

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Campus de Araraquara

Giovana Silva Ferraz

**Estudo biológico, molecular e morfométrico das cepas Tsh 8 e Tv
de *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909) (Kinetoplastida,
Trypanosomatidae).**

Araraquara

2025

Giovana Silva Ferraz

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, para obtenção do grau de Bacharela em Farmácia.

Orientador: Prof. Dr. João Aristeu da Rosa

Araraquara

2025

F381e Ferraz, Giovana Silva.
Estudo biológico, molecular e morfométrico das cepas Tsh 8 e
Tv de *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909) (Kinetoplastida,
Trypanosomatidae) / Giovana Silva Ferraz. – Araraquara, 2025.
43 f. : il.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação – Farmácia) –
Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências
Farmacêuticas, Araraquara.

Orientador: João Aristeu da Rosa.

1. Biologia. 2. *Trypanosoma cruzi*. 3. Morfometria. 4. Aspectos
moleculares. 5. Cepas. I. Rosa, João Aristeu da, orient. II. Título.

Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP Campus de Araraquara
Kazumi Tomoyose - CRB 8/10904

Esta ficha não pode ser modificada

Giovana Silva Ferraz

**Estudo biológico, molecular e morfométrico das cepas Tsh 8 e Tv
de *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909) (Kinetoplastida,
Trypanosomatidae).**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Universidade Estadual
Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências
Farmacêuticas, Araraquara, para obtenção
do título de Bacharela em Farmácia.

Data de defesa: 05/12/2025

Banca Examinadora:

Prof. Dr. João Aristeu da Rosa (Presidente)

UNESP - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Campus de Araraquara

Profa. Dra. Mara Cristina Pinto (Titular)

UNESP - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Campus de Araraquara

Prof. Pós Doc. Jader de Oliveira (Titular)

UNESP - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Campus de Araraquara

Bacharel Jociel Klleiton Santos Santana (Suplente)

UNESP - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Campus de Araraquara

Aos meus pais, pela paciência, inspiração e por terem feito tanto por mim
desde sempre.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus professores, todos que já passaram pela minha história, mas em especial ao meu orientador, João Aristeu da Rosa, que sempre me auxiliou e foi o melhor exemplo que eu poderia ter.

Aos integrantes do Laboratório de Parasitologia da FCFar, que me acolheram desde o primeiro dia.

Às minhas amigas da sala: Ana, Beatriz, Carolina, Julia, Larissa e Luísa, que me incentivaram quando nem eu acreditava ser possível.

À “República Damas de Copos”, para minhas companheiras de casa e de vida, que fizeram tudo valer a pena de forma única, elas são parte de quem eu sou.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Brasil. Processo nº 2022/13607-0.

RESUMO

A doença de Chagas é uma zoonose que atinge mais de 7 milhões de pessoas. *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico dessa doença, é um protozoário flagelado, com ciclo evolutivo que compreende hospedeiros mamíferos e insetos hematófagos, os triatomíneos. Este projeto teve como objetivo o estudo biológico, molecular, e morfométrico das cepas Tsh 8 e Tv de *Trypanosoma cruzi*. O estudo molecular das cepas Tsh 8 e Tv foi realizado pela técnica de FFLB, que indicou que pertencem à mesma DTU I. O estudo biológico da cepa Tv de *T. cruzi* consistiu na determinação do período pré-patente, pico parasitêmico, taxa de mortalidade, período de desaparecimento das formas circulantes no sangue periférico e período de sobrevivência de camundongos Swiss infectados. O estudo morfométrico das formas epimastigotas da cepa Tsh 8 e das formas tripomastigotas e epimastigotas da cepa Tv foi feito a partir da mensuração dos parâmetros: Comprimento total do parasito (CT), comprimento da célula (CC), flagelo livre (FL), largura da célula (LC), área do cinetoplasto (AC), área do núcleo (AN), distância da extremidade anterior ao núcleo (NA), distância da extremidade posterior ao núcleo (PN) e índice nuclear ($IN=PN/NA$).

Palavras-chave: biologia; *Trypanosoma cruzi*; morfometria; molecular; cepas.

ABSTRACT

Chagas disease is a zoonosis that affects more than 7 million people. *Trypanosoma cruzi*, the etiological agent of this disease, is a flagellated protozoan with a life cycle that involves mammalian hosts and hematophagous insects, the triatomines. This project aimed to study the biological, molecular, and morphometric characteristics of the *Trypanosoma cruzi* strains Tsh 8 and Tv. The molecular analysis of the Tsh 8 and Tv strains was performed using the FFLB technique, which indicated that they belong to the same DTU I. The biological study of the Tv strain of *T. cruzi* involved determining the pre-patent period, parasitemia peak, mortality rate, disappearance period of circulating forms in peripheral blood, and the survival period of infected Swiss mice. The morphometric study of the epimastigote forms of the Tsh 8 strain and the trypomastigote and epimastigote forms of the Tv strain was carried out by measuring the following parameters: total length of the parasite (CT), cell length (CC), free flagellum (FL), cell width (LC), kinetoplast area (AC), nucleus area (AN), distance from the anterior end to the nucleus (NA), distance from the posterior end to the nucleus (PN), and nuclear index ($IN = PN/NA$).

Keywords: biology; *Trypanosoma cruzi*; morphometry; molecular; strains.

SUMÁRIO

1. Introdução	8
Doença de Chagas.....	8
<i>Trypanosoma cruzi</i>	10
Impacto na saúde pública.....	12
Vetores/Triatominae.....	12
2. Objetivos	14
3. Material e métodos	15
Meio de cultura.....	15
Animais.....	16
Caracterização Morfométrica das cepas Tsh 8 e Tv.....	16
Caracterização Biológica da cepa Tv.....	20
Caracterização Molecular (Fluorescent Fragment Length Barcoding - FFLB) das cepas Tsh 8 e Tv.....	22
Envelhecimento da cepa Tsh 8 em meio LIT.....	22
Indução do processo de metaciclogênese em meio de cultura TAU e TAU-3AAG substituindo o meio LIT.....	23
Imunossupressão dos camundongos utilizando ciclosporina.....	23
4. Resultados	24
Caracterização Morfométrica das cepas Tv e Tsh 8.....	24
- Caracterização das formas tripomastigotas da cepa Tv.....	24
- Caracterização das formas epimastigotas das cepas Tv e Tsh 8.....	26
Caracterização Biológica da cepa Tv.....	31
Caracterização molecular da cepa Tsh 8 e Tv.....	33
5. Discussão	35
Estudo Morfométrico.....	35
Estudo Biológico.....	36
Estudo Molecular.....	38
6. Conclusão	39
Referências Bibliográficas	40

1. Introdução

1.1 Doença de Chagas

Assim que descrita, a doença de Chagas foi considerada uma questão “médico-científica” e social. Conhecida como “Moléstia tropical”, fora caracterizada como “endemia dos sertões” e como “doença do Brasil”. Isso se deve ao seu perfil característico, que se mostrou bastante associado à identidade nacional daquela época, 1909 (Kropf, 2009). As pesquisas dessa doença foram determinantes para o avanço do conhecimento científico. *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico da doença de Chagas, é um protozoário flagelado, com ciclo evolutivo que compreende hospedeiros mamíferos e insetos hematófagos da ordem Hemiptera, subfamília Triatominae que incluem três principais gêneros: *Panstrongylus*, *Rhodnius* e *Triatoma* (De rezende, 1968). Atualmente são admitidas 159 espécies na subfamília Triatominae (sendo 156 espécies vivas e três espécies fósseis) (Alevi *et al*, 2021; Guerra, 2016; Masarin, 2023; Ravazi, 2023; Sousa, 2024).

A doença de Chagas é assim nomeada por se tratar de uma homenagem a Carlos Ribeiro Justiniano das Chagas, que em 1909, foi o responsável por divulgar ao mundo científico a existência da doença no Brasil, além de descrever seu agente causal e a identificação do inseto transmissor em seu trabalho (Westphalen; Bisugo; Araújo, 2012).

A doença de Chagas tem como agente etiológico o protozoário flagelado *Trypanosoma (Schizotripanum) cruzi* Chagas, 1909, em homenagem ao cientista Oswaldo Cruz. Esse protozoário parasita diferentes espécies de triatomíneos, os quais atuam como vetores responsáveis pela transmissão a mamíferos, estabelecendo assim o ciclo silvestre de infecção (Coura, 2003). A infecção humana tornou-se possível a partir do processo de colonização e/ou invasão de triatomíneos, popularmente conhecidos como barbeiros nos ambientes domiciliares. Esse contato com o homem ocorre em função da necessidade alimentar do vetor, o que justifica sua ausência em ambientes desprovidos de ocupação humana. Além disso, fatores como o desmatamento e a consequente redução da disponibilidade de animais que, originalmente, constituíam suas fontes

naturais de alimento contribuem para aproximar os triatomíneos dos domicílios humanos (Forattini *et al.*, 1981; Fé *et al.*, 2009). A doença é caracterizada como uma antropozoonose e está fortemente associada a contextos de desigualdade socioeconômica, uma vez que o vetor apresenta maior incidência em áreas rurais de criação de animais, onde as habitações frequentemente apresentam condições estruturais rudimentares (Costa; Pacheco, 2008). Ademais, a transmissão oral constitui um agravante nessas regiões, sobretudo porque alimentos como o açaí, típico da região Norte do Brasil têm seu consumo amplamente relacionado à ocorrência de surtos de doença de Chagas (Ferreira, 2016).

Barbosa-Labello, em 2010, conseguiu mostrar em seu trabalho, em que foi utilizado um modelo animal, que o parasita era capaz de sobreviver na polpa do açaí por diferentes períodos e sob diferentes temperaturas, garantindo a sua virulência e, conseqüentemente, sua capacidade de infecção via alimento. O que faz com que a região amazônica brasileira possua um número bastante alto de surtos da doença de Chagas em comparação ao restante do país. A transmissão oral também está associada ao consumo de diversos alimentos contaminados, incluindo caldo de cana e leite materno, entre outros produtos capazes de atuar como veículos do parasito (Ferreira *et al.*, 2014).

A transmissão de *Trypanosoma cruzi* ao ser humano pode ocorrer nos ambientes silvestre, peridoméstico e doméstico. No ciclo silvestre, a manutenção do parasito depende da interação entre triatomíneos e mamíferos silvestres que atuam como reservatórios naturais. O ciclo peridoméstico, por sua vez, representa uma extensão do ciclo silvestre, estabelecendo-se a partir da aproximação de triatomíneos e animais domésticos que vivem nas imediações das residências humanas, favorecendo a circulação do parasito entre espécies de diferentes habitats. Já o ciclo doméstico envolve animais que coabitam com o ser humano — como cães, gatos e suínos, os quais podem igualmente atuar como hospedeiros de *T. cruzi*. Os triatomíneos não nascem infectados; tornam-se portadores do parasito ao ingerirem sangue de um animal infectado. Embora esses insetos possam se alimentar de uma ampla variedade de vertebrados, incluindo aves (uma espécie reportada)(Martinez-Hernandez *et al* 2022, répteis,

anfíbios e os mamíferos, esses são competentes para manter a infecção e permitir a continuidade do ciclo de *T. cruzi* (Botto et 2022; Fernandes, 1994).

