

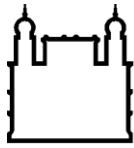
MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mestrado em Programa de Pós-Graduação Biologia Parasitária

Avaliação de taxas de infecção, carga parasitária e tipagem molecular de *Trypanosoma cruzi* em triatomíneos provenientes do Ceará (Caatinga) e Rio Grande do Sul (Pampa)

THAIANE DE SOUSA VERLY

Rio de Janeiro
Março de 2016



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

THAIANE DE SOUSA VERLY

Avaliação de taxas de infecção, carga parasitária e tipagem molecular de *Trypanosoma cruzi* em triatomíneos provenientes do Ceará (Caatinga) e Rio Grande do Sul (Pampa)

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biologia Parasitária.

Orientadora: Prof. Dra. Constança Felícia de Paoli de Carvalho Britto

RIO DE JANEIRO

Março de 2016

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

V521 Verly, Thaiane de Sousa

Avaliação de taxas de infecção, carga parasitária e tipagem molecular de *Trypanosoma cruzi* em triatomíneos provenientes do Ceará (Caatinga) e Rio Grande do Sul (Pampa) / Thaiane de Sousa Verly. – Rio de Janeiro, 2016.

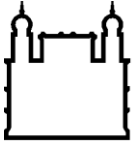
xviii, 119 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Parasitária, 2016.

Bibliografia: f. 92-117

1. *Trypanosoma cruzi*. 2. Doença de Chagas. 3. Triatomíneos. 4. DTU. 5. Carga parasitária. 6. Infecção natural. 7. PCR. I. Título.

CDD 616.9363



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

AUTORA: THAIANE DE SOUSA VERLY

Avaliação de taxas de infecção, carga parasitária e tipagem molecular de *Trypanosoma cruzi* em triatomíneos provenientes do Ceará (Caatinga) e Rio Grande do Sul (Pampa)

ORIENTADORA: Prof. Dra. Constança Felícia de Paoli de Carvalho Britto

Aprovada em: 30/03/2016

EXAMINADORES:

Prof. Dr. André Luiz Rodrigues Roque – Presidente (revisor)

Prof. Dr. Cléber Galvão (membro)

Prof. Dr. Cícero Brasileiro de Mello Neto (membro externo)

Prof. Dr. Márcio Galvão Pavan (suplente)

Prof. Dr. Marcelo Salabert Gonzalez (suplente externo)

Rio de Janeiro, 30 de março de 2016




Ministério da Saúde


Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz

Ata da defesa de dissertação de mestrado em Biologia Parasitária de **Thaiane de Sousa Verly**, sob orientação da Dr^a. Constança Felicia de Paoli de Carvalho Britto. Ao trigésimo dia do mês de março de dois mil e dezesseis, realizou-se às quatorze horas, na Sala 29 do Pavilhão 108/Fiocruz, o exame da dissertação de mestrado intitulada: "**Avaliação de taxas de infecção, carga parasitária e tipagem molecular de *Trypanosoma cruzi* em triatomíneos provenientes do Ceará (caatinga) e Rio Grande do Sul (pampa)**" no programa de Pós-graduação em Biologia Parasitária do Instituto Oswaldo Cruz, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestra em Ciências - área de concentração: Ecologia e Epidemiologia, na linha de pesquisa: Ecologia de Parasita, Vetores e Hospedeiros. A banca examinadora foi constituída pelos Professores: Dr. André Luiz Rodrigues Roque - IOC/FIOCRUZ (Presidente), Dr. Cleber Galvão Ferreira - IOC/FIOCRUZ, Dr. Cicero Brasileiro de Mello Neto - UFF/RJ e como suplentes: Dr. Marcio Galvão Pavan - IOC/FIOCRUZ e Dr. Marcelo Salabert Gonzalez - UFF/RJ. Após arguir a candidata e considerando que a mesma demonstrou capacidade no trato do tema escolhido e sistematização da apresentação dos dados, a banca examinadora pronunciou-se pela aprovação da defesa da dissertação de mestrado. De acordo com o regulamento do Curso de Pós-Graduação em Biologia Parasitária do Instituto Oswaldo Cruz, a outorga do título de Mestra em Ciências está condicionada à emissão de documento comprobatório de conclusão do curso. Uma vez encerrado o exame, o Coordenador do Programa, Dr. Rafael Maciel de Freitas, assinou a presente ata tomando ciência da decisão dos membros da banca examinadora. Rio de Janeiro, 30 de março de 2016.


Dr. André Luiz Rodrigues Roque (Presidente da Banca):


Dr. Cleber Galvão Ferreira (Membro da Banca):


Dr. Cicero Brasileiro de Mello Neto (Membro da Banca):


Dr. Rafael Maciel de Freitas (Coordenador do Programa):

AGRADECIMENTOS

Ao Deus maravilhoso que demonstra o seu cuidado e o seu carinho em todas as estradas em que percorro e que me dá sabedoria para lidar com todos os obstáculos. Obrigada por me capacitar e me dar forças quando eu pensava em não tê-las mais.

Ao meu pai, Sergio Verly, que quando eu era bem pequenininha era o meu contador de histórias e sempre sentava comigo à mesa para estudar. Cresci amando a leitura e a busca por conhecimento. Por meio do estudo alcancei todos os objetivos que tracei, e isso ocorreu porque você me incentivou e me fez enxergar que o caminho do sucesso profissional estava nos livros. Pai, você é meu maior exemplo, de inteligência e sabedoria!

À minha mãe e irmã, Valéria Verly e Thainara Verly, obrigada por fazerem parte de mim, da minha história. Sei que comemoram comigo em cada vitória que conquisto. Obrigada por todo o apoio verbal, amizade e o diálogo que temos.

Ao meu querido namorado Erick Abercrombie, nenhuma palavra escrita neste parágrafo poderá transmitir a minha gratidão por você estar tão presente em cada passo que dou. Obrigada por todas as vezes que escutou meus desabafos, que agüentou os meus estresses, que compreendeu a minha falta de tempo e me aconselhou. Com você meus fardos são bem mais leves. Ainda compartilharemos muitos momentos, sejam bons ou ruins. A cada nascer do sol eu te amo mais e mais!

Aos meus amigos de infância, de ensino fundamental, de faculdade, de repúblicas... que sempre torceram por mim e se orgulham por eu ter chegado aonde cheguei. Só não vou citar nomes para não me esquecer de alguém injustamente. Amo vocês!

À minha primeira orientadora, Dra. Suzete Gomes, que nunca duvidou do meu potencial quanto aluna e pesquisadora, sempre me impulsionando a seguir com os meus objetivos. Obrigada por ter me auxiliado a traçar um novo caminho, em que me sinto tão realizada em trilhar.

Aos colegas do LABIMDOE, obrigada pelo intercâmbio de conhecimentos. Em especial, à Angélica Cardoso, à Daniela Pita, à Paula Finamore, ao Ronald Martins e à Natália Beline (no último ano você foi meu braço direito, tanto nos experimentos quanto na amizade!), sou grata pela boa vontade e pela disposição em ajudar.

Às Secretarias de Saúde do Ceará e do Rio Grande do Sul pela parceria e envio de alguns exemplares de insetos que encontraram nas regiões estudadas, em especial, aos agentes de saúde que realizam essa investigação entomológica. Ah, e não poderia deixar de citar o agente de saúde do Rio Grande do Sul, Mário Britto, que tive a imensa oportunidade de conhecer. Sempre muito

disposto, foi nosso braço direito no trabalho de campo em todos os municípios do estado. Muito obrigada por toda assistência!

Aos colaboradores do presente estudo Dra. Jacenir Mallet, Msc. Nathanielly Rocha, Msc. Danielle Misael, Dra. Margareth Almeida e Cleonara Bedin; em especial, ao Dr. Otacilio Moreira por todos os ensinamentos e discussões de resultados, sempre com muito entusiasmo e solicitude. Muito obrigada a todos, sem a parceria de cada um de vocês não seria possível concretizar este trabalho.

À minha querida orientadora Dra. Constança Britto, obrigada por me acompanhar e fazer parte do meu crescimento acadêmico e pessoal desde a iniciação científica até agora no mestrado. Sou imensamente grata por acreditar no meu potencial e por todo o conhecimento compartilhado e amizade. Estes 4 anos no LABIMDOE foram muito importantes para mim!

Ao revisor, André Roque, pelo cuidado e atenção ao revisar este trabalho. Obrigada por ter topado, mesmo num momento em que estava tão atarefado. Todas as discussões e sugestões foram de grande valia!

À banca, Dr. André Roque, Dr. Cléber Galvão, Dr. Cícero Brasileiro, Dr. Márcio Pavan e Dr. Marcelo Gonzalez, muito obrigada por aceitarem o convite. O contato com todos vocês sempre resulta em grande aprendizado!

Ao Instituto Oswaldo Cruz e à Pós - graduação em Biologia Parasitária que tornaram real o meu grande desejo de fazer parte de um curso com conceito 7 na CAPES. É simplesmente uma honra!

À turma de Biologia Parasitária, principalmente às meninas que fizeram dos meus dias ainda melhores e mais divertidos: Millena, Kate, Andreza, Amanda, Camilla, Mariana e Klecia. Que no doutorado tenhamos mais Happy Hour ☺!

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq pelo auxílio financeiro.

Avaliação de taxas de infecção, carga parasitária e tipagem molecular de *Trypanosoma cruzi* em triatomíneos provenientes do Ceará (Caatinga) e Rio Grande do Sul (Pampa)

RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM BIOLOGIA PARASITÁRIA

Thaiane de Sousa Verly

Embora o Brasil mantenha constante a operação de vigilância e controle dos principais vetores da doença de Chagas, o risco de transmissão do *Trypanosoma cruzi* ainda persiste. Estimativas de taxas de infecção natural por *T. cruzi* em triatomíneos são importantes para avaliar um possível risco de transmissão vetorial. Deste modo, o objetivo do presente estudo é estimar taxas de infecção natural, carga parasitária e caracterização de linhagens de *T. cruzi* diretamente de triatomíneos capturados em dois biomas brasileiros: Caatinga e Pampa. A técnica de PCR convencional *multiplex*, por apresentar maior sensibilidade, reprodutibilidade e fidedignidade, comparada à observação microscópica direta do parasito, foi utilizada para detecção simultânea do DNA cinetoplástico de *T. cruzi* e da subunidade 12S do gene ribossomal de triatomíneos. Para a estimativa da carga parasitária por qPCR, foram realizados ensaios de quantificação absoluta utilizando o sistema TaqMan *multiplex*, com o mesmo alvo para triatomíneos e empregando o DNA nuclear satélite de *T. cruzi*. A caracterização molecular do parasito foi realizada a partir de adaptações dos algoritmos de PCR preconizados previamente. A PCR convencional *multiplex* demonstrou sensibilidade superior à microscopia para o diagnóstico de triatomíneos coletados. No Ceará o percentual de positividade para *T. cruzi*, por PCR, foi maior em *P. lutzi* (6/7; 85,7%), seguido de *T. brasiliensis* (29/158; 18,4%) e *T. pseudomaculata* (28/230; 12,2%). As maiores cargas parasitárias observadas foram em *T. pseudomaculata* e *T. brasiliensis* ($9,1 \times 10^7$ e $1,9 \times 10^7$ equivalentes de parasito, respectivamente), e a menor em *P. lutzi* ($1,2 \times 10^2$ equivalentes de *T. cruzi*). O genótipo TcI foi detectado em *T. brasiliensis*, *T. pseudomaculata* e *P. lutzi*; e as DTUs TcV, TcII e TcVI em *T. brasiliensis*. Coinfecções por TcIII+V e TcI+II/V/VI foram observadas em *P. lutzi* e em *T. brasiliensis*, respectivamente. *T. brasiliensis* infectados com TcII e TcVI apresentaram cargas parasitárias mais altas ($1,8 \times 10^7$ e $1,9 \times 10^7$ equivalentes de parasito, respectivamente). No Rio Grande do Sul a taxa de infecção natural foi superior em *T. rubrovaria* (4/8; 50%), seguido de *T. circummaculata* (3/9; 33,3%), *T. infestans* (10/123; 8,1%) e *T. carvalhoi* (2/33; 6,1%). Entre os *Triatoma* sp., 4,8% (11/228) foram positivas para *T. cruzi*. A maior carga parasitária foi observada em *T. rubrovaria* (3×10^7 equivalentes de parasito) e as mais baixas em *Triatoma* sp. e *T. infestans* ($1,5 \times 10^1$ e $2,1 \times 10^1$ equivalentes de *T. cruzi*, respectivamente). TcI foi encontrada em *T. rubrovaria*, *T. infestans* e *Triatoma* sp.. *T. circummaculata* continha coinfeção por TcI+IV. A presença de triatomíneos infectados por *T. cruzi* nos ambientes domiciliar e peridomiciliar sugerem um possível risco de transmissão em humanos nas regiões estudadas. Além disso, os dados apresentados demonstram que o ciclo de transmissão de *T. cruzi* nos diferentes ecótopos é altamente complexo e que a distribuição geográfica dos genótipos do parasito é subestimada no Brasil, sendo necessárias novas investigações para uma melhor compreensão acerca da interação parasito-vetor-hospedeiro-reservatório. O presente estudo confirmou a fidedignidade das técnicas moleculares empregadas para a avaliação de triatomíneos naturalmente infectados por *T. cruzi*.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Evaluation of infection rates, parasitic load and molecular typing of *Trypanosoma cruzi* in triatomines in naturally infected triatomines in two Brazilian biomes through of use of molecular assays based on PCR

ABSTRACT

MASTER DISSERTATION IN BIOLOGY PARASITIC

Thaiane de Sousa Verly

Although Brazil steady maintains the surveillance and control operation of the main Chagas disease vectors, the risk of *Trypanosoma cruzi* transmission still persists. Estimatives of natural infection indexes by *T. cruzi* in triatomines are important for evaluating possible risk of vector transmission. The aim of the present study is to evaluate natural infection indexes, parasite load and to characterize *T. cruzi* lineages directly from triatomine bugs captured in two Brazilian biomes: Caatinga and Pampa. Conventional multiplex PCR assay, due to its higher sensitivity, reproducibility and reliability, compared to direct microscopic observation of the parasite, was used for the simultaneous detection of *T. cruzi* kinetoplast DNA and the 12S subunit of triatomine ribossomal gene. For the estimative of parasite load by qPCR, absolute quantification assays were carried out using the multiplex TaqMan system directed simultaneously to the same triatomine target and to the *T. cruzi* satellite nuclear DNA. Molecular characterization of the parasite was performed from adaptations of PCR algorithms previously preconized. The conventional multiplex PCR presented higher sensitivity than microscopy for the diagnosis of collected triatomines. In Ceara, the proportion of PCR positive results for *T. cruzi* was higher in *P. lutzi* (6/7, 85.7%), followed by *T. brasiliensis* (29/158, 18.4%) and *T. pseudomaculata* (28/230, 12.2%). The highest parasite loads were observed in *T. pseudomaculata* and *T. brasiliensis* (9.1×10^7 and 1.9×10^7 parasite equivalents, respectively) and the lower was found in *P. lutzi* (1.2×10^2 *T. cruzi* equivalents). The TcI genotype was identified in *T. brasiliensis*, *T. pseudomaculata* and *P. lutzi*, while DTUs TcV, TcII and TcVI were found in *T. brasiliensis*. Coinfections by TcIII+V and TcI+II/V/VI were observed in *P. lutzi* and *T. brasiliensis*, respectively. *T. brasiliensis* infected with TcII and TcVI have the highest parasite loads (1.8×10^7 and 1.9×10^7 *T. cruzi* equivalents, respectively). In Rio Grande do Sul, the natural infection rate was higher in *T. rubrovaria* (4/8, 50%), followed by *T. circummaculata* (3/9, 33.3%), *T. infestans* (10/123, 8.1%) and *T. caracaloi* (2/33, 6.1%). Among the *Triatoma* sp., 4.8% (11/228) were positive for *T. cruzi*. The highest parasite load was observed in *T. rubrovaria* (3×10^7 parasite equivalents) and the lower ones were found in *Triatoma* sp. and *T. infestans* (1.5×10^1 and 2.1×10^1 *T. cruzi* equivalents, respectively). TcI was registered in *T. rubrovaria*, *T. infestans* and *Triatoma* sp. Coinfection with TcI+IV was observed in *T. circummaculata*. The presence of *T. cruzi* infected triatomines, in the domestic and peridomestic environments, suggests a possible transmission risk to humans in the studied areas. Beyond that, these data indicate a high complexity of the parasite transmission cycle in different ecotopes and an underestimation of the geographycal distribution of *T. cruzi* genotypes in Brazil, requiring new studies for a better comprehension of the parasite-vector-host-reservoir interaction. The present investigation corroborated the reliability of molecular techniques for evaluating triatomine bugs naturally infected by *T. cruzi* parasites.

"Não esmorecer para não desmerecer."

Oswaldo Cruz

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	A doença de Chagas.....	1
1.2	Os vetores: Triatomíneos	10
1.3	O parasito: <i>Trypanosoma cruzi</i>	15
1.4	Avaliação de infecção natural por <i>Trypanosoma cruzi</i> em triatomíneos.....	22
1.4.1	Reação em Cadeia da Polimerase (Qualitativa).....	22
1.4.1.1	<i>kDNA</i> de <i>T. cruzi</i> como alvo de detecção.....	24
1.4.1.2	DNA nuclear satélite de <i>T. cruzi</i> como alvo de detecção.....	27
1.4.2	Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (Quantitativa).....	28
2	JUSTIFICATIVA	32
3	OBJETIVOS	34
3.1	Objetivo geral	34
3.2	Objetivos específicos.....	34
4	MATERIAL e MÉTODOS.....	35
4.1	Captura de triatomíneos	35
4.2	Áreas de coleta.....	36
4.2.1	Rio Grande do Sul	36
4.2.2	Ceará.....	37
4.3	Exame a fresco das fezes de triatomíneos de campo	38
4.4	Extração de DNA.....	39
4.5	Avaliação das taxas de infecção natural e da carga parasitária de <i>T. cruzi</i> em triatomíneos de campo.....	40
4.5.1	Reação em Cadeia da Polimerase Qualitativa (PCRc).....	41
4.5.1.2	Eletroforese em gel de agarose.....	42
4.5.2	Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa (qPCR)	42
4.5.2.1	Curva padrão	43
4.5.2.2	Cultivo de células para curva padrão e controles da PCR.....	44
4.5.2.3	Análise estatística	44
4.6	Tipagem molecular de <i>T. cruzi</i> em DNA extraído de amostras de conteúdo intestinal de triatomíneos	44
5	RESULTADOS	48
5.1	Descrição das localidades, espécies e estádios evolutivos dos triatomíneos coletados.....	48
5.2	PCRc <i>multiplex</i> e exame parasitológico por microscopia óptica.....	54

5.3	Avaliação da carga parasitária: qPCR <i>multiplex</i>	60
5.4	Genotipagem de <i>T. cruzi</i> em triatomíneos naturalmente infectados.....	64
5.4.1	Comparação entre genótipos de <i>T. cruzi</i> e carga parasitária no inseto vetor.....	67
6	DISCUSSÃO	70
6.1	Comparação entre PCRc <i>multiplex</i> e exame parasitológico por microscopia óptica: .	71
6.2	Infecção natural por <i>T. cruzi</i> e DTUs identificadas nos triatomíneos provenientes do Ceará – Bioma Caatinga	73
6.3	Infecção natural por <i>T. cruzi</i> e DTUs identificadas nos triatomíneos provenientes do Rio Grande do Sul – Bioma Pampa.....	80
6.4	Comparação entre genótipos de <i>T. cruzi</i> e carga parasitária no inseto vetor:.....	87
7	CONCLUSÕES	90
8	PERSPECTIVAS	91
9	BIBLIOGRAFIA	92
10	ANEXO	118

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Rotas migratórias de indivíduos latino-americanos infectados por <i>T. cruzi</i> para regiões não endêmicas.	3
Figura 2: Letalidade anual da doença de Chagas aguda. Brasil, 2005 a 2013.	6
Figura 3: Gastos do Ministério da Saúde do Brasil com medicamentos para os programas de assistência farmacêutica, de 2004 a 2008.	9
Figura 4: Diferenciação dos gêneros <i>Panstrongylus</i> , <i>Rhodnius</i> e <i>Triatoma</i> pelo ponto de inserção das antenas no tubérculo antenífero (indicado pela seta).	10
Figura 5: Ciclo de vida de um triatomíneo – <i>Triatoma brasiliensis brasiliensis</i>	13
Figura 6: Principais formas evolutivas do <i>T. cruzi</i>	16
Figura 7: Ciclo de vida do <i>T. cruzi</i> em hospedeiros invertebrado e vertebrado.	17
Figura 8: Micrografia eletrônica do kDNA.	25
Figura 9: Representação esquemática do minicírculo de <i>T. cruzi</i>	26
Figura 10: Coleta de triatomíneos no Rio Grande do Sul.	36
Figura 11: Localização geográfica dos municípios estudados (em cores), nos estados do Rio Grande do Sul (A) e do Ceará (B).	38
Figura 12: Dissecção do intestino médio posterior e intestino posterior de triatomíneos, após a análise parasitológica por microscopia óptica.	40
Figura 13: Fluxograma para a identificação das Unidades Discretas de Tipagem (DTUs) diretamente do conteúdo intestinal de triatomíneos, baseada em quatro marcadores, utilizando a técnica de PCRc.	47
Figura 14: Distribuição das espécies de triatomíneos coletados, de acordo com os municípios estudados no Ceará (A) e Rio Grande do Sul (B).	49
Figura 15: Ambientes em que os triatomíneos foram coletados, de acordo com as espécies (A) e os municípios (B) do Rio Grande do Sul.	50
Figura 16: Ambientes em que os triatomíneos foram coletados, de acordo com as espécies (A) e os municípios (B) do Ceará.	51
Figura 17: Distribuição de triatomíneos coletados nos estados do Ceará (A) e do Rio Grande do Sul (B) de acordo com os estádios evolutivos e as espécies estudadas.	53
Figura 18: Distribuição do número de exemplares coletados das diferentes espécies de triatomíneos e o número de espécimes naturalmente infectados pelo <i>T. cruzi</i> , analisados por PCRc a partir do conteúdo intestinal.	55
Figura 19: Exemplo de revelação dos resultados da PCR convencional para avaliar infecção natural em triatomíneos. Gel de agarose 2% corado com Nancy.	56
Figura 20: Distribuição de espécies de triatomíneos naturalmente infectados pelo <i>T. cruzi</i> , de acordo com o município em que foram coletadas no Ceará (A) e no Rio Grande do Sul (B). ...	57
Figura 21: Distribuição por espécies de triatomíneos infectados por <i>T. cruzi</i> de acordo com o ambiente em que foram coletados, no Ceará (A) e no Rio Grande do Sul (B).	59
Figura 22: Ensaio de qPCR TaqMan: Curva padrão representativa construída a partir de DNA diluído em série, extraído de um <i>pool</i> de cinco intestinos de triatomíneos não infectados, contaminado artificialmente com epimastigotas de <i>T. cruzi</i> CL-Brener.	61

Figura 23: Curvas de amplificação do ensaio de qPCR – sistema TaqMan.....	62
Figura 24: Distribuição da carga parasitária por <i>T. cruzi</i> em triatomíneos coletados nos estados do Rio Grande do Sul e Ceará.....	63
Figura 25: Distribuição das DTUs de <i>T. cruzi</i> em triatomíneos naturalmente infectados coletados nos estados do Ceará (em bege) e do Rio Grande do Sul (em cinza).....	66
Figura 26: Gel representativo da tipagem molecular de <i>T. cruzi</i> em amostras de triatomíneos naturalmente infectados.....	67
Figura 27: Relação entre cargas parasitárias e DTUs. (A): Ceará. (B): Rio Grande do Sul.	69

INDICE DE TABELAS

Tabela 1: Principais situações e respectivas estratégias de vigilância epidemiológica da doença de Chagas humana.	5
Tabela 2: Casos confirmados de doença de Chagas aguda, segundo Região, Unidade da Federação de residência e forma de transmissão. Brasil, 2000 a 2013.	7
Tabela 3: Casos confirmados de doença de Chagas aguda, segundo ano de notificação e forma de transmissão. Brasil, 2000 a 2013.	8
Tabela 4: Distribuição das 65 espécies de triatomíneos conhecidas nas 27 unidades da federação do Brasil.	12
Tabela 5: Correspondência entre as DTUs atuais e as nomenclaturas anteriores.	19
Tabela 6: Sequências e iniciadores para os ensaios de PCRC e qPCR.	43
Tabela 7: Condições da PCRC para a tipagem molecular.	46
Tabela 8: Pesquisa de <i>T. cruzi</i> em triatomíneos: comparação entre a PCRC e o exame a fresco.	54
Tabela 9: Distribuição dos municípios, espécies, estádios evolutivos e as DTUs correspondentes nos estados do Ceará e do Rio Grande do Sul.	65

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
CDC	<i>Center for Disease Control and Prevention</i>
Cm	Centímetro
C _T	<i>Threshold Cycle</i>
°C	Graus Celsius
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTPs	Deoxinucleotídeos trifosfatos
DTUs	<i>Discret Typing Units</i>
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
Ef	Eficiência
EUA	Estados Unidos da América
Fg	Fitograma
Fiocruz	Fundação Oswaldo Cruz
h	Hora
HCl	Ácido Clorídrico
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus Infection</i>
IOC	Instituto Oswaldo Cruz
LAMBIMDOE	Laboratório de Biologia Molecular e Doenças Endêmicas
LIFIDIH	Laboratório Interdisciplinar de Vigilância Entomológica em Díptera e Hemíptera
KCl	Cloreto de Potássio
kDNA	Ácido desoxirribonucléico do kinetoplasto
M	Marcador de Peso Molecular
mL	Mililitro
mM	Milimolar
Min	Minutos
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
N	Número amostral
NaCl	Cloreto de Sódio
nM	Nanomolar
NTC	<i>Negative Template Control</i>

N1	Ninfa de 1º estágio
N2	Ninfa de 2º estágio
N3	Ninfa de 3º estágio
N4	Ninfa de 4º estágio
N5	Ninfa de 5º estágio
OMS	Organização Mundial da Saúde
OPAS	Organização Pan-Americana da Saúde
pb	Pares de base
PBS	Tampão Salino – Fosfato
PCR _c	<i>Polymerase Chain Reaction</i> / Reação em Cadeia da Polimerase Convencional
pH	Potencial hidrogeniônico
qPCR	Quantitative <i>Polymerase Chain Reaction</i> / Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa
RNA	Ácido ribonucléico
R ₂	Coefficiente de Linearidade
s	Segundos
SL	<i>Spliced Leader</i>
SIDA	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
TBE	Solução Tampão Tris/Borato/EDTA
<i>T. cruzi</i>	<i>Trypanosoma cruzi</i>
TcI	<i>Trypanosoma cruzi</i> grupo I
TcII	<i>Trypanosoma cruzi</i> grupo II
TcIII	<i>Trypanosoma cruzi</i> grupo III
TcIV	<i>Trypanosoma cruzi</i> grupo IV
TcV	<i>Trypanosoma cruzi</i> grupo V
TcVI	<i>Trypanosoma cruzi</i> grupo VI
Tcbat	<i>Trypanosoma cruzi</i> grupo bat
TX	Texas
V	Volts
USA	<i>The United States of America</i>
UV	Ultravioleta
U/μL	Unidades/microlitro
μg	Micrograma

μL	Microlitro
g	Aceleração da gravidade
Z1	Zimodema 1
Z2	Zimodema 2
Z3	Zimodema 3

1 INTRODUÇÃO

1.1 A doença de Chagas

Em 1909, o sanitarista Oswaldo Cruz anunciou formalmente à Academia Nacional de Medicina a descoberta de uma nova doença pelo médico e pesquisador do Instituto Oswaldo Cruz (IOC), Carlos Justiniano Ribeiro Chagas, intitulada Tripanossomíase Americana ou doença de Chagas (CHAGAS, 1909). Dois anos antes, Carlos Chagas viajou para Lassance no estado de Minas Gerais e observou um inseto hematófago que se alimentava no período noturno e picava, sobretudo, o rosto dos moradores de casebres de barro (KROPF, 2009; DIAS et al., 2013). Tratava-se do vetor da doença, o triatomíneo. Chagas identificou no intestino de tal hemíptero, em 1908, o protozoário *Trypanosoma cruzi* (CHAGAS, 1909). Inoculou o parasito em macacos por suspeitar que ele pudesse ser transmitido ao homem e a outros animais, e verificou o desenvolvimento de parasitemia e uma doença febril (DIAS et al., 2013). Assim, investigou a relação entre o parasito recém-descoberto e as condições mórbidas da população. A descoberta de Carlos Chagas é considerada única na história da medicina, comemorada como um grande feito da ciência nacional, por incluir todos os aspectos básicos da doença: o agente etiológico em todas as suas formas evolutivas, o inseto vetor e seus hábitos de vida, os reservatórios domésticos e silvestres, a descrição da doença e o seu diagnóstico (KROPF, 2009; REY, 2011). O primeiro caso clínico humano diagnosticado e estudado, na mesma área endêmica, ocorreu no ano seguinte à identificação do vetor (REY, 2011).

Com o advento da paleoparasitologia, alguns autores acreditam que os humanos foram introduzidos acidentalmente no ciclo de transmissão do parasito na região Andina em populações pré-históricas, 8.000 a 6.000 anos atrás, após a domesticação de animais, como pequenos roedores utilizados para o consumo ou rituais (ROTHHAMMER et al., 1985; COIMBRA JR., 1988; STEVENS; GIBSON, 1999), o que propiciou a domiciliação do *Triatoma infestans* Klug, 1934 nessa área (SCHOFIELD et al., 1994). Com a introdução de técnicas moleculares que detectam a presença de DNA de minicírculos do cinetoplasto do *T. cruzi*, através da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), a doença de Chagas foi confirmada em múmias chilenas datadas em 4.000 anos (GUHL et al., 1999, 2000; FERREIRA et al., 2000; MADDEN et al., 2001). A possibilidade do encontro de DNA de *T. cruzi* em múmias de sítios arqueológicos descortina uma nova hipótese, a de que a doença seja tão antiga no continente quanto os humanos. Os vestígios arqueológicos mostraram a presença de animais reservatórios e vetores em áreas ocupadas pelos primeiros habitantes da região (GONÇALVES

et al., 2002). A antiguidade da infecção por *T. cruzi* em humanos foi confirmada com o resultado de PCR-positiva em múmias mais antigas, as múmias Chinchorro do deserto do Atacama, que data de 9.000 anos atrás, bem antes dos hábitos sedentários da espécie humana (GUHL et al., 1997, 1999, 2000; FERREIRA et al., 2000; AUFDERHEIDE et al., 2004). Assim, sugere-se, que os primeiros sul-americanos a serem infectados foram os habitantes de cavernas, pois o ambiente no qual viviam era favorável à presença dos vetores, já que também era o habitat de pequenos mamíferos e de outros primatas (ARAÚJO et al., 2009).

Originalmente, o mal de Chagas correspondia à uma enzootia de animais silvestres, afetando marsupiais, quirópteros, roedores, edentados, carnívoros, logomorfos e primatas (DIAS et al., 2013). Nos últimos 200-300 anos se estabeleceu como uma zoonose devido ao desmatamento das áreas de mata para a implantação da agricultura e da criação de gado (COURA; BORGES-PEREIRA, 2010). Com a degradação do ambiente natural do inseto vetor em torno das cidades e a diminuição de animais silvestres disponíveis como fonte de alimentação pôde-se observar a sua invasão e colonização nos domicílios e peridomicílios humanos, tendo como fontes alimentares os animais domésticos e o homem (DIAS, 2000; COURA, 2003; COURA; BORGES-PEREIRA, 2010; DIAS et al., 2013).

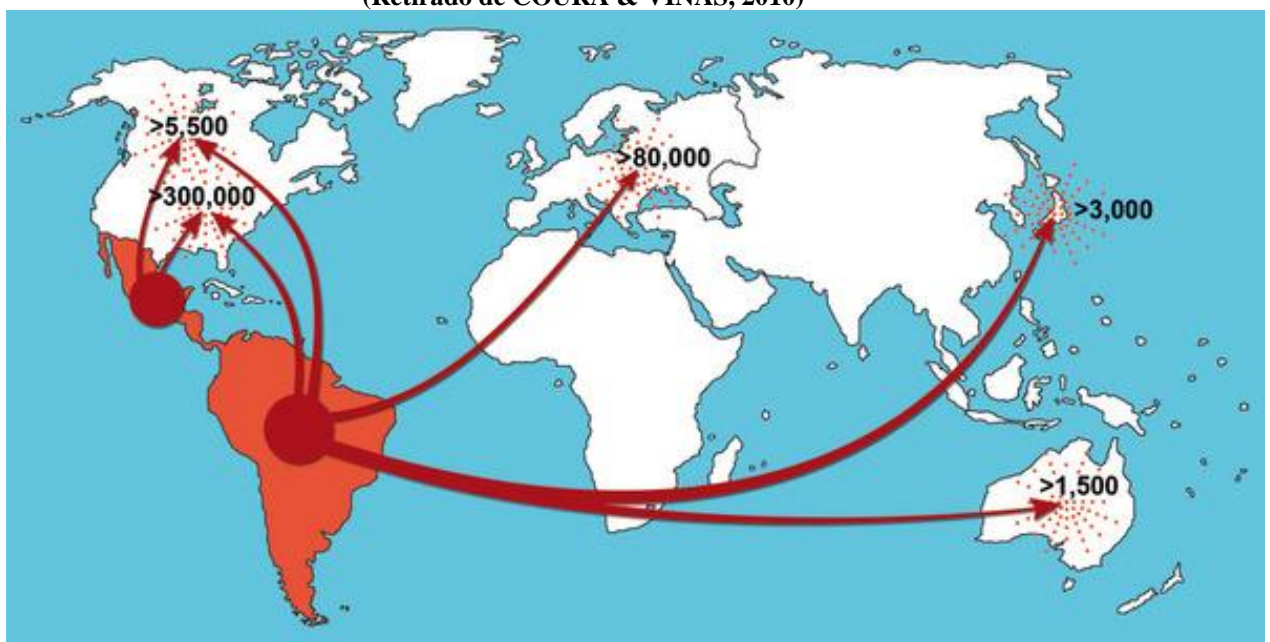
A doença de Chagas constitui a doença parasitária responsável pelo maior número de mortes na América Latina, superando a malária (SOUZA, 2010), sendo classificada na década de 90 como a de maior impacto na América do Sul e Central em termos socioeconômicos (SCHOFIELD; DIAS, 1999). Mesmo com os avanços alcançados no controle da infecção vetorial e da transfusão sanguínea, estima-se que, a nível mundial, há cerca de 6 a 7 milhões de pessoas infectadas, sobretudo nos países latino-americanos (OMS, 2015). Nas Américas, a cada ano há 28.000 novos casos, cerca de 65 milhões de pessoas sob o risco de adquirir a enfermidade e 18.000 recém-natos infectados durante a gestação (OPAS, 2014). O método mais útil de prevenção do aumento da incidência é o controle vetorial, seguido de controle dos bancos de sangue para evitar a transmissão transfusional e por transplante de órgãos, além da realização de exames em mulheres grávidas para prevenir a transmissão vertical (OMS, 2015).

A doença de Chagas possui duas fases. A fase aguda, decorrente da infecção inicial pelo *T. cruzi*, pode persistir até dois meses após a infecção (OMS, 2015), correspondendo ao período de elevada parasitemia e, na maioria das vezes, é oligossintomática (COURA; BORGES-PEREIRA, 2010; REY, 2011; OMS, 2015). Em 5% dos casos (STANAWAY; ROTH, 2015) é caracterizada por febre, astenia, poliadenite, aumento relativamente pequeno do fígado e baço, e sinal de Romaña ou de outros tipos de chagoma de inoculação (REY, 2011). Eventualmente, o parasito e o hospedeiro alcançam um equilíbrio imunológico e a doença evolui para a fase

crônica. Nesta fase, a parasitemia é intensamente reduzida e a maioria dos pacientes torna-se assintomáticos. A fase crônica pode seguir imediatamente após o período agudo ou o intervalo assintomático pode durar anos (REY, 2011). Entre 50 a 70% dos indivíduos crônicos permanecem na forma indeterminada (latente) da doença por toda a sua vida e não desenvolvem qualquer sintoma crônico (BARRETT et al., 2003; COURA; BORGES-PEREIRA, 2010; REY, 2011). Porém, os protozoários podem se estabelecer no coração e nos músculos digestivos (OMS, 2015), representando as duas formas clínicas de grande importância devido a sua gravidade, a cardiopatia chagásica crônica e megaesôfago e megacólon (REY, 2011). Assim, até 30% das pessoas infectadas desenvolvem a forma cardíaca, e até 10% a forma digestiva, neurológica ou mista da doença (OMS, 2015). Isso acontece, geralmente, 10 a 25 anos após a infecção inicial (BARRETT et al., 2003).

Inicialmente, a enfermidade era circunscrita à região das Américas, principalmente na América Latina, mas atualmente tem se propagado para outros continentes (**Figura 1**) (OMS, 2010, 2015).

Figura 1: Rotas migratórias de indivíduos latino-americanos infectados por *T. cruzi* para regiões não endêmicas.
(Retirado de COURA & VIÑAS, 2010)



A estimulação pela repressão política e/ou pela estagnação econômica das crescentes migrações internacionais de 21 países latino-americanos endêmicos (Argentina, Belize, Bolívia, Brasil, Chile, Colômbia, Costa Rica, Equador, El Salvador, Guiana Francesa, Guatemala, Guiana, Honduras, México, Nicarágua, Panamá, Paraguai, Peru, Suriname, Venezuela e Uruguai) (SCHMUNIS; YADON, 2010; OMS, 2015) para países desenvolvidos de áreas não endêmicas, fizeram com que a doença passasse a ser um problema emergente na América do

Norte, Europa, Japão e Austrália (OMS, 2010, 2015; SCHMUNIS; YADON, 2010). Em estudo realizado por Schmunis e Yadon (2010), observou-se que no ano de 2005, 15 países da Europa (exceto a Espanha) receberam 483.074 imigrantes latino-americanos dos quais 2,9% estariam infectados com *T. cruzi*. Em 2006, dos 80.522 indivíduos que imigraram de 17 países endêmicos para a Austrália, 3,8% estavam possivelmente infectados com o parasito. No mesmo ano, 156.960 latinos imigraram para o Canadá com taxa estimada em 3,5% de infecção por *T. cruzi*. No Japão, em 2007, havia 80.912 imigrantes do Brasil, 15.281 do Peru e 19.413 de outros países da América do Sul, uma parte dos quais também pode ter sido infectada. Em 2008, a Espanha recebeu 1.678.711 latinos de países endêmicos e, destes, 5,2% estavam potencialmente infectados e 17.390 sob o risco de desenvolver a doença de Chagas. Acredita-se que, em 2007, 24 a 92 recém-nascidos na Espanha de imigrantes sul-americanas grávidas, infectadas, também adquiriram congenitamente o protozoário. Nos EUA estima-se que 1,9% dos cerca de 13 milhões de imigrantes da América Latina, em 2000, e 2% de 17 milhões, em 2007, estavam parasitados. Destes, 49.157 e 65.133, em 2000 e 2007, respectivamente, podem ter ou podem desenvolver sintomas e sinais da doença de Chagas crônica (SCHMUNIS; YADON, 2010).

Entre 1975 e 1983, o programa de controle da doença de Chagas teve início no Brasil devido à infestação domiciliar pelo vetor epidemiologicamente mais relevante da espécie *Triatoma infestans* Klug, 1834 em 700 municípios de 12 estados brasileiros (SILVEIRA et al., 1984). Acredita-se que, nestes anos, 4,2% da população brasileira estava infectada pelo *T. cruzi* e cerca de 100.000 novos casos foram registrados a cada ano (CAMARGO et al., 1984). Em 1991, o Brasil aderiu ao consórcio internacional do Cone Sul com o objetivo de reduzir a transmissão por vetores através do uso de inseticidas contra a principal espécie de triatomíneo (DIAS et al., 2002; GURGEL GONÇALVES et al., 2012). Esta iniciativa teve um grande impacto sobre a doença nos países pertencentes ao Cone Sul, ocorrendo uma redução de 94% da incidência após 10 anos de medidas realizadas (OMS, 2002). E, em 2006, o Ministério da Saúde do Brasil recebeu a Certificação Internacional de Eliminação da Transmissão de *T. cruzi* pelo *T. infestans*, conferida pela Organização Pan-Americana da Saúde (FERREIRA; SILVA, 2006).

Quando o sistema de controle de vigilância em saúde for falho, a interação parasito-vetor-hospedeiro-reservatório pode ser mantida em regiões onde espécies de triatomíneos autóctones são comuns. Com a descentralização do sistema de saúde no Brasil, as medidas de controle vetorial passaram a ser de responsabilidade dos governos municipais que se deparam com dificuldades operacionais e políticas, e carecem de recursos financeiros (COUTINHO et

al., 2014). Além disso, em locais onde triatomíneos silvestres são freqüentes, o baixo efeito residual de inseticidas juntamente com as alterações nos biomas induzidas pela devastação do ecótopo natural em torno das cidades, facilitam a invasão e colonização de triatomíneos em ambientes domiciliar e peridomiciliar (DIAS, 2000), aumentando o potencial de importância epidemiológica de outras espécies deste hemíptero na transmissão de *T. cruzi* ao homem.

É importante destacar que, diferente da erradicação em que a transmissão é definitivamente interrompida, mesmo na ausência de qualquer ação de controle, a certificação de eliminação representa uma interrupção momentânea da transmissão do parasito, especificamente por determinada espécie de triatomíneo, e depende da manutenção de alguma ação de controle e vigilância (SILVEIRA, 2002). Assim, pode haver repovoamento do *T. infestans* quando tais medidas epidemiológicas (Tabela 1) são interrompidas, principalmente em regiões mais pobres e politicamente menos representativas. Existe certa preocupação com as espécies que habitam preferencialmente o peridomicílio: *Triatoma brasiliensis*, *Triatoma pseudomaculata*, *Triatoma sordida* e *Panstrongylus megistus* (DIAS, 2000; RAMOS JR; CARVALHO, 2001; FERREIRA; SILVA, 2006; BRASIL, 2009). Porém, esse processo de adaptação domiciliar triatomínica é lento e dependerá da genética, do comportamento e da biologia do vetor (FERREIRA; SILVA, 2006).

Tabela 1: Principais situações e respectivas estratégias de vigilância epidemiológica da doença de Chagas humana.

