



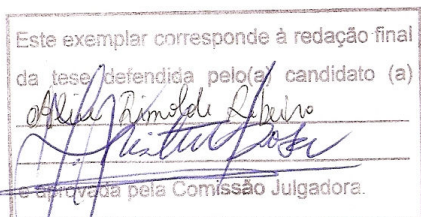
**Universidade Estadual de Campinas**  
**Instituto de Biologia**  
**Departamento de Biologia Animal**



**Caracterização Morfológica, Biológica e Molecular de três cepas de  
*Trypanosoma cruzi* Chagas, 1909 (Kinetoplastida, Trypanosomatidae)  
isoladas de exemplares de *Triatoma sordida* (Stall) 1859 (Hemiptera,  
Reduviidae)**



**ALINE RIMOLDI RIBEIRO**



**Dissertação de Mestrado apresentada à  
Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP,  
para obtenção do título de Mestre em Parasitologia.**

**ORIENTADOR: PROF. DR. JOÃO ARISTEU DA ROSA**

**Campinas – São Paulo**

**2010**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

R354c

Ribeiro, Aline Rimoldi

Caracterização morfológica, biológica e molecular de três cepas de *Trypanosoma cruzi* Chagas, 1909 (Kinetoplastida, Trypanosomatidae) isoladas de exemplares de *Triatoma sordida* (Stål) 1859 (Hemiptera, Reduviidae) / Aline Rimoldi Ribeiro. – Campinas, SP: [s.n.], 2010.

Orientador: João Aristeu da Rosa.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. *Trypanosoma cruzi*. 2. *Triatoma*. 3. Morfologia. 4. Cepas. I. Rosa, João Aristeu da. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

(rodt/ib)

**Título em inglês:** Morphological, biological and molecular characterization of three *Trypanosoma cruzi* Chagas, 1909 (Kinetoplastida, Trypanosomatidae) stains isolated of *Triatoma sordida* Stal 1859 (Hemiptera, Reduviidae) specimens.

**Palavras-chave em inglês:** *Trypanosoma cruzi*; *Triatoma*; Morphology; Specimens.

**Área de concentração:** Parasitologia.

**Titulação:** Mestre em Parasitologia.

**Banca examinadora:** João Aristeu da Rosa, Sérgio de Albuquerque, Regina Maura Bueno Franco.

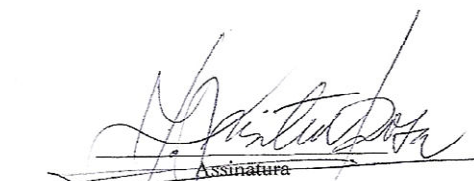
**Data da defesa:** 03/08/2010.

**Programa de Pós-Graduação:** Parasitologia.

Campinas, 3 de agosto de 2010.

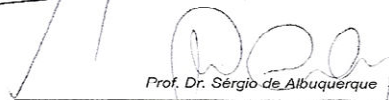
**BANCA EXAMINADORA**

Prof. Dr. João Aristeu da Rosa (Orientador)



Assinatura

Prof. Dr. Sérgio de Albuquerque



Prof. Dr. Sérgio de Albuquerque

Assinatura

Profa. Dra. Regina Maura Bueno Franco



Assinatura

Prof. Dr. Mara Cristina Pinto

Assinatura

Profa. Dra. Silmara Marques Allegretti

Assinatura

Dedico este trabalho ao meu pai Antonio, um exemplo de homem, a minha mãe Rosângela, aos meus irmãos, Regiane e Guinho, por mostrarem, com gestos, o significado verdadeiro de família, à minha filha amada Amanda, que foi inspiração para que eu vencesse todas as dificuldades encontradas, à minha afilhada Júlia, que me alegrou quando estava cansada e ao meu marido Eduardo que esteve ao meu lado, sempre, com muita paciência, dedicação e amor.

Amo vocês!



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

### **Agradecimento Especial**

*“Agradecer é admitir que houve um minuto em que se precisou de alguém”*

*“Agradecer é reconhecer que o homem jamais poderá lograr por si o dom de ser  
auto-suficiente”*

(Autor desconhecido)

Agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. João Aristeu da Rosa, pelo exemplo de determinação, amor à pesquisa e principalmente pela confiança, incentivo e amizade. Obrigada professor pela cuidadosa leitura de meu trabalho, pelos conselhos profissionais, pela ética e acima de tudo por fazer com que este trabalho fosse realizado com amor.

## **Agradecimentos**

- Agradeço primeiramente a Deus por ter me dado garra e prudência para enfrentar os dias árduos de pesquisa, em que às vezes parece que nada vai dar certo. Obrigada, Pai Eterno pela coragem de todos os dias e pelos obstáculos colocados, pois com eles cresci e aprendi que a felicidade “é logo ali”, basta olhá-la com bons olhos.

- Agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa de Mestrado. Obrigada por terem confiado em mim e no meu trabalho, dando-me a oportunidade de pesquisar em uma área de tamanho interesse e satisfação.

- Agradeço à Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP - Programa de Pós-Graduação em Parasitologia e à Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP - Faculdade de Ciências Farmacêuticas Campus de Araraquara, pela disponibilidade de recursos e de estrutura laboratorial necessária ao desenvolvimento desse trabalho.

- Aos professores do Curso de Pós-Graduação em Parasitologia da Unicamp, pela amizade, incentivo e experiência profissional que contribuíram para meu crescimento científico, registro aqui meus sinceros agradecimentos.

- Agradeço à Coordenadora do Curso de Pós-Graduação em Parasitologia da Universidade Estadual de Campinas, Prof<sup>a</sup> Dra. Regina Maura Bueno Franco, muito obrigada pela atenção.

- Agradeço aos funcionários da Seção de Pós-Graduação da Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP, em especial ao Marco Antônio, pelo atendimento feito com paciência e atenção.

- Agradeço à funcionária da Seção de Pós-Graduação do Departamento de Ciências Biológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP, Margarete Rossi Ferreira, pelo pronto atendimento sempre que necessário e pelas boas risadas em momentos de descontração.

- À Prof<sup>a</sup> Dra. Regina Maria Barreto Cicarelli, da Disciplina de Imunologia do Departamento de Ciências Biológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP – Araraquara, que permitiu que eu utilizasse seu laboratório para que as técnicas de biologia molecular fossem feitas.

- À Prof<sup>a</sup> Dra. Mara Cristina Pinto, da Disciplina de Parasitologia do Departamento de Ciências Biológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP – Araraquara. Muito obrigada “Professora” por estar disposta sempre, por avaliar cuidadosamente meu trabalho, pela sua disposição nos manuscritos em inglês e, é claro, pelos momentos de descontração, como um cafezinho na Parasito no meio do expediente. Serena e amiga, essa é a Prof<sup>a</sup> Mara, com certeza um exemplo profissional a ser seguido.

- À Prof<sup>a</sup> Dra. Márcia Ap. Graminha da Disciplina de Parasitologia Clínica do Departamento de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP – Araraquara, pela convivência no Laboratório de Parasitologia, pelos conselhos profissionais e pessoais, muito obrigada.

- À Therezinha Aparecida Ricci, funcionária da Disciplina de Parasitologia do Departamento de Ciências Biológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP – Araraquara, pelos cuidados aos animais, muito obrigada.

- À amiga Dra. Isabel Martinez da Disciplina de Parasitologia Clínica do Departamento de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP – Araraquara, pelos valiosos ensinamentos, se fosse possível, com certeza seria minha co-orientadora, mulher de fibra e corajosa. Obrigada pela amizade e dedicação, você foi fundamental para o desenvolvimento desse trabalho.

- A uma pessoa muito valiosa, Maria Zenaide Tita Fernandes, funcionária aposentada da Disciplina de Parasitologia do Departamento de Ciências Biológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP – Araraquara, a primeira pessoa que confiou em mim no Laboratório,

com você “Zê” aprendi muito (inocular, fazer repique, cuidar dos animais com carinho e dedicação, entre inúmeras técnicas) muito obrigada por todos os ensinamentos e amizade.

- Aos meus amigos da pós-graduação - UNESP: Cláudia Solano Rocha, Júlio César Miné, Júlio César Rente Ferreira Filho, Renata Tomé Alves, Sueli Gardim e Vagner José Mendonça, aos estagiários de Iniciação Científica Karina Pereira Barbieri, Jader de Oliveira e Juliana Damieli, tenho certeza que juntos formamos uma equipe competente, pois não basta ser bom, o diferencial está no respeito e convivência diária.

- À Dra. Daniela Luz Ambrósio da University of Connecticut Health Center - Department of Genetics and Developmental Biology - Farmington - CT – USA, pelas suas contribuições e ajuda do aprendizado da técnica de Biologia Molecular, muito obrigada.

- Aos meus queridos amigos da pós-graduação (UNICAMP): Alexandra, Carina, Luciana e Rodrigo, muito obrigada a cada um, vocês me ajudaram a superar a saudade de casa, aprendi muito com esses amigos e alunos que, com certeza, serão brilhantes profissionais, adoro vocês.

- À Joselma Gomes Duque Baptista, funcionária do Departamento de Ciências Biológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP - Araraquara, pela convivência diária e amizade.

- Ao Prof. Dr. Adalberto Farache Filho do Departamento de Ciências Biológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP - Araraquara, pelos ensinamentos e amizade.

- À Prof<sup>a</sup> Dra. Maria José Soares Mendes Geannini do Laboratório de Micologia Clínica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP – Araraquara, pela disponibilidade de estrutura laboratorial necessária ao desenvolvimento de parte trabalho.

- A alguns amigos, que diariamente me ajudam, ajuda que vai muito além dos livros, artigos, disciplinas, seminários, congressos e experimentos. Vocês não imaginam como fazem parte desse trabalho, principalmente em dias difíceis, onde o resultado tão esperado do

experimento dá errado e quando por algum motivo me ausentei e algum de vocês me substituiu. Muito obrigada a todos vocês amigos, essa conquista (quem me conhece bem sabe) foi muito difícil, mas sei que é apenas o início de uma longa estrada e, nesse caminho a percorrer quero algumas pessoas especiais ao meu lado, para ter um sorriso verdadeiro em quem confiar ou conselho duro a ouvir... à vocês minha sincera gratidão: Adolfo, Adriana, Alexandra, Carina, Luciana, Maria Fernanda, Renata e Vagner.

- À minha família amada, que é minha base, meus irmãos Regiane e Guinho, que me ajudaram muito, há anos atrás, nos cuidados de minha filha, para que eu pudesse estudar, com certeza sem a ajuda deles não teria concluído a Graduação. À minha mãe Rosângela agradeço sua garra, com ela aprendi a não ter medo de trabalho, a cuidar de minha filha e o mais importante que sou forte e capaz. Ao Norberto, que sempre procurou me ajudar de alguma forma. À minha afilhada Júlia, um anjo em minha vida, seu sorriso me ajuda a ter esperança diante dos obstáculos. À minha filha Amanda, que com certeza foi meu objetivo de vida, por ela busco sempre melhorar como pessoa e profissional, obrigada minha querida e desculpe-me pela ausência. Ao meu marido Eduardo, muito obrigada meu amor por me ajudar sempre, principalmente por cuidar da Amanda quando estou ausente, minha eterna gratidão, te amo. Meu amado pai Antônio, uma estrela que sempre está ao meu lado, independente da situação, lembro-me de suas palavras quando engravidei “filha não se preocupe, só te peço uma coisa ESTUDE”, como sou obediente, depois de 17 anos te dou este presente...TE AMO...meu pai e protetor!

Muito obrigada a todos!

*...o laboratório representa em  
nossa terra uma esperança.  
Dele esperamos esclarecidos os inúmeros problemas de  
patologia tropical, que por aí,  
prevalecem obscuros,  
zombando da sagacidade dos  
observadores e cujas  
incógnitas estão repletas das  
ilações as mais benéficas ao  
nosso bem-estar*

*Carlos Chagas*

## Resumo

A doença de Chagas, assim como seu agente etiológico *Trypanosoma cruzi*, foram descritos por Carlos Ribeiro Justiniano das Chagas. *T. cruzi* é transmitido por hemipteros sendo os gêneros *Panstrongylus*, *Rhodnius* e *Triatoma* os mais importantes. Com resultados bastante satisfatórios em relação ao controle do principal vetor, *T. infestans*, outros triatomíneos de importância secundária, coletados no peridomicílio, passaram a assumir maior relevância, dentre essas espécies, *T. sordida*. As populações de *T. cruzi* apresentam grande variabilidade intraespecífica evidenciada por diferenças na morfologia, na virulência e patogenicidade, na habilidade de evasão à resposta imune do hospedeiro e na constituição antigênica. Essa diversidade pode estar associada à sua adaptação e sobrevivência em diferentes hospedeiros. As diferentes formas de manifestação clínica da doença no homem podem ser associadas com cepas específicas ou com marcadores genéticos do hospedeiro, embora ambos possam influenciar o curso da infecção. Este trabalho objetivou a caracterização biológica, morfológica e molecular de três cepas de *T. cruzi* (SI<sub>5</sub>, SI<sub>8</sub> e SIGR<sub>3</sub>) isoladas de *T. sordida* coletadas em Santo Inácio, Bahia. Desse modo, o estudo biológico indicou que as cepas isoladas de Santo Inácio, pertencem ao Biodema III e Zimodema I. Os resultados das mensurações das cepas SI<sub>5</sub>, SI<sub>8</sub> e SIGR<sub>3</sub> mostraram polimorfismo das formas tripomastigotas sanguíneas, embora com predominância de formas intermediárias para largura do corpo e curtas para comprimento total do corpo no decurso da infecção experimental. Foram avaliados para as formas epimastigotas, parâmetros como comprimento total do corpo, largura e índice nuclear e observamos para as cepas SI<sub>5</sub>, SI<sub>8</sub> e SIGR<sub>3</sub> respectivamente, formas intermediária/intermediária/baixo, curto/intermediário/baixo e curta/larga/baixo para os parâmetros descritos acima. O significado geral desse polimorfismo ainda não foi suficientemente investigado, desconhecendo-se se ele expressa um diferente comportamento biológico das cepas ou se reflete apenas a existência de um “complexo” morfológico. A caracterização molecular das cepas SI<sub>5</sub>, SI<sub>8</sub> e SIGR<sub>3</sub>, as enquadram no grupo II, o que indica, que nesse local circula uma mesma linhagem de *T. cruzi*, apesar das mesmas terem sido isoladas de hospedeiros e épocas distintas.

Palavras-Chaves: *Trypanosoma cruzi*. *Triatoma sordida*. Biologia. Morfologia. Cepas



## Abstract

Chagas disease and its causative agent *Trypanosoma cruzi* were described by Carlos Ribeiro Justiniano das Chagas. *T. cruzi* is transmitted by blood-sucking hemipterous and *Panstrongylus*, *Rhodnius* and *Triatoma* are the most important genera. Satisfactory results were achieved to the control of the main vector, *T. infestans*. However, other bugs of secondary importance, like *Triatoma sordida* collected around the houses began to assume greater epidemiological importance. The populations of *T. cruzi* show great variability among individuals demonstrated by differences in morphology, virulence and pathogenicity, ability to evade the host immune response and antigenic constitution. Such diversity may be associated with their adaptation and survival in different hosts. The course of the infection in human may be associated with specific strains or host genetic markers, although both can influence. This aim of this study was the biological, morphological and molecular characterization of three strains of *T. cruzi* (SI<sub>5</sub>, and SI<sub>8</sub> SIGR<sub>3</sub>) isolated from *T. sordida* collected in Santo Inácio, Bahia. The biological study indicated that the isolates from Santo Inácio, belong to Biodeme III Zimodeme I. The results of measurements of the strains SI<sub>5</sub>, SI<sub>8</sub> SIGR<sub>3</sub> showed polymorphism of blood trypomastigotes, with a predominance of intermediate forms to body width and short length for total body in the course of experimental infection. Parameters such as: total body length, width and nuclear index were evaluated for epimastigotes, and observed for strains SI<sub>5</sub>, SI<sub>8</sub> and SIGR<sub>3</sub> respectively, forms an intermediate / middle / low, short / intermediate / low, short / wide / low for the parameters described above. The general meaning of this polymorphism has not been sufficiently investigated. It is not known if such polymorphism expresses a different biologic behavior of the strains or merely is a result of a "complex" morphology. According to the molecular characterization the strains SI<sub>5</sub>, SI<sub>8</sub> SIGR<sub>3</sub> are in group II, which indicates that in this site it occurs the same lineage of *T. cruzi*, despite their different sources (isolated from different hosts and different times).

**Key-Words:** *Trypanosoma cruzi*. *Triatoma sordida*. Biology. Morphology. Strains

## Lista de Abreviaturas

---

AC: Área do cinetoplasto

AN: Área do núcleo

ANOVA: Análise de Variância

BSA: *Bovine Serum Albumin*

°C: Graus Celsius

CEMIB: Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica

CC: Comprimento da célula sem o flagelo livre

CT: Comprimento total da célula

DNA: Ácido desoxirribonucleico

DNAg: DNA genômico

dNTP: Desoxirribonucleotídeos Fosfatados

DP: Desvio padrão

DTU: *Discret Typing Units*

EDTA: *Ethylene Diamine Tetracetic acid* (ácido etilodiamino tetra-acético)

FL: Flagelo livre

g: força da gravidade

GPI: Glicosil-fosfatidil-inositol

gp: Glicoproteínas

H<sub>2</sub>O: Água

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

IN (PN/NA): Índice nuclear

Kb: Kilobase (1000 pares de bases)

kDNA: DNA do cinetoplasto

KCl: Cloreto de potássio

LC: Largura da célula

LiCl: Cloreto de lítio

LIT: *Liver Infusion Tryptose*

M: Molar

mL: Mililitro

mM: Milimolar

$\mu$ M: Micromolar

MCl<sub>2</sub>: Cloreto de magnésio

Mlog: Média logarítmica

NA: Distância da extremidade anterior ao núcleo

NaAc: Ácido acético

NaCl: Cloreto de sódio

ng: Nanogramas

nm: Nanômetros

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>: *Disodium Hydrogen Phosphate* (fosfato de sódio)

OMS: Organização Mundial da Saúde

pb: Pares de bases

PCR: Reação em cadeia da polimerase

PM: Marcador de peso molecular

PN: Distância da extremidade posterior ao núcleo

RFLP: *Restriction Fragment Length Polymorphism*

rDNA: DNA ribossomal

RPM: Rotações por minuto

SI: Santo Inácio

TA: Temperatura ambiente

Taq DNA polimerase: *High Fidelity PCR Enzyme Mix*

TcI: *Trypanosoma cruzi* I

TcII: *Trypanosoma cruzi* II

Tc Tox: Proteína presente em *Trypanosoma cruzi*

Tris-HCl: Tris-Ácido clorídrico

U: Unidade

UV: Luz ultravioleta

Z1, Z2 e Z3: Principais Zimodemas

## Lista de Figuras

---

|                                                                                                                                                                        |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1. Ciclo biológico de <i>Trypanosoma cruzi</i> .....                                                                                                            | 5  |
| Figura 2. Distrito de Santo Inácio.....                                                                                                                                | 13 |
| Figura 3. Exemplar de <i>Triatoma sordida</i> .....                                                                                                                    | 14 |
| Figura 4. Seleção da imagem.....                                                                                                                                       | 16 |
| Figura 5. Mensuração do comprimento do corpo e comprimento total do corpo .....                                                                                        | 17 |
| Figura 6. Mensuração da distância da extremidade anterior e posterior ao núcleo.....                                                                                   | 17 |
| Figura 7. Mensuração da largura do corpo e área do núcleo .....                                                                                                        | 18 |
| Figura 8. Mensuração do cinetoplasto.....                                                                                                                              | 18 |
| Figura 9. Curvas parasitêmicas (C <sub>1</sub> , C <sub>2</sub> , C <sub>3</sub> , C <sub>4</sub> , C <sub>5</sub> ) cepa SI <sub>5</sub> de <i>T. cruzi</i> .....     | 28 |
| Figura 10. Curvas parasitêmicas (C <sub>1</sub> , C <sub>2</sub> , C <sub>3</sub> , C <sub>4</sub> , C <sub>5</sub> ) cepa SI <sub>8</sub> de <i>T. cruzi</i> .....    | 29 |
| Figura 11. Curvas parasitêmicas (C <sub>1</sub> , C <sub>2</sub> , C <sub>3</sub> , C <sub>4</sub> , C <sub>5</sub> ) cepa SIGR <sub>3</sub> de <i>T. cruzi</i> . .... | 29 |
| Figura 12. Comparação dos valores parasitêmicos. ....                                                                                                                  | 30 |
| Figura 13: Fotomicrografias das formas tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> .....                                                                                        | 30 |
| Figura 14: Fotomicrografias das formas tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> .....                                                                                        | 31 |
| Figura 15: Fotomicrografias das formas tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> .....                                                                                        | 31 |
| Figura 16. Fotomicrografias referentes às formas tripomastigotas da cepa SI <sub>5</sub> de <i>T. cruzi</i> . ....                                                     | 32 |
| Figura 17. Fotomicrografias referentes às formas tripomastigotas da cepa SI <sub>8</sub> de <i>T. cruzi</i> . ....                                                     | 33 |
| Figura 18. Fotomicrografias referentes às formas tripomastigotas da cepa SIGR <sub>3</sub> de <i>T. cruzi</i> . ....                                                   | 34 |
| Figura 19. Resultado da morfometria de formas tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> . ....                                                                                | 37 |
| Figura 20: Diversidade morfológica em formas epimastigotas.....                                                                                                        | 39 |
| Figura 21. Fotomicrografias referentes às formas epimastigotas da cepa SI <sub>5</sub> de <i>T. cruzi</i> .....                                                        | 40 |

|                                                                                                               |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 22. Fotomicrografias referentes às formas epimastigotas da cepa SIGR <sub>3</sub> de <i>T. cruzi</i> . | 41 |
| Figura 23. Fotomicrografias referentes às formas epimastigotas da cepa SI <sub>8</sub> de <i>T. cruzi</i> .   | 42 |
| Figura 24. Resultado da morfometria de formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i> .                              | 45 |
| Figura 25: Formas amastigotas da cepa SI <sub>8</sub> de <i>T. cruzi</i> em monócito de camundongo.           | 46 |
| Figura 26. Formas amastigotas livres da cepa SI <sub>8</sub> de <i>T. cruzi</i> .                             | 46 |
| Figura 27. Forma amastigota da cepa SI <sub>8</sub> de <i>T. cruzi</i> em eosinófilo de camundongo.           | 47 |
| Figura 28. Forma amastigota da cepa SI <sub>8</sub> de <i>T. cruzi</i> em neutrófilo de camundongo.           | 47 |
| Figura 29. Forma amastigota da cepa SI <sub>8</sub> de <i>T. cruzi</i> em monócito de camundongo.             | 47 |
| Figura 30. Diferentes células durante infecção chagásica experimental por <i>T. cruzi</i> .                   | 48 |
| Figura 31. Dimorfismo genético do gene 24 Sα do rRNA e GPI de <i>T. cruzi</i> .                               | 49 |
| Figura 32. Dimorfismo genético do gene HSP60 de <i>T. cruzi</i> .                                             | 50 |
| Figura 33. Dimorfismo genético do gene 24 Sα do rRNA de <i>T. cruzi</i> .                                     | 50 |
| Figura 34. Dimorfismo genético do gene GPI de <i>T. cruzi</i> .                                               | 51 |
| Figura 35. Dimorfismo genético do gene HSP60 de <i>T. cruzi</i> .                                             | 51 |
| Figura 36. Cortes histológicos de coração.                                                                    | 52 |
| Figura 37. Cortes histológicos de baço.                                                                       | 53 |
| Figura 38. Cortes histológicos de fígado.                                                                     | 53 |
| Figura 39. Cortes histológicos de músculo esquelético.                                                        | 53 |

## Lista de Tabelas

---

|                                                                                                                                           |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela 1. Características biológicas da cepa SIGR <sub>3</sub> de <i>T. cruzi</i> .....                                                   | 26 |
| Tabela 2. Características biológicas da cepa SI <sub>5</sub> de <i>T. cruzi</i> .....                                                     | 27 |
| Tabela 3. Características biológicas da cepa SI <sub>8</sub> de <i>T. cruzi</i> .....                                                     | 27 |
| Tabela 4. Características biológicas das cepas SI <sub>5</sub> , SI <sub>8</sub> e SIGR <sub>3</sub> de <i>T. cruzi</i> .....             | 27 |
| Tabela 5. Características morfométricas e biológicas das cepas SI <sub>5</sub> , SI <sub>8</sub> e SIGR <sub>3</sub> de <i>T. cruzi</i> . | 35 |
| Tabela 6. Análise morfométrica de formas tripomastigotas da cepa SI <sub>5</sub> de <i>T. cruzi</i> .....                                 | 35 |
| Tabela 7. Análise morfométrica de formas tripomastigotas da cepa SI <sub>8</sub> de <i>T. cruzi</i> .....                                 | 36 |
| Tabela 8. Análise morfométrica de formas tripomastigotas da cepa SIGR <sub>3</sub> de <i>T. cruzi</i> .....                               | 36 |
| Tabela 9. Parâmetros morfométricos médios das formas tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> .....                                             | 36 |
| Tabela 10. Parâmetros morfométricos médios das formas de tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> . ....                                        | 37 |
| Tabela 11. Análise estatística (ANOVA) .....                                                                                              | 38 |
| Tabela 12. Análise morfométrica de formas epimastigotas da cepa SI <sub>5</sub> de <i>T. cruzi</i> .....                                  | 43 |
| Tabela 13. Análise morfométrica de formas epimastigotas da cepa SI <sub>8</sub> de <i>T. cruzi</i> .....                                  | 43 |
| Tabela 14. Análise morfométrica de formas epimastigotas da cepa SIGR <sub>3</sub> de <i>T. cruzi</i> .....                                | 44 |
| Tabela 15. Parâmetros morfométricos médios das formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i> .....                                              | 44 |
| Tabela 16. Análise estatística (ANOVA) .....                                                                                              | 45 |

# Sumário

---

|                                                                                |      |
|--------------------------------------------------------------------------------|------|
| Resumo.....                                                                    | xii  |
| Abstract.....                                                                  | xiii |
| Lista de abreviaturas.....                                                     | xiv  |
| Lista de figuras.....                                                          | xvii |
| Lista de tabelas.....                                                          | xix  |
| 1. Introdução.....                                                             | 1    |
| 2. Revisão da Literatura.....                                                  | 4    |
| 2.1 Ciclo de Vida.....                                                         | 4    |
| 2.1 Interação Parasito- Célula Hospedeira .....                                | 5    |
| 2.2 Vetores da doença de Chagas .....                                          | 7    |
| 2.3 <i>Trypanosoma cruzi</i> .....                                             | 8    |
| 3. Objetivos.....                                                              | 12   |
| 4. Material e Métodos.....                                                     | 13   |
| 4.1 Isolamento do Parasito: .....                                              | 13   |
| 4.2 Meio de Cultura.....                                                       | 14   |
| 4.3 Inoculação e Crescimento.....                                              | 15   |
| 4.4 Fixação, Coloração e Mensuração de <i>T. cruzi</i> .....                   | 15   |
| 4.5 Estudo de formas amastigotas em camundongo BALB/c .....                    | 18   |
| 4.6 Animais Utilizados .....                                                   | 19   |
| 4.7 Caracterização Biológica.....                                              | 19   |
| 4.8 Estudo Histopatológico .....                                               | 21   |
| 4.9 Caracterização Molecular .....                                             | 21   |
| 4.9.1 Extração do DNA Genômico de <i>T. cruzi</i> .....                        | 21   |
| 4.9.2 Amplificação dos Genes 24Sα rRNA, HSP60 e GPI de <i>T. cruzi</i> .....   | 22   |
| 4.10 Análise estatística .....                                                 | 25   |
| 5. Resultados.....                                                             | 26   |
| 5.1 Caracterização Biológica.....                                              | 26   |
| 5.1.1 Perfil Parasitêmico.....                                                 | 28   |
| 5.2 Caracterização de Formas Tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> .....          | 30   |
| 5.2.1 Caracterização de Formas Epimastigotas de <i>T. cruzi</i> .....          | 38   |
| 5.3 Estudo de formas amastigotas em camundongos BALB/c.....                    | 46   |
| 5.4 Células observadas durante infecção experimental por <i>T. cruzi</i> ..... | 48   |



|     |                                                          |    |
|-----|----------------------------------------------------------|----|
| 5.5 | Caracterização Molecular .....                           | 48 |
| 5.6 | Estudo Histopatológico .....                             | 52 |
| 6.  | Discussão .....                                          | 54 |
| 6.1 | Estudo Biológico .....                                   | 54 |
| 6.2 | Estudo Morfológico .....                                 | 57 |
| 6.3 | Estudo de formas amastigotas em camundongos BALB/c ..... | 61 |
| 6.4 | Estudo Histopatológico .....                             | 62 |
| 6.5 | Estudo Molecular .....                                   | 63 |
| 7.  | Conclusões .....                                         | 65 |
| 8.  | Referências Bibliográficas .....                         | 66 |
| 9.  | Anexos .....                                             | 78 |

# 1. Introdução

---

A doença de Chagas ou tripanossomíase americana, assim como seu agente etiológico, o protozoário *Trypanosoma cruzi* foram descritos por Carlos Ribeiro Justiniano das Chagas em Lassance, Minas Gerais, em 1909 (CHAGAS, 1909). *T. cruzi* é transmitido por hemípteros da família Reduviidae sendo os gêneros *Panstrongylus*, *Rhodnius* e *Triatoma* os mais importantes (CHAGAS, 1935).

