dados morfométricos;
- Genotipar as cepas Tmel 8, Tmel 44, Tsh 12 e Tsh 19 de *T. cruzi* por PCR-RFPL;
- Estudar as cepas Tsh 12 e Tsh 19 de *T. cruzi* em cultura celular J774 quanto à capacidade de infecção em macrófagos.

5. Materiais e Métodos

5.1. Isolamento das cepas de *T. cruzi*

As cepas Tsh 12 e Tsh 19 foram isoladas a partir de ninfas de 4° e 5° estágio de *Triatoma sherlocki* coletados em áreas silvestres de Santo Inácio, município de Gentio do Ouro – BA (S 11°09.246' e W 42°70.826' altitude 972 metros) por Jader de Oliveira do laboratório de Parasitologia do departamento de Ciências Biológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP – Araraquara e Tiago Bellintani do Instituto Biologia da Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, em novembro de 2014. As cepas Tmel 8 e Tmel 44 foram isoladas a partir de ninfas de 5° estágio de *Triatoma melanica* coletadas em áreas silvestres do município de Porteirinha – MG (S 15°44'34 e W 43°1'40 altitude 1544 metros) por João Aristeu da Rosa e Jader Oliveira do laboratório de Parasitologia da Universidade de Ciências Farmacêuticas –UNESP– Araraquara, Genivaldo Navarro da Secretaria de Saúde de Catuti, MG e Edson Nunes dos Santos da Secretaria de Saúde Porteirinha, MG em maio de 2017.

O isolamento das cepas foi feito por Aline Rimoldi Ribeiro e Rossana Falconi no laboratório de Parasitologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP – Araraquara, por meio de fezes obtidas por compressão abdominal de ninfas de *T. sherlocki* e *T. melanica*. O material obtido foi diluído em salina 0,9 % e observado por microscopia óptica. A amostra positiva (0,3 mL) foi inoculada em 4 mL de meio de cultura LIT suplementada com soro fetal bovino (AnexoI). As cepas Tsh 12, Tsh 19, Tmel 8 e Tmel 44 são mantidas por repiques sucessivos em meio de cultura LIT (Figura 4).

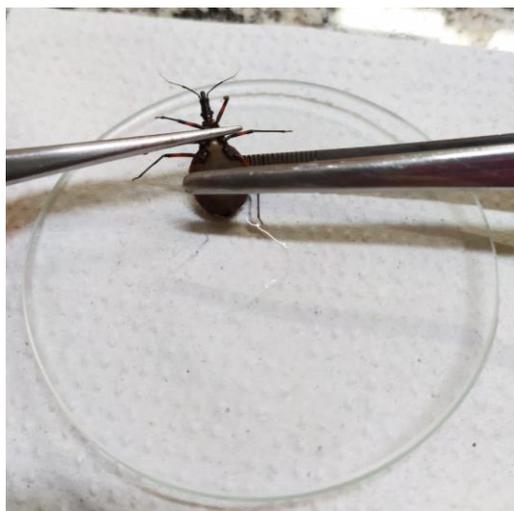


Figura 4. Compressão abdominal de ninfa de 5º estágio de *Triatoma sherlocki* (Imagem autoral).

5.2. Fixação, coloração e mensuração das formas epimastigotas e tripomastigotas de *T. cruzi*:

Foram mensuradas 30 formas epimastigotas de *T. cruzi* em triplicata das cepas Tsh 12, Tsh 19, Tmel 8 e Tmel 44 obtidas de meio de cultura LIT em fase logarítmica de crescimento. Assim como, 30 formas tripomastigotas *T. cruzi* em triplicata de cada uma das quatro cepas oriundas de meio de cultura LIT após 45 dias de cultivo (DE OLIVEIRA et al., 2015).

No preparo das amostras, 1 mL de meio de cultura LIT contendo formas epimastigotas das cepas Tsh 12, Tsh 19, Tmel 8 e Tmel 44 de *T. cruzi* foram centrifugadas a 2000 rpm por 10 minutos, posteriormente o sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspenso em 1 mL de solução fisiológica 0,9%. A seguir foram adicionados 200 µL em cinco lâminas de microscopia, fixadas com álcool metílico e coradas pela coloração de *Giemsa* (ROSENFELD, 1974).

Os parâmetros usados para mensuração de formas epimastigotas de *T. cruzi* foram definidos por Dias e Freitas (1943) e Barreto (1965), das quais foram estudados comprimento total (CT), comprimento da célula sem flagelo (CC), flagelo livre (FL), largura (LC), área do cinetoplasto (AC), distância da extremidade posterior ao núcleo

(PN), distancia da extremidade anterior ao núcleo (AN) e índice nuclear ($IN=PN/AN$) (BARRETO, 1965; DIAS; FREITAS FILHO, 1943).

Para classificar as formas epimastigotas de *T. cruzi* mensuradas foram utilizados os parâmetros definidos por Rossi (2007). Para a definição dos parâmetros morfométricos, a autora utilizou as cepas Bolívia, QM₂, S.I.9 e Y que apresentaram as mensurações referidas na fig. 5 (ROSSI, 2007).

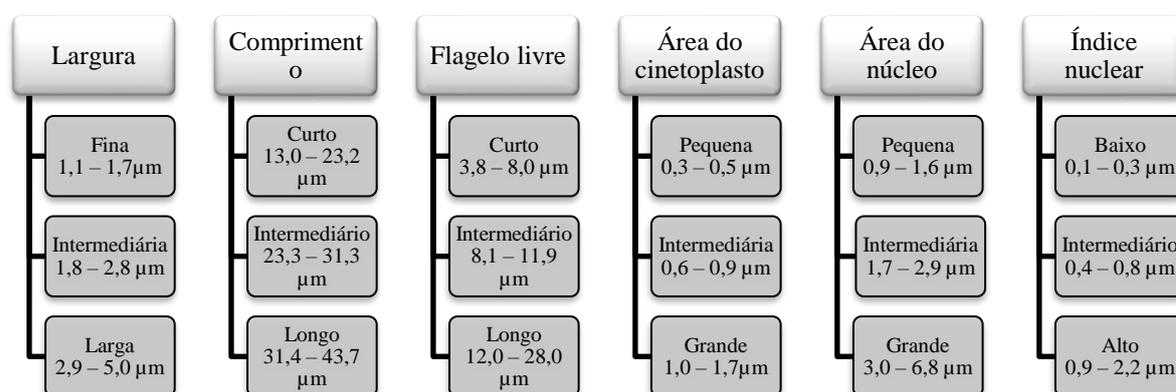


Figura 5. Parâmetros morfométricos estabelecidos por Rossi (2007) para formas epimastigotas de *T. cruzi*.

Para classificar as formas tripomastigotas de *T. cruzi* mensuradas foram utilizados os parâmetros descritos por Rossi (2007), assim como foram para as formas epimastigotas. Para a definição dos parâmetros morfométricos dessas formas, a autora também utilizou as cepas Bolívia, QM₂, S.I.9 e Y, conforme referido abaixo na fig. 6.

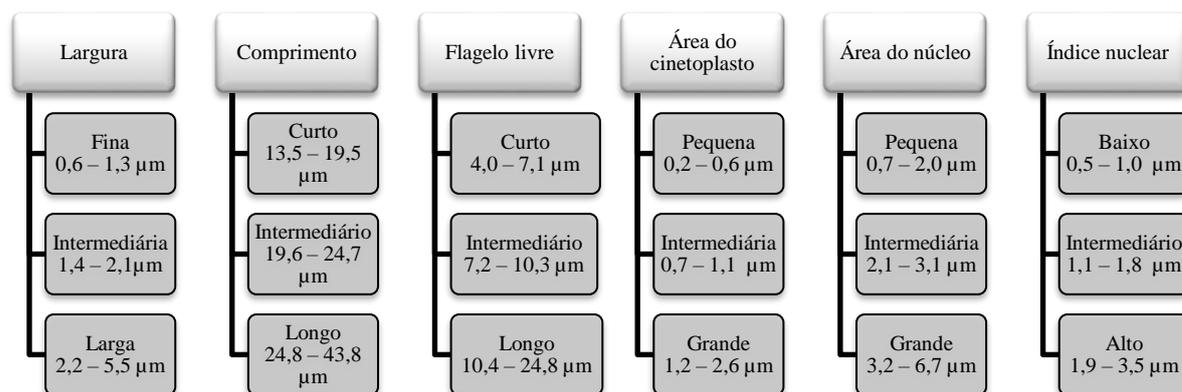


Figura 6. Parâmetros morfométricos estabelecidos por Rossi (2007) para formas tripomastigotas de *T. cruzi*.

5.3. Caracterização Molecular:

5.3.1. Extração do DNA Genômico:

A extração do DNA genômico das cepas Tsh 12, Tsh 19, Tmel 8 e Tmel 44 de *T. cruzi* foi realizada a partir de formas epimastigotas utilizando PureLink™ Genomic DNA Mini Kit (ThermoFisher).

As formas foram contadas para se certificar que as culturas se encontravam em 1×10^6 , fase logarítmica de crescimento. Posteriormente, 5 mL de meio de cultura LIT foram transferidos para tubo falcon de 15mL e as células foram centrifugadas a 2000 rpm/10 minutos a 10°C. O sobrenadante foi descartado, o *pellet* ressuspensionado em 200µL de PBS 1% estéril e a solução transferida para *ependorf* estéril.

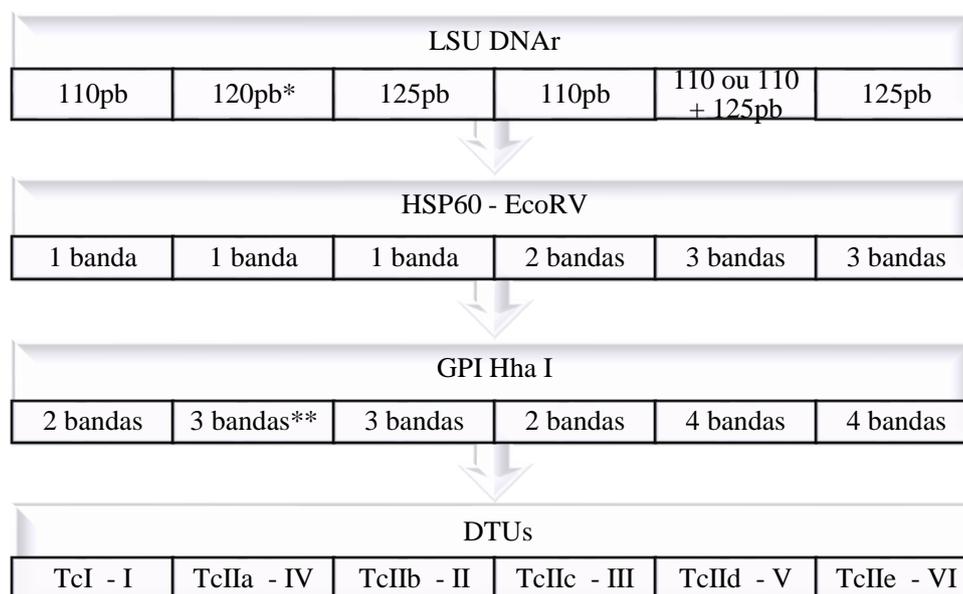
Foram adicionados 20µL de Proteinase K e 20µL de RNase A e incubou-se por 2 minutos à temperatura ambiente. Acrescentou-se 200µL de Pure Link Lysis Buffer e a seguir incubação a 35°C em banho-maria por 10 minutos. Após, adicionou-se 200µL de etanol 100% seguido por agitação em vortex por 5 segundos.

A reação foi inserida na coluna do kit que passou por centrifugação a 10.000g por 1 minuto à temperatura ambiente, seguido pelo descarte do eluído. Adicionou-se 500µL de *buffer* 1 na coluna mantendo por 1 minuto em temperatura ambiente.