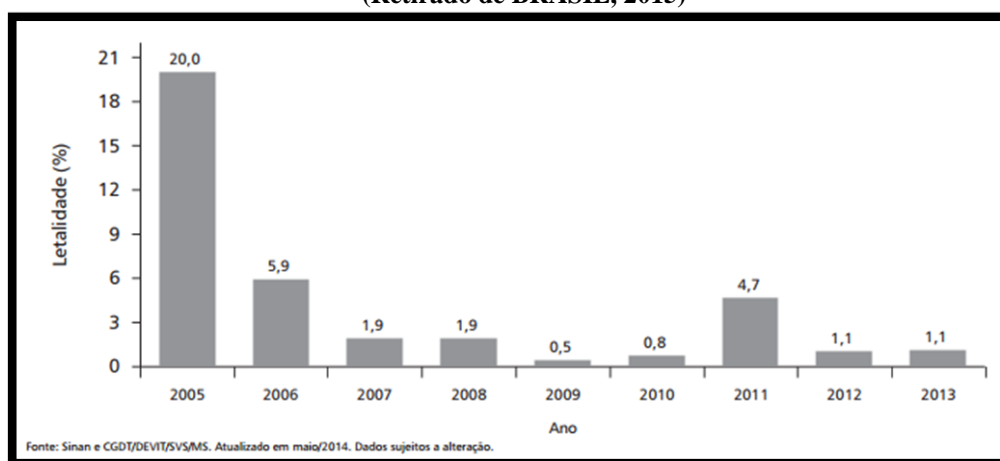
(Retirado de DIAS, 2000)

Problema	Situações	Estratégias de vigilância
Transmissão vetorial	Áreas rurais, algumas urbanas	Detecção e eliminação de focos Melhoramento da vivenda e peridomicílio Participação comunitária Soroepidemiologia como medida do impacto
Transmissão transfusional	Basicamente urbana	Sorologia prévia de doadores; soroepidemiologia Controle de procedimentos e reagentes Conscientização comunitária
Transmissão congênita	Urbana ou rural	Diagnóstico precoce de gestantes e neonatos Tratamento específico precoce da criança Soroepidemiologia (detecção e medida de impacto)
Caso agudo (eventual)	Rural ou urbano	Diagnóstico precoce Tratamento específico Investigação epidemiológica do caso e da região
Caso crônico	Urbano ou rural	Diagnóstico precoce Atenção médica periódica Atenção previdenciária e médico-laboral Tratamento específico quando indicado

No Brasil, cerca de 2 a 3 milhões de pessoas estão infectadas pelo *T. cruzi* (AKHAVAN, 2000; DIAS, 2007; RAMOS JR. et al., 2010; MARTINS-MELO et al., 2014)

com cerca de 6.000 mortes por ano (MARTINS-MELO et al., 2012a,b,c). A doença de Chagas transmitida por via oral é geralmente responsável pela ocorrência de surtos esporádicos de infecção aguda em áreas desprovidas de insetos vetores domiciliados, resultando em apresentação clínica aguda mais severa e altas taxas de mortalidade (PEREIRA et al., 2009). Situações imprevisíveis na região da Amazônia Brasileira e mais raramente, em áreas que não apresentam endemicidade, têm revelado casos emergentes de doença de Chagas (SHIKANAI-YASUDA; CARVALHO, 2012). No Brasil, os registros de óbitos por doença de Chagas aguda ocorreram entre 2005 e 2013. A elevada letalidade (20,0%), em 2005, ocorreu em decorrência do surto por transmissão oral em Santa Catarina. Em 2006, a letalidade foi de 5,9%, com posterior redução, que se manteve relativamente constante nos anos subsequentes (BRASIL, 2015) (**Figura 2**).

Figura 2: Letalidade anual da doença de Chagas aguda. Brasil, 2005 a 2013. (Retirado de BRASIL, 2015)



Até meados da década de 1970, o risco de transmissão por *T. cruzi* estava diretamente ligado à pobreza e às más condições de moradia da população em áreas endêmicas. Entretanto, o crescente êxodo rural nas décadas de 70 e 80 deu início a uma mudança dos padrões tradicionais de epidemiologia da doença para uma infecção também urbana, podendo ocorrer transmissão por transfusão sanguínea (DIAS, 2002; OMS, 2008). Nas décadas de 80 e 90 este tipo de transmissão foi a principal forma de disseminação da doença em áreas endêmicas do Brasil. Com uma melhor cobertura na triagem de doadores de sangue e controle vetorial houve uma drástica redução na taxa de transmissão por essa via (MORAES-SOUZA; FERREIRA-SILVA, 2011). Com relação à transmissão vertical, em estudo realizado por Ostermayer et al. (2011), o estado do Rio Grande do Sul possui alta taxa de transmissão congênita, correspondendo a 60% do total de casos de infecção incluídos na pesquisa. Por fim, a transmissão oral tornou-se evidente devido aos casos de infecção humana por ingestão de

alimentos contaminados com a forma infectante do parasito, estando geralmente relacionada à presença de vetores e/ou reservatórios infectados nas imediações do evento. Diversos casos de doença aguda têm sido registrados no Brasil (**Tabela 2**), com prevalência maioritária na região Amazônica (principalmente no Pará), seguida do Nordeste, Sul, Centro Oeste e Sudeste, causados por ingestão de água (DIAS et al., 2008), consumo de alimentos (NEVES et al., 1968), de cana-de-açúcar (SHIKANAI-YASUDA et al., 1991) e açaí (DA SILVA VALENTE et al., 1999; VALENTE, 2005; NÓBREGA, 2009) contaminados com *T. cruzi*. A região amazônica era considerada uma área não endêmica, mas, atualmente, é responsável pelo maior número de casos de doença de Chagas aguda, principalmente por transmissão oral, incentivando medidas de vigilância que visam à pasteurização dos produtos, o controle da exportação de sucos não tratados e outros produtos (PINTO et al., 2008; DIAS; AMATO NETO, 2011); e a participação da comunidade na notificação da presença do vetor (ABAD-FRANCH et al., 2011), a partir de medidas educativas.

Segundo dados do Ministério da Saúde, no período de 2000 a 2013, houve o registro de 1.570 novos casos da doença de Chagas aguda no Brasil. Aproximadamente 70% destes casos foram decorrentes de transmissão oral, em cerca de 7% a transmissão ocorreu por via vetorial e em 23,7% dos casos não se identificou a forma de transmissão (BRASIL, 2015) (**Tabela 2**).

Tabela 2: Casos confirmados de doença de Chagas aguda, segundo ano de notificação e forma de transmissão. Brasil, 2000 a maio de 2014.

(Retirado de BRASIL, 2015)

Forma de transmissão	Ano de notificação														Total	%
	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013		
Oral	31	18	64	47	51	27	106	92	68	169	68	117	127	96	1.081	68,9
Ignorada*	10	6	11	8	9	3	8	59	24	34	36	61	49	54	372	23,7
Vetorial	-	-	-	1	1	-	4	4	11	16	25	10	8	20	100	6,4
Outras**	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	1	1	3	4	11	0,7
Vertical	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	1	2	6	0,4
Total	41	24	75	56	61	30	118	156	104	220	131	190	188	176	1.570	100,0

*Foram incluídos os casos com a variável "forma provável de transmissão" em branco.
 **Transmissão acidental e transfusional.
 Fonte: Sinan e CGDT/DEVIT/SVS/MS. Atualizado em maio/2014. Dados sujeitos a alteração.

Entre os fatores que dificultam o controle da doença está o enfraquecimento do sistema de vigilância epidemiológica, pois a notificação de ocorrência de casos novos é obrigatória somente na fase aguda (**Tabela 2 e 3**) que, frequentemente, é oligossintomática, podendo ocorrer a subnotificação da incidência da enfermidade. Sua detecção é de grande importância, não apenas pela necessidade de tratamento precoce dos doentes, mas também para as ações de vigilância epidemiológica. No Brasil, o Ministério da Saúde tem discutido a possibilidade de notificação compulsória também da fase crônica (MARTINS-MELO et al. 2012a), considerando que a reativação da doença de Chagas crônica pode ocorrer em 20% dos

pacientes co-infectados com HIV/*T. cruzi*, caracterizada por altos níveis de parasitemia (RAMOS JR., 2004; DE FREITAS et al., 2011). Ressalta-se que mais de 90% dos indivíduos infectados pelo *T. cruzi* encontram-se na fase crônica da infecção. Além disso, o país possui uma peculiaridade por conter uma ampla diversidade de espécies de vetores e seus respectivos habitats, principalmente na região nordeste. De acordo com Dias (2000), os maiores desafios quanto à luta antivetorial estão na “sustentação da participação comunitária, manutenção da vontade política, manejo do peridomicílio e detecção de triatomíneos em baixas densidades”. Conforme Coura e Borges-Pereira (2010) há uma grande ameaça à reintrodução de espécies de triatomíneos em regiões onde o controle vetorial foi alcançado. Ademais, não existe vacina disponível para prevenir a doença e, embora as infecções agudas possam ser tratadas com sucesso, a ausência ou a baixa manifestação de sintomas nesta fase leva ao diagnóstico tardio e faz com que a rotina de vigilância epidemiológica seja dificultada (BWITITI; BROWNE, 2012).

Tabela 3: Casos confirmados de doença de Chagas aguda, segundo Região, Unidade da Federação de residência e forma de transmissão. Brasil, 2000 a maio de 2014. (Retirado de BRASIL, 2015)

Região/Unidade da Federação	Forma de transmissão					Total	Total%
	Oral	Vetorial	Vertical	Ignorada*	Outras**		
Norte	1.023	70	1	329	7	1.430	91,1
Rondônia	0	2	0	0	0	2	0,1
Acre	5	2	0	0	0	7	0,4
Amazonas	56	14	0	7	1	78	5,0
Roraima	0	0	0	1	0	1	0,1
Pará	812	49	1	306	5	1.173	74,7
Amapá	131	1	0	13	1	146	9,3
Tocantins	19	2	0	2	0	23	1,5
Nordeste	33	14	1	23	2	73	4,6
Maranhão	11	7	0	5	1	24	1,5
Piauí	0	3	0	1	0	4	0,3
Ceará	8	1	0	0	0	9	0,6
Rio Grande do Norte	1	0	1	0	0	2	0,1
Paraíba	0	0	0	1	0	1	0,1
Pernambuco	0	2	0	15	0	17	1,1
Sergipe	0	1	0	1	0	2	0,1
Bahia	13	0	0	0	1	14	0,9
Sudeste	0	2	1	8	1	12	0,8
Minas Gerais	0	0	0	6	0	6	0,4
Espírito Santo	0	0	0	0	1	1	0,1
Rio de Janeiro	0	1	0	0	0	1	0,1
São Paulo	0	1	1	2	0	4	0,3
Sul	25	0	3	0	0	28	1,8
Santa Catarina	24	0	0	0	0	24	1,5
Rio Grande do Sul	1	0	3	0	0	4	0,3
Centro-Oeste	0	14	0	12	1	27	1,7
Mato Grosso	0	4	0	0	0	4	0,3
Goiás	0	10	0	12	1	23	1,5
Brasil	1.081	100	6	372	11	1.570	100,0

*Foram incluídos os casos sem preenchimento da forma provável de transmissão.
**Transmissão acidental e transfusional.
Fonte: Sinan e CGDT/DEVIT/SVS/MS. Atualizado em maio/2014. Dados sujeitos a alteração.

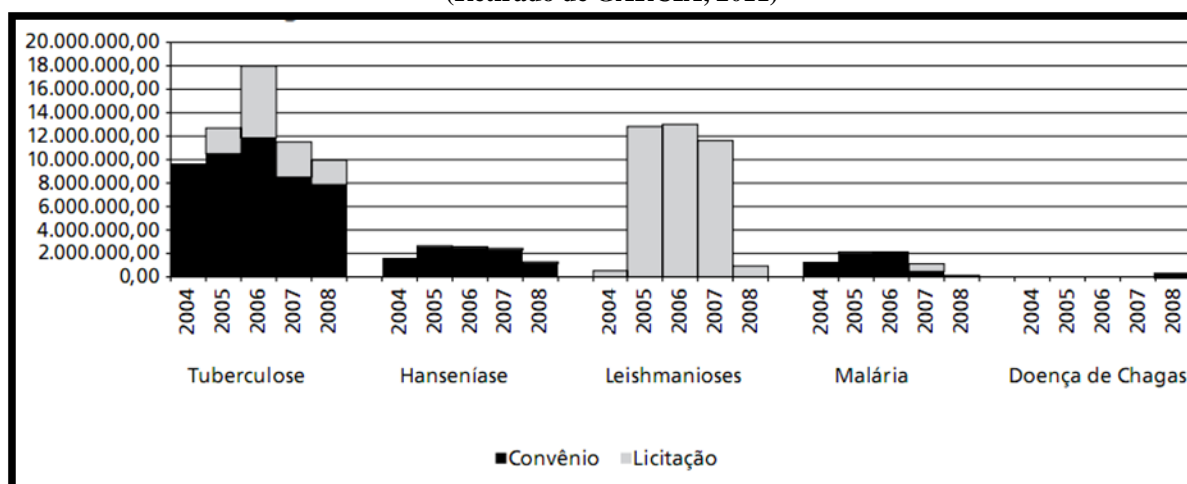
Em 1970, foi originalmente proposto o termo ‘Doenças Negligenciadas’ por um programa da Fundação Rockefeller (SOUZA, 2010). Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (2007) as doenças negligenciadas são as que “não apresentam

atrativos econômicos para o desenvolvimento de fármacos, quer seja por sua baixa prevalência, ou por atingir população em região de baixo nível de desenvolvimento”. Assim, as empresas farmacêuticas multinacionais não veem nessas enfermidades compradores potenciais de novos medicamentos. As seguintes doenças foram incluídas neste conceito: doença de Chagas, doença do Sono, Leishmanioses, Malária, Filariose, Esquistossomose, Hanseníase, Tuberculose, Dengue, Febre Amarela, SIDA, Ascaríase, Tricuríase, Necatoríase, Ancilostomíase, Tracoma, Dracunculíase e Úlcera de buruli (SOUZA, 2010).

A **Figura 3** mostra os gastos do Ministério da Saúde, entre 2004 e 2008, com fármacos para os programas de assistência farmacêutica para tuberculose, hanseníase, leishmanioses, malária e doença de Chagas (GARCIA et al., 2011). Entre 2004 e 2007, não foram registrados gastos com medicamentos para o tratamento da doença de Chagas. Apenas em 2008, houve repasse de recursos para a produção de medicamentos. No ano anterior, o laboratório fabricante havia doado ao governo brasileiro os direitos e a tecnologia de fabricação do Benzonidazol, que representa o único medicamento disponível no país, gratuitamente, para combater a doença (GARCIA et al., 2011), apesar de seus efeitos colaterais e toxicidade. Este medicamento foi introduzido há mais de 40 anos e não é eficaz para a fase crônica. Além disso, a necessidade de longos períodos de tratamento e de possuírem efeitos colaterais potenciais, pode gerar abandono do tratamento por parte dos pacientes levando a uma redução da eficácia do medicamento. Ademais, algumas cepas de *T. cruzi* são resistentes a estes fármacos (CLAYTON, 2010). Neste contexto, a doença de Chagas necessita urgentemente de mais opções de tratamento.

Figura 3: Gastos do Ministério da Saúde do Brasil com medicamentos para os programas de assistência farmacêutica, de 2004 a 2008.

(Retirado de GARCIA, 2011)



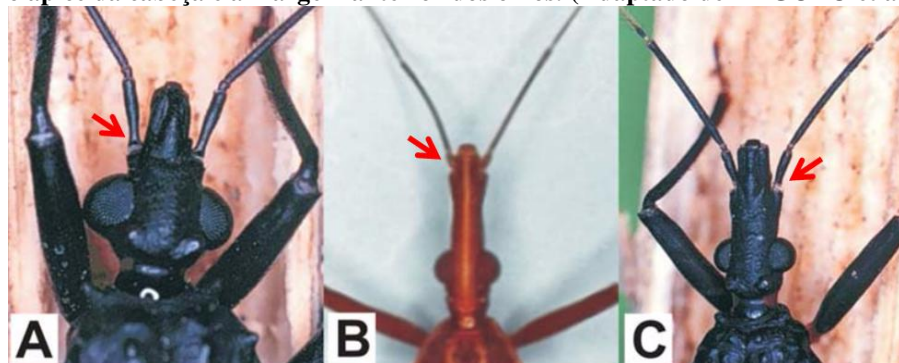
1.2 Os vetores: Triatomíneos

Os triatomíneos são vulgarmente chamados no Brasil de Barbeiros, Chupanças, Fincões, Chupões, Bicudos, Procotós, Prorocotós, Percevejões, Bichos-de-parede, Bichos-de-parede pretos, Percevejo-do-sertão, Percevejos franceses, Percevejos grandes, Percevejos gaudérios, Baratão, Bruxas, Piolhos-de-piaçava, Quiches do sertão, Rondões, Vunvuns, Cascudos (LENKO; PAPAVERO, 1979). E ainda são conhecidos, em outros países, como *Vinchucas*, *Chinchorros*, *Chipos*, *Chinches*, *Chirimachas*, *Pitos*, *Kissing-bugs*... (LENKO; PAPAVERO, 1979; REY, 2011; DIAS et al., 2013).

São vetores invertebrados do *T. cruzi* e pertencem à subfamília Triatominae (Hemiptera: Heteroptera: Reduviidae) (LENT; WYGODZINSKY 1979). Esta subfamília divide-se em cinco tribos (Rhodniini, Triatomini, Cavernicolini, Bolboderini e Alberproseniini), incluindo 18 gêneros e 148 espécies (DIAS et al., 2013; JUBERG et al., 2014; GALVÃO, 2015). No Brasil foram registradas 65 espécies (**Tabela 4**) (GALVÃO, 2015). Destas, cerca de dez espécies e três gêneros (*Triatoma* Laporte 1832, *Panstrongylus* Berg 1879 e *Rhodnius* Stal 1859) são epidemiologicamente mais importantes devido às suas características comportamentais (REY, 2011; JUBERG et al., 2014). A inserção das antenas nos tubérculos anteníferos auxilia na diferenciação destes principais gêneros (**Figura 4**).

Figura 4: Diferenciação dos gêneros *Panstrongylus*, *Rhodnius* e *Triatoma* pelo ponto de inserção das antenas no tubérculo antenífero (indicado pela seta).

(A) *Panstrongylus*: as antenas encontram-se inseridas junto à margem anterior dos olhos; (B) *Rhodnius*: as antenas apresentam-se no ápice da cabeça; (C) *Triatoma*: as antenas inserem-se na metade da distância entre o ápice da cabeça e a margem anterior dos olhos. (Adaptado de ARGOLO et al., 2008)



Apesar da descrição da subfamília Triatominae preconizar a realização do hematofagismo em animais vertebrados, sabe-se que os triatomíneos podem se alimentar da hemolinfa de outros insetos, e realizar a coprofagia e a cleptohematofagia, em que o *T. cruzi* é excepcionalmente transmitido de vetor a vetor (LENT; WYGODZINSKY, 1979; DIAS et al., 2013; NEVES, 2012). Este fato corrobora com a hipótese de que este inseto evoluiu de outros reduviídeos, predadores ou fitófagos, a partir de mudanças morfológicas, fisiológicas,

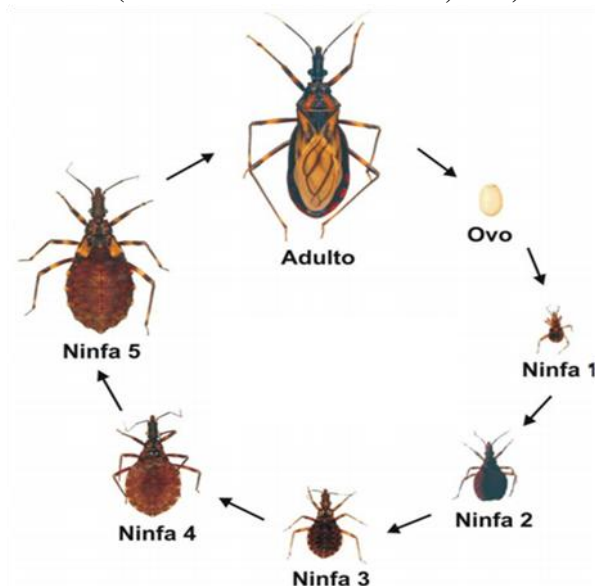
comportamentais e demográficas para a adaptação da hematofagia sobre os vertebrados e dependência destes para se dispersar passivamente (SCHOFIELD; DIAS, 1999). Podem ser levados para o interior das casas de forma passiva por meio dos animais, dos moradores quando estes trazem objetos do seu quintal/terreiro para o interior do domicílio ou, até mesmo, através do vento.

O tamanho das populações e a dispersão das diversas espécies de triatomíneos em seus habitats naturais dependem da disponibilidade da fonte alimentar, uma vez que, quanto maior o número de insetos numa determinada área, estes terão menores quantidades disponíveis de sangue. Quando há essa limitação alimentar, muitas vezes relacionadas às ações antrópicas no ambiente, eles se dispersam a procura de novos hospedeiros, aspecto importante para a manutenção das medidas de controle. Entre os fatores que influenciam a distribuição das diferentes espécies de triatomíneos estão a diversidade de habitats e as condições de temperatura e umidade. Outra questão importante na elaboração de estratégias de controle vetorial é a resistência ao jejum. Após o repasto sanguíneo os triatomíneos iniciam a digestão do sangue, produzindo o corpo gorduroso. Este tecido é responsável por acumular reservas nutritivas, fazendo com que os insetos permaneçam por tempo razoável sem se alimentar quando não há hospedeiros disponíveis. Assim, os insetos vetores alimentados podem permanecer longe de habitações que foram borrifadas e voltar a recolonizar o domicílio após o término do poder residual do inseticida (OPAS, 2015).

Os triatomíneos são hemípteros de hábitos noturnos e durante o dia permanecem em seus abrigos (DIAS et al., 2013). A maioria das espécies vive nos ecótopos silvestres e estão associados aos mamíferos, aves e répteis. Porém, com as crescentes mudanças ocorridas no habitat natural destes insetos, houve a adaptação e instalação destes no ecótopo artificial ocupado pelo homem, tanto no ambiente domiciliar quanto no ambiente peridomiciliar, especialmente em frestas e rachaduras das casas, galinheiros, currais, amontoados de telhas, tijolos, lenhas e em paióis. Cada gênero possui sua especificidade. As espécies de *Rhodnius* estão associadas a palmeiras (babaçu, buriti, inajá...) onde são encontrados pássaros, pequenos roedores e lacertídeos, as de *Panstrongylus* são predominantemente encontradas em tocas ou cavidades de árvores, e as do gênero *Triatoma* estão associadas com rochas e tocas de roedores, com espécies exclusivamente encontradas em cavidades das árvores ou em ninhos, enquanto outras em rochas e cavernas com morcegos (GAUNT; MILES, 2000; OPAS, 2015).

Estes insetos medem de 1 a 4 cm de comprimento. Podem ser facilmente distinguidos de outros hemípteros por serem hematófagos em todas as fases de vida, se alimentando preferencialmente de sangue de pássaros e mamíferos, e por possuírem uma probóscida retilínea com apenas três segmentos (REY, 2011). Os triatomíneos vivem por volta de 1 a 2 anos. São hemimetábolos (metamorfose incompleta) e as alterações morfológicas são gradativas ao longo do seu crescimento e desenvolvimento. Sendo muito semelhantes aos adultos, as ninfas dos insetos hemimetábolos possuem peças bucais iguais às dos adultos (ARGOLO et al., 2008; MESSIAS, 2011; OLIVEIRA, 2013). Por este motivo, todos os estádios se nutrem da mesma fonte alimentar e vivem no mesmo nicho ecológico. Seu ciclo de vida é representado por ovo, cinco estádios ninfais (N1 a N5) e uma fase adulta, havendo nesta o surgimento das asas e a completa diferenciação sexual (ARGOLO et al., 2008) (**Figura 5**).

Figura 5: Ciclo de vida de um triatomíneo – *Triatoma brasiliensis brasiliensis*. (Retirado de ARGOLO et al., 2008)



Dependendo da espécie o ciclo biológico completo ocorre entre seis meses e dois anos, e dependerá da temperatura e da umidade relativa do ambiente (OPAS, 2015). O conhecimento da biologia do inseto é relevante para as medidas de controle, uma vez que as borrifações nas habitações humanas devem atuar de modo que os insetos não cheguem à fase adulta, diminuindo as chances de recolonização do ambiente que foi tratado.

De modo geral, a fêmea realiza a postura entre 20 e 30 dias após a cópula, produzindo uma ou duas centenas de ovos (ARGOLO et al., 2008; DIAS et al., 2013). Na ovoposição o ovo pode estar solto ou preso ao substrato, como nos pelos de animais

ou materiais de peridomicílio que são levados para as habitações humanas, fatores importantes para a dispersão passiva das espécies.

Os triatomíneos são vetores biológicos em que o agente etiológico se multiplica e se desenvolve em seu interior antes de ser transmitido para um hospedeiro vertebrado. Na transmissão biológica há especificidade entre o vetor e o patógeno decorrente de condições fisiológicas e bioquímicas próprias dos tecidos do hospedeiro invertebrado, onde ocorre a interação parasito-vetor. Historicamente, estes vetores são classificados, segundo a sua importância epidemiológica, como vetor primário ou vetor secundário. Um vetor primário é capaz de disseminar o protozoário entre os indivíduos suscetíveis numa determinada área, possuindo alta capacidade vetorial (OLIVEIRA, 2013). Esta capacidade vetorial irá depender da sua boa reprodução em ambientes artificiais e longevidade, da suscetibilidade à infecção pelo parasito e este dispor de ampla capacidade de metaciclogênese; além da capacidade de ingerir volume sanguíneo expressivo, e apresentar curto período de repasto e reduzido intervalo entre o repasto e a defecação, já que a transmissão vetorial se dá pela penetração das formas infectantes do parasita, eliminadas nas fezes do triatomíneo durante a sua alimentação no hospedeiro vertebrado (ARGOLO et al., 2008; DIAS et al., 2013).

O *T. infestans* foi o principal vetor primário no Brasil, até que em 2006 recebeu a certificação internacional de eliminação da transmissão de *T. cruzi* por este vetor, contribuindo com a redução drástica da doença por transmissão vetorial no nosso país. No entanto, por razões desconhecidas, focos residuais deste vetor ainda são encontrados na Bahia e Rio Grande do Sul (GURGEL GONÇALVES et al., 2012; PESSOA et al., 2015; BRANDÃO et al., 2015). Vetores secundários possuem capacidade vetorial menor do que a de vetores primários, no entanto, podem auxiliar na transmissão do agente etiológico numa determinada área onde a transmissão é mantida por um vetor primário (OLIVEIRA, 2013). Dentre estas espécies secundárias estão *T. sordida*, *T. rubrovaria*, *T. pseudomaculata*, *T. brasiliensis*, *P. megistus* e *R. neglectus*, que vêm ocupando em algumas regiões do Brasil os nichos que foram liberados pelo *T. infestans* (ZELEDÓN; RABINOVICH, 1981; CARBAJAL DE LA FUENTE; CATALÁ, 2002; COSTA et al., 2003; BRASIL, 2009; CORTEZ et al., 2010). Atualmente, estão relacionadas aos surtos orais por meio de alimentos contaminados com a forma infectante do parasito, principalmente na região da Amazônia Brasileira (DA SILVA VALENTE et al., 1999; VALENTE, 2005; NÓBREGA, 2009). É importante ressaltar que a definição do papel primário ou secundário das diferentes espécies de triatomíneos

não pode ser um conceito generalista, devendo-se considerar o potencial de domiciliação local da espécie e a pressão que as modificações ambientais podem exercer sobre este processo de domiciliação. Assim, um vetor secundário em uma região pode ser considerado primário em outra devido às diferenças relacionadas à capacidade vetorial, às espécies crípticas e à devastação do ecótopo natural, aumentando o contato com seres humanos e outras fontes susceptíveis.

1.3 O parasito: *Trypanosoma cruzi*

O *T. cruzi* é um protozoário flagelado e unicelular da ordem Kinetoplastida e família Trypanosomatidae, caracterizado pela existência de um único flagelo que se origina de uma invaginação, conhecida como bolsa flagelar, além de um cinetoplasto capaz de auto-replicação, que possui uma condensação de DNA (DNA do cinetoplasto ou kDNA) localizada no interior dessa mitocôndria única (CLAYTON, 2002).

Ao longo do seu ciclo biológico complexo, o *T. cruzi* assume diferentes formas evolutivas: amastigota, epimastigota e tripomastigota (BRENER, 1971, 1973). Estas diferentes formas evolutivas são diferenciadas morfológicamente pelo aspecto geral da célula, pela posição do cinetoplasto em relação ao núcleo e pela região de emergência do flagelo (BRENER, 1971, 1973; DE SOUZA, 2002; REY 2011, 2013) (**Figura 6**).

Mesmo apresentando diferenças relacionadas à quantidade de DNA e tamanho do genoma, o cariótipo do *T. cruzi* apresenta-se estável nas diferentes subpopulações (WAGNER; SO, 1990). *T. cruzi* evolui alternadamente entre um hospedeiro invertebrado, representado por numerosas espécies de triatomíneos, e um hospedeiro vertebrado (mamíferos silvestres ou domésticos), sendo classificado como heteroxênico. Seu ciclo evolutivo nos insetos hematófagos ocorre no intestino médio e posterior. O triatomíneo se infecta com as formas tripomastigotas sanguícolas ao sugar o sangue de um mamífero infectado. No intestino médio, os tripomastigotas transformam-se em epimastigotas. Alguns epimastigotas, após multiplicação ativa, sofrem uma nova diferenciação no intestino posterior, na ampola retal, adotando a forma tripomastigota metacíclica. Esta constitui a forma infectante para os vertebrados e é eliminada pelas fezes após o repasto sanguíneo, podendo penetrar no vertebrado por meio de lesões cutâneas, mucosas ou conjuntiva. As formas tripomastigotas metacíclicas são altamente infectantes, podendo invadir diferentes tipos celulares que encontram no hospedeiro vertebrado, incluindo macrófagos, fibroblastos ou células epiteliais, entre outras. Ao invadir estas células, os tripomastigotas metacíclicos se diferenciam em amastigotas,

que se proliferam intracelularmente por fissão binária. Depois de intensa divisão, as formas amastigotas recuperam as formas tripomastigotas sanguíneas que rompem a célula, as quais podem então invadir novas células localizadas no sítio de infecção ou podem atingir a via linfática e sanguínea, e potencialmente atingir diferentes tecidos do hospedeiro, invadindo os mais diversos tipos celulares, em especial células musculares (cardíaca, lisa e esquelética) e ganglionares (**Figura 7**) (ARGOLO et al., 2008; REY, 2011, 2013; CDC, 2015).

Figura 6: Principais formas evolutivas do *T. cruzi*.
(Modificado de REY, 2013)

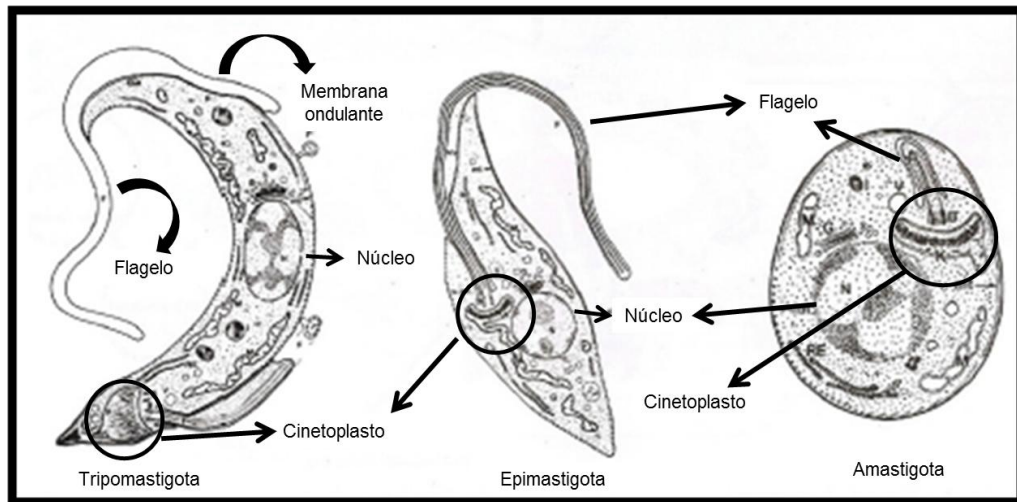
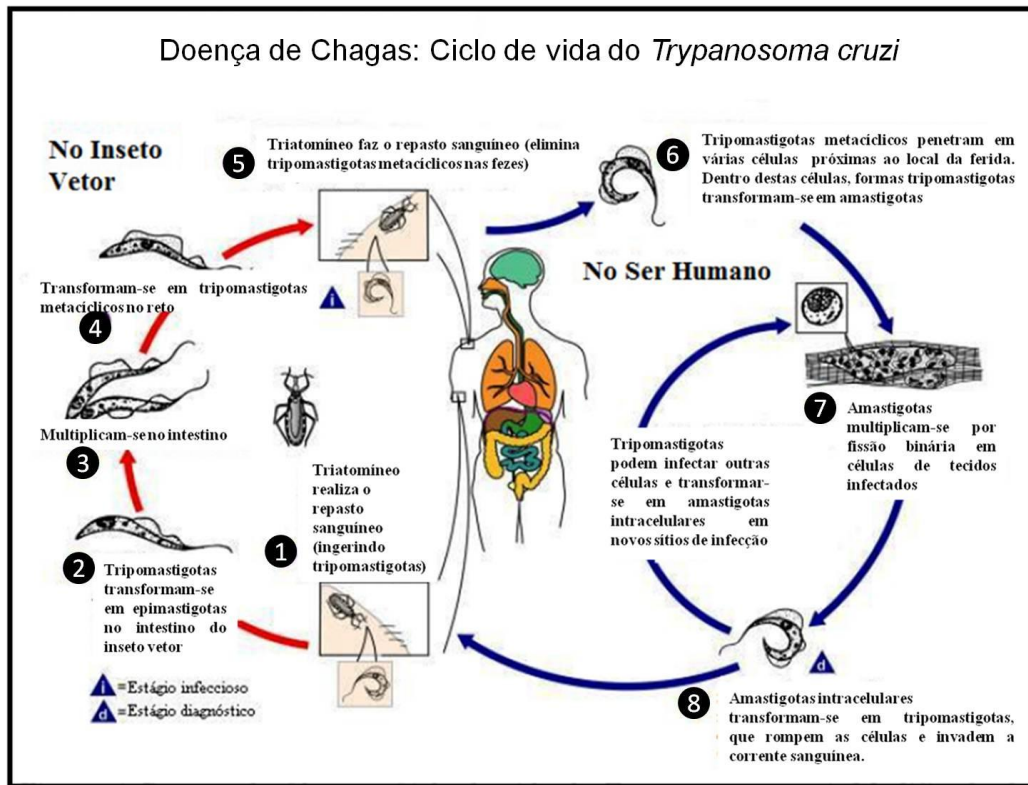


Figura 7: Ciclo de vida do *T. cruzi* em hospedeiros invertebrado e vertebrado.
(Modificado de CDC, 2015)



A plasticidade genômica do *T. cruzi* pode conferir mecanismos para sua sobrevivência ao estresse ambiental (por exemplo, temperatura e pH), além de promover a elevada heterogeneidade genética observada entre as diferentes linhagens do parasito, podendo de certa forma contribuir para a diversidade de espectro clínico relatado na doença de Chagas (McDANIEL; DVORAK, 1993).

T. cruzi é uma espécie heterogênea, representada por subgrupos de cepas, estoques ou isolados que circulam entre hospedeiros mamíferos e insetos vetores. Os primeiros estudos de genética de populações de *T. cruzi* foram realizados pelo grupo de Michael Miles a partir do final da década de 1970. Os isolados foram reunidos em três grupos principais, zimodemas, a partir da análise dos perfis eletroforéticos de isoenzimas (MILES et al., 1978; 1980). Os zimodemas Z1 e Z3 estariam associados ao ambiente silvestre e Z2 ao ambiente doméstico. No entanto, o estudo de um número maior de loci genéticos em um número maior de isolados ampliou a diversidade para 43 zimodemas (TIBAYRENC; AYALA, 1988). A classificação das diferentes cepas e isolados em esquizodemas foi possível por meio de estudos que se baseiam nos perfis de restrição do kDNA (MOREL et al., 1980; ÁVILA et al., 1990). Estes estudos revelaram um elevado polimorfismo genético, resultante de um longo período clonal na evolução do *T. cruzi* (TIBAYRENC et al. 1986; TIBAYRENC; AYALA, 1988).

Através de um conjunto de marcadores genéticos foi possível classificar os *clonets*, clones/cepas que apresentam o mesmo perfil de marcadores genéticos, em subdivisões estáveis conhecidas como DTU I e II (*Discrete Typing Unit* ou Unidade Discreta de Tipagem) (TIBAYRENC; AYALA 1991; TIBAYRENC, 1995; SOUTO et al., 1996; TIBAYRENC, 1998).

Em 1999, a comunidade científica reuniu os isolados de *T. cruzi* em dois grupos denominados por consenso, grupos *T. cruzi* I e *T. cruzi* II (ANONYMOUS, 1999). As cepas do grupo *T. cruzi* I predominam no ciclo silvestre e cepas do grupo *T. cruzi* II predominam no ciclo doméstico da transmissão do parasita (BRIONES et al., 1999). A ligação entre os dois ciclos é feita por vetores que albergam TcII e que invadem os domicílios. Posteriormente, com base na análise de outros marcadores genéticos, foi proposta a substituição do grupo *T. cruzi* II em cinco sub-grupos (BRISSE et al., 2000a), ficando então a nova classificação denominada DTUs I, IIa, IIb, IIc, IId, IIE. Apesar de não ter sido oficialmente recomendada, esta nomenclatura vinha sendo citada pela comunidade científica. Em 2006, Freitas et al. propuseram a existência de uma terceira linhagem principal em *T. cruzi*, designada de *T. cruzi* III, a partir da análise de microsatélites e DNA mitocondrial (FREITAS et al., 2006). Foi também evidenciada a presença de isolados híbridos originados por trocas genéticas entre cepas parentais. É interessante salientar que o clone CL Brener, organismo de referência do projeto genoma de *T. cruzi*, é um isolado híbrido (EL-SAYED et al., 2005). Mais recentemente, a nomenclatura sub-específica de *T. cruzi* foi revisada, visando o entendimento de questões de biologia básica do parasito. Esta nova revisão inclui seis DTUs (*T. cruzi* I - VI), baseada em diferentes marcadores moleculares e características biológicas do parasito (ZINGALES et al., 2009, 2012). O termo DTU é definido como o conjunto de isolados geneticamente semelhantes e que podem ser identificados por marcadores moleculares ou imunológicos comuns (TIBAYRENC, 1998).

A extensa diversidade intraespecífica em *T. cruzi* resulta provavelmente de uma combinação entre clonalidade predominante e eventos de hibridização/troca genética (GAUNT et al., 2003), sustentando a hipótese da associação dos distintos genótipos do parasito com a epidemiologia clínica heterogênea da doença de Chagas (MILES et al., 2003; MACEDO et al., 2004). O conhecimento da distribuição geográfica das populações de *T. cruzi* torna-se fundamental para melhor compreender os aspectos epidemiológicos da doença, uma vez que tem sido sugerido haver associação entre os genótipos do parasito e as formas clínicas da doença de Chagas (MILES et al., 2009;

STURM; CAMPBELL 2010; ZINGALES et al., 2012). Nos países que integram o Cone Sul, as DTUs TcII, TcV e TcVI são as principais responsáveis pela doença de Chagas, sendo que TcII predomina nos estados do leste e centro do Brasil, TcV na Argentina, Bolívia e Paraguai, e TcVI no Gran Chaco. TcI está relacionada com a doença humana na Amazônia, países Andinos, América Central e México (ZINGALES et al., 2012). A partir da revisão de literatura sobre a distribuição das DTUs em humanos indica-se que as DTUs apresentam distribuições geográficas distintas; que todas as DTUs são capazes de promover a doença de Chagas, sendo a TcIII observada, recentemente, infectando humanos no Nordeste do Brasil (MARTINS et al., 2015); que a DTU I não favorece a forma digestiva e que as DTUs II e V seriam mais virulentas, promovendo as manifestações cardíaca e digestiva (CARRANZA et al., 2009; ZINGALES, 2011). A **Tabela 5** apresenta a correspondência entre as DTUs atuais e as nomenclaturas anteriores.

Tabela 5: Correspondência entre as DTUs atuais e as nomenclaturas anteriores.
(Adaptado de ZINGALES et al., 2009)

Designação DTU	Abreviação	Equivalente a
<i>T. cruzi</i> I	TcI	<i>T. cruzi</i> ^{la, b} e DTU I ^c
<i>T. cruzi</i> II	TcII	<i>T. cruzi</i> II ^a e DTU II ^b
<i>T. cruzi</i> III	TcIII	Z3/Z1 ASAT ^d , Z3-A ^e , DTU IIc ^c e <i>T. cruzi</i> III ^f
<i>T. cruzi</i> IV	TcIV	Z3 ^d , Z3-B ^e e DTU IIa ^c
<i>T. cruzi</i> V	TcV	Bolivian Z2 ^d , rDNA 1/2 ^g , clone 39 ^h e DTU IIId ^c
<i>T. cruzi</i> VI	TcVI	Paraguayan Z2 ⁱ , Zymodeme B ^j e DTU IIe ^c

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

A DTU TcI apresenta grande diversidade genética, sendo a mais abundante e a mais dispersa geograficamente de todas as DTUs de *T. cruzi* nas Américas. ZINGALES et al. (2012) descrevem que a infecção humana com esta DTU está concentrada no norte da América do Sul e na América Central, e está associada com cardiomiopatia chagásica. No entanto, no ano passado, Martins et al. observaram que tanto pacientes infectados por TcI quanto por TcII, estavam associados com as formas clínicas da doença: cardíaca, digestiva e indeterminada (MARTINS et al., 2015). Pode ser encontrada em uma ampla variedade de mamíferos e triatomíneos associados aos ciclos domésticos e silvestres. Foram descritos mais de 52 gêneros de mamíferos naturalmente infectados com esta DTU, com representantes de Marsupialia, Rodentia, Primata, Chiroptera, Xenartha, Carnivora e Artiodactyla, bem como os principais gêneros de triatomíneos (ZINGALES et al., 2012). No trabalho realizado por Jansen et al. (2015) também observou-se uma maior predominância do isolado TcI em reservatórios

silvestres; e que *Didelphis* spp. infectados por TcI são capazes de manter parasitemia alta e de longa duração.

Já a TcII é predominantemente encontrada na região sul e central da América do Sul. Está associada com manifestações cardíacas, megaesôfago e megacólon, ou mistas (ZINGALES et al., 2012). Jansen et al. (2015) verificaram que *Didelphis* spp. mantém e controla rapidamente, em níveis quase indetectáveis, a parasitemia causada por TcII. No entanto, as espécies de mico *Leontopithecus rosalia* e *L. chrysomelas* mantêm altos níveis de TcII no sangue e de longa duração, semelhante ao marsupial *Philander* sp. O quati *Nasua nasua* possui elevadas parasitemias, de forma constante, tanto por TcI/TcII quanto por TcII/TcIV. Infecções mistas por TcI+TcII foi comum em quatis e em *Didelphimorphia*. O grupo relata que, apesar de ser significativamente menos frequente que TcI, o TcII também está amplamente distribuído. Esses achados em reservatórios silvestres faz cair por terra o pensamento de que a DTU TcII está envolvida principalmente com o ciclo de transmissão doméstico e que possui uma distribuição restrita, como citado por ZINGALES et al. (2012). Ainda com relação à ecologia de TcII, Pinho et al. (2000) detectou infecção por TcII em *Didelphis aurita* e *Philander frenatus*, coletados na costa da Floresta Atlântica. Após este estudo, TcII foi encontrado em vários outros táxons de mamíferos em biomas e habitats distintos (SHIKANAI-YASUDA; CARVALHO, 2012; LIMA et al, 2014; HERRERA et al, 2015).

No Brasil e em países adjacentes, a TcIII é geralmente associada com o ciclo silvestre, e infecções em humanos foram reportadas em 2015 por Martins et al. O grupo realizou o primeiro relato de infecção por TcIII em pacientes com a forma indeterminada da doença de Chagas no Nordeste do Brasil. Além disso, também encontraram essa DTU em triatomíneos da espécie *P. lutzi*, em *Galea spixii* e *Euphractus sexcinctus*, indicando uma conexão entre os ciclos silvestres e domésticos nesta região (MARTINS et al., 2015). TcIII está relacionada com nichos terrestres e com *Dasybus novemcinctus*, do oeste da Venezuela ao Chaco Argentino (LLEWELLYN et al., 2009a; MARCILI et al., 2009a). Ocasionalmente, também é isolado de cães domésticos (CHAPMAN et al., 1984; CARDEAL et al., 2008).

