

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

CÂMPUS DE ARARAQUARA

Influência da fonte alimentar na infecção de triatomíneos por

***Trypanosoma cruzi*.**

Maria Clara Soares Marin

Araraquara

2013

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

LABORATÓRIO DE PARASITOLOGIA

Influência da fonte alimentar na infecção de triatomíneos por

***Trypanosoma cruzi*.**

**Trabalho de conclusão de curso
apresentado ao Curso de graduação
em Farmácia- Bioquímica da Faculdade
de Ciências Farmacêuticas de
Araraquara, da Universidade Estadual
Paulista “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
- UNESP para a obtenção do grau de
Farmacêutica-Bioquímica.**

Aluna: Maria Clara Soares Marin

Orientador: Prof. Dr. João Aristeu da Rosa

Coorientadora: Aline Rimoldi Ribeiro

Araraquara

2013

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho primeiramente aos meus pais, Airton e Cida, pelo incansável empenho em construir aquilo quem sou, pela criação excepcional, pelo amor e confiança desde sempre. Ao meu amado irmão João Pedro, meu eterno companheiro. Eu não seria nada sem o amor, a felicidade e a alegria de vocês.

Dedico-o ao meu Orientador Prof. Dr. João Aristeu da Rosa, um exemplo de Docente e pessoa, por toda paciência, amizade e ensinamentos dados ao longo da minha iniciação científica.

Às minhas amigas de Laboratório Larissa, Juliana e Aline, minha coorientadora, obrigada pela amizade e ajuda desde sempre.

À minha família, tias, tios, primos e primas, Vó Theresinha e Vó Ana por todo amor e cuidado nesses anos de faculdade.

Ao meu avô Airton (in memoriam), pelas lembranças.

Ao meu avô “Preto” (in memoriam), aquele que inspirou duas gerações de farmacêuticas na família Soares.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus pelo dom da vida. Agradeço por todas as oportunidades que Ele me concedeu até agora, pela família que tenho e pela proteção que me é dada.

Ao meu amado pai, por todo amor e incrível apoio.

À minha mãe, amada “Louis”, por me mostrar o encanto da profissão farmacêutica.

Ao Prof. Dr. Aristeu pela orientação, pelos ensinamentos dados e amizade.

Às minhas tias Gunga, Cristina, Rô e Elisa pelo “carinho de mãe” que me foi dado durante esses anos de faculdade. As minhas avós, Theresinha e Ana, por todo carinho e preocupação.

Às minhas amigas - irmãs de infância: Carol, Natália, Fernanda e Mayra que mesmo distantes se fazem presentes na minha vida, por tudo que vivemos e pela amizade que ainda cultivamos.

Às amizades verdadeiras que a UNESP me proporcionou, agradeço por cada momento, por todo amor, pela confiança. Em especial aos que sempre estiveram do meu lado durante esses anos de faculdade.

Ao Rodrigo, por todo o apoio, por acreditar em mim e pela felicidade que me oferta.

À turma 80, que para sempre estará marcada na minha história.

Aos amigos que o Laboratório de Parasitologia me trouxe: Aline, Larissa, Ju, Jader, Danila, Amanda, Mariana, Heloísa e Fernanda.

Sumário

1. Resumo5

2. Lista de figuras6

3. Lista de Tabelas7

4. Introdução.....18

5. Objetivo.....18

6. Materiais e Métodos.....18

7. Resultado.....25

8. Discussão31

9. Conclusão.....37

10. Referências Bibliográficas.....38

1. Resumo

Embora a doença de Chagas seja amplamente estudada, ainda não se conhece todos os interferentes que modulam a relação parasitária *Trypanosoma cruzi*- vetor-hospedeiro vertebrado. Sabe-se que as aves são refratárias ao *T. cruzi*, ou seja, o parasito não consegue estabelecer parasitismo nas mesmas, enquanto que nos camundongos a infecção ocorre. Essa refratariedade representa um exemplo de resistência natural do hospedeiro a uma infecção parasitária. Originalmente, acreditava-se que isso ocorria devido à presença de um anticorpo natural contra o *T. cruzi* no sangue das aves, porém estudos atuais atribuem tal atividade ao sistema complemento presente no sangue das mesmas. Pretendeu-se avaliar neste projeto se a referida característica peculiar do sangue das aves interfere no processo e no nível de infecção dos triatomíneos, em especial de *Rhodnius neglectus*, espécie de comprovada importância epidemiológica. Para tanto, utilizou-se a cepa Y de *T. cruzi* e ninfas de 4º estágio de *R. neglectus*. Avaliou-se também a capacidade lítica do soro de galinha em formas epimastigotas e tripomastigotas em meio de cultura LIT, utilizando a cepa Y. Referente à influência de diferentes fontes alimentares na infecção de *R. neglectus* por *T. cruzi*, observou-se um decréscimo no número de exemplares infectados após alimentação em patos, apresentando Índice de Infecção médio de 19,74%. Por outro lado, exemplares infectados após alimentação em camundongos não apresentaram diferença significativa na parasitemia total. Os testes *in vitro* demonstraram que a adição de soro de galinha em meio de cultura LIT, com formas epimastigotas e tripomastigotas, foi capaz de diminuir notoriamente a contagem de parasitos móveis até a contagem zero, uma hora após a adição. O conjunto desses resultados sugere que a refratariedade das aves ao *T. cruzi* influencia a infecção de *R. neglectus* pelo flagelado e foi demonstrada, *in vitro*, pela ação lítica em formas epimastigotas e tripomastigotas em meio de cultura LIT.

Palavras chaves: *T. cruzi*, *R. neglectus*, refratariedade das aves, infecção.

2. Lista de figuras

Figura 1. Número estimado de emigrantes infectados com <i>T. cruzi</i> vivendo em áreas não endêmicas (Rassi et al., 2010).	9
Figura 2. Ocorrência relativa de 16 espécies de triatomíneos em todos os biomas brasileiros, calculado com base em proporções de ocorrências conhecidas correspondentes a cada área. (GURGEL et al., 2012).....	11
Figura 3. Modelo de nicho ecológico projetado como potencial de distribuição para <i>R. neglectus</i> no Brasil (Gurgel et al, 2012).....	12
Figura 4. <i>T. cruzi</i> isolado de fezes de <i>R. montenegrensis</i> (Rosa et al.; 2012). A, forma epimastigota; B, forma tripomastigota. Foto tirada por Maria Clara S. Marin..	13
Figura 5. Transmissão vetorial e ciclo de vida de <i>T. cruzi</i> . (Adaptado de Rassi Jr et al., 2010).....	16

3. Lista de Tabelas

Tabela 1. Número de exemplares infectados de *R. neglectus* do Grupo A após alimentação em camundongo parasitado pela cepa Y de *T. cruzi*.....25

Tabela 2. Número de exemplares infectados de *R. neglectus* do Grupo B após alimentação em camundongo parasitado pela cepa Y de *T. cruzi*.26

Tabela 3. Número de exemplares infectados de *R. neglectus* do Grupo A após alimentação em patos.....27

Tabela 4. Número de exemplares infectados de *R. neglectus* do Grupo B após alimentação em camundongos sadios.....27

Tabela 5. Tabela 5. Índices de Infecção após alimentação : Grupo A, *R. neglectus* infectados por *T. cruzi* e alimentados em patos; Grupo B, *R. neglectus* infectados por *T. cruzi* e alimentados em camundongos sadios.28

Tabela 6. Número de formas epimastigotas de *T. cruzi* móveis após adição de soro de galinha em meio de cultura LIT.29

Tabela 7. Número de formas epimastigotas de *T. cruzi* móveis após adição de soro de galinha em meio de cultura LIT.30

4. Introdução

A doença de Chagas é uma antroponose endêmica, sistêmica e crônica que tem como agente etiológico o protozoário hemoflagelado *Trypanosoma cruzi*. A transmissão é principalmente vetorial, pelas fezes de insetos hematófagos da subfamília Triatominae contaminados com formas infectantes do protozoário (Chagas, 1909). Carlos Justiniano Ribeiro das Chagas, em 1909, foi o responsável por descrever tanto o ciclo de transmissão (vetores, hospedeiros, parasito) e as manifestações clínicas agudas do primeiro caso humano, em Lassance- MG.

Atualmente cerca de sete a oito milhões de pessoas são acometidas pela doença de Chagas na América Latina (WHO). Do ponto de vista epidemiológico e político é considerada um grande problema de saúde pública, sendo uma patologia endêmica em 21 países da América Latina (Pan American Health Organization, 2006), nos quais aproximadamente 25 milhões vivem em situação de risco.