Durante o dia, os triatomíneos permanecem ocultos em frestas, abrigos escuros ou outras estruturas protegidas, emergindo à noite para se alimentar. Geralmente, a hematofagia ocorre enquanto o ser humano está dormindo. O ato de sucção, por si só, não provoca dor intensa nem é responsável pela transmissão do parasito, uma vez que o *Trypanosoma cruzi* está presente nas fezes do vetor, eliminadas logo após a refeição sanguínea. Ao sentir desconforto ou prurido no local da picada, o indivíduo tende a coçar a região, facilitando a entrada do protozoário por microlesões cutâneas ou por mucosas adjacentes. Esse processo constitui o principal mecanismo de infecção no ciclo vetorial clássico (Argolo; Felix; Pacheco; Costa, 2008).

1.2 *Trypanosoma cruzi*

Quando o parasita *T. cruzi* é eliminado pelas fezes do triatomíneo, esse encontra-se na forma tripomastigota metacíclica (a que é presente na porção retal do vetor), que se trata de uma célula alongada e com um flagelo, o que facilita sua movimentação. Nesse sentido, depois de adentrar o organismo do hospedeiro vertebrado, a infecção de células vizinhas ocorre, e nessas células o parasita assume a forma amastigota, que é arredondada. A forma amastigota se multiplica de forma rápida, o que facilita o rompimento celular e a entrada na corrente sanguínea. A forma do parasita nessa fase é chamada de tripomastigota sanguíneo, que se dissemina e penetra células de diferentes tecidos e órgãos, como tecidos musculares cardíacos e lisos (Dias e Coura, 1997).

Um triatomíneo que se alimenta de um vertebrado contaminado, também se infecta ao ingerir os tripomastigotas sanguíneos. A forma que o parasita adota no intestino médio do vetor é a epimastigota, que se multiplica. Já no intestino posterior do barbeiro, a forma epimastigota se transforma em tripomastigota metacíclica, que é eliminada junto das fezes do vetor no momento de infecção do hospedeiro vertebrado, o que possibilita o início de um novo ciclo. (Dias e Coura, 1997).

Diversas vias de transmissão de *Trypanosoma cruzi* são reconhecidas,

embora algumas apresentem maior relevância epidemiológica. Entre elas destacam-se: a transmissão vetorial, que ocorre pelo contato direto entre o vetor e o hospedeiro durante e após a repasto sanguíneo; a transmissão congênita, caracterizada pela passagem vertical do parasito, predominantemente por via transplacentária; e a transmissão oral/vetorial, resultante da ingestão de alimentos contaminados, como caldo de cana, açaí e outros produtos suscetíveis à contaminação, além da possibilidade de transmissão pelo leite materno. Também podem ocorrer a transmissão acidental, geralmente relacionada ao manuseio inadequado de material biológico e ao uso incorreto de equipamentos de proteção individual; a transmissão transplantar, decorrente do transplante de órgãos infectados; e a transmissão transfusional, historicamente associada ao processo de 'urbanização dos chagásicos', que elevou a frequência de doadores com infecção crônica (Shikanai-Yasuda; Shiroma, 1990). Adicionalmente, embora menos frequentes, são descritas a transmissão sexual e a transmissão associada ao manuseio de carcaças ou sangue de animais silvestres infectados, especialmente em contextos de caça, abate ou manipulação sem proteção adequada (Xavier, *et al*, 2014)

Existem duas fases da doença de Chagas, a aguda e a crônica. A fase aguda consiste em uma forma sintomática ou assintomática, frequente na primeira infância (Costa, 2013). Essa fase tem início quando há o primeiro contato do parasita com o vertebrado, nesse período, os sintomas e sinais clínicos apresentados pelo indivíduo começam depois de 8 a 10 dias após a infecção, que são o sinal de Romaña e o chagoma de inoculação. Os principais sintomas dessa fase são febre, astenia e cefaléia. Outros sintomas que podem ser percebidos são linfonodomegalia generalizada e hepatoesplenomegalia, além de manifestações cardíacas. Esses sintomas normalmente desaparecem de forma breve (Colosio, 2007; Santos, 2011).

A fase crônica pode se manifestar de forma assintomática e sintomática. A primeira é caracterizada pela inexistência de manifestações clínicas relevantes. Enquanto a forma sintomática, faz com que os indivíduos, que antes eram assintomáticos, passem a expressar complicações no sistema cardiovascular e no digestório, além de uma intensa ativação do processo inflamatório (Gilber, 2007).

1.3 Impacto na saúde pública

Já é fato que a doença de Chagas é uma das enfermidades humanas que mais se relaciona a fatores como o subdesenvolvimento. Calcula-se que em áreas endêmicas existam mais de 7 milhões de infectados, e cerca de 6 mil pessoas morrem no mundo devido a complicações na fase crônica (Pereira-Silva; De mello; Araújo-Jorge, 2022; Who, 2025).

Além do mais, existem discussões e estudos sobre os diversos impactos que a doença de Chagas pode causar no âmbito humano, que são bastante diversificados. Os principais impactos observados até aqui têm relação com alterações comportamentais, cognitivas ou até psicossociais (mais presentes na fase crônica) (Hueb; Loureiro, 2005).

1.4 Vetores/Triatominae

Os vetores de *Trypanosoma cruzi*, os triatomíneos, popularmente conhecidos como barbeiros, são insetos estritamente hematófagos. Apresentam aparelho bucal reto, do tipo sugador, que não ultrapassa o nível do primeiro par de pernas; possuem cabeça alongada, antenas inseridas lateralmente e olhos proeminentes. O tamanho corporal geralmente varia entre 2 e 3 cm, embora possa oscilar de 0,5 a 4,5 cm, dependendo da espécie (Argolo, 2008).

Atualmente, são reconhecidas 159 espécies de triatomíneos, incluindo três espécies fósseis, distribuídas em cinco tribos e 19 gêneros (Rivas, 2022; Paiva *et al.*, 2025)

Em 2002 Papa, Jurberg, Carcavallo, Cerqueira e Barata descreveram uma nova espécie de Triatominae, que foi denominada *Triatoma sherlocki*, coletada em Santo Inácio, município de Gentio do Ouro, Bahia. Espécie essa que foi tema da tese de doutorado de Cerqueira em 1982, desenvolvida e defendida no Instituto de Ciências Biomédicas, USP, São Paulo. Em 2009 Mendonça *et al.* por meio de reconstrução filogenética concluíram que *T. sherlocki* faz parte do subcomplexo *T. brasiliensis* e do complexo *T. infestans*.

T. vitticeps encontra-se distribuído no Brasil, nos estados da Bahia, Espírito Santo, Minas Gerais e Rio de Janeiro (Lent & Wygodzinsky, 1979; Galvão, 2015) e costuma estar mais próximo de áreas vegetadas e com campo rupestre (Dias,

2015). Essa espécie costuma estar presente em ambientes úmidos e florestais. Além de também preferir habitar ambientes intradomiciliares do que aqueles peridomiciliares (Dias, 1989).

As cepas Tsh 8 e Tv de *T. cruzi* são mantidas no laboratório de Parasitologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas/Unesp/Araraquara.

2. Objetivos

Estudar a parasitemia obtida a partir da infecção de camundongos Swiss com a cepa Tv de *Trypanosoma cruzi* isoladas no laboratório de Parasitologia, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas/Unesp/Araraquara.

Estabelecer estudos morfométricos das formas epimastigotas e tripomastigotas da cepa Tv e da forma epimastigota da cepa Tsh 8 de *Trypanosoma cruzi*.

Realizar a caracterização molecular dessas duas cepas de *T. cruzi* por meio da técnica Fluorescent Fragment Length Barcoding (FFLB), que se baseia na amplificação de quatro regiões variáveis dos genes 18S e 28S α rRNA.

3. Material e métodos

As cepas utilizadas para o estudo do projeto foram isoladas a partir de fezes de *Triatoma sherlocki* coletadas no distrito de Santo Inácio, município de Gentio do Ouro, BA. Enquanto a cepa Tv foi isolada de um espécime adulto de *Triatoma vitticeps* coletado no município Grão Mogol, MG.

Essas cepas foram mantidas em meio de cultura LIT e, posteriormente, foram alvo de genotipagem por meio dos genes 18S e 28S α rRNA. Foi feita a limpeza correta e indicada do meio LIT, a fim de evitar o decréscimo da cultura e qualquer tipo de contaminação. Ainda no que se refere à manutenção das cepas sem contaminação, foram feitos repiques periódicos.

Com relação à pesquisa *in vivo*, os camundongos da linhagem Swiss foram infectados com tripomastigotas da cepa Tv por via intraperitoneal, o que tornou possível avaliar o desenvolvimento da doença biologicamente.

Os estudos biométricos da forma epimastigota das cepas Tsh 8 e Tv, e da forma tripomastigota da cepa Tv, foram feitos no laboratório de Parasitologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP de Araraquara.

Optou-se por estudar tais cepas com base em um conjunto de características biológicas, incluindo observações de seu comportamento infectivo em camundongos (*Mus musculus*, variedade Swiss) e em meio de cultura LIT, além de análises moleculares destinadas à genotipagem por meio dos genes 18S e 28S α rRNA. A cepa Tv teve suas formas tripomastigota e epimastigota avaliadas quanto a cinco caracteres biométricos, enquanto a cepa Tsh 8 teve suas formas epimastigotas examinadas com base nos mesmos parâmetros. Desse modo, busca-se ampliar o conhecimento sobre essas duas cepas de *T. cruzi*, isoladas de *Triatoma sherlocki* e *T. vitticeps*, respectivamente, contribuindo para o avanço científico, para o aprimoramento das estratégias de controle da doença de Chagas e para a formação de recursos humanos especializados na área.

3.1 Meio de cultura

O meio de cultura utilizado para o crescimento do parasita foi o meio LIT (liver infusion tryptose) contendo NaCl 75 mM; KCl 5,4 mM; Na₂HPO₄ 62 mM;

glicose 0,2%; triptose 0,5% (Sigma-Aldrich); infusão de fígado 0,5% (BD, Brasil); hemina 10 µg/mL; 10% SFB (Gibco); 59 mg/mL penicilina; 133 µg/mL estreptomicina, ajustado para pH=7,2 (Camargo, 1964; Mantovani, 2022).