O padrão de distribuição da DTU TcIV na América do Sul é semelhante a da TcIII, exceto com relação ao Chaco. Ocorre com maior frequência em humanos sendo o agente secundário da doença de Chagas na Venezuela (MILES et al., 1981). Acredita-se que esta DTU poder estar circulando no ecótopo arbóreo por ter sido isolado de primatas e de *R. brethesi* na bacia amazônica (MARCILI et al., 2009b). Além de já ter

sido observado como o segundo padrão de coinfeção mais comum (TcI+TcIV) no estudo realizado recentemente, encontrado em Chiroptera, Didelphimorphia e Primatas (JANSEN et al., 2015). As TcV e TcVI são DTUS híbridas de TcII e TcIII associadas com a doença de Chagas na América Central e América do Sul. Os isolados silvestres são praticamente desconhecidos (ZINGALES et al., 2012).

Os sistemas de interação parasita-hospedeiro e as estratégias de transmissão de *T. cruzi* na natureza são altamente complexos e multivariáveis (JANSEN et al., 2015). O aumento dos trabalhos de campo, com a investigação da presença do parasito em reservatórios e vetores, tem desconstruído várias associações anteriormente propostas pela comunidade científica, demonstrando que o nosso conhecimento acerca da ecologia de *T. cruzi* ainda é muito limitado. Não se pode definir todo um complexo sistema ao estudar somente uma pequena parte dele. Não se pode tentar associar uma subpopulação de *T. cruzi* com uma determinada espécie, com base apenas em um estudo realizado, ignorando os inúmeros tipos de interação destes com outras espécies e habitat. A ecologia de *T. cruzi* só poderá ser realmente compreendida quando todas as peças deste quebra-cabeça (parasito, vetor, hospedeiro e reservatório) forem unidas. Este sistema precisa ser estudado como um todo, lembrando que os fenômenos naturais estão em constante mudança e não são estáticos.

A variação genética intraespecífica de *T. cruzi* é bastante complexa, levando à sua subdivisão em duas subespécies: *T. c. cruzi* e *T. c. marinkellei*, sendo esta última quase que exclusivamente associada a morcegos (BAKER et al., 1978). Várias espécies do gênero *Trypanosoma* estão presentes em espécies de Chiroptera em todo o mundo. Morcegos insetívoros são infectados com mais frequência e podem abrigar tripanosomas da seção Stercoraria ou Salivaria (ZINGALES et al., 2012). *T. c. marinkellei* é restrito a morcegos, não infecta camundongos de laboratório e acredita-se que seja transmitido exclusivamente por triatomíneos do gênero *Cavernicola* (MARINKELLE 1976, 1982). Recentemente foi reportada a associação de um novo genótipo em morcegos das espécies *Noctilio* spp., *Myotis* spp. e *Artibeus* spp., tanto em regiões da Amazônia (Brasil) quanto no Panamá (MARCILI et al., 2009a; PINTO et al., 2012). Em 2011, somente isolados de morcegos capturados em ambientes antrópicos das regiões Central e Sudeste do Brasil estavam infectados por esse novo isolado (LIMA, 2011), indicando que esses animais são importantes reservatórios e potenciais fontes de infecção por *T. cruzi* para o homem. Esse grupo de isolados ganhou o título

provisório de 'TcBat' e aguarda melhor caracterização para definir se constituiria uma nova DTU (MARCILI et al., 2009c).

Diferentemente das outras seis DTUs, Tcbat não se desenvolve nas espécies de triatomíneos comumente criadas em colônias no laboratório: *T. infestans*, *R. prolixus* e *P. megistus*. Até o momento, o inseto vetor de TcBat é desconhecido. Os possíveis vetores são espécies de triatomíneos associadas aos refúgios de morcegos, ou cimicídeos (vetores do *Trypanosoma dionisii* na Europa), ou ectoparasitas de morcego (CAVAZZANA et al., 2010). No entanto, TcBat se desenvolve no interior das células de mamíferos, *in vitro*, semelhante a outras DTUs (MARCILI et al., 2009c). Ramírez et al., em 2014, identificaram pela primeira vez o genótipo TcBat em humanos. O indivíduo era uma criança colombiana de 5 anos de idade que apresentava infecção mista com TcI. Supõe-se que a transmissão deste caso foi por via vetorial ou oral, a forma mais comum de doença de Chagas aguda na Colômbia. Estes pesquisadores acreditam que as infecções por *T. cruzi* atribuídas ao TcBat sejam subestimadas, pois estão associadas aos casos assintomáticos da doença.

1.4 Avaliação de infecção natural por *Trypanosoma cruzi* em triatomíneos

1.4.1 Reação em Cadeia da Polimerase (Qualitativa)

A determinação da taxa de infecção natural por *T. cruzi* nos vetores triatomíneos em regiões com diferentes índices de endemicidade é relevante para o melhor conhecimento acerca da epidemiologia da doença de Chagas, assim como para a vigilância epidemiológica e para a elaboração de programas de controle da disseminação da doença. Taxas de infecção do vetor em regiões endêmicas para a doença de Chagas é significativamente variável, alcançando 5% no Brasil (DIAS, 2002) e até 79% na Bolívia (Cochabamba) (MEDRANO-MERCADO et al., 2008).

Programas de controle monitoram periodicamente a prevalência da infecção pelo *T. cruzi*, nos insetos triatomíneos, através da microscopia óptica de suspensões do conteúdo intestinal fresco dos insetos vetores, em busca de tripanosomos ativos. Contudo, esta metodologia apresenta algumas limitações, tais como: baixa sensibilidade em amostras com números reduzidos de parasitos, somada à perda de especificidade devido às infecções com outros tripanosomatídeos, como *Trypanosoma rangeli* e *Blastocrithidia triatomae* (CERISOLA et al. 1971; CHIURILLO et al. 2003), baixa

reprodutibilidade, dificuldade no processamento de ninfas muito pequenas, necessidade da análise em insetos frescos, além da microscopia ser um procedimento laborioso e subjetivo, variando de observador para observador. Em adição, por muitas vezes nas regiões endêmicas, os insetos são coletados por agentes de saúde em comunidades rurais isoladas; até estes espécimes chegarem a um laboratório para análise, frequentemente, já se encontram mortos, o que inviabiliza ou dificulta o exame microscópico. Isso pôde ser observado em um trabalho realizado por Bustamante e col. (2014), em que 71% dos triatomíneos coletados em dois municípios da Guatemala morreram durante o transporte, devido à alta temperatura ambiental. Outra desvantagem desta metodologia é a impossibilidade de identificação da espécie do tripanosomatídeo somente pela observação ao microscópio.

Neste contexto, ensaios de biologia molecular baseados na Reação em Cadeia da Polimerase qualitativa ou convencional (PCRc) têm sido desenvolvidos para detectar o DNA de *T. cruzi* em amostras biológicas, como o conteúdo intestinal dos triatomíneos, pois apresentam várias vantagens com relação ao método tradicional, como a maior sensibilidade, reprodutibilidade e fidedignidade no diagnóstico. Os resultados provenientes da PCR são obtidos em um tempo mais curto quando comparado aos métodos parasitológicos indiretos, como o xenodiagnóstico e a hemocultura, que apresentam resultados após semanas ou até meses (LUQUETTI; RASSI, 2000; YANG; ROTHMAN, 2004). Também é possível o exame em insetos mortos e em ninfas de 1º estágio, por exemplo, além da repetição dos testes em caso de resultados inconclusivos, uma vez que esta técnica faz uso de pequenos volumes de amostra (YANG; ROTHMAN, 2004).

A utilização da PCR para a detecção de DNA de *T. cruzi* em triatomíneos já vem sido descrita na literatura por diversos autores (SILBER et al., 1997; VALLEJO et al., 1999; CHIURILLO et al., 2003; CORONADO et al., 2006; LIARTE, 2006; MARCET et al., 2006; BACIGALUPO et al., 2012; PINHO, 2012; VILLACIS et al., 2015). Contudo, o uso de ensaios moleculares em amostras biológicas complexas, como intestino de insetos triatomíneos, pode gerar uma série de limitações devido principalmente à presença de produtos derivados da digestão que podem degradar o DNA, além da copurificação de potenciais inibidores (SCHRADER et al., 2012), tais como polissacarídeos (os que são produzidos pela microbiota do inseto, por exemplo (MADDRELL, 1964), hemoglobina (produzida por hemólise no intestino médio

anterior do triatomíneo), hemozoína (agregado de heme, a qual é produzida no intestino médio posterior (OLIVEIRA et al., 1999) e, eventualmente, ácido úrico (um produto final do metabolismo da purina que é altamente abundante no intestino posterior).

1.4.1.1 *kDNA de T. cruzi como alvo de detecção*

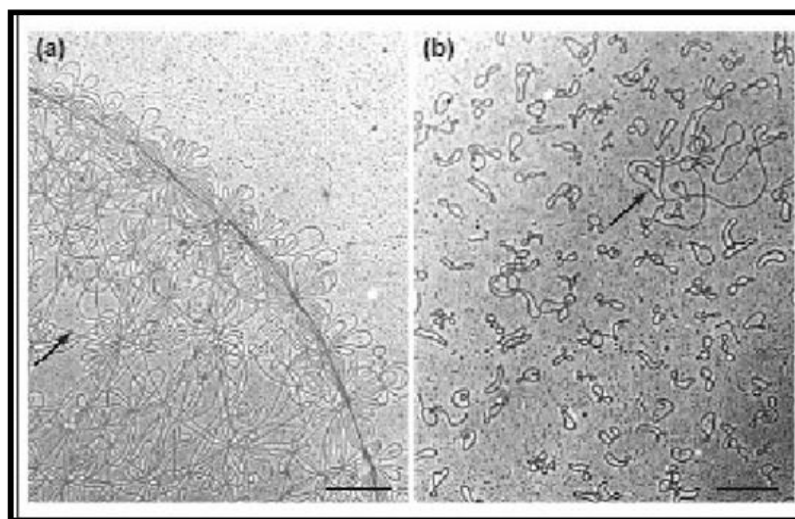
A seleção de um fragmento de DNA cuja sequência seja conservada em todas as cepas e isolados do parasito é necessária para a realização do ensaio da PCR para a detecção do *T. cruzi*. A partir disso e da busca por uma sequência alvo que esteja presente em inúmeras cópias no genoma do *T. cruzi*, o DNA do cinetoplasto (kDNA), que representa o genoma mitocondrial, tem sido usado com sucesso por diferentes pesquisadores no diagnóstico de infecção por *T. cruzi* em amostras biológicas, como sangue (AVILA et al., 1991, 1993; BRITTO et al., 1993, 1995, 2001; WINCKER et al., 1994; BRITTO, 2009), tecidos (ANDRADE et al., 2002) e fezes de triatomíneos (RUSSOMANDO et al., 1996; BRITO et al., 2008; PINHO, 2012; GRIJALVA et al., 2014; CANTILLO-BARRAZA et al., 2015).

O kDNA representa a maior quantidade de DNA extranuclear já identificada em células eucarióticas, consistindo de 20 a 25% do DNA total da célula (RAY, 1989; WESTENBERGER et al., 2006). É representado por uma rede altamente compactada formada por milhares de moléculas circulares de DNA entrelaçadas entre si, os minicírculos, com tamanhos de 1.400 pb e presentes em cerca de 10.000 a 20.000 cópias por rede, perfazendo 95% do kDNA (DEGRAVE et al., 1988; KLINGBEIL; ENGLUND, 2004; THOMAZ et al., 2007). Estas moléculas codificam RNAs pequenos (RNAs guia) que participam do processo de edição dos transcritos de maxicírculos (OCHSENREITER, 2007). Os maxicírculos são moléculas maiores localizadas na periferia da rede, com tamanhos que variam entre 20.000 – 40.000 pb e são representados em número de cópias bem menores (25 - 50 cópias idênticas por célula; 5% do kDNA). São moléculas análogas funcionais ao DNA mitocondrial de outros eucariotos, codificando para proteínas da cadeia de transporte de elétrons e RNA ribossômico mitocondrial (VERLAG & VERLAG, 2001; KLINGBEIL, ENGLUND, 2004; PIMENTEL, 2012).

A estrutura concatenada da rede de kDNA pode ser desfeita *in vitro* a partir de um tratamento com a enzima Topoisomerase II, possibilitando a visualização dos maxicírculos e minicírculos (KLINGBEIL et al., 2001), como demonstrado na **Figura 8** (LIU et al., 2005).

Figura 8: Micrografia eletrônica do kDNA.

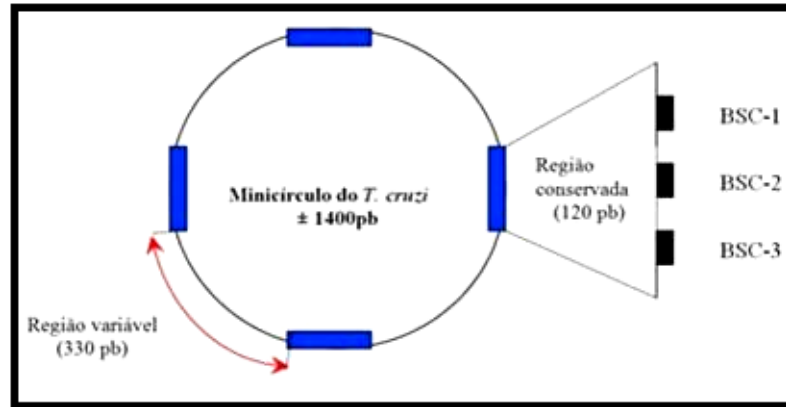
(a) Rede concatenada de kDNA com a presença dos minicírculos e dos maxicírculos (seta). (b) kDNA decatenado pela ação da Topoisomerase II. Vários minicírculos livres e um maxicírculo (seta) (Retirado de LIU et al., 2005).



Os minicírculos apresentam classes de sequências heterogêneas (JUNQUEIRA et al., 2005), entretanto, apresentam em comum uma organização molecular peculiar com quatro regiões de DNA conservado, localizadas a 90° de distância entre elas e intercaladas por sequência de DNA variável (**Figura 9**). Nas porções conservadas existem três motivos altamente preservados que são comuns entre os minicírculos, os blocos de seqüências conservadas (CSB – *conserved sequence blocks*) (DEGRAVE et al., 1988; RAY, 1989) (**Figura 9**). Com a utilização de iniciadores específicos previamente desenhados para estes blocos conservados, é possível amplificar as regiões conservadas (120 pb) e variáveis (330 pb) do DNA de minicírculos de *T. cruzi* (DEGRAVE et al., 1988; STURM et al., 1989; AVILA et al., 1991; BRITTO et al., 1993; WINCKER et al., 1994; SIMPSON, 1997; JUNQUEIRA et al., 2005), tornando os minicírculos do kDNA um excelente alvo para a detecção molecular do parasito para fins de diagnóstico.

Figura 9: Representação esquemática do minicírculo de *T. cruzi*.

Organização das quatro regiões conservadas (retângulos em azul), com aproximadamente 120pb cada, contendo os blocos de seqüências mais conservadas da molécula: BSC-1, BSC-2 e BSC-3 (retângulos em preto). As regiões de seqüências hipervariáveis dos minicírculos de 330 pb (seta em vermelho) encontram-se intercaladas com as regiões conservadas (Modificado de STURM et al., 1989).



Apesar da sua comprovada sensibilidade diagnóstica, a especificidade da PCR-kDNA para a pesquisa de *T. cruzi* em triatomíneos foi desafiada quando a sequência completa do DNA de minicírculos de *Trypanosoma (Tejeraia) rangeli* foi disponibilizada, o que poderia confundir o diagnóstico em se tratando de infecções mistas por *T. cruzi* e *T. rangeli*, em áreas onde ambos os parasitos coexistam, compartilhando vetores e hospedeiros (GRISARD et al., 1999; GUHL; VALLEJO, 2003). Muito embora *T. rangeli* tenha a capacidade de infectar mamíferos e triatomíneos, em especial do gênero *Rhodnius* (VALLEJO et al., 2002) nas Américas Central e do Sul, o seu potencial patogênico ao homem ainda é muito controverso. Há controvérsias nas informações acerca da presença ou não de formas reprodutivas de *T. rangeli* no hospedeiro vertebrado. As formas tripomastigotas do parasita são encontradas no sangue, no entanto, não são observadas células infectadas *in vivo* com este parasito, ainda que em experimento de infecção celular *in vitro* seja possível a visualização das formas intracelulares de *T. rangeli* (OSORIO et al., 1995; ZÚÑIGA et al., 1997; PALÁU et al., 2001). Alguns autores têm evidenciado a ausência de multiplicação do parasito *in vitro* em diferentes tipos celulares (MOLYNEAUX, 1997; TANOURAKA et al., 1989), enquanto outros autores relatam a presença de parasitos intracelulares (Cepa colombiana) e sua multiplicação em células Vero (ZÚÑIGA et al., 1997). Ao que parece, as características biológicas e a fonte de obtenção (cultivo axênico, hemolinfa ou glândula salivar) de cada cepa de *T. rangeli* estão relacionadas com o comportamento em infecção celular *in vitro* (MENESES, 2004).

Os iniciadores para a PCR-kDNA descritos para a detecção de *T. cruzi* também reconhecem sequências conservadas de minicírculos do kDNA de *T. rangeli*, embora os fragmentos gerados possam ser diferenciados entre as espécies por apresentarem tamanhos relativamente diferentes visualizados em gel de poliacrilamida (VALLEJO et al., 1999). Considerando que o exame microscópico direto para a pesquisa de tripanosomos em triatomíneos mostra-se limitado em diferenciar *T. cruzi* de *T. rangeli*, pela similaridade morfológica entre as espécies (D'ALESSANDRO-BACIGALUPO; SARAIVA, 1992), alguns grupos vêm empregando a PCR-kDNA para a identificação diferencial destas espécies, a partir do conteúdo intestinal do inseto (VALLEJO et al., 1999; GURGEL GONÇALVES et al., 2004; VILLACÍS et al., 2015). Um fragmento de 330 pb é esperado para amostras infectadas com *T. cruzi* (**Figura 9**) e um fragmento de 760 pb, junto a uma possível série de fragmentos entre 300 – 450 pb são esperados para as infecções por *T. rangeli* (VALLEJO et al., 1999).

1.4.1.2 DNA nuclear satélite de *T. cruzi* como alvo de detecção

O *T. cruzi* possui em seu genoma nuclear, cerca de 10^5 cópias de uma repetição de 195 pb, chamada DNA satélite, que corresponde a cerca de 10% do DNA total do parasito (ELIAS et al., 2003). O DNA nuclear satélite são arranjos não codificantes de DNA, constituídos de repetições diretas (*em tandem*) da mesma sequência de nucleotídeos. Essas sequências são altamente conservadas (ELIAS et al., 2003, 2005; VARGAS et al., 2004; LIARTE, 2006; MARTINS et al., 2008). O número de cópias é variável entre as cepas do parasito. Em estudo realizado por Elias et al. (2003) verificou-se que o DNA satélite é de quatro a seis vezes mais abundante em cepas Y e CL Brener, em comparação com Silvio X10 cl1. Estudos posteriores observaram que isolados de TcI apresentam menor número de cópias de DNA nuclear satélite quando comparado a isolados de outras DTUs (DUFFY et al., 2009; IENNE et al., 2010). Apesar disso, as unidades repetidas são organizadas de forma semelhante. As unidades de repetições satélite são agrupadas, no genoma nuclear, em conjuntos que compreendem cerca de 30 a ± 10 kb (ELIAS et al., 2003). A análise de sequências de várias unidades de repetição de DNA satélite das três cepas (Y, CL Brener e Silvio X10 cl1) revelou uma semelhança notável com blocos de nucleotídeos conservados separados por regiões mais variáveis (ELIAS et al., 2003). Assim, sugere-se que o DNA satélite tenha um papel estrutural nos cromossomos de *T. cruzi*. Em cromossomos

típicos de mamíferos, os DNAs satélite estão representados em grandes agrupamentos, localizados em regiões heterocromáticas, que muitas vezes são centroméricas (LIARTE, 2006). Embora tenha sido postulado que esse elemento esteja localizado em minicromossomos, experimentos demonstraram que tais minicromossomos não existem em *T. cruzi*, e as sequências de DNA satélite estão distribuídas em alguns, mas não em todos, cromossomos do parasito (REQUENA et al., 1996; ELIAS et al., 2003).

O DNA nuclear satélite é dividido em três classes. Microsatélites estão organizados em repetições de 2 - 5 pb, com arranjos de tamanho médio de 100 pb. Minisatélites são constituídos por arranjos com repetições em torno de 15 pb e tamanhos hipervariáveis entre 0,5 - 3,0 kb. A terceira classe, as sequências satélites (ou macrossatélites), compreendem unidades de repetição de 5 - 200 pb, tipicamente organizadas como grupos de megabases localizados em regiões heterocromáticas dos cromossomos (REQUENA et al., 1996).

Machado et al. (2000) apresentaram uma metodologia simples e prática de detecção do DNA satélite de *T. cruzi*, através da PCR, a partir de amostras de fezes de triatomíneos. Os resultados encontrados pelos autores confirmam a alta sensibilidade e especificidade do DNA satélite do parasito. Em 2003, Virreira et al. compararam a sensibilidade de alguns conjuntos de iniciadores usados para detecção do *T. cruzi* por PCR (para os alvos DNA nuclear satélite, região conservada do elemento de repetição E13 [REQUENA et al., 1996], kDNA e proteína flagelar F29). Concluíram que os iniciadores que amplificam o DNA satélite detectaram DNA do parasito em todas as linhagens testadas e com a mesma sensibilidade, e exceto o kDNA, os demais iniciadores foram menos sensíveis e variaram de acordo com as linhagens.

Assim como os minicírculos do kDNA, a abundância do número de repetições das sequências de DNA satélite do núcleo de *T. cruzi*, tornam este um alvo de elevada sensibilidade e especificidade para pesquisa diagnóstica por PCR em sangue, amostras de tecidos e nas fezes do vetor (MOSER et al., 1989; OLIVARES-VILLAGÓMEZ et al., 1998; DIAZ et al., 1992; MACHADO et al., 2000; MARCON et al., 2011; DE FREITAS et al., 2011).

1.4.2 Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (Quantitativa)

Para os estudos em triatomíneos, a técnica clássica de contagem usando câmara de Neubauer, tem sido amplamente empregada para quantificar *T. cruzi* em homogenatos ou conteúdo intestinal, assim como em amostras de fezes (MELLO et al.,

1996; KOLLIEN; SCHAUB, 1998; ARAUJO et al., 2008, 2014). Embora útil para quantificação rápida de amostras contendo cargas parasitárias elevadas, o método não é acurado para amostras que apresentam um número reduzido de parasitos, o que é de ocorrência comum na natureza. Em adição, a quantificação de parasitos em amostras de intestino de insetos, por contagem em microscópio, é frequentemente dificultada pela presença de elevada concentração de eritrócitos, agregados heme e cristais; além de ser complicado diferenciar parasitos imóveis de resíduos de tecidos e a contagem do número exato de parasitos que formam rosetas.

A Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real quantitativa (qPCR) tem mostrado ser um método preciso para estimativa da carga parasitária por *T. cruzi* em sangue periférico de pacientes infectados, assim como em amostras de conteúdo intestinal de triatomíneos. Sua aplicação já vem sendo descrita por diversos grupos para inferir parasitemia em humanos (MORA et al., 2005; PIRON et al., 2007; DUFFY et al., 2009, 2013; DE FREITAS et al., 2011; BUA et al., 2012; QVARNSTROM et al., 2012; MOREIRA et al., 2013; MELO et al., 2015), em ensaios de interação parasito-inseto vetor (UEHARA et al., 2012) e para monitorar a colonização por *T. cruzi* em diferentes segmentos do trato digestivo de *R. prolixus* (DIAS et al., 2015).

A qPCR é capaz de monitorar a amplificação do DNA no momento em que a reação está ocorrendo. Esta técnica utiliza o momento do ciclo da reação no qual a amplificação de um alvo é detectada pela primeira vez, ao invés da quantidade de alvo acumulado após um número fixo de ciclos. O ensaio de quantificação mede a quantidade de ácido nucléico alvo a cada ciclo de amplificação da qPCR (HIGUCHI et al., 1993). Quanto mais elevado o número de cópias iniciais do ácido nucléico alvo, mais rápido (menor valor de Ct) será observado o aumento significativo na fluorescência (VITZHUM et al., 1999; NOVAIS, 2004; VELASCO et al., 2006). A Applied Biosystems desenvolveu dois sistemas de detecção de sequência: o Sistema SYBR[®]Green e o Sistema Taqman[®].

O sistema SYBR utiliza o corante SYBR *Green*, que é um intercalante de DNA dupla-fita, para detectar o produto da PCR conforme este se acumule durante os ciclos da reação (ZIPPER et al., 2004; BENGTSSON et al., 2003). Durante a PCR, a DNA Polimerase amplifica a sequência alvo, a partir dos iniciadores específicos, gerando os *amplicons*. O corante SYBR *Green* se liga a qualquer nova cópia de DNA dupla-fita. Assim, o resultado é tido como o aumento na intensidade da fluorescência proporcional à quantidade de produto gerado pela PCR (RUTLEDGE & COTE, 2003). As vantagens

desse sistema são o monitoramento da amplificação de qualquer sequência de DNA dupla-fita e o fato de não ser necessário o uso de sonda interna fluorescente, o que reduz a configuração do ensaio e os custos de execução. Uma desvantagem com relação ao sistema anterior (TaqMan), é que o SYBR Green detectará todo DNA dupla-fita, inclusive produtos de reação não específicos, como dímeros de iniciadores, podendo gerar falso-positivos (NOVAIS, 2004).

O sistema TaqMan detecta um produto específico da PCR conforme o seu acúmulo durante os ciclos da reação a partir de uma sonda fluorescente, desenhada internamente para o alvo amplificado (HEID et al., 1996). Esta sonda contém um corante fluorescente *reporter* na extremidade 5' e um *quencher* (inibidor da fluorescência) na extremidade 3'. Enquanto a sonda está intacta (não hibridizada ao alvo específico), a proximidade do *quencher* reduz bastante a fluorescência emitida pelo corante *reporter* (Efeito FRET, *Fluorescence Resonance Energy Transfer*) (ALBERTS et al., 2002). Se a sequência alvo estiver presente, a sonda se anela logo após um dos iniciadores e é clivada através da atividade nucleásica 5' da Taq DNA polimerase enquanto o iniciador é estendido. Com a clivagem da sonda, o *reporter* é separado do *quencher*, aumentando o sinal do corante *reporter* (HEID et al., 1996). A sonda é removida da fita alvo, permitindo que a extensão do iniciador continue até o final da fita molde. Assim, moléculas do corante *reporter* são clivadas em suas respectivas sondas, resultando em um aumento na intensidade de fluorescência, de acordo com a quantidade de *amplicon* produzido. Esse sistema tem como vantagens a hibridização específica entre a sonda e o alvo para gerar sinal fluorescente, o que aumenta a especificidade da reação (HOLLAND et al., 1991); as sondas podem ser marcadas com corantes *reporter* distintos, os quais permitem a amplificação de duas sequências distintas ou mais em um mesmo tubo de reação (reação em multiplex). A principal desvantagem seria a necessidade de síntese de diferentes sondas para sequências distintas (alvos distintos) (NOVAIS, 2004).

De maneira geral, o bom desempenho das técnicas de PCR exige alta qualidade da extração de DNA das amostras a serem estudadas. A presença de inibidores da PCR pode reduzir a sua eficiência, resultando em falso negativo na PCR convencional ou quantificação subestimada ou ausência de quantificação da carga parasitária na qPCR. Devido a isso, todos os ensaios de PCR para diagnóstico devem incluir um controle interno ou exógeno que possibilite controlar a qualidade do DNA recuperado e eventual presença de inibidores nas amostras.

Em 2012, nosso grupo demonstrou pela primeira vez a aplicação acurada do sistema SYBR Green de qPCR para a quantificação dos níveis de carga parasitária por *T. cruzi* em amostras de intestino e reto de *R. prolixus* mantidos em laboratório, objetivando investigar o papel da cruzipaína na interação do parasito com o hospedeiro triatomíneo (UEHARA et al., 2012). Os ensaios foram realizados independentemente para dois alvos moleculares: DNA satélite de *T. cruzi* (PIRON et al., 2007) e gene para o RNA ribossomal 12S de *R. prolixus* (novo iniciador desenhado pelo nosso grupo), como controle interno da reação (UEHARA et al., 2012). Mais recentemente, DIAS et al. (2015) desenvolveram um sistema TaqMan de qPCR, também direcionado para o DNA satélite de *T. cruzi*, para monitorar a colonização do trato digestivo de *R. prolixus* pelo parasito durante o estabelecimento da infecção no vetor, a fim de gerar maior conhecimento sobre a dinâmica de colonização no intestino do inseto. Como padrão interno de normalização, amostras de extratos de inseto foram previamente contaminadas com DNA heterólogo exógeno, para a quantificação precisa da carga parasitária em cada segmento de intestino do inseto. Neste estudo, os autores concluem que uma reduzida taxa de infecção deve ser mantida no vetor.

2 JUSTIFICATIVA

O risco de transmissão do *Trypanosoma cruzi* em áreas rurais endêmicas, depende principalmente da densidade de insetos triatomíneos e da prevalência da infecção por *T. cruzi* nos vetores invertebrados, humanos e animais reservatórios. O controle da doença de Chagas inclui a ação combinada do diagnóstico e tratamento de casos da doença em humanos, associada ao controle vetorial e, em focos zoonóticos, ao monitoramento de reservatórios animais. Embora o Brasil mantenha constante a operação de vigilância e controle dos principais vetores da doença de Chagas, o risco de transmissão do *T. cruzi* persiste devido a fatores como: devastação ambiental descontrolada por ação antrópica, baixas condições de vida da população, presença de reservatórios infectados pelo *T. cruzi* e de triatomíneos autóctones, e a pré-adaptação e adaptação dos vetores à habitação humana. Estimativas da taxa de infecção natural tornam-se importantes para avaliar um possível risco de transmissão vetorial da doença de Chagas em regiões nas quais há a presença, nos ambientes doméstico e peridoméstico, de triatomíneos. Contudo, a maior parte dos estudos a cerca do índice de infecção por *T. cruzi* é realizada com base na pesquisa microscópica de encontro do parasito no vetor, o que pode refletir na subnotificação das taxas de infecção vetorial devido a menor sensibilidade do método. Em condições naturais, a presença do parasito no inseto vetor pode variar de acordo com a origem destes hospedeiros invertebrados; estas taxas aumentam quando animais susceptíveis (mamíferos) participam do ciclo de transmissão e diminuem consideravelmente quando os insetos estão proximamente associados com animais refratários, tais como aves.

O Rio Grande do Sul é um dos estados brasileiros (o outro é a Bahia) que ainda mantém a persistência de focos residuais de *T. infestans*, apesar de ter recebido a certificação de área livre de transmissão intradomiciliar do parasito por este vetor. Neste estado, o programa de controle da doença de Chagas existe desde 1975, porém a vigilância deve ser permanente para que seja evitada a reincidência da transmissão domiciliar. Além da persistência de infestação por vetores introduzidos, espécies nativas e silvestres estão gradualmente ocupando o espaço domiciliar antes ocupado pelo *T. infestans*; espécies como *Triatoma rubrovaria*, *Panstrongylus megistus*, *Triatoma circummaculata* e *Panstrongylus tupynambai*. A fim de comparar dois biomas brasileiros, triatomíneos provenientes do estado do Ceará também foram analisados. Diversos municípios cearenses apresentam altos índices de infestação triatomínica

decorrentes de fatores como precária condição de vida da população e a presença de espécies nativas e de difícil controle, como o *Triatoma brasiliensis*, *Triatoma pseudomaculata* e *Panstrongylus lutzi*. O *T. brasiliensis* é a espécie autóctone de maior relevância no nordeste brasileiro, encontrada especialmente na região semiárida. O seu controle é dificultado devido à capacidade de invadir habitações, mesmo após quatro meses de borrifação com inseticidas de ação residual, principalmente no peridomicílio.

Neste contexto, a partir das abordagens moleculares propostas pelo presente trabalho, foi possível determinar as taxas de infecção natural por *T. cruzi* em diversas espécies de triatomíneos, além da estimativa da carga parasitária nos insetos infectados e da caracterização molecular das linhagens (DTUs) dos parasitos circulantes. Espera-se assim, contribuir para uma maior compreensão da dinâmica de transmissão de *T. cruzi* nas áreas estudadas, buscando auxiliar na elaboração de planos estratégicos para controles cada vez mais eficazes da doença de Chagas no país.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Estimar taxas de infecção natural, carga parasitária e caracterização das linhagens de *Trypanosoma cruzi* em triatomíneos capturados em dois biomas brasileiros, a fim de contribuir para o maior entendimento dos ciclos de transmissão do parasito nas localidades de estudo.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar as taxas de infecção natural por *T. cruzi* em triatomíneos capturados em municípios do Rio Grande do Sul (Bioma Pampa) e em municípios do Ceará (Bioma Caatinga).
- Comparar a taxa de positividade entre a PCR convencional e o exame parasitológico por microscopia.
- Estimar a carga parasitária nos vetores que se mostraram positivos para infecção pelo *T. cruzi*.
- Identificar as Unidades Discretas de Tipagem (DTUs) de *T. cruzi* nos triatomíneos com PCR positiva.

4 MATERIAL e MÉTODOS

4.1 Captura de triatomíneos

As capturas foram conduzidas pela equipe parceira do Laboratório Interdisciplinar de Vigilância Entomológica em Diptera e Hemiptera (LIVEDIH) do Instituto Oswaldo Cruz (Fiocruz), com a participação da aluna no trabalho de campo de 2015, no Rio Grande do Sul. Os insetos foram capturados nos anos de 2014 e 2015, através da utilização de pinças manuais à procura dos insetos por busca ativa em diversos ecótopos. No estado do Rio Grande do Sul a captura manual ocorreu no ambiente silvestre (sob rochas), em peridomicílio (paiol) e no intradomicílio (**Figura 10**). Já no Ceará, no ambiente peridoméstico (amontoado de lenhas e telhas, galinheiros, poleiros e cunicultura) e no intradomicílio. O transporte dos espécimes foi realizado em tubos plásticos, com pequenos furos na tampa, contendo papel de filtro em seu interior. Posteriormente, foram encaminhados para o LIVEDIH onde foi realizada a identificação da espécie por critérios taxonômicos preconizados por Lent & Wygodzinsky (1979).

Eventualmente, as Secretarias Estaduais da Saúde do Rio Grande do Sul e do Ceará enviavam triatomíneos encontrados nos municípios estudados para o laboratório colaborador.

Figura 10: Coleta de triatomíneos no Rio Grande do Sul.

1, 2 e 3: Busca ativa em ambientes intradomiciliares; 4, 5 e 6: Peridomicílios com presença de galinheiro (4), amontoados de galhos e troncos (5) e de telhas (6); 7, 8 e 9: Ambiente silvestre com presença de fezes de possíveis hospedeiros (7) e coleta de triatomíneos presentes sob as rochas (8 e 9).



4.2 Áreas de coleta

4.2.1 Rio Grande do Sul

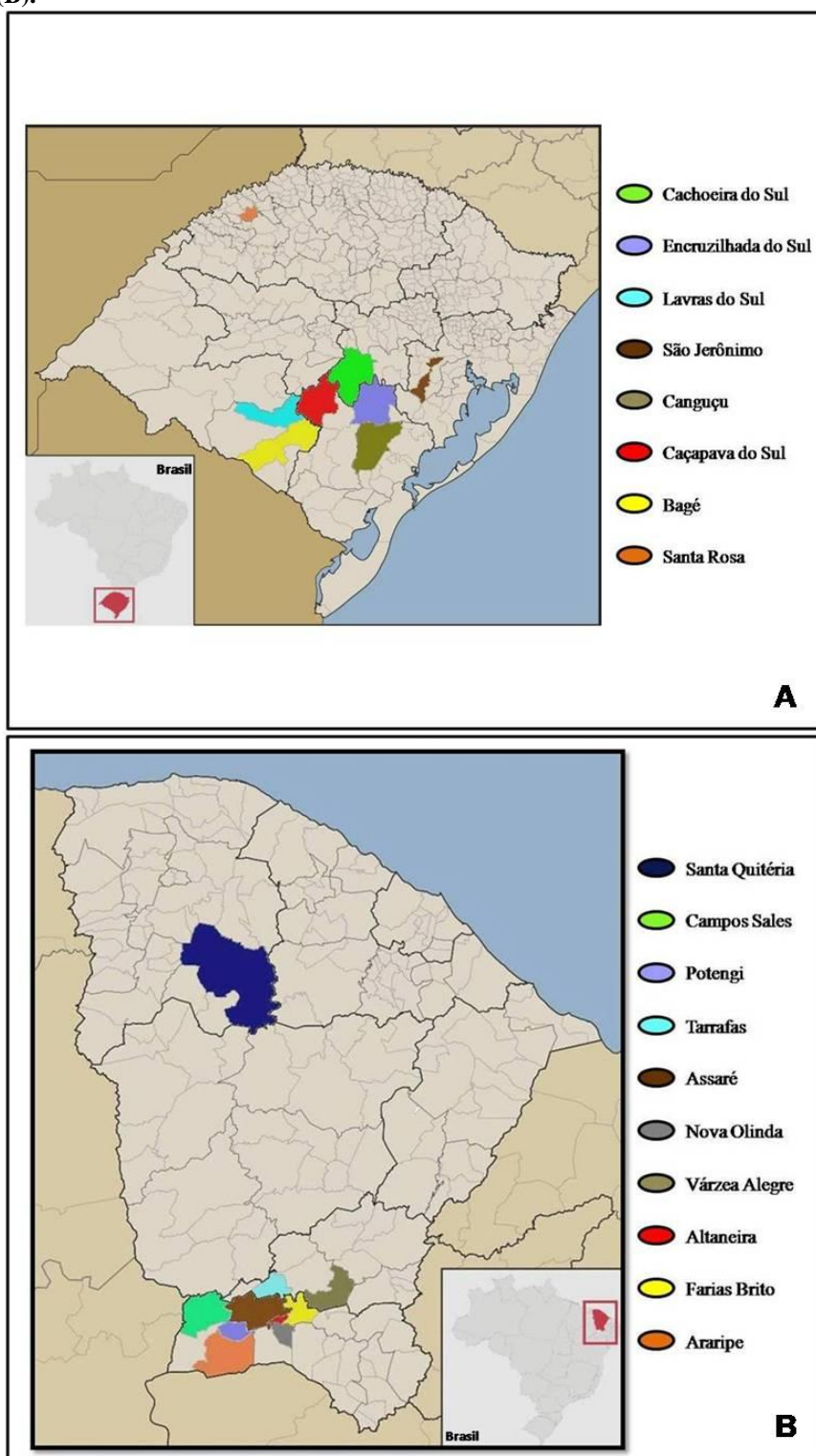
Os insetos foram capturados nos municípios de Caçapava do Sul (Localidades - Rincão Nossa Senhora das Graças: 30°31'44,2"S, 53°30'50,2"O; Campo do Triângulo: 30°50'38,8"S, 53°38'06,0"O; Rincão dos Ventura: 30°31'44,2"S, 53°30'50,2"O), Encruzilhada do Sul (30°32'38"S, 52°31'19"O), Lavras do Sul (Localidades - Cordilheira I: 30°36'14,3"S, 53°48'48,2"O; Cordilheira II: 30°36'11,9"S, 53°47'54,0"O), Cachoeira do Sul (30°50'58,9"S, 53°37'05,3"O), Canguçu (31°23'58,1"S, 52°43'08,9"O), São Jerônimo (29°57'32"S, 51°43'19"O), Santa Rosa (27°52'15"S, 54°28'51"O) e Bagé (31°19'51"S, 54°06'25"O) (**Figura 11A**). Estas localidades estão presentes no bioma Pampa, que ocupa 63% do território estadual. O Pampa é

caracterizado por uma vegetação rasteira formada por gramíneas e pequenos arbustos. O clima da região é subtropical úmido.

4.2.2 Ceará

A captura dos triatomíneos foi realizada em Santa Quitéria (04°19'55"S, 40°09'25"O) e em outros nove municípios que compõem a 20ª Célula Regional da Saúde, no sul do Ceará, localizados na região do Cariri: Nova Olinda (07°05'31"S, 39°40'51"O), Potengi (07°05'27"S, 40°01'37"O), Alto Alegre (03°50'05"S, 38°36'34"O), Farias Brito (06°55'38"S, 39°34'22"O), Araripe (07°12'46"S, 40°02'45"O), Várzea Alegre (06°47'20"S, 39°17'45"O), Assaré (06°52'26"S, 39°52'30"O), Tarrafas (06°41'02"S, 39°45'39"O) e Altaneira (06°00'07"S, 39°44'27"O) (**Figura 11B**). O bioma Caatinga está presente em 92% do território cearense, cuja vegetação é representada por árvores e arbustos espinhosos, densos, baixos, retorcidos, de aspecto seco, de folhas pequenas, xerófilas e raízes muito desenvolvidas, com grandes áreas de degradação. O clima é quente semiárido com prolongadas estações secas.

Figura 11: Localização geográfica dos municípios estudados (em cores), nos estados do Rio Grande do Sul (A) e do Ceará (B).



4.3 Exame a fresco das fezes de triatomíneos de campo

Para detectar o *T. cruzi* pelo método convencional em triatomíneos vivos, as fezes foram obtidas por compressão abdominal com o auxílio de pinça, diluídas em

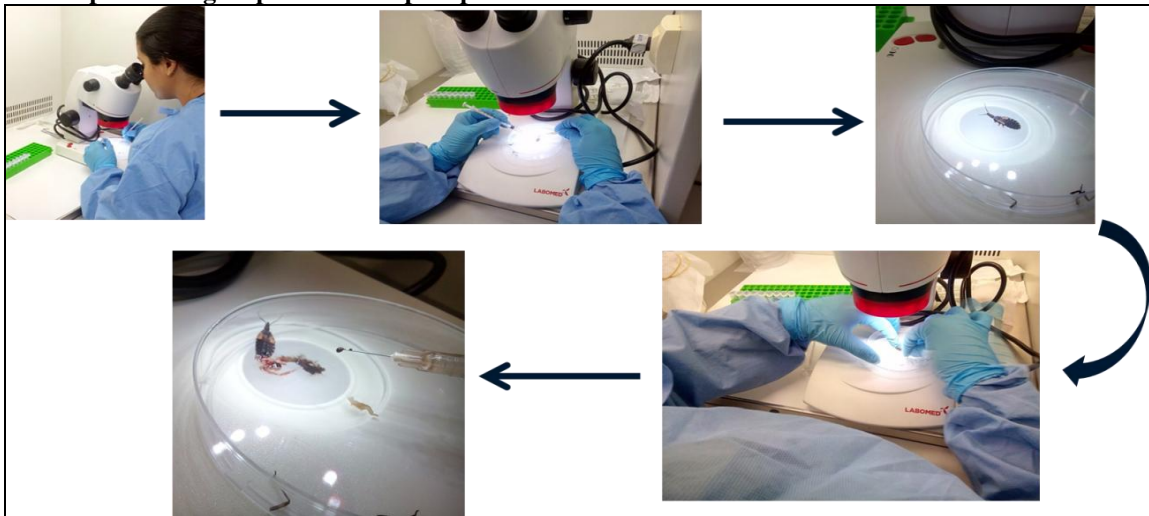
solução salina (NaCl a 0,85%) e observadas entre lâmina e lamínula por microscopia óptica (aumento de 400 vezes). Para os insetos mortos o intestino médio posterior e o intestino posterior foram dissecados e embebidos em placas de Petri estéreis contendo 20µl de solução fisiológica e 100 µg/mL 5- fluorocitosina. O homogenato foi observado entre lâmina e lamínula para a visualização do parasito por microscopia óptica (aumento de 400 vezes).