Os casos de doença de Chagas humana no Brasil são encontrados principalmente nos Estados do Rio Grande do Sul, parte de Santa Catarina e região noroeste do Paraná Minas Gerais (exceto o sul de Minas), São Paulo, Goiás e Estados do Nordeste. São evidenciadas duas áreas, distintas geograficamente, onde os padrões de transmissão de doença de Chagas são diferenciados: a) regiões originalmente de risco para a transmissão vetorial, das quais fazem parte os estados de AL, BA, CE, DF, GO, MA, MG, MS, MT, PB, PE, PI, PR, RN, RS, SE, SP, TO; b) Amazônia Legal, com mecanismos excepcionais de transmissão (vetorial domiciliar sem colonização, vetorial extradomiciliar, oral) compreendida pelos estados do AC, AM, AP, RO, RR, PA, TO, e parte do MA e do MT (Consenso brasileiro em doença de Chagas).

A expansão da doença de Chagas humana é produto da ocupação errática e colonização não ordenada da América Latina. Essa teoria é baseada em três elementos principais: profundas ações sobre o meio natural, como queimadas e desmatamentos extensivos promovendo a abertura dos espaços naturais e carreando para ecótopos artificiais reservatórios e vetores silvestres da tripanossomíase americana; existência de ranchos e outras vivendas de má qualidade propiciando adaptação dos vetores ao processo de domiciliação; migrações e grandes deslocamentos populacionais, carreadores da própria infecção e de vetores com alta capacidade de domiciliação (Forattini, 1980; Dias, 1988).

A doença de Chagas originalmente era confinada às áreas pobres da América Latina, no entanto uma mudança nesse cenário é observada. Atualmente essa nosologia não é mais restrita, sendo observados casos em países desenvolvidos como Estados Unidos, Austrália, Canadá, Japão, países da Europa (Figura 1). Essa expansão é resultado da emigração de pessoas de áreas endêmicas, da falta de triagem nos bancos sanguíneos e transmissão congênita (WHO,2007 ; Schmunis,; 2000; Rassi et al., 2010).



Figura 1. Número estimado de emigrantes infectados com *Trypanosoma cruzi* vivendo em áreas não endêmicas (Rassi et al., 2010).

Em 1991 foi criada a Iniciativa Cone Sul assinada pelo Brasil, Bolívia, Chile, Argentina, Paraguai e Uruguai, cujo principal objetivo foi o combate ao vetor *Triatoma infestans* e a redução de transmissão por transfusão sanguínea. O resultado foi a redução da área de distribuição de *T. infestans*, o declínio das taxas de infecção de crianças nascidas desde o início do programa, e a interrupção da transmissão vetorial e transfusional em sete estados brasileiros, Uruguai e Chile (Dias et al., 2000)

O Brasil recebeu no dia 9 de junho de 2006 uma certificação da Organização Pan- Americana da Saúde pela virtual eliminação, no País, da transmissão da doença de Chagas pelo principal vetor regional, o *T. infestans*. A certificação foi produto do trabalho tenaz de dezenas de cientistas e de milhares de anônimos guardas sanitários, uma saga iniciada em Minas por Emmanuel Dias, na década de 1940.

4.1 Os vetores da Doença de Chagas

A subfamília Triatominae, família Reduviidae, caracterizada por insetos hematófagos, é composta por aproximadamente 146 espécies (Galvão et al., 2003; Forero et al., 2004; Costa et al., 2006; Schofield e Galvão, 2009; Frias-Lassare, 2010, Rosa et al. 2012). Duas tribos apresentam os gêneros mais importantes epidemiologicamente: Rhodniini (gêneros *Rhodnius* e *Psammolestes*) e Triatomini (gênero *Triatoma*, *Panstrongylus*, *Eratyrus*, *Dipetalogaster*, *Hermanlenticia*, *Meccus*, *Mepraia* e *Paratriatoma*) As espécies mais importantes de vetores da doença de Chagas são: *Triatoma infestans*, *Triatoma dimidiata*, *Triatoma brasiliensis*, *Triatoma maculata*, *Triatoma sordida*, *Rhodnius prolixus*, *Rhodnius neglectus*, *Rhodnius*

pallescens e *Panstrongylus megistus* (Lent e Wygozinsky, 1979; Cruz e Lopéz, 2001).

No Brasil são encontradas aproximadamente 62 espécies de triatomíneos sendo esse número sujeito a alterações (Gurgel et al, 2012).

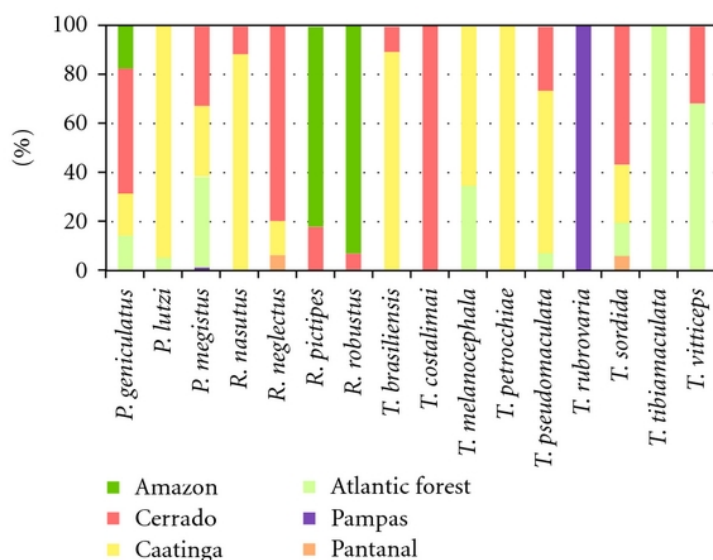


Figura 2. Ocorrência relativa de 16 espécies de triatomíneos em todos os biomas brasileiros, calculado com base em proporções de ocorrências conhecidas correspondentes a cada área. (GURGEL et al., 2012)

4.1.1 *Rhodnius neglectus*

Rhodnius neglectus habita várias espécies de palmeiras, como babaçu (*Orbignya maritima*), macaubeira (*Acrocomia macrocarpa*), buriti (*Mauritia vinifera* Martius) e aricuri (*Scheelea phalerata* Burret). Pode ser também encontrado em galinheiros, ninhos de pássaros, em alguns mamíferos e habitando casas, possuindo um papel importante na transmissão enzoótica de *T. cruzi* e *T. rangeli*. Trata-se de uma espécie característica do cerrado no Brasil central, concentrada principalmente nos Estados de Goiás, Minas Gerais, São Paulo e Mato Grosso, como descrito por Lent e Wygodzinsk em 1979 (Figura 3).

Em geral, seu comprimento varia de 17,5 - 19mm nos machos e 18,5 - 20,5mm em fêmeas com coloração marrom clara. Além disso, apresenta manchas marrom escura na cabeça, escutelo, pronoto, conexivo e cório e regiões amareladas na parte ventral do abdômen, no conexivo, coxa e trocânter.



Figura 3. Modelo de nicho ecológico projetado como potencial de distribuição para *R. neglectus* no Brasil (Gurgel et al, 2012).

4.2 *Trypanosoma cruzi*

O agente etiológico da doença de Chagas é um protozoário flagelado pertencente à ordem Kinetoplastida e à família Trypanosomatidae. A diversidade patogênica, imunológica e morfológica inerentes ao *T. cruzi*, depende do hospedeiro e outros fatores ainda indeterminados, como variação regional e individual da doença humana em infecções naturais e experimentais (Coura e Dias, 2009).

T. cruzi apresenta um ciclo de vida bastante complexo, que inclui diferentes formas no vetor e no hospedeiro vertebrado. As formas epimastigotas e tripomastigotas metacíclicas são encontradas no vetor, enquanto as formas tripomastigotas sanguíneas e amastigotas intracelulares no vertebrado (Dias, 1934). A forma tripomastigota é alongada, com cinetoplasto posterior ao núcleo, flagelo que

se estende por toda célula e torna-se livre na porção anterior, sendo ela a forma infectante. A forma epimastigota é alongada com cinetoplasto localizado na região anterior do núcleo com flagelo aderido a parte do corpo do parasita, tornando-se livre na região anterior (Figura 4). Por último, amastigota é caracterizada por ser ovalada e possuir cinetoplasto em forma de barra ou bastão na região anterior ao núcleo e flagelo curto que não se exterioriza a (Bellini et al., 2011; Lana e Tafuri, 2000).