3.2 Animais

Camundongos da espécie *Mus musculus* da linhagem Swiss. Essa linhagem trata-se de um tipo de camundongo heterogênico que é utilizado há muito tempo em pesquisas biomédicas e farmacológicas. Possui alta fertilidade, prolificidade e produtividade. (Neves; Filho; Menezes, 2013).

3.3 Caracterização Morfométrica das cepas Tsh 8 e Tv

Foram capturadas e mensuradas imagens de 35 formas epimastigotas de cada uma das duas cepas de *T.cruzi* retiradas de meio LIT, além disso, também se mensurou 35 formas tripomastigotas da cepa Tv, que foram obtidas do sangue de camundongos contaminados durante o pico de parasitemia.

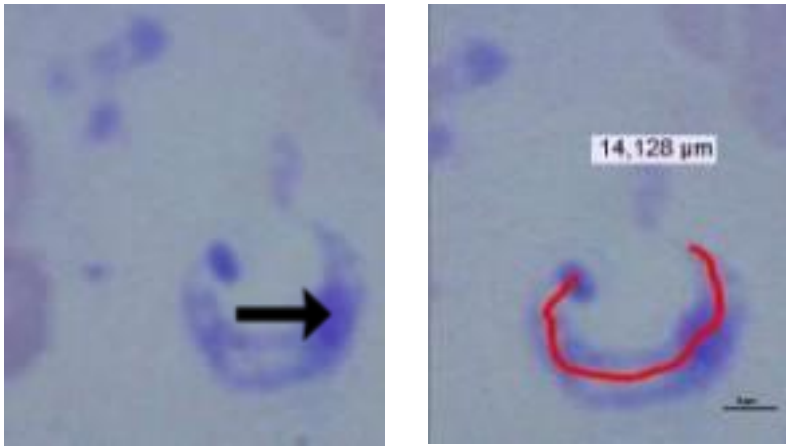
Os parâmetros morfológicos da forma tripomastigota que foram mensurados foram definidos por Dias e Freitas Filho (1943) e Barreto (1965): Comprimento total do parasito (CT), comprimento da célula (CC), flagelo livre (FL), largura da célula (LC), área do cinetoplasto (AC), área do núcleo (AN), distância da extremidade anterior ao núcleo (NA), distância da extremidade posterior ao núcleo (PN) e índice nuclear ($IN=PN/NA$).

Para a forma epimastigota, foram mensurados os mesmos parâmetros da forma tripomastigota descritos acima, mas adicionando parâmetros morfométricos que foram preconizados anteriormente: a largura sendo (fina/intermediária/larga: 1,1 a 1,7µm / 1,8 a 2,8µm / 2,9 a 5,0µm), o comprimento total sendo (curto/intermediário/longo: 13,0 a 23,2µm / 23,3 a 31,3µm / 31,4 a 43,7µm), a área do núcleo (pequeno/intermediário/grande: 0,9 a 1,6µm² / 1,7 a 2,9µm² / 3,0 a 6,8µm²), área do cinetoplasto (pequeno/intermediário/grande: 0,3 a 0,5µm² / 0,6 a 0,9µm² / 1,0 a 1,7µm²) e índice nuclear (baixo/intermediário/alto: 0,1 a 0,3 / 0,4 a 0,8 / 0,9 a 0,22) (Rossi, 2007).

Tanto as formas epimastigotas retiradas de meio LIT a partir do 7º dia de

inóculo, contando com o platô de crescimento, quanto às formas tripomastigotas coletadas no período agudo da infecção em que se encontra o maior número de formas, foram colocadas em lâmina dentro da câmara de fluxo laminar, fixadas com álcool metílico e coradas por Giemsa segundo Rosenfeld (1974).

Figura 1: Forma tripomastigota de *T. cruzi*, cepa Tv, ajuste do zoom (a) e seleção da imagem por meio de microscópio óptico, mensuração do comprimento da célula (CC) por poly line (b). A seta está indicando o núcleo. 14,128 μm indica o comprimento da célula.

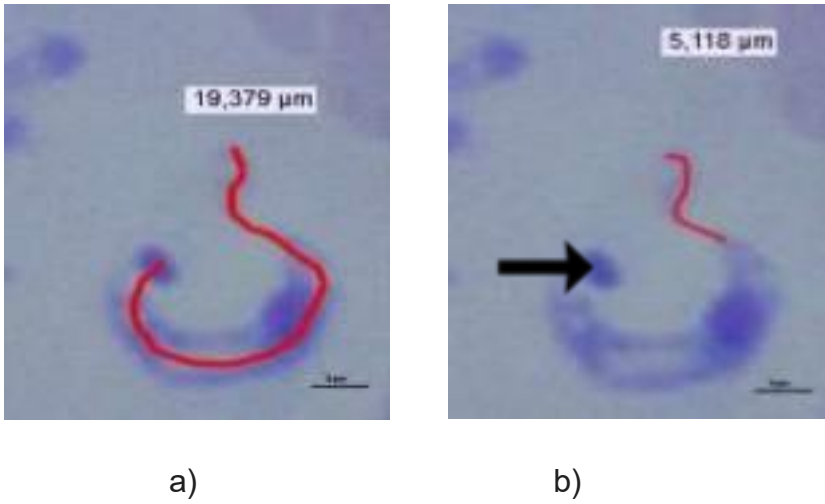


a)

b)

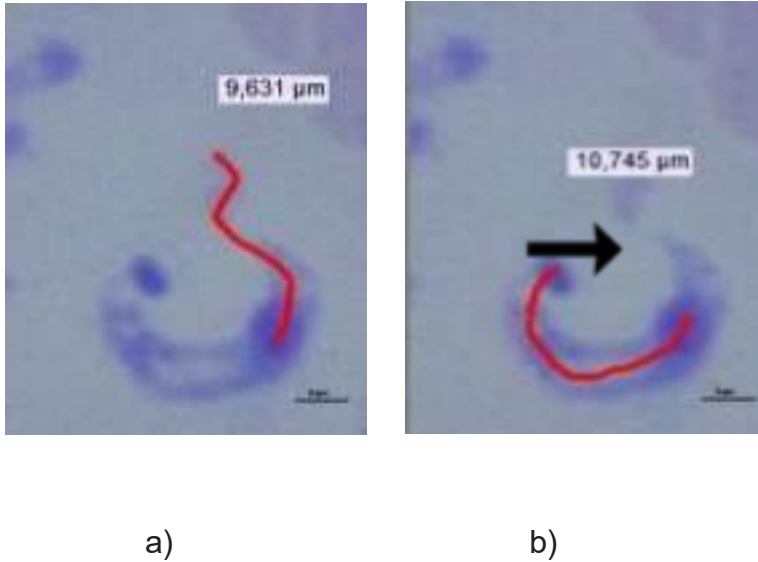
Fonte: Autoria própria (2023).

Figura 2: Forma tripomastigota de *T. cruzi*, cepa Tv, seleção da imagem por meio de microscópio óptico, (a) mensuração do comprimento total (CT) e (b) flagelo livre (FL) com poly line. A seta está indicando a posição do cinetoplasto. 19,379 μm indica o comprimento total da célula e 5,118 μm indica o comprimento do flagelo livre.



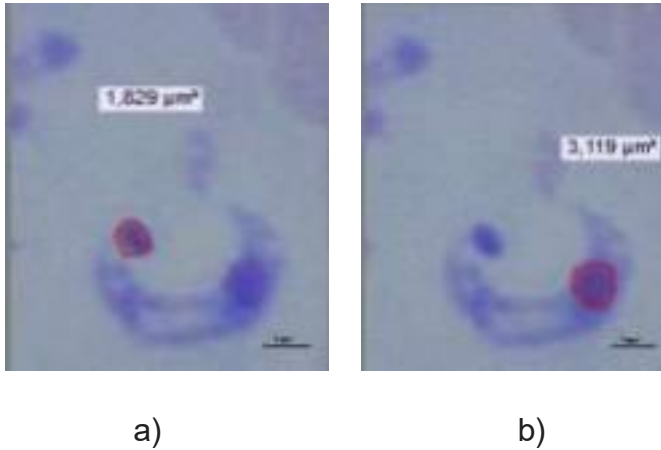
Fonte: Autoria própria (2023).

Figura 3: Forma tripomastigota de *T. cruzi*, cepa Tv, seleção da imagem por meio de microscópio óptico, (a) mensuração da distância da extremidade anterior ao núcleo (NA) e (b) distância da extremidade posterior ao núcleo (PN) por meio de poly line. A seta indica o flagelo. 9,631 μm indica a distância da extremidade anterior ao núcleo e 10,745 μm indica a distância da extremidade posterior ao núcleo.



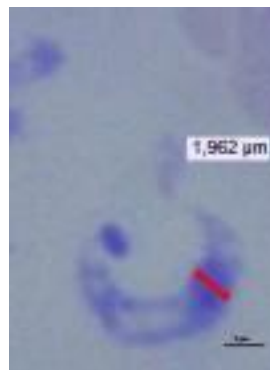
Fonte: Autoria própria (2023).

Figura 4: Forma tripomastigota de *T. cruzi*, cepa Tv, seleção da imagem por meio de microscópio óptico, (a) mensuração da área do cinetoplasto (AC) e (b) área do núcleo (AN) com cálculo da área. 1,829 μm^2 indica a área do cinetoplasto e 3,119 μm^2 indica a área do núcleo.



Fonte: Autoria própria (2023).

Figura 5: Forma tripomastigota de *T. cruzi*, cepa Tv, seleção da imagem por meio de microscópio óptico, mensuração da largura da célula por meio de traço. 1,962 μm indica a largura da célula.



Fonte: Autoria própria (2023).

3.4 Caracterização Biológica da cepa Tv

Inicialmente, quatro camundongos com cerca de 21 dias da linhagem

Swiss foram infectados com 20 μL de sangue contaminado, que possuía aproximadamente $1,08 \cdot 10^4$ formas de tripomastigotas da cepa Tv, quantidade padronizada anteriormente em camundongos matriz a partir de contagem na Câmara de Neubauer. Esses animais previamente infectados sofreram punção cardíaca durante a fase aguda da infecção para que fosse possível concluir o estudo nos quatro camundongos selecionados.

Os parâmetros considerados foram:

- período pré-patente;
- período patente;
- taxa de mortalidade;
- período de desaparecimento das formas circulantes;
- curva de parasitemia.

A contagem de formas tripomastigotas foi feita na câmara de Neubauer. A partir do 5º dia de infecção, três vezes por semana, foi coletado cerca de 5 μL de sangue contaminado pelo corte da cauda e depositou-se na câmara, que foi recoberta com lamínula, a fim de obter-se uma camada delgada de sangue da forma mais homogênea possível. Para fazer a contagem, um cálculo considerando o número de quadrantes foi feito, os quatro quadrantes das extremidades da câmara foram os considerados. A partir disso, dividiu-se o número de formas tripomastigotas encontradas por 4, número que representa a quantidade de quadrantes considerados, multiplicou-se por 0,020, sendo estes os 20 μL inseridos na câmara e, por fim, multiplicou-se por 10^4 , sendo esse o fator de correção da câmara. (Counting chambers, [2020]).