Parte da análise do exame parasitológico por microscopia óptica foi realizada no LIVEDIH e a outra parte no LABIMDOE (Laboratório de Biologia Molecular e Doenças Endêmicas do Instituto Oswaldo Cruz). No entanto, as amostras analisadas pelo LIVEDIH também foram encaminhadas para o LABIMDOE para a realização da pesquisa molecular.

4.4 Extração de DNA

Após o exame parasitológico por microscopia óptica, o intestino médio posterior e o intestino posterior de cada triatomíneo foram dissecados (**Figura 12**) e transferidos para tubo eppendorf de 1,5mL contendo 200µL da mistura de 970µL de tampão de lise 1X (Tris-HCl a 1 mM, EDTA a 1 mM, pH 9,2) e 30µL de Proteinase K (150 µg/mL, SIGMA-Aldrich[®], São Paulo, Brasil). As preparações foram incubadas (2 horas, 56°C), com agitações constantes, e o DNA foi extraído em colunas de sílica, utilizando o kit de extração QIAamp DNA Mini kit (Qiagen, Valencia, CA), seguindo o protocolo do fabricante com modificações na etapa final de eluição do DNA (eluído em 100µL). O DNA eluído foi armazenado a -20°C para os posteriores ensaios de PCR convencional (qualitativo) e qPCR.

Figura 12: Dissecção do intestino médio posterior e intestino posterior de triatomíneos, após a análise parasitológica por microscopia óptica.



4.5 Avaliação das taxas de infecção natural e da carga parasitária de *T. cruzi* em triatomíneos de campo

Todos os procedimentos realizados obedeceram às Boas Práticas de Laboratório para evitar contaminações nas realizações das técnicas, tanto pela divisão física das etapas de extração de DNA e PCRs (pré-reação e pós-reação), quanto pela descontaminação prévia de todos os materiais e capelas/fluxos laminares utilizados com o uso de hipoclorito de sódio a 2% ou DNAZap™ PCR DNA *Degradation Solutions* (AMBION, Austin, TX), no caso dos equipamentos. Todas as ferramentas utilizadas na dissecção do inseto eram descartáveis e submetidas aos mesmos processos. Para monitorar eventual contaminação, foram utilizados controles negativos para a etapa de extração de DNA (tubo contendo todos os reagentes na ausência de intestino de triatomíneo) e PCR (tubo contendo todos os reagentes na ausência de DNA e um tubo contendo apenas água estéril).

4.5.1 Reação em Cadeia da Polimerase Qualitativa (PCRc)

Para a amplificação bioquímica de sequências específicas foram utilizados os iniciadores 121 e 122 para os minicírculos do kDNA de *T. cruzi* (**Tabela 6**), descritos por STURM et al. (1989) e modificados por WINCKER et al. (1994), que hibridizam com as sequências flanqueadoras das regiões conservadas das moléculas de minicírculos, amplificando produtos de 330 pb, correspondentes às regiões hipervariáveis (AVILA et al., 1991; BRITTO et al., 1993; WINCKER et al., 1994). No mesmo ensaio, em formato duplex, foram introduzidos os iniciadores P2B e P6R (**Tabela 6**), desenhados previamente pelo nosso grupo (UEHARA et al., 2012), com alvo no gene que codifica a região 12S do RNA ribossomal, que amplificam uma sequência genômica conservada de 163 pb em espécies pertencentes aos gêneros *Rhodnius*, *Triatoma* e *Panstrongylus*. As reações ocorreram em um volume final de 50µL contendo 5µL de DNA, 5µL de solução tampão 10X [100 mM de Tris-HCl pH 8,3 contendo 500 mM de KCl], 9µL MgCl₂ (4,5 mM), 0,4µL Platinum Taq DNA polimerase (Solução estoque: 5U/µL) (Life Technologies, USA), 2µL dNTPs (0,4 mM, Life Technologies, USA), 1µL de cada iniciador 121 e 122 (200 nM) e 0,5µL de cada iniciador P2B e P6R (100 nM) e 19,6µL de H₂O ultra-pura. A ciclagem térmica foi realizada no aparelho modelo GeneAmp PCR System 9700 (Life Technologies, USA), com a seguinte programação: Hot Start (12 min, 94°C), seguido por 36 ciclos de desnaturação (30s, 94°C), anelamento (30s, 55°C), extensão (30s, 72°C) e extensão final (10 min, 72°C).

Em todas as reações foram incluídos os controles positivos: DNAs de *T. rangeli* (Cepa Macias), de *T. cruzi* (Cepa Cl-Brener) e amostra reconstituída experimentalmente (Controle positivo de infecção: DNA de lisado de *R. prolixus* não infectado misturado a DNA de *T. cruzi* Cl-Brener), sendo este último necessário para confirmar a eficiência da reação em *multiplex*. Também foram incluídos os controles negativos da reação de PCR (todos os reagentes sem o DNA e um tubo contendo apenas água ultra-pura) e da etapa de extração de DNA (tubo contendo todos os reagentes na ausência de intestino de triatomíneo).

4.5.1.2 Eletroforese em gel de agarose

Após a PCRc, 12µL dos produtos amplificados foram misturados com 2,4µL do tampão de amostra 1X (0,25% de azul de bromofenol; 0,25% de xileno-cianol; 30% de glicerol), e aplicados em gel de agarose a 2% imerso em tampão TBE 1X (Trizma base a 89 mM, Ácido Bórico a 88 mM e EDTA a 2 mM, pH=8) corado com *Nancy-520 DNA Gel Stain* (SIGMA-Aldrich®, São Paulo, Brasil). A corrida eletroforética foi realizada por cerca de 20 min a 80V (até todo o conteúdo amostral sair do poço de aplicação), seguida de 40min a 1 hora em 110V. O peso molecular dos produtos de PCR foi determinado em comparação ao marcador de peso molecular de 100pb (DNA Ladder - Invitrogen, California, USA) incluído nos géis.

Os fragmentos amplificados foram visualizados por transiluminação em luz ultravioleta e registrados digitalmente pelo sistema de fotodocumentação de imagens em gel – UVP *Bioimaging Systems* (Upland, CA, USA).

4.5.2 Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa (qPCR)

Para estimar a carga parasitária de triatomíneos que se mostraram positivos para *T. cruzi* pela PCRc, foram realizados ensaios de quantificação absoluta utilizando o sistema *TaqMan* de qPCR. Assim como na PCR convencional, os ensaios *TaqMan* foram realizados em *multiplex*, contendo na mesma reação, os iniciadores para o gene que codifica a região 12S do RNA ribossomal de triatomíneos (iniciadores P2B e P6R) e sonda *Taqman* para triatomíneos (Triat) desenhada pelo nosso grupo (manuscrito em preparação), e para o alvo DNA nuclear satélite de *T. cruzi* (iniciadores *Cruzi1* e *Cruzi2*), desenhados para amplificar uma região de 166pb e a sonda *Cruzi3* (PIRON et al, 2007) (**Tabela 6**). As reações ocorreram em um volume final de 20µL contendo 2µL DNA, 10µL *TaqMan*® Universal PCR Master Mix 2X (Applied Biosystems), 1,2µL de cada iniciador *Cruzi1* e *Cruzi2* (600 nM) e 1µL sonda *Cruzi 3* (FAM/NFQ-MGB) (250 nM), 0,6µL iniciador P2B (300 nM), 1µL iniciador P6R (500 nM) e 0,3µL sonda *Triat* (VIC/NFQ-MGB - Applied Biosystems) (150 nM) e 2,7µL H₂O ultra-pura. Os ensaios foram realizados no equipamento ABI Prism 7500 Fast (*Sequence Detector System* – Applied Biosystems), albergado pela plataforma PDTIS RPT-09^a/Fiocruz, com a seguinte programação: atividade inicial da enzima amperase (1 min, 50 °C), desnaturação inicial/ativação *Taq* Polimerase Hot start (10 min, 95 °C), 40 ciclos de desnaturação (15s, 95 °C) e anelamento/extensão (1 min, 58 °C).

Tabela 6: Sequências e iniciadores para os ensaios de PCR e qPCR

Alvos	Iniciadores/Sondas	Produtos amplificados (pb)	Sequência (5' – 3')
kDNA de <i>T. cruzi</i>	121 (Forward) 122 (Reverse)	330	AAATAATGTACGGG(T/G)GAGATGCATGA GGTTCGATTGGGGTTGGTGAATATA
DNA Satélite de <i>T. cruzi</i>	Cruzi 1 (Forward) Cruzi 2 (Reverse) Cruzi 3 (Sonda)	166	ASTCGGCTGATCGTTTTCGA AATTCCTCCAAGCAGCGGATA FAM-TTGGTGTCCAGTGTGTG-NFQ-MGB
12S RNAr de triatomíneo	P2B (Forward) P6R --(Reverse) *Triat (Sonda)	163	AAAGAATTTGGCGGTAATTTAGTCT GCTGCACCTTGACCTGACATT VIC-TCAGAGGAATCTGCCCTGTA-NFQ-MGB

*Manuscrito em preparação

4.5.2.1 Curva padrão

As curvas padrão de calibração para os alvos *T. cruzi* e triatomíneo, foram construídas a partir de diluições seriadas de DNA extraído de um *pool* de cinco intestinos de triatomíneos não infectados (*R. prolixus* de laboratório, de 5º estágio) previamente contaminado com formas epimastigotas de *T. cruzi* (CL-Brener), variando de 10^7 a 0,5 equivalentes de parasito a partir do *pool* de cinco intestinos de triatomíneos no primeiro ponto da curva. O DNA das amostras reconstituídas foi recuperado a partir do método descrito no item 4.4. Para as diluições seriadas das amostras reconstituídas, extrato de intestino de triatomíneo não infectado foi usado como diluente, como controle interno para verificar a qualidade do DNA extraído e a possível presença de inibidores da PCR nas amostras.

Cada diluição foi correspondente a um ponto que compôs a curva padrão para quantificação absoluta de *T. cruzi* nos triatomíneos. A curva padrão foi incluída em todos os ensaios quantitativos, em duplicatas para cada ponto da curva. Todas as amostras foram quantificadas em duplicatas e todas as placas de ensaios de qPCR contiveram controle positivo (10 fg DNA de *T. cruzi* CL-Brener/ μ L) e controles negativos (NTC: *Negative Template control* - 2 μ L água ultrapura e controle negativo para *T. cruzi*: 2 μ L DNA extraído a partir de 100 μ L de extrato de intestino de triatomíneo não infectado).

4.5.2.2 Cultivo de células para curva padrão e controles da PCR

Células de *T. cruzi* CL- Brener, Dm28c, Y, INPA 3663, INPA 4167, LL014 e *T. rangeli* (cepa Macias), foram cultivadas em BOD (B.O.D. Mod. 347) (Fanem, São Paulo, Brasil) a 28°C em cultura axênica em meio BHI (*Brain Heart Infusion*) (BD, Maryland, USA) suplementado com 10% de soro fetal bovino termodesativado (Cultilab, Campinas/SP, Brasil). As células foram cultivadas até atingirem a fase logarítmica de crescimento, após sucessivas passagens. No meio da fase logarítmica de cultivo, os parasitos foram centrifugados a 800 g durante 10 min, lavados três vezes com PBS (Tampão salina: Na₂HPO₄ 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7.2) e ressuspensos em 1 mL de PBS. Os epimastigotas foram submetidos a contagem em câmara de Neubauer e ajustados para uma concentração final na ordem de 10⁶ células/mL. As células foram armazenadas a -20°C até o momento de uso.

4.5.2.3 Análise estatística

Os dados da qPCR foram expressos como médias aritméticas ou mediana ± desvio padrão. Foram utilizados os testes *Mann–Whitney Rank Sum* ou *One-way ANOVA* para analisar a significância estatística das diferenças observadas. Um *p-value* menor ou igual a 0.05 foi considerado estatisticamente significativo. Todas as análises foram conduzidas com o programa *GraphPad Prism* versão 5.0.

4.6 Tipagem molecular de *T. cruzi* em DNA extraído de amostras de conteúdo intestinal de triatomíneos

A caracterização molecular do *T. cruzi* em DTUs foi realizada utilizando o DNA extraído (item 4.4) diretamente de amostras de intestino médio posterior e intestino posterior de triatomíneos, adaptada de BURGOS et al. (2010), RAMIREZ et al. (2010) e DOS SANTOS-RODRIGUES (2015), baseada em reações de PCR convencional multilocus (**Tabela 7**). A identificação subsequente dos genótipos se baseia no conjunto dos perfis dos produtos de PCR apresentados para cada alvo, utilizando os seguintes marcadores moleculares (como ilustrado na **Figura 13**): A região intergênica do gene de *Spliced Leader* (SL-IRac) utilizando os iniciadores UTCC e TCac (descrito por Burgos et al., 2007) para distinguir Tc I (150 pb), Tc II/V/VI (157 pb) e Tc III/IV (200 pb), e para SL-IR I e II, os iniciadores TCC, TC1 e TC2 (descrito por SOUTO et al., 1996, adaptado por MARCET et al., 2006), usados simultaneamente, diferenciando Tc I (350

pb), Tc II/V/VI (300 pb) e Tc III/IV (não são amplificados). O domínio variável D7 do gene da subunidade 24S α do RNA ribossomal, utilizando os iniciadores D75, D76 e D71 em *semi-nested* PCR, para distinguir Tc II/VI (140 pb), Tc III (125 pb), Tc IV (140/145 pb) e Tc V (125/140 pb) (BRISSE et al., 2000a). A região do fragmento nuclear A10 utilizando em *semi-nested*, os iniciadores Pr1, Pr6 e Pr3 (BRISSE et al., 2000b) para diferenciar Tc II (690/580 pb) e Tc VI (630/525 pb). Todas as reações de PCR foram realizadas para um volume final de 30 μ L.

Para os alvos SL-IRac (iniciadores UTCC e TCac) e SL-IRI e II (TCC, TC1 e TC2), os ensaios obedeceram às seguintes condições: 2 μ L de DNA, 3 μ L de solução tampão 10X [100 mM de Tris-HCl pH 8,3 contendo 500 mM de KCl], 0,15 μ L Platinum Taq DNA polimerase (Solução estoque: 5U/ μ L) (Life Technologies, USA), 1,8 μ L MgCl₂ (3 mM), 0,12 μ L de cada dNTP (0,02 mM), 1 μ L de cada primer (1,66 μ M) e 20,57 μ L de H₂O ultra-pura (19,57 μ L de H₂O para o alvo SL-IRI e II).

As condições de reação para o alvo 24s α foram: Primeira rodada (iniciadores D75, D76) - 2 μ L de DNA, 3 μ L de solução tampão 10X [100mM de Tris-HCl pH 8,3 contendo 500 mM de KCl], 0,12 μ L Platinum Taq DNA polimerase (Solução estoque: 5U/ μ L) (Life Technologies, USA), 1,8 μ L MgCl₂ (3 mM), 0,12 μ L de cada dNTP (0,02 mM), 2,4 μ L de cada primer (1,66 μ M) e 17,8 μ L de H₂O. Para a segunda rodada (iniciadores D71, D76): 1 μ L de produto amplificado na primeira rodada, 3 μ L de solução tampão 10X [100mM de Tris-HCl pH 8,3 contendo 500 mM de KCl], 0,15 μ L Platinum Taq DNA polimerase (Solução estoque: 5U/ μ L) (Life Technologies, USA), 1,2 μ L MgCl₂ (3 mM), 0,12 μ L de cada dNTP (0,02 mM), 3 μ L de cada primer (1,66 μ M) e 18,17 μ L de H₂O.

A primeira rodada da reação para o alvo do fragmento nuclear A10 (iniciadores Pr1 e Pr6) consistiu de 2 μ L de DNA, 3 μ L de solução tampão 10X [100mM de Tris-HCl pH 8,3 contendo 500 mM de KCl], 0,15 μ L Platinum Taq DNA polimerase (Solução estoque: 5U/ μ L) (Life Technologies, USA), 1,8 μ L MgCl₂ (3 mM), 0,75 μ L de cada dNTP (0,02 mM), 0,3 μ L de cada primer (1,66 μ M) e 19,45 μ L de H₂O ultra-pura. Para a segunda rodada (iniciadores Pr1 e Pr3): 2 μ L de produto amplificado na primeira rodada, 3 μ L de solução tampão 10X [100mM de Tris-HCl pH 8,3 contendo 500 mM de KCl], 0,15 μ L Platinum Taq DNA polimerase (Solução estoque: 5U/ μ L) (Life Technologies, USA), 1,8 μ L MgCl₂ (3 mM), 0,75 μ L de cada dNTP (0,02 mM), 1 μ L de cada *primer* (1,66 μ M) e 18,05 μ L de H₂O ultra-pura.

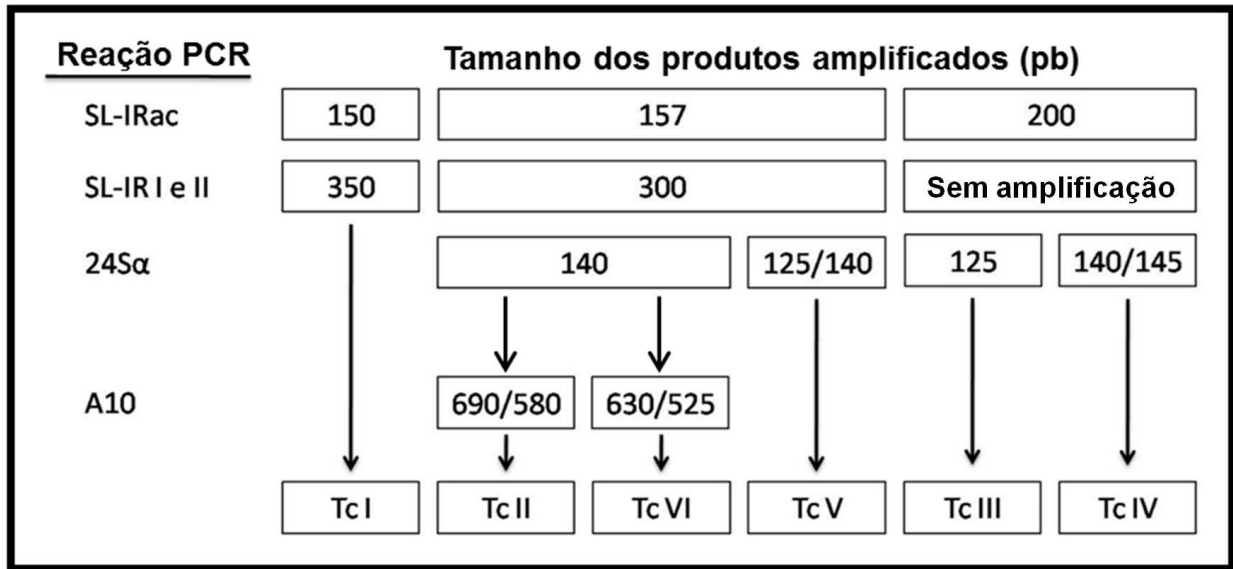
Os isolados de referência utilizados como controles positivos nas reações foram: Dm28c (TcI), Y (TcII), INPA 3663 (TcIII), INPA 4167 (TcIV), LL014 (TcV) e CL (TcVI), provenientes da Coleção de Protozoários do Instituto Oswaldo Cruz (COLPROT). Os controles negativos da reação de PCR (tubo contendo todos os reagentes na ausência de DNA) e de triatomíneo (inseto não infectado mantido em laboratório - Laboratório de Bioquímica e Fisiologia de Insetos/IOC) também foram incluídos.

Tabela 7: Condições da PCRc para a tipagem molecular

Alvo	Iniciadores	Sequência	Concentração	Termociclagem							
				Hot Start	D	A	E	Ef	C		
SL-IRac	UTCC TCac	CGTACCAATATAGTACAGAACTG CTCCCCAGTGTGGCCTGGG	1,66 µM 1,66 µM	94°/10'	94°C/30''	70°C/30''	72°C/30''			3	
					94°C/30''	68°C/30''	72°C/30''			3	
					94°C/30''	66°C/30''	72°C/30''	72°C/10'		4	
					94°C/30''	64°C/30''	72°C/30''			6	
					94°C/30''	62°C/30''	72°C/30''			34	
SL-IR I SL-IR II	TCC TC2 TC1	CCCCCTCCAGGCCACACTG CCTGCAGGCACACGTGTGTG TCCGCCACCTCCTCGGGCC	1,66 µM 1,66 µM 1,66 µM	94°C/5'	94°C/1'	67°C/1'	72°C/1'			5	
					94°C/1'	65°C/1'	72°C/1'			5	
					94°C/1'	63°C/1'	72°C/1'	72°C/10'		5	
					94°C/1'	61°C/1'	72°C/1'			30	
24Sα- rDNA Primeira rodada	D76 D75	GGTTCTCTGTTGCCCTTTT GCAGATCTTGGTTGCGTAG	1,66 µM 1,66 µM	94°C/3'	94°C/30''	64°C/45''	72°C/1'			5	
					94°C/30''	65°C/45''	72°C/1'			5	
					94°C/30''	60°C/45''	72°C/1'			5	
	Segunda rodada	D76 D71	GGTTCTCTGTTGCCCTTTT AAGGTGCGTCGACAGTGTGG		1,66 µM 1,66 µM	94°C/30''	58°C/45''	72°C/1'	72°C/5'		35
						94°C/30''	60°C/30''	72°C/30''			6
						94°C/30''	57°C/30''	72°C/30''			6
				94°C/30''	55°C/30''	72°C/30''			30		
Fragmento A10 Primeira rodada	Pr1 Pr6	CCGCTAAGCAGTTCTGTCCATA GTGATCGCAGGAAACGTGA	1,66 µM 1,66 µM	94°C/3'	94°C/1'	65°C/1'	72°C/1'			35	
								72°C/10'			
	Pr1 Pr3	CCGCTAAGCAGTTCTGTCCATA CGTGCCATGGGGTAATAAAGCA	1,66 µM 1,66 µM		94°C/1'	60°C/1'	72°C/1'			35	

Hot Start: Ativação da enzima, **D:** Desnaturação, **A:** Anelamento, **E:** Extensão, **Ef:** Extensão final, **C:** Ciclos.

Figura 13: Fluxograma para a identificação das Unidades Discretas de Tipagem (DTUs) diretamente do conteúdo intestinal de triatomíneos, baseada em quatro marcadores, utilizando a técnica de PCRc.
 Adaptado de Burgos et al. (2010), Ramírez et al. (2010) e Dos Santos-Rodrigues (2015)



4.6.1 Eletroforese em gel de agarose

Após a PCRc, 20 μ L dos produtos amplificados foram misturados com 4 μ L do tampão da amostra 1X (0,25% de azul de bromofenol; 0,25% de xileno-cianol; 30% de glicerol), e aplicados em gel de agarose a 3% imerso em tampão TBE 1X (Trizma base a 89 mM, Ácido Bórico a 88 mM e EDTA a 2 mM, pH 8,0) corado com *Nancy-520 DNA Gel Stain* (SIGMA-Aldrich[®], São Paulo, Brasil). A corrida eletroforética foi realizada por cerca de 30 min a 80V (até todo o conteúdo amostral sair do poço de aplicação), seguida por 1 hora a 1:30h a 110V. O peso molecular dos produtos de PCR foi determinado em comparação ao marcador de peso molecular de 100pb (DNA Ladder - Invitrogen, California, USA) incluído nos géis.

Os fragmentos amplificados foram visualizados por transiluminação em luz ultravioleta e registrados digitalmente pelo sistema de fotodocumentação de imagens em gel – UVP *Bioimaging Systems* (Upland, CA, USA).

5 RESULTADOS

5.1 Descrição das localidades, espécies e estádios evolutivos dos triatomíneos coletados

No total, foram coletados 796 triatomíneos, dos quais 401 exemplares são provenientes do Rio Grande do Sul e 395 do Ceará, cuja distribuição por localidade pode ser verificada na **Figura 14**. No estado gaúcho 277 triatomíneos foram coletados no ambiente silvestre (sob-rochas); 123 em peridomicílio (paiol), espécimes de *T. infestans* coletados no município de Santa Rosa; e 1 no intradomicílio, da espécie *T. rubrovaria* (em Bagé) (**Figura 15**). No Ceará 389 insetos estavam presentes no ambiente peridomiciliar (amontado de lenhas e telhas, galinheiros, poleiros e cunicultura) e outros 6 no intradomicílio, somente da espécie *T. brasiliensis* (3 exemplares em Assaré e outros 3 em Alto Alegre) (**Figura 16**). A classificação dos insetos através da morfologia foi realizada antes da análise molecular, resultando na identificação de *T. pseudomaculata* (N=270), *T. brasiliensis* (N=118) e *P. lutzi* (N=7), no estado do Ceará; e de *T. infestans* (N=123), *T. carvalhoi* (N=33), *T. circummaculata* (N=9) e *T. rubrovaria* (N=8), no estado do Rio Grande do Sul. Não foi possível identificar a espécie de mais da metade dos triatomíneos do Rio Grande do Sul (N=228).

Figura 14: Distribuição das espécies de triatomíneos coletados, de acordo com os municípios estudados no Ceará (A) e Rio Grande do Sul (B).

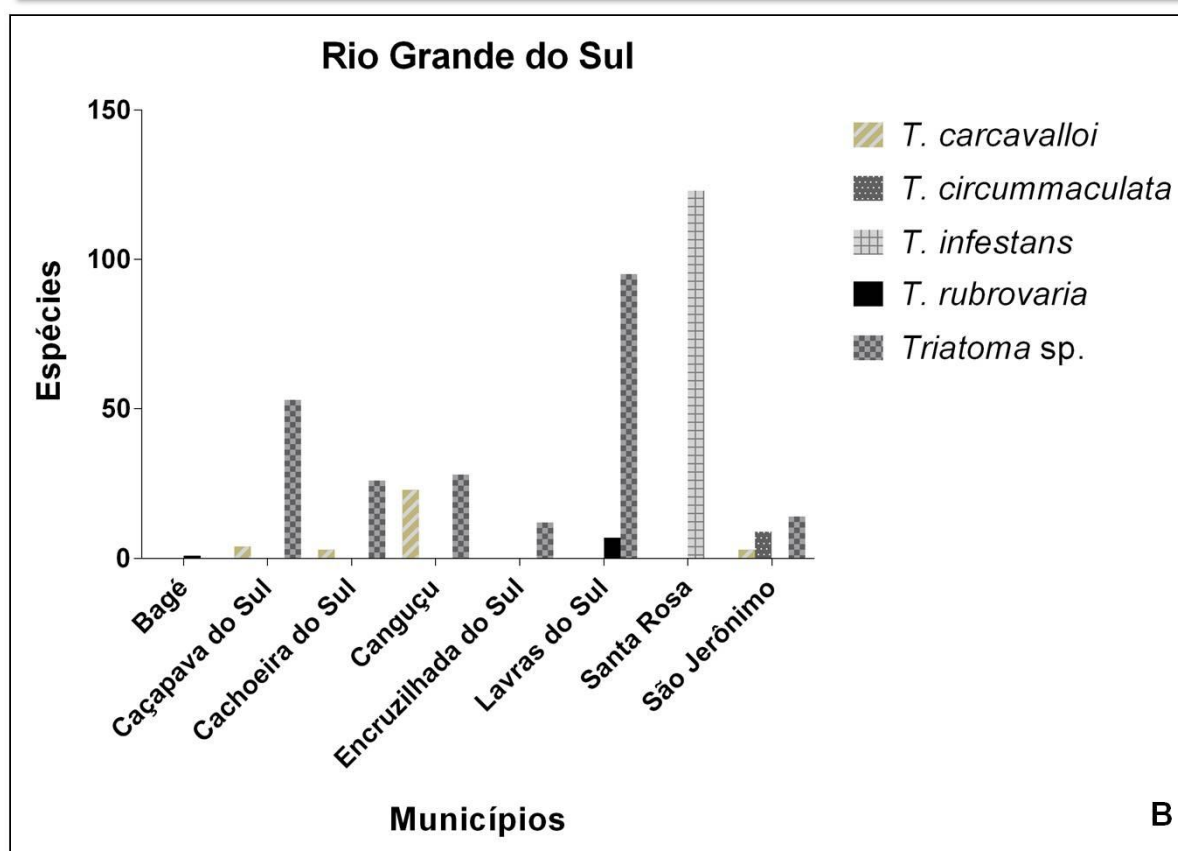
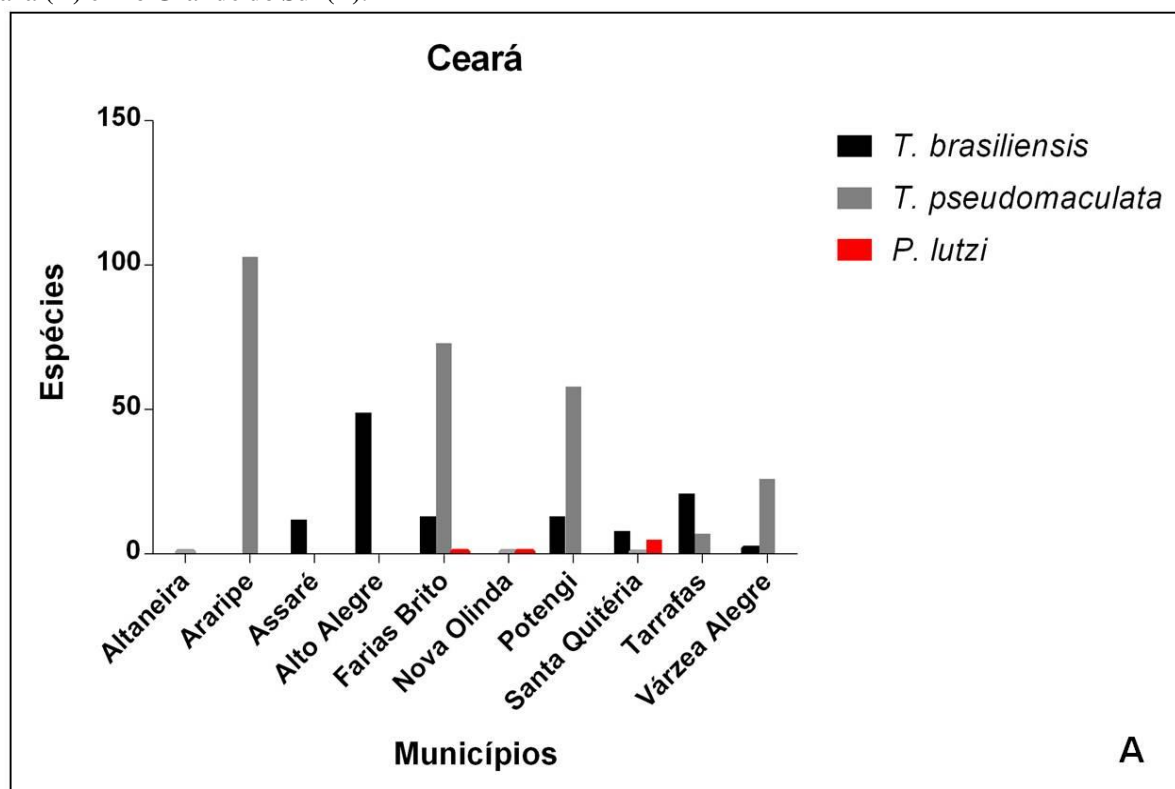


Figura 14: Ambientes em que os triatomíneos foram coletados, de acordo com as espécies (A) e os municípios (B) do Rio Grande do Sul.

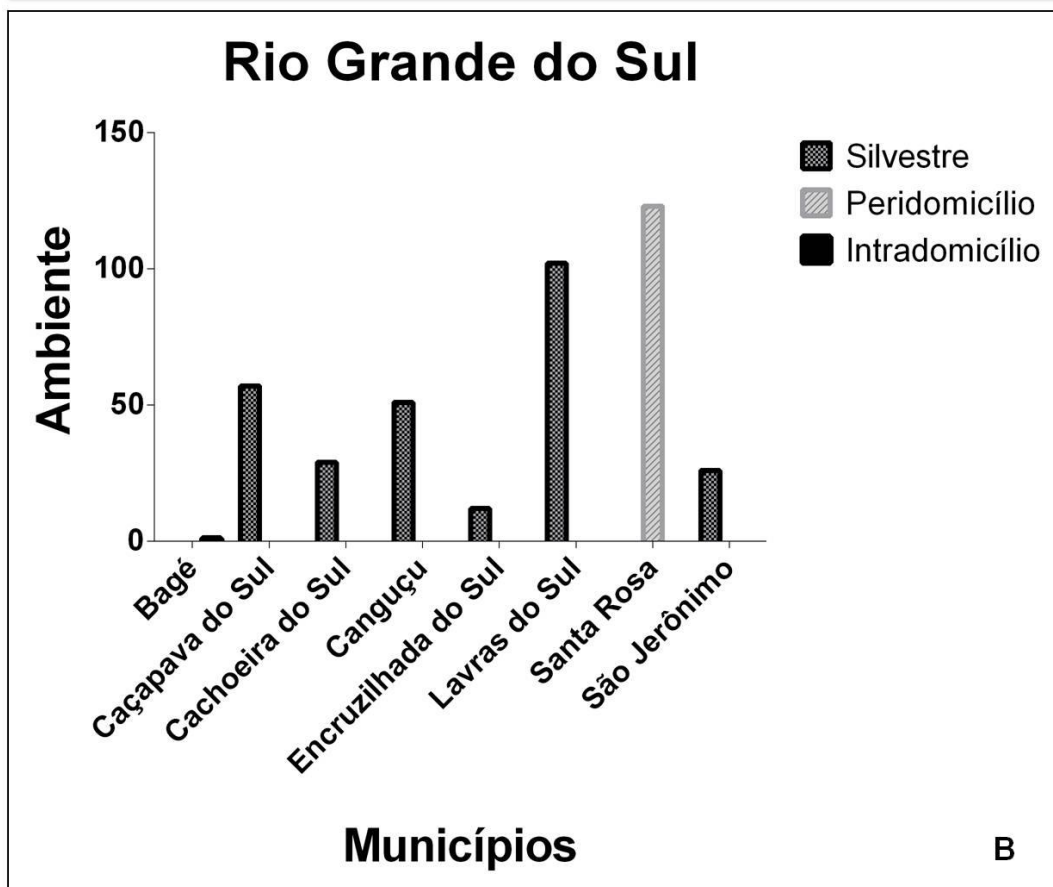
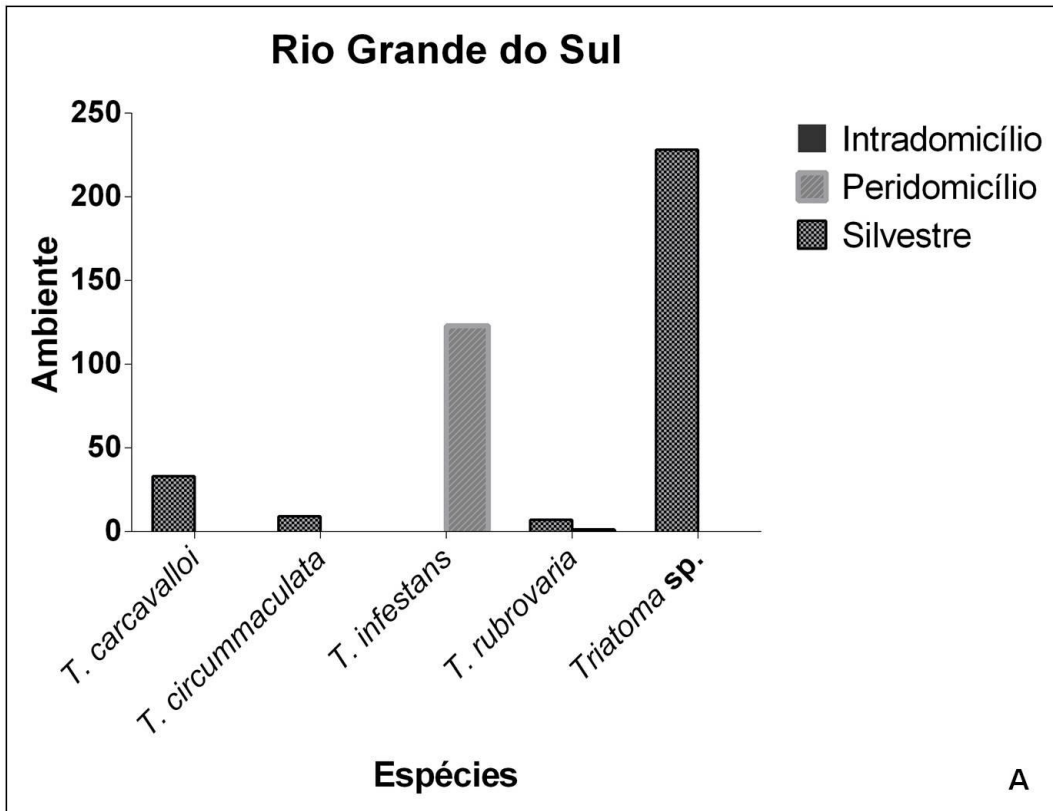
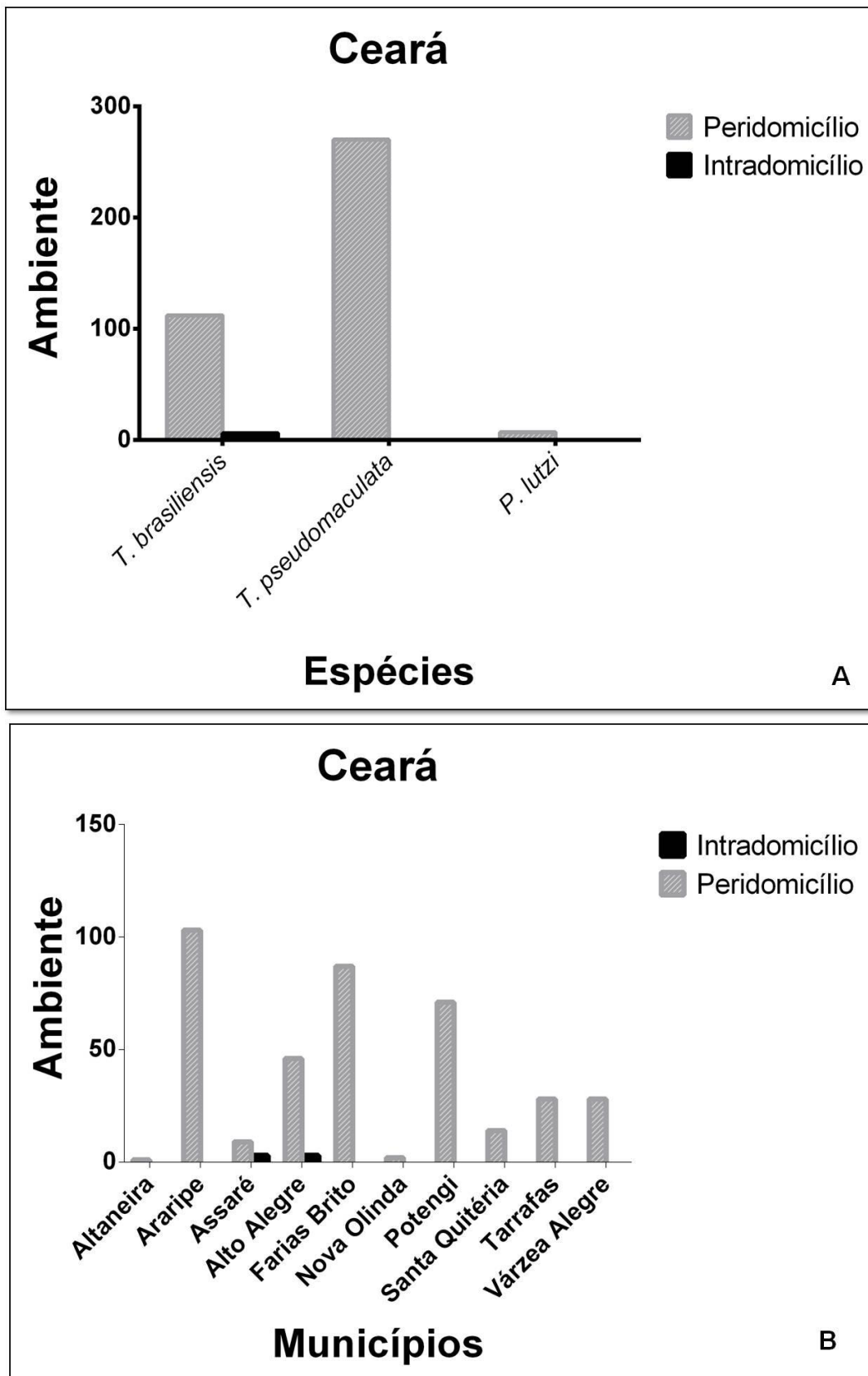


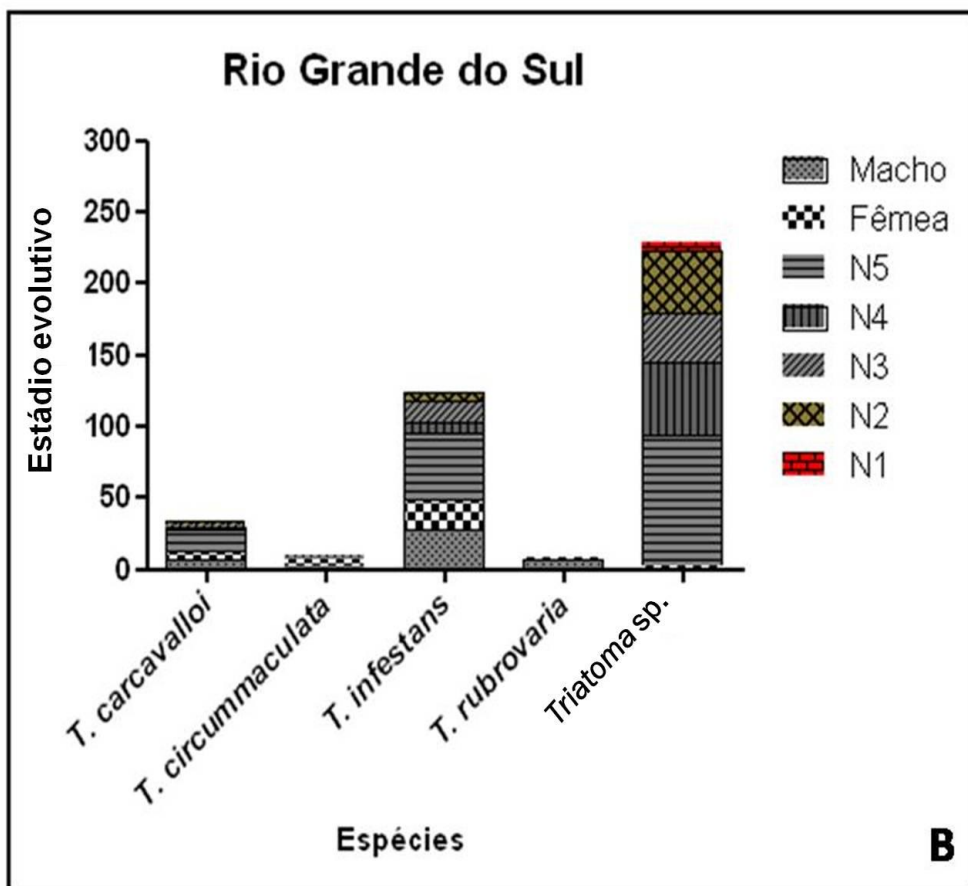
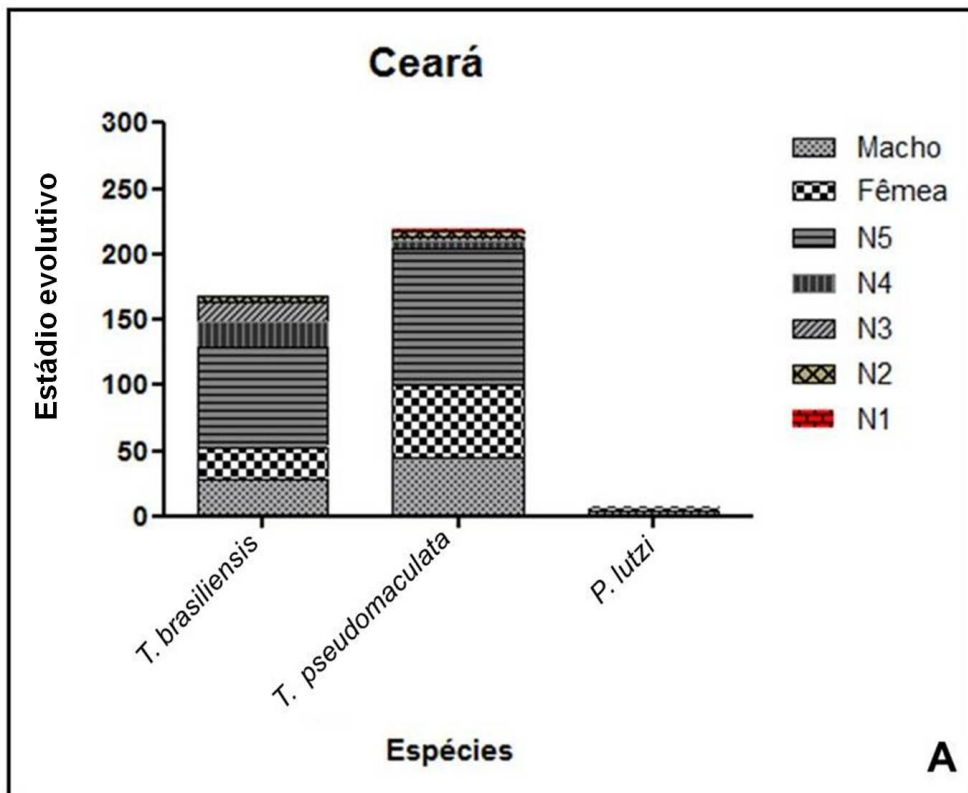
Figura 15: Ambientes em que os triatomíneos foram coletados, de acordo com as espécies (A) e os municípios (B) do Ceará.