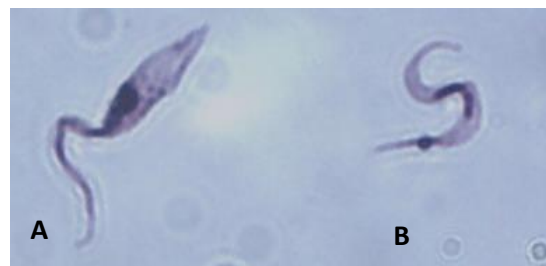


Figura 4. *Trypanosoma cruzi* isolado de fezes de *R. montenegrensis* (Rosa et al.; 2012). A, forma epimastigota; B, forma tripomastigota. Foto tirada por Maria Clara S. Marin.

Em 1999, duas linhagens principais foram descritas, *T. cruzi* I, que predomina no ciclo de transmissão silvestre, parece ser menos resistente a fármacos utilizados no tratamento; *T. cruzi* II, que predomina no ambiente doméstico em todos os países da América Latina, com sugestiva resistência a fármacos tripanossomicidas e que, especialmente no Brasil e Argentina, está relacionado ao dano tecidual (Di Noia et al., 2002; Freitas et al., 2005). A linhagem II é ainda subdividida em cinco outras: IIa, IIb, IIc, IId, e IIe (Brisse et al., 2000). Em 2006, Freitas et al. reportaram uma terceira linhagem, denominada III.

Em 2009, Zingales e colaboradores fizeram uma revisão da nomenclatura e *T. cruzi* foi classificado como pertencente a seis grupos independentes, referidos como DTU (*Discrete Typing Unit* – TcI a TcVI).

A diversidade patogênica, imunológica e morfológica inerentes ao *T. cruzi*, depende do hospedeiro e outros fatores ainda indeterminados, como variação regional e individual da doença humana em infecções naturais e experimentais (Coura e Dias, 2009).

Aves e alguns animais poiquilotérmicos representam exemplos típicos de resistência natural ao *T. cruzi* (Bruni, 1926; Dios, Werngrenand Perez, 1929; Dias, 1933). Formas sanguíneas de *T. cruzi* obtidas de camundongos infectados foram relatados por serem rapidamente lisadas por soro fresco de galinha, rãs e sapos, mas não camundongo, humano ou porcos-guiné (Rubio 1956; Budzko, 1975).

Essa resistência natural foi interpretada originalmente pela presença de anticorpos naturais aos protozoários presentes especialmente no sangue das aves, porém Kierzszenbaum et al.(1976) revelaram que soro de galinhas agamaglobulínicas foi igualmente capaz de lisar formas tripomastigotas, sugerindo que talvez essa capacidade esteja relacionada ao sistema complemento.

4.3 Ciclo biológico e interações parasito-célula hospedeira.

O ciclo biológico de *T. cruzi* é caracterizado por ser heteroxeno sendo necessário um hospedeiro invertebrado (triatomíneo) e outro vertebrado (mamífero). O ciclo no hospedeiro invertebrado foi descrito em detalhes por Dias (1934), mostrando a transformação dos tripomastigotas sanguíneos em epimastigotas e subsequentemente em tripomastigotas metacíclicos, a forma infectante do parasita eliminada junto às fezes e urina.

Durante o repasto sanguíneo as formas tripomastigotas, presentes no sangue do hospedeiro vertebrado, são ingeridas pelo inseto. Depois de alguns dias no intestino do triatomíneo, a maioria dos tripomastigotas sanguíneos assumem a forma epimastigotas e em alguns esferomastigotas, que posteriormente se tornam epimastigotas. Os epimastigotas replicam-se ao longo do comprimento total do trato digestivo e nos tubos de Malpighi, migrando para o intestino posterior atingindo o reto, transformando-se em tripomastigotas metacíclicas, as quais são eliminadas nas fezes e urina do vetor (Tyler e Engman, 2001). Essa forma é capaz de infectar e replicar em uma ampla variedade de células do hospedeiro vertebrado usando componentes de sua superfície e da superfície celular do hospedeiro (Burleigh e Woolsey, 2002; Yoshida, 2006).

A transmissão de *T. cruzi* ao homem ocorre quando as fezes do parasito, contaminados com a forma infectante, durante o repasto sanguíneo, entram em contato com mucosas ou fissuras na pele do hospedeiro. Subsequentemente, diferenciam-se em amastigotas e se multiplicam no citoplasma da célula. Essas formas amastigotas, depois de certo período, assumem a forma tripomastigota que rompe a célula, podendo penetrar em células adjacentes ou propagam-se na circulação sanguínea e infectam tecidos distantes. As células musculares, incluindo as do coração, são as mais fortemente infectadas.

A doença de Chagas é dividida em fase aguda e crônica. Durante a fase aguda os sintomas podem incluir febre, inflamação no local de inoculação, edema unilateral de pálpebra (sinal de Romaña), inchaço de linfonodos e esplenomegalia. Essa fase desaparece espontaneamente em dois a quatro meses, e o paciente, se não tratado, permanece infectado entrando na fase crônica. Cerca de 60% dos pacientes nunca apresentam sintomas, enquanto os outros 40% desenvolvem 20 a

30 anos após a fase aguda cardiomiopatia, arritmias, megasíndromes e, mais raramente, polineuropatias (Pérez-Molina et al.,2012).

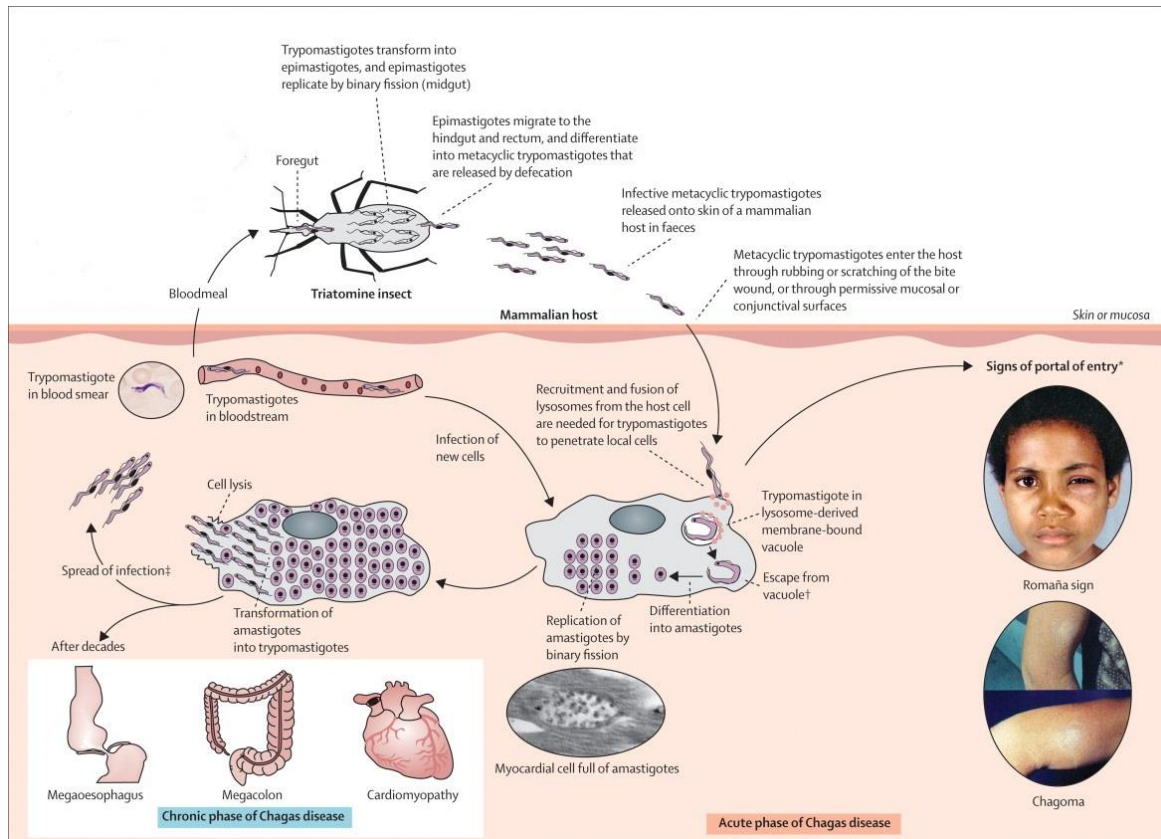


Figura 5. Transmissão vetorial e ciclo de vida de *T. cruzi*. (Adaptado de Rassi Jr et al., 2010)

5. Objetivos

Estudar a infecção de exemplares de *R. neglectus* por *T. cruzi* quando alimentados por camundongos (*Mus musculus*), linhagem Swiss, e patos (*Cairina moschata*), ambos utilizados na rotina de manutenção das colônias do Insetário de Triatominae da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara (FCFAR).