A seguir foi procedida centrifugação a 10.000g durante 1 minuto à temperatura ambiente e o eluído foi descartado. Foram adicionados 500µL de *buffer* 2, novamente passou por centrifugação a 20.000g durante 3 minutos à temperatura ambiente. Foram acrescentados 25µL de buffer de eluição, incubado por 1 minuto a temperatura ambiente e centrifugado a 20.000g por 1 minuto à temperatura ambiente. Uma segunda coleta com 25µL de buffer de eluição foi realizada.

5.3.2. Amplificação dos Genes:

Foram utilizados os marcadores moleculares GPI, HSP60 e LSU rDNA (24 Sα rDNA) amplificados por meio da técnica de PCR-RFLP seguindo o protocolo estabelecido por Lewis et al. (2009) segundo diagrama abaixo.



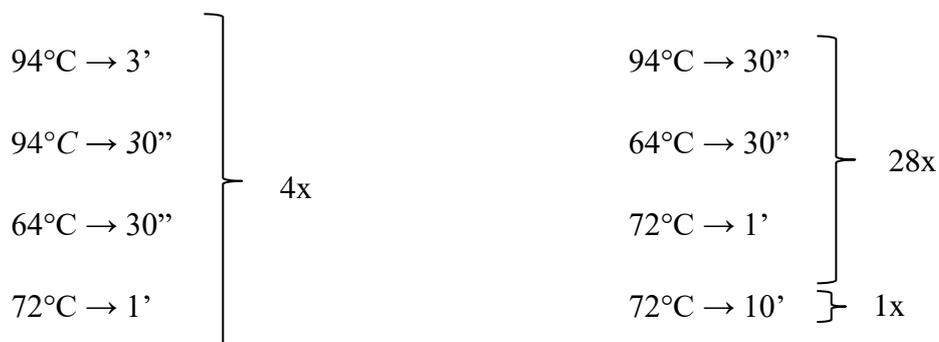
*TcIIa = 130 pb; **TcIIa = 2 bandas

Figura 7. Diagrama de ensaio triplo recomendado para discriminar as DTUs de *T. cruzi* (LEWIS et al., 2009; RIBEIRO, 2010).

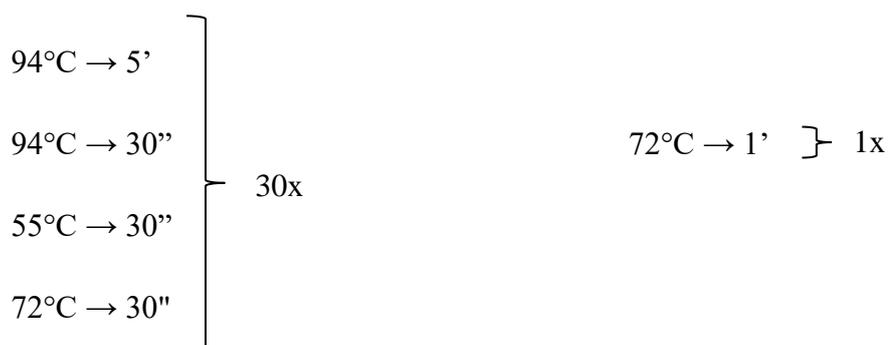
Para a reação de PCR-RFLP foram adicionados os seguintes componentes em 50 μ L de volume final:

- 100ng de DNA genômico;
- 0,2 mmol/L para cada dNTP;
- 1 pmol/ μ L de cada oligonucleotídeo iniciador;
- 1,5 mmol/L de MgCl₂;
- 1 unidade de Taq DNA polimerase (*High Fidelity PCR Enzyme MIX*);
- Tampão 10x

A reação foi realizada em termociclador Gene Amp PCR System 9700 Applied BiosystemsTM. Para os genes GPI e HSP60, seguiu-se os seguintes ciclos:



Para o gene LSU rDNA (24 S α rDNA), seguiu-se os seguintes ciclos:



5.3.3. Digestão Enzimática:

Os produtos obtidos dos genes GPI e HSP60 a partir da PCR passaram por digestão enzimática com as enzimas *HhaI* e *EcoR V*, respectivamente, seguindo protocolo abaixo:

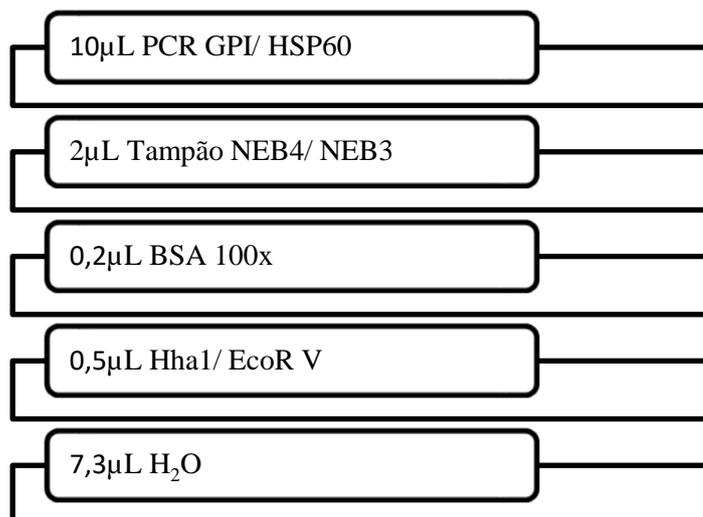


Figura 8. Protocolo de digestão enzimática referente às enzimas Hha1 e EcoR V.

5.4. Tempo de duplicação celular:

As cepas Tsh 12 e Tsh 19 de *T. cruzi* foram mantidas em meio de cultura LIT por 45 dias para obter formas tripomastigotas metacíclicas. As TMs foram inoculadas em cultura celular de macrófagos da linhagem J774 e mantidas a 37°C em meio de cultura celular RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino, adicionado de estreptomicina e penicilina 1,5%.

Nos ensaios, foram semeados e incubadas *overnight* 5×10^5 macrófagos a 37°C em placa de 24 poços. As células foram infectadas com $4,3 \times 10^4$ formas tripomastigotas para as cepas Tsh 12 e Tsh 19. Posteriormente, foram coradas por *Giemsa* e analisadas em microscopia óptica.

As culturas foram observadas quanto a tempo de duplicação celular obtida por meio da fórmula:

$$Td = \frac{\text{Ln } 2 (t1-t0)}{2,3 \log\left(\frac{N1}{N0}\right)}$$

Td = tempo de duplicação

T₁ = tempo 1

T₂ = tempo 2

N₁ = número de formas

N₀ = número de formas

Ln = constante

6. Análise estatística

Foi feito o teste de Shapiro-Wilk para os parâmetros morfométricos a partir dos valores medidos obtidos para cada uma das cepas mensuradas a fim de classificar os valores como paramétricos e não-paramétricos.

Para os parâmetros classificados como paramétricos, a análise estatística foi feita a partir do teste ANOVA-One-way.

Para os parâmetros classificados como não-paramétricos, a análise estatística foi feita a partir do teste de Kruskal-Wallis.

7. Resultados

7.1. Mensuração das formas epimastigotas e tripomastigotas de *T. cruzi*:

7.1.1. Mensuração de formas epimastigotas das cepas Tsh 12, Tsh 19, Tmel 8 e Tmel 44 de *T. cruzi*:

As formas epimastigotas das cepas Tsh 12, Tsh 19, Tmel 8 e Tmel 44 de *T. cruzi* mostraram-se equivalentes quanto aos parâmetros mensurados: comprimento total do parasito, largura da célula, área e posição do cinetoplasto, área do núcleo e índice nuclear. Os resultados para cada uma delas estão apresentados nas tabelas abaixo.

Tabela 2. Resultado das mensurações em triplicata de 30 formas epimastigotas de *T. cruzi* da cepa Tsh 12 obtidas de meio de cultura LIT

Parâmetros	Valores (µm)			
	Mínimo	Máximo	Média ± DP	Mediana
Comprimento total	25,4	71,3	47,19 ± 10,67	48,85
Flagelo livre	7,7	48,1	15,11 ± 5,74	13,55
Largura	1,3	7,5	4,51 ± 1,51	4,6
Área do cinetoplasto	0,3	1,6	0,62 ± 0,22	0,6
Área do núcleo	0,7	3,9	1,82 ± 0,60	1,75
Índice nuclear	0,13	1,05	0,62 ± 0,20	0,59

As formas epimastigotas de *T. cruzi* da cepa Tsh 12 mensuradas apresentaram-se largas, comprimento e flagelo longos, área do cinetoplasto e área do núcleo pequenas e índice nuclear baixo conforme dados apresentados na Tabela 2.

Tabela 3. Resultado das mensurações em triplicata de 30 formas epimastigotas de *T. cruzi* da cepa Tsh 19 obtidas de meio de cultura LIT.

Parâmetros	Valores (µm)			
	Mínimo	Máximo	Média ± DP	Mediana
Comprimento total	24,2	62,1	43,87 ± 8,47	44,4
Flagelo livre	14,6	38,6	27,12 ± 5,98	27,65
Largura	1,2	4,3	2,52 ± 0,61	2,45
Área do cinetoplasto	0,2	3,0	0,42 ± 0,31	0,4
Área do núcleo	0,2	1,3	0,68 ± 0,25	0,65
Índice nuclear	0,03	0,83	0,40 ± 0,16	0,39

As formas epimastigotas da cepa Tsh 19 de *T. cruzi* se apresentam em sua predominância como largas, com comprimento e flagelo longos, área do cinetoplasto e área do núcleo pequenas e índice nuclear baixo conforme dados apresentados na Tabela 3.

Tabela 4. Resultado das mensurações em triplicata de 30 formas epimastigotas de *T. cruzi* da cepa Tmel 8 obtidas de meio de cultura LIT.

Parâmetros	Valores (μm)			
	Mínimo	Máximo	Média \pm DP	Mediana
Comprimento total	28,4	68,1	46,15 \pm 10,15	42,8
Flagelo livre	12,3	37,4	22,06 \pm 6,64	20,65
Largura	1,5	5,0	2,81 \pm 0,76	2,7
Área do cinetoplasto	0,1	0,4	0,24 \pm 0,08	0,2
Área do núcleo	0,3	2,0	0,69 \pm 0,30	0,6
Índice nuclear	0,05	1,20	0,75 \pm 0,20	0,75

As formas epimastigota da cepa Tmel 8 de *T. cruzi* mensuradas apresentam-se em predominância como largas, com comprimento e flagelo longos, área do cinetoplasto e área do núcleo pequenas e índice nuclear baixo conforme dados apresentados na Tabela 4.

Tabela 5. Resultado das mensurações em triplicata de 30 formas epimastigotas de *T. cruzi* da cepa Tmel 44 obtidas de meio de cultura LIT.

Parâmetros	Valores (μm)			
	Mínimo	Máximo	Média \pm DP	Mediana
Comprimento total	19,8	59,9	41,75 \pm 8,74	42,15
Flagelo livre	7,0	32,8	19,51 \pm 5,34	19,55
Largura	1,3	4,7	2,83, \pm 0,07	2,85
Área do cinetoplasto	0,1	0,4	0,23 \pm 0,11	0,2
Área do núcleo	0,1	1,1	0,56 \pm 0,17	0,5
Índice nuclear	0,30	1,31	0,72 \pm 0,24	0,69

As formas epimastigotas da cepa Tmel 44 de *T. cruzi* apresentam-se como largas, com comprimento e flagelo longos, área do cinetoplasto e área do núcleo pequenas e índice nuclear baixo conforme dados apresentados na Tabela 5.

Tabela 6. Média dos parâmetros morfométricos de *T. cruzi* sob as formas epimastigotas das cepas Tsh 12, Tsh 19, Tmel 8 e Tmel 44 em meio LIT (n = 30).

Parâmetros	Valores média (μm)			
	Tsh 12	Tsh 19	Tmel 8	Tmel 44
Comprimento total	47,19	43,87	46,15	41,75
Largura	4,51	2,52	2,81	2,83
Índice nuclear	0,62	0,40	0,75	0,72

O número de formas referentes a cada parâmetro analisado encontra-se nas figuras abaixo e os valores de significância estão representados na Tabela 7.