Esse processo foi continuado até a negativação em três exames consecutivos ou por um período de 60 dias. Considerou-se, principalmente, o período pré-patente, nível de parasitemia e taxa de letalidade para determinar a virulência da cepa.

3.5 Caracterização Molecular (Fluorescent Fragment Length Barcoding - FFLB) das cepas Tsh 8 e Tv

- Extração do DNA de *Trypanosoma cruzi*

O DNA das cepas Tsh 8 e Tv foram extraídos segundo o protocolo indicado por Rodrigues *et al*, 2019. Para a cepa Tsh 8 e Tv, 5mL do meio de cultura LIT foram adicionados em um tubo, depois adicionou-se neste tubo 300 µL de Digsol Buffer, que foi misturado levemente, posteriormente, foi adicionado 10 µL de Proteinase K. O tubo foi homogeneizado e incubado “overnight” a 37°C, adicionou-se 350 µL de acetato de amônia e foi agitado em vortex por 15 minutos fazendo pausas periódicas. Após esse processo, o tubo foi centrifugado por mais 15 minutos a 14000 rpm a 10°C. O sobrenadante dessa mistura foi transferido para outro tubo e descartado o tubo com pellet.

Foi acrescentado 1mL de etanol 100% ao tubo com sobrenadante e, depois, por inversão, esse tubo foi homogeneizado e logo centrifugado por 15 minutos a 14000 rpm novamente. O etanol foi descartado cuidadosamente e, posteriormente, acrescentou-se 1mL de etanol 70% que foi homogeneizado e centrifugado da mesma forma que anteriormente, novamente o etanol foi descartado com cuidado. O tubo foi seco por meio de bloco seco a 55°C, depois de completamente seco, foi acrescentado 30 µL de TE, o tubo final foi deixado em “overnight” à temperatura ambiente.

A amostra obtida foi quantificada em nanodrop e armazenada em - 20°C até o dia da realização da técnica de FFLB, que foi utilizada para analisar os picos associados às amostras de DNA obtidas e, a partir desta análise, foi possível classificar as cepas de acordo com a classificação das DTUs (Discrete Typing Units).

3.6 Envelhecimento da cepa Tsh 8 em meio LIT

O repique dos meios contaminados foi feito de forma periódica, de 25 em 25 dias, a fim de manter as formas epimastigotas presentes em meio de cultura LIT. Para o envelhecimento da cepa Tsh 8, o repique foi feito utilizando 1 mL do meio de cultura contaminado com a cepa e 4 mL de meio LIT, esperou-se cerca de 50 dias para que se pudesse visualizar a metaciclogênese de forma mais

evidente, uma vez que conforme os dias passaram, o metabolismo das células passou a ser mais intenso, o meio começou a ter menor quantidade de nutrientes e o pH diminuiu, fatores que facilitaram o processo de metaciclologênese (Melo, 2012). Foi possível observar algumas formas tripomastigotas por microscopia óptica, os meios foram centrifugados e o precipitado foi ressuspensionado em sangue de camundongo saudável e inoculado via intraperitoneal em cerca de 4 camundongos de 20 dias.

3.7 Indução do processo de metaciclologênese em meio de cultura TAU e TAU-3AAG substituindo o meio LIT

O repique foi feito utilizando 1 mL do meio contaminado e 4 mL de meio de cultura TAU, esperou-se cerca de 50 dias para que o processo de metaciclologênese se desencadeasse com maior facilidade. Foi possível observar formas tripomastigotas por microscopia óptica, o meio de cultura foi centrifugado a 5000 rpm por 15 minutos a 5°C, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspensionado em 0,5 mL de meio de cultura e inoculado por via intraperitoneal em quatro camundongos da linhagem Swiss de cerca de 20 dias, também foi feita a ressuspensão do precipitado em 1 mL de sangue de camundongo saudável para a posterior inoculação intraperitoneal em outros 4 camundongos de 20 dias. O mesmo foi feito com o meio de cultura TAU-3AAG.

3.8 Imunossupressão dos camundongos utilizando ciclosporina

A imunossupressão foi feita em cinco camundongos de aproximadamente 21 dias, que receberam quantidades de ciclosporina relativas ao seu peso, de acordo com a bula do medicamento (15 mg/kg), por sete dias seguidos. Após o período estabelecido, a cultura envelhecida de LIT com a cepa Tsh 8 (o precipitado ressuspensionado com sangue de camundongo saudável) foi inoculada nos camundongos via intraperitoneal, cerca de 15 µL em cada camundongo.

4. Resultados

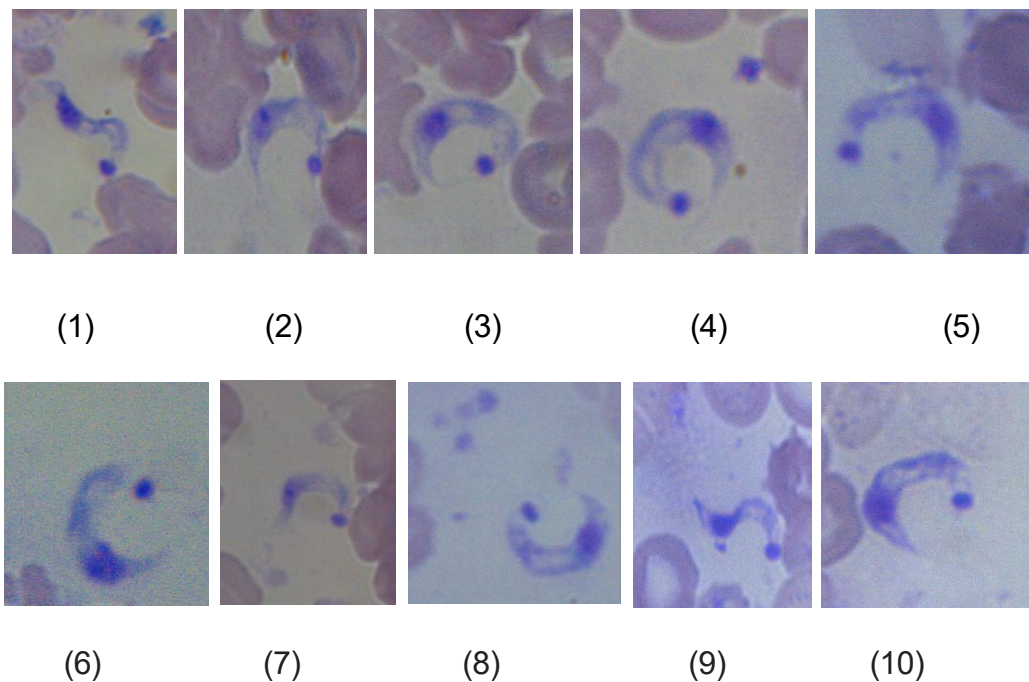
4.1 Caracterização Morfométrica das cepas Tv e Tsh 8

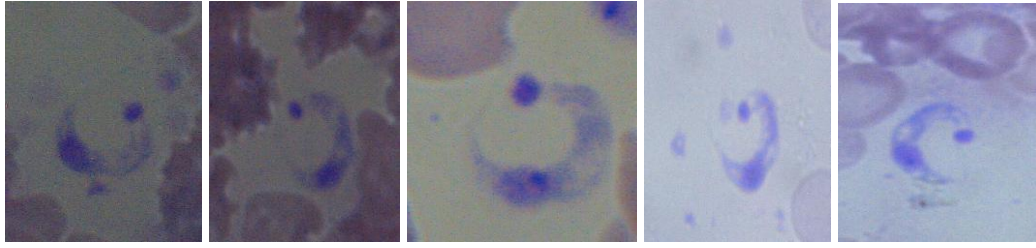
- Caracterização das formas tripomastigotas da cepa Tv

As lâminas com o sangue dos camundongos infectados foram coradas pelo método de coloração May Grunwald Giemsa para mensuração da cepa Tv.

Observa-se a seguir as fotomicrografias das formas parasitárias tripomastigotas da cepa Tv de *T. cruzi*.

Figura 6: Fotomicrografias (100 X) referentes às formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Tv de *T. cruzi* mensuradas.





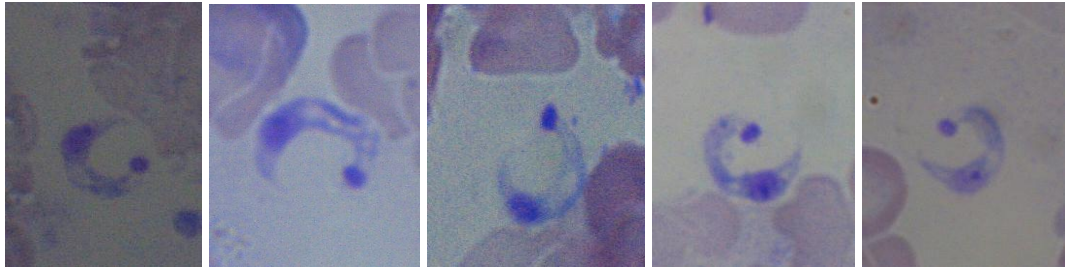
(11)

(12)

(13)

(14)

(15)



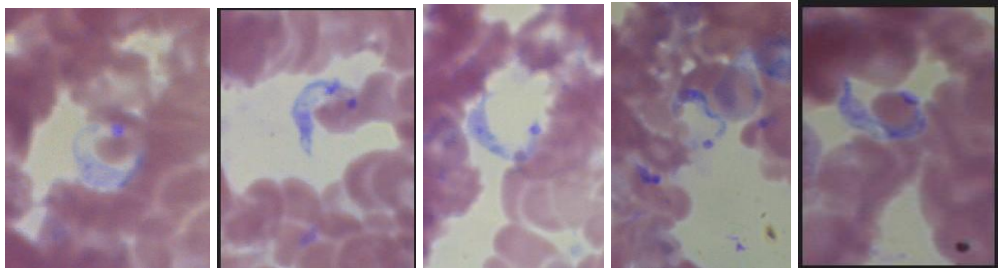
(16)

(17)

(18)

(19)

(20)