Avaliar a capacidade *in vitro* do soro coletado de galinha (*Gallus gallus domesticus*) em lisar formas tripomastigotas e epimastigotas de *T. cruzi* (cepa Y).

6. Materiais e Métodos

6.1 Experimento I. *Avaliação da infecção de R. neglectus por T. cruzi após alimentação em camundongos (Mus musculus) linhagem Swiss e patos (Cairina moschata).*

6.1.1 Cepa Y de *T. cruzi*

A cepa Y foi isolada de um caso humano de doença de Chagas por meio de xenodiagnóstico e caracterizada por Silva e Nussenzweig, 1953. Essa cepa possui elevado percentual de mortalidade e período pré-patente de um a oito dias, dependendo do número de parasitos inoculados. A cepa é classificada como do Tipo I, por se multiplicar muito rápido, predominância de formas finas e macrófago tropismo na fase final de infecção, altos e curtos picos de parasitemia e mortalidade.

6.1.2 Animais

Foram utilizados para a infecção dos triatomíneos camundongos Swiss, machos, infectados com a cepa Y. Os animais infectados passavam por repiques periódicos de forma a manter a cepa.

Para a alimentação foram utilizados camundongos Swiss, machos, adultos.

A alimentação em patos foi realizada no Insetário de Triatominae da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara/UNESP utilizando-se animais que fazem parte do patário.

6.1.3 Triatomíneos

Os exemplares de triatomíneos utilizados foram obtidos de colônias de triatomíneos mantidas no Insetário de Triatominae da Faculdade de Ciências de Araraquara – UNESP. As colônias são mantidas em cubas de vidro fechadas, com

divisórias internas rígidas, identificadas com número e CTA (Colônia de Triatomíneos de Araraquara – CTA nº). Periodicamente, de acordo com a necessidade biológica da colônia, são alimentadas com *Rattus norvegicus* (ratos), *Mus musculus* (camundongos) ou *Cairina moschata* (patos). Para este trabalho foram utilizadas as colônias CTA 055 e CTA 056 provenientes de Frutal, Minas Gerais, e estabelecidas no insetário desde 23/05/1983.

a) Infecção dos triatomíneos

Para infecção dos triatomíneos, optou-se por utilizar 30 ninfas de 4º estágio por grupo, que haviam sido alimentadas, de preferência, 30 dias antes e que estavam visivelmente magras.

Os camundongos infectados com a cepa Y foram examinados de 10-15 dias após o último repique de forma a verificar se os mesmos se encontravam no pico parasitêmico. Foi realizado um pequeno corte na cauda do animal e aproximadamente uma alíquota de 5 µL de sangue foi inserida em uma lâmina de 25 x 75mm e recoberta por uma lamínula de 22 x 22 mm sendo examinada em microscópio Carl ZeissJena, Jenamed com objetiva de 40X e ocular de 10X. Dois camundongos foram selecionados de acordo com o resultado da contagem em 100 campos, 20 campos em cada um dos cantos e um central. Todos os utensílios utilizados eram flambados e após o uso a bancada passava por assepsia com álcool 70%.

As ninfas selecionadas foram colocadas em contato com os dois camundongos anteriormente examinados, separadamente em bolsas para alimentação. A cuba era devidamente fechada, colocada em ambiente escuro onde

permanecia por 30 minutos ou até as ninfas se apresentarem visivelmente ingurgitadas.

Para confirmar se houve a infecção e garantir a exequibilidade do experimento os exemplares de *R. neglectus*, três semanas após a infecção, passavam por compressão abdominal, de forma a eliminar suas fezes em um vidro de relógio. Essas fezes foram colocadas /em uma solução fisiológica 0,9% (salina) e examinadas ao microscópio para confirmação da infecção. Durante esse processo foi necessário muita destreza, visto que os exemplares não poderiam morrer, e ainda, muita atenção para identificar a presença do parasito nas fezes.

As ninfas que apresentavam resultados positivos no material biológico foram isoladas, enquanto que aquelas que tiveram resultados negativos, inconclusivos ou que não defecaram foram descartadas.

b) Alimentação após infecção

Foram estabelecidos dois grupos de *R. neglectus*, denominados A e B, de acordo com a fonte alimentar a que seriam infectados posteriormente à infecção. Os exemplares de *R. neglectus* do grupo A eram alimentados, após infecção, em patos e os exemplares infectados do grupo B alimentados em camundongos. Os grupos foram submetidos ao experimento em triplicata, subdividindo- os em Grupo AI, AII, AIII, BI, BII,BIII, para dar maior relevância aos resultados obtidos.

No insetário de Triatomíneo da FCFAr mantem-se também um patário do qual era capturado um animal para alimentação do grupo A. O animal foi colocado sobre um balcão, amarrado, e a colônia era colocada em baixo do mesmo para alimentação.

Para alimentação em camundongos, Grupo B, foram utilizados dois animais, aprisionados em uma bolsa e colocados em contato com as ninfas. A cuba era fechada e posta em ambiente escuro por aproximadamente 30 minutos, ou por tempo suficiente para que ficassem ingurgitadas.

c) Leitura final após alimentação

Após duas semanas as ninfas, já alimentadas, foram examinadas no microscópio. Por meio de compressão abdominal, suas fezes eram coletadas em um vidro de relógio com algumas gotas de solução salina 0,9% e seguiam para visualização no microscópio. Os grupos A e B foram examinados separadamente e após leitura de um grupo todos os instrumentos utilizados eram embebidos em álcool 70% para não haver contaminação.

6.2 Experimento II. Avaliação da atividade lítica de soro de galinha em formas epimastigotas e tripomastigotas de *T. cruzi* em meio LIT.

6.2.1 Animais

a) Camundongos: foram utilizados, para a obtenção de formas tripomastigotas, camundongos da linhagem Swiss, machos, infectados com a cepa Y, mantidos no Biotério do Laboratório de Parasitologia da FCFAr.

b) Galinha: utilizou-se uma galinha adulta, aparentemente sadia. A ave foi colocada em decúbito lateral para que a coleta pudesse ser feita pela veia ulnar (veia da asa) por meio de uma seringa de 5mL por punção venosa. O volume foi transferido para um tubo de ensaio de 10mL, autoclavado, seco e sem anticoagulante. Para a obtenção do soro o tubo de ensaio foi mantido em completo

repouso até separação. O soro foi coletado por uma pipeta Pasteur e armazenado em um tubo de ensaio para realização do experimento e mantido em refrigeração após o primeiro uso.

6.2.2 Meio de cultura

Para obtenção das formas epimastigotas, foi utilizado o meio de cultura LIT (*Liver Infusion Tryptose*), proposto por Camargo (1964) com a seguinte formulação:

NaHPO ₄ .7H ₂ O -----	8,0 g
NaCl -----	4,0 g
KCl -----	0,4 g
Glucose -----	2,0 g
Tryptose -----	5,0 g
Caldo de infuso de fígado -----	5,0 g
Hermina ----- 25mg/20mL TrisBase -----	0,1N
Soro fetal bovino-----	100mL
Água Milli Q ----- q.s.p -----	1000mL

6.2.3 Parasitos

a) Epimastigotas:

As formas epimastigotas foram obtidas de cepa Y estabelecida em meio LIT mantidas em uma estufa incubadora para B.O.D modelo 347F/FANEM à 25°C. Inicialmente, foi realizada a contagem dos parasitos em Câmara de Neubauer, nos quatro quadrantes. Com base na quantidade de parasitos contados inicialmente, calculou-se a concentração de parasitos por unidade de volume da mostra líquida

inicial. Desta forma, fez-se necessário aliquotar 4,6mL de cepa Y, para garantir a concentração padronizada de 2.10^6 parasitos.

b) Tripomastigotas

Os tripomastigotas sanguíneos foram obtidos de sangue colhido durante a fase aguda da infecção, por punção cardíaca, de animais previamente infectados mantidos no biotério do Laboratório de Parasitologia.

As contagens das formas tripomastigotas foram realizadas de acordo com o método de Brener (1965) com correção dos intercamos. Colheu-se 5 μ L do sangue de 3 animais infectados com a cepa Y, por meio de corte da cauda e depositou-se em uma lâmina de vidro, recobrando-a com uma lamínula. Examinou-se a preparação em microscópio ótico, com objetiva de 40X e ocular de 10X, na proporção 1, contando-se 100 campos microscópicos. Considerando que a superfície da lamínula utilizada com a correção dos intercamos corresponde, no aumento empregado, a cerca de 1550 campos microscópicos, basta multiplicar o número de parasitos encontrados no exame de 100 campos pelo fator 15,55 e obtém-se o número de formas contidas em 5 μ L.