Essa nosologia apresenta uma fase aguda, de curta duração, que na maioria dos pacientes progride para uma fase crônica. A fase aguda é geralmente assintomática, entretanto em 10% dos casos os sinais clínicos começam 6 a 10 dias após a infecção e se caracterizam por um quadro febril passageiro e inespecífico, linfadenopatia, esplenomegalia branda e, mais raramente, uma intensa miocardite (RASSI et al., 2000). Essa fase se resolve espontaneamente em quatro a oito semanas. Entretanto, alguns pacientes, principalmente crianças ou indivíduos imunodeficientes, podem apresentar quadros meníngeos graves e insuficiência cardíaca que podem levar ao óbito (SILVA et al., 2006).

Dependendo da região geográfica, cerca de 60% a 70% dos pacientes infectados são assintomáticos, caracterizando a forma indeterminada da doença. Entretanto, 20% a 35% dos indivíduos infectados podem desenvolver lesões irreversíveis no sistema nervoso, coração, esôfago e cólon na fase crônica da infecção (STEINDEL et al., 2008).

A causa dessa variabilidade em relação aos sintomas clínicos da doença não é conhecida. Sabe-se que a severidade e os sintomas variam em diferentes regiões geográficas e que tais variabilidades podem ser resultantes tanto da heterogeneidade entre isolados do parasito como da resposta imune do hospedeiro (SOUTO et al., 1996).

A enfermidade representa importante problema médico e social nos países afetados. Em alguns deles, a extensão da doença segue desconhecida e programas de controle não foram implantados, mas, em outros, a endemia foi efetivamente minimizada mercê de controle e mudanças sociais e econômicas (DIAS, 2000).

Nos países da América Latina, a doença de Chagas é uma importante morbidade que afeta aproximadamente 10 milhões de pessoas e representa um risco para 25 milhões da população

latino americana, desde o sul dos Estados Unidos até o sul da Argentina. Estima-se que a doença de Chagas em 2008 matou mais de 10.000 pessoas. Essa nosologia ocorre, principalmente, na América Latina. No entanto, nas últimas décadas a doença é cada vez mais detectada nos Estados Unidos da América, Canadá, muitos países europeus e alguns países do Pacífico Ocidental. Isto se deve principalmente à mobilidade populacional entre a América Latina e o resto do mundo. Menos freqüentemente por transfusão de sangue, transmissão vertical (da mãe infectada para o filho) ou doação de órgãos (WHO, 2010).

A estimativa da existência de pessoas infectadas por *T. cruzi* em países não endêmicos é decorrente principalmente da emigração e da falta de triagem em bancos de doação de sangue. Esse fato é observado em países como os Estados Unidos, onde se supõe que vivam entre 100.000 e 370.000 pessoas infectadas; no Japão, cerca de 150.000; na Austrália, por volta de 80.000; e, na Europa, em torno de 250.000. A transfusão de sangue pode ser considerada o segundo mecanismo mais importante de transmissão da doença de Chagas, representando de 12 a 20% das infecções (SCHMUNIS, 1991; 2000).

No Brasil, a criação da Iniciativa Cone Sul em 1991 foi estimulada pelos dados obtidos a partir de inquéritos entomológicos e de soro-prevalência na população, quando se delimitou uma área de risco de transmissão domiciliar de 36% e uma taxa de prevalência de 4,2% na população rural. A estratégia dos países participantes - Argentina, Bolívia, Brasil, Chile, Paraguai e Uruguai - foi o combate ao principal vetor, *Triatoma infestans*, além da redução do risco de transmissão por transfusão sanguínea (VINHAES; DIAS, 2000).

Dias (2000) avaliou que a incidência de doença de Chagas no Brasil decresceu drasticamente e que o mais importante foi o efetivo controle de sua transmissão natural em âmbito nacional. “O panorama futuro da doença de Chagas humana se desenha otimista, caso se mantiverem minimamente ativos e adequados os programas nacionais já em curso, especialmente se as atuais iniciativas de ampliação e sustentação desses programas, em nível do Cone Sul, do Pacto Andino e da região do México e América Central, cumprirem o seu papel”.

Os casos de doença de Chagas humana no Brasil estão distribuídos em uma área de três milhões de quilômetros quadrados, sendo 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. Na Região Amazônica, já foram detectados

focos de transmissão vetorial no Pará, no Amapá e no Alto Rio Negro (SILVEIRA; REZENDE, 1994; DIAS et al., 2009; BOZELLI et al., 2006).

Casos humanos de transmissão oral da doença de Chagas tem sido notificados nos Estados da Bahia, Ceará, Piauí, Rio Grande do Sul, Santa Catarina e São Paulo, com maior frequência de casos e surtos registrados nos seguintes Estados da Amazônia Legal: Amazonas, Maranhão, Mato Grosso, Amapá, Pará e Tocantins. A transmissão do *T. cruzi* por via oral geralmente ocorre no ciclo endêmico, por meio da ingestão por mamíferos susceptíveis de vetores e reservatórios infectados. O homem pode ser contaminado no momento em que ingere alimentos contaminados com o parasito, principalmente a partir de triatomíneos ou de suas dejeções. (DIAS, 2006; MAEGAWA et al., 2003; OMS, 2009).

Dias (2006) refere que os casos de transmissão oral da doença predominam em determinados períodos do ano, onde o clima quente favorece a atividade biológica dos triatomíneos. Na Amazônia, 70% das micro-epidemias registradas até 2005, ocorreram de agosto a dezembro, período que favorece maior atividade biológica dos vetores em ecótopos naturais e artificiais.

## 2. Revisão da Literatura

---

### 2.1 Ciclo de Vida

*T. cruzi* é um protozoário flagelado da Ordem Kinetoplastida, Família Trypanosomatidae, caracterizado pela existência de um único flagelo e de cinetoplasto, que se localiza dentro do sistema mitocondrial. O cinetoplasto possui uma estrutura filamentosa formada por ácido desoxirribonucléico ou DNA (kDNA) que possui cerca de 20 a 25% do DNA celular (TELLERIA et al., 2006).

Durante o ciclo de vida, *T. cruzi* apresenta-se sob três formas distintas dependendo do hospedeiro em que se encontre. Nos mamíferos são observadas as formas amastigotas intracelulares e tripomastigotas sanguíneas, enquanto nos hospedeiros invertebrados ocorrem as formas epimastigotas e tripomastigotas metacíclicas (TYLER e ENGMAN, 2001).

*T. cruzi* apresenta ciclo de vida heteroxeno alternado entre hospedeiros invertebrados (triatomíneos), que atuam como vetores do parasito e uma grande variedade de vertebrados mamíferos. Durante o ciclo no hospedeiro invertebrado, que se infecta pela ingestão de sangue de animais infectados durante o repasto sanguíneo, as formas tripomastigotas de *T. cruzi* ficam arredondadas no estômago e originam as formas esferomastigotas. Essas se transformam em epimastigotas ainda no estômago e aderem à superfície do intestino médio e posterior, multiplicando-se intensamente. Posteriormente, os epimastigotas migram 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).

No momento em que as formas infectantes são depositadas na pele dos hospedeiros mamíferos, elas encontram as primeiras barreiras do sistema imune inato, como a pele e a mucosa (KIPNIS e DA SILVA, 1989). No hospedeiro vertebrado, os tripomastigotas infectam as células e diferenciam-se em amastigotas, uma forma proliferativa intracelular. Posteriormente, as

amastigotas se diferenciam em formas tripomastigotas, as quais rompem as células hospedeiras e atingem a corrente sanguínea podendo infectar novas células do hospedeiro ou serem ingeridas por triatomíneos na ocasião de um novo repasto. Dentro do inseto vetor, os parasitos transformam-se em epimastigotas, reiniciando o ciclo (TYLER e ENGMAN, 2001).

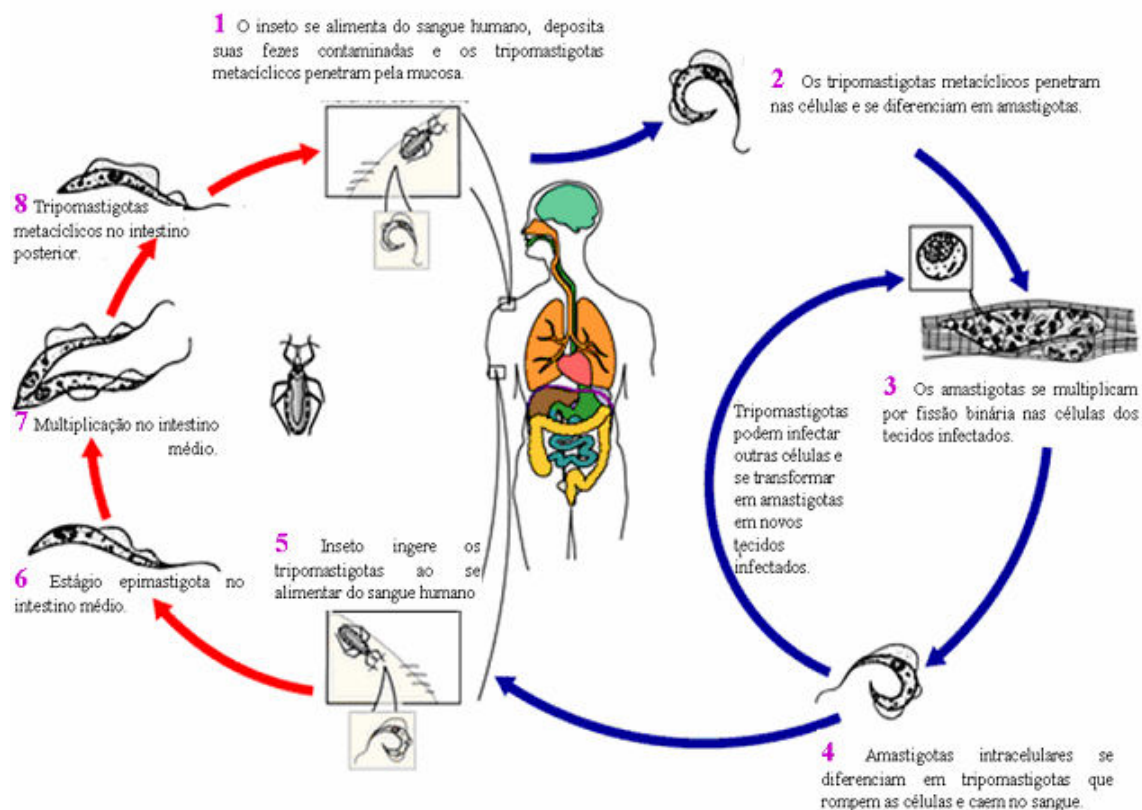


Figura 1. Ciclo biológico de *Trypanosoma cruzi* (Modificado de CDC, 2009).

## 2.1 Interação Parasito- Célula Hospedeira

A infecção natural por *T. cruzi* ocorre por meio de penetração do parasito na pele lesionada ou mucosa íntegra. Ao completar o ciclo de replicação intracelular após 3-5 dias, formas tripomastigotas são liberadas na corrente sanguínea e invadem rapidamente as células hospedeiras (BURLEIGH e WOOLSEY, 2002).

A fase inicial do processo de interação *T. cruzi*-célula hospedeira envolve adesão do parasito à superfície da célula, decorrente de um processo de reconhecimento celular em que moléculas presentes na membrana plasmática do parasito e da célula hospedeira estão envolvidas

(YOSHIDA, 2006). Algumas moléculas de superfície envolvidas no processo de adesão foram descritas nas formas tripomastigotas metacíclicas do *T. cruzi*, como as glicoproteínas gp82, gp35/50 e gp90, as quais reconhecem receptores celulares ainda desconhecidos (YOSHIDA et al., 1990; RAMIREZ et al., 1993; PREVIATO et al., 1994).

Uma segunda glicoproteína ancorada por GPI à superfície do parasito é a gp35/50, que é uma glicoproteína O-glicosilada rica em treonina, serina e prolina, sendo enquadrada no grupo das mucinas. Ela é expressa em formas tripomastigotas metacíclicas e epimastigotas de *T. cruzi* (PREVIATO et al., 1994).

Estudos com formas tripomastigotas de várias cepas de *T. cruzi* revelaram a existência de dois grupos distintos de parasitos, que se diferenciam quanto à expressão de glicoproteínas de superfície e capacidade de invasão de células de mamíferos. Cepas altamente invasivas ligam-se à superfície da célula hospedeira por meio da glicoproteína gp82 (YOSHIDA, 2006).

Outra glicoproteína envolvida na invasão celular é glicoproteína gp90, que modula negativamente a entrada do parasito na célula hospedeira (YOSHIDA et al., 1990). Gp90 é uma glicoproteína ancorada por GPI à superfície do parasito, capaz de se ligar em células de mamíferos. A expressão de gp90 varia entre diferentes cepas de *T. cruzi* e sua expressão está inversamente correlacionada com a capacidade de invasão do parasito às células de mamíferos em cultura, uma vez que cepas com menor capacidade infectiva expressam grandes quantidades de gp90 (RUIZ, 1998; YOSHIDA, 2006).

À medida que o parasito penetra a célula, o mesmo vai sendo envolvido por uma membrana inicialmente proveniente da membrana plasmática em células fagocíticas (SCHENKMAN et al., 1988) e em células não-fagocíticas o parasito é envolvido por uma membrana oriunda da membrana dos lisossomos (ANDREWS et al., 1990; TARDIEUX et al., 1992). No decorrer do processo, o vacúolo se funde com organelas do sistema endolisossomal da célula hospedeira. A exposição das formas tripomastigotas ao ambiente ácido no interior do vacúolo é requerido para a secreção e atividade da proteína TcTox, que tem capacidade de incorporar-se à membrana do vacúolo parasitóforo, levando a destruição da membrana vacuolar e, conseqüentemente, liberação do parasito para o citoplasma (ANDREWS et al., 1990). O meio ácido possui papel importante no início da diferenciação de formas tripomastigotas em amastigotas. Esse processo se inicia no vacúolo e termina no citoplasma (TANOWITZ et al., 1992; KIRCHHOFF, 1996; BURLEIGH e WOOLSEY, 2002).

Após a completa diferenciação em formas amastigotas, *T. cruzi* se multiplica sucessivas vezes e em seguida se diferencia novamente em tripomastigotas. Acredita-se que a grande motilidade e a secreção de enzimas pelas formas tripomastigotas levem ao rompimento da membrana plasmática e posterior liberação das formas tripomastigotas para o meio extracelular, tornando-os capazes de infectar novas células (BRENER, 1973).

## 2.2 Vetores da doença de Chagas

Os triatomíneos estão distribuídos essencialmente no Continente Americano e apresentam 144 espécies descritas até o momento (GALVÃO et al., 2003; FORERO et al., 2004; POINAR et al., 2005; COSTA et al., 2006; GALVÃO e ANGULO, 2006; BÉRENGER e BLANCHET, 2007; COSTA e FELIX, 2007; MARTÍNEZ et al., 2007; SANDOVAL et al., 2007; JUBERG et al., 2009). No Brasil são encontradas 52 espécies, mas apenas cinco dessas, *Panstrongylus megistus*, *Triatoma brasiliensis*, *Triatoma infestans*, *Triatoma pseudomaculata* e *Triatoma sordida* possuem maior importância em termos epidemiológicos pelo fato de colonizarem no peri ou intradomicílio. As 47 espécies não domiciliadas promovem a circulação de *T. cruzi* em mamíferos que vivem em ambientes silvestres (COURA e DIAS, 2009).

O controle da transmissão vetorial da doença de Chagas no Estado de São Paulo, Brasil, teve início em 1950 com as atividades dirigidas ao combate do principal vetor *T. infestans*. Essa espécie, estritamente domiciliada, foi controlada no Brasil, Chile e Uruguai e a erradicação está progredindo em outros países da América do Sul (COURA e DIAS, 2009), entretanto nos Estados da Bahia e do Rio Grande do Sul ainda encontra-se em residências, embora com baixa densidade (MONCAYO e SILVEIRA, 2009).

Algumas espécies como *P. megistus*, *T. brasiliensis* e *T. sordida* podem invadir residências, assim como podem ser encontradas no peridomicílio, podendo ser carregadas passivamente pelos homens por meio da lenha ou, mesmo, por cobertura vegetal de casas e anexos (DIAS, 2000).

Com os resultados bastante satisfatórios em relação ao controle de *T. infestans*, outros triatomíneos de importância secundária, coletados no peridomicílio, passaram a assumir maior relevância. Dentre as espécies de triatomíneos descritas, *T. sordida* tem sido encontrada em



cidades do Estado de São Paulo, como as cidades de Ribeirão Preto, São José do Rio Preto e Araçatuba (SILVA et al., 2003). Alguns autores também descrevem a presença desses vetores em localidades do Estado da Bahia, como as de Santo Inácio (CERQUEIRA et al., 1998).

A presença de colônias de *T. sordida* no peridomicílio pode sinalizar uma iminente colonização dessa espécie em futuro próximo, caso as medidas de controle sejam descontinuadas. Certamente a falta de cuidado do morador e a não notificação da ocorrência desses insetos pela população são fatores que podem contribuir com o aumento desses vetores (SILVA et al., 2003).

Pelli et al. (2007) estudaram populações de *T. sordida* no Triângulo Mineiro e os resultados mostraram que essa espécie é a mais freqüente em Uberaba – MG. Em 2007, Oliveira e Silva analisaram a distribuição geográfica de triatomíneos sinantrópicos no Estado de Goiás e demonstraram a presença de exemplares de *T. sordida* no peri e intradomicílio.

Programas de controle na América Latina têm focado o uso de inseticidas em casas e anexos, com o intuito de interromper o ciclo doméstico e peridoméstico de transmissão, envolvendo vetores, reservatórios animais e humanos. Combinado ao uso de inseticidas é importante que se realize atividades de educação sanitária para que o controle desses vetores seja eficaz (MONCAYO e SILVEIRA, 2009).

Buscando racionalizar as operações de controle dos vetores de *T. cruzi*, é fundamental que se conheça a dinâmica populacional de cada uma das espécies envolvidas (SILVEIRA e COSTA, 2000). Questões como atividade sazonal, razão sexual, mobilidade, resposta comportamental a inseticidas, tempo de defecação após repasto, em função da fonte alimentar devem ser esclarecidas, visando assim criar condições favoráveis à erradicação dos vetores de uma das moléstias que produz o maior ônus de enfermidade entre as denominadas doenças tropicais (PELLI et al., 2007).

## 2.3 *Trypanosoma cruzi*

*T. cruzi* apresenta um ciclo de vida complexo, que inclui diferentes estágios no vetor invertebrado e no hospedeiro vertebrado. As formas epimastigotas e tripomastigotas metacíclicas são encontradas no vetor, enquanto as formas tripomastigotas sanguíneas e amastigotas intracelulares no vertebrado. A transição entre uma forma e outra envolve modificações morfológicas, na expressão gênica e no ciclo celular (HEATH et al., 1990).

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).

As populações de *T. cruzi* apresentam grande variabilidade intraespecífica evidenciada por diferenças na morfologia, na virulência e patogenicidade, na habilidade de evasão à resposta imune do hospedeiro, na sensibilidade aos fármacos, na constituição antigênica e nas propriedades bioquímicas (FERNANDES et al., 1998; TIBAYRENC e AYALA, 2002). Essa diversidade pode estar associada à sua adaptação e sobrevivência em diferentes hospedeiros (ZINGALES et al., 1997). As diferentes formas de manifestação clínica da doença no homem podem ser associadas com cepas específicas ou com marcadores genéticos do hospedeiro, embora ambos possam influenciar o curso da infecção (STURM et al., 2003).

Andrade (1974) classificou as diferentes cepas de *T. cruzi* em três Biodemas, segundo alguns parâmetros biológicos como a morfologia de tripomastigotas (delgada ou larga), a curva parasitêmica, o período pré-patente, a evolução da infecção, o histotropismo, as lesões histopatológicas e o índice de mortalidade.

Os primeiros estudos que demonstraram a grande diversidade genética de *T. cruzi* foram realizados por Miles et al. no final da década de 1970. Esses autores analisaram o polimorfismo dos perfis eletroforéticos de seis enzimas e sugeriram uma classificação em três grupos distintos, os quais foram denominados zimodemas Z1, Z2 e Z3 (MILES et al., 1977, 1978, 1980). Estudos epidemiológicos mostraram que Z1 e Z3 estão associados às cepas que circulam no ciclo silvestre e Z2 àquelas que circulam no ciclo de transmissão doméstico (MILES et al., 1978, 1980; BARRET et al., 1980). Esses três zimodemas principais (Z1, Z2 e Z3) apresentaram diferenças em relação à associação hospedeiro-vetor, assim como em sua distribuição geográfica que pode estar relacionada às diversas formas clínicas da doença (LUQUETTI et al., 1986; DE SOUZA et al., 2000).

Apesar da elevada diversidade genética evidenciada pelas técnicas mencionadas, a análise de sequências com taxa de evolução menor mostrou um claro dimorfismo entre as cepas. Souto et al. (1996) demonstraram que a amplificação de uma região do espaçador não transcrito do gene do mini-éxon e da região divergente correspondente ao terminal 3' do gene 24 Sα rDNA produzia uma clara divisão das cepas de *T. cruzi* em duas linhagens. Os autores observaram uma associação entre as cepas que produziam fragmentos de DNA amplificados de 125 pb e 300 pb,

sendo assim designadas linhagem 1. Da mesma forma, foi observada uma correlação entre as cepas que geravam fragmentos de DNA amplificados de 110 pb e 350 pb, denominadas linhagem 2.

Com o objetivo de padronizar a nomenclatura das duas linhagens principais de *T. cruzi* definidas por várias metodologias, em 1999 durante o Simpósio Internacional Comemorativo da Descoberta da Doença de Chagas foi adotada a subdivisão da espécie *T. cruzi* em duas linhagens principais, denominadas *T. cruzi* I (TcI) e *T. cruzi* II (TcII) (ANONYMOUS, 1999). Posteriormente, baseado em análises de outros marcadores genéticos, foi proposta a subdivisão do grupo TcII em cinco subgrupos, denominados TcIIa-TcIIe (BRISSE et al., 2000; 2001).

Recentemente, foi proposta uma revisão da nomenclatura, onde cada subgrupo passou a ser classificado como um grupo independente, referido como DTU (*Discrete Typing Units*) (ZINGALES et al., 2009). Os grupos TcI e TcIIb correspondem, respectivamente, aos grupos TcI e TcII originalmente recomendados durante o Simpósio Internacional Comemorativo da Descoberta da Doença de Chagas. Propõe-se ainda que os subgrupos TcIIa, TcIIc, TcIId e TcIIe sejam denominados TcIV, TcIII, TcV e TcVI respectivamente (ZINGALES et al., 2009).

Especula-se que TcI e TcII sejam grupos ancestrais, que deram origem a TcIII e TcIV por meio de um evento de hibridização, sendo que TcII e TcIII originaram TcV e TcVI também pelo mesmo fenômeno biológico (hibridização) (MACHADO e AYALA, 2001; BRISSE et al., 2000; WESTENBERGER et al., 2005).

Com base em características epidemiológicas dos grupos TcI e TcII, foi possível associar cepas do grupo TcI ao ciclo de transmissão silvestre e cepas do grupo TcII ao ciclo de transmissão doméstico (ANONYMOUS, 1999). Em países do Cone Sul, isolados do grupo TcII são os principais responsáveis pelas manifestações clínicas da doença de Chagas. Entretanto, em países ao norte da Bacia Amazônica, como Venezuela e México, infecções humanas por *T. cruzi* estão comumente associadas ao grupo TcI (MILES et al., 1981; BOSSENSO et al., 2002).

Na natureza, verifica-se que espécies hospedeiras de *T. cruzi* podem ser infectadas por múltiplos contatos com diferentes triatomíneos e esses podem alimentar-se em diferentes espécies hospedeiras infectadas. Esse comportamento propicia a formação de populações de cepas multiclonais, tanto nas espécies hospedeiras quanto nos vetores (TORRES et al., 2004).

Análises de microssatélites permitem verificar se uma determinada cepa de *T. cruzi* é constituída por um único clone (monoclonal) ou por mais de um clone (multiclonal). A utilização

dessa técnica tem demonstrado que a porcentagem de populações multiclonais diminui quando cepas isoladas do ciclo silvestre são comparadas com cepas isoladas de pacientes. Isso sugere que o homem atua como filtro biológico ao selecionar populações mais adaptadas a se desenvolverem no seu organismo (OLIVEIRA et al., 1998; 1999; MACEDO et al, 2001).

O conhecimento a cerca da biologia do protozoário *T. cruzi* poderá trazer informações importantes acerca da patogênese da doença de Chagas no Distrito de Santo Inácio. Este trabalho, portanto, tem o intuito de contribuir para ampliar o conhecimento sobre as populações de *T. cruzi*, bem como de fomentar um controle mais efetivo da infecção chagásica na citada região. Propõe-se dessa forma a caracterização biológica, morfológica e molecular de três cepas isoladas de *Triatoma sordida* no Estado da Bahia.

### 3. Objetivos

---

- ✓ Estabelecer o perfil parasitêmico e verificar o comportamento biológico em camundongos da linhagem BALB/c das cepas SI<sub>5</sub> e SI<sub>8</sub> isoladas a partir de *T. sordida* e SIGR<sub>3</sub> isolada por meio de xenodiagnóstico artificial aplicado em gato;
- ✓ Avaliar a morfologia das formas tripomastigotas das cepas SI<sub>5</sub>, SI<sub>8</sub> e SIGR<sub>3</sub> de *T. cruzi* observadas no sangue de camundongos BALB/c;
- ✓ Avaliar a morfologia das formas epimastigotas das cepas SI<sub>5</sub>, SI<sub>8</sub> e SIGR<sub>3</sub> de *T. cruzi* mantidas em meio de cultura LIT;
- ✓ Efetuar estudo histopatológico no decurso das fases aguda e crônica da infecção experimental em camundongos BALB/c infectados com as cepas SI<sub>5</sub>, SI<sub>8</sub> e SIGR<sub>3</sub> de *T. cruzi*;
- ✓ Caracterizar as cepas SI<sub>5</sub>, SI<sub>8</sub> e SIGR<sub>3</sub> de *T. cruzi* por meio da sequência dos genes 24S $\alpha$  do RNA ribossomal, HSP60 e GPI.

## 4. Material e Métodos

---

### 4.1 Isolamento do Parasito:

As cepas SI<sub>5</sub> e SI<sub>8</sub> foram isoladas a partir de fezes de ninfas e adultos de *T. sordida*, capturados no peridomicílio por ROSA et al. (2004) em Santo Inácio, município de Gentio do Ouro, no Estado da Bahia ( 11° 25' 57'' S e 42 ° 30' 25'' O). A cepa SIGR<sub>3</sub> foi isolada em 2007 a partir de xenodiagnóstico aplicado a um gato no peridomicílio por ROSA et al. (BASSI, 2007) na mesma localidade das cepas SI<sub>5</sub> e SI<sub>8</sub>. O isolamento das cepas SI<sub>5</sub>, SI<sub>8</sub> e SIGR<sub>3</sub> foi realizado no laboratório de Parasitologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP-ARARAQUARA, por meio de fezes obtidas da compressão abdominal dos triatomíneos. Em seguida, o material foi diluído com salina 0,9 % e observado entre lâmina e lamínula em microscopia óptica comum. A amostra positiva (0,3 mL) foi inoculada intraperitonealmente em camundongos Swiss de 23 a 35 dias de idade e em meio de cultura LIT (*liver infusion tryptose*) para isolamento do parasito.



Figura 2. Distrito de Santo Inácio

Fonte: [www.ecoenigma.com.br/conteudo/santo\\_inacio](http://www.ecoenigma.com.br/conteudo/santo_inacio)



**Figura 3. Exemplar de *Triatoma sordida***

As cepas SI<sub>5</sub>, SI<sub>8</sub> e SIGR<sub>3</sub> são mantidas por repiques sucessivos em meio de cultura axênico (LIT) com ótimo crescimento, bem como passagem sucessiva por meio de punção cardíaca em camundongos Swiss jovens, com aproximadamente 21 dias de idade, no laboratório de Parasitologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP- ARARAQUARA.

## 4.2 Meio de Cultura

As cepas SI<sub>5</sub>, SI<sub>8</sub> e SIGR<sub>3</sub> foram isoladas em cultura a partir de formas flageladas do parasito no intestino posterior dos triatomíneos. Após o inóculo intraperitoneal de formas flageladas de *T. cruzi* nos camundongos, manteve-se a infecção a partir de sangue de animal previamente infectado, coletado por meio de punção cardíaca, durante o pico parasitêmico. Desse modo, as cepas são mantidas “*in vitro*” em meio de cultura LIT e “*in vivo*” em camundongos Swiss.