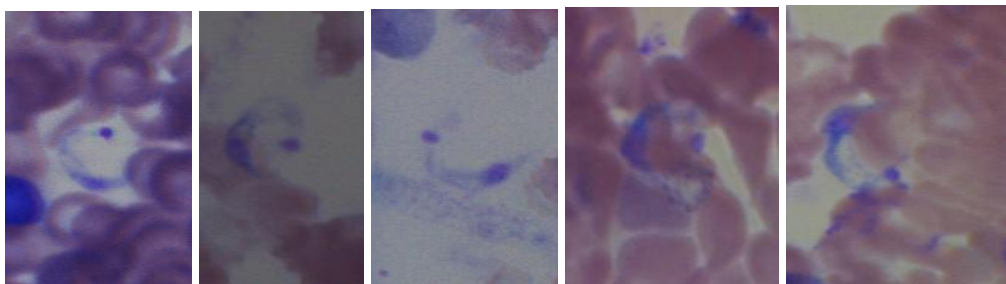
(21)

(22)

(23)

(24)

(25)



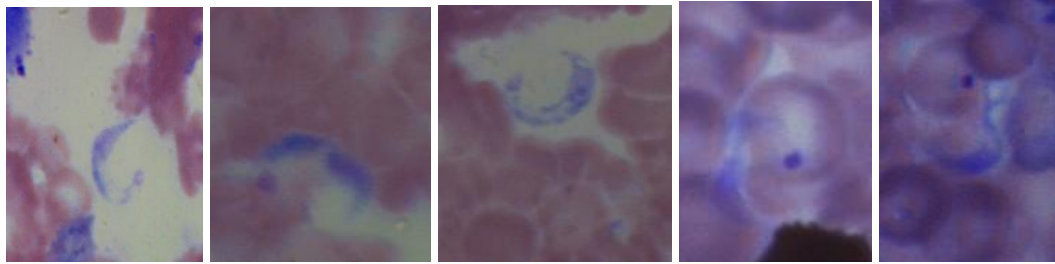
(26)

(27)

(28)

(29)

(30)



(31)

(32)

(33)

(34)

(35)

Fonte: Autoria própria (2023).

- Caracterização das formas epimastigotas das cepas Tv e Tsh 8

As formas epimastigotas das cepas Tv e Tsh 8, obtidas por meio de cultura LIT, foram coradas pelo método de coloração May Grunwald Giemsa. Foi observada a variabilidade das estruturas, principalmente, a posição do cinetoplasto e do núcleo, o comprimento total, as distâncias das extremidades anterior e posterior ao núcleo, as áreas do núcleo e do cinetoplasto e o índice nuclear.

Observa-se abaixo as fotomicrografias das formas epimastigotas das cepas Tv e Tsh 8 de *T. cruzi* (Figuras 7 e 8).

Figura 7: Fotomicrografias (100 X) referentes às formas epimastigotas da cepa Tv de *T. cruzi* mensuradas.



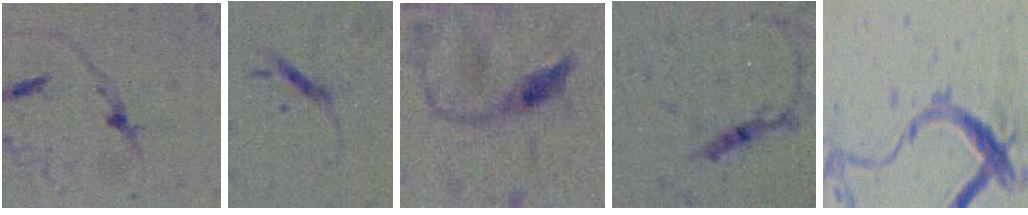
(1)

(2)

(3)

(4)

(5)



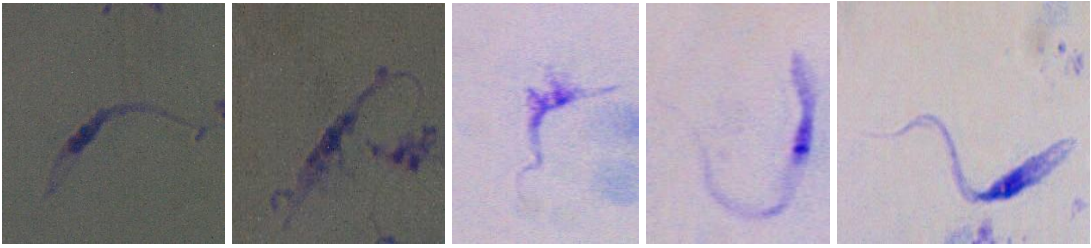
(6)

(7)

(8)

(9)

(10)



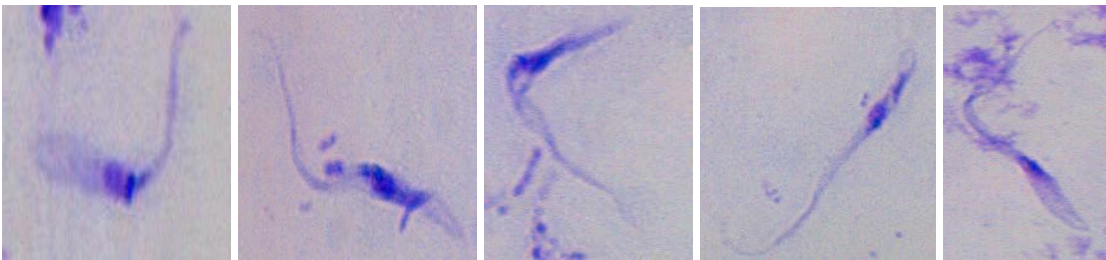
(11)

(12)

(13)

(14)

(15)



(16)

(17)

(18)

(19)

(20)



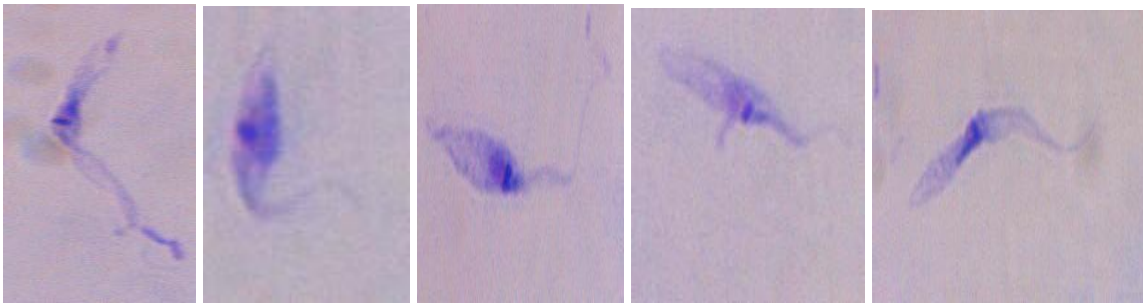
(21)

(22)

(23)

(24)

(25)



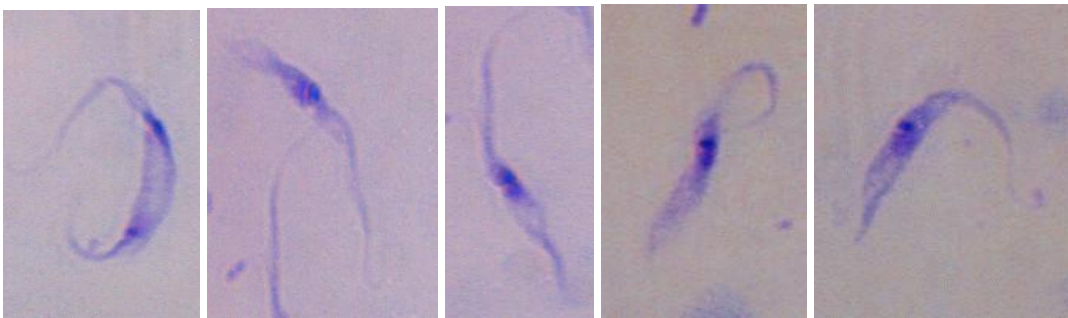
(26)

(27)

(28)

(29)

(30)



(31)

(32)

(33)

(34)

(35)

Fonte: Autoria própria (2023).

Figura 8: Fotomicrografias (100 X) referentes às formas epimastigotas da cepa Tsh 8 de *T. cruzi* mensuradas.



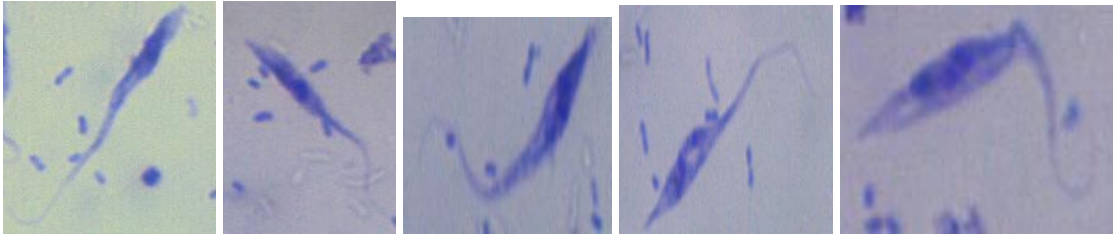
(1)

(2)

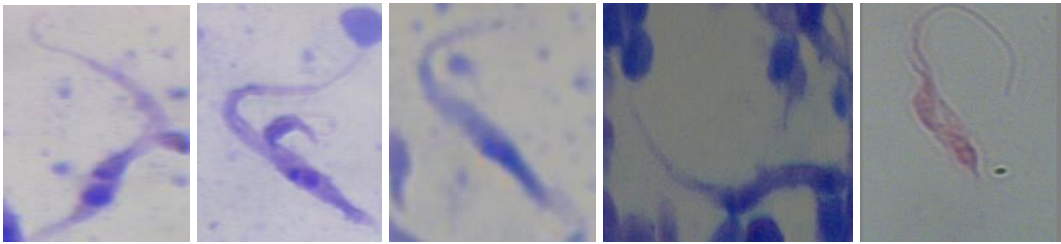
(3)

(4)

(5)



(6) (7) (8) (9) (10)



(11) (12) (13) (14) (15)



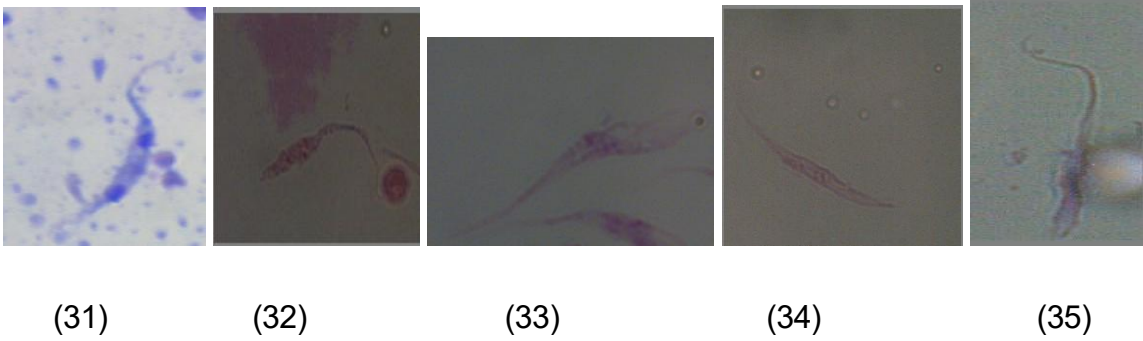
(16) (17) (18) (19) (20)