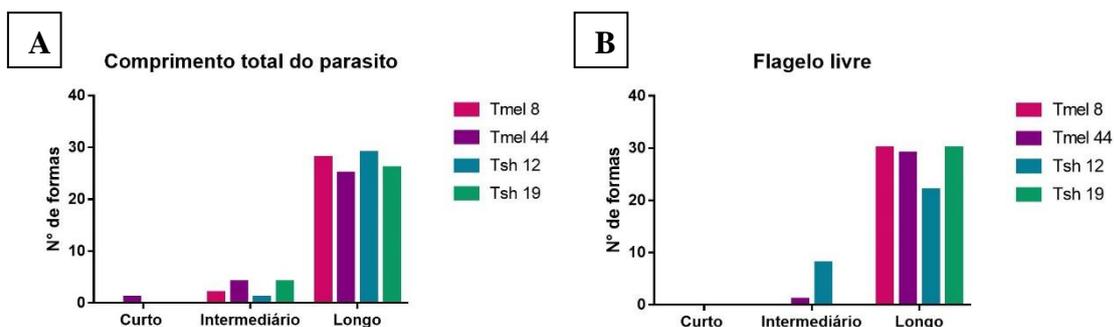


Figura 9. Representação gráfica do número de formas mensuradas e classificação de formas epimastigotas de *T. cruzi* das cepas Tsh 12, Tsh 19, Tmel 8 e Tmel 44 quanto ao comprimento total do parasito e flagelo livre.

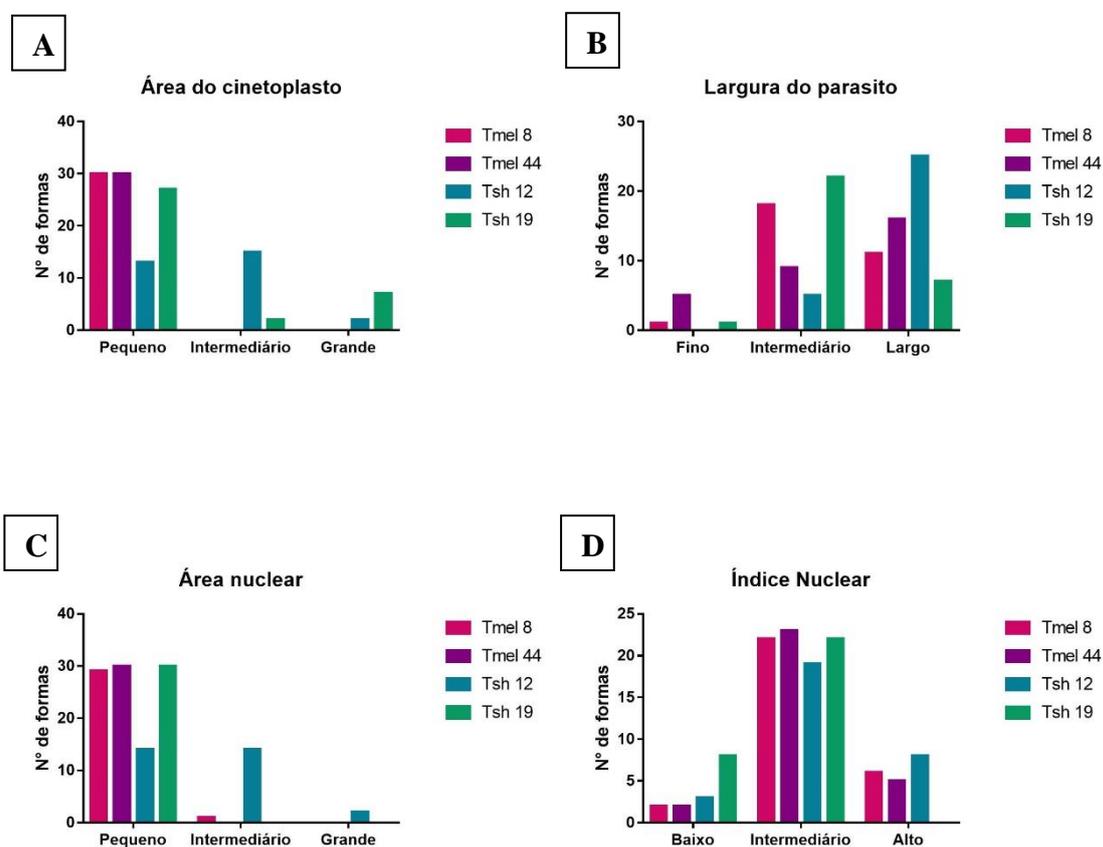


Figura 10. Representação gráfica do número de formas mensuradas e classificação de formas epimastigotas de *T. cruzi* das cepas Tsh 12, Tsh 19, Tmel 8 e Tmel 44 quanto a área do cinetoplasto, largura do parasito, área do núcleo e índice nuclear. A. Área do cinetoplasto; B. Largura do parasito; C. Área nuclear; D. Índice nuclear.

Tabela 7. Análise estatística referente as mensurações das formas epimastigotas de *T. cruzi* das cepas Tsh 12, Tsh 19, Tmel 8 e Tmel 44.

Parâmetros	Valores de significância - <i>P</i>
Comprimento total	$P=0,0078$ **
Flagelo livre	$P<0,0001$ ****
Largura	$P<0,0001$ ****
Área do cinetoplasto	$P<0,0001$ ****
Área do núcleo	$P<0,0001$ ****
Índice nuclear	$P<0,0001$ ****

** : Significativo

*** : Muito significativo

**** : Extremamente significativo

Para os parâmetros flagelo livre, área do cinetoplasto, largura do cinetoplasto, área do núcleo e índice nuclear foi utilizado o teste paramétrico ANOVA-One-Way. Para o parâmetro comprimento total do parasito foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis.

As cepas Tsh 12 e Tsh 19 de *T. cruzi* isoladas de *T. sherlocki* no mesmo ano de coleta (2014) e mesmo local (Santo Inácio, município de Gentio do Ouro, BA) não apresentaram variação morfométrica sob as formas epimastigotas, conforme mostrado nas Tabs. 2 e 3.

As cepas Tmel 8 e Tmel 44 de *T. cruzi* isoladas de *T. melanica* no mesmo ano de coleta (2017) e mesma região (Porteirinha, - MG) não apresentaram variação morfométrica sob as formas epimastigotas de acordo com os parâmetros usados para comparação conforme mostrado nas Tabs. 4 e 5.

7.1.2. Mensuração de formas tripomastigotas de *T. cruzi* das cepas Tsh 12, Tmel 8 e Tmel 44 obtidas de meio LIT.

As formas tripomastigotas de *T. cruzi* das cepas Tsh 12, Tmel 8 e Tmel 44 foram mensuradas quanto aos parâmetros: comprimento total do parasito, largura da célula, área e posição do cinetoplasto, área do núcleo, distância da extremidade anterior ao núcleo e da extremidade posterior ao núcleo e índice nuclear.

Para cada uma das cepas, foram mensuradas 30 formas tripomastigotas em triplicata. O resultado está apresentado na tabela abaixo.

Tabela 8. Resultado das mensurações em triplicata de 30 formas tripomastigotas de *T. cruzi* da cepa Tsh 12 obtidas de meio de cultura LIT após 45 dias de cultivo.

Parâmetros	Valores (μm)			
	Mínimo	Máximo	Média \pm DP	Mediana
Comprimento total	18,1	50,3	34,24 \pm 6,35	32,4
Flagelo livre	6,0	25,6	11,25 \pm 3,84	10,5
Largura	1,0	3,6	2,34 \pm 0,51	2,4
Área do cinetoplasto	0,3	0,67	0,67 \pm 0,23	0,6
Área do núcleo	0,9	4,8	2,34 \pm 0,74	2,3
Índice nuclear	0,96	3,56	0,96 \pm 0,41	0,90

As formas tripomastigotas de *T. cruzi* da cepa Tsh 12 mensuradas em triplicata apresentam-se com largura intermediária, comprimento longos, flagelo intermediário, área do cinetoplasto e área do núcleo intermediárias e índice nuclear alto conforme dados apresentados na Tabela 8.

Tabela 9. Resultado das mensurações em triplicata de 30 formas tripomastigotas de *T. cruzi* da cepa Tmel 8 obtidas de meio de cultura LIT após 45 dias de cultivo.

Parâmetros	Valores (μm)			
	Mínimo	Máximo	Média \pm DP	Mediana
Comprimento total	21,0	41,8	33,1 \pm 4,94	34,15
Flagelo livre	10,2	26,4	16,4 \pm 3,80	16,75
Largura	1,6	3,6	2,6 \pm 0,42	2,6
Área do cinetoplasto	0,3	1,9	0,8 \pm 0,29	0,8
Área do núcleo	0,5	3,2	1,5 \pm 0,64	1,5
Índice nuclear	0,21	1,71	0,67 \pm 0,32	0,60

As formas tripomastigotas de *T. cruzi* da cepa Tmel 8 mensuradas se apresentaram em sua predominância com largura intermediária, comprimento e flagelo longos, área do cinetoplasto intermediária, área do núcleo pequena e índice nuclear intermediário conforme dados apresentados na Tabela 9.

Tabela 10. Resultado das mensurações em triplicata de 30 formas tripomastigotas de *T. cruzi* da cepa Tmel 44 obtidas de meio de cultura LIT após 45 dias de cultivo.

Parâmetros	Valores (μm)			
	Mínimo	Máximo	Média \pm DP	Mediana
Comprimento total	14,8	43,6	32,2 \pm 6,39	33,2
Flagelo livre	5,0	26,8	14,3 \pm 4,68	14,45
Largura	1,3	4,2	2,7 \pm 0,61	2,7
Área do cinetoplasto	0,3	1,5	0,7 \pm 0,27	0,7
Área do núcleo	0,9	4,8	1,9 \pm 0,64	1,9
Índice nuclear	0,26	3,28	0,77 \pm 0,45	0,63

As formas tripomastigotas da cepa Tmel 44 de *T. cruzi* mensuradas apresentam-se em sua predominância com largura intermediária, comprimento e flagelo longos, área do cinetoplasto e área do núcleo intermediárias, e índice nuclear intermediário conforme dados apresentados na Tabela 11.

Tabela 11. Média dos parâmetros morfométricos de formas tripomastigotas de *T. cruzi* das cepas Tsh 12, Tmel 8 e Tmel 44 de em meio LIT após 45 dias de cultivo (n = 30).

Parâmetros	Valores média (µm)		
	Tsh 12	Tmel 8	Tmel 44
Comprimento total do parasito	34,2	33,1	32,2
Largura do parasito	2,3	2,6	2,7
Índice nuclear	0,96	0,67	0,77

O número de formas referentes a cada parâmetro analisado encontra-se nas figuras abaixo e os valores de significância estão representados na tabela 12.

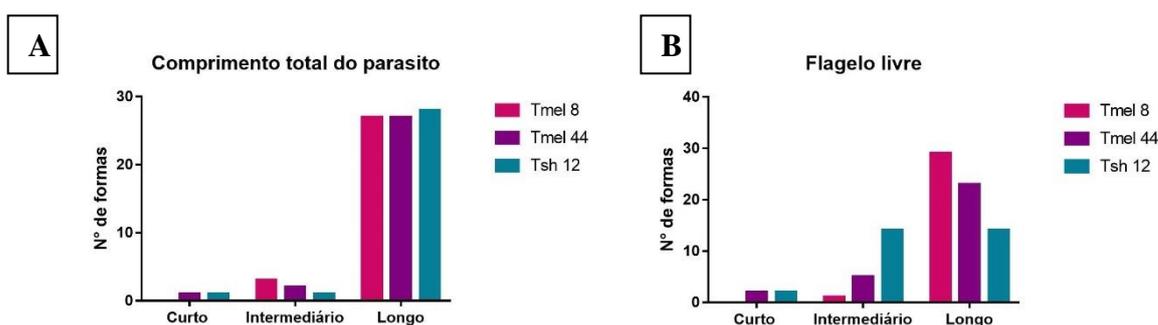


Figura 11. Representação gráfica do número de formas mensuradas e classificação de formas tripomastigotas das cepas Tsh 12, Tmel 8 e Tmel 44 de *T. cruzi* quanto ao comprimento total do parasito e flagelo livre. A. Flagelo livre; B. Comprimento total do parasita.