Os triatomíneos foram coletados em dez localidades do estado do Ceará: **Altaneira** – *T. pseudomaculata* (N=1); **Araripe** – *T. pseudomaculata* (N=103); **Assaré** – *T. brasiliensis* (N=12); **Alto Alegre** – *T. brasiliensis* (N=49); **Farias Brito** – *T. brasiliensis* (N=13), *T. pseudomaculata* (N=73) e *P. lutzi* (N=1); **Nova Olinda** – *T. pseudomaculata* (N=1) e *P. lutzi* (N=1); **Potengi** – *T. brasiliensis* (N=13) e *T. pseudomaculata* (N=58); **Santa Quitéria** – *T. brasiliensis* (N=8), *T. pseudomaculata* (N=1) e *P. lutzi* (N=5); **Tarrafas** – *T. brasiliensis* (N=21) e *T. pseudomaculata* (N=7) e **Várzea Alegre** – *T. brasiliensis* (N=2) e *T. pseudomaculata* (N=26). Já no Rio Grande do Sul os triatomíneos estudados eram provenientes de oito municípios: **Bagé** – *T. rubrovaria* (N=1); **Caçapava do Sul** – *T. carcavalloi* (N=4) e *Triatoma* sp. (N=53); **Cachoeira do Sul** - *T. carcavalloi* (N=3) e NI (N=26); **Canguçu** - *T. carcavalloi* (N=23) e NI (N=28); **Encruzilhada do Sul** – NI (N=12), **Lavras do Sul** – *T. rubrovaria* (N=7) e NI (N=95), **Santa Rosa** – *T. infestans* (N=123) e **São Jerônimo** - *T. carcavalloi* (N=3), *T. circummaculata* (N=9) e NI (N=14).

A distribuição das espécies conforme os seus estádios evolutivos é apresentada na **Figura 17**. *T. brasiliensis*: Macho (N=24), Fêmea (N=19), N5 (N=46), N4 (N=17), N3 (N=8) e N2 (N=4); *T. pseudomaculata*: Macho (N=50), Fêmea (N=60), N5 (N=134), N4 (N=8), N3 (N=11), N2 (N=5) e N1 (N=2); *P. lutzi*: Macho (N=5) e Fêmea (N=2). *T. carcavalloi*: Macho (N=6), Fêmea (N=7), N5 (N=15), N4 (N=1), N3 (N=2), N2 (N=1) e N1 (N=1); *T. circummaculata*: Macho (N=2), Fêmea (N=5), N5 (N=1) e N3 (N=1); *T. infestans*: Macho (N=28), Fêmea (N=21), N5 (N=46), N4 (N=8), N3 (N=14) e N2 (N=6); *T. rubrovaria*: Macho (N=6) e Fêmea (N=2); e *Triatoma* sp. : Fêmea (N=2), N5 (N=92), N4 (N=51), N3 (N=34), N2 (N=43) e N1 (N=6).

Figura 17: Distribuição de triatomíneos coletados nos estados do Ceará (A) e do Rio Grande do Sul (B) de acordo com os estádios evolutivos e as espécies estudadas.



5.2 PCRC *multiplex* e exame parasitológico por microscopia óptica

Na **Tabela 8** pode-se observar a comparação entre a PCR convencional *multiplex* e a análise microscópica para detectar *T. cruzi* em triatomíneos. O parasito não foi detectado por exame a fresco em nenhum exemplar coletado no Ceará, em contraste com as 63 amostras positivas pela PCR. Já com relação aos insetos provenientes do Rio Grande do Sul, só foi possível o encontro de *T. cruzi* por microscopia em dois (6,7%) espécimes de *T. infestans* entre as 30 amostras PCR positivas. Trezentos e trinta e dois e 371 insetos do Ceará e do Rio Grande do Sul, respectivamente, com microscopia-negativa também foram negativos para a PCR.

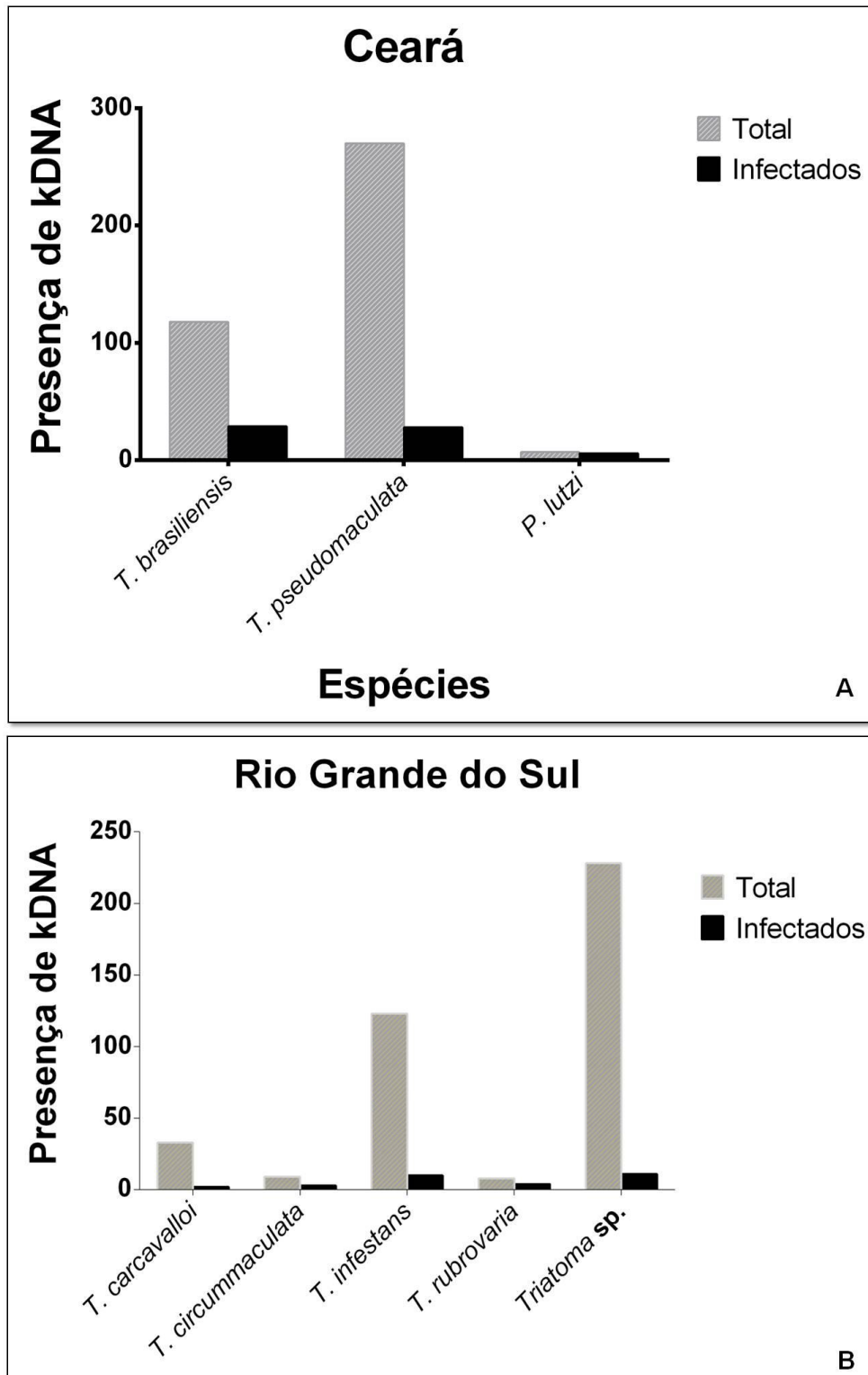
Tabela 8: Pesquisa de *T. cruzi* em triatomíneos: comparação entre a PCRC e o exame a fresco

Triatomíneos de campo (Ceará)		
	PCR + (%)	PCR – (%)
Microscopia +	-	-
Microscopia -	63	332
Total	63 (15,9)	332 (84,1)

Triatomíneos de campo (Rio Grande do Sul)		
	PCR + (%)	PCR – (%)
Microscopia +	2	-
Microscopia -	28	371
Total	30 (7,5)	371 (92,5)

Dos 401 triatomíneos coletados no Rio Grande do Sul, o DNA de *T. cruzi* foi detectado em 30 amostras (7,5%); no Ceará, dos 395 insetos coletados, 63 (15,9%) foram positivos pela PCR. No Rio Grande do Sul, a razão entre o número de exemplares naturalmente infectados pelo protozoário e o número de espécimes coletadas de uma determinada espécie, foi superior entre aqueles pertencentes à espécie *T. rubrovaria* (4/8; 50%), seguido de *T. circummaculata* (3/9; 33,3%), *T. infestans* (10/123; 8,1%) e *T. carvalhoi* (2/33; 6,1%). Entre as 228 espécies não identificadas, 11 foram positivas para DNA de *T. cruzi*, perfazendo uma taxa de 4,8%. No Ceará, o maior percentual de positividade da PCR em função da espécie de triatomíneo, foi em indivíduos da espécie *P. lutzi* (6/7; 85,7%), seguido de *T. brasiliensis* (29/118; 24,6%) e *T. pseudomaculata* (28/270; 10,4%) (**Figura 18**).

Figura 168: Distribuição do número de exemplares coletados das diferentes espécies de triatomíneos e o número de espécimes naturalmente infectados pelo *T. cruzi*, analisados por PCRc a partir do conteúdo intestinal. (A) Ceará; (B) Rio Grande do Sul.

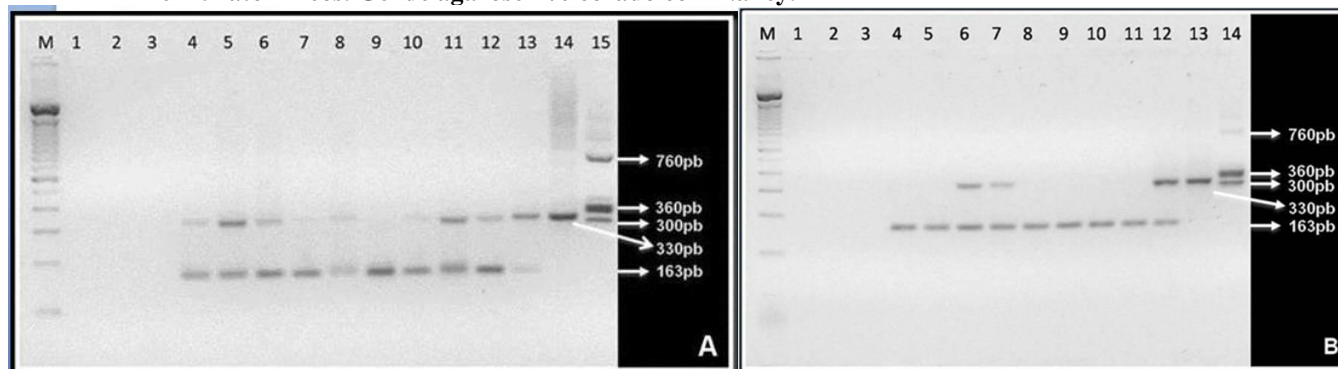


É importante salientar que um total de 11 exemplares de triatomíneos (4 espécimes do Ceará e 7 do Rio Grande do Sul) não amplificaram o gene constitutivo do

triatomíneo, que é o nosso controle interno, na PCR convencional *multiplex*. Por este motivo, eles não foram incluídos nas análises moleculares posteriores.

Em todas as amostras incluídas neste estudo, o fragmento amplificado de 163pb correspondente a região 12S do RNA ribossomal de triatomíneos foi observado, validando as amostras negativas, livres de infecção pelo *T. cruzi* (representado pelo fragmento de 300pb) e indicando a não inibição da reação. Em adição, não foi detectada a presença de kDNA de *T. rangeli* nos triatomíneos capturados em ambos os estados, considerando o perfil de bandas observado no controle positivo para este tripanosomatídeo (Cepa Matias) em nosso estudo (300pb, 360pb e 760pb) (**Figura 19**).

Figura 17: Exemplo de revelação dos resultados da PCR convencional para avaliar infecção natural em triatomíneos. Gel de agarose 2% corado com Nancy.

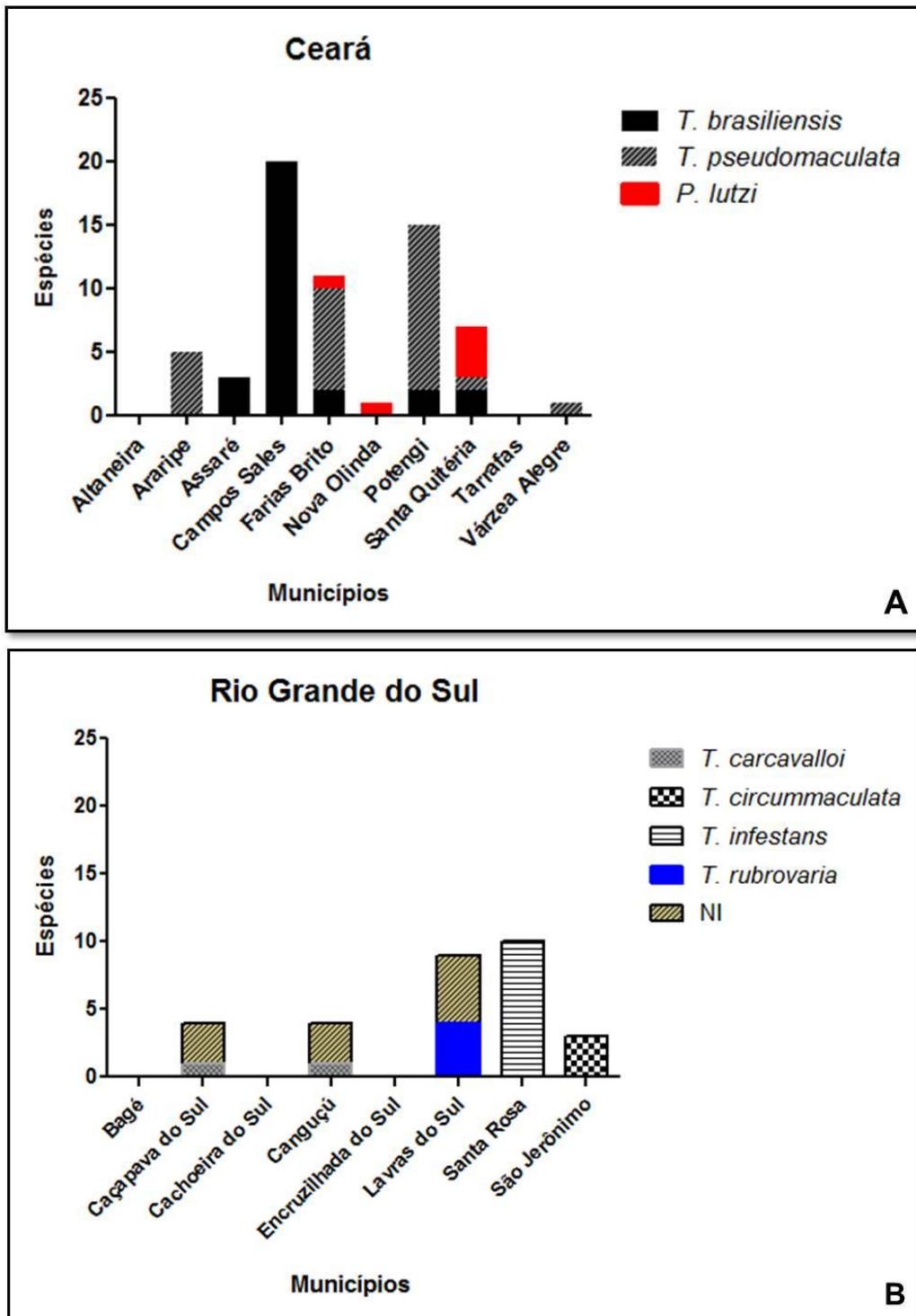


(A): Triatomíneos coletados no Ceará – M: Marcador de peso molecular (100pb); 1 e 2: Controles negativos da PCR (tubo contendo todos os reagentes na ausência de DNA e um tubo contendo apenas água estéril); 3: Controle negativo da extração (tubo contendo todos os reagentes na ausência de intestino de triatomíneo); Município de Santa Quitéria – 4, 5, 8, 11: *P. lutzi* infectados; 7, 10: *T. brasiliensis* infectados; 9: *T. brasiliensis* não infectado; 12: *T. pseudomaculata* infectado; Município de Nova Olinda – 6: *P. lutzi* infectado; 13: Controle positivo de infecção (DNA de lisado de *R. prolixus* não infectado misturado a DNA de *T. cruzi* CI-Brener, 10^5 parasitos/mL); 14: Controle positivo de *T. cruzi* (DNA extraído de epimastigotas CI-Brener, 10^5 parasitos/mL); 15: Controle positivo de *T. rangeli* (DNA extraído Cepa Macias, 10^5 parasitos/mL). (B): Triatomíneos coletados no município de Lavras do Sul, Rio Grande do Sul – M: Marcador de peso molecular (100pb); 1 e 2: Controles negativos da PCR (tubo contendo todos os reagentes na ausência de DNA e um tubo contendo apenas água estéril); 3: Controle negativo da extração (tubo contendo todos os reagentes na ausência de intestino de triatomíneo); 4, 5, 8 e 11: Insetos não infectados; 6 e 7: *T. rubrovaria* infectados; 12: Controle positivo de infecção (DNA de lisado de *R. prolixus* não infectado misturado a DNA de *T. cruzi* CI-Brener, 10^5 parasitos/mL); 13: Controle positivo de *T. cruzi* (DNA extraído de epimastigotas CI-Brener, 10^5 parasitos/mL); 14: Controle positivo de *T. rangeli* (DNA extraído Cepa Macias, 10^5 parasitos/mL).

Em oito municípios do Ceará foram encontradas espécies naturalmente infectadas por *T. cruzi*, tais como: **Araripe** (*T. pseudomaculata*, N=5), **Assaré** (*T. brasiliensis*, N=3), **Alto Alegre** (*T. brasiliensis*, N=20), **Farias Brito** (*T. pseudomaculata*, N=8; *T. brasiliensis*, N=2; *P. lutzi*, N=1), **Nova Olinda** (*P. lutzi*, N=1), **Potengi** (*T. pseudomaculata*, N=13; *T. brasiliensis*, N=2), **Santa Quitéria** (*T. brasiliensis*, N=2; *P. lutzi*, N=4) e **Várzea Alegre** (*T. pseudomaculata*, N=1). Em contraste com o Rio Grande do Sul, em que espécies infectadas foram coletadas em

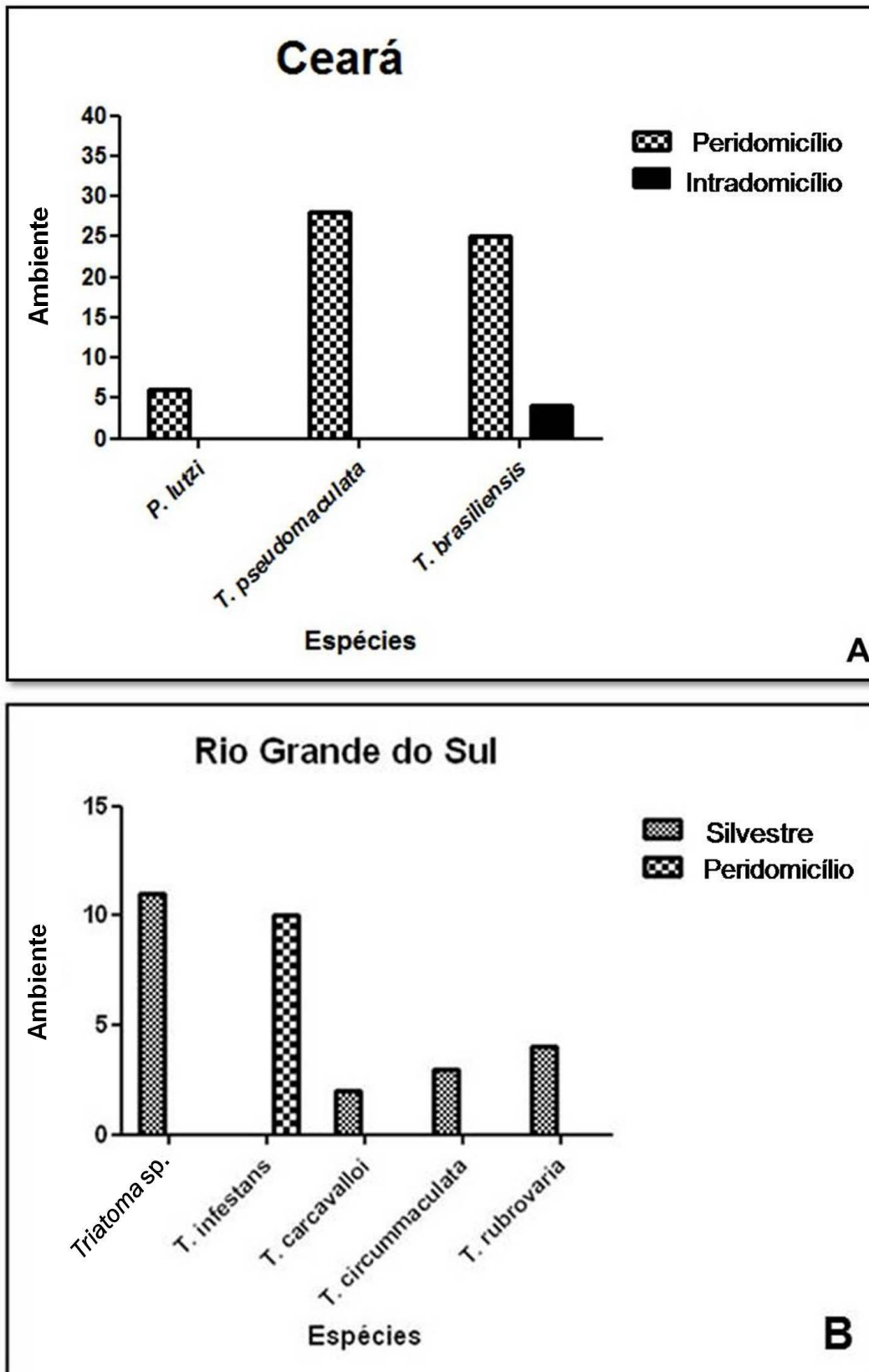
cinco municípios: **Caçapava do Sul** (*T. carvalhoi*, N=1 e *Triatoma* sp., N=3), **Canguçu** (*T. carvalhoi*, N=1; NI, N=3), **Lavras do Sul** (*T. rubrovaria*, N=4; NI, N=5), **Santa Rosa** (*T. infestans*, N=10) e **São Jerônimo** (*T. circummaculata*, N=3) (Figura 20).

Figura 18: Distribuição de espécies de triatomíneos naturalmente infectados pelo *T. cruzi*, de acordo com o município em que foram coletadas no Ceará (A) e no Rio Grande do Sul (B).



A **Figura 21** indica os habitats em que os triatomíneos positivos para a detecção de kDNA de *T. cruzi* foram encontrados. No Rio Grande do Sul, dos insetos positivos pela PCR (30/401), os dez espécimes de *T. infestans* estavam em peridomicílio (paiol), dois *T. carcavallo* encontravam-se em área silvestre, assim como os três *T. circummaculata* e quatro *T. rubrovaria*. Os espécimes *Triatoma* sp. (N=11), que continham o parasito, também estavam presentes em ecótopo silvestre. Todos estes insetos vetores, do ambiente silvestre, foram coletados sob-rochas (insetos rupestres). No Ceará, somente quatro insetos (*T. brasiliensis*), entre os 63 positivos para *T. cruzi*, foram coletados no intradomicílio. Os demais indivíduos com infecção natural foram coletados no ambiente peridomiciliar: *T. pseudomaculata* (N=28), *T. brasiliensis* (N=25) e *P. lutz* (N=6).

Figura 191: Distribuição por espécies de triatomíneos infectados por *T. cruzi* de acordo com o ambiente em que foram coletados, no Ceará (A) e no Rio Grande do Sul (B).

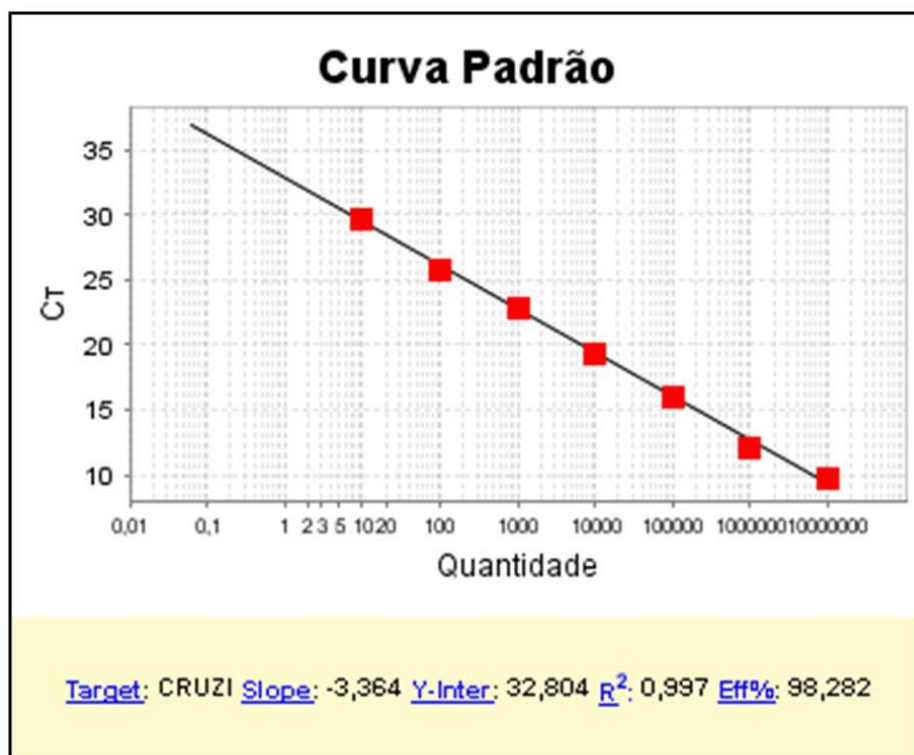


5.3 Avaliação da carga parasitária: qPCR *multiplex*

Para quantificar a carga parasitária de amostras de triatomíneos considerados positivos a partir da detecção de kDNA de *T. cruzi* por PCRc, foi utilizado um ensaio de qPCR *multiplex* com base no sistema TaqMan, tendo como alvo o gene que codifica a região 12S do RNA ribossomal de triatomíneos e o DNA nuclear satélite de *T. cruzi*. A **Figura 22** demonstra um exemplo de curva padrão de calibração construída a partir de DNA diluído em série, extraído de um *pool* de cinco intestinos de triatomíneos (*R. prolixus* livres de infecção) contaminado artificialmente com epimastigotas de *T. cruzi* CL Brener. A faixa de detecção de DNA de *T. cruzi* foi linear, variando de 10^5 a 0,5 equivalentes de parasito, a partir de amostras reconstituídas de intestinos de triatomíneos infectados com o parasito. Da mesma forma, a detecção de DNA de triatomíneos foi linear, na faixa de 5 a 0,002 equivalentes de triatomíneo. Para o alvo *T. cruzi* a equação da reta foi $Y = -3,36x + 32,80$, o que resultou uma eficiência de 98,3% e coeficiente de linearidade (R^2) de 0,99 (**Figura 22**).

Figura 202: Ensaio de qPCR TaqMan: Curva padrão representativa construída a partir de DNA diluído em série, extraído de um pool de cinco intestinos de triatomíneos não infectados, contaminado artificialmente com epimastigotas de *T. cruzi* CL-Brener.

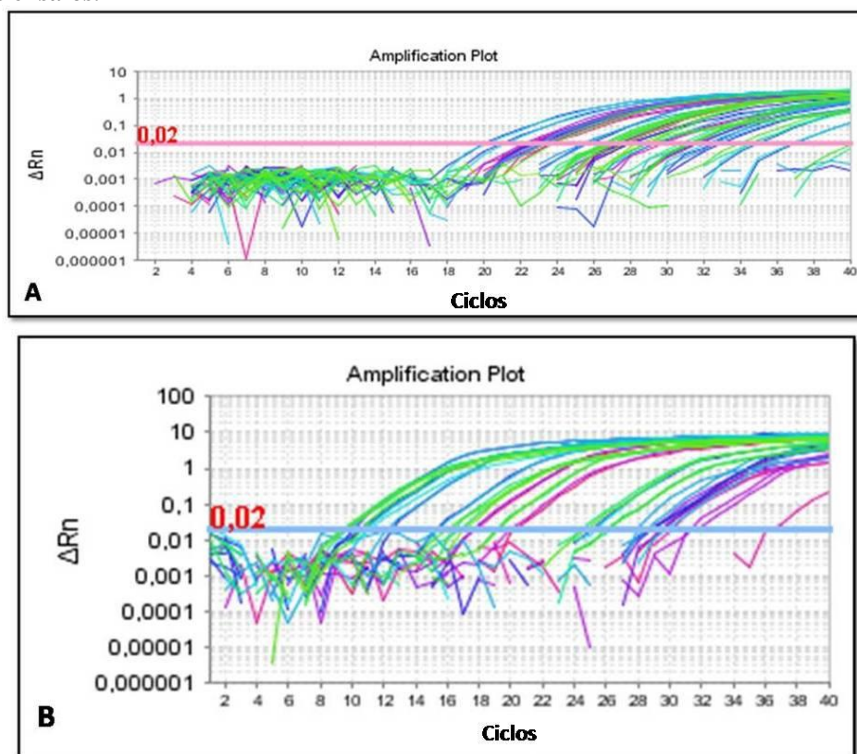
A inclinação (*slope*), coeficiente de regressão (R^2) e a eficiência de amplificação (*Eff*) estão indicados nos gráficos.



Na **Figura 23** estão representadas as curvas de amplificação (*amplification plot*) geradas pelo equipamento *ABI Prism 7500 Fast* durante os ensaios de quantificação. Pode-se observar uma expressiva variação dos valores de C_T para o alvo em triatomíneo ($C_T = 20$ a $C_T = 36$), considerando a heterogeneidade dos triatomíneos capturados quanto aos estádios evolutivos dos espécimes (**Figura 17**). Ressalta-se que as amostras de DNA de triatomíneos que foram quantificadas, foram aquelas que deram resultados positivos para a presença de DNA de *T. cruzi* pela PCR convencional *multiplex* e que revelaram o fragmento de 163pb correspondente a região 12S do RNA ribossomal de triatomíneos, confirmando assim a qualidade do DNA extraído e ausência de inibidores nas amostras. Da mesma forma, pode ser observada a variação dos valores de C_T para o alvo em *T. cruzi* ($C_T = 10$ a $C_T = 37$), demonstrando a diferença de carga parasitária entre as diferentes amostras de triatomíneos.

Figura 23: Curvas de amplificação do ensaio de qPCR – sistema TaqMan.

(A) Alvo triatomíneo. (B) Alvo *T. cruzi*. Eixo X: número de ciclos. Eixo Y: variação de fluorescência normalizada gerada pela clivagem da sonda TaqMan (ΔR_n). A linha horizontal nos gráficos (em rosa/azul) corresponde ao *Threshold* selecionado no *software*, o que permite indicar o ciclo (C_T) no qual a fluorescência de cada amostra ultrapassa a linha *Threshold*, estipulado em 0,02 em todos os ensaios.

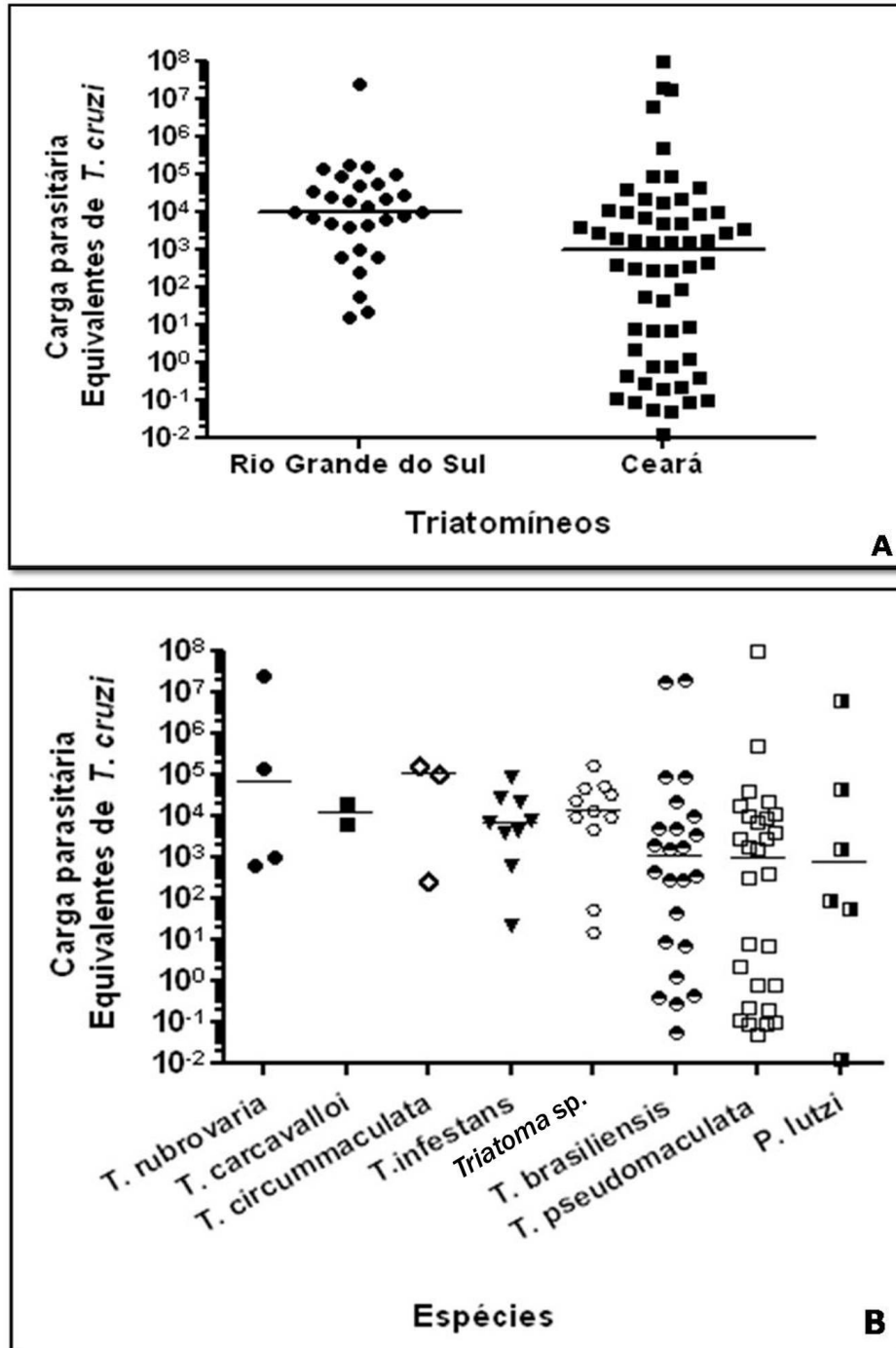


No Rio Grande do Sul, dos 30 insetos positivos para *T. cruzi* por PCRc, 29 foram quantificados por qPCR. A carga parasitária variou entre $2,3 \times 10^7$ (um único exemplar) a $1,5 \times 10^1$ equivalentes de parasito, com uma mediana de 10^4 equivalentes de parasito. Quando a carga foi analisada por espécie, *T. rubrovaria* apresentou a maior quantidade de parasitos ($2,3 \times 10^7$ equivalentes de parasito). Em contraste, *Triatoma* sp. e *T. infestans* apresentaram infecções mais baixas ($1,5 \times 10^1$ e $2,1 \times 10^1$ equivalentes de *T. cruzi*, respectivamente). Os dois exemplares de triatomíneos que foram positivos para *T. cruzi* por microscopia óptica pertenciam à espécie *T. infestans* (ninfas de 5º estágio). A carga parasitária destes foi de $5,8 \times 10^2$ e $2,1 \times 10^1$ equivalentes de *T. cruzi*. No Ceará, das 63 amostras PCRc-positivas, 58 puderam ser avaliadas quantitativamente por qPCR. Neste estado, a carga parasitária variou entre $9,1 \times 10^7$ a $1,2 \times 10^{-2}$ equivalentes de parasito, com mediana de $0,9 \times 10^3$ equivalentes de parasito. A análise por espécie revelou que as maiores cargas parasitárias observadas foram em *T. pseudomaculata* e *T. brasiliensis* ($9,1 \times 10^7$ e $1,9 \times 10^7$ equivalentes de parasito, respectivamente). A menor carga foi encontrada em *P. lutzi* ($1,2 \times 10^{-2}$ equivalentes de *T. cruzi*) (Figura 24, Tabela

9). A distribuição das cargas parasitárias entre os estados foi estatisticamente significativa (P -valor=0.0008) e entre as espécies não foi significativa (P -valor=0.9680).

Figura 24: Distribuição da carga parasitária por *T. cruzi* em triatomíneos coletados nos estados do Rio Grande do Sul e Ceará.

(A): Distribuição da carga parasitária por estado. (B): Distribuição da carga parasitária por espécie de triatomíneo. O valor da mediana está indicado pela linha horizontal.



5.4 Genotipagem de *T. cruzi* em triatomíneos naturalmente infectados

A tipagem molecular de *T. cruzi* em triatomíneos naturalmente infectados foi baseada em reações de PCR convencional multilocus, a partir de algoritmos adaptados de BURGOS et al. (2010), RAMIREZ et al. (2010) e DOS SANTOS-RODRIGUES (2015) (**Figura 13**).

A caracterização das linhagens de *T. cruzi* pôde ser realizada em 30% (9/30) e 28,6% (18/63) das amostras positivas para infecção coletadas nos estados do Rio Grande do Sul e Ceará, respectivamente (**Tabela 9**). Quanto às DTUs encontradas, a mais abundante no estado do Ceará foi TcI (8/18, 44,4%), além da ocorrência de TcV (3/18, 16,7%), TcII (1/18, 5,6%) e TcVI (1/18, 5,6%). Algumas coinfeções também foram observadas, sendo duas ocorrências de TcIII+V (2/18, 11,1%), além de uma infecção mista de TcI+II/V/VI (1/18, 5,6%), não sendo possível identificar ao certo qual a linhagem estava presente junto com TcI. E, em dois casos de infecção (TcIII/IV) em *T. pseudomaculata*, a DTU não foi totalmente definida (11,1%). A DTU TcI foi encontrada em espécies *T. brasiliensis* (N=3, fêmeas) coletadas no município de Alto Alegre; em *T. pseudomaculata* (N=4), sendo duas fêmeas e uma ninfa N5 (N=3) em Potengi, e um inseto macho em Santa Quitéria; além de *P. lutzi* (N=1, macho) de Farias Brito. A DTU TcII foi identificada em *T. brasiliensis* (N=1) de 5º estágio de Assaré; TcV em *T. brasiliensis* (N=3), correspondente a um espécime macho de Assaré e duas ninfas N5 de Alto Alegre; TcVI em um espécime de *T. brasiliensis* (macho) de Assaré. As duas coinfeções por TcIII+V foram encontradas em *P. lutzi* (macho), de Santa Quitéria; e a coinfeção TcI+II/V/VI foi observada em um único exemplar de *T. brasiliensis* (N5) de Alto Alegre. Com relação às DTUs encontradas no estado do Rio Grande do Sul, a mais predominante também foi a TcI (5/9, 55,5%), além da ocorrência de TcV em uma amostra (11,1%). Um caso de coinfeção por TcI+IV foi verificada (11,1%). E em 22,2% (2/9) das amostras não foi possível definir a DTU, sendo classificada como III/IV e II/V/VI. A DTU TcI foi encontrada na espécie *T. rubrovaria* (N=3, duas fêmeas e um macho) coletados no município de Lavras do Sul; em *T. infestans* (N=1, ninfa N5) de Santa Rosa; e em *Triatoma* sp. (N=1, ninfa N2) de Caçapava do Sul. TcV foi identificada em um exemplar de espécie NI (ninfa N2) de Canguçu; e coinfeção por TcI+IV em um inseto fêmea da espécie *T. circummaculata*, de São Jerônimo. Um exemplar de 5º estágio e outro exemplar macho de *T. infestans*, do município de Santa Rosa, não tiveram a confirmação da DTU, sendo essa

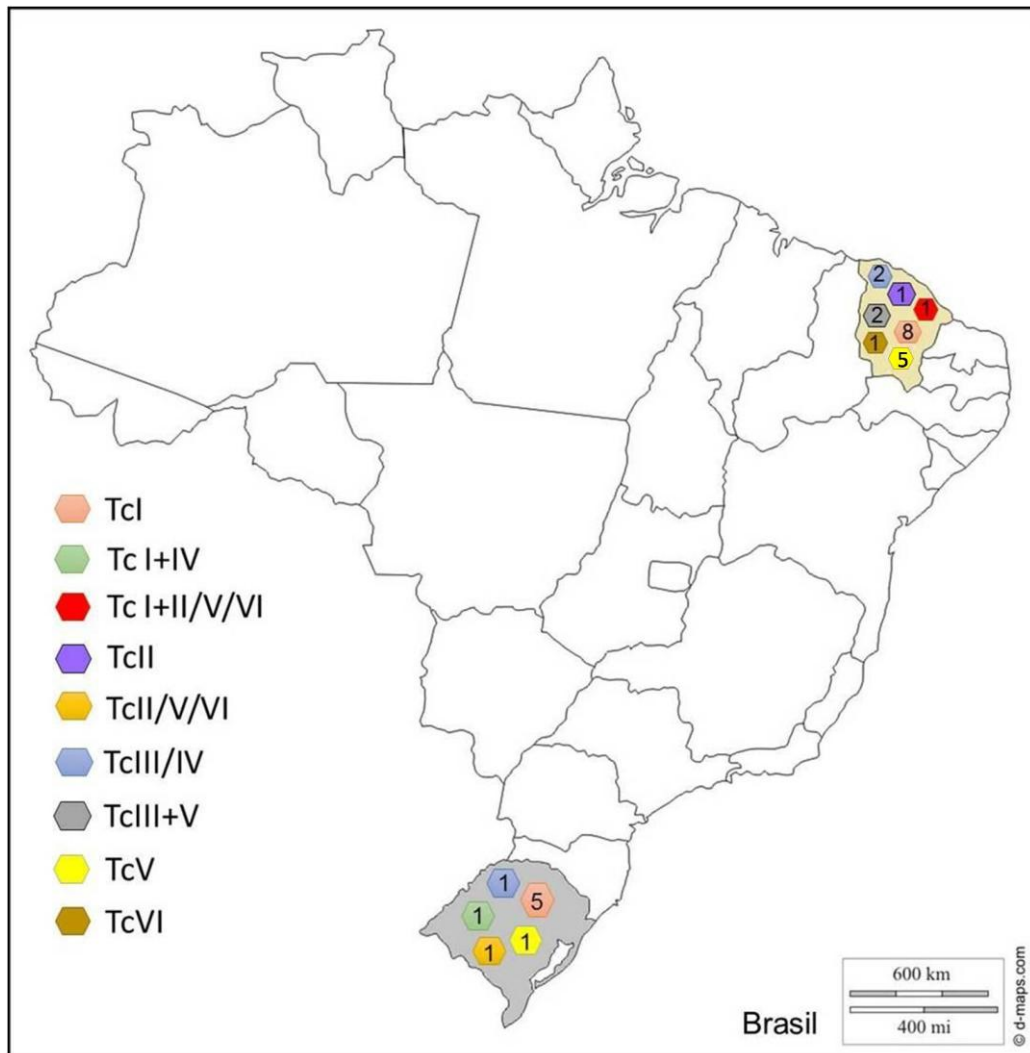
caracterizada como II/V/VI e III/IV, respectivamente. O mapa da **Figura 25** demonstra a distribuição das DTUs nos dois estados estudados.