Optou-se escolher aquele camundongo que apresentasse o maior número de formas em 5 μ L, que foi submetido à punção cardíaca, para coleta do sangue. Sabendo das limitações de se usar um animal, o volume de sangue obtido por punção em média é de 1-2mL, padronizou-se que o volume utilizado de sangue seria 0,1mL.

Outro fator limitante: quanto maior o volume de sangue utilizado, mais concentrado ficaria o meio e, portanto mais difícil a visualização dos parasitos em microscópio óptico.

6.2.4 Procedimento

a) Para formas epimastigotas: todo o experimento foi feito em triplicata, cada tubo de ensaio continha inicialmente 0,3mL de meio de cultura LIT, 4,6mL de cepa Y, concentração aproximada 2×10^6 formas epimastigotas/mL e 0,1mL de soro, totalizando 3 tubos. A contagem, após adição do soro, foi em 2, 5, 8, 12, 16, 18, 22 e 60 minutos para cada tubo.

b) Para formas tripomastigotas: foram utilizados quatro tubos de ensaio, cada um contendo 0,1mL de sangue de camundongo infectado com a cepa Y, 4mL de meio LIT, concentração aproximada 6×10^4 parasitos/mL, e 0,1mL de soro. Três deles foram destinados a adição do soro e contagem após 5, 8, 12, 16, 18, 22 e 60 minutos. O tubo restante foi utilizado para controle, não foi adicionado o soro e a contagem foi feita em dois momentos: no início do experimento e após uma hora.

Para o teste com epimastigotas utilizou-se o soro imediatamente após a coleta, enquanto para tripomastigotas o mesmo foi mantido sob refrigeração por três semanas a 4°C. Imediatamente após adição do soro, a amostra total era homogeneizada e a cada tempo padronizado uma alíquota de 10µL era colocada sobre a área útil de uma câmara de Neubauer, recoberta com uma lamínula e colocada em microscópio óptico para contagem.

7. Resultados

7.1 Experimento I. Avaliação da infecção de *R. neglectus* por *T. cruzi* após alimentação em camundongos (*Mus musculus*) e patos (*Cairina moschata*).

O experimento, como dito anteriormente, utilizou-se de dois grupos: grupo A composto por exemplares infectados e posteriormente submetidos à alimentação em pato; grupo B também formado por exemplares infectados porém submetidos posteriormente à alimentação em camundongo.

Os exemplares eram examinados em uma semana. Porém, observou-se que após esse período os mesmos ainda continuavam ausentes de *T. cruzi*. O mesmo exame foi feito em semanas consecutivas e observou-se que somente após três semanas, em média, na maioria dos exemplares, era possível visualizar o parasito nas fezes.

A primeira etapa do experimento, que consiste no processo de infecção dos exemplares. Observa-se que em ambos os grupos chegou-se a uma média próxima de infectados. O subgrupo A III (Tabela 1) obteve o maior número de infectados e o subgrupo B II (tabela 2) o menor número.

Tabela 1- Número de exemplares infectados de *R. neglectus* do Grupo A após alimentação em camundongo parasitado pela cepa Y de *T. cruzi*.

Grupo A*	Total	Infectados	Descartados
A I	32	24	8
A II	30	23	7
A III	30	28	2
Média (X)	30,66	25	5,6

* AI, AII, AIII: Grupos de *R. neglectus* destinados à alimentação em patos após infecção por *T. cruzi*

Tabela 2- Número de exemplares infectados de *R. neglectus* do Grupo B após alimentação em camundongo parasitado pela cepa Y de *T. cruzi*.

Grupo B	Total	Infectados	Descartados
B I	31	24	7
B II	30	22	8
B III	30	25	5
Média (X)	30,33	23,66	6,6

** BI, BII, BIII: Grupos de *R. neglectus* destinados à alimentação em camundongo após infecção por *T. cruzi*

Os exemplares descartados foram aqueles que após três semanas se encontravam mortos, com resultado inconclusivo ou negativo para infecção. Mesmo sendo contabilizados todos juntos, os descartados eram na sua grande maioria exemplares mortos. O grupo A (Tabela 1), em média, descartou cinco exemplares enquanto o B (Tabela 2) teve, em média, seis exemplares subtraídos do total.

Posterior à infecção, os grupos infectados foram alimentados em suas respectivas fontes alimentares. O exame final dos exemplares foi feito três semanas após esta alimentação e seus resultados referem-se as tabelas 3 e 4. Os exemplares descartados, foram aqueles que inicialmente, encontravam-se mortos. Aqueles que possuíam resultados inconclusivos, ausência ou quantidade insuficiente de fezes foram reexaminados após alguns dias, e se ainda assim, não apresentassem nenhum resultado significativo (negativo ou positivo) eram descartados.

O grupo A apresentava no início do experimento uma média de 25 exemplares infectados por *T. cruzi*. Após a alimentação em pato o número de infectados examinados foi, em média, 3,66 exemplares, enquanto os negativos somaram-se em 14,66 exemplares (Tabela 3).

Tabela 3. Número de exemplares infectados de *R. neglectus* do Grupo A após alimentação em patos.

Grupo A	Positivos	Negativos	Descartados
A I	4	12	8
A II	3	15	5
A III	4	17	7
Média (X)	3,66	14,66	6,66

* AI, AII, AIII: Grupos de *R. neglectus* destinados à alimentação em patos após infecção por *T. cruzi*

A média de triatomíneos infectados no grupo B, no início do experimento foi 23,66 exemplares. Quando examinados, após alimentação, o número de infectados somaram-se 17, apenas um exemplar foi considerado negativo e 6,33 exemplares descartados (Tabela 4).

Tabela 4. Número de exemplares infectados de *R. neglectus* Grupo B após alimentação em camundongo sadio.

Grupo B	Positivos	Negativos	Descartados
B I	15	1	8
B II	17	0	5
B III	19	0	6
Média (X)	17,00	1,33	6,33

** BI, BII, BIII: Grupos de *R. neglectus* destinados à alimentação em camundongos após infecção por *T. cruzi*.

Quando comparado o índice de infecção, observou-se que o grupo A, depois de alimentado, apresentou diminuição da parasitemia total, com índice de infecção média de 19,74 % (Tabela 5).

Enquanto isso, os exemplares do grupo B depois de alimentados não apresentaram mudanças significativas no quadro de infecção, mostrando um índice médio de 97,91% (Tabela 5).

Tabela 5. Índices de Infecção após alimentação : Grupo A, *R. neglectus* infectados por *T. cruzi* e alimentados em patos; Grupo B, *R. neglectus* infectados por *T. cruzi* e alimentados em camundongos sadios.

Índice de Infecção*		
Experimento	Grupo A	Grupo B
I	25%	93,75%
II	16,66%	100%
III	19,04%	100%
Média (X)	19,74 %	97,91%

*O índice de Infecção foi calculado com base nos exemplares viáveis e que apresentaram resultados conclusivos, portanto através da razão entre os exemplares positivos e o total de exemplares analisados.

7.2 Experimento II. Avaliação da atividade lítica de soro de galinha em formas epimastigotas e tripomastigotas em meio LIT.

A contagem dos parasitos na câmara de Neubauer, iniciada imediatamente após a adição do soro, foi realizada em cada tempo estipulado observando-se as formas que apresentavam movimentação.

a) Teste em epimastigotas

A primeira contagem dos epimastigotas, dois minutos após a adição do soro, foi de 251, 283 e 267 formas móveis. Observa-se nos experimentos I e II que a

contagem de parasitos foi decrescendo de forma constante, até que após 60 minutos nenhuma forma com movimento foi observada (Tabela 6). O experimento III apresentou-se de forma diferente e logo nos 12 minutos não foi possível visualizar nenhuma forma com movimento, saindo do padrão que foi apresentado nos experimentos I e II (Tabela 6).

Tabela 6. Número de formas epimastigotas de *T. cruzi* móveis após adição de soro de galinha em meio de cultura LIT.

Epimastigotas móveis			
Experimento			
Tempo (min)	I	II	III
2	251	283	267
5	189	151	142
8	196	128	90
12	158	122	0
16	156	114	0
18	130	114	0
22	130	96	0
60	0	0	0

b) Teste em tripomastigotas

A contagem de formas tripomastigotas iniciou-se com uma concentração bem inferior a concentração das formas epimastigotas, porém por um motivo técnico e adequado para as condições do experimento. É importante ressaltar que o soro utilizado neste experimento, ainda que o mesmo utilizado no teste em epimastigotas, foi mantido em refrigeração por duas semanas a 4°C antes de adicionado às amostras.