(21) (22) (23) (24) (25)



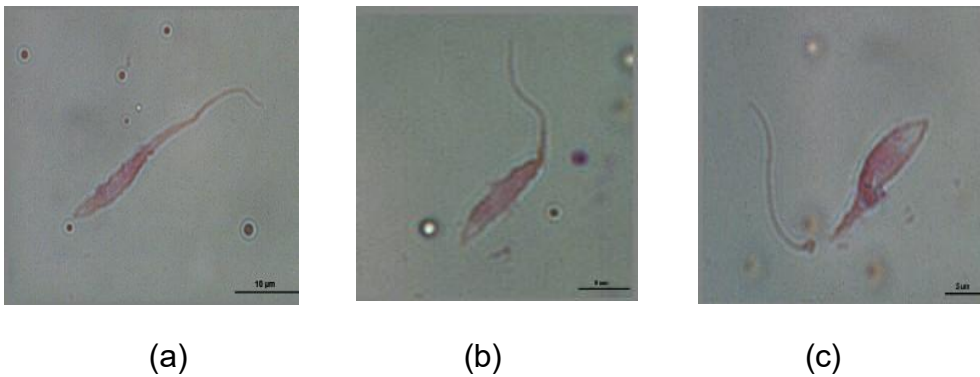
(26) (27) (28) (29) (30)



Fonte: Autoria própria (2023).

O comprimento das formas epimastigotas mensuradas puderam ser diferenciadas em formas finas, intermediárias e largas, como é possível observar na figura abaixo. Os parâmetros utilizados para realizar essa classificação foram preconizados por Rossi, 2007.

Figura 9: Fotomicrografias das formas epimastigotas de *T. cruzi* (100 X) da cepa Tsh 8: (a) forma fina, (b) forma intermediária e (c) forma larga.



Fonte: Autoria própria (2023).

Os resultados referentes à avaliação morfométrica de 35 formas tripomastigotas da cepa Tv e de 35 formas epimastigotas das cepas Tv e Tsh 8, a partir de um analisador e mensurador de imagem baseado em parâmetros estabelecidos anteriormente por Dias e Freitas Filho (1943) e Barreto (1965), estão representados nas Figuras 10 e 11.

Figura 10: Resultados da análise morfométrica feita em 35 formas epimastigotas e 35 formas tripomastigotas da cepa Tv de *T. cruzi*.

Parâmetros Morfométricos	Cepa Tv					
	Mínimo (μm)		Máximo (μm)		Média \pm DP (μm)	
	Tv Epimastigota	Tv Tripomastigota	Tv Epimastigota	Tv Tripomastigota	Tv Epimastigota	Tv Tripomastigota
CT	14,021	12,643	43,04	24,135	26,548 \pm 6,439	17,379 \pm 2,767
CC	8,116	7,454	24,793	17,417	14,947 \pm 4,296	13,428 \pm 1,891
FL	5,533	1,341	19,247	9,588	12,119 \pm 3,671	4,321 \pm 1,713
LC	1,334	1,265	3,604	2,869	2,350 \pm 0,569	2,119 \pm 0,362
AC*	0,502	1,032	4,775	3,019	1,656 \pm 0,803	2,065 \pm 0,485
AN*	0,775	0,554	5,453	6,136	1,639 \pm 0,974	2,200 \pm 1,164
NA	7,885	3,658	25,845	14,418	17,114 \pm 4,543	8,205 \pm 2,238
PN	4,191	1,97	26,448	12,601	9,732 \pm 4,131	10,286 \pm 1,506
IN	0,246	0,448	2,565	3,433	0,658 \pm 0,439	1,425 \pm 0,580

Fonte: Autoria própria (2023).

Figura 11: Resultados da análise morfométrica feita em 35 formas epimastigotas da cepa Tsh 8 de *T. cruzi*.

Parâmetros Morfométricos	Cepa Tsh 8 Epimastigota		
	Máximo (μm)	Mínimo (μm)	Média \pm DP (μm)
CT	39,911	19,102	29,063 \pm 4,966
CC	23,667	8,847	15,616 \pm 4,434
FL	22,168	7,081	14,601 \pm 3,419
LC	3,391	1,661	2,482 \pm 0,590
AC*	4,735	0,459	1,710 \pm 0,843
AN*	3,111	1,117	2,150 \pm 0,838
NA	34,504	10,643	22,996 \pm 5,768
PN	19,67	1,102	6,86 \pm 3,937
IN	0,73	0,071	0,351 \pm 0,338

* = μm^2

Fonte: Autoria própria (2023).

4.2 Caracterização Biológica da cepa Tv

O comportamento da cepa Tv nos camundongos da linhagem Swiss foi praticamente constante, observou-se um aumento do número de formas

tripomastigotas de forma lenta e contínua até o pico da parasitemia ser atingido, após isso, a queda do número de formas também se deu de forma regular, chegando ao desaparecimento total de formas no sangue periférico. A cepa Tv apresentou 100% de infectividade. Os valores relacionados aos parâmetros estabelecidos anteriormente para o desenvolvimento do estudo biológico da cepa Tv estão referidos na Figura 12.

Figura 12: Características biológicas da cepa Tv de *T. cruzi* após infecção intraperitoneal em camundongos Swiss com formas tripomastigotas

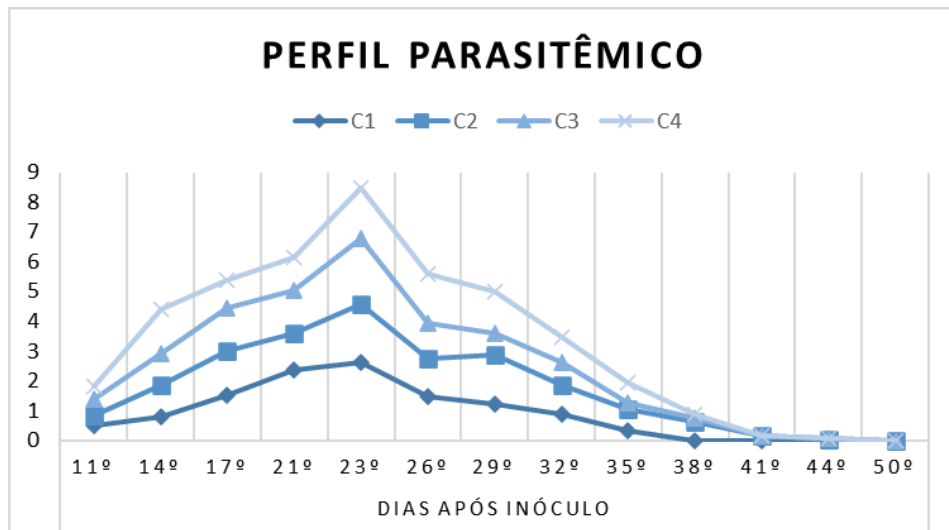
Cepa Tv						
Camundongos (formas/0,02 mL)	Período pré-patente (dias)	Parasitemia Máxima (nº/ml)	Dia	Fase Aguda (dias)	Observações	
Inóculo $1,08.10^4$						
C1	11	$2,64.10^4$	20º	17	cronicidade	
C2	11	$1,94.10^4$	23º	17	cronicidade	
C3	11	$2,21.10^4$	23º	17	cronicidade	
C4	11	$1,69.10^4$	23º	14	cronicidade	

Fonte: Autoria própria (2023).

A cepa Tv teve uma variação da parasitemia que foi de $1,69.10^4$ a $2,64.10^4$ formas tripomastigotas por mL de sangue infectado, a fase aguda teve duração de 14-17 dias e a taxa de letalidade foi de 0% (Tab. 3). Também existem dados que mostram que o período pré-patente foi de 11 dias, a parasitemia máxima foi de $2,64.10^4$ formas de tripomastigotas no 20º dia de infecção e houve evolução do parasita para cronicidade em 100% dos animais.

No perfil parasitêmico da cepa Tv é possível observar o período pré-patente, o pico parasitêmico e o desaparecimento das formas analisadas (Figura 13).

Figura 13: Curva de parasitemia (C1, C2, C3 e C4) observada em camundongos Swiss inoculados com a cepa Tv de *T. cruzi*. O eixo X indica os dias após o inóculo e o eixo Y o nº de tripomastigotas/mL de sangue 10^4 .

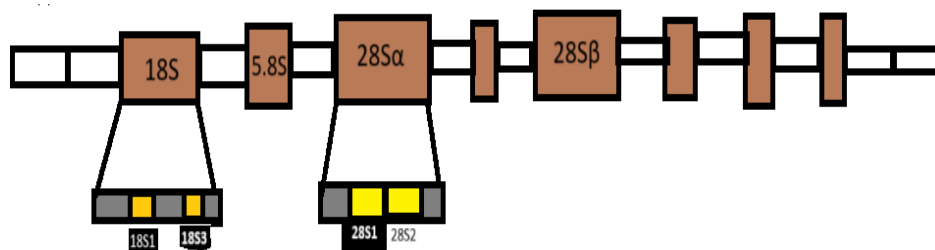


Fonte: Autoria própria (2023).

4.3 Caracterização molecular da cepa Tsh 8 e Tv

A amplificação de quatro regiões variáveis dos genes 18S e 28S α rRNA, que são partes da técnica de FFLB, pode ser representada pelo esquema feito abaixo:

Figura 14: Sequência do código de rRNA. As partes amarelas representam as regiões analisadas pela técnica de FFLB.



Fonte: Autoria própria (2023).

A análise das amostras de DNA, obtidas das cepas de Tsh 8 e Tv, a partir da técnica de FFLB mostrou que os picos encontrados são pertencentes ao subtipo genético Tcl.

5. Discussão

5.1 Estudo Morfométrico

As formas tripomastigotas e epimastigotas de *T. cruzi* possuem muitas variações quanto às mensurações, o que foi possível observar durante o desenvolvimento do estudo morfométrico das cepas Tv e Tsh 8. Entretanto, ainda não existe um consenso sobre a variação das formas das cepas e a sua patogenicidade (Martins et al., 2008). O estudo demonstrou grandes variações em relação a alguns parâmetros específicos das formas tripomastigotas e epimastigotas da cepa Tv quando comparadas, como o comprimento do flagelo livre (FL) e o comprimento total (CT), mas também tiveram os outros parâmetros com valores regulares.