### 4.3 Inoculação e Crescimento

Foram inoculados  $7,5 \times 10^6$  parasitos/mL em frasco de vidro com tampa azul de rosquear (tipo boeco) com 50 mL de meio LIT. Durante os primeiros quatros dias de cultivo ocorre à fase logarítmica da multiplicação ou crescimento celular, em que predominam formas epimastigotas, sendo rara a presença de formas tripomastigotas de *T. cruzi* (ARAÚJO et al., 2000).

### 4.4 Fixação, Coloração e Mensuração das Formas Epimastigotas e Tripomastigotas de *T. cruzi*

Foram capturadas e mensuradas imagens de 30 formas epimastigotas de cada uma das três cepas de *T. cruzi* oriundas de meio LIT. Mensurou-se 30 formas tripomastigotas das três cepas de *T. cruzi* obtidas de sangue de camundongo durante o pico parasitêmico. As 30 formas de *T. cruzi* mensuradas foram escolhidas, levando-se em conta a qualidade das organelas estudadas. Foram mensurados os parâmetros morfológicos definidos por Dias e Freitas Filho (1943) e Barreto (1965) da forma tripomastigota de *T. cruzi*, comprimento total do parasito (CT), comprimento do corpo (CC), flagelo livre (FL), largura (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 ( $IN=PN/NA$ ).

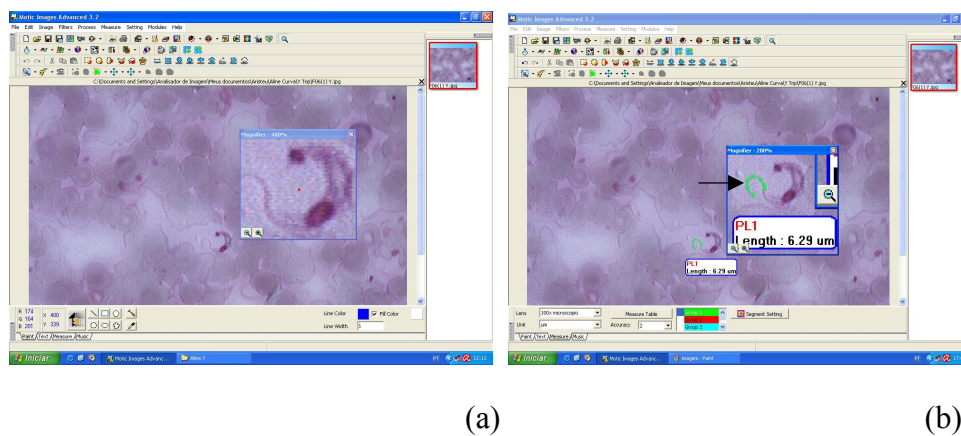
Para avaliação das características morfológicas das formas tripomastigotas sanguíneas foram realizados esfregaços de sangue dos animais inoculados, no 7°, 10°, 14°, 20°, 30°, 150° e 180° dia de infecção, sendo seis lâminas para cada dia (SI<sub>5</sub>, SI<sub>8</sub> e SIGR<sub>3</sub>). Os esfregaços foram fixados com metanol e corados pela técnica de Giemsa (ANEXO 2) e posteriormente as formas tripomastigotas tiveram suas imagens capturadas e mensuradas.

Em relação às formas epimastigotas de *T. cruzi*, preconizou-se os parâmetros morfométricos de largura (fina/intermediária/larga: 1,1 a 1,7 $\mu$ m / 1,8 a 2,8 $\mu$ m / 2,9 a 5,0 $\mu$ m), comprimento total (curto/intermediário/longo: 13,0 a 23,2 $\mu$ m / 23,3 a 31,3 $\mu$ m / 31,4 a 43,7 $\mu$ m), área do núcleo (pequeno/intermediário/grande: 0,9 a 1,6 $\mu$ m<sup>2</sup> / 1,7 a 2,9 $\mu$ m<sup>2</sup> / 3,0 a 6,8 $\mu$ m<sup>2</sup>), área do cinetoplasto (pequeno/intermediário/grande: 0,3 a 0,5 $\mu$ m<sup>2</sup> / 0,6 a 0,9 $\mu$ m<sup>2</sup> / 1,0 a 1,7 $\mu$ m<sup>2</sup>) e

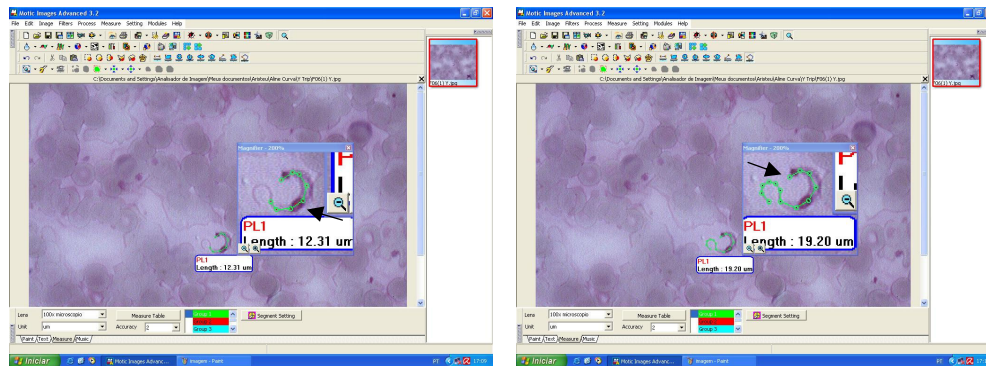


índice nuclear (baixo/intermediário/alto: 0,1 a 0,3 / 0,4 a 0,8 / 0,9 a 0,22) (ROSSI, 2007). Observou-se variabilidade de estruturas como a posição do cinetoplasto, comprimento total, largura, área do cinetoplasto, área do núcleo, distância da extremidade anterior ao núcleo, extremidade posterior ao núcleo e índice nuclear.

As formas epimastigotas utilizadas para mensuração foram colhidas do meio de cultura no sétimo dia após o inóculo inicial, quando ocorreu o platô de crescimento. Dessa forma, o frasco contendo o meio de cultura foi levado para uma câmara de fluxo laminar, posteriormente coletou-se 3,0 mL que foram centrifugados a 1000 g por cinco minutos, do sedimento retiraram-se quatro gotas que foram colocadas em lâmina em câmara de suta, fixadas com álcool metílico e coradas por Giemsa segundo Rosenfeld (1974).



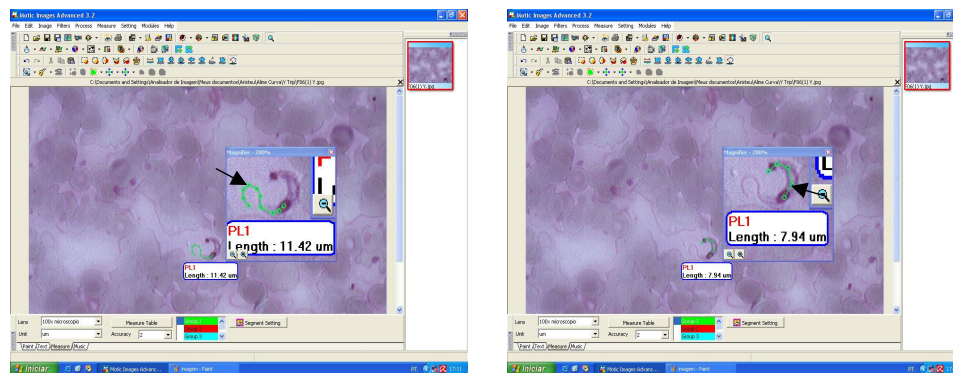
**Figura 4.** Ajuste do zoom (a) e seleção da imagem por meio de microscópio óptico, mensuração do flagelo livre (CF) com a ferramenta poly line (b). A seta indica a estrutura mensurada.



(a)

(b)

**Figura 5.** Seleção da imagem por meio de microscópio óptico, (a) mensuração do comprimento do corpo (CC) e (b) comprimento total (CT) com a ferramenta poly line. As setas indicam as estruturas mensuradas.



(a)

(b)

**Figura 6.** 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) com a ferramenta poly line. As setas indicam as estruturas mensuradas.

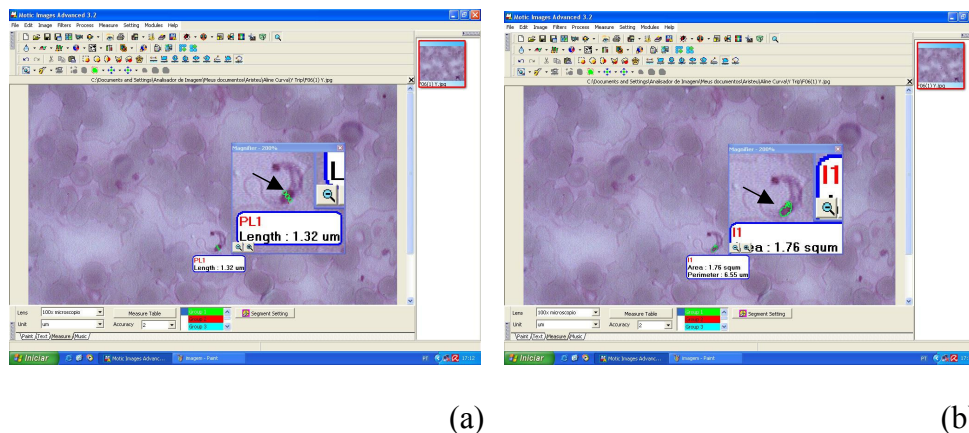


Figura 7. Seleção da imagem por meio de microscópio óptico, (a) mensuração da largura do corpo (LC) com a ferramenta poly line e (b) área do núcleo (AN) com a ferramenta irregular. As setas indicam as estruturas mensuradas.

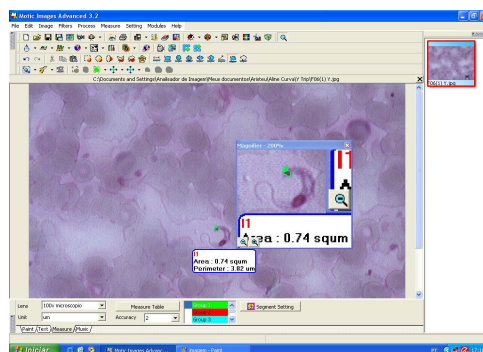


Figura 8. Seleção da imagem por meio de microscópio óptico, mensuração do cinetoplasto (AC) com a ferramenta irregular.

## 4.5 Estudo de formas amastigotas no sangue periférico de camundongo BALB/c

Durante caracterização morfológica das cepas SI<sub>5</sub>, SI<sub>8</sub> e SIGR<sub>3</sub>, foram observadas formas amastigotas da cepa SI<sub>8</sub> no sangue periférico de camundongos BALB/c. As três cepas foram avaliadas durante o pico parasitêmico, mas, somente a cepa SI<sub>8</sub> foi positiva para o encontro de formas amastigotas na circulação periférica dos modelos animais estudados. As lâminas coradas foram observadas em microscópio óptico comum com óleo de imersão para a avaliação qualitativa das formas encontradas em aumento de 1000 vezes, conforme descrito no item 3.4.

## 4.6 Animais Utilizados

Foram utilizados camundongos machos da linhagem BALB/c, que pesavam entre 20 e 30 g, com 21 a 35 dias de idade e obtidos junto ao CEMIB (UNICAMP), Campinas. A escolha do modelo foi feita com base em estudos clássicos que mostram que a resistência de *T. cruzi* é regulada por controle multigênico. Portanto, como a resistência está mais ligada às características da cepa, um hospedeiro pode ser resistente e controlar a infecção. A linhagem BALB/c mostra-se o modelo mais susceptível para o estudo da infecção pelo parasito *T. cruzi* e desse modo, a escolha do modelo pode ser crucial no entendimento da patogenia observada. O uso desses modelos para a realização do experimento com *T. cruzi* foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara - UNESP, onde o mesmo foi aprovado (Protocolo nº12/2008).

## 4.7 Caracterização Biológica

Inicialmente, todos os animais inoculados com fezes de ninfas de 5º estágio de *T. sordida* infectados adquiriram a infecção. Após o isolamento, as amostras foram mantidas em camundongos albinos Swiss jovens, mediante inoculações via intraperitoneal de sangue colhido durante a fase aguda da infecção do doador obtido por punção cardíaca de animais previamente infectados, quando as formas tripomastigotas são abundantes no sangue periférico.

Para o estudo do comportamento da infecção nas três cepas estudadas (SI<sub>5</sub>, SI<sub>8</sub> e SIGR<sub>3</sub>) cinco camundongos BALB/c com aproximadamente 20 dias foram inoculados com tripomastigotas sanguíneos por via intraperitoneal. Esse procedimento foi realizado com seringa de vidro tipo tuberculina e agulha BD 10x5 na dose 0,3 mL de sangue proveniente de outro camundongo infectado. Padronizou-se a concentração de  $5 \times 10^3$  formas de tripomastigotas sanguíneos em 0,3 mL de sangue.

Foram considerados para essa etapa experimental os seguintes parâmetros (ANDRADE, 1974):

- período pré-patente
- índice de infecção
- curva parasitêmica
- taxa de letalidade

As contagens das formas tripomastigotas foram realizadas de acordo com o método de Brener (1965) com correção dos intercampos (MARTINS, 1999). Colheu-se 5  $\mu$ L do sangue do animal por meio de corte da cauda e depositou-se em uma lâmina de vidro de 26x76 mm recobrimo-a com uma lamínula de dimensões 22x22 mm, de modo a se obter uma camada delgada de sangue, ocupando homogeneamente toda a superfície da lamínula. Examinou-se a preparação em microscópio óptico Carl Zeiss JENA-JENAVAL, com objetiva de 40X e ocular de 10X, na proporção 1, contando-se 20 campos nas quatro extremidades da lamínula e mais de 20 campos na parte central, totalizando 100 campos microscópicos. Considerando que a superfície da lamínula utilizada com a correção dos intercampos corresponde, no aumento empregado, à cerca de 1550 campos microscópicos, basta multiplicar o número de parasito encontrado no exame de 100 campos pelo fator 15,55 e obtém-se o número de tripanossomas contidos em 5 $\mu$ L. Para avaliar o número de formas tripomastigotas do inóculo de 0,1mL, basta multiplicar esse número por 20.

A fim de estabelecer o padrão de infecção, esfregaços de sangue fresco obtidos pelo corte da cauda dos camundongos, foram examinados, a partir do 2º dia da infecção, três vezes por semana até a negatificação em três exames consecutivos ou por um período de 60 dias.

Obteve-se dessa maneira, dados referentes aos níveis parasitêmicos e traçaram-se as curvas parasitêmicas. Verificou-se também a duração do período pré-patente, a duração da fase aguda e a taxa de letalidade.

A virulência das cepas foi determinada de acordo com o período pré-patente, nível de parasitemia e taxa de letalidade.

## 4.8 Estudo Histopatológico:

Foram inoculados, intraperitonealmente, para cada cepa, 21 camundongos machos com 21 dias de idade e pesando em média 20 g, com  $5 \times 10^3$  formas tripomastigotas sanguíneas (0,3 mL de sangue por camundongo).

O estudo histopatológico tem o propósito de pesquisar formas amastigotas durante a fase aguda da infecção, realizado no 7°, 10°, 14°, 20° e 30° dia após a inoculação e na fase crônica, com 150 e 180 dias. Para cada dia foram sacrificados três camundongos dos quais se retiraram o coração, músculo esquelético, fígado e baço adicionando-os em solução de formalina a 10% por 24 horas para fixação. Após, foram lavados em água corrente por 24 horas e então mantidos em solução de álcool a 70° até o momento de uso. As peças foram então submetidas a uma série de reagentes: álcool absoluto, álcool-xilol, xilol, parafina, parafina em estufa a vácuo e por último inclusão em blocos de parafina. Com o emprego de micrótomo foram efetuados cortes (parafinados) de 5  $\mu$ m que foram corados com hematoxilina e eosina e então examinados em microscopia óptica. Classificaram-se as cepas de acordo com o Biodema (I, II, III) segundo Andrade (1974).

## 4.9 Caracterização Molecular (PCR – RFLP):

### 4.9.1 Extração do DNA Genômico de *T. cruzi*:

O DNA das formas epimastigotas das cepas SI<sub>5</sub>, SI<sub>8</sub> e SIGR<sub>3</sub> foram extraídos segundo o protocolo descrito por Lewis et al. (2009).

Inicialmente, foi realizada a contagem dos parasitos em Câmara de Neubauer a fim de obter a concentração de  $1.10^6$  parasitos/mL. Em seguida, 1 mL do meio de cultura axênico (LIT) foi centrifugado a 3000g/1minuto em temperatura ambiente. Após essa etapa foi retirado o sobrenadante e adicionado 800 $\mu$ L de Tryps Wash Buffer (100mM de NaCl, 3mM de MgCl<sub>2</sub>, 20mM de Tris-HCl pH 7,5) ao sedimento. O material foi centrifugado a 3000g/1minuto em temperatura ambiente e o sobrenadante retirado novamente. O sedimento foi ressuspendido em 250 $\mu$ L de TELT Buffer (50mM de Tris-HCl pH 8,0, 62,5mM de EDTA, 2,5M de LiCl, 4% de

Triton X-100). Na próxima etapa foi adicionado 250µL de Fenol/Clorofórmio e o material centrifugado a 16000g/2minutos em temperatura ambiente. A fase superior do material foi retirada e transferida para um novo tubo. Adicionou-se ao tubo 250µL de Clorofórmio e, em seguida, o mesmo foi centrifugado a 16000g/2minutos em temperatura ambiente. A fase superior foi retirada e transferida para um novo tubo. O DNA foi precipitado com 750µL de etanol a 100% e 25µL de NaAc 3M pH 7,0 e centrifugado a 16000g/10minutos em temperatura ambiente. O material foi lavado com 500µL de etanol a 70% e centrifugado a 16000g/5minutos em temperatura ambiente. Na última etapa, o material foi ressuspensionado em 30µL de H<sub>2</sub>O Mili-Q autoclavada.

#### 4.9.2 Amplificação dos Genes LSU rDNA (24Sα rRNA), HSP60 e GPI de *T. cruzi*:

A caracterização molecular foi realizada por meio da técnica de PCR-RFLP, segundo o protocolo descrito por Lewis et al. (2009).

A reação de PCR para o gene LSU rDNA (24Sα rRNA) foi realizada em um termociclador Gene Amp PCR System 9700 Applied Biosystems™, com um volume final de 50µL com os seguintes componentes:

- 10-100 ng DNA genômico;
- 0,2 mmol/L para cada dNTP;
- 1 pmol/µL de cada oligonucleotídeo iniciador;
- 1,5 mmol/L de cloreto de magnésio (MgCl<sub>2</sub>);
- 1 unidade de *Taq* DNA polimerase (*High Fidelity PCR Enzyme Mix*);
- Tampão 10X.

A amplificação do domínio divergente do gene 24 Sα rRNA foi realizada com os oligonucleotídeos iniciadores (SOUTO e ZINGALES, 1993):

Forward: D71 5'- AAGGTGCGTCGACAGTGTGG-3'

Reverse: D72 5'-TTTTCAGAATGGCCGAACAGT-3'

O produto da reação de PCR (110-125 pb) foi submetido à eletroforese em gel de agarose a 3%, corado com brometo de etídio e visualizado em luz UV.

As condições para a amplificação do 24S $\alpha$  rRNA foram:

- 94 °C por 5 minutos
  - 94 °C por 30 segundos
  - 55 °C por 30 segundos
  - 72 °C por 30 segundos
  - 72 °C por 7 minutos
- } 30 vezes

A reação de PCR para os genes HSP60 e GPI foi realizada em um termociclador Gene Amp PCR System 9700 Applied Biosystems<sup>TM</sup>, com um volume final de 50 $\mu$ L com os seguintes componentes:

- 10-100 ng gDNA;
- 0,2 mM/L para cada dNTP;
- 1 pmol/ $\mu$ L de cada oligonucleotídeo iniciador;
- 1,5 mmol/L de cloreto de magnésio (MgCl<sub>2</sub>);
- 1 unidade de *Taq* DNA polimerase (*High Fidelity PCR Enzyme Mix*).
- Tampão 10X.

Para amplificar o gene HSP60 foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores (LEWIS et al., 2009):

Forward: HSP60 5' - GTGGTATGGGTGACATGTAC - 3'

Reverse: HSP60 5' - CGAGCAGCAGAGCGAAACAT - 3'

O produto de PCR (432 - 462 pb) foi submetido à eletroforese em gel de agarose a 1%, e as condições para a amplificação do gene HSP60 foram:

- 94 °C por 3 minutos
  - 94 °C por 30 segundos
  - 64 °C por 30 segundos
  - 72 °C por 1 minuto
- } 4X

- 94 °C por 30 segundos
  - 60 °C por 30 segundos
  - 72 °C por 1 minuto
  - 72 °C por 10 minutos
- } 28X



A amplificação do gene GPI foi obtida com os oligonucleotídeos iniciadores (LEWIS et al., 2009):

Forward: GPI 5' - GGCATGTGAAGCTTTGAGGCCTTTTTCAG- 3'

Reverse: GPI 5' - TGTAAGGGCCCAGTGAGAGCGTTCGTTGAATAGC 3'

O produto de PCR (1264 pb) foi submetido à eletroforese em gel de agarose a 1%, corado com brometo de etídio e visualizado em luz UV.

As condições para a amplificação do GPI foram:

- 94 °C por 3 minutos
  - 94 °C por 30 segundos
  - 64 °C por 30 segundos
  - 72 °C por 1 minuto
- } 4X

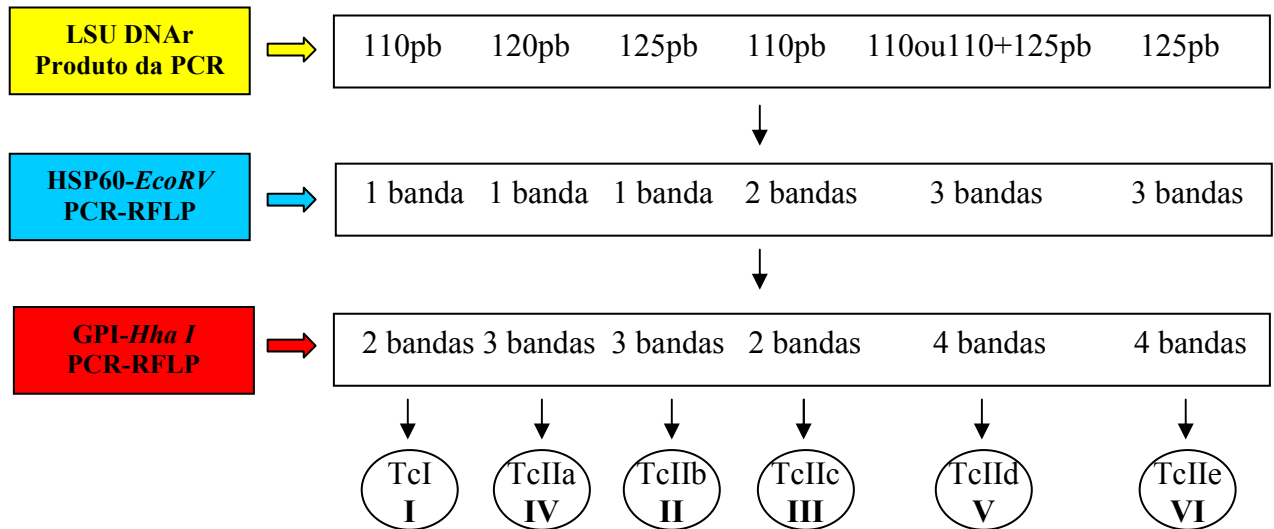
- 94 °C por 30 segundos
  - 60 °C por 30 segundos
  - 72 °C por 1 minuto
  - 72 °C por 10 minutos
- } 28X

Os produtos obtidos dos genes HSP60 e GPI foram digeridos com as enzimas *EcoR V* e *Hha I*, respectivamente. As condições da reação foram:

- 10 µL PCR HSP60 ou GPI
- 2 µL tampão NEB 3 ou NEB 4
- 0,2 µL BSA 100X
- 0,5 µL *EcoR V* 10 U/ µL ou *Hha I* 10 U/ µL
- 7,3 µL H<sub>2</sub>O

Partindo-se do produto da digestão enzimática, a reação foi incubada por 4 horas, a 37°C. Após esse período foi aplicado 5 µL do produto da digestão enzimática dos genes HSP60 e GPI, em gel de agarose a 1% e a 3%, respectivamente.

Os fragmentos obtidos foram comparados segundo o protocolo de Lewis et al. (2009), de acordo com o esquema abaixo:



#### 4.10 Análise estatística

Após o estudo morfológico (mensuração do comprimento total do parasito, comprimento do corpo, largura, flagelo livre, área do cinetoplasto, área do núcleo, distância da extremidade anterior ao núcleo, distância da extremidade posterior ao núcleo e índice nuclear) de cada uma das formas obtidas das cepas SI<sub>5</sub>, SI<sub>8</sub>, SGR<sub>3</sub>, foi realizada avaliação descritiva das mensurações utilizando-se o programa Microsoft Office Excel 2007 for Windows. Diferentes parâmetros entre grupos microbiológicos são examinados estatisticamente por meio de Análise de Variância (ANOVA), seguido do teste de Tukey para comparações múltiplas. Para a realização do teste de Tukey utilizou-se o programa GraphPad Instat Demo, versão 3.06 for Windows.

## 5. Resultados

### 5.1 Caracterização Biológica

O comportamento de cada uma das três cepas nos camundongos BALB/c manteve-se relativamente constante, observando-se uma ascensão lenta e regular da parasitemia até atingir um pico e depois queda também regular até o desaparecimento do parasito no sangue periférico. As cepas SI<sub>5</sub> e SIGR<sub>3</sub> apresentaram 80% de infectividade, para a cepa SI<sub>8</sub>, esse índice foi de 100%. Os valores obtidos em relação aos parâmetros previamente estabelecidos para o comportamento da infecção das cepas SI<sub>5</sub>, SI<sub>8</sub> e SIGR<sub>3</sub> em camundongos estão representados nas Tabelas 1, 2 e 3. Para facilitar a discussão sobre os resultados, reuniram-se os principais caracteres das cepas estudadas na Tabela 4.

**Tabela 1. Características biológicas da cepa SIGR<sub>3</sub> de *T. cruzi* após infecção intraperitoneal em camundongos BALB/c com formas tripomastigotas.**

| Animal<br>(formas/0,3mL)     | Período<br>Prepatente<br>(dias) | Parasitemia máxima    |     | Fase<br>Aguda<br>(dias) | Observações |
|------------------------------|---------------------------------|-----------------------|-----|-------------------------|-------------|
|                              |                                 | nº/mL                 | dia |                         |             |
| Inóculo<br>5x10 <sup>3</sup> |                                 |                       |     |                         |             |
| C1                           | *                               | *                     | *   | *                       | *           |
| C2                           | 11                              | 9,33x10 <sup>3</sup>  | 30° | 15                      | cronicidade |
| C3                           | 11                              | 21,77x10 <sup>3</sup> | 32° | 15                      | cronicidade |
| C4                           | 11                              | 3,11x10 <sup>3</sup>  | 32° | 08                      | cronicidade |
| C5                           | 11                              | 12,44x10 <sup>3</sup> | 21° | 16                      | cronicidade |

\* Não foram observadas formas tripomastigotas sanguíneas.

**Tabela 2. Características biológicas da cepa SI<sub>5</sub> de *T. cruzi* após infecção intraperitoneal de formas tripomastigotas em camundongos BALB/c.**

| Animal<br>(formas/0,3mL)     | Período<br>Prepatente<br>(dias) | Parasitemia máxima      |     | Fase<br>Aguda<br>(dias) | Observações |
|------------------------------|---------------------------------|-------------------------|-----|-------------------------|-------------|
|                              |                                 | nº/mL                   | dia |                         |             |
| Inóculo<br>5x10 <sup>3</sup> |                                 |                         |     |                         |             |
| C1                           | 11                              | 102,63 x10 <sup>3</sup> | 44° | 20                      | cronicidade |
| C2                           | *                               | *                       | *   | *                       | *           |
| C3                           | 11                              | 139,95x10 <sup>3</sup>  | 35° | 20                      | cronicidade |
| C4                           | 11                              | 105,74x10 <sup>3</sup>  | 53° | 20                      | cronicidade |
| C5                           | 11                              | 71,53x10 <sup>3</sup>   | 32° | 19                      | cronicidade |

\* Não foram observadas formas tripomastigotas sanguíneas.