Tabela 9: Distribuição dos municípios, espécies, estádios evolutivos e as DTUs correspondentes nos estados do Ceará e do Rio Grande do Sul.

Ceará				
Municípios	Espécies	Estádios evolutivos	DTUs	Carga parasitária (equivalentes de parasito)
Assaré	<i>Triatoma brasiliensis</i>	N5	II	$1,8 \times 10^7$
Assaré	<i>Triatoma brasiliensis</i>	Macho	VI	$1,9 \times 10^7$
Assaré	<i>Triatoma brasiliensis</i>	Macho	V	$4,3 \times 10^1$
Alto Alegre	<i>Triatoma brasiliensis</i>	N5	V	$1,9 \times 10^3$
Alto Alegre	<i>Triatoma brasiliensis</i>	N5	I+II/V/VI	$4,7 \times 10^3$
Alto Alegre	<i>Triatoma brasiliensis</i>	N5	V	$2,6 \times 10^2$
Alto Alegre	<i>Triatoma brasiliensis</i>	Femea	I	$9,0 \times 10^0$
Alto Alegre	<i>Triatoma brasiliensis</i>	Femea	I	$4,0 \times 10^{-1}$
Alto Alegre	<i>Triatoma brasiliensis</i>	Femea	I	$2,8 \times 10^2$
Farias Brito	<i>Triatoma pseudomaculata</i>	N5	III/IV	$2,8 \times 10^3$
Farias Brito	<i>Triatoma pseudomaculata</i>	N5	III/IV	$3,9 \times 10^4$
Farias Brito	<i>Panstrongylus lutzi</i>	Macho	I	$8,3 \times 10^1$
Potengi	<i>Triatoma pseudomaculata</i>	N5	I	$4,0 \times 10^3$
Potengi	<i>Triatoma pseudomaculata</i>	Femea	I	$9,1 \times 10^3$
Potengi	<i>Triatoma pseudomaculata</i>	Femea	I	$6,6 \times 10^0$
Santa Quitéria	<i>Panstrongylus lutzi</i>	Macho	III+V	$4,2 \times 10^4$
Santa Quitéria	<i>Triatoma pseudomaculata</i>	Macho	I	$1,1 \times 10^4$
Santa Quitéria	<i>Panstrongylus lutzi</i>	Macho	III+V	$6,4 \times 10^6$

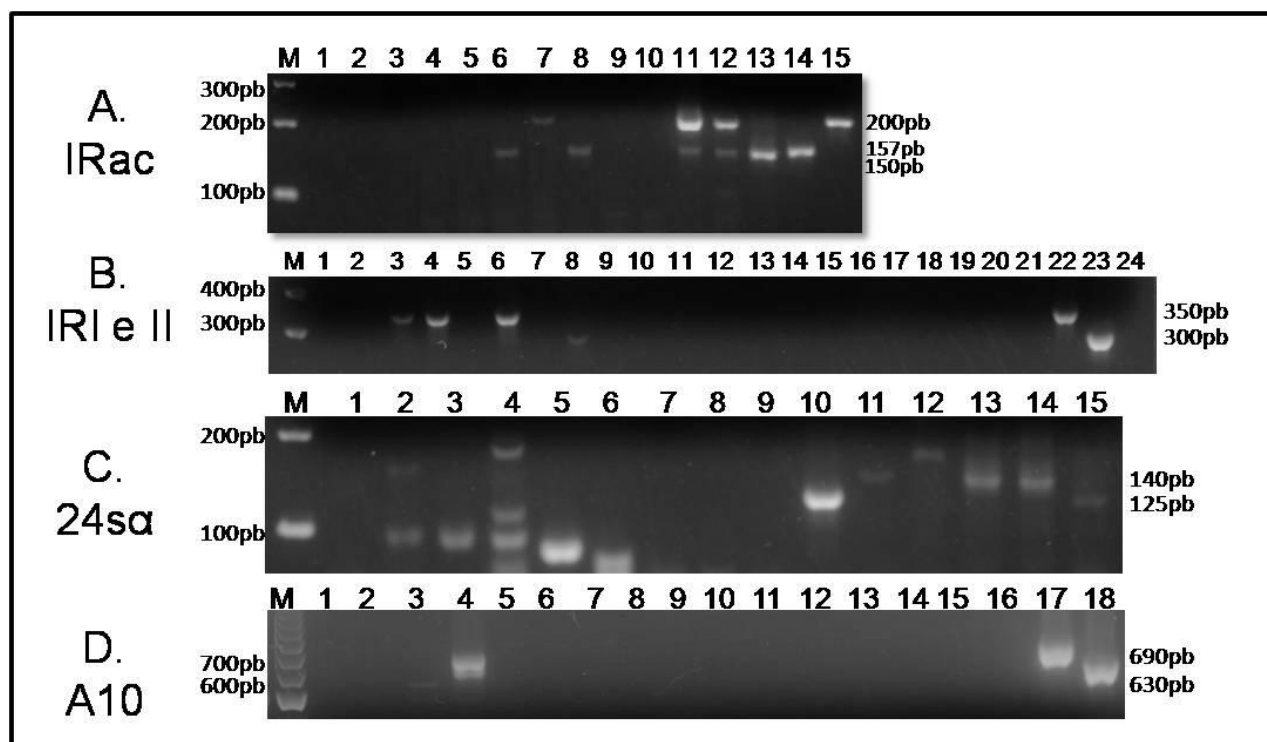
Rio Grande do Sul				
Municípios	Espécies	Estádios evolutivos	DTUs	Carga parasitária (equivalentes de parasito)
Canguçu	<i>Triatoma sp.</i>	N2	V	$1,5 \times 10^1$
Caçapava do Sul	<i>Triatoma sp.</i>	N2	I	$5,4 \times 10^1$
Lavras do Sul	<i>Triatoma rubrovaria</i>	Macho	I	$6,4 \times 10^2$
Lavras do Sul	<i>Triatoma rubrovaria</i>	Femea	I	$1,3 \times 10^5$
Lavras do Sul	<i>Triatoma rubrovaria</i>	Femea	I	$2,3 \times 10^7$
Santa Rosa	<i>Triatoma infestans</i>	N5	I	$2,1 \times 10^1$
Santa Rosa	<i>Triatoma infestans</i>	N5	II/V/VI	$5,8 \times 10^2$
Santa Rosa	<i>Triatoma infestans</i>	Macho	III/IV	X
São Jerônimo	<i>Triatoma circummaculata</i>	Femea	I+IV	$2,4 \times 10^2$

Figura 215: Distribuição das DTUs de *T. cruzi* em triatomíneos naturalmente infectados coletados nos estados do Ceará (em bege) e do Rio Grande do Sul (em cinza). O número de amostras em que determinada DTU foi encontrada em cada região está indicado dentro dos hexágonos.



As DTUs puderam ser distinguidas através da análise do perfil eletroforético dos fragmentos obtidos, visualizados em gel de agarose a 3% (**Figura 26**).

Figura 226: Gel representativo da tipagem molecular de *T. cruzi* em amostras de triatomíneos naturalmente infectados.



A. Região intergênica do *Spliced Leader* (SL-IRac). M: Marcador de peso molecular de 100 pb; 1: Controle negativo da PCR (tubo contendo todos os reagentes na ausência de DNA); 2: Controle negativo de triatomíneo (inseto não infectado mantido em laboratório - Laboratório de Bioquímica e Fisiologia de Insetos/IOC); 3-12: Amostras de triatomíneos; 13: Controle positivo Tc I (Cepa Dm28c, 150pb), 14: Controle positivo Tc II/V/VI (Cepa Y, 157pb); 15: Controle positivo Tc III/IV (Cepa 4167, 200pb). B. Região intergênica do *Spliced Leader* (SL-IRI e II). M: Marcador de peso molecular de 100 pb; 1: Controle negativo da PCR (tubo contendo todos os reagentes na ausência de DNA); 2: Controle negativo de triatomíneo (inseto não infectado mantido em laboratório - Laboratório de Bioquímica e Fisiologia de Insetos/IOC); 3-21: Amostras de triatomíneos; 22: Controle positivo Tc I (Cepa Dm28c, 350pb); 23: Controle positivo Tc II/V/VI (Cepa Y, 300pb); 24: Controle positivo Tc III/IV (Cepa 4167, não amplifica). C. Região do gene da subunidade 24S- α . M: Marcador de peso molecular de 100 pb, 1: Controle negativo da PCR (tubo contendo todos os reagentes na ausência de DNA); 2-12: Amostras de triatomíneos; 13: Controle positivo Tc II/VI (Cepa Y, 140pb); 14: Controle positivo Tc V (Cepa LL014, 125/140pb); 15: Controle positivo Tc III (Cepa 3663, 125pb). D. Região correspondente ao Fragmento nuclear A 10. M: marcador de peso molecular de 100 pb; 1: Controle negativo da PCR (tubo contendo todos os reagentes na ausência de DNA); 2: Controle negativo de triatomíneo (inseto não infectado mantido em laboratório - Laboratório de Bioquímica e Fisiologia de Insetos/IOC); 3-16: Amostras de triatomíneos; 17: Controle positivo Tc II (Cepa Y, 690/580pb); 18: Controle positivo Tc VI (Clone CL-Brener, 630/525pb).

5.4.1 Comparação entre genótipos de *T. cruzi* e carga parasitária no inseto vetor

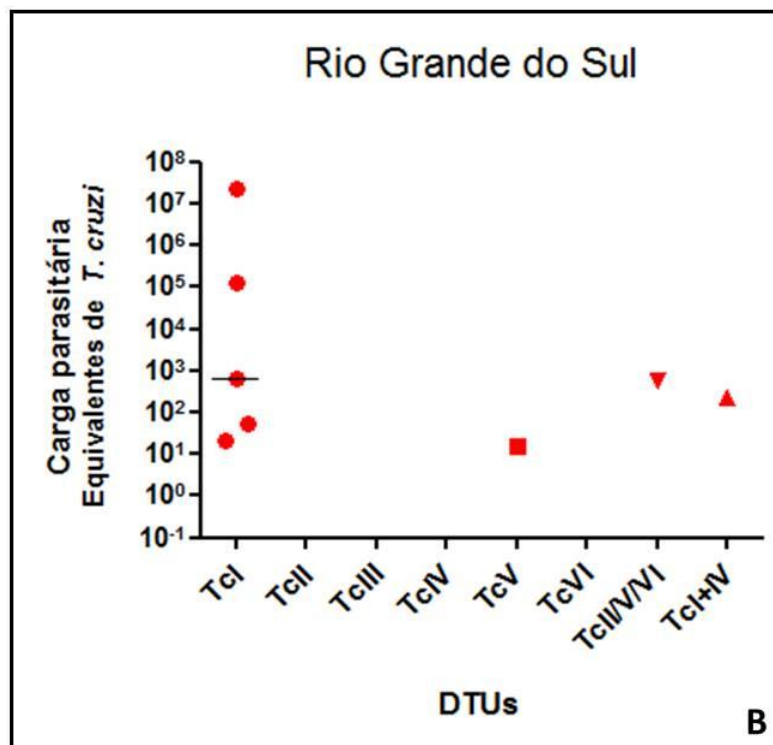
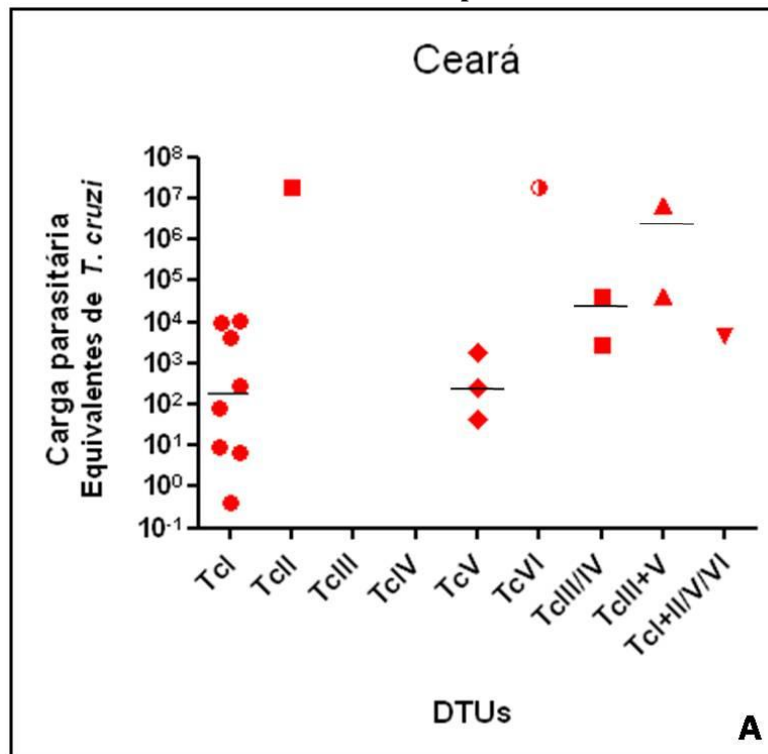
Com o objetivo de verificar uma possível correlação entre carga parasitária e linhagem genética de *T. cruzi*, foi feita a comparação entre o número estimado de parasitos presentes nos triatomíneos infectados do Ceará e Rio Grande do Sul, e as DTUs de *T. cruzi* (Tabela 9). A Figura 27a mostra o resultado obtido no Ceará, em que

triatomíneos da espécie *T. brasiliensis* (N=2), infectados com TcII e TcVI apresentaram cargas parasitárias mais altas ($1,8 \times 10^7$ e $1,9 \times 10^7$ equivalentes de parasito, respectivamente). As amostras que apresentaram infecção por TcI tiveram uma distribuição mais ampla dos valores de carga parasitária, variando entre 4×10^{-1} (*T. brasiliensis*) a $1,1 \times 10^4$ (*T. pseudomaculata*) equivalentes de parasito. Com relação à quantificação de parasitos nos triatomíneos que apresentaram infecções mistas, o valor estimado da mediana para os dois espécimes de *P. lutzii* infectados por TcIII+V foi de $6,4 \times 10^6$ equivalentes de parasito, em comparação ao único exemplar de *T. brasiliensis* coinfectado com TcI+II/V/VI, o qual apresentou $4,7 \times 10^3$ equivalentes de parasito. As duas amostras infectadas de *T. pseudomaculata*, que não tiveram a DTU identificada (sendo TcIII ou IV) continham $3,9 \times 10^4$ e $2,8 \times 10^3$ equivalentes de parasito.

As análises obtidas no Rio Grande do Sul estão representadas na **Figura 27b**, em que a maior e mais diversa carga parasitária foi encontrada em amostras infectadas por TcI, variando entre $2,1 \times 10^1$ (*T. infestans*) a $2,3 \times 10^7$ (*T. rubrovaria*) equivalentes de parasito. Uma ninfa N2 de *Triatoma* sp. continha $1,5 \times 10^1$ equivalentes de TcV. A coinfeção TcI+IV em *T. circummaculata* apresentou $2,4 \times 10^2$ equivalentes de *T. cruzi*. E em um espécime de *T. infestans* que não foi possível classificar a DTU ao certo, podendo ser TcII, V ou VI, a carga parasitária foi de $5,8 \times 10^2$ equivalentes de parasito. Infelizmente, não foi possível quantificar o parasito em uma amostra da espécie *T. infestans* infectado por TcIII ou TcIV, por insuficiência no volume de DNA eluído para posterior uso na qPCR.

As análises estatísticas não apresentaram diferenças significativas quanto à possível associação entre carga parasitária e DTUs de *T. cruzi* nos estados do Ceará e Rio Grande do Sul (P -valor=0,6255 e P -valor=0,4400, respectivamente).

Figura 237: Relação entre cargas parasitárias e DTUs. (A): Ceará. (B): Rio Grande do Sul. O valor da mediana está indicado pela linha horizontal.



6 DISCUSSÃO

Para a ocorrência de transmissão do *T. cruzi* para o homem, no domicílio através do vetor, é necessário que o triatomíneo invada (somente para o repasto sanguíneo) ou colonize a habitação humana vulnerável e que esteja infectado com o parasito. A colonização do vetor pode estar relacionada ao baixo efeito residual de inseticidas, somado às alterações nos biomas induzidas pela devastação do ecótopo natural por ação antrópica, além de atribuições intrínsecas do inseto vetor, como fatores genéticos e comportamentais (FERREIRA; SILVA, 2006). Ademais, atenção especial deve ser dada às espécies de triatomíneos autóctones de importância secundária, que podem invadir novamente e recolonizar domicílios submetidos a tratamento químico com inseticidas, não sendo possível sua eliminação definitiva (SILVEIRA, 2000). É importante ressaltar que a capacidade vetorial de cada espécie, para a transmissão do parasito ao homem, depende de uma série de fatores, tais como, alto grau de antropofilia, ingestão de volume sanguíneo expressivo e apresentar um curto período de repasto, elevada suscetibilidade ao parasito e dispor de ampla capacidade de metaciclogênese, além do tempo reduzido entre repasto e defecação (FORATTINI, 1980; SILVA et al., 1993; ARGOLO et al., 2008; DIAS et al., 2013).

Atualmente, os principais métodos para o controle da doença de Chagas são o controle do inseto vetor, a proteção de alimentos contra contaminação com fezes de triatomíneos e a triagem de sangue e órgãos para a presença de *T. cruzi* (HOLLINGSWORTH et al., 2015). As estratégias para interromper a transmissão do *T. cruzi* pela via vetorial incluem a aplicação de inseticidas residuais no interior das habitações, uso de mosquiteiros e melhoria das habitações (HOLLINGSWORTH et al., 2015). Inseticidas devem ser aplicados regularmente a fim de se evitar a re-infestação, porém isso tem levado ao desenvolvimento de resistência em algumas espécies de triatomíneos (HOLLINGSWORTH et al., 2015). Por outro lado, melhorias das habitações podem ser efetivas, embora dispendiosas (HOLLINGSWORTH et al., 2015). Quando o controle vetorial for falho, a interação parasito-vetor-hospedeiro-reservatório pode ser mantida (COUTINHO et al., 2014) e, assim, a enfermidade permanece sendo um problema de saúde pública no Brasil, mesmo com a Certificação Internacional de Eliminação da Transmissão de *T. cruzi* pelo *T. infestans*.

Nesse contexto, para efetivos programas de controle, torna-se importante a busca de métodos mais acurados para avaliar taxas de infecção natural por *T. cruzi* em triatomíneos, e que possibilitem, concomitantemente, estimar a carga parasitária nos vetores, além da identificação da linhagem do parasito, contribuindo assim para a identificação de possíveis riscos de transmissão vetorial da doença de Chagas em regiões onde há presença de insetos vetores nos ambientes doméstico e peridoméstico. Contudo, a maior parte da análise acerca do índice de infecção por *T. cruzi* é realizada com base na pesquisa microscópica de encontro do parasito nas fezes, o que pode refletir na subnotificação das taxas de infecção vetorial, devido a menor sensibilidade do método parasitológico clássico.

6.1 Comparação entre PCRc *multiplex* e exame parasitológico por microscopia óptica:

Onze exemplares de triatomíneos (4 espécimes do Ceará e 7 do Rio Grande do Sul) não amplificaram o gene constitutivo do triatomíneo na PCR convencional *multiplex*. Essa inibição pode ter ocorrido devido a co-purificação de vários inibidores potenciais (SCHRADER et al., 2012), tais como polissacarídeos (os que são produzidos pela microbiota do inseto, por exemplo (MADDRELL, 1964), hemoglobina (lançado pela hemólise no intestino médio anterior), hemozoína (agregado de heme, a qual é produzida no intestino médio posterior (OLIVEIRA et al., 1999) e, eventualmente, ácido úrico (um produto final do metabolismo da purina que é altamente abundante no intestino posterior).

Entretanto, no presente estudo, pôde-se observar a maior sensibilidade da PCR convencional *multiplex* quando comparada à análise microscópica para a detecção de *T. cruzi* em triatomíneos (**Tabela 8**). Dos 401 triatomíneos coletados no Rio Grande do Sul, o DNA de *T. cruzi* foi detectado em 30 amostras (7,5%); no Ceará, dos 395 insetos coletados, 63 (15,9%) foram positivos pela PCR. Este resultado é contrastante quando comparado ao exame microscópico, em que o parasito foi encontrado somente em dois exemplares do Rio Grande do Sul, não sendo identificado em nenhum exemplar coletado no Ceará. Estes resultados demonstram as diversas limitações do exame parasitológico clássico para a análise de insetos de campo, como baixa sensibilidade em amostras com números reduzidos de parasitos, somada à perda de especificidade devido às infecções com outros tripanosomatídeos, baixa reprodutibilidade, dificuldade no processamento de ninfas muito pequenas, necessidade da análise em insetos frescos,

além da microscopia ser um procedimento laborioso e subjetivo, variando de observador para observador. Parte dos exemplares coletados (222/796, 27,9%) eram ninfas muito pequenas, além da alta frequência de espécimes mortos ou ressecados que foram submetidos ao exame a fresco, dificultando a análise. Outros estudos corroboram estes dados de comparação de sensibilidade entre os métodos.

Em 1995, Breniere et al. testaram a aplicabilidade da PCR para o alvo kDNA de *T. cruzi*, em quatro espécies de triatomíneos autóctones da Bolívia. Os autores observaram concordância de 85,3% na positividade entre a PCR e microscopia, para as análises em *T. infestans*. Porém, nas espécies *Rhodnius pictipes*, *Eratyrus mucronatus* e *T. sordida*, cujos conteúdos intestinais foram todos negativos ao exame microscópico, foram obtidos 52,8%, 19,1% e 12,5% de resultados positivos, respectivamente, pela PCR (BRENIERE et al., 1995).

No ano seguinte, outro estudo utilizou a técnica molecular para detectar a presença de DNA do protozoário em fezes secas de *T. infestans* coletadas em papel filtro, em insetos infectados artificialmente pela alimentação em macacos na fase crônica da doença (parasitemia baixa) e em triatomíneos coletados em áreas endêmicas do Paraguai (RUSSOMANDO et al., 1996). Os resultados sugeriram que a avaliação por PCR pode reduzir o tempo necessário para o exame de insetos utilizados em xenodiagnóstico. Ademais, os autores relatam uma positividade de 84% pela PCR e 26% pela microscopia óptica em triatomíneos de campo. Isso pode ser explicado devido à falta de mobilidade dos protozoários flagelados nas fezes secas depositadas em papel filtro, que também pode ocorrer quando o inseto se encontra morto, sendo este um viés do método clássico de microscopia (RUSSOMANDO et al., 1996).

Dorn et al. (1999) compararam as sensibilidades da PCR e microscopia óptica em diversos compartimentos do tubo digestivo dos dois principais vetores da Guatemala, *T. dimidiata* e *R. prolixus*. Para amostras do intestino posterior de *T. dimidiata*, a positividade por PCR foi de 39.1% e por microscopia foi de 24.6%, não sendo observadas diferenças significativas. Entretanto, em *R. prolixus* a PCR demonstrou ter maior sensibilidade (57.6% amostras positivas) comparada à 22.7% de positividade por exame a fresco. Os autores enfatizam ainda a necessidade de se analisar o conteúdo de diferentes sítios anatômicos do tubo digestivo do inseto, intestino

anterior, médio e posterior (reto), como forma de aumentar a sensibilidade dos ensaios diagnósticos (DORN et al., 1999).

Em 2006, Marcet et al. compararam a técnica de PCR e o exame microscópico, em lisados fecais obtidos de *T. infestans* coletados em área rural da Argentina. Os ensaios de PCR detectaram o kDNA do parasito em 91% das amostras positivas e em 7,5% das amostras negativas ao exame microscópico direto. Porém, a PCR não foi capaz de detectar a presença do parasito em duas amostras positivas obtidas de *T. guasayana* e em duas amostras também positivas de *T. garciabesi*. No entanto, a partir da abordagem molecular com o uso de outro alvo, o gene *24Sa* do *DNA ribosomal*, foi revelado que estas amostras PCR-negativas e microscopia-positivas estavam infectadas com outros tripanosomatídeos. Assim, os autores advertem para o cuidado que se deve ter ao realizar um diagnóstico de infecção pelo *T. cruzi* com base apenas na microscopia óptica de fezes frescas não coradas, a fim de se evitar resultados falso-positivos (MARCET et al., 2006).

Um estudo realizado por PINHO (2012) demonstrou diferenças de sensibilidade entre as técnicas de microscopia óptica e PCR, para diagnóstico da infecção por *T. cruzi* no conteúdo intestinal de triatomíneos capturados em dois municípios do estado do Ceará. Observou-se uma sensibilidade de 100% para a PCR e de apenas 28,6% para a microscopia óptica. VILLACIS et al. (2015), avaliaram taxa de infecção natural em *Panstrongylus howardi* coletados em dez municípios do Equador. A presença de *T. cruzi* foi confirmada em 29,8% e 61,7% dos insetos analisados por microscopia e por PCR, respectivamente.

A partir deste conjunto de dados que validam a elevada sensibilidade do ensaio molecular, podemos sugerir a aplicação da PCR em inquéritos epidemiológicos de campo para estimativa de taxas de infecção natural por *T. cruzi* em distintas espécies de vetores coletadas em diferentes ecótopos.

6.2 Infecção natural por *T. cruzi* e DTUs identificadas nos triatomíneos provenientes do Ceará – Bioma Caatinga:

No presente trabalho foi observada uma maior taxa de infecção natural por *T. cruzi* em triatomíneos presentes no Ceará (15,9%), em comparação com Rio Grande do Sul (7,5%). A Caatinga representa uma vegetação característica da região semiárida do

Nordeste brasileiro como, por exemplo, o Ceará. Este bioma ocupa a terceira posição em diversidade de triatomíneos (GURGEL GONÇALVES et al 2012). A agricultura de subsistência é a principal atividade dos habitantes, além de pecuária, principalmente cabras e galinhas, que vivem livres no ambiente peridoméstico (SARQUIS et al., 2012), atraindo insetos vetores hematófagos ao redor das habitações humanas. No Ceará, encontramos o maior percentual de positividade da PCR em função da espécie de triatomíneo, sendo de 85,7% para a espécie *P. lutzi*, seguido de *T. brasiliensis* (18,4%) e *T. pseudomaculata* (12,2%) (**Figura 18**). Em relação à *P. lutzi*, a elevada positividade encontrada pode estar superestimada, pelo fato de ter sido coletado um reduzido número de exemplares desta espécie e a grande maioria estar infectada. Para as outras duas espécies coletadas no Ceará, ressalta-se que compõem o grupo das cinco espécies de maior importância epidemiológica no Brasil, por ordem de relevância: *T. infestans*, *P. megistus*, *T. brasiliensis*, *T. sordida* e *T. pseudomaculata* (GALVÃO, 2015).

T. brasiliensis Neiva, 1911 é a espécie autóctone de maior importância no Nordeste brasileiro, encontrada principalmente em regiões semiáridas (SILVEIRA; VINHAES, 1999; DIAS, 2000), possuindo ampla distribuição em onze estados brasileiros (Alagoas, Bahia, Ceará, Goiás, Maranhão, Paraíba, Pernambuco, Piauí, Sergipe, Tocantins e Rio Grande do Norte) (GALVÃO, 2015). É considerada a espécie de triatomíneo mais adaptada a temperaturas mais elevadas e a climas mais secos (FORATTINI, 1980). O complexo *T. brasiliensis* é considerado um grupo monofilético, compreendendo quatro espécies (*T. brasiliensis* Neiva, 1911; *T. juazeirensis* Costa & Felix, 2007; *T. melanica* Neiva & Lent, 1941; *T. sherlocki* Papa et al., 2002) e duas subespécies (*T. brasiliensis brasiliensis* Neiva, 1911; *T. brasiliensis macromelasoma* Galvão, 1956), que podem ser identificadas por características morfológicas externas e pela chave taxonômica (DE SOUZA et al., 2015). A subespécie *T. b. brasiliensis*, encontrada também no Ceará, tem sido considerada como a principal preocupação para a transmissão do *T. cruzi*, por possuir ampla distribuição geográfica e hábitos sinantrópicos, com alto índice de domiciliação e de infecção natural por *T. cruzi*, em comparação com outras espécies vetoras, além da sua capacidade em ocupar uma enorme variedade de ecótopos, sendo encontrada nos ambientes domiciliar e peridomiciliar (COSTA et al., 1998; 2003). Estes fatores alertam para a necessidade de manutenção da vigilância entomológica e medidas contínuas de controle contra o vetor. No ambiente silvestre a espécie pode ser encontrada principalmente sob rochas, associada a roedores (*Kerodon rupestris*) (COSTA et al, 1998; GALVÃO, 2015).

Diversos estudos apontam para a variação entre as taxas de infecção por *T. cruzi* em *T. brasiliensis* no estado do Ceará, como mostrado em seguida. Por meio da microscopia óptica das fezes, um estudo realizado em domicílio e peridomicílio por Costa et al., em 2003, verificou que menos de 1% dos insetos da espécie *T. brasiliensis* estava infectado por *T. cruzi*. Em contraste, exemplares coletados no Rio Grande do Norte apresentaram taxa de 4,5%, em Alagoas 4,3%, na Bahia e em Pernambuco o percentual de infecção foi de 2,7% (COSTA et al., 2003). Em outro estudo, as fezes de triatomíneos da espécie *T. brasiliensis* foram visualizadas ao microscópio óptico, e em 10,7% e 15,7% dos insetos coletados no intradomicílio e peridomicílio (município de Jaguaruana), respectivamente, foi possível detectar a presença do protozoário flagelado (SARQUIS et al., 2004). No município de Tauá, SARQUIS et al. (2010) realizaram a investigação de infecção natural em espécimes de *T. brasiliensis* em ambiente silvestre, em variados períodos de coleta. A taxa de infecção foi de 5,3% em abril, de 10,9% em julho, de 0% em setembro, e de 3% em dezembro. Em outro estudo do mesmo grupo, também usando o método clássico de microscopia, foi observada uma taxa de infecção de 2,8% em amostras de *T. brasiliensis* capturados em galinheiros, chiqueiros, currais, amontoados de telhas e madeiras, na localidade Nova Morada (SARQUIS et al., 2012). BEZERRA et al. (2014) conduziram um estudo no município de Tauá, utilizando o exame parasitológico das fezes dos vetores em busca do parasito. Observaram que o ambiente peridomiciliar foi o local no qual os insetos (*T. brasiliensis*) tiveram a maior taxa de infecção natural (14%), embora os ecótopos mais infestados fossem galinheiros. Os espécimes coletados no ambiente silvestre tiveram uma taxa de 1,2%. COUTINHO et al. (2014), por exame a fresco das fezes de triatomíneos coletados no município de Russas, verificaram uma alta taxa de positividade em *T. brasiliensis* (27,3%). Com o ensaio de PCR para detectar a presença de kDNA do protozoário em triatomíneos coletados no peridomicílio, no município de Jaguaruana, foi possível observar que 17,9% de *T. brasiliensis* estavam naturalmente infectados (PINHO, 2012). Esses dados são congruentes com os resultados obtidos no presente trabalho, em que *T. brasiliensis* apresentou uma positividade de 18,4%, todos também coletados no peridomicílio. A partir da detecção de *T. cruzi* por amplificação do DNA de mini-exon em triatomíneos coletados no peridomicílio (município Russas), em 2015, foi verificado que 90% dos insetos da espécie *T. brasiliensis* capturados (N=20) estavam infectados com o protozoário (GUMIEL et al., 2015). A maior taxa de infecção natural presente em *T. brasiliensis* pela PCR, comparada com a maioria dos estudos que empregaram a

metodologia clássica de microscopia, pode ser explicada pela sensibilidade mais elevada da técnica molecular.

A espécie *T. pseudomaculata* Correa & Espínola 1964, é tipicamente encontrada na região Nordeste do Brasil, distribuída geograficamente pelos estados de Alagoas, Bahia, Ceará, Distrito Federal, Goiás, Maranhão, Minas Gerais, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Paraíba, Pernambuco, Piauí, Rio Grande do Norte, Sergipe e Tocantins (GALVÃO, 2015). *T. pseudomaculata* ocorre em simpatria com *T. brasiliensis*, compartilham diferentes ecótopos da mesma região, com grande capacidade de adaptação aos ambientes artificiais (DIAS, 1995; ASSIS et al., 2007). Ambas as espécies são consideradas os principais vetores em zonas semiáridas do Nordeste, devido às suas características ecológicas, sua distribuição generalizada e quanto aos níveis de infecção natural (SILVEIRA; VINHAES, 1999), apresentando um importante papel epidemiológico (OLIVEIRA-LIMA et al., 2000; FREITAS et al., 2004; CARBAJAL-DE-LA FUENTE et al., 2007). Essas espécies podem ser coletadas no peridomicílio e em ecótopos naturais de vegetação xerófila, já sendo observadas colônias em domicílio no estado do Ceará (FREITAS et al., 2005). Porém, *T. pseudomaculata* ocorre em menor número no domicílio quando comparado a *T. brasiliensis*, espécie já domiciliada no Nordeste brasileiro. O *T. pseudomaculata* é facilmente encontrado no peridomicílio, principalmente em galinheiros (ASSIS et al., 2007) e sob casca de árvores e em ninhos de aves (CARCAVALLO et al., 1988). Neste caso, quando existe uma associação alimentar com animais refratários ao parasito, esta espécie de vetor não apresentará infecção (DIAS, 2000). *T. pseudomaculata* é considerada espécie secundária, pois ainda não foi registrada infecção natural por *T. cruzi* em habitações humanas, além de apresentar baixas taxas de diferenciação para as formas tripomastigotas metacíclicas, infectantes para vertebrados, fato este que se reflete em sua capacidade vetorial (FORATTINI et al., 1981; PERLOWAGORA-SZUMLEWCZ; MOREIRA, 1994, GONÇALVES et al., 1997). Porém, está entre as cinco espécies de maior importância na transmissão do parasito (GALVÃO, 2015) e, progressivamente, vem se instalando nos ecótopos artificiais e aumentando a sua taxa de colonização no peridomicílio, tornando-se assim uma espécie em transição (FREITAS et al. 2004).

Alguns estudos de identificação de infecção natural por *T. cruzi* em *T. pseudomaculata* foram realizados no estado do Ceará, como descritos a seguir.

SARQUIS et al. (2004) observaram uma taxa de positividade de 18,3%, por meio da microscopia óptica, somente em insetos coletados no peridomicílio no distrito de Jaguaruana. Nos municípios de Assaré e Salitre foi observada a presença do protozoário através do exame a fresco em 1,6% dos espécimes de *T. pseudomaculata* coletados no peridomicílio (FREITAS et al., 2005). Pinho (2012), em pesquisa realizada no município de Jaguaruana, observou que triatomíneos coletados no peridomicílio da espécie *T. pseudomaculata* apresentavam 87,5% de positividade para *T. cruzi* a partir da detecção de kDNA por PCR (PINHO, 2012). Uma alta taxa de infecção natural (39,5%) em amostras de *T. pseudomaculata* coletadas no peridomicílio, no município de Russas, foi observada por COUTINHO et al. (2014). Em 2015, a partir da detecção de *T. cruzi* por amplificação do DNA de mini-exon em triatomíneos coletados no peridomicílio (município Russas), foi verificado que 80% dos insetos da espécie *T. pseudomaculata* estavam infectados com o protozoário. Essa elevada taxa pode ser explicada pelo pequeno número de exemplares capturados (N=12) (GUMIEL et al., 2015). No nosso estudo, empregando a PCR para o alvo kDNA, observamos que dos 230 espécimes coletados no peridomicílio de distintos municípios do Ceará, 29 foram positivos para *T. cruzi* (12,6%).

P. lutzii Neiva & Pinto, 1923 é uma das espécies nativas do Nordeste brasileiro. Sua distribuição geográfica coincide com a distribuição do bioma Caatinga, compreendendo os estados: Alagoas, Bahia, Ceará, Minas Gerais, Paraíba, Pernambuco, Piauí, Rio Grande do Norte e Sergipe (GALVÃO, 2015). Apesar de serem encontrados em tocas de tatus (*E. sexcinctus* e *D. novemcinctus*) e rochas habitadas por mocós (*Kerodon rupestris*), possui uma dieta alimentar muito eclética no ambiente domiciliar e apresenta níveis elevados de infecção natural (CARANHA et al., 2006). Especialmente no Ceará e em Pernambuco, tem se observado cada vez mais a presença de adultos no intradomicílio (GALVÃO, 2015). Freitas et al. (2004) foram os primeiros a registrarem a ocupação de *P. lutzii* no peridomicílio nos municípios de: Altaneira, com presença de um adulto em galinheiro; Salitre, onde havia um adulto voando; e em Várzea Alegre, onde encontraram 18 ninfas (13 foram coletadas em amontoado de tijolos e cinco em amontoado de telhas), sendo observada a colonização no peridomicílio. Os autores relatam que a presença de indivíduos adultos no peridomicílio pode sugerir uma resposta à destruição do habitat natural e escassez de fonte alimentar, acarretando na dispersão dos vetores à procura de outros vertebrados. Da mesma forma, o encontro de ninfas demonstra a adaptação do inseto neste ecótopo. Ressaltam, também, que a

presença destes insetos no ecótopo artificial se deve à proximidade das casas ao ambiente silvestre, na região do Cariri, favorecendo a atração dos triatomíneos devido à diversidade de hospedeiros ao redor das habitações humanas (FREITAS et al., 2004).

Estudos acerca da positividade de *P. lutzi* por *T. cruzi* no estado do Ceará já foram publicados utilizando o exame parasitológico clássico. Entre 1989 e 2001 a taxa de infecção natural por *T. cruzi* em *P. lutzi* variou entre 1,8% a 5,3%, sendo o percentual de positividade no último ano de 1,8%, correspondente a seis adultos e uma ninfa (quatro espécimes infectados dentro do domicílio e três no peridomicílio) (GARCIA et al., 2005). No estudo realizado no município de Jaguaruana por Sarquis et al. (2004), não foi observada a presença de *T. cruzi* no único exemplar de *P. lutzi* analisado. Em 2006, Caranha et al. analisaram o conteúdo estomacal por microscopia óptica de insetos coletados no intradomicílio, de vinte municípios do Ceará, e observaram uma alta taxa de positividade de 29,1% (CARANHA et al., 2006). Estudos realizados por Freitas et al. (2004) e Bezerra (2013) não foi observada a presença do protozoário flagelado por microscopia óptica em exemplares coletados no peridomicílio dos municípios de Tauá e Jaguaruana, respectivamente. No presente estudo, o maior percentual de positividade da PCR em função da espécie de triatomíneo, foi em indivíduos da espécie *P. lutzi* (6/7; 85,7%), todos coletados no peridomicílio. Como citado anteriormente, a elevada positividade encontrada pode ter sido superestimada, devido à coleta de um reduzido número de exemplares desta espécie e a grande maioria estar infectada.

Quanto às linhagens genéticas ou DTUs de *T. cruzi*, TcI é o genótipo mais amplamente distribuído no Brasil. Em 2008, Araújo et al. avaliaram as densidades de *T. cruzi* I (isolado de *Didelphis aurita* proveniente da Mata Atlântica), nas três porções do intestino de ninfas de *T. brasiliensis*. Após infecção experimental, observaram que a densidade do isolado TcI foi significativamente maior no reto do que no intestino médio, além de altas taxas de metaciclo-gênese no intestino posterior e competência do isolado TcI em completar seu ciclo de vida neste inseto vetor. Os resultados também mostraram que *T. cruzi* foi capaz de se multiplicar e se diferenciar em *T. brasiliensis* de regiões geográficas diferentes, demonstrando a complexidade da interação parasito-vetor (ARAÚJO et al., 2008). Também em 2008, a subpopulação TcI foi observada em *T. pseudomaculata* presentes em ambientes peridomiciliares e silvestres, no município de Jaguaruana. Os autores relatam a importância da circulação de TcI nesta espécie, em

diferentes ambientes, e o possível risco de transmissão doméstica do parasito (BRITO et al., 2008). Anteriormente, TcI também havia sido isolado de *T. brasiliensis* capturados nos ecótopos intradomiciliar e peridomiciliar, em Jaguaruana (PACHECO et al., 2005). No mesmo município, Lima et al. 2012, através de PCR convencional *multiplex* para o gene de mini-exon, identificaram a linhagem TcI em *T. pseudomaculata* provenientes de peridomicílio. Ademais, encontraram os genótipos TcI em *Rattus rattus* e em *D. albiventris*, e TcII em *D. albiventris* (LIMA et al., 2012).