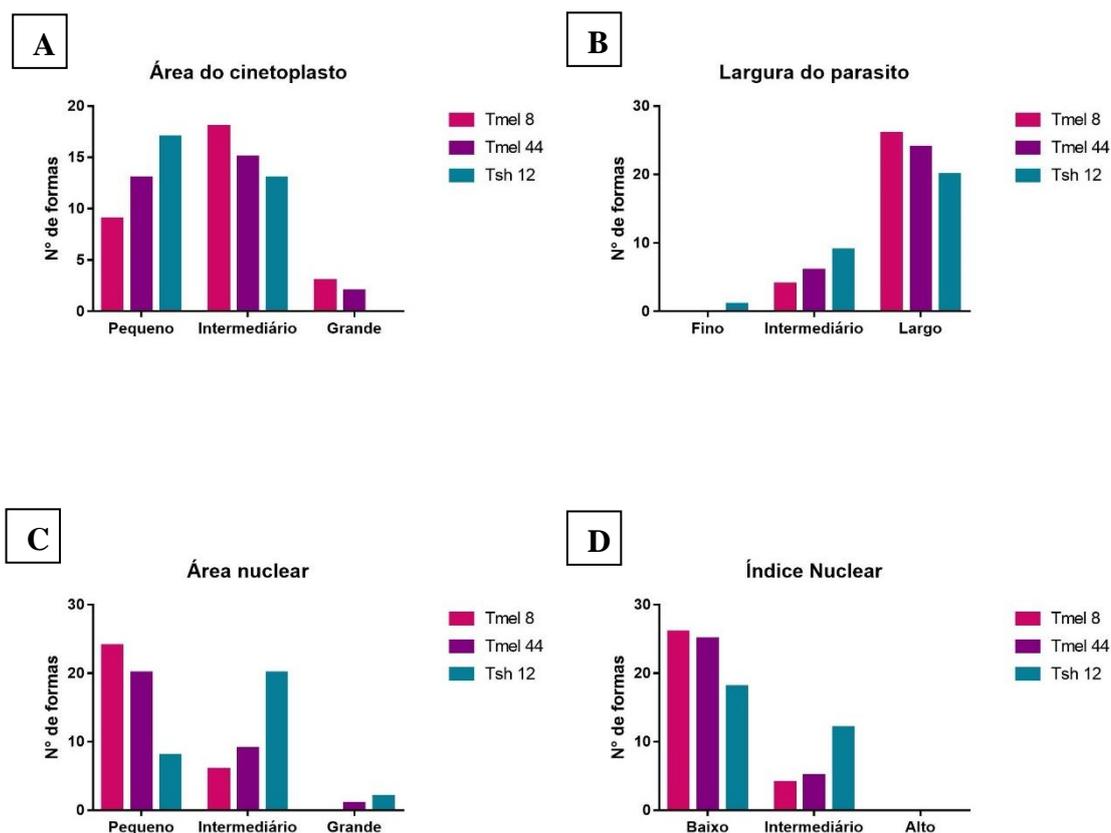


Figura 12. Representação gráfica do número de formas mensuradas e classificação de formas tripomastigotas das cepas Tsh 12, Tmel 8 e Tmel 44 de *T. cruzi* quanto a área do cinetoplasto, largura do parasito, área do núcleo e índice nuclear. A. Área do cinetoplasto; B. Largura do parasito; C. Área do núcleo; D. Índice nuclear.

Tabela 12. Análise estatística referente as mensurações das formas tripomastigotas das cepas Tsh 12, Tmel 8 e Tmel 44 de *T. cruzi*.

Parâmetros	Valores de significância - <i>P</i>
Comprimento total do parasito	$P=0,0623$ ns
Flagelo livre	$P<0,0001$ ****
Largura do parasito	$P<0,0001$ ***
Área do cinetoplasto	$P<0,0005$ ***
Área do núcleo	$P<0,0001$ ****
Índice nuclear	$P<0,0001$ ****

NS: Não significativo

***: Muito significativo

****: Extremamente significativo

Para os parâmetros comprimento total do parasito, flagelo livre, área do cinetoplasto, área do núcleo e índice nuclear foi utilizado o teste paramétrico ANOVA-One-Way. Para o parâmetro largura do parasito foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis.

As cepas Tmel 8 e Tmel 44 de *T. cruzi* isoladas de *T. melanica* no mesmo ano de coleta (2017) e mesma região (Porteirinha, - MG) apresentaram variação morfológica na área nuclear das formas tripomastigotas de acordo com os parâmetros usados para comparação conforme mostrado nas Tabs. 9 e 10.

7.2.Caracterização Molecular:

A amplificação dos genes HSP60, GPI e LSU de *T. cruzi* das cepas Tsh 12, Tsh 19, Tmel 8 e Tmel 44 por meio da técnica de PCR-RFLP resultou nas ampliações mostradas abaixo.

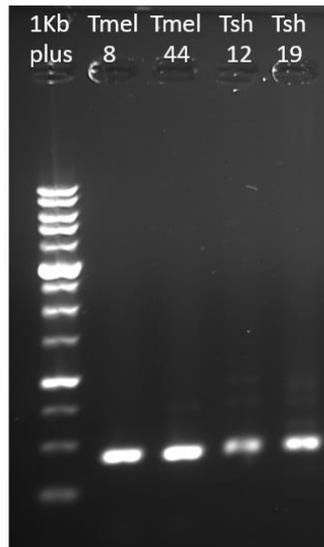


Figura 13. Amplificação do gene HSP60 para as cepas Tsh 12, Tsh 19, Tmel 8 e Tmel 44 de *T. cruzi* em gel de agarose a 1%, 60V por 90 minutos.

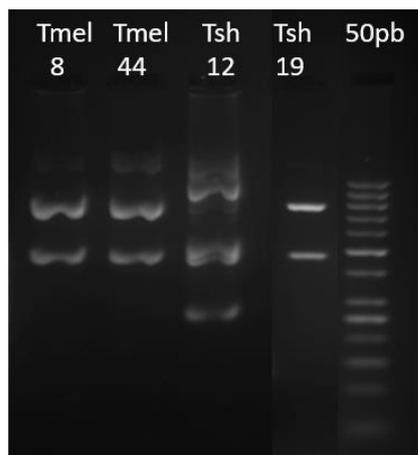


Figura 14. Amplificação do gene GPI para as cepas Tsh 12, Tsh 19, Tmel 8 e Tmel 44 de *T. cruzi* em gel de agarose a 3%, 40V por 80 minutos.

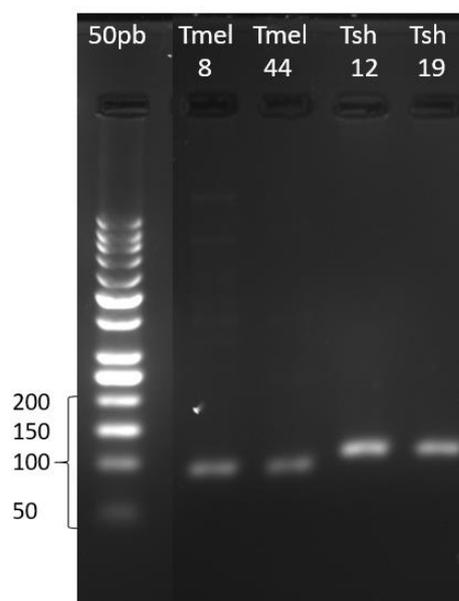


Figura 15. Amplificação do gene LSU (24S α) para as cepas Tsh 12, Tsh 19, Tmel 8 e Tmel 44 de *T. cruzi* em gel de agarose a 3%, 50V por 80 minutos.

Os fragmentos obtidos pela amplificação dos genes HSP61, GPI e LSU (24S α) para as cepas Tsh 12, Tsh 19, Tmel 8 e Tmel 44 de *T. cruzi* foram observados e avaliados segundo protocolo de Lewis et al. (2009). Por essa metodologia a cepa de *T. cruzi* Tsh 12 foi classificada no grupo TcII; a cepa de *T. cruzi* Tsh 19 foi classificada como pertencente ao grupo TcIV e as cepas de *T. cruzi* Tmel 8 e Tmel 44 inseridas ao grupo TcI, conforme demonstrado nas Figuras 13, 14 e 15.

As cepas de *T. cruzi* Tmel 8 e Tmel 44 apresentaram uma banda amplificada quanto ao gene HSP60, duas bandas amplificadas para o gene GPI em uma amplificação em 110pb para o gene LSU (24S α) classificando-as como pertencentes ao grupo TcI, anteriormente conhecido por Zimodema 1 ou Linhagem 2.

A cepa Tsh 12 apresentou uma banda amplificada para o gene HSP60, três bandas amplificadas para o gene GPI e uma banda amplificada em 125pb para o gene LSU (24S α), permitindo a classificação como pertencente ao grupo TcII, anteriormente descrito por Zimodema 2 ou Linhagem 1.

A cepa Tsh 19 de *T. cruzi* apresentou 1 banda amplificada para o gene HSP60, duas bandas amplificadas para o gene GPI e uma banda amplificada em 130pb para o gene LSU (24S α), permitindo com que esta fosse classificada como pertencente ao grupo TcIV, foi caracterizada antes como Z3 ou Z3 B.

7.3. Tempo de duplicação celular de *T. cruzi* em linhagem celular J774

Para análise da taxa de infecção celular na linhagem J774 por *T. cruzi* foram estudadas formas tripomastigotas metacíclicas das cepas Tsh 12 e Tsh 19 obtidas por cultura em meio LIT após 45 dias de cultivo mantidas em estufa B.O.D no Laboratório de Parasitologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara. As cepas de *T. cruzi* foram inoculadas em placas de 24 poços com macrófagos da linhagem J774 previamente plaqueados e incubados *overnight*.

As lâminas foram preparadas e coradas através da coloração de *Giemsa*. As formas amastigotas interiorizadas nos macrófagos foram contadas após 24, 48 e 72 horas de infecção (Figs 16, 17 e 18).

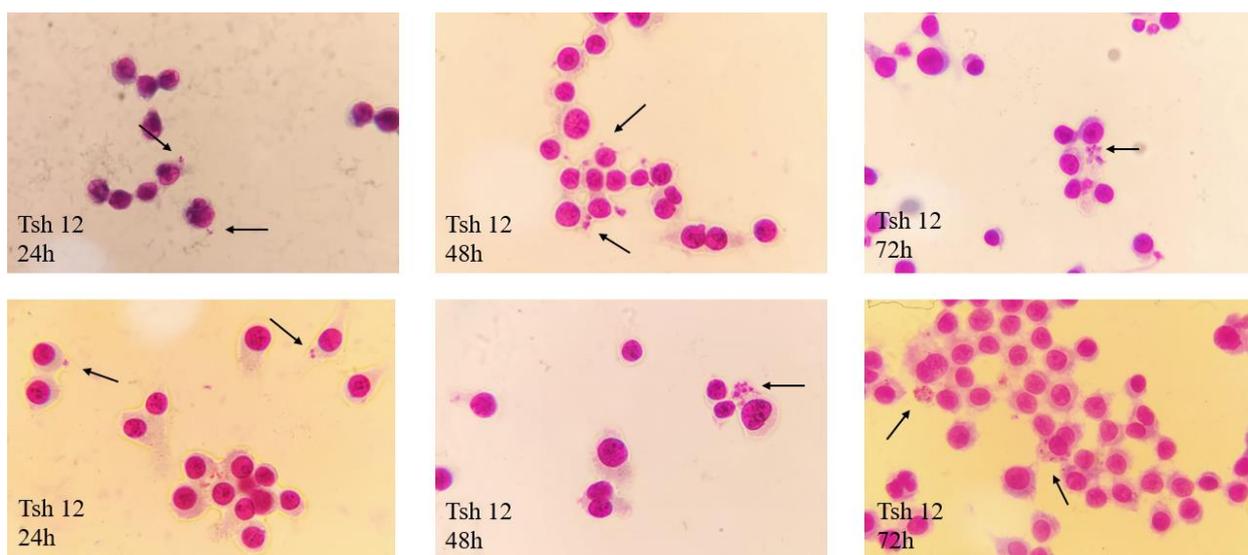


Figura 16. Micrografias representativas da análise microscópica (100x) de infecção celular de macrófagos da linhagem J774 pela cepa Tsh 12 de *T. cruzi* após 24, 48 e 72h de infecção. Setas indicam as formas amastigotas de *T. cruzi*.