**Tabela 3. Características biológicas da cepa SI<sub>8</sub> de *T. cruzi* após infecção intraperitoneal de formas tripomastigotas em camundongos BALB/c.**

| Animal<br>(formas/0,3mL)     | Período<br>Prepatente<br>(dias) | Parasitemia máxima     |     | Fase<br>Aguda<br>(dias) | Observações |
|------------------------------|---------------------------------|------------------------|-----|-------------------------|-------------|
|                              |                                 | nº/mL                  | dia |                         |             |
| Inóculo<br>5x10 <sup>3</sup> |                                 |                        |     |                         |             |
| C1                           | 2                               | 43,54 x10 <sup>3</sup> | 44° | 21                      | cronicidade |
| C2                           | 21                              | 6,22x10 <sup>3</sup>   | 32° | 05                      | cronicidade |
| C3                           | 09                              | 24,88x10 <sup>3</sup>  | 23° | 16                      | cronicidade |
| C4                           | 07                              | 37,32x10 <sup>3</sup>  | 37° | 19                      | cronicidade |
| C5                           | 16                              | 34,21x10 <sup>3</sup>  | 35° | 08                      | cronicidade |

**Tabela 4. Características biológicas (limites de variação de parasitemia, duração da fase aguda em dias e taxa de letalidade) das cepas SI<sub>5</sub>, SI<sub>8</sub> e SIGR<sub>3</sub> de *T. cruzi*.**

| Cepas de <i>T. cruzi</i> | Variação da parasitemia<br>(5x10 <sup>5</sup> ) nº/mL | Duração da Fase<br>Aguda em dias | Taxa de letalidade |
|--------------------------|-------------------------------------------------------|----------------------------------|--------------------|
| SI <sub>5</sub>          | 71,53x10 <sup>3</sup> - 139,95x10 <sup>3</sup>        | 19 – 20                          | 0,00               |
| SI <sub>8</sub>          | 6,22x10 <sup>3</sup> - 43,54x10 <sup>3</sup>          | 05 - 21                          | 0,00               |
| SIGR <sub>3</sub>        | 9,33x10 <sup>3</sup> - 30,11x10 <sup>3</sup>          | 08 - 16                          | 0,00               |

A Tabela 1 mostrou para a cepa SIGR<sub>3</sub> período pré-patente de 11 dias, parasitemia máxima de  $21,77 \times 10^3$  formas tripomastigotas no 32º dia de infecção, fase aguda variando entre os dias 08 a 16 e evolução da infecção para cronicidade em 80% dos animais. A Tabela 2 apresentou para a cepa SI<sub>5</sub> período pré-patente de 11 dias, parasitemia máxima de  $139,95 \times 10^3$  formas tripomastigotas no 35º dia de infecção, fase aguda do 19-20º dia e evolução da infecção para cronicidade em 80% dos animais. A Tabela 3 mostrou para a cepa SI<sub>8</sub> período pré-patente que variou entre o 2º e 21º dia, parasitemia máxima de  $43,54 \times 10^3$  formas tripomastigotas no 44º dia de infecção, a fase aguda variou entre os dias 05 a 21 e evolução da infecção para a cronicidade em 100% dos camundongos.

### 5.1.1 Perfil Parasitêmico

Observou-se por meio do perfil parasitêmico, que as cepas isoladas em Santo Inácio (SI<sub>5</sub>, SI<sub>8</sub> e SIGR<sub>3</sub>) apresentaram diferenças no período pré-patente, pico parasitêmico e desaparecimento das formas tripomastigotas sanguíneas, embora as três cepas tenham apresentado o mesmo perfil de curva parasitêmica.

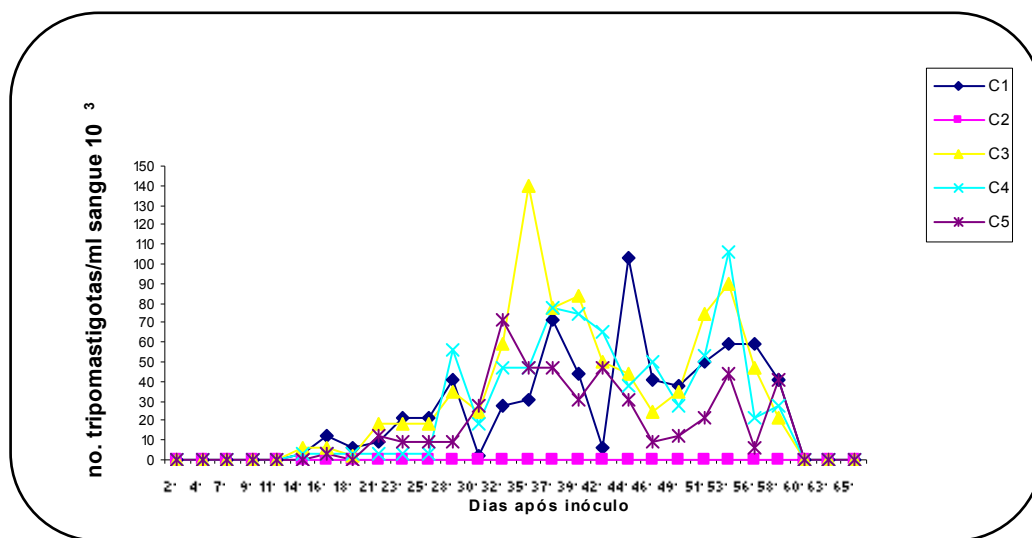


Figura 9. Curvas parasitêmicas (C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub>, C<sub>5</sub>) observadas em camundongos BALB/c inoculados com a cepa SI<sub>5</sub> de *T. cruzi*.

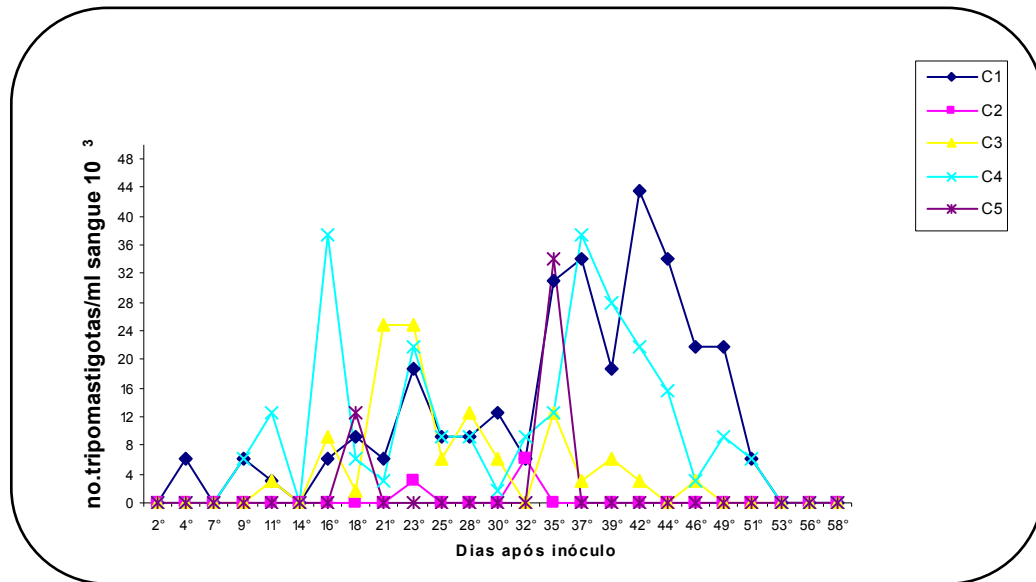


Figura 10. Curvas parasitêmicas (C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub>, C<sub>5</sub>) observadas em camundongos BALB/c inoculados com a cepa SI<sub>8</sub> de *T. cruzi*.

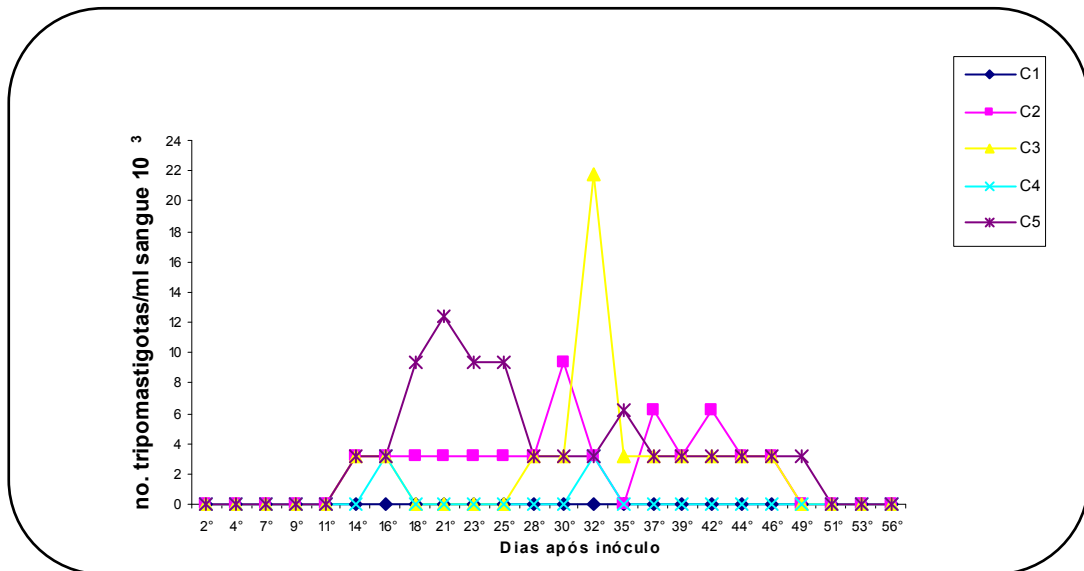


Figura 11. Curvas parasitêmicas (C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub>, C<sub>5</sub>) observadas em camundongos BALB/c inoculados com a cepa SIGR<sub>3</sub> de *T. cruzi*.

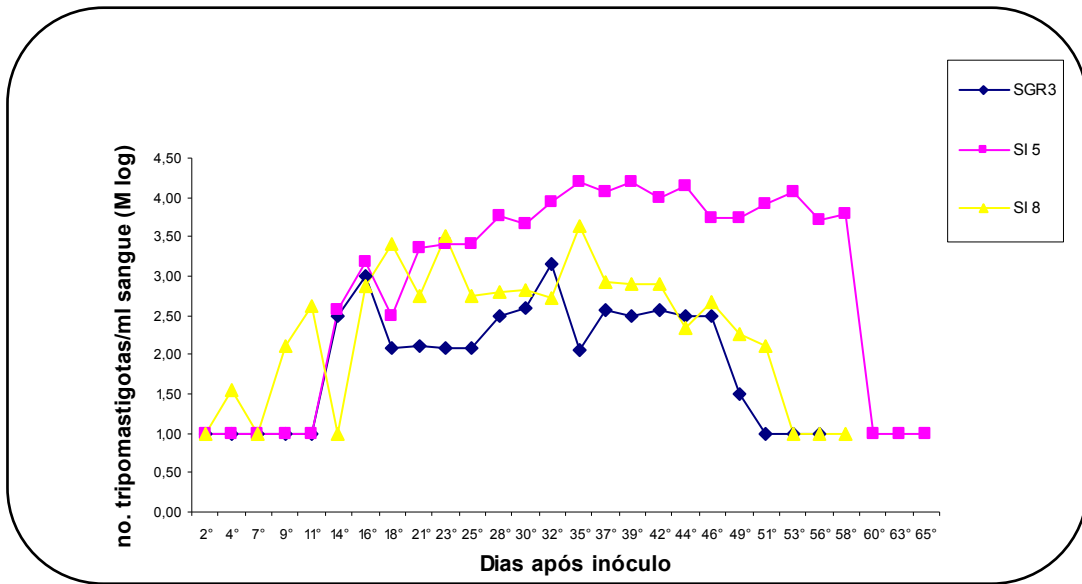


Figura 12. Comparação dos valores da parasitemia observados em camundongos BALB/c inoculados com a cepa SI<sub>5</sub>, SI<sub>8</sub> e SGR<sub>3</sub> de *T. cruzi* expressos em média logarítmica (Mlog).

## 5.2 Caracterização de Formas Tripomastigotas das Cepas SI<sub>5</sub>, SI<sub>8</sub> e SGR<sub>3</sub> de *T. cruzi*

A observação das lâminas coradas pelo método de Giemsa para mensuração das formas tripomastigotas nas amostras SI<sub>5</sub>, SI<sub>8</sub> e SGR<sub>3</sub> permitiu obter imagens das formas finas, intermediárias e largas, com aspecto de *C* ou *S* itálicos conforme figuras 16, 17 e 18.

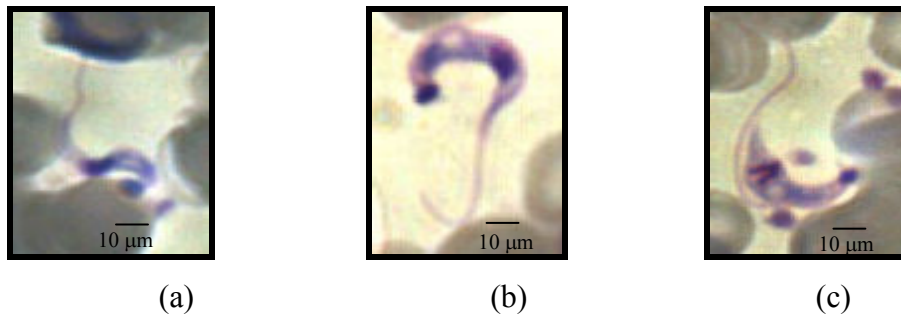
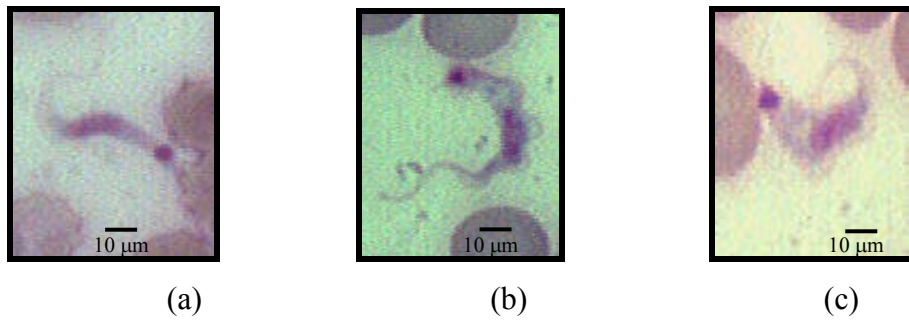
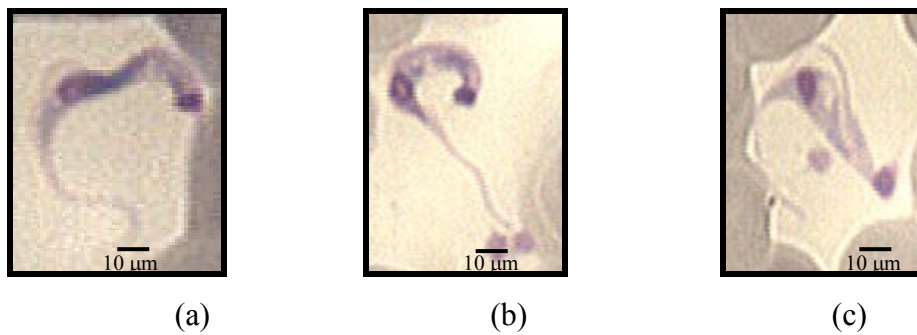


Figura 13: Fotomicrografias das formas tripomastigotas de *T. cruzi* (100 X) da cepa SI<sub>5</sub>: (a) forma fina, (b) forma intermediária e (c) forma larga.



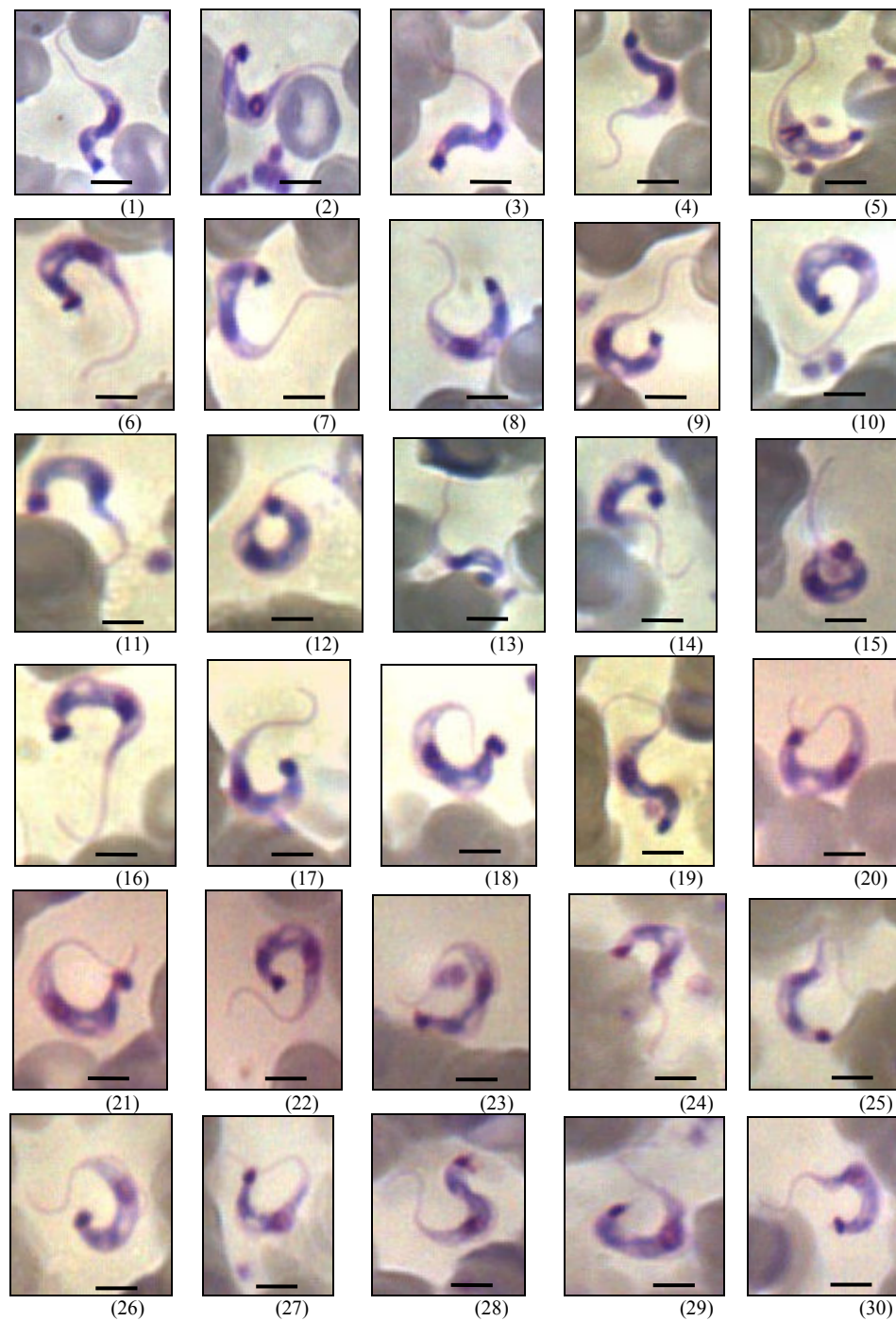
**Figura 14:** Fotomicrografias das formas tripomastigotas de *T. cruzi* (100 X) da cepa SI<sub>8</sub>: (a) forma fina, (b) forma intermediária e (c) forma larga.



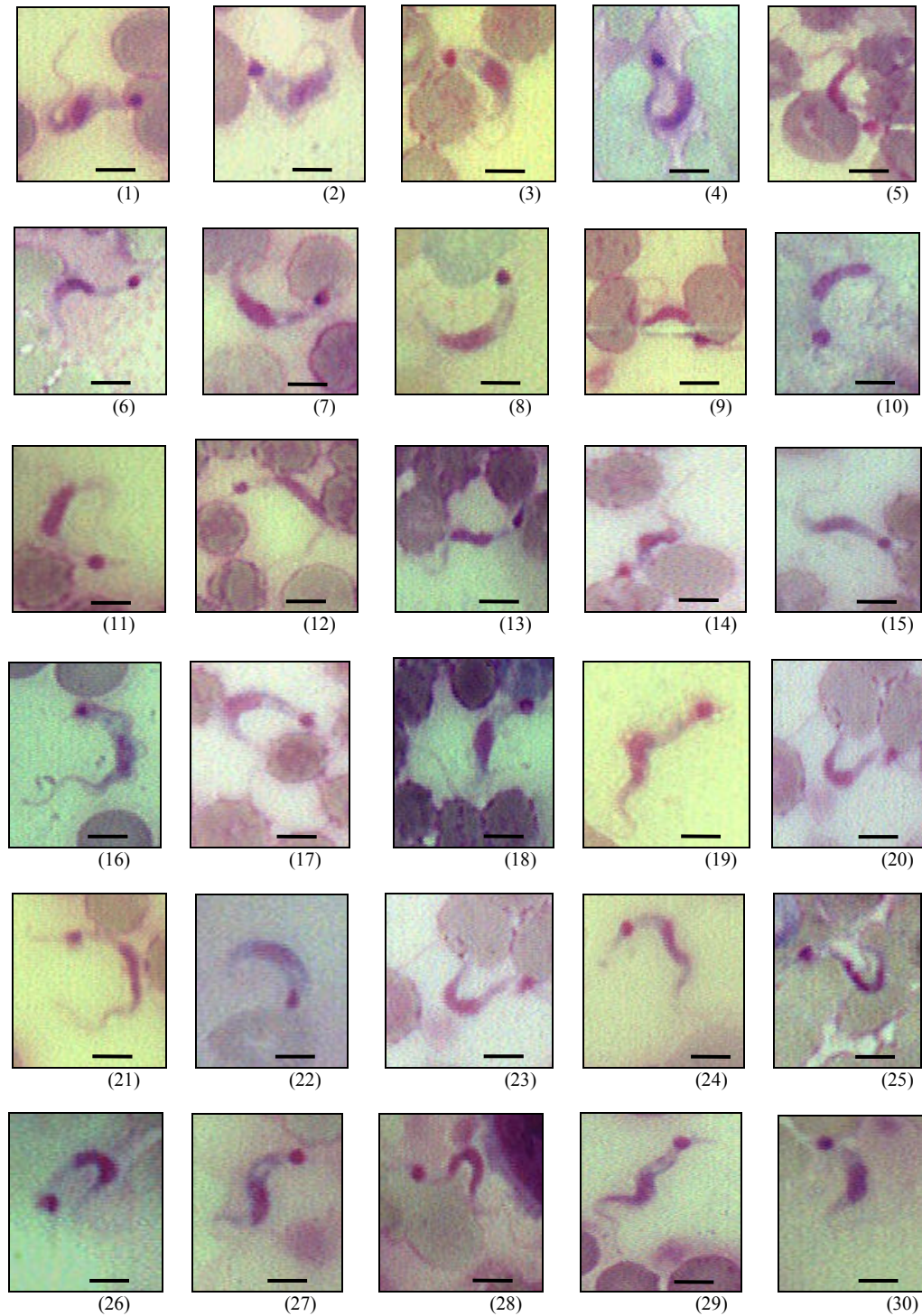
**Figura 15:** Fotomicrografias das formas tripomastigotas de *T. cruzi* (100 X) da cepa SIGR<sub>3</sub>: (a) forma fina, (b) forma intermediária e (c) forma larga.

Observam-se a seguir as fotomicrografias das formas tripomastigotas das cepas SI<sub>5</sub>, SI<sub>8</sub> e SIGR<sub>3</sub> de *T. cruzi* obtidos no pico parasitêmico (Figuras 16, 17 e 18).

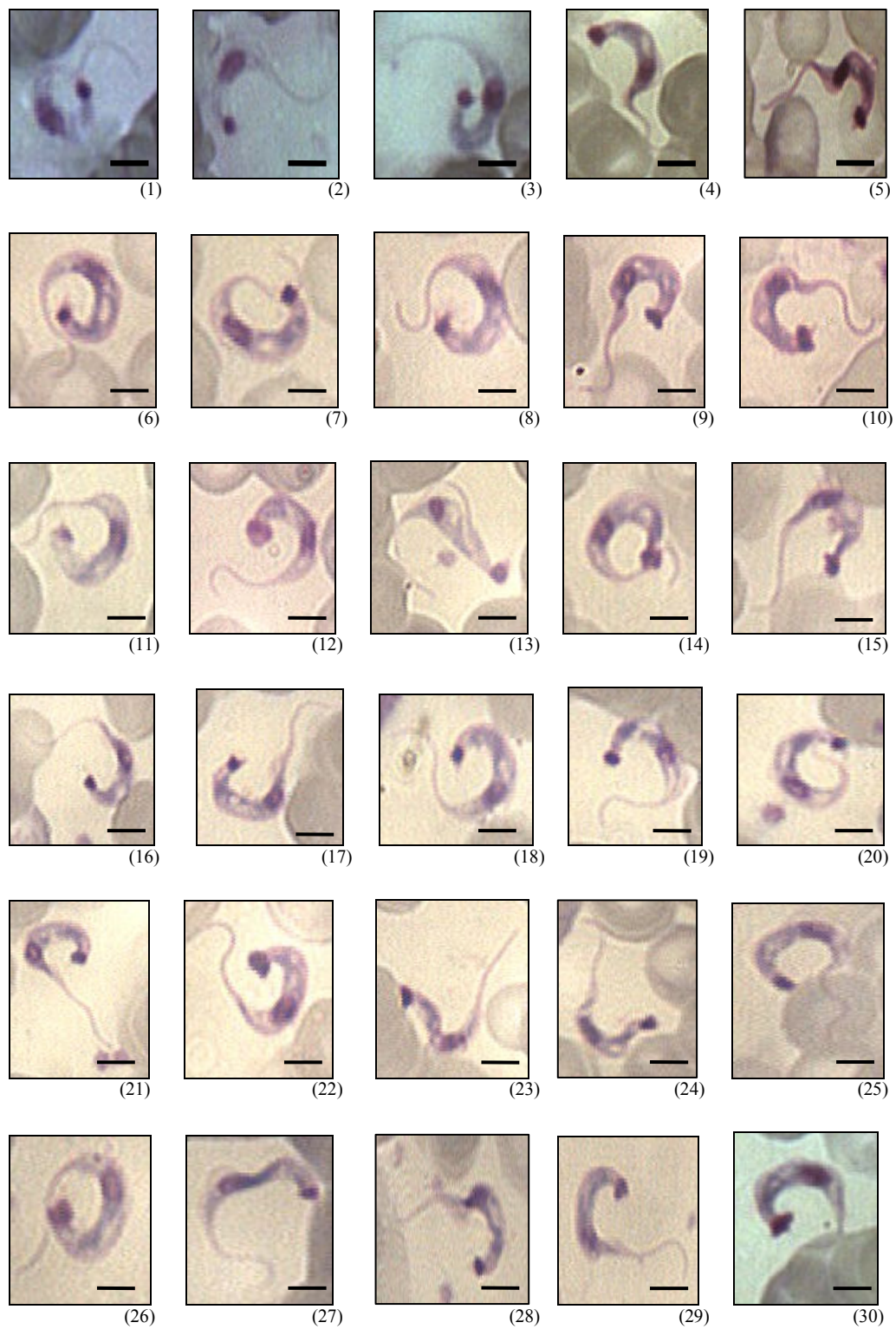




**Figura 16.** Fotomicrografias (100 X) referentes às formas tripomastigotas sanguíneas da cepa SI<sub>5</sub> de *T. cruzi* mensuradas obtidas no pico parasitário. As barras representam 10 μm.



**Figura 17.** Fotomicrografias (100 X) referentes às formas tripomastigotas sanguíneas da cepa SI<sub>8</sub> de *T. cruzi* que foram mensuradas e obtidas no pico parasitêmico. As barras representam 10 μm.



**Figura 18.** Fotomicrografias (100 X) referentes às formas tripomastigotas sanguíneas da cepa SIGR<sub>3</sub> de *T. cruzi* mensuradas e obtidas no pico parasitêmico. As barras representam 10 μm.

Os resultados referentes à avaliação morfométrica de 30 formas tripomastigotas sanguíneas das cepas SI<sub>5</sub>, SI<sub>8</sub> e SIGR<sub>3</sub>, empregando-se analisador de imagem e baseando-se nos parâmetros descritos por Barreto (1965) são apresentados nas Tabelas 6, 7 e 8. Os parâmetros morfométricos médios das formas tripomastigotas sanguíneas das cepas SI<sub>5</sub>, SI<sub>8</sub> e SIGR<sub>3</sub> no pico parasitêmico estão representados na Tabela 9.

Os valores médios das formas tripomastigotas sanguíneas das cepas SI<sub>5</sub>, SI<sub>8</sub> e SIGR<sub>3</sub> referentes ao comprimento total do corpo, largura e índice nuclear estão representados na Tabela 10. O valor de significância para as formas tripomastigotas está representado na Tabela 11.