Quando outros estudos relacionados à morfometria (Brenner e Chiari, 1963; Belda Neto, 1974; Martins, 2005; Rossi, 2007; Martins et al., 2008) são levantados, é possível concluir que os resultados possuem um padrão de variação, estando próximos da variação de Hoare (1972) e semelhantes aos resultados obtidos aqui neste trabalho. É importante ressaltar que as principais diferenças notadas neste estudo em relação aos outros trabalhos podem ser justificadas devido à fonte de obtenção e manutenção das formas existentes nas demais análises. Por outro lado, o estudo da forma tripomastigota deste trabalho foi feito de forma semelhante aos demais, com sangue de mamífero (camundongo).

A cepa Tsh 8 na forma epimastigota possui grande variação de valores nos parâmetros de flagelo livre (FL), comprimento celular (CC), distância da extremidade anterior ao núcleo (NA), distância da extremidade posterior ao núcleo (PN) e área do cinetoplasto (AC), indicativo de alguns polimorfismos, daí a classificação de parâmetros preconizados anteriormente por Rossi em 2007. Entretanto, o significado real desse polimorfismo ainda não foi estabelecido, não se sabe se há um comportamento biológico distinto associado ou se trata apenas de variações morfológicas (Brenner e Chiari, 1963; Andrade, S. G. et al., 1997).

Os hospedeiros podem funcionar como critério para os aspectos relacionados à morfologia das cepas de *T. cruzi*, sendo meios seletivos, além de

diversos outros fatores como o meio-ambiente e localização geográfica (Rimoldi, 2010).

5.2 Estudo Biológico

Apesar da infecção de hospedeiros vertebrados por *T. cruzi* se desenvolverem de forma típica e semelhante entre si, existe grande variabilidade em relação à velocidade do desaparecimento das formas tripomastigotas sanguíneas, uma vez que as formas mais finas têm capacidade de desaparecer mais rapidamente da circulação (Brener, 1977), o que não acontece com as formas mais largas de tripomastigotas.

Foi importante constatar que a parasitemia máxima encontrada nos animais permaneceu relativamente constante entre os quatro camundongos selecionados para o estudo, o que pode ser associado ao fato do inóculo ter sido padronizado anteriormente em relação à quantidade de parasitas inoculados existentes.

A cepa Tv de *T. cruzi* apresentou período pré-patente curto. Esse período foi de 11 dias. O resultado se assemelha com alguns estudos como o de Nai et al. (2006) que ao estudar quatro cepas de *T. cruzi* isoladas de pacientes chagásicos crônicos procedentes de diversas áreas geográficas, também observou período pré-patente curto, entre 5 e 9 dias.

Neste estudo foi possível verificar que a parasitemia máxima da cepa Tv foi atingida entre os dias 20º e 23º com cerca de $2,12 \cdot 10^4$ formas tripomastigotas, e com a fase aguda atingida entre 14-17 dias. A curva de parasitemia seguiu uma constância em que as formas aumentaram de forma lenta e regular, com algumas pequenas quedas, mas depois seguiu aumentando em direção ao pico, decaindo de forma também constante até atingir a completa cronicidade.

O grau de virulência da cepa Tv mostrou-se bastante alto, visto que muitos animais morreram antes dos 10 primeiros dias de infecção, o que dificultou o estudo completo até a fase de cronificação. Após mais experimentos conduzidos, foi verificada alta agressividade da cepa para os animais de laboratório infectados, que mostravam pelo ralo, pele arroxeadada e órgãos visivelmente

edemaciados ao final do estudo. Ademais, a taxa de letalidade foi alta, quando considerados os 8 primeiros camundongos, que não sobreviveram até parte relevante do estudo. Os quatro camundongos que permaneceram vivos seguiram até a cronificação com taxa de mortalidade de 0%.

5.3 Estudo Molecular

Trypanosoma cruzi está relacionado a um clado denominado de “clado *T. cruzi*”, que é composto por representantes do subgênero *Schizotrypanum*, entre outras espécies de Trypanosomatidae. O clado em que *T. cruzi* se insere é bastante heterogêneo, portanto, possui uma grande variedade de espécies de *Trypanosoma*, que possuem vários hospedeiros mamíferos e com diferentes distribuição geográfica (Jansen *et al*, 2017).

As informações sobre a variabilidade genética e as relações filogenéticas entre as linhagens do parasita crescem, isso é devido ao rápido surgimento de técnicas e metodologias moleculares utilizadas para a identificação dos diferentes subtipos genéticos de *T. cruzi*, além de estabelecer relações entre esses (Maldonado, 2018). Por meio de análises capazes de codificar genes específicos do parasita, as cepas de *T. cruzi* foram divididas em sete grupos (Lewis *et al*. 2009; Zingales *et al*. 2009; Marcili *et al*. 2009). Os subtipos genéticos existentes são chamados de DTUs, Unidades Discretas de Tipagem, e trata-se de um conjunto de populações geneticamente semelhantes e que são identificados por marcadores genéticos, moleculares e imunológicos em comum (Jansen *et al*, 2017).

As análises das duas cepas estudadas neste trabalho feitas pela técnica FFLB se enquadram no grupo I, que é um dos genótipos mais antigos de *T. cruzi*, também conhecido como sendo um dos primeiros, assim como o grupo II. Estudos apontam que as DTUs I e II se separaram entre 3 e 10 milhões de anos atrás (Jansen *et al*, 2017).

É sabido que a DTU TcI é bastante dispersa e muito frequente na natureza, possui uma grande variedade de hospedeiros mamíferos e vetores, pode ser vista desde o Chile até territórios estadunidenses (Lima *et al*, 2014). A DTU TcI já foi associada aos ciclos de transmissão silvestre e arbóreo, entretanto, já foi isolada

em mamíferos e triatomíneos variados, e conseguiu ser encontrada em todos os extratos florestais. Trata-se de uma DTU muito heterogênea, que pode ser encontrada em países da América do Sul, e em regiões do Norte do Brasil. O grupo TcI já foi dividido em outros quatro grupos, ou os chamados haplótipos, que foram encontrados em infecção humana, em triatomíneos que habitam ambientes silvestres e em ciclos de transmissão do parasita em ambientes peridomiciliares. Novas populações e genótipos de TcI são descritos e associados a ambientes silvestres e domésticos (Honorato, 2020).

6. Conclusão

O conjunto de estudos desenvolvidos e estabelecidos por este trabalho traz importantes considerações sobre o protozoário *Trypanosoma cruzi*, que é o agente causal da doença de Chagas, que podem colaborar para o desenvolvimento futuro de demais análises relacionadas a essa doença que ainda se mostra muito presente na América Latina.

Os resultados morfométricos encontrados revelam a variação significativa observada nos parâmetros analisados, o que reforça a existência de polimorfismos. A morfologia é influenciada tanto pela genética da cepa quanto por pressões seletivas do hospedeiro e do ambiente.

Os dados biológicos obtidos revelam a alta agressividade e a virulência da cepa Tv, o que é demonstrado pelo curto período pré-patente e por uma taxa de letalidade precoce. Além disso, a rápida progressão da infecção somada ao aparecimento de sinais clínicos severos, definem a cepa Tv como um modelo de estudo muito relevante para casos agudos da Doença de Chagas, o que permite a determinação da gravidade e do desfecho de caso clínico.

O estudo molecular mostrou-se extremamente relevante, uma vez que a identificação das cepas estudadas como pertencentes à DTU TcI reafirma a importância deste genótipo na dinâmica da Doença de Chagas no Brasil. Conclui-se que as cepas Tsh8 e Tv inserem-se em uma linhagem evolutivamente ancestral e muito versátil, as quais são capazes de transitarem com sucesso entre ciclos silvestres e peridomiciliares. A classificação demonstra a heterogeneidade biológica das cepas, visto que este é um grupo reconhecido por uma vasta distribuição geográfica e alta capacidade de infecção. Dessa forma, pode-se concluir que o grupo TcI é um componente persistente e adaptável, cujo monitoramento genético torna-se essencial para entender os mecanismos de dispersão e os diferentes cenários de transmissão da cepa.

Referências Bibliográficas

ALEVI, K. C. C. *et al.* Tendências na taxonomia de vetores da doença de Chagas (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae): da taxonomia lineana à integrativa.

Pathogens , v. 10, n. 12, p. 1627, 2021.

ANDRADE, S. G. *et al.* Specific chemotherapy of Chagas disease: a comparison between the response in patients and experimental animals inoculated with the same strains. Transactions of the **Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**,

Hygiene,

v. 86, n. 6, p. 624-626, 1992.

ARGOLO, A. M. *et al.* Doença de Chagas e seus principais vetores no Brasil. Rio de Janeiro: **Imperial Novo Milênio**. Principais vetores de *Trypanosoma cruzi* no Brasil (com ênfase para o complexo T. brasiliensis), p. 41-53, 2008.

BOTTO-MAHAN, C. *et al.* Lizards as silent hosts of *Trypanosoma cruzi*. **Emerging infectious diseases**, v. 28, n. 6, p. 1250, 2022.

BRENER, Z.; CHIARI, E. Aspectos do crescimento inicial de diferentes cepas de *Trypanosoma cruzi* em meio de cultura. **O Jornal de parasitologia** , p. 922-926, 1965.

BRENER, Z. *Trypanosoma cruzi*: morfologia e ciclo evolutivo. **Clínica e Terapêutica da doença de Chagas: uma abordagem prática para o clínico geral**, p. 24-31, 1997.

CAMARGO, E. Plessmann. Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi*; i. origin of metacyclic trypanosomes in liquid media. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 6, n. 3, p. 93-100, 1964.

COLOSIO, R.C. *et al.* Conhecimentos e atitudes sobre a doença de Chagas entre profissionais de saúde–Paraná, Brasil. **Ciência, Cuidado E Saúde**, v. 6, p. 355-363, 2007.

COSTA, J; PACHECO, R.S. **Doença de Chagas e seus principais vetores no Brasil**. Rio de Janeiro. Imperial Novo Milênio, 2008.

COSTA, M. *et al.* Doença de Chagas: uma revisão bibliográfica. **Revista Eletrônica da Faculdade Evangélica de Ceres**, v. 2, n. 1, 2013.

COUNTING CHAMBERS. [s. l.], n. page 313, [2020]. p. 56. Disponível em: http://www.brand.de/fileadmin/user/pdf/GK900/Zaehlkammern/GK900_05_Clinical_Lab_Zaehlkammern_e.pdf. Acesso em 15 jan. 2026.

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

COURA, J.R. Tripanosomose, doença de Chagas. **Ciência e Cultura**, v. 55, n. 1, p. 30-33, 2003.

DE REZENDE, J. M. **Doença de Chagas**. 1968.

DIAS, J.C.P.; COURA, J.R. **Clínica e terapêutica da doença de Chagas: uma abordagem prática para o clínico geral**. Editora Fiocruz, 1997.