Os três experimentos após dois minutos apresentaram quantidades muito próximas de formas tripomastigotas com movimento. Assim como nos experimentos I e II da tabela 6, os experimentos I, II e III da tabela 7, mostram-se semelhantes no decorrer dos tempos apresentando diminuição na contagem geral de parasitos. É possível visualizar em I (Tabela 7) que nos tempos 16, 18 e 22 minutos a contagem de parasitos permanece constante até zerar no tempo 60 minutos. Nos demais experimentos, dois momentos de constância iguais são observados: no tempo 12 e 16 minutos e 18 e 22 minutos, zerando após uma hora da adição do soro (Tabela 7).

O grupo controle apresentou uma diferença muito pequena na contagem de parasitos móveis após uma hora do tempo inicial, 42 parasitos móveis foram contados no início e 40 formas após 1 hora.

Tabela 7. Número de formas tripomastigotas de *T. cruzi* móveis após adição de soro de galinha em meio de cultura LIT.

Parasitos móveis				
Experimento				
Tempo (min)	I	II	III	Controle
2	39	37	40	42
5	21	21	33	-
8	23	22	17	-
12	16	13	13	-
16	8	13	13	-
18	8	8	7	-
22	8	8	7	-
60	0	0	0	40

8. Discussão

Os resultados obtidos utilizando patos (*Cairina moschata*) como fonte alimentar de *R. neglectus* infectado por *T. cruzi* mostraram uma visível redução da infecção quando comparados aos exemplares alimentados em camundongos. Os resultados mostraram que o grupo de *R. neglectus* infectado por *T. cruzi* após alimentação em patos, teve o número de exemplares infectados diminuído. Por outro lado, o grupo B, alimentado em camundongo, um reservatório do flagelado, apresentou porcentagem de infecção semelhante à alimentação anterior. O experimento contou com uma porcentagem de exemplares descartados, porém deve-se ressaltar que o mesmo levou em consideração condições externas que puderam ter influenciado na manutenção dos grupos. Um exemplo claro é a mudança de temperatura, umidade, claridade e hábito alimentar anterior. Diotaiuti e colaboradores (1987) mostraram que *R. neglectus* criados por longo período em insetários, alimentados em aves, apresentam um menor potencial biológico em comparação à colônias recém estabelecidas.

Referente à avaliação da capacidade lítica do soro de galinha em *T. cruzi* observou-se que a contagem de epimastigotas e tripomastigotas móveis diminuiu significativamente após adição do soro em meio de cultura LIT.

Os resultados obtidos estão relacionados com o fenômeno de refratariedade das aves, que representa um exemplo típico de resistência natural ao *T. cruzi*. Dias em 1944 descreveu a resistência natural de pombos a esse flagelado ao inoculá-los com formas sanguíneas do parasito (tripomastigotas) e obter xenodiagnósticos negativos desde três horas até 25 dias após as inoculações. Já é sabido que ovos de galinhas embrionados com formas sanguíneas de *T. cruzi* apresentam-se parasitêmicos apenas durante alguns dias após o período embrionário e que após o

nascimento, os pintos originados apresentam-se ausentes de infecção (Nery-Guimarães e Lage, 1974; Nitz et al, 2004). Sendo assim, as aves são consideradas refratárias ao *T. cruzi* desde o nascimento (Nery-Guimarães e Lage, 1974).

Warren e Borsos (1959) atribuíram a refratariedade das aves à existência de dois fatores no soro das galinhas capazes de lisar o *T. cruzi* : um termoestável, que seria um anticorpo aglutinante e sensibilizante, e outro termolábil, o sistema complemento. Entretanto, Kierzembaum (1981) conseguiu demonstrar que galinhas agamaglobulinêmicas eram igualmente refratárias ao flagelado, ao passo que aves saudáveis quando tinham seu soro aquecido perdiam essa capacidade. Portanto, desde então a refratariedade das aves é dada como, majoritariamente, resultado da ação do sistema complemento.

Alguns autores afirmam que o sistema complemento presente no sangue das galinhas não interfere na infecção de triatomíneos por *T. cruzi* (Minter, 1976; Urdaneta-Morale, 1972), porém Schaub (1981) ao misturar *in vitro* sangue de galinha com uma população de *T. cruzi* presente no estômago do vetor observou, após dez minutos, apenas uma forma flagelada. No entanto, a mesma interação sangue – parasito não foi observada no intestino.

Cachorros, galinhas e humanos são as principais fontes alimentares dos barbeiros no âmbito domiciliar, apresentando um papel importante na transmissão vetorial domiciliar de *T. cruzi*. Dentro deste âmbito domiciliar, as galinhas poderiam surgir como importantes ferramentas de controle de infecção, graças a sua peculiaridade refratária associada aos resultados apresentados após alimentação de triatomíneos infectados em patos. Porém a simples presença da mesma em ambientes onde a presença de triatomíneos é frequente e densa, não seria o suficiente para garantir ausência ou níveis baixo de infecção por *T. cruzi*.

O papel das galinhas em ambientes infestados por triatomíneos é controverso. Minter (1976) declarou que a presença de aves na área intradomiciliar pode ser benéfica, reduzindo a porcentagem total de vetores infectados, ou prejudiciais, aumentando a densidade populacional dos vetores.

Vazquéz (1999) testou experimentalmente a presença de um hospedeiro não susceptível, galinhas, e porcos guiné, susceptíveis, na infecção de *T. infestans* por *T. cruzi*. Os resultados observados corroboram os resultados obtidos no experimento de exemplares infectados após alimentação em patos: a porcentagem de ninfas infectadas foi significativamente menor na presença (variação de 43-57%) do que na ausência (variação de 68-92%) de galinhas.

Gurtler (1998), avaliando a influência de humanos e animais domésticos na prevalência intradomicílio de *T. cruzi* em triatomíneos, observou que *T. infestans* domiciliares que se alimentavam exclusivamente em galinhas tiveram um menor índice de infecção (27%) do que aqueles que se alimentavam de cães (58%). Aqueles que se alimentavam em galinhas e outras fontes, independente da qual, apresentaram taxa de infecção ligeiramente menor (41%) do que aquelas que se alimentavam apenas em cachorros ou seres humanos (56%). Entretanto, no mesmo estudo, foi observado que a densidade domiciliar de *T. infestans* foi significativamente maior em casas com galinhas do que em casa que as mantinham do lado de fora.

O sistema complemento, embora muito eficiente, é rapidamente inativado quando submetido a diferentes temperaturas. Entretanto, a utilização do soro de galinha mantido em refrigeração, por três semanas, em formas tripomastigotas mostrou ter atividade similar comparada ao utilizado minutos após a coleta em formas epimastigotas. Essa atividade gerou uma controvérsia, visto que a diferença

de temperatura ambiente e depois ao refrigerar seria suficiente para inativá-lo. Porém, Demey (1993) avaliou que atividade de um soro mantido sob -10°C mantinha, ainda que bem menor, sua capacidade lítica por aproximadamente 210 dias. Partindo desses dados é possível sugerir que a amostra mantida em refrigeração por três semanas a 4°C continha uma quantidade incerta e diminuída, é claro, de atividade do sistema complemento.

O sistema complemento é parte do sistema imune inato e é constituído por mais de 30 proteínas presentes no plasma e nas superfícies celulares. Suas principais funções são a lise celular, defesa contra infecções, quimiotaxia e ativação de leucócitos, eliminação de imunocomplexos dos tecidos e de células apoptóticas, interface entre sistema imune inato e adaptativo (Walport, M. J., 2001)

A ativação do complemento pode ocorrer por três vias principais: a via clássica que é ativada na presença de certos anticorpos como IgG e IgM; via alternativa, que é ativada quando em contato com a superfície celular do microrganismo; via das lectinas, ativada pela ligação de polissacarídeos na superfície de micro-organismos à lectinas circulantes, como as lectinas ligantes de manose (Abbas et al., 2012).

Essas três vias diferem-se no processo inicial de ativação, porém levam a formação de um complexo enzimaticamente ativo que atua sobre uma das principais proteínas que fazem parte deste sistema, a proteína C3. A inserção do complexo de ataque à membrana (MAC) como ponto final é um evento em comum entre as três vias (Abbas et al., 2012).