**Tabela 5. Características morfométricas e biológicas das cepas SI<sub>5</sub>, SI<sub>8</sub> e SIGR<sub>3</sub> de *T. cruzi*.**

| Cepas de<br><i>T. cruzi</i> | Médias (μm) |      |      | Índice de infecção<br>% | Período pré-patente<br>(dias) |
|-----------------------------|-------------|------|------|-------------------------|-------------------------------|
|                             | C           | L    | IN   |                         |                               |
| SI <sub>5</sub>             | 19,15       | 1,74 | 0,64 | 80                      | 11                            |
| SI <sub>8</sub>             | 16,95       | 1,51 | 0,62 | 100                     | 02                            |
| SIGR <sub>3</sub>           | 19,02       | 1,58 | 0,70 | 80                      | 11                            |

C = comprimento total do corpo

L = largura

IN = índice nuclear

**Tabela 6. Resultados da análise morfométrica efetuada em 30 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa SI<sub>5</sub> de *T. cruzi*, obtidas no pico parasitêmico.**

| Parâmetros Morfométricos | Valores (μm) |        |              |
|--------------------------|--------------|--------|--------------|
|                          | Mínimo       | Máximo | Média ± DP   |
| Comprimento do flagelo   | 3,45         | 9,81   | 7,54 ± 1,15  |
| Comprimento do corpo     | 8,04         | 12,96  | 11,27 ± 1,11 |
| Comprimento total        | 15,13        | 23,58  | 19,15 ± 1,55 |
| Largura do corpo         | 1,21         | 2,96   | 1,74 ± 0,36  |
| Área do cinetoplasto*    | 0,60         | 1,68   | 1,02 ± 0,23  |
| Distância PN             | 5,79         | 8,79   | 7,33 ± 0,58  |
| Distância NA             | 8,25         | 15,95  | 11,57 ± 1,45 |
| Índice nuclear           | 0,46         | 0,95   | 0,64 ± 0,09  |

\* μm<sup>2</sup>

**Tabela 7. Resultados da análise morfométrica efetuada com 30 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa SI<sub>8</sub> de *T. cruzi*, no pico parasitêmico.**

| Parâmetros Morfométricos | Valores (μm) |        |              |
|--------------------------|--------------|--------|--------------|
|                          | Mínimo       | Máximo | Média ± DP   |
| Comprimento do flagelo   | 2,91         | 12,45  | 6,14 ± 2,13  |
| Comprimento do corpo     | 7,71         | 15,69  | 10,85 ± 1,81 |
| Comprimento total        | 11,63        | 22,56  | 16,95 ± 2,61 |
| Largura do corpo         | 0,77         | 3,25   | 1,51 ± 0,49  |
| Área do cinetoplasto*    | 0,57         | 1,49   | 0,94 ± 0,19  |
| Distância PN             | 4,60         | 10,21  | 6,36 ± 1,25  |
| Distância NA             | 6,63         | 15,18  | 10,72 ± 2,27 |
| Índice nuclear           | 0,31         | 0,95   | 0,62 ± 0,17  |

\* μm<sup>2</sup>

**Tabela 8. Resultados da análise morfométrica efetuada com 30 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa SIGR<sub>3</sub> de *T. cruzi*, no pico parasitêmico.**

| Parâmetros Morfométricos | Valores (μm) |        |              |
|--------------------------|--------------|--------|--------------|
|                          | Mínimo       | Máximo | Média ± DP   |
| Comprimento do flagelo   | 3,06         | 8,68   | 6,77 ± 1,17  |
| Comprimento do corpo     | 8,92         | 15,69  | 12,09 ± 1,55 |
| Comprimento total        | 15,65        | 21,88  | 19,02 ± 1,68 |
| Largura do corpo         | 1,22         | 2,44   | 1,58 ± 0,29  |
| Área do cinetoplasto*    | 0,53         | 2,88   | 1,13 ± 0,48  |
| Distância PN             | 5,58         | 10,11  | 7,79 ± 0,70  |
| Distância NA             | 7,58         | 13,04  | 11,25 ± 1,24 |
| Índice nuclear           | 0,48         | 1,05   | 0,70 ± 0,12  |

\* μm<sup>2</sup>

**Tabela 9. Parâmetros morfométricos médios das formas tripomastigotas sanguíneas das cepas SI<sub>5</sub>, SI<sub>8</sub> e SIGR<sub>3</sub> de *T. cruzi*, no pico parasitêmico.**

| Parâmetros Morfométricos | Valores médios (μm) |                    |                    |
|--------------------------|---------------------|--------------------|--------------------|
|                          | SI <sub>5</sub>     | SI <sub>8</sub>    | SIGR <sub>3</sub>  |
| Comprimento do flagelo   | 7,54 <sup>a</sup>   | 6,14 <sup>a</sup>  | 6,77 <sup>b</sup>  |
| Comprimento do corpo     | 11,27 <sup>b</sup>  | 10,85 <sup>a</sup> | 12,09 <sup>a</sup> |
| Comprimento total        | 19,15 <sup>a</sup>  | 16,95 <sup>a</sup> | 19,02 <sup>a</sup> |
| Largura do corpo         | 1,74 <sup>a</sup>   | 1,51 <sup>a</sup>  | 1,58 <sup>b</sup>  |
| Área do cinetoplasto*    | 1,02 <sup>b</sup>   | 0,94 <sup>b</sup>  | 1,13 <sup>b</sup>  |
| Distância PN             | 7,33 <sup>a</sup>   | 6,36 <sup>a</sup>  | 7,79 <sup>a</sup>  |
| Distância NA             | 11,57 <sup>b</sup>  | 10,72 <sup>b</sup> | 11,25 <sup>b</sup> |
| Índice nuclear           | 0,64 <sup>b</sup>   | 0,62 <sup>b</sup>  | 0,70 <sup>b</sup>  |

\* μm<sup>2</sup>

Letras iguais = diferença estatística

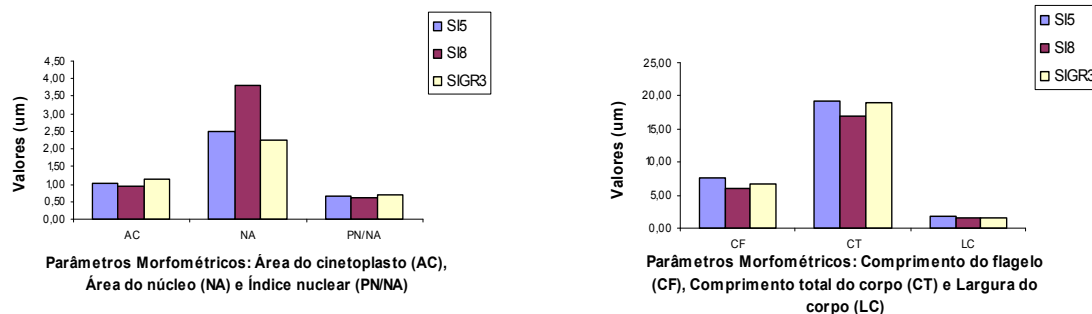


**Tabela 10. Parâmetros morfométricos médios das formas de tripomastigotas sanguíneas das cepas SI<sub>5</sub>, SI<sub>8</sub> e SIGR<sub>3</sub> de *T. cruzi*, no pico parasitêmico (n=30).**

| Parâmetros Morfométricos | Valores médios (μm) |                 |                   |
|--------------------------|---------------------|-----------------|-------------------|
|                          | SI <sub>5</sub>     | SI <sub>8</sub> | SIGR <sub>3</sub> |
| Comprimento total        | 19,15               | 16,95           | 19,02             |
| Largura do corpo         | 1,74                | 1,51            | 1,58              |
| Índice nuclear           | 0,64                | 0,62            | 0,70              |

\* μm<sup>2</sup>

Os resultados das mensurações das organelas das formas tripomastigotas de *T. cruzi* das cepas SI<sub>5</sub>, SI<sub>8</sub>, SIGR<sub>3</sub> foram representados na figura 19 de modo a facilitar a visualização das distinções entre as mesmas.



**Figura 19. Resultado da morfometria efetuada com 30 formas tripomastigotas sanguíneas de *T. cruzi* no pico parasitêmico nas cepas SI<sub>5</sub>, SIGR<sub>3</sub> e SI<sub>8</sub> referentes à área do cinetoplasto, área do núcleo e índice nuclear (PN/NA) e comprimento do flagelo, comprimento total e largura do corpo.**

**Tabela 11. Análise estatística por meio de Teste Tukey – Kramer Multiple Comparisons (ANOVA paramétrico) referente às mensurações das formas tripomastigotas sanguíneas (SI<sub>5</sub>, SI<sub>8</sub> e SIGR<sub>3</sub>) de *T. cruzi*.**

| Parâmetros                    | Valor <i>P</i> - Significância |
|-------------------------------|--------------------------------|
| Comprimento do flagelo        | <i>P</i> = 0, 0032 **          |
| Comprimento do corpo          | <i>P</i> = 0, 0081 **          |
| Comprimento total             | <i>P</i> < 0, 0001 ***         |
| Largura do corpo              | <i>P</i> = 0, 0626 ns          |
| Área do cinetoplasto          | <i>P</i> = 0, 741 ns           |
| Área do núcleo                | <i>P</i> < 0, 0001 ***         |
| Distância anterior ao núcleo  | <i>P</i> = 0, 1580 ns          |
| Distância posterior ao núcleo | <i>P</i> < 0,0001 ***          |
| Índice nuclear                | <i>P</i> = 0,0577 ns           |

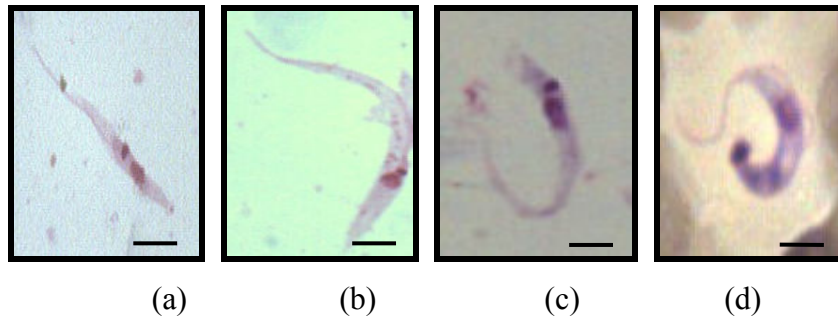
NS = não significativo (*P* > 0,05)

\*\* muito significativo (*P* < 0, 001)

\*\*\* extremamente significativo (*P* < 0, 0001)

### 5.2.1 Caracterização de Formas Epimastigotas das Cepas SI<sub>5</sub>, SI<sub>8</sub> e SIGR<sub>3</sub> de *T. cruzi*

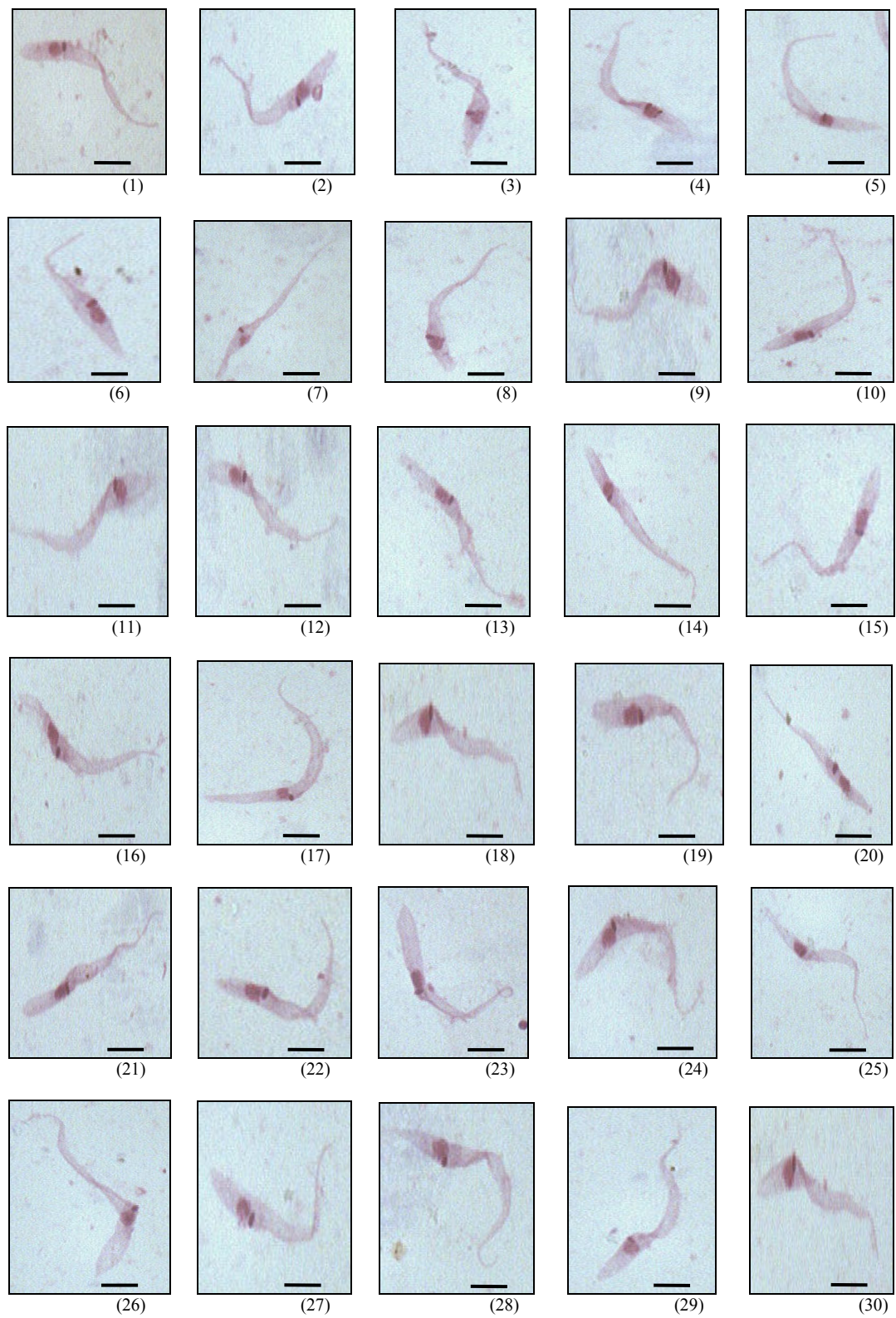
As formas epimastigotas das cepas SI<sub>5</sub>, SI<sub>8</sub> e SIGR<sub>3</sub> obtidas de meio LIT e coradas pelo método de Giemsa mostraram variabilidade de posição do cinetoplasto, comprimento total do corpo, largura do corpo, área do cinetoplasto, área do núcleo, distância da extremidade anterior ao núcleo, extremidade posterior ao núcleo e índice nuclear, como se observa na Figura 20.



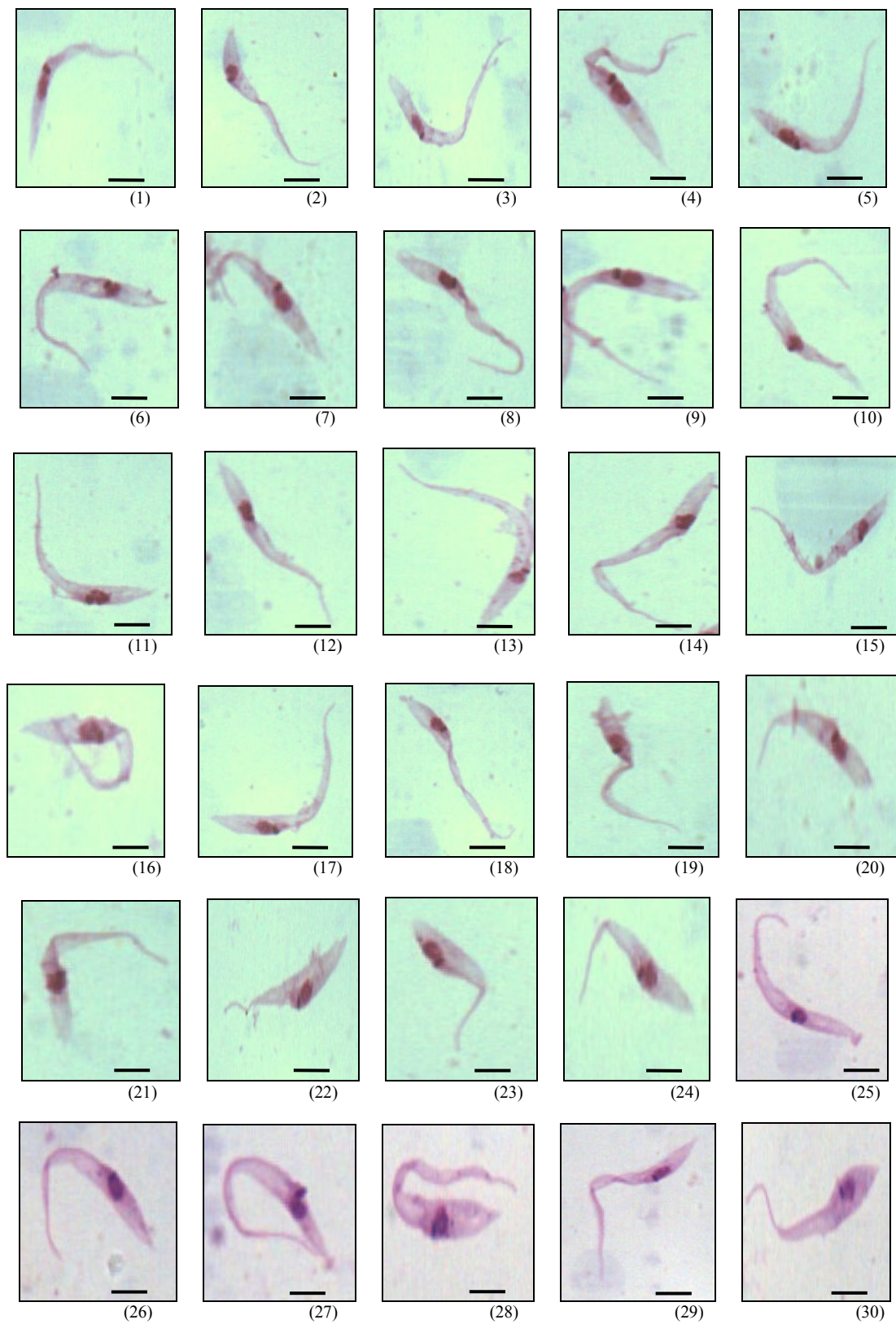
**Figura 20: Diversidade morfológica em formas epimastigotas (100 X) das cepas SI<sub>5</sub> (a), SIGR<sub>3</sub> (b) e SI<sub>8</sub> (c), comparativamente à forma tripomastigota de *T. cruzi* (d). As barras representam 10 µm.**

Observam-se abaixo as fotomicrografias de formas epimastigotas nas cepas SI<sub>5</sub>, SI<sub>8</sub> e SIGR<sub>3</sub> de *T. cruzi* (Figuras 21, 22 e 23).

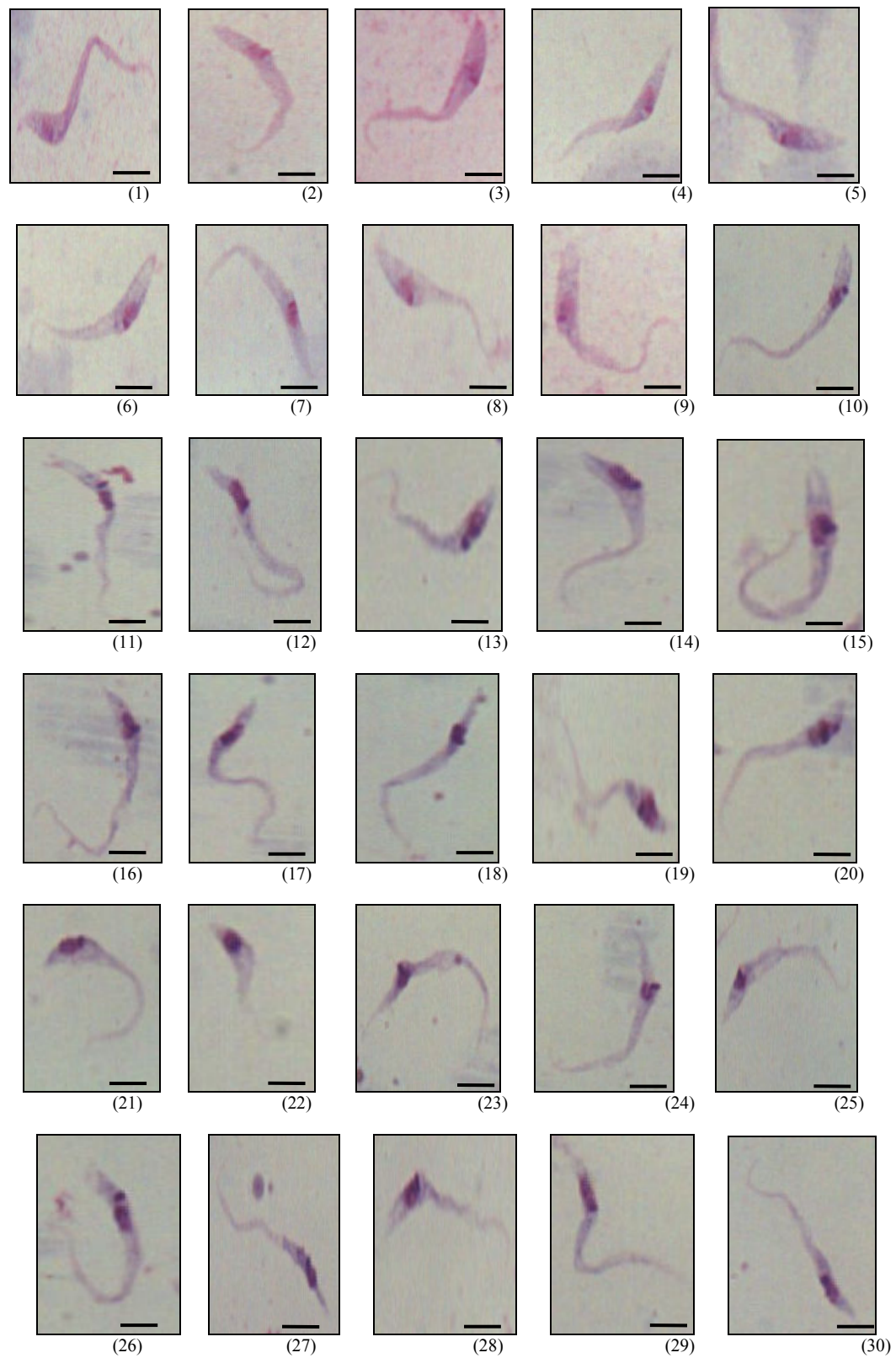




**Figura 21.** Fotomicrografias (1000 X) referentes às formas epimastigotas mensuradas da cepa SI<sub>5</sub> de *T. cruzi*. As barras representam 10 μm.



**Figura 22.** Fotomicrografias (1000 X) referentes às formas epimastigotas mensuradas da cepa SIGR<sub>3</sub> de *T. cruzi*. As barras representam 10 µm.



**Figura 23.** Fotomicrografias (1000 X) referentes às formas epimastigotas mensuradas da cepa SI<sub>8</sub> de *T. cruzi*. As barras representam 10 μm.

Os resultados referentes à avaliação morfométrica de 30 formas epimastigotas das cepas SI<sub>5</sub>, SI<sub>8</sub> e SIGR<sub>3</sub>, estão representados nas Tabelas 12, 13 e 14.

Os parâmetros morfométricos médios das formas epimastigotas das cepas SI<sub>5</sub>, SI<sub>8</sub> e SIGR<sub>3</sub> de *T. cruzi* no meio LIT estão representados na Tabela 15. O valor de significância para as formas epimastigotas está representado na Tabela 16.

**Tabela 12. Resultado da análise morfométrica de 30 formas epimastigotas na cepa SI<sub>5</sub> de *T. cruzi*, obtidas de meio LIT.**

| Parâmetros Morfométricos   | Valores (μm) |        |              |
|----------------------------|--------------|--------|--------------|
|                            | Mínimo       | Máximo | Média ± DP   |
| Comprimento total do corpo | 18,46        | 38,89  | 28,56 ± 5,43 |
| Largura do corpo           | 1,66         | 3,32   | 2,43 ± 0,42  |
| Área do cinetoplasto*      | 0,45         | 1,15   | 0,71 ± 0,16  |
| Área do núcleo             | 2,05         | 4,62   | 3,08 ± 0,66  |
| Distância PN               | 4,56         | 11,67  | 7,11 ± 1,88  |
| Distância NA               | 13,01        | 27,73  | 20,96 ± 3,24 |
| Índice nuclear             | 0,24         | 0,54   | 0,34 ± 0,07  |

\* μm<sup>2</sup>

**Tabela 13. Resultado da análise morfométrica de 30 formas epimastigotas na cepa SI<sub>8</sub> de *T. cruzi*, obtidas de meio LIT.**

| Parâmetros Morfométricos   | Valores (μm) |        |              |
|----------------------------|--------------|--------|--------------|
|                            | Mínimo       | Máximo | Média ± SP   |
| Comprimento total do corpo | 12,11        | 30,80  | 21,96 ± 3,36 |
| Largura do corpo           | 1,24         | 2,91   | 2,07 ± 0,39  |
| Área do cinetoplasto*      | 0,31         | 0,85   | 0,55 ± 0,11  |
| Área do núcleo             | 1,22         | 3,67   | 2,34 ± 0,52  |
| Distância PN               | 2,19         | 6,85   | 4,57 ± 1,19  |
| Distância NA               | 9,47         | 26,50  | 17,31 ± 3,02 |
| Índice nuclear             | 0,15         | 0,45   | 0,27 ± 0,07  |

\* μm<sup>2</sup>

**Tabela 14. Resultado da análise morfométrica de 30 formas epimastigotas na cepa SIGR<sub>3</sub> de *T. cruzi*, obtidas de meio LIT.**

| Parâmetros Morfométricos   | Valores (µm) |        |              |
|----------------------------|--------------|--------|--------------|
|                            | Mínimo       | Máximo | Média ± DP   |
| Comprimento total do corpo | 15,47        | 35,05  | 26,17 ± 4,65 |
| Largura do corpo           | 1,64         | 3,45   | 2,40 ± 0,44  |
| Área do cinetoplasto*      | 0,24         | 0,93   | 0,53 ± 0,14  |
| Área do núcleo             | 1,68         | 20,50  | 2,93 ± 1,21  |
| Distância PN               | 3,63         | 10,41  | 6,83 ± 3,55  |
| Distância NA               | 12,37        | 26,73  | 19,28 ± 1,63 |
| Índice nuclear             | 0,21         | 0,54   | 0,36±0,07    |

\* µm<sup>2</sup>

**Tabela 15. Parâmetros morfométricos médios das formas epimastigotas nas cepas SI<sub>5</sub>, SI<sub>8</sub> e SIGR<sub>3</sub> de *T. cruzi*, obtidas de meio de cultura LIT (n = 30).**

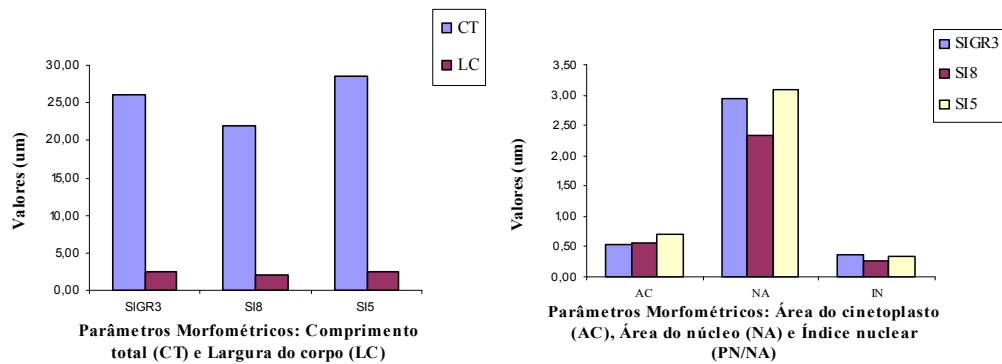
| Parâmetros Morfométricos   | Valores Médios     |                    |                    |
|----------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
|                            | SI <sub>5</sub>    | SI <sub>8</sub>    | SIGR <sub>3</sub>  |
| Comprimento total do corpo | 28,56 <sup>a</sup> | 21,96 <sup>a</sup> | 26,17 <sup>a</sup> |
| Largura do corpo           | 2,43 <sup>a</sup>  | 2,07 <sup>a</sup>  | 2,40 <sup>a</sup>  |
| Área do cinetoplasto*      | 0,71 <sup>a</sup>  | 0,55 <sup>a</sup>  | 0,53 <sup>a</sup>  |
| Área do núcleo             | 3,08 <sup>a</sup>  | 2,34 <sup>a</sup>  | 2,93 <sup>a</sup>  |
| Distância PN               | 7,11 <sup>a</sup>  | 4,57 <sup>a</sup>  | 6,83 <sup>a</sup>  |
| Distância NA               | 20,96 <sup>a</sup> | 17,31 <sup>a</sup> | 19,28 <sup>a</sup> |
| Índice nuclear             | 0,34 <sup>a</sup>  | 0,27 <sup>a</sup>  | 0,36 <sup>a</sup>  |

\* µm<sup>2</sup>

Letras iguais = diferença estatística

Os resultados das mensurações das organelas das formas epimastigotas de *T. cruzi* das cepas SI<sub>5</sub>, SI<sub>8</sub>, SIGR<sub>3</sub> foram representados na figura 24 de modo a facilitar a visualização das distinções entre as mesmas.