No presente estudo, a DTU mais abundante no estado do Ceará foi TcI (8/18, 44,4%), além da ocorrência de TcV (3/18, 16,7%), TcII (1/18, 5,6%) e TcVI (1/18, 5,6%) (**Tabela 9** e **Figura 26**). Foi possível identificar TcI em *T. brasiliensis* (N=3) coletados no município de Alto Alegre, em *T. pseudomaculata* (N=4), de Potengi, além de *P. lutzi* (N=1) de Farias Brito. Segundo Zingales et al. (2012), no estado do Ceará, TcI é uma subpopulação que participa do ciclo de transmissão doméstico (ZINGALES et al., 2012). O que está de acordo com os resultados obtidos, pois os insetos foram capturados no ambiente peridomiciliar, indicando que estão se alimentando de hospedeiros infectados presentes ao redor das habitações humanas ou, até mesmo, dentro das mesmas, levando em consideração o grau de domiciliação e antropofilia de *T. brasiliensis*.

Em estudo realizado por Jansen et al. (2015) foram observados no Ceará, em reservatórios silvestres, os genótipos TcI (*Rattus rattus* – N=3) e TcIII (*D. novemcinctus* – N=1). No mesmo ano, Gumiel et al. classificaram as DTUs de *T. cruzi* presentes em espécies de triatomíneos no município de Russas. Dos indivíduos *T. pseudomaculata*, 60% continham TcII e 20% apresentaram infecção mista TcI+TcII. Entretanto, em *T. brasiliensis* 10% dos insetos adultos apresentaram infecção por TcI e 10% por TcII, e 70% apresentaram infecção mista com TcI+TcII. Em contraste, a infecção em ninfas ocorreu, majoritariamente, por TcI (70%), sendo observada coinfeção por TcI e TcII em 20% dos casos. O grupo relata que a elevada percentagem de infecção por *T. cruzi* observada em *T. brasiliensis* e *T. pseudomaculata* deve ser cuidadosamente considerada pelas autoridades de saúde, por estes triatomíneos serem encontrados nos ecótopos peridomiciliares (GUMIEL et al., 2015).

No presente trabalho também foi identificada a DTU TcII em apenas um exemplar de *T. brasiliensis*, coletado no município de Assaré; e coinfeção com TcI e II, V ou VI também em um único exemplar desta espécie, de Alto Alegre.

Curiosamente, também foram encontrados em *T. brasiliensis*, os genótipos TcV (em Assaré e Alto Alegre) e TcVI (em Assaré). Para a espécie *P. lutzi*, coletada em Santa Quitéria, foram identificadas duas infecções mistas por TcIII+V. De acordo com Zingales et al. 2012, o genótipo TcV não é esperado no Brasil, e a distribuição geográfica de TcVI limita-se a região Sul, Sudeste e Centro-oeste do país; sendo as duas DTUs presentes no ciclo doméstico (ZINGALES et al., 2012). No entanto, já foi observada a presença de TcV em hospedeiros vertebrados no Cerrado e na Caatinga (ARAUJO et al., 2011), e os dados obtidos no nosso estudo podem indicar a dispersão desta DTU para o Nordeste do Brasil.

6.3 Infecção natural por *T. cruzi* e DTUs identificadas nos triatomíneos provenientes do Rio Grande do Sul – Bioma Pampa:

O Rio Grande do Sul, representado por planícies subtropicais do Pampa, abriga uma grande fauna triatomínica, representada por 12 espécies, a saber: *P. megistus* Burmeister, 1835; *P. tupynambai* Lent, 1942; *T. delpontei* Romañae Abalos, 1947; *T. infestans*; *T. sordida* Stål, 1859; *T. platensis* Neiva, 1913 e as espécies pertencentes ao subcomplexo *T. rubrovaria* (GALVÃO, 2015). O subcomplexo *T. rubrovaria* é composto por *T. carcavalloii* Jurberg, Rocha e Lent, 1998; *T. circummaculata* Stål, 1859; *T. klugi* Carcavallo, Jurberg, Lent e Galvão, 2001; *T. oliveirai* Neiva, Pinto e Lent, 1939; *T. rubrovaria* Blanchard, 1843 (SCHOFIELD; GALVÃO, 2009); e, o mais recentemente descrito, *T. pintodiasi* Jurberg, Cunha e Rocha, 2013, sendo considerada uma espécie críptica com relação a *T. circummaculata* (JURBERG et al., 2013). Os triatomíneos rupestres, no território gaúcho, podem ser classificados como espécies introduzidas de hábitos sinantrópicos (*T. infestans* e *T. sordida*) e espécies autóctones de hábitos silvestres (demais espécies) (BARRETTO, 1976; BEDIN et al., 2009). A espécie *T. rubrovaria* é a mais importante epidemiologicamente devido a sua ampla distribuição geográfica e capacidade de transmissão de *T. cruzi*, seguida de *T. circummaculata* e *T. carcavalloii* (CARDOZO-DE-ALMEIDA et al., 2014). São espécies simpátricas, presentes em ambientes silvestres rochosos (consideradas espécies rupestres) e exibem hábito alimentar eclético (ALMEIDA et al., 2002; CARDOZO-DE-ALMEIDA, 2007). Interessantemente, *T. circummaculata* realiza a hemolinfagia sobre baratas silvestres (Blastódeos) para seguir o seu desenvolvimento até adultos (RUASNETO; CORSEUIL, 2002). Por outro lado, é comum a associação de *T. rubrovaria* com diversos lagartos e lagartixas em cercas e pedregais do Rio Grande do Sul

(SCHOFIELD et al., 1994), além de poder desenvolver-se na fase ninfal a partir da hemolinfa sobre baratas do gênero *Blattella* (RUAS-NETO; CORSEUIL, 2002). Esta espécie tem sido encontrada frequentemente em áreas domiciliares e peridomiciliares (ALMEIDA et al., 2002; COSTA et al., 2009), o que comprova as características de adaptação do inseto aos ambientes antrópicos. No ambiente peridomiciliar pode ser capturada em cercas, muros ou paredes construídas com pedras sobrepostas e, ocasionalmente, no interior de habitações próximas aos criadouros (SHERLOCK, 1979). Em 2002, Ruas-Neto & Corseuil observaram que a espécie *T. rubrovaria* estava presente em todas as regiões com rochas graníticas ou areníticas do Rio Grande do Sul (RUAS-NETO; CORSEUIL, 2002). Pressupõe-se que devido aos micro-habitats e às fontes alimentares que ali vivem (anfíbios, répteis e artrópodes), as espécies de hábitos rupestres possuem maior proteção contra as intempéries e um ciclo biológico mais equilibrado (JUBERG et al., 2013). Bedin et al. (2009) relataram que, no Rio Grande do Sul, a espécie *T. carcavalloii* tem sido observada nos municípios de Canguçu, Dom Feliciano, Pinheiro Machado e São Jerônimo, sendo encontrada no domicílio (BEDIN et al., 2009). Em 2002, no entanto, em Encruzilhada do Sul, Almeida et al. capturaram 50 exemplares de *T. carcavalloii* (ALMEIDA et al., 2002). Já no presente estudo, esta espécie foi capturada nos municípios de Cachoeira do Sul e Caçapava do Sul, regiões nas quais não havia indícios de distribuição de *T. carcavalloii*, além dos locais em que o encontro já era esperado, como Canguçu e São Jerônimo.

Em nosso estudo, não foi possível identificar taxonomicamente mais da metade das espécies coletadas no Rio Grande do Sul, uma vez que a maior parte dos insetos capturados eram ninfas. Estas espécies não identificadas estão inseridas no Subcomplexo *T. rubrovaria*, representado por espécies crípticas que apresentam coloração e características morfológicas semelhantes, além de serem simpátricas, dificultando a identificação dos exemplares. Tentamos realizar a identificação taxonômica por técnica molecular (*Barcoding*), antes da escrita da dissertação, com a parceria do Dr. Márcio Pavan (Laboratório de Epidemiologia e Sistemática Molecular - IOC), padronizando as condições de reação e sequenciando as amostras. Porém, o sequenciamento não foi satisfatório e pelo curto prazo de tempo para a defesa, não conseguimos os resultados a tempo. Contudo, estamos repetindo os experimentos, paralelamente à preparação da dissertação, e uma de nossas perspectivas é a de terminar o DNA *Barcoding* dos insetos vetores não identificados por taxonomia clássica.

No presente trabalho foi encontrada uma taxa de infecção natural por *T. cruzi* de 7,5% em triatomíneos coletados no Rio Grande do Sul. A razão entre o número de exemplares naturalmente infectados pelo protozoário e o número de espécimes coletadas de uma determinada espécie foi superior entre aqueles pertencentes à espécie *T. rubrovaria* (4/8; 50%), seguido de *T. circummaculata* (3/9; 33,3%), *T. infestans* (10/123; 8,1%) e *T. carcavalloii* (2/33; 6,1%) (**Figura 19**). Porém, esses dados devem ser interpretados com cautela, já que não foi possível identificar mais da metade das espécies (N=228) coletadas no Rio Grande do Sul. Outros estudos apontam para a presença do tripanosomatídeo nas espécies rupestres, a partir de exames parasitológicos por microscopia. Os municípios localizados no noroeste do estado possuem resíduos de infestação de *T. infestans*, que podem ser explicados pela biologia do vetor e pelos hábitos culturais dos moradores de manterem em desuso, em suas propriedades, vários anexos no peridomicílio (BEDIN et al., 2009). Na primeira metade do século XX eram observados altos índices de infecção por *T. cruzi* em *T. infestans* nos inquéritos entomológicos: 67,3% (SIMÕES; TUPINAMBÁ, 1942), 56,75% (COUTINHO et al., 1952), 29,6% (BARUFFA; ALCÂNTARA FILHO, 1985). Mais recentemente, tem se observado uma taxa de infecção média de 4% nesta espécie (BEDIN et al., 2009). Porém, os resultados do presente estudo apontam um índice duas vezes maior, de 8,1%, para *T. infestans* coletados no peridomicílio, demonstrando a sensibilidade da técnica de PCR empregada.

Em 2003, Martins et al. observaram, na região de Quaraí, que 1,6% de *T. rubrovaria* coletados no ambiente silvestre estavam infectados pelo protozoário (MARTINS et al., 2003). Dois anos mais tarde, no mesmo município, Martins observou que 4,2% dos *T. rubrovaria* coletados estavam parasitados. Nenhum dos 26 exemplares coletados de *T. circummaculata* continha o parasito (MARTINS, 2005). Dados da Secretaria Estadual de Saúde do Rio Grande do Sul apontam que, no período de 2000 a 2008, o índice médio de infecção de *T. rubrovaria* foi de 0,4% (BEDIN et al., 2009). Entre 2002-2009, ecótopos naturais foram investigados em diversos municípios do Rio Grande do Sul. Nos municípios de Caçapava do Sul e Lavras do Sul nenhum espécime de *T. circummaculata* examinado estava infectado por *T. cruzi*. Com relação aos insetos *T. rubrovaria* capturados nos municípios de Santana do Livramento, Quaraí e Lavras do Sul a taxa de infecção natural foi de 60%, 23% e 0%, respectivamente (RIBEIRO et al., 2014). Interessantemente, apesar de não conseguirmos identificar taxonomicamente uma boa parte dos espécimes coletados em Lavras do Sul, quatro exemplares de *T.*

rubrovaria de oito coletados neste município, em ecótopos silvestres, estavam infectados com *T. cruzi* (50%). Quanto à espécie *T. circummaculata*, observamos positividade para a pesquisa de DNA do parasito em três indivíduos entre nove coletados (33,3%), todos provenientes de São Jerônimo encontrados em ambiente silvestre (**Figura 20**). Já foi reportado que *T. circummaculata* é encontrado infectado por *T. cruzi* com menos frequência por estar menos associado a mamíferos (RUAS-NETO; CORSEUIL, 2002). Sobre a espécie *T. carcavalloii*, Almeida et al. (2009) ressaltam que ainda são escassas as informações acerca da filogenia, ecologia e competência vetorial (ALMEIDA et al., 2009). Apesar da busca incessante na literatura por estudos que tenham encontrado algum espécime de *T. carcavalloii* naturalmente infectado por *T. cruzi*, não foi identificada nenhuma informação a respeito. Possivelmente, o presente trabalho tenha encontrado o primeiro relato de infecção pelo tripanosomatídeo nesta espécie. Dos 33 exemplares coletados, dois se mostraram positivos para a presença de DNA do parasito (6,1%), coletados em área silvestre, sendo um espécime de Caçapava do Sul e outro de Canguçu (**Figura 20**).

Martins (2005) caracterizou geneticamente cinco isolados de *T. cruzi* obtidos de *T. rubrovaria* coletados no ambiente silvestre de Quaraí, município do Rio Grande do Sul. A análise do DNA que codifica a fração 24Sα do rRNA mostrou fragmentos de 110pb, agrupando-os em TcI. Anteriormente, duas cepas de *T. cruzi* de *T. rubrovaria* foram isoladas nessa mesma região e foram classificadas molecularmente como também sendo TcI (MARTINEZ; ROSA, 2003; MARTINEZ, 2004). Estes resultados estão de acordo com os obtidos neste trabalho, em que a DTU mais predominante foi a TcI (5/9, 55,5%), sendo encontrada em *T. rubrovaria* (N=3) coletados no município de Lavras do Sul; em *T. infestans* (N=1) de Santa Rosa; e em espécie não identificada “NI” (N=1) de Caçapava do Sul. Foi observado ainda um caso de coinfeção por TcI+IV em um espécime de *T. circummaculata*, em São Jerônimo. Como já mencionado, TcI é a mais abundante e a mais dispersa geograficamente de todas as DTUs de *T. cruzi* nas Américas. Pode ser encontrada em uma ampla variedade de mamíferos e triatomíneos associados aos ciclos silvestres, no Rio Grande do Sul (ZINGALES et al., 2012). Para Martinez (2004), o encontro de TcI em *T. rubrovaria* já era esperado, por ser considerado um triatomíneo silvestre, embora alguns estudos terem demonstrado um aumento da frequência dessa espécie de triatomíneo no domicílio (ALMEIDA et al., 2002).

No entanto, em 2008, a partir da análise do domínio variável D7 do gene da subunidade 24Sa do rRNA e do espaçador não transcrito de genes de mini-exon de *T. cruzi*, Martins et al. realizaram a primeira descrição da linhagem TcIIc (TcIII) de *T. cruzi* em *T. rubrovaria* no ciclo silvestre da região sul do Brasil (MARTINS et al., 2008). Esses dados corroboram com o estudo de Gaunt e Miles (2002) que mostra os indícios de que TcIIc tenha evoluído num habitat terrestre (tocas) e em ambientes rochosos com triatomíneos dos gêneros *Panstrongylus* e *Triatoma*, em associação com mamíferos edentados e/ou marsupiais (GAUNT; MILES, 2002), concordando com o comportamento ecológico de *T. rubrovaria*. No presente estudo, não identificamos esta DTU em *T. rubrovaria*, porém um exemplar de *T. infestans*, do município de Santa Rosa, foi classificado como infectado por TcIII ou TcIV. Se realmente esta espécie estava infectada por TcIII, indica que essa linhagem também está circulando em outras espécies de triatomíneos da região Sul do país que, apesar de participar do ciclo silvestre, não é esperada nesse local (ZINGALES et al., 2012). Levando em consideração a infecção por TcIV, o encontro desta no sul do Brasil também não é esperado, sendo relatada no Norte e Nordeste do país, em sua maioria no ciclo silvestre (ZINGALES et al., 2012). TcIV também está associada aos surtos de doença de Chagas aguda na Amazônia Brasileira Ocidental e foi encontrada em *R. robustus* presente nessa região (MONTEIRO et al., 2012). A possibilidade do encontro de TcIII em *T. infestans* é maior, devido a distribuição desta DTU próxima à região Sul e por já ter sido reportado a infecção por TcIII em triatomíneos do território gaúcho.

Curiosamente, foi encontrado TcV em um espécime NI em Canguçu. É muito conhecida a distribuição desta DTU no ciclo de transmissão doméstico em outros países do Cone Sul, porém ARAUJO et al. (2011) observaram a presença de TcV em hospedeiros vertebrados nos biomas brasileiros Cerrado e Caatinga. Os autores sugerem que o padrão de distribuição é maior do que o descrito anteriormente. Também relatam que TcV tem sido identificada em *T. infestans* na Argentina, Bolívia e Paraguai (ARAUJO et al., 2011). Pode-se supor que a dispersão desta linhagem do parasito esteja ocorrendo destes países para a região Sul do Brasil, pela proximidade com os territórios em que circula. Como o triatomíneo coletado no presente estudo (sem a identificação de espécie) tem hábitos silvestres, capturado sob rochas, talvez a TcV aqui identificada, já esteja circulando nesse ambiente. Outro exemplar de *T. infestans*, do município de Santa Rosa, também não teve a subpopulação do parasito confirmada, sendo esta caracterizada como TcII, TcV ou TcVI. As DTUs TcII e TcVI até são esperadas no ciclo doméstico

de transmissão no território gaúcho (Zingales et al., 2012), e está de acordo com o comportamento ecológico de *T. infestans*, espécie vetora com alto grau de domiciliação e antropofilia, ainda sendo observada em focos residuais no noroeste do Rio Grande do Sul, onde está inserido o município de Santa Rosa, local em que o inseto foi capturado. Um estudo de 2013, na Argentina, demonstra que a DTU predominante em *T. infestans* foi a TcVI (MAFFEY et al., 2012). Ao contrário do que era proposto (LISBOA et al. 2006, 2008; HERRERA et al. 2005; ZINGALES et al., 2012), o TcII tem demonstrado ter uma ampla distribuição geográfica, sendo observado em reservatórios dos biomas Cerrado, Pantanal, Floresta Atlântica, Floresta Amazônica e Caatinga, não parecendo estar associado a um bioma ou habitat em particular (JANSEN et al., 2015). No entanto, não podemos descartar a possibilidade de essa espécie estar infectada por TcV.

Há muitos equívocos quando tentamos generalizar fenômenos biológicos, principalmente quando estão associados às doenças humanas. Buscamos respostas a partir de uma compreensão limitada do assunto. É importante levar em consideração que esses processos biológicos na natureza são extremamente complexos e que a transmissão das diferentes subpopulações de *T. cruzi* depende de diversas variáveis. Dificilmente teremos um vetor ou reservatório infectado por uma única DTU. Os animais estão constantemente expostos à infecção única ou múltipla de *T. cruzi*, que pode ocorrer uma ou diversas vezes. Com a predação, os animais carnívoros se infectam com *T. cruzi* pela transmissão oral, principalmente. Animais que fazem parte do topo da cadeia alimentar, possuem maior probabilidade de acumular diversos parasitos, pois necessitam se alimentar mais vezes devido às suas necessidades energéticas, além de animais do nível trófico abaixo já ter adquirido *T. cruzi* de outras presas, podendo ter inúmeros parasitismos. E esta cadeia alimentar não pode ser entendida como uma associação alimentar unilateral, os organismos estão interligados por uma rede alimentar, que representa as diversas relações que estes possuem entre si no ecossistema. Assim, as seis DTUs de *T. cruzi* podem circular de forma mais abrangente em diversas espécies de reservatórios, possibilitando enormemente às coinfeccções. Outro fator importante a ser considerado é que a dispersão do parasito de hospedeiro a hospedeiro é mantida por diversas espécies de triatomíneos que, por sua vez, não são hematófagos restritos unicamente a uma determinada fonte alimentar, pelo contrário, é um inseto generalista, se nutrindo de diversas espécies de animais. As interações ecológicas, o encontro do vetor com sua fonte alimentar infectada, serão moduladas pela composição da fauna, que dependerá do habitat em que esses indivíduos vivem. A

inserção ou remoção de um único elemento dessa fauna poderá resultar em um perfil diferenciado de interação, gerando um novo cenário de transmissão do parasito, a partir de alterações dos ambientes em que as diversas espécies ocupam os seus nichos ecológicos. É interessante também pensar que cada espécie de mamífero exerce uma pressão seletiva sobre as subpopulações do parasito de forma única e seus padrões de infecções são distintos, seja pelas condições ambientais em que estão inseridos, seja por peculiaridades inerentes ao indivíduo. Essas características resultam em uma complexidade imensa na transmissão e na distribuição geográfica das linhagens de *T. cruzi*, em diversos habitats e nichos. Todos esses aspectos devem ser levados em conta na interpretação dos dados obtidos por toda comunidade científica que busca a melhor compreensão da dinâmica de transmissão do agente etiológico da doença de Chagas.

Todos os insetos do Rio Grande do Sul examinados neste trabalho foram coletados no ambiente silvestre. Lorosa et al. (2008) relatam a importância do estudo de triatomíneos silvestres para o maior conhecimento acerca dos seus ecótopos naturais, do mecanismo de interação entre o ecótopo natural e artificial, e da sua associação com hospedeiros vertebrados, que possibilita o entendimento da circulação do parasito *T. cruzi* entre esses ambientes, e do eventual estabelecimento ou restabelecimento do ciclo doméstico de transmissão (LOROSA et al., 2008).

As taxas de infecção natural dos triatomíneos por *T. cruzi* variam enormemente entre as espécies e de acordo com o contato com os reservatórios parasitados. Segundo Coura e Borges Pereira, entre a maioria dos triatomíneos domésticos, não mais de 5% estão infectados (Coura; Borges-Pereira 2010). Um dos fatores que explicam o baixo percentual de infectividade nos insetos vetores é a probabilidade do parasito estar presente na corrente sanguínea quando há baixa parasitemia nas fontes alimentares no momento do repasto, além da associação alimentar dos triatomíneos com animais refratários (aves, anfíbios e répteis), apesar destes exercerem um importante papel na manutenção populacional (fontes de nutrientes) e na dispersão dos insetos vetores, através da plumagem de aves silvestres (SCHOFIELD et al., 1994).

A sobreposição da distribuição geográfica e o compartilhamento dos mesmos reservatórios animais entre os tripanosomatídeos *T. rangeli* e *T. cruzi* permitem a ocorrência de coinfeções ou infecções únicas nos hospedeiros vertebrados e invertebrados de uma mesma área geográfica (MARINKELLE, 1972; D'ALESSANDRO-BACIGALUPO; SARAIVA, 1992). O *T. rangeli* apresenta

diferentes graus de patogenicidade nos hospedeiros invertebrados (BRECHER; WIGGLESWORTH, 1944; LAKE; FRIEND, 1967; D'ALESSANDRO, 1976; HECKER et al. 1990; EICHLER; SCHAUB, 1998). Muito pouco ainda se sabe sobre o curso de infecção por este parasito no hospedeiro mamífero. Os dados a respeito da existência ou não de formas em divisão nos tecidos e no sangue são escassos e controversos (MENESES et al., 2004). No entanto, a similaridade genética já observada na composição das sequências conservadas dos minicírculos de kDNA entre as duas espécies (GUHL et al. 2002) deve ser levada em consideração. Assim, a diferenciação entre estas espécies para fins de diagnóstico é extremamente importante para evitar resultados falso-positivos para *T. cruzi*. Devido a isso, em todos os ensaios de PCR realizados no presente estudo, foram utilizados como controles positivos da reação DNA de *T. cruzi* e de *T. rangeli* para diferenciar a(s) espécie(s) de tripanosomatídeo(s) presente(s) nos vetores. Como mostrado na **Figura 20**, não foi possível detectar a presença de kDNA de *T. rangeli* nos triatomíneos capturados em ambos os estados, não sendo observados produtos de amplificação deste parasito em gel de agarose a 2%. Estes dados podem ser explicados devido ao desenvolvimento completo do parasito no intestino, na hemolinfa e nas glândulas salivares ocorrer, principalmente, em espécies do gênero *Rhodnius* (TOBIE, 1970; WATKINS, 1971; HOARE, 1972; GUHL; VALLEJO, 2003; DIAS et al., 2007). Nos outros gêneros, quando há infecção, esta parece ser limitada ao trato intestinal do triatomíneo. Gregório e Ratcliffe observaram que o intestino de *T. infestans*, em comparação ao de *R. prolixus*, possui maiores níveis de aglutininas contra *T. rangeli*. Ademais, relatam que a saliva de *T. infestans* apresenta atividade lítica contra *T. rangeli*, e uma vez que parte da saliva é ingerida pelo inseto durante o repasto sanguíneo, esta atividade também poderia conferir uma maior resistência ao desenvolvimento deste tripanosoma em *T. infestans* (GREGÓRIO; RATCLIFFE, 1991). Em infecções naturais, a porcentagem de triatomíneos com presença de *T. rangeli* no trato intestinal, na hemolinfa e nas glândulas salivares, varia de 2 a 50% (GROOT, 1954; MARINKELLE, 1968; TOBIE, 1965, 1970; AÑEZ et al., 1987; HECKER et al., 1990; FERREIRA et al., 2010).

6.4 Comparação entre genótipos de *T. cruzi* e carga parasitária no inseto vetor:

Quanto à distribuição da carga parasitária por *T. cruzi* nos insetos positivos, observamos no Ceará que triatomíneos da espécie *T. brasiliensis*, infectados com TcII e

TcVI apresentaram as cargas parasitárias mais altas ($1,8 \times 10^7$ e $1,9 \times 10^7$ equivalentes de parasito, respectivamente). As amostras que apresentaram infecção por TcI tiveram uma distribuição mais ampla dos valores de carga parasitária, variando entre 4×10^1 (*T. brasiliensis*) a $1,1 \times 10^4$ (*T. pseudomaculata*) equivalentes de parasito. O valor estimado da mediana para os dois espécimes de *P. lutzii* infectados por TcIII+V foi de $6,4 \times 10^6$ equivalentes de parasito, em comparação ao único exemplar de *T. brasiliensis* coinfectado com TcI+II/V/VI, o qual apresentou $4,7 \times 10^3$ equivalentes de parasito. As duas amostras infectadas de *T. pseudomaculata*, que não tiveram a DTU identificada (sendo TcIII ou IV) continham $3,9 \times 10^4$ e $2,8 \times 10^3$ equivalentes de parasito. As análises obtidas no Rio Grande do Sul indicaram que a maior e mais diversa carga parasitária foi encontrada em amostras infectadas por TcI, variando entre $2,1 \times 10^1$ (*T. infestans*) a $2,3 \times 10^7$ (*T. rubrovaria*) equivalentes de parasito. Uma espécie não identificada continha $1,5 \times 10^1$ equivalentes de TcV. A coinfeção TcI+IV em *T. circummaculata* apresentou $2,4 \times 10^2$ equivalentes de *T. cruzi*. E em um espécime de *T. infestans* que não foi possível classificar a DTU ao certo, podendo ser TcII, V ou VI, a carga parasitária foi de $5,8 \times 10^2$ equivalentes de parasito. Infelizmente, não foi possível encontrar na literatura dados sobre estimativas de carga parasitária em insetos de campo, para fins de comparação. Este fato demonstra quão atual e inovadora é a abordagem molecular para a quantificação da carga parasitária nos triatomíneos coletados na natureza.

Vários aspectos podem influenciar a carga parasitária no inseto vetor, como a origem e quantidade de sangue ingerido, os fatores hemolíticos, a presença de membrana perimicrovilar, a ação de aglutininas e lectinas e a imunidade inata do triatomíneo (PERLOWAGORA-SZUMLEWICZ et al., 1990; PERLOWAGORA-SZUMLEWICZ; MOREIRA, 1994; CARVALHO-MOREIRA et al., 2003; AZAMBUJA et al., 2005; GARCIA et al., 2007). Sabe-se que a cepa Y (TcII) é lisada por fatores hemolíticos presentes no intestino médio anterior de *R. prolixus*, ao passo que outras cepas se desenvolvem com sucesso neste vetor, como a Dm28c (TcI) (MELLO et al., 1996; CORTEZ et al., 2002). TcI é capaz de modular as respostas imunes no intestino do inseto para diminuir a microbiota, sendo essa mudança crucial para o desenvolvimento do parasito no trato digestivo do vetor (CASTRO et al., 2012). A manutenção do parasito no hospedeiro invertebrado também é determinada pelas características específicas das diferentes cepas de *T. cruzi*, período de infecção e número total de flagelados inoculados (DVORAK et al., 1980; ZELEDÓN; RABINOVICH,

1981; GARCIA; AZAMBUJA, 1991; GARCIA et al., 1993). Ademais, o estado nutricional do inseto é outro parâmetro que afeta diretamente o desenvolvimento do parasito no lúmen intestinal deste hemíptero (SCHAUB; LÖSCH, 1989). A qPCR é uma técnica promissora em termos de avaliação de competência de infectividade do *T. cruzi* e poderá auxiliar ainda mais em pesquisas futuras sobre a viabilidade do parasito no trato digestivo do inseto vetor (UEHARA et al., 2012; MELO et al, 2015).

7 CONCLUSÕES

Gerais:

- A PCR convencional demonstrou sensibilidade superior à microscopia óptica para o diagnóstico da infecção natural por *T. cruzi* em triatomíneos coletados em campo.
- A técnica de qPCR apresentou boa eficiência e coeficiente de linearidade, tornando possível a estimativa de carga parasitária nos insetos de campo.

No estado do Ceará:

- O maior número de exemplares coletados foi da espécie *Triatoma pseudomaculata*, seguido de *Triatoma brasiliensis* e *Panstrongylus lutzi*.
- A presença de triatomíneos no ambiente intradomiciliar só foi observada para a espécie *T. brasiliensis*, demonstrando a sua adaptação aos ecótopos artificiais.
- O peridomicílio foi o local com maior infestação, colonização e infecção por *T. cruzi*, sendo este ambiente o principal responsável por amplificar o potencial epidemiológico das três espécies de triatomíneos aqui estudadas.
- O maior percentual de positividade para *T. cruzi*, por PCR, foi em indivíduos da espécie *P. lutzi*, seguido de *T. brasiliensis* e *T. pseudomaculata*.
- A carga parasitária de *T. cruzi* foi altamente variável, sendo as maiores cargas observadas em *T. pseudomaculata* e em *T. brasiliensis*, espécies que possuem grande importância epidemiológica no estado.
- TcI foi o genótipo encontrado com maior frequência, e apresentou uma distribuição mais ampla dos valores de carga parasitária. Diversas outras DTUs também foram identificadas, além de coinfeções, demonstrando a complexidade da transmissão do parasito.

No Rio Grande do Sul:

- O maior número de exemplares coletados foi da espécie *T. infestans*, seguido de *Triatoma carvalhoi*, *Triatoma circummaculata* e *T. rubrovaria*.
- Espécimes de *T. infestans* foram encontrados no peridomicílio, e de *T. rubrovaria* no intradomicílio, alertando a importância de controles de vigilância

entomológica para evitar a recolonização de *T. infestans* e a introdução de espécies secundárias em habitações humanas.

- A taxa de infecção natural por *T. cruzi* foi superior entre aqueles pertencentes à espécie *T. rubrovaria*, seguido de *T. circummaculata*, *T. infestans*, *T. carvalhoi* e *Triatoma* sp.

- Este estudo é o primeiro relato de detecção de *T. cruzi* em *T. carvalhoi*.

- A quantificação apresentou uma ampla variação da carga parasitária, sendo a maior carga observada em *T. rubrovaria*.

- Devido ao encontro cada vez mais frequente de *T. rubrovaria* dentro de habitações humanas e os dados obtidos no presente estudo, pode-se observar a importância epidemiológica desta espécie no território gaúcho, merecendo atenção adequada pelas autoridades de saúde.

- A DTU predominante no estado foi a TcI, apresentando a maior e mais diversa carga parasitária.

8 PERSPECTIVAS

- Finalizar o *Barcoding* dos insetos vetores do Rio Grande do Sul que não foram identificados por taxonomia clássica;

- Pesquisar as fontes alimentares dos triatomíneos coletados;

- Investigar a correlação entre taxas de infecção natural por *T. cruzi*, cargas parasitárias, DTUs encontradas e as respectivas fontes alimentares;

- Notificar às Secretarias de Saúde do Ceará e do Rio Grande do Sul sobre os dados obtidos no presente estudo, para que sejam elaborados planos estratégicos de medidas de controle da doença de Chagas nestas regiões.

9 BIBLIOGRAFIA

Abad-Franch F., Celeste VM., Rólon MS., Santos WS., de Arias AR. Community Participation in Chagas Disease Vector Surveillance: Systematic Review. PLoS Negl Trop Dis, 2011; 5(6): e1207.

Araújo A; Jansen AM, Karl R, Ferreira LF. Paleoparasitology of Chagas disease - A Review. Mem Inst Oswaldo Cruz 2009; 104(I): 9-16.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução nº 28, de 4 de abril de 2007. Priorização da análise técnica de petições, no âmbito da Gerência-Geral de Medicamentos da ANVISA, cuja relevância pública se enquadre nos termos desta Resolução. Diário Oficial da União 05 abr 2007.

Akhavan D. Cost-effectiveness Analysis of the Project for Controlling Chagas Disease in Brazil—Final Report. 2000. Pan American Health Organization, Brasília.

Alberts B. et al. Manipulating Proteins, DNA, and RNA. In: Molecular Biology of The Cell. New York: Garland Science. 2002; 8:469-546.

Alencar JE. História Natural da Doença de Chagas no Estado do Ceará. Imprensa Universitária da Universidade Federal do Ceará, 1987; 341.

Almeida CE, Duarte R, Pacheco RS, Costa J. *Triatoma rubrovaria* (Blanchard, 1843) (Hemiptera Reduviidae - Triatominae) II: trophic resources and ecological observations of five populations collected in the state of Rio Grande do Sul, Brazil. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 2002; 97:1127-1131.

Almeida CE, Marcet PL, Gumiel M, Takiya DM, Cardozo-de-Almeida M, Pacheco RS, et al. Phylogenetic and phenotypic relationships among *Triatoma carcavallo* (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) and related species collected in domiciles in Rio Grande do Sul State, Brazil. Journal of Vector Ecology, 2009; 34(2):164-173.

Andrade LO, Machado CR, Chiari E, Macedo AM. *Trypanosoma cruzi*: role of host genetic background in the differential tissue distribution of parasite clonal populations. Exp Parasitol 2002; 100: 269-275.

Añez N, Nieves E, Cazorla D. Studies on *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920. IX. Course of infection in different stages of *Rhodnius prolixus*. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 1987; 82:1-6.

Anonymous. Recommendations from a satellite meeting. Mem Inst Oswaldo Cruz 1999; 94:549-562.

Araujo CA, Waniek PJ, Jansen AM. Development of a *Trypanosoma cruzi* (TcI) isolate in the digestive tract of an unfamiliar vector, *Triatoma brasiliensis* (Hemiptera, Reduviidae). Acta Trop, 2008; 107: 195–199.

Araújo CAC, Waniek PJ, Xavier SCC, Jansen AM. Genotype variation of *Trypanosoma cruzi* isolates from different Brazilian biomes. *Experimental Parasitology*, 2011; 127(1):308–312.

Araujo CA, Waniek PJ, Jansen AM. TcI/TcII co-infection can enhance *Trypanosoma cruzi* growth in *Rhodnius prolixus*. *Parasit Vectors*, 2014; 7: 94.

Argolo AM, Felix M, Pacheco R, Costa J. Doença de Chagas e seus vetores no Brasil In: Ação comemorativa do centenário de descoberta da doença de chagas. Rio de Janeiro: Imperial Novo Milênio; 2008.

Assis GF, Azeredo BV, Carbajal de la Fuente AL, Diotaiuti L, de Lana M. Domiciliation of *Triatoma pseudomaculata* (Corrêa e Espínola 1964) in the Jequitinhonha valley, state of Minas Gerais. *Rev Soc Bras Med Trop*, 2007; 40:391–396.

Aufderheide, A.C.; Salo, W.; Madden, M.; Streitz, J.; Buikstra, J.; Guhl, F. et al. A 9,000-year record of Chagas' disease. *Proc Natl Acad Sci* 2004; 101:2034-2039.

Avila H, Goncalves AM, Nehme NS, Morel CM, Simpson L. Schizodeme analysis of *Trypanosoma cruzi* stocks from South and Central America by analysis of PCR-amplified minicircle variable region sequences. *Mol Biochem Parasitol*. 1990; 42:175-188.

Avila HA, Sigman DS, Cohen LM, Millikan RC, Simpson L. Polymerase chain reaction amplification of *Trypanosoma cruzi* kinetoplast minicircle DNA isolated from whole blood lysates: diagnosis of chronic Chagas disease. *Mol. Biochem. Parasitol*. 1991;48(2):211-221.

Avila HA, Pereira JB, Thiemann O, De Paiva E, DeGrave W, Morel CM et al. Detection of *Trypanosoma cruzi* in blood specimens of chronic chagasic patients by Polymerase chain reaction amplification of Kinetoplast Minicircle DNA: Comparison with serologic and xenodiagnosis. *Journal of Clinical Microbiology* 1993; 31(9):2421–26.

Azambuja P, Ratcliffe NA, Garcia ES. Towards an understanding of the interactions of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* within the reduviid insect host *Rhodnius prolixus*. *Anais Acad. Bras. Ciências*, 2005; 77:397–404.

Bacigalupo A, Segovia V, García A, Botto-Mahan C, Ortiz S, Solari A et al. Differential Pattern of Infection of Sylvatic Nymphs and Domiciliary Adults of *Triatoma infestans* with *Trypanosoma cruzi* Genotypes in Chile. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2012; 87(3):473–480.

Baker JR, Miles MA, Godfrey DG, Barrett TV. Biochemical characterization of some species of *Trypanosoma* (*Schizotrypanum*) from bats (*Microchiroptera*). *Am J Trop Med Hyg.* 1978; 27: 483–491.

Barnabe C, Brisse S, Tibayrenc M. Phylogenetic diversity of bat trypanosomes of subgenus *Schizotrypanum* based on multilocus enzyme electrophoresis, random

amplified polymorphic DNA, and cytochrome b nucleotide sequence analyses. *Infect Genet Evol.* 2003; 2: 201–208.

Barrett MP, Bruchmore RJS, Stich A, Lazzari JO, Frash AC, Cazzulo JJ, Krishna S: The trypanosomiasis. *Lancet* 2003, 362:1469–1480.

Barretto MP. Possible role of wild mammals and triatomines in the transmission of *Trypanosoma cruzi* to man. In: International Symposium on New Approaches in American Trypanosomiasis Research, Belo Horizonte, 1975. Proceedings. Washington, D.C., Pan American Health Organization, 1976; 318:307-18.

Baruffa G, Alcantara Filho A. Inquérito entomológico e sorológico da infecção pelo *T. cruzi* na região sul do Rio Grande do Sul, Brasil. *Annales de la Société Belge de Médecine Tropicale*, 1985; 65:171-179.

Bedin C, Mello F, Wilhelms TS, Torres MA, Estima C, Ferreira CF, et al. Vigilância Ambiental: Doença de Chagas no Rio Grande do Sul. *Bol Epidemiológico*, 2009; 11:1-8.

Bezerra CM. Hospedeiros domésticos, peridomiciliares e silvestres na transmissão de *Trypanosoma cruzi* pelo *Triatoma brasiliensis* em área de Caatinga no município de Tauá – CE. Dissertação [Mestrado em Saúde Pública] – Universidade Federal do Ceará; 2013.

Bezerra CM, Cavalcanti LPG, Souza RCM, Barbosa SE, Xavier SCC, Jansen AM et al. Domestic, peridomestic and wild hosts in the transmission of *Trypanosoma cruzi* in the Caatinga area colonised by *Triatoma brasiliensis*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 2014; 109(7): 887–898.

Brandão HR, Fonseca EOL, Santos RF, Júnior GR, Santos CGS, Cova BO et al. Descrição de focos residuais de *Triatoma infestans* klug, 1834 no município de novo horizonte, Bahia. *Revista Baiana de Saúde Pública*, 2015; 39(1):91-104.

Brasil. Ministério da Saúde. Caderno de atenção básica: vigilância em saúde, zoonoses. Brasília; 2009 [Acesso em 18 nov 2015]. Disponível em: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_vigilancia_epidemiologica_7ed.pdf.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim epidemiológico. Brasília, 2015; 46(21):1-9.

Bengtsson M, Karlsson JH, Westman G, Kubista M. A new minor groove binding asymmetric cyanine reporter dye for real-time PCR. *Nucleic Acids Research*, 2003;31:45.

Brener Z. Life cycle of *Trypanosoma cruzi*. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 1971; 13: 171–78.

Brener Z. Biology of *Trypanosoma cruzi*. *Ann Rev Microbiol* 1973; 27:347-82.

Breniere SF, Bosseno MF, Telleria J, Carrasco R, Vargas F, Yaksic N, et al. Field application of Polymerase Chain Reaction diagnosis and strain typing of *Trypanosoma cruzi* in bolivian triatomines. *Am J Trop Med Hyg*, 1995; 53(2):179-84.

Brecher G, Wigglesworth VB. The transmission of *Actinomyces rhodnii* Erikson in *Rhodnius prolixus* Stal (Hemiptera) and its influence on the growth of the host. *Parasitology*, 1944; 35:220-224.

Briones MR, Souto RP, Stolf BS, Zingales B. The evolution of the two *Trypanosoma cruzi* subgroups inferred from rRNA genes can be correlated with the interchange of American mammalian faunas in the cenozoic and has implications to pathogenicity and host specificity. *Molecular and Biochemical Parasitology* 1999; 104:219-232.

Brisse S, Dujardin JC, Tibayrenc M. Identification of six *Trypanosoma cruzi* lineages by sequence-characterised amplified region markers. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 2000a; 111:95-105.

Brisse S, Barnabé C, Tibayrenc M. Identification of six *Trypanosoma cruzi* phylogenetic lineages by random amplified polymorphic DNA and multilocus enzyme electrophoresis. *Int. J. Parasitol.*, 2000b; 30:35-44.

Britto C, Cardoso MA, Wincker P, Morel CM. A simple protocol for the physical cleavage of *Trypanosoma cruzi* kinetoplast DNA present in blood samples and its use in polymerase chain reaction (PCR)-based diagnosis of chronic Chagas disease. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 1993; 88:171-172.

Britto C, Cardoso MA, Ravel C, Santoro A, Pereira JB, Coura JR et al. *Trypanosoma cruzi*: Parasite detection and strain discrimination in chronic chagasic patients from Northeastern Brazil using PCR amplification of kinetoplast DNA and nonradiative hybridization. *Exper Parasit* 1995; 81(4):462-71.

Britto C, Silveira C, Cardoso MA, Marques P, Luquetti A, Macêdo V et al. Parasite persistence in treated chagasic patients revealed by xenodiagnosis and polymerase chain reaction. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 2001; 96:823-826.

Britto CC. Usefulness of PCR-based assays to assess drug efficacy in Chagas disease chemotherapy: value and limitations. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 2009; 104(1):102-135.

Brito CM, Lima MM, Sarquis O, Pires MQ, Coutinho CF, Duarte R et al. Genetic polymorphism in *Trypanosoma cruzi* isolated from Brazilian Northeast triatomines revealed by low-stringency single specific primer–polymerase chain reaction. *Parasitol Res* 2008; 103:1111–1117.

Bwititi P, Browne J. Seroprevalence of *Trypanosoma cruzi* in blood donors at the National Blood Transfusion Services: Guyana. *West Indian Med*. 2012; 61:559–563.

Bua J, Volta BJ, Velazquez EB, Ruiz AM, Rissio AM, Cardoni RL. Vertical transmission of *Trypanosoma cruzi* infection: quantification of parasite burden in mothers and their children by parasite DNA amplification. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 2012; 106:623– 628.

Burgos JM, Altchek J, Bisio M, Duffy T, Valadares HMS, Seidenstein ME, Piccinali R et al. Direct molecular profiling of minicircle signatures and lineages of *Trypanosoma*

cruzi bloodstream populations causing congenital Chagas disease. *Int. J. Parasitol.*, 2007; 37:1319–1327.