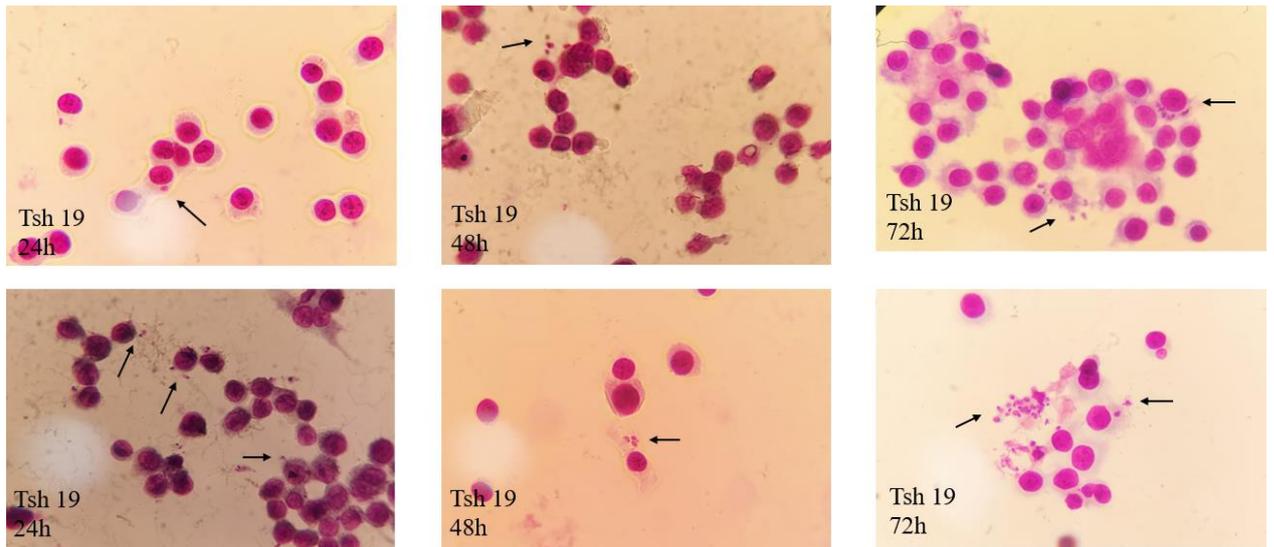


Figura 17. Micrografias representativas da análise microscópica (100x) de infecção celular de macrófagos da linhagem J774 pela cepa Tsh 19 de *T. cruzi* após 24, 48 e 72h de infecção. Setas indicam as formas amastigotas de *T. cruzi*.

O número médio de formas amastigotas contadas em macrófagos da linhagem J774 está representado no gráfico (Figura 18). A taxa de infecção celular está representada na Tabela13.

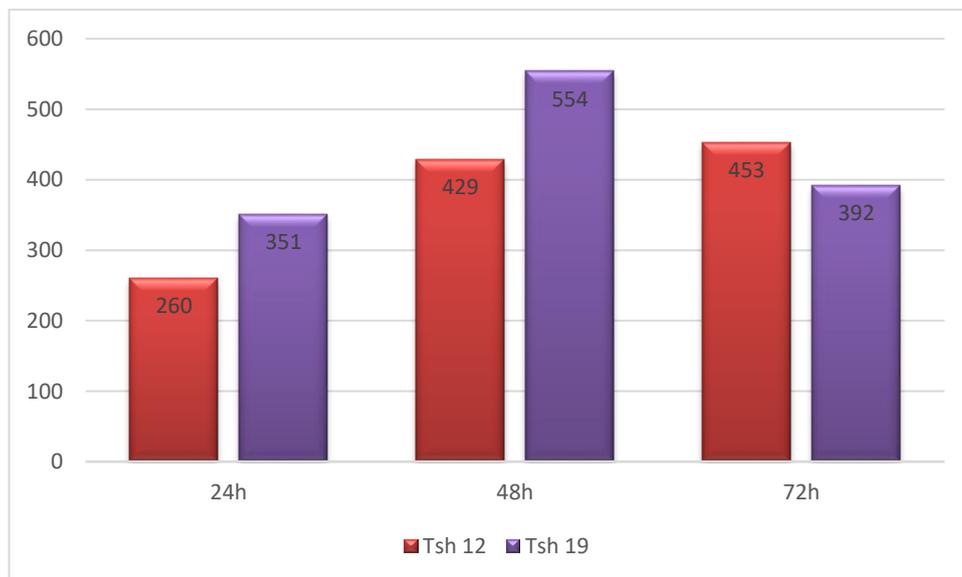


Figura 18. Tempo de duplicação celular de macrófagos da linhagem J774 pelas cepas de *T. cruzi* Tsh 12 e Tsh 19.

Tabela 13. Tempo de duplicação celular pelas cepas Tsh 12 e Tsh 19 de *T. cruzi* em células da linhagem J774.

Cepa	Grupo	N ₀	N ₁	N ₂	Td ₁ (horas)	Td ₂ (horas)	Td ₁ (dias)	Td ₂ (dias)
Tsh 12	TcII	260	429	453	32,6	59,0	1,4	2,5
Tsh 19	TcIV	351	554	392	36,2	313,2	1,5	13,0

Td₁:Tempo de duplicação entre 24h e 48 h.

Td₂:Tempo de duplicação entre 24h e 72 h.

N₀: Número de parasitas por célula em 24h.

N₁:Número de parasitas por célula em 48h.

N₂: Número de parasitas por célula em 72h.

8. Discussão

8.1. Mensuração de formas epimastigotas e tripomastigotas de *T. cruzi*:

A existência de tripomastigotas com tamanhos distintos foi observada pela primeira vez por Chagas (1909) que associou ao dimorfismo sexual, que posteriormente não foi verificado por outros autores (MEYER; XAVIER DE OLIVEIRA, 1948; PIZZI, 1953; SILVA, 1959; TREJOS et al., 1963; BRENER, 1965).

Em estudo realizado em 1965, Brener mostrou que de forma geral o início da infecção apresenta formas tripomastigotas delgadas, algumas cepas mantiveram as formas delgadas até a morte do animal, enquanto outras foram substituídas por formas mais amplas (BRENER, 1965). Ribeiro et al. (1982) observaram que uma cepa de *T. cruzi* poderia ser fracionada em duas subamostras com características distintas quanto ao tamanho e assim a população do parasito poderia influir no curso da infecção (RIBEIRO et al., 1986; RIBEIRO; FERRIOLLI FILHO; BELDA NETO, 1982).

Schelemper Jr et al. (1986) correlacionaram a largura das formas tripomastigotas com a virulência da cepa, todas as cepas estudadas pelos autores apresentaram-se largas ou muito largas, quanto maior a largura do parasito, maior o padrão de virulência (SCHLEMPER JR et al., 1986). Zeledon e Vieto (1958) levantaram a hipótese que quanto menor o índice nuclear menor a virulência da cepa (ZELEDÓN; VIETO, 1958).

Nas análises realizadas após a metaciclologênese, ou seja, processo de diferenciação, a cepa Tsh 12 apresentou variações morfométricas quanto à largura, flagelo livre, área do cinetoplasto, área do núcleo e índice nuclear (Tabs. 2 e 8). A cepa Tmel 8 obteve variações morfométricas quanto à largura, área do cinetoplasto e índice nuclear (Tabs. 4 e 9). A cepa Tmel 44 apresentou-se com variações morfométricas quanto à largura, áreas de cinetoplasto e núcleo e índice nuclear (Tabs. 5 e 10).

As cepas de *T. cruzi* mensuradas neste trabalho apresentaram variações quanto aos parâmetros morfométricos de largura e índice nuclear após a metaciclologênese, tendo seus índices nucleares aumentados e suas larguras diminuídas, no entanto, não foi possível correlacionar esses resultados com as hipóteses levantadas por Zeledon e Vieto (1958) e Schlemper Jr. (1986).

Em estudo de 1968, Ferriolli Filho et al. notaram que formas tripomastigotas observadas em reservatórios silvestres apresentavam grande variabilidade quanto à biometria de comprimento total médio e de índice nuclear médio, conforme observado anteriormente por outros autores. Foi observado que amostras coletadas de humanos se assemelhavam às amostras coletadas de outros mamíferos. Os resultados por eles obtidos não confirmaram a hipótese de Zeledon e Vieto quanto a correlação do índice nuclear e a virulência da cepa (BARRETO, 1965; FERRIOLLI FILHO; BARRETO; CARVALHEIRO, 1968; ZELEDÓN; VIETO, 1958).

Foi possível observar neste estudo que as cepas mensuradas obtiveram valores máximos e mínimos muito distintos nos parâmetros flagelo livre, área do cinetoplasto, área nuclear e índice nuclear para formas epimastigotas (Tabs. 2, 3, 4 e 5) e para as formas tripomastigotas em todos os parâmetros analisados conforme demonstrado nas tabelas 8, 9 e 10. Esses resultados corroboram com a observação de Ribeiro (1982) de que uma mesma cepa pode ser fracionada em duas subamostras.

Belda Neto (1974) se propôs a estudar a correlação entre mensuração e características biológicas de formas tripomastigotas de dez diferentes cepas de *T. cruzi* isoladas de humanos. O autor observou, variação quanto à largura da forma tripomastigota com certo polimorfismo predominante em diferentes cepas. O pesquisador ressalta a importância da correlação entre tamanho e o comportamento biológico do parasito e a necessidade de novos estudos (BELDA NETO, 1974).

A análise dos resultados morfométricos de formas epimastigotas e tripomastigotas feitas por Rossi (2007) ao utilizar as cepas Bolívia, QM₂, S.I.₉ e Y definiram valores numéricos para se considerar uma cepa de *T. cruzi* como fina, intermediária ou larga quanto à largura. Rossi (2007) também padronizou o comprimento total e flagelo livre como curto, intermediário e longo, área do núcleo e área do cinetoplasto como pequena, intermediária e grande e índice nuclear como baixo, intermediário e alto. Martins e colaboradores (2008) utilizaram esses resultados estatísticos para a classificação morfométrica de formas tripomastigotas sanguíneas, os resultados estatísticos por sua vez, se mostraram diferentes dos resultados obtidos por microscopia (MARTINS et al., 2008).

As cepas de *T. cruzi* Tmel 8, Tmel 44, Tsh12 e Tsh19, apresentaram divergências nos parâmetros analisados quanto aos valores mínimos e máximos obtidos por Rossi

(2007) em relação a mensuração das cepas Bolívia, QM2, S.I.9 e Y em formas epimastigotas e tripomastigotas. As formas epimastigotas das cepas Tsh 12, Tsh 19, Tmel 8 e Tmel 44 apresentaram formas maiores do que o padrão estabelecido por Rossi em 2007 para o comprimento total do parasito, flagelo livre, área do cinetoplasto e largura. Assim como, formas menores que o determinado pela autora nos parâmetros área do cinetoplasto, área do núcleo e índice nuclear (resultados demonstrados nas Tabs. 2-5). Em comparação as formas tripomastigotas, as cepas de *T. cruzi* Tsh 12; Tmel 8 e Tmel 44 se mostraram igualmente maiores que os padrões apresentados por Rossi (2007) para o comprimento total do parasito e flagelo livre, do mesmo modo que se mostraram inferiores quanto a área do núcleo e índice nuclear (Tabs. 8-10).