**Figura 24.** Resultado da morfometria efetuada com 30 formas epimastigotas das cepas Sigr<sub>3</sub>, SI<sub>8</sub> e SI<sub>5</sub> referente ao comprimento total e largura do corpo e área do cinetoplasto, área do núcleo e índice nuclear.

**Tabela 16.** Análise estatística por meio de Teste Tukey – Kramer Multiple Comparisons (ANOVA paramétrico) referente às mensurações das formas epimastigotas (SI<sub>5</sub>, SI<sub>8</sub> e Sigr<sub>3</sub>) de *T. cruzi*.

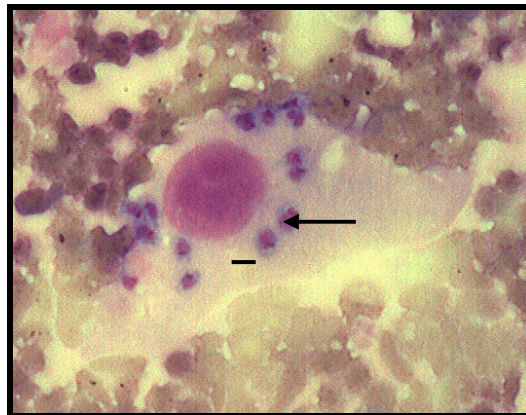
| Parâmetros                    | Valor <i>P</i> - Significância |
|-------------------------------|--------------------------------|
| Comprimento total do corpo    | $P < 0,0001$ ***               |
| Largura do corpo              | $P = 0,0014$ **                |
| Área do cinetoplasto          | $P < 0,0001$ ***               |
| Área do núcleo                | $P = 0,0027$ **                |
| Distância anterior ao núcleo  | $P = 0,0002$ ***               |
| Distância posterior ao núcleo | $P < 0,0001$ ***               |
| Índice nuclear                | $P < 0,0001$ ***               |

\*\* muito significativo ( $P < 0,001$ )

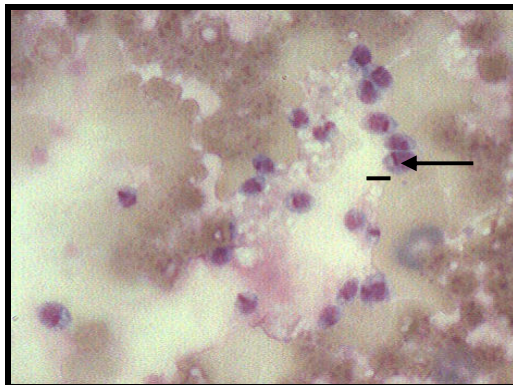
\*\*\* extremamente significativo ( $P < 0,0001$ )

### 5.3 Estudo de formas amastigotas no sangue periférico de camundongos BALB/c

No pico parasitêmico da infecção, durante a caracterização morfológica de formas tripomastigotas sanguíneas, foram observadas formas amastigotas da cepa SI<sub>8</sub> de *T. cruzi* na circulação periférica dos camundongos BALB/c (camundongos 1 e 4), assim como em monócitos, neutrófilos e eosinófilos. O mecanismo de interiorização corresponde a um processo de fagocitose induzida, de que participam tanto o parasito como a célula hospedeira, sendo precedida pela aderência dos tripomastigotas à membrana do macrófago ou outras células. Todas as células cultivadas de mamíferos são passíveis de invasão por *T. cruzi*, porém apenas as formas tripomastigotas podem penetrar em elementos que não desenvolvam atividade fagocitária. A eficiência com que isso se dá depende da natureza da célula e da linhagem do tripanossoma.



**Figura 25:** Formas amastigotas da cepa SI<sub>8</sub> de *T. cruzi* em monócito de camundongo BALB/c (1000X). A seta indica a forma amastigota e a barra representa 1μm.



**Figura 26.** Formas amastigotas livres da cepa SI<sub>8</sub> de *T. cruzi* no sangue periférico de camundongo BALB/c (1000 X). A seta indica a forma amastigota e a barra representa 1μm.

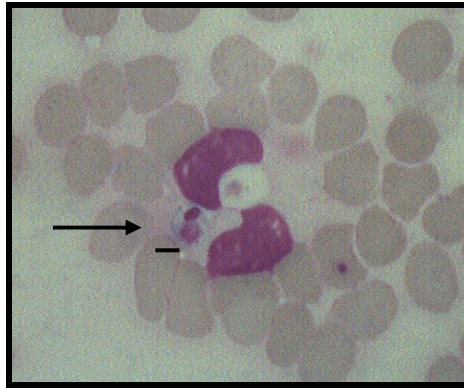


Figura 27. Forma amastigota da cepa SI<sub>8</sub> de *T. cruzi* em eosinófilo de camundongo BALB/c (1000 X). A seta indica a forma amastigota e a barra representa 1µm.



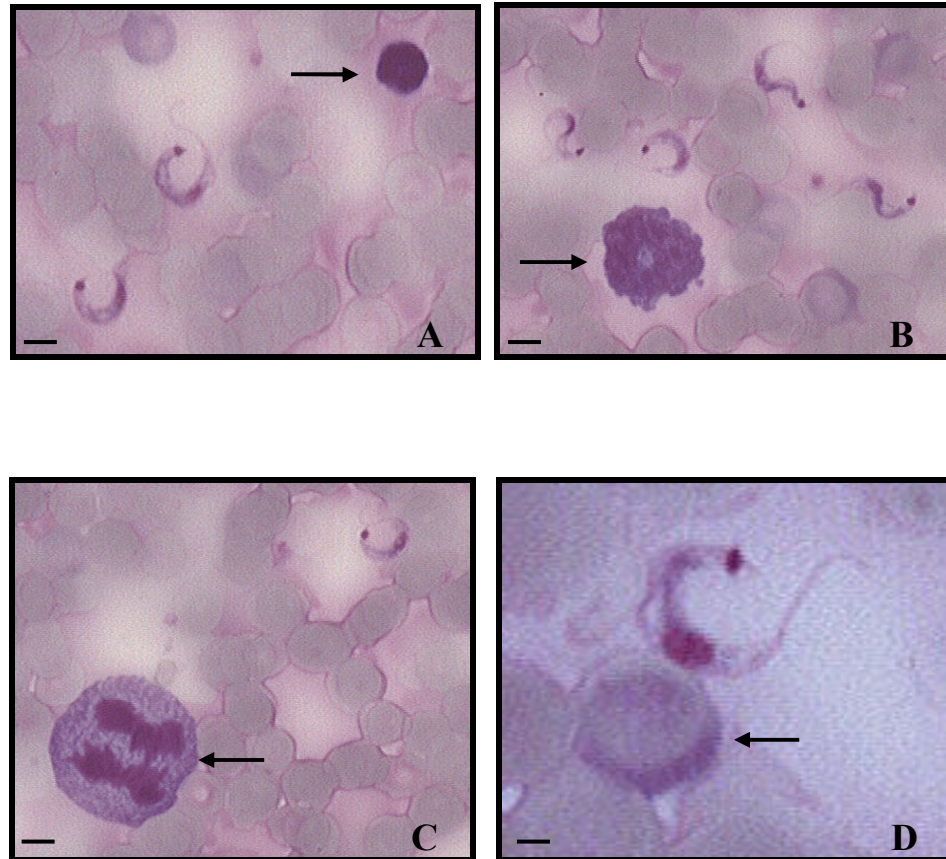
Figura 28. Forma amastigota da cepa SI<sub>8</sub> de *T. cruzi* em neutrófilo de camundongo BALB/c (1000 X). A seta indica a forma amastigota e a barra representa 1µm.



Figura 29. Forma amastigota da cepa SI<sub>8</sub> de *T. cruzi* em monócito de camundongo BALB/c (1000 X). A seta indica a forma amastigota e a barra representa 1µm.



#### 5.4 Células observadas durante infecção experimental por *T. cruzi*



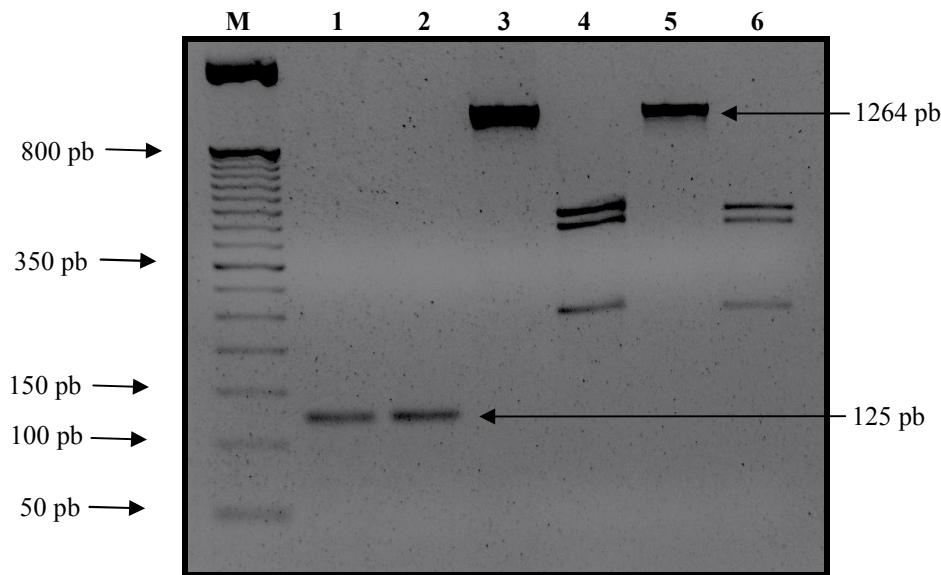
**Figura 30.** Diferentes células em esfregaços sanguíneos de camundongo BALB/c durante infecção chagásica experimental por *T. cruzi* (1000 X). A – Linfócito; B – Basófilo; C – Célula em mitose e D – Eritrócito. As barras representam 10  $\mu$ m.

#### 5.5 Caracterização Molecular

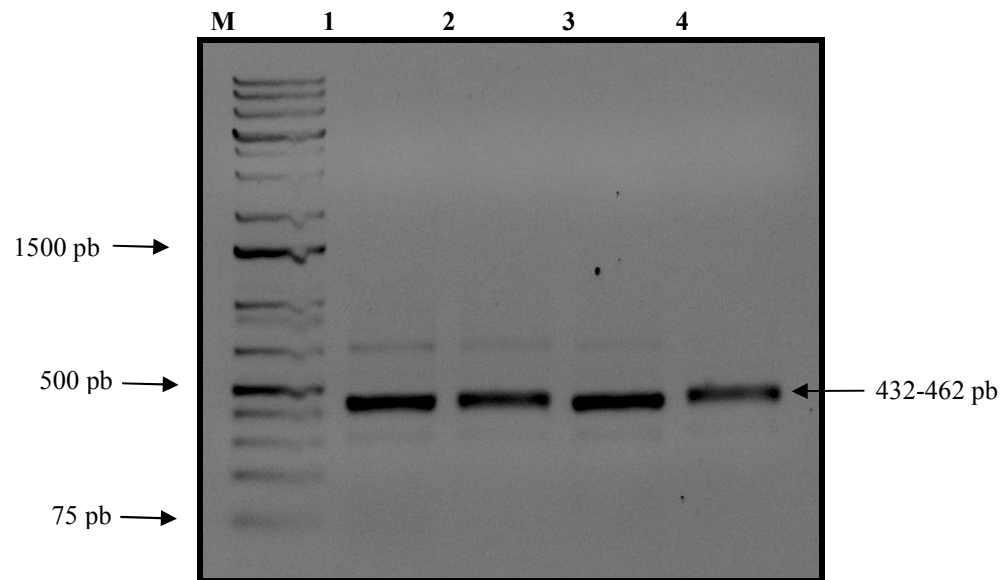
A amplificação do domínio divergente 24 S $\alpha$  rRNA, HSP60 e GPI por meio da técnica tripla de PCR, resulta em produtos de 110 – 125 pb, 432 – 462 pb e 1264 pb respectivamente. Essa técnica é utilizada para a caracterização de cepas isoladas de humanos, triatomíneos e animais reservatórios, e indica a existência de heterogeneidade entre isolados de *T. cruzi* (LEWIS et al., 2009; ZINGALES et al., 2009).

A análise de heterogeneidade genética da fração 24S $\alpha$  do rRNA (LSU – rDNA) demonstrou que as cepas SI<sub>8</sub>, SI<sub>5</sub> e SIGR<sub>3</sub> amplificaram DNA de 125 pb (Figuras 31 e 33). O

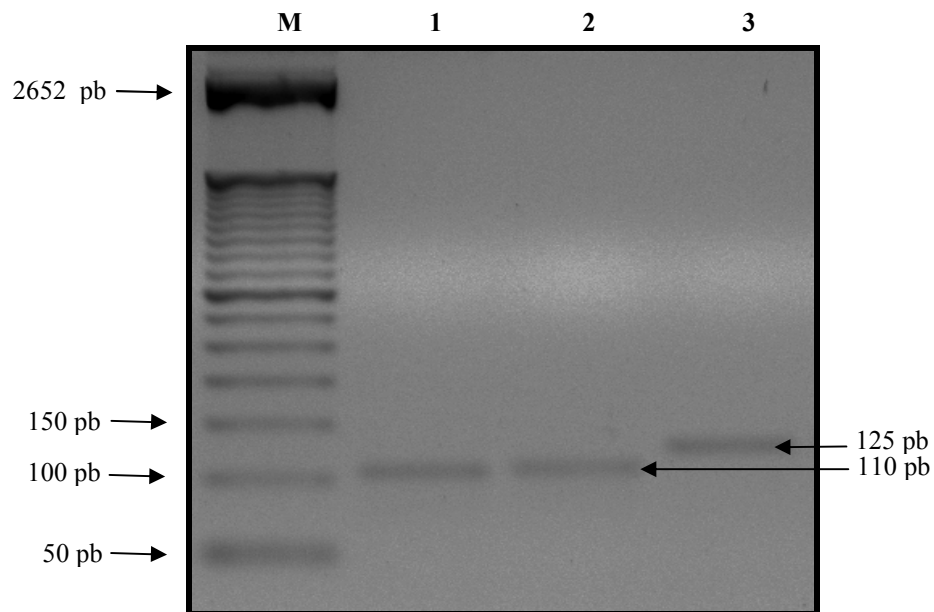
produto do gene HSP60 amplificado mostrou fragmentos entre 432 – 462 pb, apresentando uma banda no gel de agarose 1% (Figura 32 e 35). Para o gene GPI observou-se fragmentos de 1264 pb, com a presença de três bandas no gel de agarose 3% (Figuras 31 e 34). Esses resultados estão de acordo com os encontrados na literatura (LEWIS et al., 2009; ZINGALES et al., 2009) e classificam *T. cruzi* como pertencentes ao grupo II. Os resultados dos produtos da amplificação pela técnica de PCR são mostrados nas Figuras 31, 32, 33, 34 e 35.



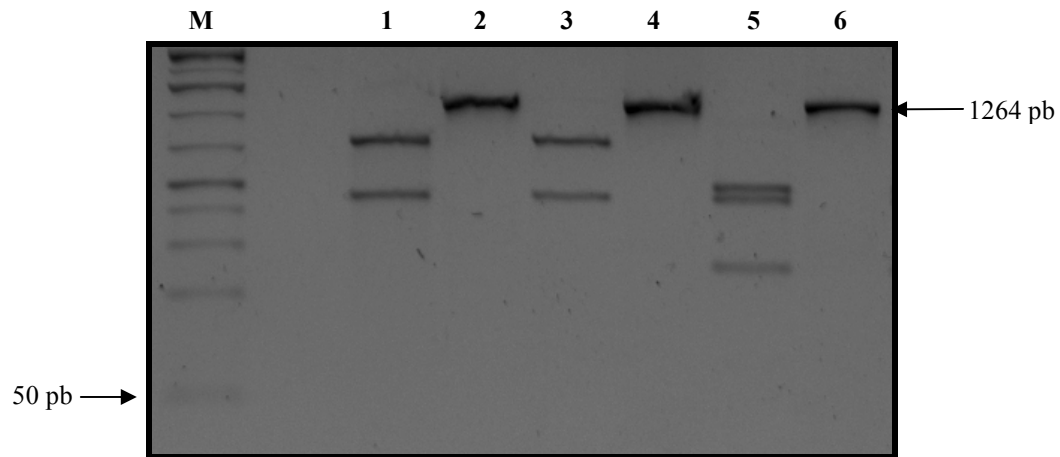
**Figura 31.** Análise do dimorfismo genético da fração 24 S $\alpha$  do rRNA e GPI de *T. cruzi* por PCR e eletroforese em gel de agarose 3% corado com brometo de etídeo. 1 e 2 correspondem às amostras SI<sub>8</sub> e SIGR<sub>3</sub> para a fração D7 (125 pb). 3 (SI<sub>8</sub>) e 5 (SIGR<sub>3</sub>) são referentes ao GPI não digerido demonstrando bandas de aproximadamente 1264 pb. 4 (SI<sub>8</sub>) corresponde ao GPI digerido e mostra 754 pb para a primeira banda seguida de 513 pb. 6 (SIGR<sub>3</sub>) - GPI digerido mostra 592 pb para a primeira banda seguida de 526 pb. A presença de bandas múltiplas é uma característica do gene GPI. A primeira coluna corresponde ao peso molecular 50 pb DNA Ladder (Fermentas).



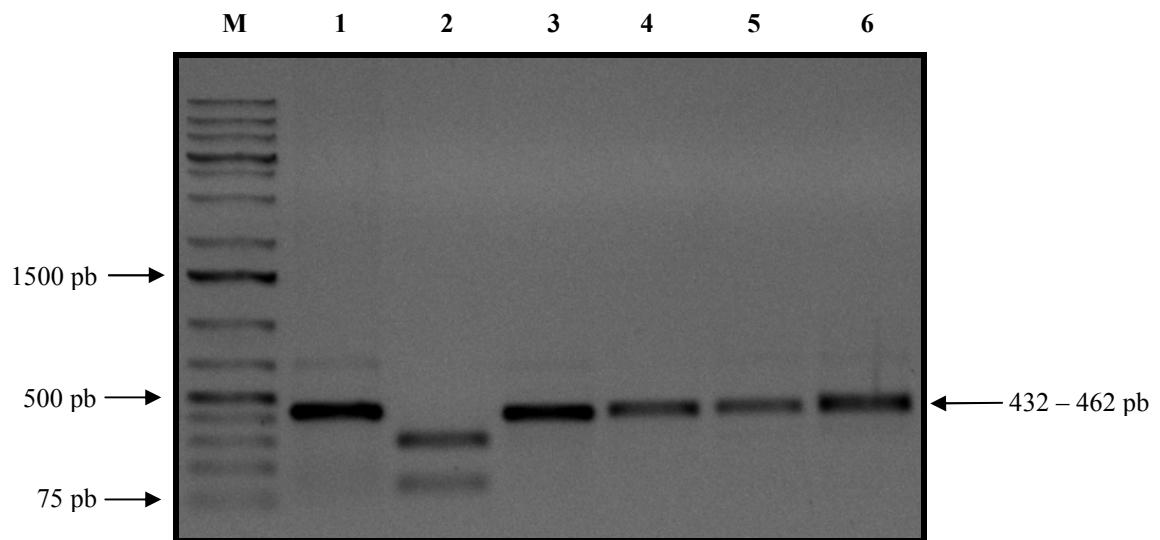
**Figura 32.** Análise do dimorfismo genético do gene HSP60 de *T. cruzi* por PCR e eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo. 1 e 2 correspondem à amostra não digerida SI<sub>8</sub>, 3 e 4 à amostra digerida SIR<sub>3</sub>. Ambas as amostras correspondem a fragmentos entre 432-462 pb específico para esse gene. A primeira coluna corresponde ao peso molecular 1 Kb Plus (Fermentas).



**Figura 33.** Análise do dimorfismo genético da fração 24 S $\alpha$  do rRNA de *T. cruzi* por PCR e eletroforese em gel de agarose 3% corado com brometo de etídeo. 1 e 2 correspondem às amostras controles T.m e T. lenti, respectivamente, para a fração D7 (110 pb). 3 é referente à amostra SI<sub>5</sub> para a fração D7 (125 pb). A primeira coluna corresponde ao peso molecular 50 pb DNA Ladder (Fermentas).



**Figura 34.** Análise do dimorfismo genético da fração GPI de *T. cruzi* por PCR e eletroforese em gel de agarose 3% corado com brometo de etídeo. 2 e 4 correspondem às amostras controles T.m e T. lenti, respectivamente, e 6 (SI<sub>5</sub>) se refere a fração GPI não digerido, demonstrando bandas de aproximadamente 1264 pb. 1 e 3 correspondem as amostras controles T.m e T. lenti e 5 (SI<sub>5</sub>) se refere a fração GPI digerido indicando a presença de bandas múltiplas, características do gene GPI. A primeira coluna corresponde ao peso molecular 50 pb DNA Ladder (Fermentas).

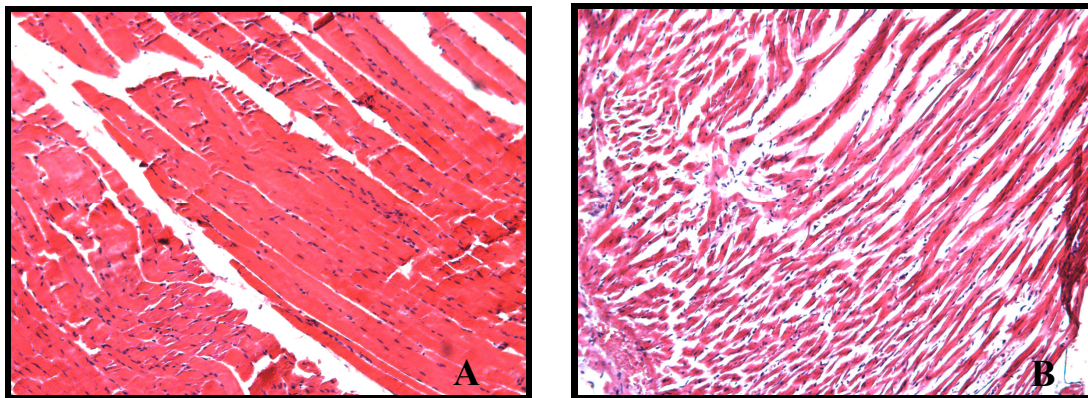


**Figura 35.** Análise do dimorfismo genético do gene HSP60 de *T. cruzi* por PCR e eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo. 1 e 3 correspondem às amostras controles T.m e T. lenti, respectivamente, 5 (SI<sub>5</sub>) a fração não digeridas do HSP60. 2 e 4 correspondem às amostras controles T.m e T. lenti e 6 (SI<sub>5</sub>) a fração digerida da fração HSP60. As amostras correspondem a fragmentos entre 432-462 pb específico para esse gene. A primeira coluna corresponde ao peso molecular 1 Kb Plus (Fermentas).

## 5.6 Estudo Histopatológico

Foram examinados cortes de tecidos e órgãos de camundongos BALB/c experimentalmente infectados com as cepas SI<sub>5</sub>, SI<sub>8</sub> e SIGR<sub>3</sub> de *T. cruzi*. Esses animais foram eutanasiados em diferentes dias da fase aguda (7°, 10°, 14°, 20° e 30° dias) e crônica (150° e 180° dias) da infecção.

Nos cortes histológicos de coração, fígado, baço e músculo esquelético, foi observada reação inflamatória discreta, não sendo verificadas alterações significativas quando comparadas com o controle em todo decorrer da infecção. Ninhos de amastigotas não foram observados para as cepas estudadas. As figuras 36 a 39 são referentes à cepa SI<sub>5</sub>, os cortes histológicos das cepas SI<sub>8</sub> e SIGR<sub>3</sub> não mostraram ninhos de amastigotas e por não apresentarem diferenças histopatológicas para a cepa SI<sub>5</sub>, não foram representados.



**Figura 36.** Cortes histológicos de coração. A. Camundongo controle (100 X). B. Reação inflamatória discreta em camundongo infectado com a cepa SI<sub>5</sub> de *T. cruzi*, 180° dias de infecção (100 X).



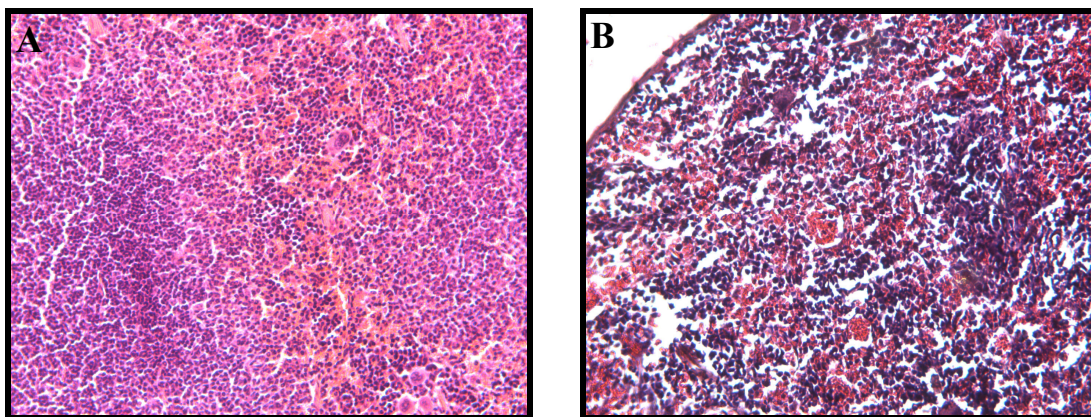


Figura 37. Cortes histológicos de baço. A. Camundongo controle (100 X). B. Camundongo infectado com a cepa SI<sub>5</sub> de *T. cruzi*, 180° dias de infecção (100 X).

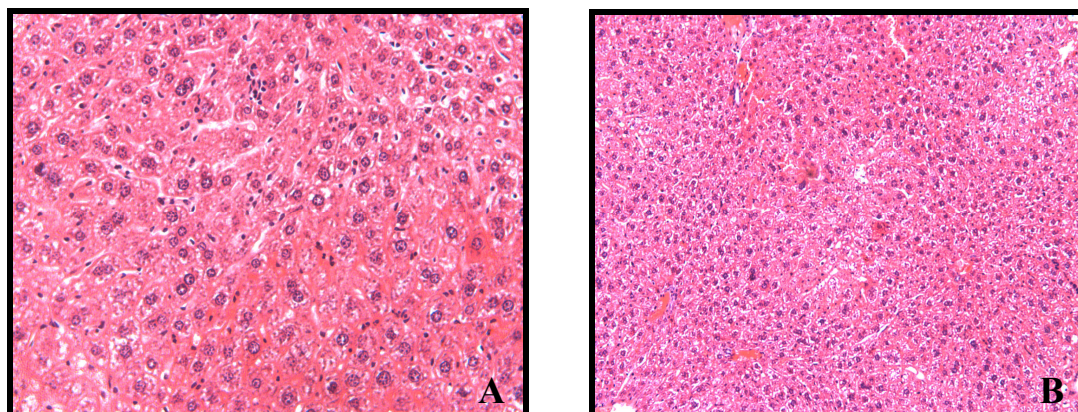


Figura 38. Cortes histológicos de fígado. A. Camundongo controle (200 X). B. Reação inflamatória perivascular e degradação citoplasmática dos hepatócitos em camundongo infectado com a cepa SI<sub>5</sub> de *T. cruzi*, 180° dias de infecção (100 X).

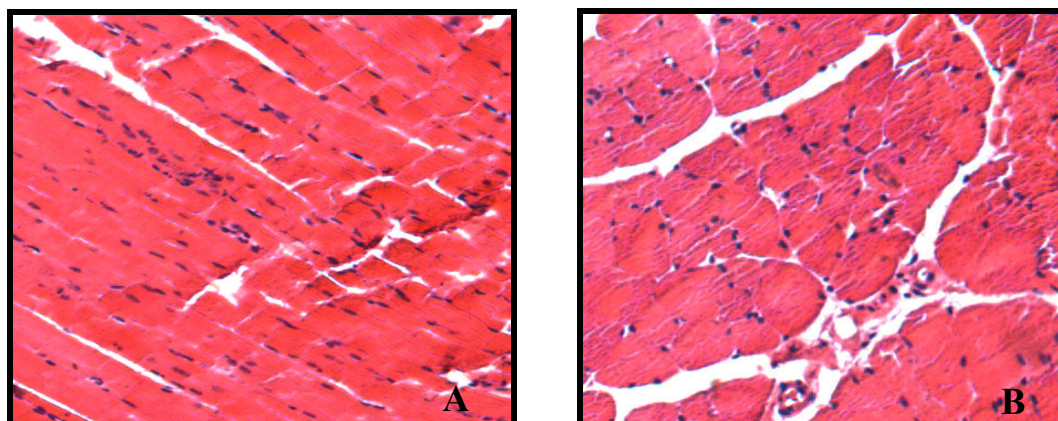


Figura 39. Cortes histológicos de músculo esquelético. A. Camundongo controle (200X). B. Camundongo infectado com a cepa SI<sub>5</sub> de *T. cruzi*, 180° dias de infecção (200 X).