O sistema complemento presente no soro das aves possui um efeito potenciador sobre a fagocitose, é capaz de induzir uma resposta inflamatória, aumentando as respostas das células B e T e, por fim, aumentar a morte direta de

vírus, bactérias e protozoários. É igualmente ativado pelas três vias convencionais: clássica, alternativa e das lectinas que culminam na inserção do complexo de ataque à membrana (Tirziu e Seres, 2010).

Kierszembraum (1981) estabeleceu claramente a importância do sistema complemento na lise de formas tripomastigotas do *T. cruzi*, demonstrando que o aquecimento do soro de galinhas e o uso de CVF (*cobra venom fator*), depletor do sistema complemento, inibiam a lise do parasito, enquanto que galinhas agamaglobulinêmicas (bursectomizadas) apresentavam a atividade lítica inalterada. Soma-se a esses fatos que a quelatção de íons Mg^{+2} , e não dos íons Ca^{+2} , foi capaz inibir o processo de lise, levando a crer que a atividade lítica das galinhas ao *T. cruzi* é decorrente da ativação da via alternativa do complemento, dependente de magnésio.

Os resultados obtidos *in vivo* por Kierszembraum (1981) mostraram que os tripomastigotas foram lisados em aproximadamente 9 minutos. Nos experimentos realizados no presente trabalho, os tripomastigotas móveis diminuíram nos primeiros minutos, entretanto não o suficiente para zerar a contagem nos tempos iniciais. É necessário levar em consideração a diferença entre concentrações, bem como a quantidade de soro de galinha e a cepa utilizada.

Nos seres humanos existem diversos mecanismos efetores humorais e celulares na resposta imune inata do hospedeiro à infecção por *T. cruzi* (Cuervo et al., 2011). De forma semelhante às aves, a via alternativa é ativada, porém as formas epimastigotas são susceptíveis à lise enquanto que as tripomastigotas metacíclicas são capazes de sobreviver. Essa atividade anticomplemento dos parasitos pode ser decorrente da indução de não ativação do complemento, porque eles bloqueiam a cascata após o início, ou porque o complexo MAC não causa

prejuízo nenhum à estrutura de sua membrana. Nos tripomastigotas, diversas glicoproteínas de membrana específicas participam e previnem eficientemente a ativação do complemento sobre a superfície do parasita como por exemplo a gp160 e T-DAF (Norris e Schrimpf, 1994; Norris 1998; Kipnis et al., 1986).

9. Conclusão

A infecção de *R. neglectus* por *T. cruzi* mostrou-se alterada em função da fonte alimentar utilizada após infecção. O grupo de *R. neglectus* infectados por *T. cruzi* quando alimentados em patos (Grupo A) apresentou redução no índice de infecção médio. Entretanto, o grupo submetido a alimentação em camundongos (Grupo B), não apresentou mudanças significativas na parasitemia.

A atividade lítica do soro da ave em formas epimastigotas e tripomastigotas de *T. cruzi* foi evidenciada pela diminuição da contagem em câmara de Neubauer, no decorrer dos tempos estipulados, das formas móveis dos parasitos.

Os resultados obtidos neste trabalho sugerem estreita relação com o fenômeno de refratariedade das aves ao *T. cruzi*, em especial a ativação do sistema complemento, presente no soro das mesmas.

10. Referências Bibliográficas

- ABBAS, A. K.; LICHMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia celular e molecular**. 7ªEdição. São Paulo: Elsevier, 2012.
- BELLINI, M. F.; SILISTINO-SOUZA, R.; VARELLA-GARCIA, M.; AZEREDO-OLIVEIRA, M. T. V.; SILVA, A. E. Review Article: Biologic and Genetics Aspects of Chagas Disease at Endemic Areas. **J. Trop. Med.** v.12, Article ID 357948, doi:10.1155/2012/357948, 2011.
- BRENER, Z. Comparative studies of different strains of *Trypanosoma cruzi*. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 59, p.19-26, 1965.
- BRISSE, S.; DUJARDIN, J. C.; TIBAYRENC, M. Identification of six *Trypanosoma cruzi* lineages by sequence-characterized amplified region markers. **Mol. Biochem. Parasitol** ; v.111, p.95–105, 2000.
- BRUNI, N. Observations et recherches sur *Trypanosoma lewisi* et *Schizotrypanum cruzi*. Bull. **Soc. Path. Exot.** v.19, p.791, 1926.
- BUDZKO, D. B.; M. C. PIZZIMENTI; F. KIER-SZENBAUM. Effects of complement de-pletion in experimental Chagas' disease: Im-mune lysis of virulent blood forms of *Trypanosoma cruzi*. **Infect. Immun.**, v.11, p.86-91, 1975.
- BURLEIGH, B. A; WOOLSEY, A. M. Cell signaling and *Trypanosoma cruzi* invasion. **Cellular Microbiology**, v 4, n.11, p.701 -711, 2002.
- CHAGAS, C. Nova tripanossomíase humana. **Mem Inst Oswaldo Cruz** , v.1, p.159-218, 1909.
- Consenso brasileiro em doença de Chagas. Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop**; 38 Suppl 3:7-29, 2009.

COSTA, J.; ARGOLLO, A .M.; FELIX, M. "Redescription of *Triatoma melanica* Neiva & Lent, 1941, new status (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae)," **Zootaxa**, v.1385, p. 47–52, 2006.

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.

CRUZ-LÓPEZ, L.; MALO, E. A.; ROJAS, J. C.; MORGAN, E.D. Chemical ecology of triatomine bugs: vectors of Chagas disease. **Medical and Veterinary Entomology** v.15, p. 351–357.

CUERVO, H.; GUERRERO, N. A.; CARBAJOSA, S.; BESCHIN, A.; BAETSELIER, P.; GIRONÈS, N.; FRESNO, M. Myeloid-Derived Suppressor Cells Infiltrate the Heart in Acute *Trypanosoma cruzi* Infection. **The Journal of Immunology**, v.187, p.2656-2665, 2011.

DEMEY, F.; PANDEY, V. S.; BAELMANS, R.; AGBEDE, G.; VERHULT, A. The effect of storage at low temperature on the haemolytic complement activity of chicken serum. **Veterinary Research Communications**, v.17, p.37–40, 1993.

DI NOIA, J. M.; BUSCAGLIA, C. A.; DE MARCHI, C. R.; ALMEIDA, I. C.; FRASCH, A. C. A *Trypanosoma cruzi* small surface molecule provides the first immunological evidence that Chagas' disease is due to a single parasite lineage. **J. Exp. Medicine**, v.195, p.401–13, 2002

DIAS E. Immunité naturelle des animaux a sang froid vis-A-vis de l'infection par le *Trypanosoma cruzi*. **C. R. Sjanc. Soc. Biol.** v.112, p.1474, 1933.

DIAS, E. Estudos sobre o Schizotrypanum cruzi. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.28, p.1-110, 1934.

DIAS, E. Não receptividade do pombo doméstico a infecção por Schizotrypanum. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.40, p.191-193, 1944

DIAS, J. C. P. Controle de vetores da doença de Chagas no Brasil e riscos da reinvasão domiciliar por vetores secundários. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 83, suppl.1, p. 387-391, 1988.

DIAS, J. C. P. Epidemiological surveillance of Chagas disease. **Caderno de Saúde Pública**, v.16, sup. 2, p. 43-59, 2000.

DIAS, J. C.P.; SILVEIRA, A. C.; SCHOFIELD, C. J. The Impact of Chagas Disease Control in Latin America - A Review. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.97, p.603-612, 2002.

DIOTAIUTI, L.; DIAS, J.C.P. - Estudo comparativo do ciclo evolutivo de *Rhodnius neglectus* (Lent, 1954) alimentados em pombos ou camundongos. **Rev. Soc. bras. Med. Tropical**, v.20, p.95-99, 1987.

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

FORERO, D.; WEIRAUCH, C. and BAENA, M. "Synonymy of the reduviid (Hemiptera: Heteroptera) genus *Torrealbaia* (Triatominae) with *Amphibolus* (Harpactorinae), with notes on *Amphibolus venator* (Klug, 1830)," **Zootaxa**, v.670, p.1–12, 2004.

FREITAS, J. M.; AUGUSTO-PINTO, L.; PIMENTA, J. R. et al. Ancestral genomes, sex, and the population structure of *Trypanosoma cruzi*. **PLoS Pathog**, 2:e24, 2006.

FREITAS, J. M.; LAGES-SILVA, E.; CREMA E.; PENA, S. D; MACEDO A. M. Real time PCR strategy for the identification of major lineages of *Trypanosoma cruzi* directly in chronically infected human tissues. **Int. J. Parasitol.** V. 35, p. 411–17, 2005.