Das cepas estudadas por Rossi (2007) duas são pertencentes ao grupo genótipo TcI (Bolívia e QM2), mesmo grupo classificado às cepas Tmel 8 e Tmel 44, e uma cepa pertencente ao grupo TcII (Y), mesmo grupo de classificação da cepa Tsh 12, não corroborando com a hipótese de que a diferença morfométrica tenha ocorrido devido a diferença de caracterização molecular. Acredita-se que essa diferença observada se deve a adaptação do parasito ao elevado número de passagens realizadas em meio de cultura LIT desde o isolamento das cepas tendo ocorrido em 2014 para as cepas Tsh 12 e Tsh 19 e em 2017 para as cepas Tmel 8 e Tmel 44.

Rimoldi *et al.* (2012) estudaram as cepas SIGR₃, SI₅ e SI₈ isoladas da região de Gentio do Ouro – BA, mesmo local de coleta das cepas Tsh 12 e Tsh 19. As cepas isoladas, foram mensuradas e apresentaram valor mensurado inferior quanto os parâmetros cinetoplasto quando comparadas às cepas Tsh 12, Tsh 19, Tmel 8 e Tmel 44, em forma epimastigota referente aos parâmetros comprimento do parasito, largura e índice nuclear e valores mensurados superiores quanto às áreas do núcleo. Para a forma tripomastigotas, as cepas apresentaram mensurações de valor inferior quanto ao comprimento total, flagelo livre, largura e índice nuclear, e superior quanto à área do cinetoplasto.

Abegg *et al.* (2017) mostraram em estudo de metaciclogênese, que cepas dos grupos TcI e TcII apresentaram taxas de metaciclogênese de 76,4% e 51,5% respectivamente em meio de cultura LIT, enquanto as cepas pertencentes ao grupo TcIV apresentou taxa de metaciclogênese máxima de 5,7% referente à cepa AM69 (ABEGG *et al.*, 2017). No presente estudo a cepa Tsh 12, pertencente ao grupo TcII, apresentou taxa

de metaciclologênese superior quando comparada com as cepas pertencentes aos grupos TcI, sendo possível mensurar 30 formas tripomastigotas obtidas em cultura com notável facilidade quanto comparado às cepas pertencentes aos grupos TcI, contradizendo o resultado obtido por Abegg. Não foi possível mensurar a cepa Tsh 19 pertencente ao grupo TcIV devido ao reduzido número de formas tripomastigotas presentes em cultura, esse resultado corrobora com dados obtidos por Abegg de menor índice de metaciclologênese para cepas TcIV.

8.2.Caracterização Molecular:

A caracterização molecular das cepas isoladas de *Triatoma sherlocki* corrobora com dados obtidos por Rimoldi *et al.* (2012) em cepas isoladas de *Triatoma sordida* na região de Gentio do Ouro – BA. Dados do estudo realizado por Rimoldi, mostraram três cepas pertencentes ao grupo TcII de *T. cruzi*, corroborando com o resultado da caracterização molecular da cepa Tsh 12 a classifica como grupo molecular TcII enquanto a cepa Tsh 19 como pertencente ao grupo TcIV. O grupo molecular TcII é considerado esperado para a região de coleta, no entanto está relacionado à transmissão doméstica, enquanto Tsh 12 coletada em região silvestre. O grupo TcIV não é um dado considerado esperado para a região segundo levantamento feito por Zingales (2012) tanto para o ciclo de transmissão doméstico como para o ciclo silvestre (RIMOLDI *et al.*, 2012; ZINGALES *et al.*, 2012). Os dados mostrados neste trabalho, reitera a complexa relação parasito – hospedeiro durante o ciclo biológico do parasito, fato que pode explicar a complexidade molecular de cepas isoladas de diferentes espécies de triatomíneos.

A distribuição do grupo de DTU TcIV no Brasil é encontrada na região Norte, como nos estados do Amapá e Amazonas. O subgrupo TcIV, é considerado como resultado de hibridizações/recombinações genômicas e há poucos relatos de infecção em humanos por cepas pertencentes a esse subgrupo (MAEDA *et al.*, 2016; ZINGALES, 2011; ZINGALES *et al.*, 2012). Estudo feito por Carrasco (2016) na Venezuela demonstrou a ocorrência significativa de casos de doença de Chagas humana por cepas da linhagem TcIV de *T. cruzi*, deste modo, os autores suspeitam que possa haver uma subnotificação da distribuição de casos humanos TcIV de doença de Chagas (CARRASCO *et al.*, 2016).

Os dados moleculares obtidos para as cepas isoladas de *Triatoma melanica* as classificam como pertencentes ao grupo TcI de *T. cruzi*, e vão de encontro ao levantamento realizado por Zingales *et al.* (2012) em que cepas do grupo TcI são comumente encontradas em triatomíneos silvestres.

De Lana *et al.* (1996) caracterizaram duas cepas isoladas da paciente Berenice, moradora de Lassance, o primeiro caso humano de doença de Chagas na região central do Estado de Minas Gerais. Das cepas de *T. cruzi* analisadas, uma foi estudada logo após o isolamento (Be-78) enquanto a outra havia passado por diversas passagens em camundongos (Be-62). A cepa Be-62 mostrou padrão enzimático Zimodema A para todas as enzimas testadas enquanto a cepa Be-78 apresentou Zimodema A para seis das oito enzimas testadas e Zimodema B para duas enzimas. Os autores sugerem que Berenice estava contaminada com populações heterogêneas de *T. cruzi*, mas não descartaram a possibilidade de a paciente ter sido contaminada com uma segunda cepa do parasito, mas também que o sistema imunológico de Berenice pudesse ter eliminado alguns parasitos durante o ciclo de desenvolvimento. Os autores frisam que Zimodema A é comum em pacientes crônicos, e equivale ao grupo Z2 do ciclo doméstico, atualmente classificado como pertencente ao grupo TcII de *T. cruzi* (MILES *et al.*, 1981; DE LANA *et al.*, 1996; ANONYMUS, 1999; JUNQUEIRA; DEGRAVE; BRANDA, 2005;).

Em estudo realizado por Oliveira *et al.* (2015) na região do Vale do Jequitinhonha – MG, as cepas foram obtidas por hemocultura e não houve cepa classificada como pertencente ao grupo TcI. Apesar da proximidade entre as regiões de coleta, foram classificadas como TcII e TcVI (DE OLIVEIRA *et al.*, 2015).

A presença de três subgrupos de *T. cruzi* distintos no estado de Minas Gerais, TcI, TcII e TcIV, somado aos dados de de Lana *et al.* (1996) e Oliveira e colaboradores (2015), conduz importante dado epidemiológico ao estado pela importância clínica de cada um dos subgrupos somado à vasta extensão de território abrangido pelos estudos e a variação de tempo decorrida entre eles. Esses dados demonstram que a situação se encontra atual e visa alertar a necessidade de políticas de controle de transmissão, bem como orientação da população quanto aos cuidados necessários tendo em vista que não foram encontrados dados epidemiológicos da situação da doença de Chagas no Estado de Minas Gerais, bem como do controle de transmissão vetorial, diferentemente do Estado da Bahia em que a notificação de casos agudos é compulsória.

Conforme dados levantados por Zingales (2012) e Maeda (2016) no Brasil, o grupo genotípico TcVI era encontrado principalmente na região Norte, nos estados Amazonas, Amapá, Rondônia, Acre, Roraima, Pará, Maranhão, Piauí, norte do Tocantins e na região Centro-Oeste no norte de Mato Grosso. O presente trabalho notifica a presença do subgrupo acima citado em área silvestre da região norte do Estado da Bahia na Região de Gentio do Ouro, município de Santo Inácio.

A notificação de um novo subgrupo de *T. cruzi* coletado no Estado da Bahia (TcIV), acrescido dos dados obtidos por Oliveira *et al.* (2015) que notifica a presença do mesmo subgrupo no Estado de Minas Gerais mostra a ampliação da área na qual cepas TcIV são encontradas e corrobora a hipótese de Carrasco (2016) de que pode haver uma subnotificação de casos de doença de Chagas ocasionada por cepas pertencentes ao grupo molecular TcIV.

8.3. Taxa de infecção celular

A análise da taxa de infecção celular em células da linhagem J774 possibilitou observar que foram encontradas mais formas amastigotas após 48h de infecção que após 72h de infecção para a cepa de *T. cruzi* Tsh 19, não corroborando com Rimoldi (2010) e Pena (2010) (MAEDA *et al.*, 2016; PENA, 2010; RIBEIRO, 2010). O número de formas encontradas para a cepa Tsh 12 em 72h de infecção foi muito próximo do número de formas apresentadas em 48h de infecção. Atribui-se essa observação a um possível rompimento das células infectadas, liberando formas tripomastigotas no meio de cultura como demonstrado na figura 17 (Fig. 18 e Tab. 13).

Para o tempo de 48h de infecção as cepas Tsh 12 e Tsh 19 de *T. cruzi* não apresentaram diferença significativa do tempo de duplicação, sendo 1,4 dias e 1,5 dias respectivamente. No entanto, a taxa de duplicação para o tempo de 72h apresentou-se distinto, sendo 2,5 dias para cepa Tsh 12 e 13 dias para cepa Tsh 19 (Fig. 18 e Tab. 13), provavelmente pela distinção do grupo de DTU apresentado entre as cepas de *T. cruzi*.

A cepa Tsh 19 classificada como pertencente ao grupo TcIV apresentou liberação de formas tripomastigotas no meio de cultura em tempo de infecção celular reduzido quando comparado à cepa Tsh 12 classificada como grupo TcII. Há poucos relatos de infecções humanas por cepas do grupo TcIV, no entanto, a taxa de multiplicação celular foi elevada entre as primeiras 48h, o que pode significar que essa cepa apresenta capacidade de multiplicação intracelular significativa.

Em suma, acredita-se que o fator de virulência de cada cepa de *T. cruzi* possa ser uma somatória que agrega a expressão fenotípica das formas parasitárias, assim como sua expressão genotípica. A multiplicação parasitária intracelular, que promove a parasitemia da doença, possivelmente está relacionada com o subgrupo genotípico qual a cepa causadora da doença pertence. Cada cepa de *T. cruzi* pode ser subdividida morfológicamente em dois grupos morfométricos, de forma que as cepas com largura mais finas são fagocitadas mais facilmente pelas células de defesa do organismo. Quanto maior o tempo de adaptação da cepa em um meio, seja em cultura ou no organismo do hospedeiro, há melhor adaptação do parasito, acarretando formas largas e de comprimentos mais longos.

9. Conclusão

A partir dos resultados obtidos conclui-se que a cepa de *T. cruzi* Tsh 12 isolada em Santo Inácio foi classificada como pertencente ao grupo TcII (Zimodema 2, Linhagem 1). A cepa de *T. cruzi* Tsh 19, também isolada de Santo Inácio, foi classificada como pertencente ao grupo TcIV (Z3 ou Z3B). As cepas de *T. cruzi* Tmel 8 e Tmel 44 isoladas em Porteirinha foram classificadas como pertencentes ao grupo TcI (Zimodema 1, Linhagem 2).

A morfometria das formas epimastigotas das cepas de *T. cruzi* Tsh 12, Tsh 19, Tmel 8 e Tmel 44 apresentaram igualdade quanto a classificação dos parâmetros mensurados, sendo considerado comprimento e flagelo longos, largura larga, áreas de cinetoplasto e núcleo pequenas e índice nuclear baixo.

As formas tripomastigota das cepas de *T. cruzi* Tsh 12, Tmel 8 e Tmel 44 apresentaram igualdade na classificação dos parâmetros comprimento, flagelo livre, largura e área do cinetoplasto, sendo, comprimento e flagelos longos, largura

intermediária e área do cinetoplasto intermediária. A cepa Tsh 12 apresentou área do cinetoplasto intermediária e índice nuclear baixo. As cepas Tmel 8 e Tmel 44, apresentaram área do núcleo pequena e índice nuclear intermediário.

A taxa de duplicação celular é inferior para a cepa de *T. cruzi* Tsh 12 tanto para 48h quanto em 72h de cultivo celular. Para a cepa Tsh 19 a taxa de duplicação celular é elevada em 48h, o que possivelmente acarreta um rápido rompimento das células infectadas quando comparado a cepa Tsh 12 de *T. cruzi*.