## 6. Discussão

---

### 6.1 Estudo Biológico

Em hospedeiros vertebrados susceptíveis ao *T. cruzi*, o curso da infecção é típico, onde o parasito apresenta-se como formas amastigotas intracelulares e tripomastigotas sanguíneas (TYLER e ENGMAN, 2001). Entretanto, é extremamente variável sofrendo influência de inúmeros fatores, ligados ao hospedeiro, ao meio ambiente e à população do parasito (PINTO et al., 1986). Existe diferença intra-específica, com relação à velocidade de desaparecimento das formas sanguíneas, os tripomastigotas finos ou delgados desaparecem rapidamente na circulação, pois os mesmos pertencem ao grupo dos tripanossomos que mais facilmente penetram diferentes tipos celulares “*in vivo*” e “*in vitro*” (BRENER, 1977). Em oposição, parasitos largos possuem capacidade de penetração reduzida em células do hospedeiro (PINTO et al., 1986).

Devemos ressaltar alguns aspectos ligados à parasitemia provocada pelas cepas estudadas. Pode ser notado, de início, uma grande variação de parasitemia nos animais inoculados com *T. cruzi*, não havendo, aparentemente, relação entre o número de tripomastigotas sanguíneos inoculados e os níveis iniciais de parasitemia, uma vez que o inóculo foi padronizado em todas as cepas estudadas ( $5 \times 10^3$ ). Apesar de algumas variações observadas, as parasitemias puderam ser evidenciadas e mantidas nas cepas estudadas. Considera-se que esses resultados podem auxiliar o isolamento de cepas de *T. cruzi* para estudos semelhantes aos referidos neste trabalho.

As cepas estudadas apresentaram períodos pré-patentes relativamente curtos. Assim as cepas SI<sub>5</sub> e SIGR<sub>3</sub> mostraram período pré-patente de 11 dias, já para a cepa SI<sub>8</sub>, esse período oscilou entre dois e 21 dias (Tabelas 1, 2 e 3). Esse mesmo comportamento foi observado por Schlemper Jr. et al. (1986) ao estudar cepas de origem silvestre provenientes de Santa Catarina. Martins (2008) ao estudar cepas isoladas do vetor *T. rubrovaria* coletados no Distrito de Quaraí - Rio Grande do Sul, também observou período pré-patente curto, oscilando entre 5 e 7 dias.

A variação da parasitemia em animais inoculados com amostras de *T. cruzi* é comentada por vários autores, tais como BARRETO (1965); BELDA NETO (1973); ANDRADE (1974); BELDA NETO et al. (1975); SCHEMPER Jr. et al. (1986); BARATA et al. (1988); PINTO (2000), tanto para as amostras isoladas de humanos, animais silvestres ou vetor. Martins (2008)

ao estudar amostras isoladas de *T. rubrovaria* observou variação da parasitemia entre 21 – 31 dias.

Neste estudo verificou-se que a parasitemia máxima variou entre as cepas SI<sub>8</sub>, SI<sub>5</sub> e SIGR<sub>3</sub>. A parasitemia máxima para a cepa SI<sub>5</sub> foi atingida no 35º dia ( $139,95 \times 10^3$  formas), para a cepa SI<sub>8</sub> foi no 37º dia ( $37,32 \times 10^3$  formas) e para a cepa SIGR<sub>3</sub> no 32º dia ( $30,11 \times 10^3$  formas) (Tabelas 1, 2 e 3).

As diferentes curvas que expressam os perfis parasitêmicos nas três cepas mostram que houve grande variabilidade individual nos animais inoculados (Figuras 9, 10 e 11). Essa variação no comportamento é observada com frequência quando se isola uma nova cepa do parasito, estando relacionado diretamente à estabilização da relação existente entre o parasito e o hospedeiro vertebrado (ALBUQUERQUE, 2001).

Segundo SOGAYAR et al. (1993) a média logarítmica (Mlog) é o melhor parâmetro para expressar a parasitemia quando os dados apresentam grande variabilidade como ocorreu neste estudo, por isso empregou-se a média logarítmica dos valores médios de parasitemia para as cepas e traçou-se a curva que se observa na Figura 12.

A duração da fase aguda variou conforme a cepa, entre os animais inoculados com uma mesma cepa e mesmo inóculo ( $5 \times 10^3$  formas/ 0,3mL). As cepas SIGR<sub>3</sub> e SI<sub>8</sub> apresentaram a fase aguda relativamente curta, entre 08 - 16 e 05 – 21 dias respectivamente. Já para a cepa SI<sub>5</sub> a fase aguda oscilou de 19 - 20 dias (Tabelas 1, 2 e 3).

A patogenicidade para o hospedeiro vertebrado é um caráter marcante de *T. cruzi* e o seu grau de agressividade varia com a cepa em estudo. Assim, algumas cepas podem mostrar-se bastante patogênicas e outras pouco ou destituídas de agressividade (ANDRADE, 1974). Nas cepas SI<sub>5</sub>, SI<sub>8</sub> e SIGR<sub>3</sub>, o grau de agressividade para animais de laboratório mostrou-se variável.

O índice de letalidade para animais de laboratório, inoculados com as diversas cepas de *T. cruzi* tem se mostrado bastante variável (BELDA NETO, 1973; ANDRADE, 1974; MAGALHÃES et al., 1985; BARATA et al., 1988; CARNEIRO et al., 1991; GOMES et al., 1995; ALBUQUERQUE, 2001). Neste estudo o índice de letalidade foi nulo para todas as cepas. Os camundongos foram eutanasiados com 180 dias de infecção e não apresentavam formas tripomastigotas no sangue periférico.

Os experimentos desenvolvidos mostraram perfis parasitêmicos distintos, as curvas apresentaram diferenças em seus períodos pré-patentes e patente e nos seus picos parasitêmicos



alcançados. Brener (1965) relata para a cepa MR parasitemias altas e irregulares que se conservam até o segundo mês de infecção quando diminuíam. Esse conjunto de informações parece sugerir que inicialmente existam dentro de algumas cepas, subpopulações que de alguma forma interagem entre si, permitindo parasitemias irregulares e sobrevida dos animais.

Frente aos dados apresentados pode-se sugerir que as características estabelecidas para uma cepa, em laboratório, ao longo dos anos, seria a resultante da interação do comportamento de vários clones por terem se beneficiado de determinadas condições de manuseio, tiveram sua expressão perpetuada de forma marcante em relação às demais subpopulações anteriormente presentes. Transformações no comportamento biológico das cepas de *T. cruzi* podem ocorrer durante a realização de repiques sucessivos em camundongos, onde as condições de manutenção do laboratório agiriam como meio selecionador (DE ARAÚJO e CHIARI, 1988).

O estudo biológico (Biodema) mostrou que as cepas de Santo Inácio (SI<sub>5</sub>, SI<sub>8</sub> e SIGR<sub>3</sub>), pertencem ao Tipo Biológico III e Zimodema 1 (ANDRADE, 1974). Esse grupo possui como característica a predominância de formas largas e intermediárias no sangue periférico no decorrer da infecção experimental. O pico parasitêmico ocorre por volta do 25° - 30° dia ou após esse período e os animais apresentam baixa mortalidade.

Esse estudo corrobora com os dados da literatura, uma vez que, a maioria das cepas isoladas no Nordeste é classificada como Biodema III e Zimodema 1 (ANDRADE e MAGALHÃES, 1997).

## 6.2 Estudo Morfológico

A forma tripomastigota de *T. cruzi*, parasita do homem e de diversos outros mamíferos, pode apresentar variações na morfologia, conforme assinalado por Chagas em 1909. Esse fenômeno foi considerado como expressão de uma diferenciação sexual, que não foi aceito pela maioria dos autores. Para Brumpt (1912) as formas largas representariam formas evolutivas mais adultas que derivariam de formas delgadas mais jovens presentes no sangue. Já para Meyer e Oliveira (1948) o rompimento precoce das células parasitadas liberaria formas delgadas ao passo que o prolongamento da permanência dos tripanossomas nas células daria origem às formas largas. Segundo Silva (1959) a inoculação, em camundongos, de apenas formas largas daria origem a infecções em que seriam encontradas formas largas, intermediárias e mesmo delgadas (finas).

Devido à grande variabilidade das formas tripomastigotas sanguíneas ao longo da infecção experimental em animais, essas têm sido classificadas em formas delgadas (finas), intermediárias, largas e muito largas (BRENER e CHIARI, 1963; SCHLEMPER et al., 1986).

Diversas denominações foram propostas de modo a caracterizar as diferenças quanto à largura e ao comprimento das formas tripomastigotas de *T. cruzi*. As denominações: fina, intermediária e larga utilizadas neste estudo seguem a terminologia utilizada por Silva (1959), embora a definição precisa do que cada autor refere como forma tripomastigota curta/longa, fina/larga ou intermediária ainda é discutida. Com o objetivo de contribuir para a caracterização morfológica das cepas SI<sub>5</sub>, SI<sub>8</sub> e SIGR<sub>3</sub> as mesmas foram mensuradas.

O aspecto morfológico de formas tripomastigotas sanguíneas das cepas SI<sub>5</sub>, SI<sub>8</sub> e SIGR<sub>3</sub>, apresentou-se semelhante aos caracteres exibidos por outras cepas de *T. cruzi*: flagelo relativamente pequeno, apresentando-se com aspecto de *C* ou *S* itálico, núcleo central ou subcentral, cinetoplasto arredondado ou ovóide, grande e de localização terminal ou subterminal, membrana ondulante delicada e com pequeno número de ondulações e flagelo livre relativamente curto (Figuras 13, 14 e 15).

As cepas (SI<sub>5</sub>, SI<sub>8</sub> e SIGR<sub>3</sub>) estudadas morfológicamente foram caracterizadas como formas curtas para comprimento total médio do corpo e intermediárias para largura (Tabela 5), com valores que variam para comprimento total entre 19,6 – 24,7µm e largura do corpo entre 1,4

– 2,1µm. Os resultados obtidos neste estudo estão de acordo com aqueles obtidos por ROSSI em 2007.

O estudo biométrico das cepas SI<sub>5</sub>, SI<sub>8</sub> e SIGR<sub>3</sub> apresentou pequena variação no comprimento total médio, largura média do corpo e índice nuclear, conforme se observa na Tabela 10. As variações estão em conformidade com as encontradas por Ferriolli et al. (1968), Brener e Chiari (1963) e Belda Neto (1973). Os resultados obtidos nesse estudo estão de acordo com a literatura onde tripomastigotas sanguíneos intermediários e largos têm predominado na maioria das cepas isoladas de humanos, triatomíneos e mamíferos silvestres (BRENER e CHIARI, 1963; ANDRADE, 1974; PINTO, 2000).

As formas delgadas são caracterizadas por apresentarem o cinetoplasto relativamente afastado da extremidade posterior, corpo com aspecto sinuoso, flagelo livre curto e o núcleo difuso. Formas largas apresentam o cinetoplasto bastante próximo da extremidade posterior, o núcleo é ovóide e mais denso e o flagelo livre mais longo. As formas intermediárias possuem caracteres intermediários (ROSSI, 2007).

A cepa Y, isolada por xenodiagnóstico, de um caso humano (SILVA e NUSSENZWEIG, 1953) tem como característica o predomínio de formas delgadas no início da fase aguda, apresentando, posteriormente, as formas largas (ANDRADE, 1974). A cepa CL, isolada por Brener e Chiari (1963), a partir de fezes de *T. infestans* provenientes do município de Encruzilhadas, Rio Grande do Sul, apresenta predominância de formas largas e muito largas sugerindo os autores que esse padrão morfológico possa representar uma característica regional.

As formas largas apresentam o cinetoplasto localizado na porção terminal ou subterminal, núcleo arredondado com tendência à localização anterior, citoplasma intensamente vacuolizado e flagelo mais longo, mas essas formas foram pouco observadas. Brener e Chiari (1963) registraram esse padrão de comportamento em três cepas de *T. cruzi* obtidas a partir de fezes de *T. infestans* provenientes de localidades diferentes do Rio Grande do Sul e classicamente conhecidas por FL, CL e MR.

Segundo SILVA (1959) o que mais caracteriza a forma delgada (fina) é a posição relativamente afastada do cinetoplasto da extremidade posterior, o aspecto sinuoso do corpo do parasito, o flagelo curto e o núcleo difuso. Essas formas foram observadas com maior frequência na amostra SI<sub>8</sub>, embora a mesma apresentasse predomínio de formas intermediárias (Figura 17).

Em relação à variação de comprimento total do corpo do parasito, Zeledon e Vieto (1958) observaram valores entre 17,5 e 25µm com média de 21,5µm ao estudarem uma amostra isolada de *Triatoma dimidiata*. Segundo Ferrioli et al. (1968) esses limites variaram entre 12,2 µm e 25,0 µm com comprimento médio de 18,6µm. Desse modo, os dados obtidos neste trabalho se encontram dentro desses valores, embora pequenas diferenças possam ocorrer decorrentes da metodologia empregada (câmara clara, micro projetor e analisador de imagem respectivamente).

De acordo com a hipótese de Zeledon e Vieto (1958) haveria uma correlação entre o valor do índice nuclear médio e a virulência da cepa. A adaptação de uma cepa a dado hospedeiro seria acompanhada de diminuição da agressividade e da migração do núcleo para a parte posterior do flagelado, resultando a diminuição do índice nuclear médio. Desse modo, quanto menor fosse o índice nuclear, tanto menor seria a patogenicidade da cepa. Os dados de Ferrioli et al. (1968) não confirmam essa hipótese, uma vez que das cepas de origem humana por ele estudadas, a cepa Y é a que apresenta maior agressividade para camundongos e com menor valor de índice nuclear, 0,93 µm, e, a cepa LAOS, que não infecta camundongos, apresenta índice nuclear com valor dos mais elevados, 1,39.

Os resultados obtidos neste estudo não confirmam a hipótese de Zeledon e Vieto (1958), uma vez que a cepa SI<sub>8</sub> apresentou menor índice nuclear (0,62) e infectividade de 100% para os camundongos, seguida da cepa SI<sub>5</sub> (0,64) e SIGR<sub>3</sub> (0,70) ambas com índices nucleares maiores e 80% de infectividade (Tabela 5).

Belda e Neto (1973) estudando várias cepas de origem humana verificaram não existir correlação entre os índices nucleares médios dessas cepas e a agressividade das mesmas. O autor verificou que uma cepa que apresentou o menor índice nuclear médio (0,90 µm) mostrou-se tão patogênica para camundongos quanta outra com o maior índice nuclear médio (1,32 µm) por ele observado.

Vários autores trabalhando com cepas isoladas de casos humanos e de triatomíneos obtiveram índices nucleares variando entre 1,04 e 1,6 (FERRIOLLI et al., 1968). De acordo com o exposto neste estudo, não houve estreita correlação entre o comprimento total médio do corpo, largura do corpo e índice nuclear.

Os resultados das mensurações das cepas SI<sub>5</sub>, SI<sub>8</sub> e SIGR<sub>3</sub> mostraram polimorfismo das formas tripomastigotas sanguíneas, embora com predominância de formas intermediárias no decurso da infecção experimental.

A forma tripomastigota na população de flagelados de uma cultura resulta na metamorfose de formas epimastigotas. Epimastigotas estes típicos com corpo largo e longo, núcleo esférico, cinetoplasto em haste anterior ao núcleo e flagelo livre longo (ROSSI, 2007). Durante um período curto precedendo a fase estacionária da cultura, observou-se uma grande variabilidade de formas intermediárias entre epimastigotas e tripomastigotas, apresentando corpo delgado, núcleo fusiforme, cinetoplasto arredondado e posterior ao núcleo e flagelo curto.

Este trabalho mostrou que o cinetoplasto ocupa distintas localizações nas formas epimastigotas obtidas de meio de cultura LIT, Figura 20 (a – c), onde o mesmo se encontra anterior ao núcleo e Figura 20 (d) com cinetoplasto posterior ao núcleo (forma tripomastigota). Sugere-se a partir dessas observações que a posição do cinetoplasto pode ser interpretada como transformação das formas epimastigotas para tripomastigotas. Tais transformações estão de acordo com a proposta de Brumpt (1912) e os experimentos de Camargo (1964).

Rossi, em 2007, realizou estudo biométrico de formas epimastigotas de *T. cruzi* e seus resultados foram utilizados neste trabalho como padrão numérico. Foram usadas como parâmetros as médias do comprimento total, largura e índice nuclear. As cepas mensuradas SI<sub>5</sub>, SI<sub>8</sub> e SIGR<sub>3</sub>, mostraram respectivamente formas intermediária/intermediária/baixo, curto/intermediário/baixo e curta/larga/baixo para os parâmetros descritos acima.

As observações deste trabalho permitiram demonstrar, como já havia feito Silva (1959) em algumas cepas, que embora o dimorfismo se apresente, em maior ou menor grau, em todas as fases evolutivas da infecção experimental, existe predominância de uma das diferentes formas, isto é, largas, intermediárias ou delgadas (finas), descritas para o *T. cruzi*.

O significado geral desse polimorfismo ainda não foi suficientemente investigado, desconhecendo-se se ele expressa um diferente comportamento biológico das cepas ou se reflete apenas a existência de um “complexo” morfológico a exemplo do que ocorre com outros tripanossomas (BRENER e CHIARI, 1963; ANDRADE, S. G. et al., 1997).

Ao que parece os vários aspectos biológicos e morfológicos das cepas de *T. cruzi* podem estar na dependência de vários fatores, inclusive os hospedeiros que podem funcionar como um meio seletivo, e em se tratando de seres de divisão assexuada, poderíamos dizer que as cepas são frutos de clones selecionados em função de diferentes variantes que se pode encontrar numa relação parasito-hospedeiro-ambiente.

### 6.3 Estudo de formas amastigotas na circulação periférica de camundongos BALB/c

Os resultados referentes ao encontro de formas amastigotas na cepa SI<sub>8</sub> de *T. cruzi* confirmam os experimentos de Carlos Chagas em 1909, onde o pesquisador relata o encontro de formas intraglobulares (amastigotas) de *T. cruzi* em células do sangue periférico de vertebrados. Segundo o autor o aspecto morfológico das formas amastigotas é variável, encontrando-se parcial ou inteiramente incluída em células dos hospedeiros e livres no plasma. Chagas afirma que a penetração de formas tripomastigotas de *T. cruzi* em células no início da infecção em hospedeiros vertebrados pode ser a condição biológica do ciclo evolutivo deste protozoário.

Segundo Brener et al. (2000), durante o ciclo de vida de *T. cruzi*, após aproximadamente cinco dias de infecção pelo parasito, quando a célula hospedeira contém até cerca de 500 amastigotas, inicia-se um processo quase que sincrônico de transformação das formas amastigotas em tripomastigotas. Logo que as formas adquirem um flagelo mais longo, iniciam um movimento intenso, que, aparentemente, é o responsável pela rotura da célula hospedeira, com, liberação de muitos tripomastigotas, e em certos casos, formas amastigotas no espaço intercelular. Os dados disponíveis sugerem que as formas tripomastigotas e amastigotas de *T. cruzi* possuem capacidade de infectar outras células no próprio ambiente onde foram liberadas, ou atingir a corrente circulatória e distribuir-se por todo o organismo.

Os resultados obtidos neste estudo mostram-se necessários, uma vez que os dados da literatura sugerem que formas tripomastigotas de *T. cruzi* podem potencialmente penetrar em qualquer tipo celular encontrado no local e aí se desenvolver, exceto em neutrófilos e eosinófilos (BRENER et al, 2000). Entretanto, os dados mostrados apontam para a penetração de formas tripomastigotas de *T. cruzi* em células como, eosinófilos, monócitos e neutrófilos em camundongos BALB/c para a cepa SI<sub>8</sub> isolada de *T. sordida*, coletada no peridomicílio em Santo Inácio (BA).

## 6.4 Estudo Histopatológico

Linhagens do protozoário *T. cruzi* devem ser descritas por meio de características biológicas e genéticas (ANDRADE e MAGALHÃES, 1997). Os resultados referentes à caracterização biológica classificaram as cepas de Santo Inácio como pertencentes ao Biodema III e Zimodema 1 de *T. cruzi*. Cepas inseridas nesse Biodema/Zimodema estão associadas ao ciclo silvestre de transmissão da doença de Chagas, podendo ocorrer em pacientes dos Estados do Norte e Nordeste do Brasil (MILES et al, 1980).

Andrade (1985) realizou um estudo com 200 camundongos infectados cronicamente e demonstrou que cepas inseridas no Biodema III e Z1 são mais patogênicas, determinando lesões na musculatura esquelética e parasitismo. Alterações eletrocardiográficas foram mais frequentes e intensas nas cepas classificadas nesse Biodema. Lesões cardíacas também ocorreram na fase crônica de camundongos infectados com cepas do Biodema I e II, assim como determinam envolvimento de células neuronais (ANDRADE, 1974; ANDRADE e ANDRADE, 1966).

Souza et al. (1996) observaram alterações inflamatórias em células ganglionares do sistema nervoso autônomo em cepas pertencentes ao Biodema I, II e III. Estudos experimentais têm demonstrado que diferentes cepas de *T. cruzi* podem determinar lesões tissulares peculiares e essa peculiaridade pode ser consequência de um tropismo específico por diferentes células de mamíferos (macrófagos, músculo esquelético, cardíaco e neurônios).

Cepas de *T. cruzi* podem determinar diferentes reações celulares, assim como, respostas imunológicas diversas que dependem, em parte, do modelo animal utilizado e da linhagem do parasito (ANDRADE, 1984). Os resultados obtidos neste estudo apontam reação inflamatória discreta, não sendo observados ninhos de amastigotas e alterações significativas quando comparadas com o controle em todo decorrer da infecção. Provavelmente esse resultado pode ser devido à baixa parasitemia apresentada pelos animais inoculados com as cepas SI<sub>5</sub>, SI<sub>8</sub> e SIGR<sub>3</sub> de *T. cruzi*, o que dificultou o encontro de formas amastigotas nos cortes histológicos de coração, fígado, baço e músculo esquelético da coxa dos camundongos BALB/c.

A ampla distribuição e a diversidade das cepas de *T. cruzi* causam dificuldade na interpretação das diferentes manifestações clínicas da doença de Chagas. É provável que o predomínio do mesmo Biodema e Zimodema em determinada região pode estar relacionado com as principais manifestações da doença nesta área (ANDRADE e MAGALHÃES, 1997).

## 6.5 Estudo Molecular

Desde a descrição do *T. cruzi* por Chagas (1909) inúmeras cepas têm sido isoladas de vários hospedeiros de diferentes regiões (DE ARAÚJO e CHIARI, 1988). Alguns trabalhos demonstram a importância do manuseio desses parasitos em laboratório. A heterogeneidade de subpopulações que constituem as cepas de *T. cruzi* vem sendo avaliadas frente a parâmetros como cinética de crescimento de epimastigotas, comportamento no vetor, análises de esquizodemas e zimodemas e DNA, composição antigênica, comportamento em animais isogênicos e infectividade para células de cultura (DVORAK et al., 1980; GARCIA.; DVORAK, 1980; MOREL et al., 1980; DVORAK et al., 1982; BRONGERTZ; DVORAK, 1983; POSTAN et al., 1983;

Recentemente, com base na análise das porções que codificam os genes 24Sα RNA, GPI e HSP60 por meio da reação de PCR as cepas de *T. cruzi* foram divididas em seis grupos (LEWIS et al. 2009; ZINGALES et al. 2009). As análises do DNA das cepas coletadas em Santo Inácio as enquadram no grupo II, o mesmo grupo da cepa Y, apesar de as mesmas apresentarem diferenças comportamentais durante a infecção experimental em camundongos, e assim pertencerem a Biodemas diferentes. Os parasitos inseridos nesse grupo estão relacionados ao ciclo de transmissão doméstico nos países da América do Sul, incluindo a Argentina, Brasil, Bolívia, Chile, Paraguai e Uruguai (CHAPMAM et al., 1984; MARTINS et al., 2008).

Na tentativa de se agrupar os parâmetros morfobiométricos e as características moleculares de diferentes linhagens de *T. cruzi*, a comunidade científica agrupou as diferentes cepas em dois grupos principais *T. cruzi* I e *T. cruzi* II (ANONYMUS, 1999). Cepas designadas *T. cruzi* I apresentariam Zimodema 1, Biodema III e Linhagem 2, cepas designadas *T. cruzi* II eram equivalentes ao Zimodema 2, Biodema II e Linhagem 1. Desse modo, as cepas SI<sub>5</sub>, SI<sub>8</sub> e SIGR<sub>3</sub> estudadas pertencem ao Grupo I de *T. cruzi*, uma vez que foram classificadas como pertencentes ao Biodema III, Zimodema 1 e Linhagem II (grupo II).

É necessário ressaltar a procedência das três cepas estudadas, ou seja, isoladas de exemplares de *T. sordida* (SI<sub>5</sub> e SI<sub>8</sub>) em 2003 e por xenodiagnóstico (SIGR<sub>3</sub>) aplicado a um gato no peridomicílio de uma residência em 2006, no município de Gentio do Ouro, Estado da Bahia. Apesar do fato de que as cepas tenham sido isoladas de hospedeiros e épocas distintas, a análise



do DNA as enquadra no grupo II, o que indica que nesse local circula uma mesma linhagem de *T. cruzi*.

*Triatoma sordida* apresenta importantes características que fazem dele um bom vetor, como a capacidade de colonizar o peridomicílio (EMMANUELLE-MACHADO et al., 2002). A adaptação pelos indivíduos que constituem uma população representa um importante atributo dentro da unidade ecológica. Devem ser ponderadas diferenças quanto ao ambiente físico, já que diferenças ambientais podem influenciar diversos atributos populacionais (CABELLO, 1999). Em 1998, Cerqueira relatou soropositividade para *T. cruzi* em Santo Inácio e Iraquara (BA), esse estudo mostrou que regiões Nordeste do Brasil, possuem características ótimas para o desenvolvimento de espécies vetoras do parasito *T. cruzi*.

*Triatoma sordida* apresenta características pré-adaptativas ao ecótopo domiciliar, uma vez que insetos adultos são encontrados no peri e intradomicílio de residências (ALMEIDA et al., 2000). Recentemente, o potencial adaptativo desses insetos a novos ambientes sugere uma plasticidade genômica que é mostrada pela alta variabilidade genética intra-específica, detectada em populações de triatomíneos, por meio de marcadores moleculares (PACHECO et al., 2007).

Este estudo constou da caracterização biológica, morfológica e genética do parasito *T. cruzi* isolado de *T. sordida*. Esses dados mostraram que cepas da Bahia possuem patogenicidade e infectividade em camundongos BALB/c. Juntos, esses dados demonstram a necessidade de vigilância entomológica na região Nordeste do Brasil para prevenir a doença de Chagas na citada região.

O resultado obtido neste trabalho corrobora dados da literatura, uma vez que cepas isoladas na Bahia, São Paulo, Bolívia, Chile e Peru pertencem ao grupo II do *T. cruzi* (ZINGALES et al. 2009).

## 7. Conclusões

---

1. O estudo biológico mostrou que as cepas SI<sub>5</sub>, SI<sub>8</sub> e SIGR<sub>3</sub> de *T. cruzi* isoladas em Santo Inácio, pertencem ao Biodema III e Zimodema 1 (Grupo I).
2. O estudo morfológico de formas tripomastigotas sanguíneas mostrou parâmetros intermediários para largura e curto para o comprimento.
3. O valor do índice nuclear das formas tripomastigotas das cepas SI<sub>5</sub>, SI<sub>8</sub> e SIGR<sub>3</sub> não se mostrou associado à infectividade da cepa.
4. As formas epimastigotas da cepa SI<sub>5</sub> foram classificadas como intermediárias para o comprimento total.
5. As formas epimastigotas das cepas SI<sub>8</sub> e SIGR<sub>3</sub> apresentaram-se curtas para o comprimento total.
6. As formas tripomastigotas das cepas SI<sub>5</sub> e SI<sub>8</sub> foram classificadas como intermediárias para a largura e SIGR<sub>3</sub> apresentou-se larga.
7. Em relação ao índice nuclear, as formas epimastigotas apresentaram baixo índice, isto é abaixo de 1,04  $\mu\text{m}$ .
8. O estudo de formas amastigotas apontou a presença dessas formas em monócitos, eosinófilos, neutrófilos e sangue periférico de camundongos BALB/c.
9. A caracterização molecular das cepas SI<sub>8</sub>, SI<sub>5</sub> e SIGR<sub>3</sub> de *T. cruzi* permitiu a classificação das mesmas como pertencentes ao grupo II (Linhagem II).

## 8. Referências Bibliográficas

---

ALBUQUERQUE, S. Considerações relativas ao comportamento biológico de amostras de uma cepa de *Trypanosoma cruzi*, obtidas por centrifugação diferencial. 2001. 106 f. **Tese (Livre-Docente)**. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - USP, Ribeirão Preto, 2001.

ALMEIDA, C. et al. Monitoring the domiciliary and peridomiciliary invasion process of *Triatoma rubrovaria* in the state of Rio Grande do Sul, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 95, p. 761 - 768, 2000.

ANDRADE, S. G. Estudo imunopatológico de camundongos de seis diferentes linhagens isogênicas à infecção por três tipos de cepas do *Trypanosoma cruzi*. **Tese de Doutorado**. Salvador, Bahia, 1984.