DIAS, J.C.P. *et al.* Fonte alimentar e potencial vetorial de *Triatoma vitticeps* (Stal, 1859) com relação à doença de Chagas humana no estado do Espírito Santo, Brasil (Hemiptera, Reduviidae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 84, p. 165-173, 1989.

DIAS, J.V.L. *et al.* **Fatores envolvidos na distribuição de triatomíneos e seu controle no município de Diamantina**, Minas Gerais, Brasil, entre 2011 e 2014. 2015.

FALCONE, R. **Estudo de populações de *Rhodnius neglectus* e *R. prolixus* (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) mantidas em laboratório por meio de marcadores mitocondriais, morfológicos e morfométricos**. 2016.

FÉ, N. F. *et al.* Ocorrência de triatomíneos em ambientes silvestres e domiciliares do município de Manaus, Estado do Amazonas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 42, p. 642-646, 2009.

FERNANDES, A.J. *et al.* Inter-relações entre os ciclos de transmissão do *Trypanosoma cruzi* no município de Bambuí, Minas Gerais, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 10, p. 473-480, 1994.

FERREIRA, R.T.B. *et al.* **Detecção de *Trypanosoma cruzi* em açaí: contribuição para o estudo da transmissão oral da Doença de Chagas.** 2016.

FERREIRA, R.T.B. *et al.* **Transmissão oral da doença de Chagas pelo consumo de açaí: um desafio para a Vigilância Sanitária.** 2014.

FORATTINI, O. P. *et al.* Observações sobre atividade de mosquitos Culicidae, em mata residual no Vale do Ribeira, S. Paulo, Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 15, n. 6, p. 557-586, 1981.

GALVÃO, C. *et al.* Influência da temperatura no ciclo de vida de *Triatoma melanosoma* Martínez, Olmedo & Carcavallo, 1987 (Hemiptera, Reduviidae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94, p. 851-854, 1999.

GALVÃO, C; JUSTI, S.A. An overview on the ecology of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae). **Acta Tropica**, v. 151, p. 116-125, 2015.

GARCIA, H.A. *et al.* Remarkable richness of trypanosomes in tsetse flies (*Glossina morsitans morsitans* and *Glossina pallidipes*) from the Gorongosa National Park and Niassa National Reserve of Mozambique revealed by fluorescent fragment length barcoding (FFLB). **Infection, Genetics and Evolution**, v. 63, p. 370-379, 2018.

GILBER, S. R. *et al.* **Reação em cadeia da polimerase em comparação com o teste de imunofluorescência indireta (IFI) e ELISA (enzimaimunoensaio) no diagnóstico para a doença de Chagas.** 2007.

GUERRA, A. L. **Análise molecular do subcomplexo Brasiliensis (Hemiptera, Triatominae).** 2016.

HAMILTON, P. B. *et al.* A novel, high-throughput technique for species identification reveals a new species of tsetse-transmitted trypanosome related to the *Trypanosoma brucei* subgenus, Trypanozoon. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 8, n. 1, p. 26-33, 2008.

HONORATO, N. R. M. **Avaliação da presença de triatomíneos e distribuição de DTUs *Trypanosoma cruzi* em diferentes mesorregiões do Rio Grande do Norte, Brasil.** 2020.

HUEB, M.F.D; LOUREIRO, S.R. Revisão: Aspectos cognitivos e psicossociais associados à doença de Chagas. **Psicologia em Estudo**, v. 10, p. 137-142, 2005.

JANSEN, AM; XAVIER, SCC; ROQUE, ALR Aspectos ecológicos do *Trypanosoma cruzi*: hospedeiros silvestres e reservatórios. In: **Tripanossomíase Americana, Doença de Chagas** . Elsevier, 2017. pág. 243-264.

KROPF, S.P. **Doença de Chagas, doença do Brasil: ciência, saúde e nação**, 1909-1962. Editora Fiocruz, 2009.

KUNII, G.K.W. *et al.* Growth Curve, Morphological and Molecular Characterization of Two Strains of *Trypanosoma cruzi* (Kinetoplastida, Trypanosomatidae) isolated from *Triatoma sherlocki* (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 55, 2022.

LIMA, V. S. *et al.* **Diversidade de *Trypanosoma cruzi* TcI e TcII nos biomas brasileiros.** 2014.

NEVES, S. MP. **Manual de Cuidados e Procedimentos com Animais de Laboratório do Biotério de Produção e Experimentação.** São Paulo: Universidade de São Paulo, 2013.

MANTOVANI, C. C. **Metodologia para busca de inibidores de síntese proteica específicos para *Trypanosoma cruzi*.** 2022.

MARCILI, A. *et al.* **Um novo genótipo de *Trypanosoma cruzi* associado a morcegos evidenciado por análises filogenéticas utilizando os genes SSU rDNA, citocromo b e Histona H2B e genotipagem baseada no rDNA ITS1.** *Parasitologia*, v. 136, n. 6, pág. 641-655, 2009.

MARTÍNEZ-HERNÁNDEZ, F. *et al.* *Trypanosoma cruzi*, beyond the dogma of non-infection in birds. *Infection, Genetics and Evolution*, v. 99, p. 105239, 2022.

MARTINS, L. P. A. *et al.* Morfometria de tripomastigotas sanguíneas de

Trypanosoma cruzi Chagas, 1909 (Kinetoplastidae, Trypanosomatidae). **Revista de Patologia Tropical/Journal of Tropical Pathology** , v. 37, n. 2, pág. 143-150, 2008.

MARTINS-MELO, F. R. *et al.* Mortalidade por doença de Chagas no Brasil: padrões espaciais e definição de áreas de alto risco. **Medicina Tropical & Saúde Internacional** , v. 9, pág. 1066-1075, 2012.

MASARIN, I. S. **Análise da relação evolutiva das espécies do subcomplexo *Triatoma pseudomaculata*, a partir de cruzamentos experimentais e sistemática filogenética.** 2023.

MELLO, F.; FIGUEIREDO, M. I. O. **Guia de identificação de triatomíneos do Rio Grande do Sul.** Porto Alegre: CORAG, 2013

OLIVEIRA CORREIA, J.P.S. *et al.* ***Triatoma guazu* Lent and Wygodzinsky Is a Junior Synonym of *Triatoma williami* Galvão, Souza and Lima.** *Insects*, v. 13, n. 7, p. 591, 2022.

PEREIRA-SILVA, F.S; MELLO, M.L.B.C; ARAÚJO-JORGE, T.C. Doença de Chagas: enfrentando a invisibilidade pela análise de histórias de vida de portadores crônicos. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 27, p. 1939-1949, 2022.

PINTO, A.Y.N. *et al.* Fase aguda da doença de Chagas na Amazônia brasileira: estudo de 233 casos do Pará, Amapá e Maranhão observados entre 1988 e 2005. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, p. 602-614, 2008.

PRIOTTO, *et al.* Aspectos da vigilância entomológica da doença de chagas no sul do Rio Grande do Sul, Brasil. **Ver. Pat. Trop.** v. 43, n. 2, p. 228-238, 2014

RAVAZI, A. **Mudanças climáticas e ambientais e seus efeitos potenciais na dinâmica da doença de Chagas: hibridação em *Rhodniini* (Hemiptera, *Triatominae*).** 2023.

RIMOLDI, A. *et al.* **Morphological, biological and molecular characterization of three strains of *Trypanosoma cruzi* Chagas, 1909 (Kinetoplastida, Trypanosomatidae) isolated from *Triatoma sordida* (Stal) 1859 (Hemiptera, Reduviidae) and a domestic cat.** *Parasitology*, v. 139, n. 1, p. 37-44, 2012.

RIVAS, N. *et al.* **Genetic diversity in peridomestic populations of *Triatoma mexicana* (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) in central Mexico.**

Parasitology Research, p. 1-12, 2022.

ROMAN MALDONADO, I. F. *et al.* **Diversidade genética de isolados de *Trypanosoma cruzi* DTU I obtido de mamíferos silvestres e triatomíneos de biomas brasileiros, avaliados por genes variáveis e constitutivos .** 2018.

ROSSI, L. R. L. **Estudo biométrico de formas epimastigotas e tripomastigotas de quatro cepas de *Trypanosoma cruzi*, Chagas 1909 (Kinetoplastidae, Trypanosomatidae).** 2007.

SANTOS, C.M; CASSIANI, R.A; DANTAS, R.O. Avaliação clínica da deglutição na doença de Chagas. **Revista da Sociedade Brasileira de Fonoaudiologia**, v. 16, p. 215-220, 2011.

SANTOS, F. M., MACEDO, G. C. D., BARRETO, W. T. G., NANTES, W. A. G., Assis, W. O. D., & Herrera, H. M. (2019). Valores hematológicos de lobinhos (*Cerdocyon thous*) do Pantanal, Mato Grosso do Sul, Brasil naturalmente infectados e não infectados por *Trypanosoma cruzi* e *T. evansi*. **Ciência Animal Brasileira**, 20.

SHIKANAI-YASUDA, M. A. *et al.* Doença de Chagas aguda: vias de transmissão, aspectos clínicos e resposta à terapêutica específica em casos diagnosticados em um centro urbano. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.32, p. 16-27, 1990.

SILVA, L. A. **Estudo morfológico, morfométrico e molecular de cinco espécies do subcomplexo *Triatoma rubrovaria* (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae).** 2018.

SOBRINHO, J.L.S. *et al.* Delineamento de alternativas terapêuticas para o tratamento da doença de Chagas. **Revista de Patologia Tropical/Journal of Tropical Pathology**, v. 36, n. 2, p. 103-118, 2007.

SOUSA, P. S. **Análise do padrão de segregação do exocório de ovos de**

triatomíneos (Hemiptera, Triatominae) em híbridos experimentais. 2024.

SOUZA, T. K. M. **Caracterização morfométrica, molecular e verificação da capacidade infectiva de cepas de *Trypanosoma cruzi*, isoladas de hospedeiros humanos e não humanos no estado de São Paulo, Brasil.** 2018. Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo.

TAFURI, W.L; CHIARI, E; RASO, P. Ciclo intracelular do *Trypanosoma cruzi* e sua importância na patogênese da doença de Chagas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 16, p. 219-221, 1983.

WESTPHALEN, E.V.N; BISUGO, M.C; ARAÚJO, M.F.L. Aspectos epidemiológicos e históricos do controle da doença de Chagas no Continente Americano. **BEPA-Boletim Epidemiológico Paulista**, p. 18-35, 2012.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Chagas disease (also known as American trypanosomiasis), 2025. 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)). Acesso em 15 jan. 2026

XAVIER, S. C. C. *et al.* Distantiae transmission of *Trypanosoma cruzi*: a new epidemiological feature of acute Chagas disease in Brazil. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 5, p. e2878, 2014.