10. Referências

ABEGG, C. P.; ABREU, A. P. De; LOPES, J.; DE, S. M.; GOMES, M. L.; FERREIRA, É. C.; JEAN, M.; TOLEDO, D. O. Polymorphisms of blood forms and in vitro metacyclogenesis of *Trypanosoma cruzi* I, II, and IV. **Experimental Parasitology**, v. 176, p. 8-15, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.exppara.2017.02.013>>

ALEVI, K. C. C.; OLIVEIRA, J. De; AZEREDO-OLIVEIRA, M. T. V. De; ARISTEU, J. *Triatoma vitticeps* subcomplex (Hemiptera , Reduviidae , Triatominae): a new grouping of Chagas disease vectors from South America. **Parasites & Vectors**, v. 10, Article number: 180, 2017. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2129-1>.

ALEVI, K. C. C.; OLIVEIRA, J. De; GARCIA, A. C. C.; CRISTAL, D. C.; DELGADO, L. M. G.; BITTINELLI, I. de F.; REIS, Y. V. Dos; RAVAZI, A.; OLIVEIRA, A. B. B. De; GALVÃO, C.; AZEREDO-OLIVEIRA, M. T. V. De; MADEIRA, F. F. *Triatoma rosai* sp. nov. (Hemiptera, Triatominae): A New Species of Argentinian Chagas Disease Vector Described Based on Integrative Taxonomy. **Insect**, v. 11, p. 830, 2020.

ALMEIDA, C. E.; OLIVEIRA, H. L.; CORREIA, N.; DORNAK, L. L.; GUMIEL, M.; NEIVA, V. L.; HARRY, M.; MENDONÇA, V. J.; COSTA, J.; GALVÃO, C. Dispersion capacity of *Triatoma sherlocki*, *Triatoma juazeirensis* and laboratory-bred hybrids. **Acta Tropica**, v. 122, n. 1, p. 71–79, 2012. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0001706X11003469>>. Acesso em: 12 jul. 2018.

ANONYMUS. Recommendations from a Satellite Meeting. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94, p. 429–432, 1999.

BARRETO, M. P. Tripanossomos semelhantes ao *Trypanosoma cruzi* em animais silvestres e sua identificação com o agente etiológico da doença de Chagas. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, v. 7, n. 5, p. 305–315, 1965.

BARRETT, T. V.; HOFF, R. H.; MOTT, K. E.; MILES, M. A.; GODFREY, D. G.; TEIXEIRA, R.; SOUZA, J. A. A. De; SHERLOCK, I. A. Epidemiological aspects of three *Trypanosoma cruzi* zymodemes in Bahia State, Brazil. **Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 74, n. 1, p. 84–90, 1980.

BASTIN, P.; GULL, K. Assembly and Function of Complex Flagellar Structures Illustrated by the Paraflagellar Rod of Trypanosomes. **Protist**, v. 150, p. 113–123, 1999.

BELDA NETO, F. M. Estudos sobre a existência de correlação entre os dados biométricos e o grau de patogenicidade de amostras humanas do *Trypanosoma cruzi* Chagas, 1909. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** v. 8, p. 27–36, 1974.

BRENER, Z. Comparative studies of different strains of *trypanosoma cruzi*. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 59, n. 1, p. 19–26, 1965.

BRISSE, S.; BARNABÉ, C.; TIBAYRENC, M. *Trypanosoma cruzi*: How Many Relevant Phylogenetic Subdivisions are There? **Parasitology Today**, v. 14, n. 5, p. 5–6, 1998.

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. 30, p. 35–44, 2000.

CAMPBELL, D.; WESTENBERGER, S.; STURM, N. The Determinants of Chagas Disease: Connecting Parasite and Host Genetics. **Current Molecular Medicine**, v. 4, n. 6, p. 549–562, 2005.

CARCAVALLO, R.; JURBERG, J.; LENT, H.; NOIREAU, F.; GALVÃO, C. Phylogeny of the Triatominae (Hemiptera: Reduviidae). Proposals for taxonomic arrangements. **Entomol Vect.**, v. 7, p. 3–173, 2000.

CARRASCO, H. J.; SEGOVIA, M.; LLEWELLYN, M. S.; MOROCOIMA, A.;

URDANETA-MORALES, S.; MARTÍNEZ, C.; MARTÍNEZ, C. E.; GARCIA, C.; RODRÍGUEZ, M.; ESPINOSA, R.; DE NOYA, B. A.; DÍAZ-BELLO, Z.; HERRERA, L.; FITZPATRICK, S.; YEO, M.; MILES, M. A.; FELICIANGELI, M. D. Geographical distribution of trypanosoma cruzi genotypes in venezuela. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 6, e1707, 2016. doi: 10.1371/journal.pntd.0001707.

CHAGAS, C. Nova tripanozomíaze humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do Schizotrypanum cruzi n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 1, n. 2, p. 159–218, 1909. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-02761909000200008&lng=pt&tlng=pt>. Acesso em: 26 may. 2018.

CHAGAS, E. Summula dos conhecimentos actuaes sobre a Trypanosomiasis americana. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 30, n. 3, p. 387–416, 1935. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-02761935000900005&lng=pt&tlng=pt>. Acesso em: 27 may. 2018.

CORDERO, E. M.; CORTEZ, C.; YOSHIDA, N.; SILVEIRA, J. F. Da. Signal peptide recognition in Trypanosoma cruzi GP82 adhesin relies on its localization at protein N - terminus. **Scientific Reports**, v. 9, p. 1–14, 2019.

COSTA, J.; ARGOLO, A. M.; FELIX, M. Redescription Of Triatoma Melanica Neiva & Lent, 1941, New Status (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). **Zootaxa**, n. 1175–5326, p. 47–52, 2006.

COURA, J. R.; PINTO DIAS, J. C. Epidemiology , control and surveillance of Chagas disease - 100 years after its discovery. v. 104, supl. 1, p. 31–40, 2009.

DE LANA, M.; CHIARI, C. A.; CHIARI, E.; MOREL, C. M.; GONÇALVES, A. M.; ROMANHA, Á. J. Characterization of two isolates of Trypanosoma cruzi obtained from the patient Berenice , the first human case of Chagas ' disease described by Carlos Chagas in 1909. **Parasitol Res**, v. 82, p. 257–260, 1996.

DE OLIVEIRA, M. T.; MACHADO DE ASSIS, G. F.; OLIVEIRA E SILVA, J. C. V.; MACHADO, E. M. M.; DA SILVA, G. N.; VELOSO, V. M.; MACEDO, A. M.; MARTINS, H. R.; DE LANA, M. Trypanosoma cruzi Discret Typing Units (TcII and TcVI) in samples of patients from two municipalities of the Jequitinhonha Valley, MG,

Brazil, using two molecular typing strategies. **Parasites and Vectors**, v. 8, n. 1, p. 1–11, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1186/s13071-015-1161-2>>

DEMEU, L. M. K.; SOARES, R. J.; MIRANDA, J. S.; PACHECO-LUGO, L. A.; OLIVEIRA, K. G.; PLAZA, C. A. C.; BILLIALD, P.; MOURA, J. F. De; YOSHIDA, N.; ALVARENGA, L. M.; DAROCHA, W. D. Engineering a single-chain antibody against *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigotes to block cell invasion. **PLoS ONE**, v. 14 (10), p. 1–14, 2019.

DIAS, E. *Trypanosoma cruzi* ou *Schizotrypanum cruzi*? **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 29, n. 1, p. 203–215, 1934.

DIAS, E.; FREITAS FILHO, L. Introdução ao estudo biométrico dos hemoflagelados do gênero *Schizotrypanum*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 3, p. 427–436, 1943.

DUJARDIN, J.; SCHOFIELD, C.; PANZERA, F. **Los vectores de la enfermedad de Chagas**. Bruxelles: Académie Royale des Sciences D’Outre-Mer, 2002. p. 189.

FERREIRA, R. T. B.; BRANQUINHO, M. R.; LEITE, P. C. Transmissão oral da doença de Chagas pelo consumo de açaí: um desafio para a Vigilância Sanitária. **Vigilância Sanitária em Debate**, Rio de Janeiro, v. 2, n. 4, p. 4-11, 2014. <http://dx.doi.org/10.3395/vd.v2i4.358>.

FERRIOLLI FILHO, F.; BARRETO, M. P.; CARVALHEIRO, J. da R. Estudos sobre reservatórios e vetores silvestres de *Trypanosoma cruzi*. xxiv. variação dos dados biométricos obtidos em amostras de *t.cruzi* isoladas de ca sos humanos da doença de Chagas. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.c. Bras. Med. Trop.**, v. 2, p. 1–8, 1968.

GALVÃO, A. . *Triatoma brasiliensis macromelasoma* n. subsp. (Reduviidae, Hemiptera). **Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais**, v. 7, p. 455– 457, 1956.

GALVÃO, C.; OLIVEIRA, J.; ALEVI, K. C. C.; CAMARGO, L. M. A.; MENEGUETTI, D. U. O. Taxonomia dos Vetores da Doença de Chagas da Forma à Molécula, quase três séculos de história. **In Atualidades em Medicina Tropical no Brazil: Vetores**, p. 9–37, 2020.

GIRARD-DIAS, W.; ALCÂNTARA, C. L.; CUNHA-E-SILVA, N.; SOUZA, W. De; MIRANDA, K. On the ultrastructural organization of *Trypanosoma cruzi* using

cryopreparation methods and electron tomography. **Histochemistry and Cell Biology** volume, v. 138, p. 821–831, 2012.

JANSEN, A. M.; XAVIER, S. C. D. C.; ROQUE, A. L. R. Trypanosoma cruzi transmission in the wild and its most important reservoir hosts in Brazil. **Parasites and Vectors**, v. 11, n. 1, p. 1–25, 2018.

JUNQUEIRA, A. C. V; DEGRAVE, W.; BRANDA, A. Minicircle organization and diversity in Trypanosoma cruzi populations. **TRENDS in Parasitology**, v. 21, n. 6, p. 4–6, 2005.

LENT, H.; WYGODZINSKY, P. Revision of the Triatominae (Hemiptera, Reduviidae), and their significance as vectors of Chagas' disease. **Bulletin of the American Museum of Natural History**, v. 163, p. 123–520, 1979.

LEWIS, M. D.; MA, J.; YEO, M.; CARRASCO, H. J.; LLEWELLYN, M. S.; MILES, M. A. Genotyping of Trypanosoma cruzi: Systematic Selection of Assays Allowing Rapid and Accurate Discrimination of All Known Lineages. **The American Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 81, n. 6, p. 1041–1049, 2009.

LUCENA, D. Estudos sobre a doença de Chagas no Brasil. **Rev Bras Malariol Doenças Trop.**, v. 22, p. 3–173, 1970.

MAEDA, F. Y.; CLEMENTE, T. M.; MACEDO, S.; CORTEZ, C.; YOSHIDA, N. Host cell invasion and oral infection by Trypanosoma cruzi strains of genetic groups TcI and TcIV from chagasic patients. **Parasites and Vectors**, v. 9, n. 1, p. 1–12, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1186/s13071-016-1455-z>>

MARCILI, A.; LIMA, L.; CAVAZZANA, M. J.; JUNQUEIRA, A. C. V.; VELUSO, H. H.; SILVA, F. M. DA; CAMPANER, M.; PAIVA, F.; NUNES, V. L. B.; TEIXEIRA, M. M. G. A new genotype of Trypanosoma cruzi associated with bats evidenced by phylogenetic analyses using SSU rDNA, cytochrome b and Histone H2B genes and genotyping based on ITS1 rDNA. **Parasitology**, v. 136, p. 641–655, 2009.

MARTINEZ-PALOMO, A.; SOUZA, W. De; GONZALEZ-ROBLES, A. Topographical differences in the distribution of surface coat components and intramembrane particles. **The Journal of cell biology**, v. 69, n. 1, p. 507–513, 1976.