ANDRADE, S. G. Morphological and behavioural characterization of *Trypanosoma cruzi* strains. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 18, p. 39 - 46, 1985.

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

ANDRADE, S. G.; ANDRADE, Z. A. Doença de Chagas e alterações neuronais do plexo de Auerbach. (Estudo experimental em camundongos). **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 8, p. 219 - 224, 1966.

ANDRADE, S. G.; MAGALHÃES, J. B. Biodemes and zimodemes of *Trypanosoma cruzi* strains: correlations with clinical data and experimental pathology. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.30, n.1, p. 27 - 35, 1997.

ANDRADE, S. G.; CARNEIRO, A. F.; SOUZA, A. J. M.; LIMA, E. S.; ANDRADE, Z. A. Influence of treatment with immunosuppressive drugs in mice chronically infected with *Trypanosoma cruzi*. **Int. J. Exp. Path.**, v. 78, p. 391 - 399, 1997.

ANDREWS, N.W., ABRAMS, C.K., SLATIN, S.L., GRIFFITHS, F. A *Trypanosoma cruzi*-secreted protein immunologically related to the complement component C9: evidence for membrane pore forming activity at low pH. *Cell*, v.61, p. 1277 - 1287, 1990.

ANONYMUS. Recommendations from a Satellite Meeting. International Symposium to commemorate the 90<sup>th</sup> anniversary of the discovery of Chagas disease. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94, p. 429 - 432, 1999.

ARAUJO, T.C.; CASTRO, J.; CASTRO, S.L. Doença de Chagas. Manual para experimentação animal. Fiocruz, **Instituto Oswaldo Cruz**, 2000.

BARATA, J. M. S. et al. Primeiro caso autóctone de tripanossomíase Americana do Estado do Acre (Brasil) e sua relação com as cepas isoladas do caso humano e de triatomíneos silvestres da área. **Revista de Saúde Pública**, v. 22, n. 5, p. 401 – 410, 1988.

BARRET, T.V., HOFF, R.H., MOTT, K.E., MILES, M.A., GODFREY, D.G., TEIXEIRA, R., ALMEIDA DE SOUZA, J.A., SHERLOCK, I.A. Epidemiological aspects of tree *Trypanosoma cruzi*: two types of parasite populations presenting distinct characteristics. **PAHO Scientific Publication**, v. 347, p.11 - 21, 1980.

BASSI, M.; ROSA, J. A. da. Isolamento e caracterização de cepas de *Trypanosoma cruzi* (KINETOPLASTIDA, TRYPANOSOMATIDAE) isoladas de gato, proveniente de Santo Inácio, Bahia. In: **JORNADA FARMACÊUTICA DA UNESP**, 54., Araraquara, 2007.

BÉRENGER, J.M.; BLANCHET, D. A new species of the genus *Panstrongylus* from French Guiana (Heteroptera; Reduviidae; Triatominae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 102 n.6, p. 733 - 736, 2007.

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

BELDA NETO, F. M. Estudos sobre a existência de correlação entre os dados biométricos e o grau de patogenicidade de amostras humanas do *Trypanosoma cruzi* Chagas, 1909. 1973. 76 f. **Tese (Doutorado)**. Faculdade de Farmácia e Odontologia de Araraquara, Unesp, Araraquara, 1973.

BELDA NETO, F. M.; RIBEIRO, R. D.; BARRETO, M. P. Considerações sobre as características da infecção de camundongos inoculados com formas amastigotas ou flageladas do *Trypanosoma cruzi*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 10, n. 3, p. 137 - 142, 1975.

BRENER, Z. Comparative studies of different strains of *Trypanosoma cruzi*. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 59, p. 19 - 26, 1965.

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

BRENER, Z. Intraspecific variation in “*Trypanosoma cruzi*”: two types of parasite populations presenting distinct characteristics. **Pan American Health Organization**. Washington, D.C, p. 11 - 21, 1977.

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

BRENER, Z.; CHIARI, E. Variações morfológicas observadas em diferentes amostras de *Trypanosoma cruzi*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, v.5, n.5, p. 220 - 224, 1963.

BRISSE, S.; BARNABÉ, C.; TIBAYRENC, M. Identification of six *Trypanosoma cruzi* phylogenetic lineages by random amplified polymorphic DNA and multilocus enzyme electrophoresis. **International Journal for Parasitology**, v.30, p.35 - 44, 2000.

BRUMPT, E. Le *Trypanosoma cruzi* évolue chez *Conorhinus megistus*, *Cimex lecticularis*, *Cimex boueti* et *Ornithodoros moubata*. **Bulletin of the Exotic Pathology Society**, v.5, p. 360-367, 1912.

BONGERTZ, V.; DVORAK, J. A. *Trypanosoma cruzi*: antigenic analysis of cloned stocks. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 32, n. 4, p. 716 - 722, 1983.

BOSENSO, M.F., BARNABÉ, C., MAGALLÓN GASTÉLUM, E., LOZANO KASTEN, F., RAMSEY, J., ESPINOZA, B., BRENIÈRE, S.F. Predominance of *Trypanosoma cruzi* Lineage I in Mexico, **Journal of Clinical Microbiology**, v.40, n.2, p.627 - 632, 2002.

BOZELLI, C. E. et al. Clinical and epidemiological profile of patients with Chagas disease at the University Hospital in Maringá, Paraná, Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 22, n. 5, p. 1027-1034, 2006.

BURLEIGH, B. A; WOOLSEY, A. M. Cell signaling and *Trypanosoma cruzi* invasion. **Cellular Microbiology**, v.4, n. 11, p. 701 - 711, 2002.

CABELLO, D. R. Effects of environmental temperature on life tables of *Rhodnius neivai* Lent, 1953 (Hemiptera: Reduviidae) under experimental conditions. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94, p. 709 – 714, 1999.

CAMARGO, E.P. Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi*. I. Origin of metacyclic trypanosomes in liquid media. *Rev. Instituto de Medicina Tropical*, v.4, p. 93-100, 1964.

CARNEIRO, M.; ROMANHA, A.J.; CHIARI, E. Biological characterization of *Trypanosoma cruzi* strains from different zymodemes and chizodemes. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.86, n.4, p.387 - 393, 1991

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

CHAGAS, E. Summula dos conhecimentos actuaes sobre a Trypanosomiasis americana. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 30, n. 3, p. 387 – 416, 1935.

CHAPMAM, M. D. et al. *Trypanosoma cruzi* from te Paraguayan Chaco: isoenzyme profiles of strains isolated at Makthalawaiya. **Journal of Protozoology**, v.31, p. 482 - 486, 1984.

CERQUEIRA, R. L. de. et al. Santo Inácio Revisited: Protozoan diseases in an isolated village in northeastern Brazil after twenty years . **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, São Paulo, v.59, p. 736 - 740, 1998.

CDC (Centers for Disease Control & Prevention). Division of Parasitic. Laboratory identification of Parasites of Public Health Concern. National Center for infectious Diseases, DPDx Identification and Diagnosis of Parasites of Public Health Concern. Disponível em <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx>. Acessoem 18 de setembro de 2009.

COSTA, J.; ARGOLLO, A.; FELIX, M. Redescription of *Triatoma melanica* Neiva & Lent, 1941, new status (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). **Zootaxa**. v. 1385, p. 47-58, 2006.

COSTA, J.; FELIX, M. *Triatoma juazeirensis* sp. nov. from the state of Bahia, Northeastern Brazil (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 102, p. 87 - 90, 2007.

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.

DE SOUZA, A. P. et al. Enzymatic markers of heart lesion in mice infected with *Trypanosoma cruzi* and submitted to benznidazole chemotherapy. **Parasitology**, v. 86, n. 10, p. 800 - 808, 2000.

DE ARAÚJO, S. M.; CHIARI, E. Caracterização biológica de clones das cepas Y, CL e MR de *Trypanosoma cruzi* em camundongos C<sub>3</sub>H isogênicos. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 83, n. 2, p. 175 – 181, 1988.

DIAS, E.; FREITAS FILHO, L. Introdução ao estudo biométrico dos hemoflagelados do gênero *Schizotrypanum*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 38, n.3, 1943.

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. Notas sobre o *Trypanosoma cruzi* e suas características bio-ecológicas, como agente de enfermidades transmitidas por alimentos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, p. 370-375, 2006.

DIAS, L. C. et al. Quimioterapia da doença de Chagas: estado da arte e perspectivas no desenvolvimento de novos fármacos. **Química Nova**, v. 32, n. 9, p. 2444 - 2457, 2009.

DVORAK, J. A. et al. *Trypanosoma cruzi*: flow cytometric analysis. I. Analysis of total DNA/organism by means of mithramycin-induced fluorescence. **Journal of Protozoology**, v. 29, n. 3, p. 430 - 437, 1982.

DVORAK, J. A.; HARTMAN, D. L.; MILES, M. A. *Trypanosoma cruzi*: correlation of growth kinetics to zymodeme type in clones derived from various sources. **Journal of Protozoology**, v. 27, n. 4, p. 472 - 474, 1980.

EMMANULLE – MACHADO, P. et al. Biology of *Triatoma klugi* Carcavallo, Juberg, Lent & Galvão 2001 (Hemiptera: Reduviidae) under laboratory conditions: effects of distinct blood sources and susceptibility to *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma cruzi rangeli*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, p. 583 – 587, 2002.

FERNANDES, O. et al. Brazilian isolates of *Trypanosoma cruzi* from humans and triatomines classified into two lineages using mini-exon and ribosomal RNA sequences. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 58, n. 6, p. 807 - 811, 1998.

FERRIOLLI FILHO, F.; BARRETO, M.P.; CARVALHEIRO, J.R. Estudos sobre reservatórios e vectores silvestres do *Trypanosoma cruzi* XXIV. Variação dos dados biométricos obtidos em amostras do *T. cruzi* isoladas de casos humanos de Doença de Chagas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.2, p.1 - 8, 1968.

FORERO, D.; WEIRAUCH, C.; 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.

GALVÃO, C.; ANGULO, V. M. *Belminus corredori*, a new species of Bolboderini (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) from Santander, Colombia. **Zootaxa**. v. 1241, p. 61- 8, 2006.

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

GARCIA, E. S.; DVORAK, J. A. Growth and development of two *Trypanosoma cruzi* clones in the arthropod *Dipetalogaster maximus*. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 31, n. 2, p. 259 – 262, 1980.

GOMES, Y.M. et al. Characterization of a *Trypanosoma cruzi* strain isolated from a non endemic area in northeast Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, v.37, n.1, p.87 - 89, 1995.

HEATH, S.; HIENY, S.; SHER, A. A cyclic AMP inducible gene expressed during development of infective stages of *Trypanosoma cruzi*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 43, p. 133 - 142, 1990.

KIPNIS, T. L.; DA SILVA, W.D. Evasion of *Trypanosoma cruzi* from complement lysis. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.22, n. 1, p. 1 - 16, 1989.

KIRCHHOFF, L.V., VOTAVA, J.R., OCHS, D.E., MOSER, D.R. Comparison of PCR and microscopic methods for detecting *Trypanosoma cruzi*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.34, n.5, p.1171 - 1175, 1996.

JURBERG, J.; ROCHA, D. S.; GALVÃO, C. *Rhodnius zeledoni* sp. nov. afim de *Rhodnius paraensis* Sherlock, Guitton & Miles, 1977 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). **Biota Neotropica**. v. 9, n. 1, p. 123 - 128, 2009.

LEWIS, M.D. et al. Genotyping of *Trypanosoma cruzi*: Systematic Selection of Assays Allowing Rapid and Accurate Discrimination of All Known Lineages. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.81, n.6, p. 1041 - 1049, 2009.



LUQUETTI, A. O. et al. *Trypanosoma cruzi*: zymodemes associated with acute and chronic Chagas' disease in central Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 80, p. 462 - 470, 1986.

MAEGAWA, F. A. B. Autochthonous Chagas' disease in Santa Catarina State, Brazil: report of the first case of digestive tract involvement. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, p. 609 - 612, 2003.

MAGALHÃES, J.B.; PONTES, A.L.; ANDRADE, S.G. Comportamento das cepas Y e Peruana do *Trypanosoma cruzi* no camundongo, após passagem em diferentes meios. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.80, n.1, p.41 - 50, 1985.

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

MACEDO, A. M.; PIMENTA, J.R.; AGUIAR, R.S.; MELO, A.I.R.; CHIARI, E.; ZINGALES, B.; PENA, S.D.J. Usefulness of microsatellite typing in population genetic studies of *Trypanosoma cruzi*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.96, p.407 - 413, 2001.

MARTINEZ, I. Caracterização de duas cepas de *Trypanosoma cruzi* CHAGAS, 1909(KINETOPLASTIDAE) isoladas de exemplares de *Triatoma rubrovaria* (BLANCHARD, 1843) (HEMIPTERA, REDUVIIDAE) coletadas em ambiente silvestre. 2004. 85 f. **Tese (Doutorado em Análises Clínicas)**. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara da Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2004.

MARTÍNEZ, E. et al. *Triatoma boliviana* sp. n. de los valles subandinos de La Paz, Bolivia (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae), similar a *Triatoma nigromaculata* Stål, 1859. **Boletín del Instituto de Investigación en Salud y Desarrollo**. n. 3, p. 1 - 11, 2007.

MARTINS, L. P. A. Verificação da Suscetibilidade de três espécies Triatominae (Hemiptera, Reduviidae) a infecção por duas cepas de *Trypanosoma cruzi* (Kinetoplastidae, Trypanosomatidae) utilizando xenodiagnóstico artificial. 1999. 105 f. **Dissertação (Mestrado em Análises Clínicas)**. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, Unesp, Araraquara, 1999.

MARTINS, L. P. A. et al. Rural *Triatoma rubrovaria* from Southern Brazil Harbors *Trypanosoma cruzi* of Lineage IIc. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 79, n.3, p. 427 - 434, 2008.

MEYER, H.; XAVIER DE OLIVEIRA, M. Cultivation of *Trypanosoma cruzi* in tissue culture: a four year study. **Parasitology**, v.39, p.91 - 94. 1948.

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

MILES, M.A., LANHAN, S.M., DE SOUZA, A.A., POVOA, D.G. Further enzymic characters of *Trypanosoma cruzi* and their evaluation for strain identification. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.74, p.221-242, 1980.

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

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

MONCAYO, A.; SILVEIRA, A. C. Current epidemiological trends for Chagas disease in Latin América and future challenges in epidemiology, surveillance and health policy. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, p. 17 - 30, 2009.

MOREL et al. Strains and clones of *Trypanosoma cruzi* can be characterized by pattern of restriction endonuclease products of kinetoplast DNA minicircles. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 77, n. 11, p. 6814 - 6910, 1980.

OLIVEIRA, A.W.S. de.; SILVA, I.G. Distribuição geográfica e indicadores entomológicos de triatomíneos sinantrópicos capturados no Estado de Goiás. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, n.2, p. 204 - 208, 2007.

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

OLIVEIRA, R.P.; MELO, A.I.R.; MACEDO, A.M.; CHIARI, E.; PENA, S.D.J. The Population Structure of *Trypanosoma cruzi*. Expanded Analysis of 54 Strains Using Eight Polymorphic CA-repeat Microsatellites. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.94, p.65 - 70, 1999.

OMS. Guia para vigilância, prevenção, controle e manejo clínico da doença de Chagas aguda transmitida por alimentos. **Serie de Manuais Técnicos**, Rio de Janeiro: PANAFTOSA-VP/OPAS/OMS, v. 12, p. 92, 2009.

PACHECO, R. S. et al. Genetic variability of *Triatoma rubrovaria* (Reduviidae, Triatominae) from Brazil, Argentina and Uruguai as revealed by two different molecular markers. **Parasite**, v. 14, p. 231 - 237, 2007.

PELLI, A. et al. Parâmetros populacionais para *Triatoma sordida* Stal, 1859, o vetor mais frequente da doença de Chagas no Triângulo Mineiro (Heteroptera, Triatominae). **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.4, n.1, p. 25 - 28, 2007.

PINTO, F. H. et al. Estudo comparativo da comportamento da infecção de camundongos, através da inoculação subcutânea e intraperitoneal, utilizando-se duas cepas de *Trypanosoma cruzi*. **Revista de Saúde Pública**, v. 20, n.2, p. 133 - 140, 1986.

PINTO, P.L.S. Circulação e caracterização de *Trypanosoma cruzi* isolados de mamíferos silvestres capturados no Estado de São Paulo – Brasil. 2000. 139 f. **Tese (Doutorado)**. Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, 2000.

POINAR J. R. G. *Triatoma dominicana* sp. n. (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae), and *Trypanosoma antiquus* sp. n. (Stercoraria: Trypanosomatidae), the First Fossil Evidence of a Triatomine-Trypanosomatid Vector Association. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 5 n. 1, p. 72 - 81, 2005.

POSTAN, M.; DVORAK, J. A.; Mc DANIEL, J. P. Studies of *Trypanosoma cruzi* clones inbred mice. I. Comparison of the course of infection of C<sub>3</sub>H/HEN mice with two clones isolated from a common source. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 32, n. 3, p. 497 - 506, 1983.

PREVIATO, J.O.; JONES, C.; GONÇALVES, L.P.; WAIT, R.; TRAVASSOS, L.R.; MENDONÇA-PREVIATO, L. O-glycosidically linked N-acetylglucosaminebound oligosaccharides from glycoproteins of *Trypanosoma cruzi*. **The Biochemical Journal**, v.301, p.151 - 159, 1994.

RAMIREZ, M.I., RUIZ, R.C., ARAYA, J.E., FRANCO DA SILVEIRA, J.E., YOSHIDA, N. Involvement of the stage-specific 82-kilodalton adhesion molecule of *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigotes in host cell invasion. **Infection and immunity**, v.61, p.3636 - 3641, 1993.

RASSI, A.; RASSI, A. J.; LITTLE, W.C. Chagas' heart disease. **Clinical Cardiology**, v.23, p.883 - 889, 2000.

ROSA, J. A. da. et al. Isolation of *Trypanosomes cruzi* strains from, *Triatoma sordida* collected in peridomestic environment in Santo Inácio, Bahia. In: **ANUAL MEETING OF THE BRAZILIAN SOCIETY OF PROTOZOOLOGIA**, 20, Caxambu, MG, 2004.

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

ROSSI, L. R. L. Estudo biométrico de formas epimastigotas e tripomastigotas de quatro cepas de *Trypanosomes cruzi*, CHAGAS, 1909 (KINETOPLASTIDAE, TRYPANOSOMATIDAE). 2007. 76 f. **Dissertação (Mestrado em Análises Clínicas)**. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, Unesp, Araraquara, 2007.

RUIZ RC. *Trypanosoma cruzi*: associação entre infectividade e expressão de glicoproteínas com atividade sinalizadora de cálcio. **Tese de doutorado**. Universidade Federal de São Paulo, SP, Brasil, 1998.

SANDOVAL, C. M. et al. *Belminus ferroae* n. sp. From the Colombia north-east, with a key to the species of the genus (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). **Zootaxa**. n. 1443, p. 55 - 64, 2007.

SCHENKMAN, S., ANDREWS, N.W., NUSSENZWEIG, V., ROBBINS, E.S. *Trypanosoma cruzi* invade a mammalian epithelial cell in a polarized manner. **Cell**, v.55, p.157 - 165, 1988.

SCHLEMPER JR., B. R. et al. Tripomastigota muito largo como padrão morfológico de cepas de *Trypanosoma cruzi* do extremo sul do Brasil? **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 81, n. 2, p. 191 - 198, 1986.

SILVA, L.H.P. da. Observações sobre o ciclo evolutivo do *Trypanosoma cruzi*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, v.1, p.99 - 118, 1959.

SILVA, L.H.P. da; NUSSENZWEIG, V. Sobre uma cepa de *Trypanosoma cruzi* altamente virulenta para o camundongo branco. **Folia Clínica et Biológica**, v.20, n.3, p. 191 - 208, 1953.

SILVA, M. A. da.; NAI, G. A.; ROSA, J. A. da. Caracterização biológica e molecular de quatro cepas de *Trypanosoma cruzi* isoladas de pacientes na fase crônica, forma cardíaca da Doença de Chagas. **Revista de Patologia Tropical**, v.35, n.3, p. 213 - 226, 2006.

SILVA, R. A. da. et al. Programa de controle da doença de chagas no Estado de São Paulo: persistência de alta infestação por triatomíneos em localidades na década de 1990. **Caderno de Saúde Pública**, v.19, n.4, p. 965 - 971, 2003.

SILVEIRA, A. C.; COSTA, J. R. Doença de Chagas e controle do vetor: desafios atuais, habitacionais e ambientais. **Revista de Patologia Tropical**, v. 29, p. 199 - 212, 2000.

SILVEIRA, A. C.; REZENDE, D. F. Epidemiologia e controle da transmissão vetorial da doença de Chagas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 29, p. 5-28, 1994.

SOGAYAR, R.; KIPNIS, T. L.; CURI, P. R. A critical evaluation of the expression of parasitemia in experimental Chagas' disease. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, v. 35, n. 5, p. 395 - 398, 1993.

SOUTO, R. P. et al. DNA markers define two major phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, 83, p.141 - 152, 1996.

SOUZA, M. M. et al. Influence of *Trypanosoma cruzi* strains on autonomic nervous system pathology (An experimental study in mice). **Memórias de Instituto Oswaldo Cruz**, v. 92, p. 217 – 224, 1996.

STEINDEL, M. et al. Characterization of *Trypanosoma cruzi* isolated from humans, vectors, and animal reservoirs following an outbreak of acute human Chagas disease in Santa Catarina State, Brazil. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v.60, n.1, p.25 - 3, 2008.

STURM, N. R. et al. Evidence for multiple hybrid groups in *Trypanosoma cruzi*. **International Journal for Parasitology**, v. 33, p. 269 - 279, 2003.

TANOWITZ, H.B., KIRCHHOFF, L.V., SIMON, S.A., MORRIS, L.M., WITTNER, M. Chagas' disease. **Clinical Microbiology Reviews**, v.5, p.400 - 419, 1992.

TARDIEUX I, WEBSTER P, RAVESLOOT J, BORON W, LUNN JA, HEUSER JE, ANDREWS NW. Lysosome recruitment and fusion are early events required for *Trypanosome cruzi* invasion of mammalian cells. **Cell**, v.71, p.1117 - 1130, 1992.

TELLERIA, J. et al. *Trypanosoma cruzi*: Sequence analysis of the variable region of kinetoplast minicircles. **Experimental parasitology**, v. 114, p. 279 - 288, 2006.

TIBAYRENC, M.; AYALA, F. J. The clonal theory of parasitic protozoa: 12 years on. **Trends Parasitology.**, v. 18, p. 405 - 410, 2002.

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

TORRES, J.P., ORTIZ, S., MUNOZ, S., SOLARI, A. *Trypanosoma cruzi* isolates from Chile are heterogeneous and composed of mixed populations when characterized by schizodeme and Southern analyses. **Parasitology**, v.128, p.161 - 168, 2004.

ZELEDÓN, R.; VIETO, P.L. Comparative studies of *Schizotrypanum cruzi* Chagas, 1909 and *S. verpertilionis* Battaglia, 1904 from Costa Rica, **Journal of Parasitology**, v.44, p. 499 - 502, 1958.

ZINGALES, B. et al. Molecular epidemiology of American trypanosomiasis in Brazil based on dimorphisms of rRNA and mini-exon gene sequences. **International Journal of Parasitology**, v.28, p.105 - 112, 1997.

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

WESTENBERGER, S.J.; BARNABÉ, C.; CAMPBELL, D.A.; STURM, N.R. Two Hybridization Events Define the Population Structure of *Trypanosoma cruzi*. **Genetics**, v.171, p.527 - 543, 2005.

<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/index.html> Acesso em: 10 ago. 2010.

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.

YOSHIDA, N., BLANCO, S.A., ARAGUTH, M.F., RUSSO, M., GONZALEZ, J. The stage-specific 90-kilodalton surface antigen of metacyclic trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v.39, p.39 - 46, 1990.

## 9. Anexos

---

**ANEXO 1.** O meio de cultura utilizado para o crescimento de *T. cruzi* foi o meio LIT (*liver infusion tryptose*), desenvolvido por Camargo (1964) e modificado por Martinez (2004). Uma porção das fezes dos triatomíneos que se mostraram positivas foram inoculadas em meio de cultura LIT como descrito abaixo:

### Meio LIT (Liver Infusion Tryptose)

|                                        |          |
|----------------------------------------|----------|
| NaCl.....                              | 4,0 g    |
| KCL.....                               | 0,4 g    |
| Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ..... | 8,0 g    |
| Glucose.....                           | 2,0 g    |
| Tryptose.....                          | 5,0 g    |
| Caldo de infuso de fígado.....         | 5,0 g    |
| Haemin (Sigma).....                    | 25,0 mg  |
| Soro fetal bovino.....                 | 100,0 mL |
| Água Milli Q.....                      | 900,0 mL |

Em erlenmeyer dissolver o NaCl, KCl, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, Glucose, Tryptose e Caldo de infuso de fígado em água. Em um béquer pequeno, pesar e solubilizar o Haemin em 0,5 mL de trietanolamina, acrescentar água, homogeneizar com um bastão de vidro e misturar à solução preparada no erlenmeyer, lavando bem o béquer para que não fique Haemin no mesmo. Medir o pH com papel indicador Merck e, se necessário, acertar o pH para 7,2 com HCL. Filtrar em membrana 0,22µm e acrescentar assepticamente o soro fetal bovino previamente inativado em banho maria a 56°C / 1 hora.

O meio deve ser distribuído em frascos estéreis que serão mantidos na geladeira até o momento do uso. Após o uso, mantê-lo a 28°C.

**ANEXO 2.** Preparo do *Corante Giemsa segundo Rosenfeld* para a realização do estudo morfológico de formas tripomastigotas e epimastigotas do parasito *T. cruzi*.

***Corante Giemsa segundo Rosenfeld***

Giemsa (pó).....0,97g

May-Grunwald.....0,53g

Metanol P.A.....1000mL

Acondicionar em frasco âmbar. Validade: 5 anos.

• **Materiais:** Lâminas, lâminas extensoras, pipeta automática, ponteiros, lápis, etiquetas, suporte para lâminas, suporte para coloração, provetas, funis, papel de filtro e óleo de imersão.

• **Reagentes:** Corante de Giemsa (Azur Eosina Azul de Metileno Segundo Giemsa), Metanol (álcool metílico) e Água destilada.

• **Procedimento:**

Limpar a lâmina com gaze seca (lâmina lavada e desengordurada). Com pipeta automática aplicar uma gota de sangue (5µL), na extremidade de uma lâmina e com lâmina extensora arrastar essa gota para trás até que o rebordo da lâmina seja preenchido. Em seguida impelir a lâmina extensora para frente em um ângulo de aproximadamente 45°, em um só movimento firme e uniforme, sem separar uma lâmina da outra, até que o sangue fique perfeitamente distribuído na lâmina. Esperar secar, fixar com álcool metílico e identificar a lâmina.

• **Coloração dos esfregaços:**

- Colocar a lâmina com o esfregaço sobre o suporte de coloração.
- Cobrir a lâmina com 1 mL do corante Giemsa segundo Rosenfeld.
- Esperar cinco minutos.



- Colocar sobre o corante 2 mL de água destilada previamente fervida, tomando o cuidado de não deixar cair o corante. Homogeneizar, tombando ligeiramente o suporte de coloração. Esperar dez minutos.

- Desprezar o corante e a água destilada.
- Lavar a lâmina com água corrente.
- Limpar o verso da lâmina com uma gaze.
- Colocar a lâmina no suporte para secar.

• **Equipamento:**

As lâminas coradas foram observadas em microscópio óptico comum Carl Zeiss Jena, Jenamed com óleo de imersão para a avaliação qualitativa das formas encontradas em aumento de 1000 vezes. Após a avaliação qualitativa das formas as lâminas foram observadas em microscópio Leica Leitz DMRXE acoplado a câmara filmadora Leica DC100 para a captura das imagens que foram armazenadas e mensuradas em analisador de imagem computadorizado Leica Qwin, utilizando o software LEICA LIDA (Leica Image Database and Archive System), cujos passos podem ser visualizados nas figuras 4, 5, 6, 7 e 8.



Protocolo CEP/FCF/CAr. nº 12/2008

Interessado: ALINE RIMOLDI RIBEIRO

Orientador: Prof. Dr. João Aristeu da Rosa

Projeto: Caracterização morfológica, biológica e molecular de três cepas de *Trypanosoma cruzi* Chagas, 1909 (Kinetoplastida, Trypanosomatidae) isoladas de exemplares de *Triatoma sordida*

#### Parecer nº 20/2008 – Comitê de Ética em Pesquisa

O Comitê de Ética em Pesquisa desta Faculdade considerou o protocolo para uso de animais na pesquisa "Caracterização morfológica, biológica e molecular de três cepas de *Trypanosoma cruzi* Chagas, 1909 (Kinetoplastida, Trypanosomatidae) isoladas de exemplares de *Triatoma sordida*", estruturado dentro dos princípios éticos na experimentação animal do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal – COBEA, manifestando-se FAVORÁVEL à sua execução.

Araraquara, 09 de junho de 2008.

  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> AURELUCE DEMONTE  
Coordenadora do CEP