FRÍAS-LASSERRE, D. "A new species and karyotype variation in the bordering distribution of *Mepraia spinolai* (Porter) and *Mepraia gajardoi* Frias et al (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) in Chile and its parapatric model of speciation". **Neotropical Entomology**, v. 39, no. 4, p. 572–583, 2010

GALVÃO, C.; CARCAVALLO, R.; ROCHA D. S. and J. Jurberg, "A checklist of the current valid species of the subfamily Triatominae Jeannel, 1919 (Hemiptera, Reduviidae) and their geographical distribution, with nomenclatural and their geographical distribution, with nomenclatural and taxonomic notes". **Zootaxa**, v. 202, p. 1 - 36, 2003.

GURGEL-GONÇALVES, R.; GALVÃO, C.; COSTA, J.; PETERSON, A. T. Geographic distribution of Chagas disease vectors in Brazil based on ecological niche modeling. **J. Trop. Medicine**, v. 2012, p.1-15, 2012.

GÜRTLER, R. E.; COHEN, J. E.; CECERE, M. C.; LAURICELLA, M. A.; CHUIT, R.; SEGURA, E. L. Influence of humans and domestic animals on the household prevalence and density of *Triatoma infestans* infected with *Trypanosoma cruzi* in northwest Argentina. **Am. J. Trop. Med. Hyg** v. 58, p. 748-758, 1998.

HOTEZ, P.J.; MOLYNEUX, D.H.; FENWICK, A. et al. Control of neglected tropical diseases. **N. Engl. J. Medicine** v. 357, p. 1018–27, 2007.

KIERSZENBAUM, F.; GOTTLIEB, C. A.; BUDZKO D.B. Antibody-independent, natural resistance of birds to *Trypanosoma cruzi* infection. **J. Parasitol.**, v. 67, p. 656–660, 1981.

KIERSZENBAUM, F; J. IVANYI, AND D. B. BUDZKO. Mechanisms of natural resistance to trypanosomal infection. Role of complement in avian resistance to *Trypanosoma cruzi* infection. **Immunology** , v. 30, p. 1-6, 1976.

KIPNIS, T. L.; TAMBOURGI, D. V.; SUCUPIRA, M.; DIAS DA SILVA, W. Effect of membrane components on the formation of the classical path C3 convertase. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 19, p. 271-278, 1986.

LANA, M.; TAFURI, W. L. Em NEVES D. P. **Parasitologia Humana**, 10. ed. São Paulo: Atheneu, p. 73-96. 2000.

LENT, H. and WYGODZISNKY, 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, no. 3, p. 123–520, 1979.

MINTER, D.M. Effects on transmission to man of the presence of domestic animals in infested households. In **New Approaches in American Trypanosomiasis Research**, Scientific Publication No. 318, p. 330-337. Pan American Organization Washington, 1976.

MINTER, D.M. Feeding patterns of some triatomine vector species. **New Approaches in American Trypanosomiasis Research** Scientific Publication No. 318, p. 33–47. Pan American Health Organization., Washington, 1976.

NERY-GUIMARÃES, F.; LAGE, H refratariedade das aves ao "Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi".I. Ausência de passagem para o sangue; duração da viabilidade e destruição dos parasitos na pele. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 70, p. 37-48, 1972a.

NERY-GUIMARÃES, F.; LAGE, H. A. A refratariedade das aves ao " Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi". II. A refratariedade das galinhas desde o nascimento; persistência de refratariedade após bursectomia; infecçõeses em ovos embrionados. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.70, p. 97-109, 1972b.

NERY-GUIMARÃES, F.; LAGE, H. Refratariedade das galinhas ao "*Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*". III. Dissociação dos fenómenos de refratariedade e da lisedos epimastigotas pelo sora das aves. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.72 , p.131–136, 1974.

NITZ, N.; GOMES, C.; ROSA, A. C.; D'SOUZA-AULT, M. R.; MORENO, F.; LAURIA-PIRES, L.; NASCIMENTO, R. J.; TEIXEIRA, A. R. L. Heritable integration of kDNA minicircle sequences from *Trypanosoma cruzi* into the avian genome: Insights into human Chagas disease. **Cell**, v.118, p.175-186, 2004.

NORRIS, K. A. Stable transfection of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes with the trypomastigote-specific complement regulatory protein cDNA confers complement resistance. **Infection and Immunity**, v.66, p.2460-2465, 1998.

NORRIS, K. A.; SCHRIMPF, J. E. Biochemical analysis of the membrane and soluble forms of the complement regulatory protein of *Trypanosoma cruzi*. **Infection and Immunity**, v.62, p.236-243, 1994.

OPAS. Organização Pan-Americana da Saúde. Certificação do Brasil como área interrompida de transmissão da doença de chagas pelo *T. infestans*. Relatório Técnico do Ministério da Saúde do Brasil, 2006.

PEREIRA DA SILVA, L. H.; NUSSENZWEIG, V. Sobre uma cepa de *Trypanosoma cruzi* altamente violenta para camundongo branco. **Folia. Clin. Biol**, v.20 (3), p.191-208, 1957.

PÉREZ-MOLINA, J. A.; NORMAN, F.; LÓPEZ-VÉLEZ, R. Chagas Disease in Non-Endemic Countries: Epidemiology, Clinical Presentation and Treatment. **Curr. Infect. JRDIs. Rep.**; v.14, p. 263-279, 2012.

PIESMAN, J.; SHERLOCK, I. A.; MOTA E.; TODD, C. W.; HOFF R.; WELLER, T. H. Association between household triatomine density and incidence of *Trypanosoma cruzi* infection during a nine-year study in Castro Alves, Bahia, Brazil. **Am. J. Trop Med. Hyg**, v. 34, p. 866–869, 1988.

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

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.138, p. 1 – 8, 2011.

ROSA, J. A.; ROCHA, C. S.; GARDIM, S; PINTO, M; C.; MENDONÇA, V. J.; FERREIRA FILHO, J. C. R.; DE CARVALHO, E. O. C; CAMARGO, L. M. A.; DE OLIVEIRA, J.; NASCIMENTO, J. D.; CILENSE, M.; ALMEIDA, C. E. Description of *Rhodnius montenegrensis* n. sp. (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) from the state of Rondônia, Brazil. **Zootaxa**, v.3478, p.62-76, 2012.

RUBIO, M. Actividad litica de sueros normales sobre formas de cultivo y sanguineas de *Trypanosoma cruzi*. **Bol. Chil. Parasit**, v. 9, p. 62, 1956.

SCHAUB, G. A. Direct transmission of *Trypanosoma cruzi* between vectors of Chagas' disease. **Acta Trop.**, v.45, p.11-19, 1988.

SCHUMUÑIS, G. A. In: BRENER, Z.; ANDRADE, Z. A.; BARRAL-NETO, M. ***Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas***. 2. ed. Rio de janeiro: Guanabara Koogan. P. 1-5. 2000.

SHOFIELD, C. J. and GALVÃO, C. "Classification, evolution, and species groups within the Triatominae". **Acta Tropica**, v.110, no. 2-3, p. 88–100, 2009.

TÎRZIU, E.; SERES, M. Particularities of the avian immune system. **LUCRĂRI ȘTIINȚIFICE MEDICINĂ VETERINARĂ**, Timisoara, VOL. XLIII (1), 2010.

TYLER, K. M.; ENGMAN, D. M. The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. **International Journal for Parasitology**, v.1, p. 472 - 81, 2001.

URDANETA-MORALE, S. *Trypanosoma cruzi* infections in *Rhodnius prolixus* reared on different hosts. **Rev. Inst. Med Trop**, v.15, p.218-221, 1973.

VÁZQUEZ, D. P.; CANALE, D.; GURTLE, R. E. Effects of non-susceptible hosts on the infection with *Trypanosoma cruzi* of the vector *Triatoma infestans*: an experimental model. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 94, p. 413–419, 1999.

WALPORT, M. J. Complement. First of two parts. **N. Engl. J. Med**, v. 344, p. 1058–1066, 2001.

WHO – World Health Organisation. Report Del grupo de trabajo científico sobre la enfermedad de Chagas (Acesso em Setembro de 2013). Disponível em: [www.who.int/tdr/publications/tdr-researchpublications/ reporte-enfermedad-chagas](http://www.who.int/tdr/publications/tdr-researchpublications/reporte-enfermedad-chagas). 2007.

YOSHIDA, N. Molecular basis of mammalian cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.78, n.1, p. 87 - 111, 2006.

ZINGALES, B. et al. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.104, n.7, p.1051 - 1054, 2009.