MARTINS, A. V.; GOMES, A. P.; MENDONÇA, E. G. De; FIETTO, J. L. R.; SANTANA, L. A.; OLIVEIRA, M. G. de A.; GELLER, M.; SANTOS, R. de F.; VITORINO, R. R.; SIQUEIRA-BATISTA, R. Biology of *Trypanosoma cruzi*: An update. **Infectio**, v. 16, n. 1, p. 45–58, 2012.

MARTINS, L. P. A.; CASTANHO, R. E. P.; GUSMÃO, A. S. De; ROSA, J. A. Da. Morfometria de tripomastigotas sanguíneos de *Trypanosoma cruzi* Chagas, 1909 (kinetoplastidae, trypanosomatidae). **Revista de Patologia Tropical**, v. 37, n. 2, p. 143–150, 2008.

MENDONÇA, V. J.; DA SILVA, M. T. A.; DE ARAÚJO, R. F.; MARTINS, J.; BACCI, M.; ALMEIDA, C. E.; COSTA, J.; GRAMINHA, M. A. S.; CICARELLI, R. M. B.; DA ROSA, J. A. Phylogeny of *Triatoma sherlocki* (Hemiptera: Reduviidae:Triatominae) inferred from two mitochondrial genes suggests its location within the *Triatoma brasiliensis* complex. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 81, n. 5, p. 858–864, 2009.

MEYER, H.; XAVIER DE OLIVEIRA, M. CULTIVATION OF *Trypanosoma GRUZI* IN TISSUE CULTURES : A FOUR-YEAR STUDY. **Parasitology**, v. 39, p. 91, 1948.

MILES, M. A.; PAVOA, M. M.; PRATA, A.; CEDILLOS, R. A.; SOUZA, A. A. DE; MACEDO, V. Do radically dissimilar *Trypanosoma cruzi* strains (zymodemes) cause Venezuelan and Brazilian forms of Chagas' disease? **The lancet**, p. 1338–1340, 1981.

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

NEIVA, A.; LENT, H. Sinopse dos Triatomídeos. **Revista de Entomologia**, v. 12, p. 61–92., 1941.

NUNES, L. R.; CARVALHO, M. R. C. De; BUCK, G. A. *Trypanosoma cruzi* strains partition into two groups based on the structure and function of the spliced leader RNA and rRNA gene promoters. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 86, p. 211–224, 1997.

OLIVEIRA, J. De. **Estudo morfológico, morfométrico e molecular de espécies do**

complexo *Triatoma brasiliensis* (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). Dissertação (Mestrado em BBAF), 2015. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Unesp. 2015.

OPS. Organización Panamericana de la Salud. Guía para el diagnóstico y el tratamiento de la enfermedad de Chagas. Disponível em: <<http://iris.paho.org/xmlui/handle/123456789/49653>>

PAPA, A. R.; JURBERG, J.; CARCAVALLO, R. U.; CERQUEIRA, R. L.; BARATA, J. M. S. *Triatoma sherlocki* SP. N. COLETADA NA BAHIA, BRASIL (HEMIPTERA, REDUVIIDAE, TRIATOMINAE). **Entomol. Vect**, v. 9, n. 1, p. 133–146, 2002.

PENA, D. A. **Caracterização biológica e molecular de cepas de *Trypanosoma cruzi* isoladas durante o surto de doença de Chagas agudo em Santa Catarina.** 2010. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, Florianópolis. Disponível em: <<https://repositorio.ufsc.br/handle/123456789/94397>>

PÉREZ-MOLINA, J. A.; MOLINA, I. Chagas disease. **Lancet**, v. 391, p. 82–94, 2018.

PINTO DIAS, J. C.; SCHOFIELD, C. J. Controle da transmissão transfusional da doença de Chagas na Iniciativa do Cone Sul Transfusional transmission control of Chagas ' disease in the Southern Cone Initiative. v. 31, n. 4, p. 373–383, 1998.

PIZZI, T. Sobre el problema de las formas delgadas de *Trypanosoma cruzi* (comunicación preliminar). **Bol. parasit. chil.**, v. 8, p. 26, 1953.

RASSI JR, A.; RASSI, A.; LITTLE, W. C. Chagas' Heart Disease. **Clin. Cardiol**, v. 23, p. 883–889, 2000.

RASSI JR, A.; RASSI, A.; MARIN-NETO, J. A. Chagas disease. **The Lancet**, v. 375, n. 9723, p. 1388–1402, 2010. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)60061-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(10)60061-X)>

REY, L. **Parasitologia.** 3ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

RIBEIRO, A. R. **Caracterização Morfológica, Biológica e Molecular de três cepas de *Trypanosoma cruzi* Chagas, 1909 (Kinetoplastida, Trypanosomatidae) isoladas de exemplares de *Triatoma sordida* (Stall) 1859 (Hemiptera, Reduviidae).** 2010. 81 f. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia,

Campinas, SP, 2010.

RIBEIRO, R. D.; FERRIOLLI FILHO, F.; BELDA NETO, F. M. Comportamento de subamostras do *Trypanosoma cruzi* em hospedeiros vertebrados e invertebrados. **Rev Bras Biol**, v. 42, p. 51–54, 1982.

RIBEIRO, R. D.; NETO, F. M. B.; JUNIOR, J. C. do P.; ALBUQUERQUE, S. De. Behaviour of the *T. cruzi* blood forms obtained from mice used as biological filters in culture and triatomine. **Rev Saúde Pública**, v. 20, p. 129–132, 1986.

RIMOLDI, A.; TOMÉ ALVES, R.; AMBRÓSIO, D. L.; FERNANDES, M. Z. T.; MARTINEZ, I.; DE ARAÚJO, R. F.; CICARELLI, R. M. B.; DA ROSA, J. A. Morphological, biological and molecular characterization of three strains of *Trypanosoma cruzi* Chagas, 1909 (Kinetoplastida, Trypanosomatidae) isolated from *Triatoma sordida* (Stal) 1859 (Hemiptera, Reduviidae) and a domestic cat. **Parasitology**, v. 139, n. 1, p. 37–44, 2012.

ROSENFELD, G. Corante pancrômico para hematologia e citologia clínica. Nova combinação dos componentes do May-Grunwald e do Gimsa num só corante de emprego rápido. **Memórias do Instituto Butantan**, [s. l.], v. 20, p. 329–334, 1974.

ROSSI, L. R. L. **Estudo biométrico de formas epimastigotas e tripomastigotas de quatro cepas de *Trypanosoma cruzi*, Chagas 1909 (kinetoplastidae, Trypanosomatidae)**. 2007. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Unesp, 2007.

SCHLEMPER JR, B. R.; ISHIDA, M. M. I.; STEINDEL, M.; GARGIONI, R. Tripomastigota muito largo como padrão morfológico de cepas do *Trypanosoma cruzi* do extremo Sul do Brasil? **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 81, n. 2, p. 191–198, 1986.

SCHOFIELD, C. J.; GALVÃO, C. Classification, evolution, and species groups within the Triatominae. **Acta Tropica**, v. 110, n. 2–3, p. 88–100, 2009.

SILVA, L. H. P. Da. Observações sobre o ciclo evolutivo do *Trypanosoma cruzi*. *Ibid.*, I, 99. and Nussenzweig, V. (1953). Sobre uma cepa de *Trypanosoma cruzi* altamente virulenta para o camundongo branco. **Folia clin. bioi.**, v. 20, p. 191, 1959.

SILVEIRA, A. C. Situação do controle da transmissão vetorial da doença de Chagas nas Américas. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 16, p. S35–S42, 2000.

SOUTO, P.; ZINGALES, B. Sensitive detection and strain classification of *Trypanosoma cruzi* by amplification of a ribosomal R N A sequence. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 62, p. 45–52, 1993.

SOUZA, W. De. Structural organization of *Trypanosoma cruzi*. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, p. 89–100, 2009.

STEINDEL, M.; KRAMER PACHECO, L.; SCHOLL, D.; SOARES, M.; DE MORAES, M. H.; EGER, I.; KOSMANN, C.; SINCERO, T. C. M.; STOCO, P. H.; MURTA, S. M. F.; DE CARVALHO-PINTO, C. J.; GRISARD, E. C. Characterization of *Trypanosoma cruzi* isolated from humans, vectors, and animal reservoirs following an outbreak of acute human Chagas disease in Santa Catarina State, Brazil. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 60, n. 1, p. 25–32, 2008.

SVS, M. da S. Vigilância em saúde no Brasil 2003|2019: da criação da Secretaria de Vigilância em Saúde aos dias atuais. **Boletim Epidemiológico de doença de Chagas [Internet]**. 2019. Disponível em: <http://www.saude.gov.br/boletins-epidemiologicos>.

TIBAYRENC, M. . Population Genetics of Parasitic Protozoa and other Microorganisms. **Advances in Parasitology**, v. 36, n. 0-12- 031736–2, p. 48–112, 1995.

TREJOS, A.; GODOY, G. A.; GREENBLATT, C.; CEDILLOS, R. Effects of temperature on morphologic variation of *Schizotrypanum cruzi* in tissue culture. **Experimental Parasitology**, v. 18, p. 211–218, 1963.

TYLER, K. M.; ENGMAN, D. M. The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited, v. 31, p. 472–481, 2001.

USINGER, R.; WYGODZINSKY, P.; RYCKMAN, R. The biosystematics of Triatominae. **Annu Rev Entomol.**, v. 11, p. 309–30, 1966.

WHO. **Reporte sobre la enfermedad de Chagas**. 2007. Disponível em: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/69724/TDR_SWG_09_spa.pdf;jsessionid=93F4100B40C2FCCE0F9C2909FE85472B?sequence=1>.

WHO. **Chagas disease (also known as American trypanosomiasis)**. 2020. Disponível

em: <[https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis))>.

YOSHIDA, N. Molecular basis of mammalian cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. **Annals of the Brazilian Academy of Sciences**, v. 78, p. 87–111, 2006. Disponível em: <sftp://cerca@192.168.2.5/home/cerca/Desktop/data/laptop_files/info/biologia/parasitas/cruzi/immuno_and_immuno_evasion/YoshidaN_2005_molecular_basis_cell_invasion.pdf%5Cnpapers2://publication/uuid/CE6E451E-BD3E-42E9-94DD-27846E42DBEE>

ZELEDÓN, R.; VIETO, P. L. Comparative study of *Schizotrypanum cruzi* Chagas, 1909 and *S. vesperilionis* (Battaglia, 1904) from Costa Rica. **The Journal of parasitology**, v. 44, n. 5, p. 499–502, 1958.

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.; ANDRADE, S. G.; CAMPBELL, D. A.; CHIARI, E.; FERNANDES, O.; GUHL, F. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. November, p. 1051–1054, 2009. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/mioc/v104n7/21.pdf>>

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, n. 2, p. 240–253, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2011.12.009>>

11. Anexo 1

Meio de cultura LIT:

Meio de cultura *Liver Infusion Tryptose* (LIT) foi desenvolvido por Camargo (1964) e modificado por Ribeiro (2010), quantidade suficiente de preparo para 1000mL:

- NaCl.....4,0 g
- KCL.....0,4 g
- Na₂HPO₄.....8,0 g
- Dextrose.....2,0 g
- Tryptose.....5,0 g
- Caldo de infuso de fígado.....3,0 g
- Haemin (Sigma).....10 mL
- Soro fetal bovino inativado100,0 mL
- Água Milli Q.....900,0 mL

Preparação do Haemin:

Pesar 0,125g de Haemin e dissolver em 100mL de NaOH. Armazenar a 4°C por até 4 meses.

Procedimentos de preparo:

- a. Dissolver os reagentes em água estéril;
- b. Acertar o pH para 7,2;
- c. Adicionar o Haemin – 10mL para 1000mL de solução;
- d. Autoclavar o meio;
- e. Deixar esfriar;
- f. Acrescentar antissepticamente o soro fetal bovino previamente inativado em banho maria a 56°C por 1 hora;
- g. Acrescentar 0,5% de antibiótico penicilina/estreptomicina (opcional);
- h. Armazenar o meio em frasco estéril mantendo-o em refrigeração a 4°C por, no máximo, 2 meses.