Burgos JM, Diez M, Vigliano C, Bisio M, Risso M, Duffy T et al. Molecular Identification of *Trypanosoma cruzi* Discrete Typing Units in End-Stage Chronic Chagas Heart Disease and Reactivation after Heart Transplantation. *Clin. Infect. Dis.*, 2010; 51(5):485–495.

Bustamante DM, De Urioste-Stone SM, Juárez JG, Pennington PM. Ecological, Social and Biological Risk Factors for Continued *Trypanosoma cruzi* Transmission by *Triatoma dimidiata* in Guatemala. *PLoS ONE*, 2014; 9(8):e104599.

Câmara ACJ. Variabilidade genética de amostras do *Trypanosoma cruzi* isoladas no semi-árido potiguar, RN. Tese [Doutorado em Ciências/Parasitologia] – Universidade Federal de Minas Gerais; 2008.

Camargo ME, Da Silva GR, De Castilho EA, Silveira AC. Serological survey of the prevalence of Chagas infection in Brazil, 1975/1980. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 1984; 26(4):192–204.

Cantillo-Barraza O, Garcés E, Gómez-Palacio A, Cortés LA, Pereira A, Marcet PL, et al. Eco-epidemiological study of an endemic Chagas disease region in northern Colombia reveals the importance of *Triatoma maculata* (Hemiptera: Reduviidae), dogs and *Didelphis marsupialis* in *Trypanosoma cruzi* maintenance. *Parasites & Vectors* 2015; 8:482.

Cardinal MV, Lauricella MA, Ceballos LA, Lanati L, Marcet PL, Levin MJ, et al. Molecular epidemiology of domestic and sylvatic *Trypanosoma cruzi* infection in rural northwestern Argentina. *Int. J. Parasitol.*, 2008; 38:1533–1543.

Cardozo-de-Almeida MAR. Estudos morfológicos, morfométricos e ultraestruturais em cinco espécies do gênero *Triatoma* Laporte, 1832 (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) incluindo a biologia de *Triatoma carcavalloii*. [Dissertação]. [Rio de Janeiro]: Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro 2007; 102 p.

Cardozo-de-Almeida M, Neves SCT, De Almeida CE, De Lima NRC, De Oliveira MLR, Dos Santos-Mallet JR, et al. Biology of *Triatoma carcavalloii* Jurberg, Rocha & Lent, 1998 under laboratory conditions. *Rev Soc Bras Med Trop*, 2014; 47(3):307-312.

Caranha L, Lorosa ES, Rocha DS, Jurberg J, Galvão C. Feeding sources evaluation of *Panstrongylus lutzii* (Neiva & Pinto, 1923) (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) in the State of Ceará. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, 2006; 39(4):347-351.

Carranza JC, Valadares HMS, D'Ávila DA, Baptista RP, Moreno M, Galvão LMC, et al. *Trypanosoma cruzi* maxicircle heterogeneity in Chagas disease patients from Brazil. *Int J Parasitol*, 2009; 39:963–973.

Carbajal De La Fuente AL, Catalá S. Relationship between antennal sensilla pattern and habitat in six species of Triatominae. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2002; 97(8):1121-5.

Carbajal De La Fuente AL, Minoli SA, Lopes CM, Noireau F, Lazzari CR, Lorenzo MG. Flight dispersal of the Chagas disease vectors *Triatoma brasiliensis* and *Triatoma pseudomaculata* in northeastern Brazil. *Acta Trop*, 2007; 101:115-9.

Carcavallo RU, Franca-Rodríguez ME, Salvatella R, Curto de Casas SI, Sherlock I, Galvão C, et al. Habitats e fauna relacionada. *In*: Carcavallo RU, Galíndez Girón I, Jurberg J, Lent H (Eds.). Atlas of Chagas disease vectors in the Americas/Atlas dos vetores da doença de Chagas nas Américas, 1998; 2:561-600.

Carvalho-Moreira CJ, Spata MCD, Coura JR, Garcia ES, Azambuja P, Gonzales MS, et al. In vivo and in vitro metacyclogenesis tests of two strains of *Trypanosoma cruzi* in the triatomine vectors *Triatoma pseudomaculata* and *Rhodnius neglectus*: short/long-term and comparative study. *Exp. Parasitol.*, 2003; 103:102–111.

Castro DP, Moraes CS, Gonzalez MS, Ratcliffe NA, Azambuja P, Garcia ES. *Trypanosoma cruzi* immune response modulation decreases microbiota in *Rhodnius prolixus* gut and is crucial for parasite survival and development. *PLoS ONE*, 2012; 7(5): e36591.

Cavazzana M, Marcili A, Lima L, da Silva FM, Junqueira ACV, Veludo HH, et al. Phylogeographical, ecological and biological patterns shown by nuclear (ssrRNA and gGAPDH) and mitochondrial (Cyt b) genes of trypanosomes of the subgenus *Schizotrypanum* parasitic in Brazilian bats. *Int. J. Parasitol.*, 2010; 40:345–355.

Centers For Disease Control And Prevention (CDC). Parasites - American Trypanosomiasis: Biology. Florida; 2015[Acesso em 22 nov 2015]. Disponível em: <http://www.cdc.gov/parasites/chagas/biology.html>.

Cerisola JA, Rohwedder R, Bozzini JP, Del Prado CE. *Blastocrithidia triatomae* n. sp. found in *Triatoma infestans* from Argentina. *The Journal of Protozoology* 1971;18:503–506.

Chagas C. Nova tripanossomíase humana: Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade mórbida do homem. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1909; 1:159-218.

Chapman MD, Baggaley RC, Godfreyfausset PF, Malpas TJ, White G, Canese J, Miles MA. *Trypanosoma cruzi* from the Paraguayan Chaco – isoenzyme profiles of strains isolated at Makthlawaiya. *J. Protozool.*, 1984; 31:482–486.

Chiurillo MA, Crisante G, Rojas A, Peralta A, Dias M, Guevara P, Anez N, Ramirez JL. Detection of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* infection by duplex PCR assay based on the telomeric sequences. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 2003; 10(5):775–779.

Clayton C. Life without transcriptional control? From fly to man and back again. *EMBO J* 2002;21:1881-8.

Clayton J. Chagas disease: pushing through the pipeline. *Nature*, 2010; 465(7301): S12-S15.

Coimbra JR CEA. Human settlements, demographic pattern and epidemiology in lowland Amazonia: the case of Chagas disease. *Am Anthropol* 1988; 90:82-97.

Coronado X, Zulantay I, Reyes Eduardo, Apt W, Venegas J, Rodriguez J, et al. Comparison of *Trypanosoma cruzi* detection by PCR in blood and dejections of *Triatoma infestans* fed on patients with chronic Chagas disease *Acta Tropica*, 2006; 98:314–317.

Cortez MGR, Gonzalez MS, Cabral MMO, Garcia ES, Azambuja P. Dynamic development of *Trypanosoma cruzi* in *Rhodnius prolixus*: role of decapitation and ecdysone therapy. *Parasitol. Res.*, 2002; 88:697–703.

Cortez MR, Monteiro FA, Noireau F. New insights on the spread of *Triatoma infestans* from Bolivia – Implications for Chagas disease emergence in the Southern Cone. *Infect Genet Evol*, 2010; 10:350-353.

Costa J, Almeida JR, Britto C, Duarte R, Marchon-Silva V, Pacheco R. Ecotopes, natural infection and trophic resources of *Triatoma brasiliensis* (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 1998; 93:7-13.

Costa J, Almeida CE, Dotson EM, Lins A, Vinhaes M, Silveira AC, et al. The epidemiologic importance of *Triatoma brasiliensis* as a Chagas disease vector in Brazil: a revision of domiciliary captures during 1993-1999. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 2003; 98: 443-449.

Costa J, Lorenzo M. Biology, diversity and strategies for the monitoring and control of triatomines - Chagas disease vectors. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 2009; 104 (I): 46-51.

Coura JR. Tripanosomose, doença de Chagas. São Paulo: *Cienc. Cult.* Jan/Mar 2003; 55(1).

Coura JR, Viñas PA. Chagas disease: a new worldwide challenge. *Nature*, 2010; 465: S6–S7.

Coura JR, Borges-Pereira J. Chagas disease: 100 years after its discovery. A systemic review. *Acta Trop.*, 2010; 115:5-13.

Coutinho PP, Pinto OS, Barbosa JA. Contribuição ao conhecimento da distribuição dos triatomídeos domiciliares e de seus índices de infecção pelo *Schizotrypanum cruzi* no Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. *Rev. Bras. Malariologia e Doenças Tropicais*, 1952; 4:211-226.

Coutinho CFS, Souza-Santos R, Teixeira NFD, Georg I, Gomes TF, Boia MN, Reis NB, Maia AO, Lima MM. An entomoepidemiological investigation of Chagas disease in the state of Ceará, Northeast Region of Brazil. *Cad. Saúde Pública*, 2014; 30(4):785-793.

D'Alessandro A. Biology of *Trypanosoma* (Herpetosoma) *rangeli* Tejera, 1920, in: Lumsden, W.H.R. e Evans, D.A. (eds.), *Biology of Kinetoplastida*. Academic Press, 1976; 1:328-403.

D'Alessandro-Bacigalupo A, Saraiva NG. *Trypanosoma rangeli*, p. 1–54. In J. P. Kreier and J. R. Baker (ed.), Parasitic protozoa, vol. 2. Academic Press, New York, N.Y. 1992.

Da Silva Valente AS, Valente VC, Neto HF. Considerations on the epidemiology and transmission of Chagas disease in the Brazilian Amazon. Mem Inst Oswaldo Cruz 1999; 94(1):395-8.

De Freitas VLT, Da Silva SCV, Sartori AM, Bezerra RC, Westphale EVN, Molina TD, Teixeira ARL, Ibrahim KY, SHIKANAI-YASUDA, M.A. Real-Time PCR in HIV/*Trypanosoma cruzi* Coinfection with and without Chagas Disease Reactivation: Association with HIV Viral Load and CD4+ Level. 8thed. PLoS Negl. Trop. 2011; 5:e1277.

Degrave, W, Fragoso SP, Britto C, Heuverswyn HV, Kidane GZ, Cardoso MA, Mueller RU, Simpson L, Morel CM. Peculiar sequence organization of kinetoplast DNA minicircles from *Trypanosoma cruzi*. Mol. Biochem. Parasitol. 1988; 27:63-70.

De Souza W. From the Cell Biology to the Development of New Chemotherapeutic Approaches Against Trypanosomatids: Dreams and Reality. Kinetop Biol Dis 2002; 1:3-24.

De Souza RCM, Campolina-Silva GH, Bezerra CM, Diotaiuti L, Gorla DE. Does *Triatoma brasiliensis* occupy the same environmental niche space as *Triatoma melanica*? Parasites & Vectors, 2015; 8:361.

Dias FA, Guerra B, Vieira LR, Perdomo HD, Gandara ACP, et al. Monitoring of the Parasite Load in the Digestive Tract of *Rhodnius prolixus* by Combined qPCR Analysis and Imaging Techniques Provides New Insights into the *Trypanosome* Life Cycle. PLoS Negl Trop Dis, 2015; 9(10):e0004186.

Dias FBS, Diotaiuti L, Romanha AJ, Bezerra CM, Machado EMM. First report on the occurrence of *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920 in the state of Ceará, Brazil, in naturally infected triatomine *Rhodnius nasutus* Stal, 1859 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). Mem Inst Oswaldo Cruz, 2007; 102(5): 643-645.

Dias JCP. Prioridades de pesquisa no controle da doença de Chagas. Rev. Soc. Bras. Med. Trop., 1995; 28:23–26.

Dias JCP. Vigilância epidemiológica em doença de Chagas. Cad. Saúde Pública 2000; 16(2):43-59.

Dias JCP. Controle da doença de Chagas no Brasil. In: Silveira AC, Arias AR, Segura E, Guillén G, Russomando G, Schenone H et al. O controle da doença de Chagas nos países do cone sul da América: História de uma iniciativa internacional 1991/2001. Uberaba: Faculdade de Medicina do Triangulo Mineiro. 2002: 145-230.

Dias JCP, Silveira AC, Schofield CJ. The Impact of Chagas Disease Control in Latin America - A Review. Mem Inst Oswaldo Cruz, 2002; 97(5): 603-612.

Dias JCP. Globalization, inequity and Chagas disease. Cad. Saude Publica 2007; 23(1):13–22.

Dias JCP, Bastos C, Araújo E, Mascarenhas AV, Martins NE, Grassi F, Silva M, Tatto E, Mendonça J, Araújo RF, Shikanai-Yasuda MA, Aras R. Acute Chagas disease outbreak associated with oral transmission. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 2008; 41(3).

Dias JCP, Amato Neto V. Prevention concerning the different alternative routes for transmission of *Trypanosoma cruzi* in Brazil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 2011; 44(2): 68–72.

Dias JCP, Borges-Pereira J, Macedo VO. Doenças de Chagas. In: Coura, J.R. (Ed.), *Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias*. 2ªed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013.

Diaz C, Nussenzweig V, Gonzalez A. An improved polymerase chain reaction assay to detect *Trypanosoma cruzi* in blood. *Am J Trop Med Hyg.*, 1992; 46(5): 616-623.

Dorn PL, Engelke D, Rodas A, Rosales R, Melgar S, Brahney B. Utility of the polymerase chain reaction in detection of *Trypanosoma cruzi* in Guatemalan Chagas' disease vectors. *Am J Trop Med Hyg.*, 1999; 60 (5):740-5.

Dos Santos-Rodrigues I. Diversidade genotípica de *Trypanosoma cruzi* em pacientes acometidos com a doença de chagas crônica em uma coorte do Brasil. Dissertação [Mestrado em Biologia Molecular e Celular] – Instituto Oswaldo Cruz; 2015.

Duffy T, Bisio M, Altcheh J, Burgos JM, Diez M, Levin MJ, et al. Accurate Real-Time PCR Strategy for Monitoring Bloodstream Parasitic Loads in Chagas Disease Patients. *PLoS Negl Trop Dis*, 2009; 3(4):e419.

Duffy T, Cura CI, Ramirez JC, Abate T, Cayo NM, Parrado R, et al. Analytical Performance of a Multiplex Real-Time PCR Assay Using TaqMan Probes for Quantification of *Trypanosoma cruzi* Satellite DNA in Blood Samples. *PLoS Negl Trop Dis*, 2013; 7(1):e2000.

Dvorak JA, Hartman DL, Miles MA. *Trypanosoma cruzi*: correlation of growth kinetics to zymodeme type in clones derived from various sources. *J. Protozool.*, 1980; 27:472–474.

Eichler S, Schaub GA. The effects of aposymbiosis and of an infection with *Blastocrithidia triatomae* (Trypanosomatidae) on the tracheal system of the reduviid bugs *Rhodnius prolixus* and *Triatoma infestans*. *J. Insect Physiol.*, 1998; 44:131-140.

Elias MC, Vargas N, Zingales B, Schenkman S. Organization of satellite DNA in the genome of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol*, 2003; 129:1–9.

Elias MC, Vargas N, Tomazi L, Pedroso A, Zingales B, Schenkman S, et al. Comparative analysis of genomic sequences suggests that *Trypanosoma cruzi* CL Brener contains two sets of non-intercalated repeats of satellite DNA that correspond to *T. cruzi* I and *T. cruzi* II types. *Mol Biochem Parasitol*, 2005; 140:221–227.

El-Sayed NM, Myler PJ, Bartholomeu DC, Nilsson D, Aggarwal G, Than NA, et al. The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. *Science*, 2005; 309:409-415.

Fernandes O, Mangia RH, Lisboa CV, Pinho AP, Morel CM, Zingales B, et al. The complexity of the sylvatic cycle of *Trypanosoma cruzi* in Rio de Janeiro state (Brazil) revealed by the nontranscribed spacer of the mini-exon gene. *Parasitology*, 1999; 118: 161–166.

Ferreira LF, Britto C, Cardoso MA, Fernandes O, Reinhard K, Araújo A. Paleoparasitology of Chagas disease revealed by infected tissues from Chilean mummies. *Acta Trop*, 2000; 75:79-84.

Ferreira ILM, Silva TPT. Eliminação da transmissão da doença de Chagas pelo *Triatoma infestans* no Brasil: um fato histórico. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, 2006; 39(5):507-509.

Ferreira LL, Lorenzo MG, Elliot SL, Guarneri AA. A standardizable protocol for infection of *Rhodnius prolixus* with *Trypanosoma rangeli*, which mimics natural infections and reveals physiological effects of infection upon the insect. *J. Invert. Pathol.*, 2010; 105:91-97.

Forattini OP. Biogeografia, origem e distribuição da domiciliação de triatomíneos no Brasil. *Rev. Saude Publ.*, 1980; 14:285–299.

Forattini OP, Barata JMS, Santos JLF, Silveira AC. Hábitos alimentares, infecção natural e distribuição de triatomíneos domiciliados na Região Nordeste do Brasil. *Rev Saúde Pública*, 1981;15:113-64.

Freitas SP, Freitas AL, Prazeres SM, Gonçalves TC. Influence of anthropic habits in the dispersion of *Triatoma pseudomaculata* Corrêa & Espínola, 1964 through *Mimosa tenuiflora* (Willdenow) (Mimosaceae) in the State of Ceará, Brazil. *Cad Saúde Publica*, 2004; 20:333-6.

Freitas SP, Lorosa ES, Rodrigues DCS, Freitas ALC, Gonçalves TCM. Feeding patterns of *Triatoma pseudomaculata* in the state of Ceará, Brazil. *Rev Saúde Pública*, 2005; 39(1):27-32.

Freitas JM, Augusto-Pinto L, Pimenta JR, Bastos-Rodrigues L, Gonçalves VF, Teixeira SM, et al. Ancestral genomes, sex and the population structure of *Trypanosoma cruzi*. *PLoS Pathog* 2006; 2:e24.

Galvão C. Série Zoologia: guias e manuais de identificação. Vetores da doença de chagas no Brasil. Curitiba: Scielo-Sociedade B; 2015.

Garcia ES, Azambuja P. Development and interaction of *Trypanosoma cruzi* within the insect vector. *Parasitol. Today*, 1991; 7:240–244.

Garcia ES, Gonzalez MS, Flawia HM, Azambuja P. Development and interaction of *Trypanosoma cruzi* within the insect vector: some facts and ideas. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 1993; 88:11–12.

Garcia MH, Souza L, De Souza RCM, Paula AS, Borges EC, Barbosa SE, et al. Occurrence and variability of *Panstrongylus lutzi* in the State of Ceará, Brazil. Rev. Soc. Bras. Med. Trop., 2005; 38(5):410-415.

Garcia ES, Ratcliffe NA, Whitten MM, Gonzalez MS, Azambuja P. Exploring the role of insect host factors in the dynamics of *Trypanosoma cruzi* – *Rhodnius prolixus* interactions. J. Insect Physiol., 2007; 53:11–21.

Garcia HM, Magalhães LCG, Aurea AP, Dos Santos CF, De Almeida RF. Epidemiologia das doenças negligenciadas no Brasil e gastos federais com medicamentos. Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada, 2011.

Gaunt M, Miles M. The ecotopes and evolution of triatomine bugs (Triatominae) and their associated trypanosomes. Mem Inst Oswaldo Cruz 2000; 95:557-565.

Gaunt MW, Miles MA. An insect molecular clock dates the origin of the insects and accords with palaeontological and biogeographic landmarks. Mol Biol Evol, 2002; 19:748–761.

Gaunt MW, Yeo M, Frame IA, Stothard JR, Carrasco HJ, Taylor MC, et al. - Mechanism of genetic exchange in American trypanosomes. Nature, 2003; 421: 936-939.

Gonçalves TCM, Cunha V, Oliveira E de, Jurberg J. Alguns aspectos da biologia de *Triatoma pseudomaculata* Corrêa & Espínola, 1964, em condições de laboratório (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). Mem Inst Oswaldo Cruz, 1997; 92:275-80.

Gonçalves MLC, Araújo A, Ferreira LF. Paleoparasitology in Brazil. Ciência & Saúde Coletiva 2002; 7(1):191–196.

Gregório N, Ratcliffe NA. The distribution of agglutinins and lytic activity against *Trypanosoma rangeli* and erythrocytes in *Rhodnius prolixus* and *Triatoma infestans* tissue extracts and haemolymph. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 1991; 86:181-186.

Grijalva MJ, Terán D, Dangles O. Dynamics of Sylvatic Chagas Disease Vectors in Coastal Ecuador Is Driven by Changes in Land Cover. PLOS Negl Trop Dis. 2014; 8(6): e2960.

Grisard EC, Steindel M, Guarneri AA, Eger-Mangrich I, Campbell DA, Romanha AJ. Characterization of *Trypanosoma rangeli* strains isolated in Central and South America: an overview. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 1999; 94: 203-209.

Groot H. Estudios sobre los trypanosomas humanos (*T. rangeli* y *T. ariarii*). Ann. Soc. biol. Bogotá, 1954; 6:109-126.

Guhl F, Jaramillo C, Yockteng R, Vallejo GA, Cardenas-Arroyo F. *T. cruzi* DNA in human mummies. Lancet 1997; 349:1370.

Guhl F, Jaramillo C, Vallejo GA, Yockteng R, Cardenas-Arroyo F, Fornaciari G, Arriaza B, Aufderheide AC. Isolation of *T. cruzi* DNA in 4.000-year-old mummified human tissue from northern Chile. *Am J Phys Anthropol* 1999; 108:401-407.

Guhl F, Jaramillo C, Vallejo GA, Cardenas-Arroyo F, Aufderheide A. Chagas disease and human migration. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2000; 95:553-555.

Guhl F, Jaramillo C, Carranza JC, Vallejo GA. Molecular Characterization and Diagnosis of *Trypanosoma cruzi* and *T. rangeli*. *Archives of Medical Research.*, 2002; 33:362–370.

Guhl F, Vallejo GA - *Trypanosoma (Herpetosoma) rangeli* Tejera, 1920: an updated review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 2003; 98: 435-442.

Gumiel M, Da Mota FF, Rizzo VS, Sarquis O, De Castro DP, Lima MM, et al. Characterization of the microbiota in the guts of *Triatoma brasiliensis* and *Triatoma pseudomaculata* infected by *Trypanosoma cruzi* in natural conditions using culture independent methods. *Parasites & Vectors*, 2015; 8:245.

Gurgel Gonçalves R, Ramalho ED, Duarte MA, Palma ART, Abad-franch F, Carranza JC, et al Enzootic transmission of *Trypanosoma cruzi* and *T. rangeli* in the Federal District of Brazil. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo*, 2004; 46(6):323-330

Gurgel Gonçalves R, Galvão C, Costa J, Peterson AT. Geographic distribution of chagas disease vectors in Brazil based on ecological niche modeling. *Journal of Tropical Medicine*, 2012.

Gurgel Gonçalves R, Galvão C, Mendonça J, Costa Neto EM. Guia de triatomíneos da Bahia. Feira de Santana: UEFS Editora, 2012.

Hecker H, Schwarzenbach M, Rudin W. Development and interactions of *Trypanosoma rangeli* in and with the reduviid bug, *Rhodnius prolixus*. *Parasitol Res*, 1990; 76:311-318.

Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM. Real time quantitative PCR. *Genome Res.*, 1996; 6(10):986-94.

Herrera CP, Licon MH, Nation CS, Jameson SB, Wesson DM. Genotypediversity of *Trypanosoma cruzi* in small rodents and *Triatoma sanguisuga* from arural area in New Orleans, Louisiana. *Parasites Vectors*, 2015; 8:123.

Herrera L, D'Andrea PS, Xavier SC, Mangia RH, Fernandes O, Jansen AM. *Trypanosoma cruzi* infection in wild mammals of the National Park 'Serra da Capivara' and its surroundings (Piauí, Brazil), an area endemic for Chagas disease. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 2005; 99:379–388.

Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology (N Y)*. 1993; 11(9):1026-30.

Hoare CA. The trypanosomes of mammals: a zoological monograph. Oxford: Blackwell Scientific Publications; 1972.

Holland PM, Abramson RD, Watson R, Gelfand DH. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5' → 3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 1991; 88:7276-7280.

Hollingsworth TD, Adams ER, Anderson RM, Atkins K, Bartsch S, Basáñez MG, et al. Quantitative analyses and modelling to support achievement of the 2020 goals for nine neglected tropical diseases. Parasites & Vectors, 2015; 8:630.

Lenne S, Pedrosa A, Carmona E, Ferreira R, Briones MR, Zingales B. Network genealogy of 195-bp satellite DNA supports the superimposed hybridization hypothesis of *Trypanosoma cruzi* evolutionary pattern. Infection, Genetics and Evolution, 2010; 10:601–606.

Jansen AM, Xavier SCC, Roque ALR. The multiple and complex and changeable scenarios of the *Trypanosoma cruzi* transmission cycle in the sylvatic environment. Acta Tropica, 2015; 151:1–15.

Junqueira ACV, Degraive W, Brandão A. Minicircle organization and diversity in *Trypanosoma cruzi* populations. Trends in Parasitology, 2005; 21(6):270-272.

Jurberg J, Galvão C, Noireau F, Carcavallo R, Rocha DS, Lent H. Uma iconografia dos triatomíneos: (Hemiptera: Reduviidae). Rio de Janeiro: Gama Filho; 2005. 51 p.

Jurberg J, Cunha V, Cailleaux S, Raigorodski R, Lima MS, Rocha DS, et al. *Triatoma pintodiasi* sp. nov. do subcomplexo *T. rubrovaria*. Rev Pan-Amaz Saude, 2013; 4(1):43-56

Jurberg J, Rodrigues JMS, Moreira FFF, Dale C, Cordeiro IRS, Lamas JR VD, Galvão C, Rocha DS. Atlas iconográfico dos triatomíneos do Brasil (vetores da doença de Chagas). Rio de Janeiro: FIOCRUZ; 2014.

Klingbeil MM, Drew ME, Liu Y, Morris JC, Motyka SA, Saxowsky ZW et al. Unlocking the secrets of trypanosome kinetoplast DNA network replication. Protist 2001; 152: 255-262.

Klingbeil MM, Englund PT. Closing the gaps in kinetoplast DNA network replication. PNAS 2004; 101(13):4333-4334.

Kollien AH, Schaub GA. *Trypanosoma cruzi* in the rectum of the bug *Triatoma infestans*: effects of blood ingestion by the starved vector. Am J Trop Med Hyg, 1998; 59: 166–170.

Kropf SP. Doença de Chagas, doença do Brasil: ciência, saúde e nação, 1909 – 1962. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2009.

Lake P, Friend WG. A monoxenic relationship, *Nocardia rhodnii* Erikson in the gut of *Rhodnius prolixus* Stal (Hemiptera: Reduviidae). P. Entomol. Soc. Ontario, 1967; 98:53-57.

Lenko K, Papavero N. Insetos no Folclore. Série Conselho Estadual de Artes e Ciências Humanas. São Paulo: Coleções Folclore, 1979; 18.

Lent H, Wygodzinsky P. Revision of the Triatominae (Hemiptera, Reduviidae), and their significance as vectors of Chagas disease. Bull Amer Mus. Nat. Hist., 1979; 163: 127-520.

Lent H, Wygodzinsky P. *Triatoma rubrovaria* (Blanchard) in Revision of the Triatominae (Hemiptera, Reduviidae) and their significance as vectors of Chagas Disease. Bulletin of the American Museum of Natural History, 1979; 163: 123-529.

Liarte DB. Desenvolvimento de uma PCR Multiplex capaz de detectar e classificar cepas de *Trypanosoma Cruzi* em amostras clínicas e de campo. Dissertação [Mestrado em Biologia Molecular e Celular] – Centro de Pesquisas René Rachou – Fundação Oswaldo Cruz; 2006.

Lima L. Diversidade morfológica, biológica e genética, e relações filogenéticas de tripanossomas de morcegos do Brasil e Moçambique (África). Tese [Doutorado em Ciências] – Instituto de Ciências Biomédicas – Universidade de São Paulo; 2011.

Lima L, Silva FM, Neves L, Attias M, Takata CS, Campaner M, et al. Evolutionary insights from bat trypanosomes: morphological, developmental and phylogenetic evidence of a new species, *Trypanosoma (Schizotrypanum) erneyi* sp. nov, in African bats closely related to *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* and allied species. Protist 163, 2012; 856–872.

Lima L, Espinosa-Álvarez O, Ortiz PA, Trejo-Varón JA, Carranza JC, Pinto CM, et al. Genetic diversity of *Trypanosoma cruzi* in bats, and multilocus phylogenetic and phylogeographical analyses supporting TcBat as an independent DTU (discrete typing unit). Acta Trop., 2015; 151:166-177.

Lima MM, Sarquis O, De Oliveira TG, Gomes TF, Coutinho C, Daflon-Teixeira NF, et al. Investigation of Chagas disease in four periurban areas in northeastern Brazil: epidemiologic survey in man, vectors, non-human hosts and reservoirs. Trans R Soc Trop Med Hyg., 2012;106(3):143-9.

Lima VS, Xavier SCC, Maldonado IFR, Roque ALR, Vicente ACP, Jansen AM. Expanding the knowledge of the geographic distribution of *Trypanosoma cruzi* TcII and TcV/TcVI Genotypes in the Brazilian Amazon. PLoS One, 2014; 9 (12):e116137.

Lisboa CV, Mangia RH, Luz SL, Kluczkowski A, Jr. Ferreira LF, Ribeiro CT, et al. Stable infection of primates with *Trypanosoma cruzi* I and II. Parasitology, 2006; 133:603–611.

Lisboa CV, Pinho AP, Monteiro RV, Jansen AM. *Trypanosoma cruzi* (kinetoplastida Trypanosomatidae): biological heterogeneity in the isolates derived from wild hosts. *Exp. Parasitol.*, 2007; 116:150–155.

Lisboa CV, Pinho AP, m HM, Gerhardt M, Cupolillo E, Jansen AM. *Trypanosoma cruzi* (Kinetoplastida, Trypanosomatidae) genotypes in neotropical bats in Brazil. *Veterinary Parasitology*, 2008; 156:314–318.

Liu B, Liu Y, Motyka SA, Agbo EEC, Englund PT. Fellowship of the rings: the replication of kinetoplast DNA. *TRENDS in Parasitology*. 2005; 21(8):365-369.

Llewellyn MS, Lewis MD, Acosta N, Yeo M, Carrasco HJ, Segovia M, et al. *Trypanosoma cruzi* IIc: phylogenetic and phylogeographic insights from sequence and microsatellite analysis and potential impact on emergent Chagas disease. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, 2009; 3:e510.

Lorosa ES, Santos CM, Jurberg J. Foco de doença de Chagas em São Fidélis, no estado do Rio de Janeiro. *Rev Soc Bras Med Trop*, 2008; 41(4): 419-420.

Luquetti AO, Rassi A. Diagnóstico laboratorial da Infecção pelo *Trypanosoma cruzi*. In: Brener Z, Andrade ZA, Barral-Neto M. (Org). *Trypanosoma cruzi* e a Doença de Chagas. 2ªed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2000.

Macedo AM, Machado CR, Oliveira RP, Pena SDJ. -*Trypanosoma cruzi*: genetic structure of populations and relevance of genetic variability to the pathogenesis of Chagas disease. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 2004; 99: 1-12.

Machado EM, Alvarenga NJ, Romanha AJ, Grisard EC. A simplified method for sample collection and DNA isolation for polymerase chain reaction detection of *Trypanosoma rangeli* and *Trypanosoma cruzi* in triatomine vectors. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.*, 2000; 95(6):863-866.

.Madden M, Salo WL, Streitz J, Aufderheide A, Fornaciari G, Jaramillo C, Vallejo GA, Yockteng R, Arriaza B, Cardenas-Arroyo F, Guhl F. Hybridization screening of very short PCR products for paleoepidemiological studies of Chagas disease. *Biotechniques* 2001; 30:102-104.

Maddrell SH. Excretion in the Blood-Sucking Bug, *Rhodnius Prolixus* Stal. II. The Normal Course of Diuresis and the Effect of Temperature. *J Exp Biol*, 1964; 41:163–176.

Maffey L, Cardinal MV, Ordóñez-Krasnowski PC, Lanati LA, Lauricella MA, Schijman AG, et al. Direct molecular identification of *Trypanosoma cruzi* Discrete Typing Units in domestic and peridomestic *Triatoma infestans* and *Triatoma sordida* from the Argentine Chaco. *Parasitology*, 2012; 139(12):1570–1579.

Marcet PL, Duffy T, Cardinal MV, Burgos JM, Lauricella MA, Levin MJ et al. PCR-based screening and lineage identification of *Trypanosoma cruzi* directly from faecal samples of triatomine bugs from northwestern Argentina. *Parasitology*. January, 2006; 132(1):57–65.

Marcili A, Lima M, Cavazzana J, Junqueira ACV, Veludo HH, Maia da Silva F, et al. A new genotype of *Trypanosoma cruzi* associated with bats evidenced by phylogenetic analyses using SSU rDNA, cytochrome b and Histone H2B genes and genotyping based on ITS1 rDNA. *Parasitology*, 2009a; 136:641–655.

Marcili A, Lima L, Valente VC, Valente SA, Batista JS, Junqueira AC, et al. Comparative phylogeography of *Trypanosoma cruzi* TCIc: new hosts, association with terrestrial ecotopes, and spatial clustering. *Infect. Genet. Evol.*, 2009b; 9:1265–1274.

Marcili A, Valente VC, Valente SA, Junqueira AC, da Silva FM, Pinto AY, et al. *Trypanosoma cruzi* in Brazilian Amazonia: Lineages TCI and TCIIa in wild primates, *Rhodnius* spp. and in humans with Chagas disease associated with oral transmission. *Int. J. Parasitol.*, 2009c; 39:615–623.

Marcon, GEB, Albuquerque DM, Batista AM, Andrade PD, Almeida EA, Guariento ME, et al. *Trypanosoma cruzi*: parasite persistence in tissues in chronic chagasic Brazilian patients. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 2011; 106(1): 85-91.

Marinkelle CJ. Pathogenicity of *Trypanosoma rangeli* for *Rhodnius prolixus* Stal in nature (Hemiptera: Reduviidae) (Kinetoplastida: Trypanosomatidae). *J. Med. Entomol.*, 1968; 5:497-499.

Marinkelle CJ. Colombian triatominae and their infestation with trypanosomatid flagellates. *Mitt-Inst Colombo-Alemán. Invest Cient*, 1972; 6:11–30.

Marinkelle CJ. Biology of the trypanosomes of bats. In: Lumsden WHR, Evans DA, editors. *Biology of the Kinetoplastida*. Academic Press; 1976; 175–216.

Marinkelle CJ. Developmental stages of *Trypanosoma cruzi*-like flagellates in *Cavernicola pilosa*. *Rev Biol Trop*. 1982; 30:107–111.

Martinez I, Rosa JA. Characterization of two strains of *Trypanosoma cruzi* Chagas, 1909 (Kinetoplastida, Trypanosomatidae) isolated from specimens of *Triatoma rubrovaria* (Blanchard, 1843) (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) collected in wild environment. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 2003; 45(13):161.

Martinez, I. Caracterização de duas cepas de *Trypanosoma cruzi* Chagas, 1909 (Kinetoplastida, Trypanosomatidae) isoladas de exemplares de *Triatoma rubrovaria* (Blanchard, 1843) (Hemiptera, Reduviidae) coletados em ambiente silvestre. 98f. Tese [Doutorado] – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, Araraquara, 2004.

Martins C, Baptista CS, Ienne S, Cerqueira GC, Bartholomeu DC, Zingales B. Genomic organization and transcription analysis of the 195-bp satellite DNA in *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol*, 2008; 160:60–64.

Martins LPA, Castanho REP, Casanova C, Caravelas DT, Frias GT, Ruas-Neto AL, et al. Rupestrian triatomines infected by Trypanosomatidae, collected in Quaraí, Rio Grande do Sul, 2003. *Rev Soc Bras Med Trop*, 2003; 39(2):198-202.

Martins LPA. Isolamento e caracterização de cepas de *Trypanosoma cruzi* Chagas, 1909 (Kinetoplastida, Trypanosomatidae) a partir de triatomíneos silvestres do Estado do Rio

Grande do Sul. Tese [Doutorado em Análises Clínicas] – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho; 2005.

Martins K, Andrade CM, Barbosa-Silva AN, Nascimento GB, Galvão ECLMC, Câmara ACJ. *Trypanosoma cruzi* III causing the indeterminate form of Chagas disease in a semi-arid region of Brazil. *Int J Infect Dis* 2015; 39:68–75.

Martins-Melo FR, Alencar CH, JR ANR, Heukelbach J. Epidemiology of mortality related to Chagas' disease in Brazil, 1999–2007. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2012a; 6:e1508.

Martins-Melo FR, Ramos JR NA, Alencar CH, Heukelbach, J. Mortality due to Chagas disease in Brazil from 1979 to 2009: trends and regional differences. *J. Infect. Dev. Ctries.* 2012b; 6:817–824.

Martins-Melo FR, Ramos JR AN, Alencar CH, Lange W, Heukelbach, J. Mortality of Chagas' disease in Brazil: spatial patterns and definition of high-risk areas. *Trop. Med. Int. Health*, 2012c; 17:1066–1075.

Martins-Melo FR, JR ANR, Alencar CH, Heubelbach J. Prevalence of Chagas disease in Brazil: A systematic review and meta-analysis. *Acta Trop*, 2014; 130:167–174

McDaniel JP, Dvorak JA. Identification, isolation, and characterization of naturally occurring *Trypanosoma cruzi* variants. *Mol Biochem Parasitol.* 1993; 57:213-222.

Medrano-Mercado N, Ugarte-Fernandez R, Butron V, Uber-Busek S, Guerra HL, et al. (2008) Urban transmission of Chagas disease in Cochabamba, Bolivia. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 103: 423–430.

Mello CB, Azambuja P, Garcia ES, Ratcliffe NA. Differential in vitro and in vivo behaviour of three strains of *Trypanosoma cruzi* in the gut and hemolymph of *Rhodnius prolixus*. *Exp. Parasitol.*, 1996; 82:112–121.

Melo MF, Moreira OC, Tenório P, Lorena V, Lorena-Rezende I, Oliveira Júnior W, et al. Usefulness of real time PCR to quantify parasite load in serum samples from chronic Chagas disease patients. *Parasites & Vectors* 2015; 8:154.

Mello CB, Azambuja P, Garcia ES, Ratcliffe NA. Differential in vitro and in vivo behavior of three strains of *Trypanosoma cruzi* in the gut and hemolymph of *Rhodnius prolixus*. *Exp Parasitol*, 1996; 82: 112–121.

Meneses AJM. *Trypanosoma rangeli*: Lo que se conoce y el impacto de su presencia. *MedUNAB*, 2004; 7:166-171.

Messias AC Vivendo com os insetos: Barbeiros. 22ªed. Rio de Janeiro: Biomanguinhos/FIOCRUZ; 2011.

Miles MA, Souza A, Pova M, Shaw JJ, Lainson R, Toye PJ. Isozymic heterogeneity of *Trypanosoma cruzi* in the first autochthonous patients with Chagas disease in Amazonian Brazil. *Nature* ,1978; 272:819-821.

Miles MA, Lanham SM, Souza AA, Póvoa M. Further enzymic characters of *Trypanosoma cruzi* and their evaluation for strain identification. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 1980; 74:221-237.

Miles MA, Cedillos RA, Povoá MM, de Souza AA, Prata A, Macedo V. Do radically dissimilar *Trypanosoma cruzi* strains (zymodemes) cause Venezuelan and Brazilian forms of Chagas' disease? Lancet, 1981; 1:1338–1340.

Miles MA, Feliciangeli MD, Rojas de Arias A. American trypanosomiasis (Chagas disease) and the role of molecular epidemiology in guiding control strategies. Brit. med. J., 2003; 326: 1444-1448.

Miles MA, Llewellyn MS, Lewis MD, Yeo M, Baleela R, Fitzpatrick S, et al. The molecular epidemiology and phylogeography of *Trypanosoma cruzi* and parallel research on *Leishmania*: looking back and to the future. Parasitology., 2009; 136:1509–1528.

Molyneaux D. Division of the human trypanosome, *Trypanosoma (Herpetosoma) rangeli*. Ann Trop Med Parasitol, 1973; 67:371-2.

Monteiro WM, Magalhães LKC, De Sá ARN, Gomes ML, Toledo MJO, Borges L, et al. *Trypanosoma cruzi* IV Causing Outbreaks of Acute Chagas Disease and Infections by Different Haplotypes in the Western Brazilian Amazonia. PLoS ONE, 2012; 7(7):e41284.

Mora MC, Sanchez Negrette O, Marco D, Barrio A, Ciaccio M, Segura MA, et al. Early diagnosis of congenital *Trypanosoma cruzi* infection using PCR, hemoculture, and capillary concentration, as compared with delayed serology. J Parasitol., 2005; 91(6):1468-73.

Moraes-Souza H, Ferreira-Silva MM. Control of transfusional transmission. Rev Soc Bras Med Trop, 2011; 44(2):64–67.

Moreira OC, Ramírez JD, Velázquez E, Melo MF, Lima-Ferreira C, Guhl F, et al. Towards the establishment of a consensus real-time qPCR to monitor *Trypanosoma cruzi* parasitemia in patients with chronic Chagas disease cardiomyopathy: a substudy from the BENEFIT trial. Acta Trop., 2013; 125(1):23-31.

Morel C, Chiari E, Camargo P, Mattei DM, Romanha AJ, Simpson L. Strains and clones of *Trypanosoma cruzi* can be characterized by pattern of restriction endonuclease products of kinetoplast DNA minicircle. Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America 1980; 77(11):6810-6814.

Moser DR, Kirshhoff LV, Donelson JE. Detection of *Trypanosoma cruzi* by DNA Amplification Using the Polymerase Chain Reaction. Journal of Clinical Microbiology, July, 1989; 27(7):1477-1482.

Neves NS, Clausell DT, Nólíbos H, De Mello AL, Ossanai J, Rapone T, Snell T. Surto epidêmico de doença de Chagas com provável contaminação oral. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo. 1968; 10:265-276.

Neves SCT. Análises morfológicas, morfométricas e moleculares revelam uma nova espécie do gênero *Triatoma* do Estado do Tocantins, Brasil. Dissertação [Mestrado em Biologia Parasitária] – Instituto Oswaldo Cruz; 2012.

Nóbrega AA, Garcia MH, Tatto E, Obara MT, Costa E., Sobel J., Araujo WN. Oral transmission of Chagas disease by consumption of açai palm fruit, Brazil. *Emerg. Infect. Dis.* 2009;15(4):653–655.

Novais CM. PCR em tempo real: Uma inovação tecnológica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). *Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*, 2004; 33:10-13.

Ochsenreiter T, Cipriano M, Hajduk SL. KISS: The kinetoplastid RNA editing sequence search tool. *RNA* 2007; 13:1-4.

Olivares-Villagómez D, Mccurley TL, Vnencak-Jones CL, Correa-Oliveira R, Colley DG, Carter CE Polymerase Chain Reaction amplification of three different *Trypanosoma cruzi* DNA sequences from human chagasic cardiac tissue. *Am J Trop Med Hyg.*, 1998; 59(4): 563-570.

Oliveira MF, Silva JR, Dansa-Petretski M, de Souza W, Lins U, Braga CMS, et al. Haem detoxification by na insect. *Nature*, 1999; 400:517–518.

Oliveira-Lima JW, Filho OFF, Vieira JBF, Gadelha FV, Oliveira Filho AM. Peridomiliary changes and implications for *Triatoma brasiliensis* control. 2000. *Cad. Saúde Pública*, Rio de Janeiro, 16(Sup. 2):75-81.

Oliveira RL. Principais insetos vetores e mecanismos de transmissão das doenças infecciosas e parasitárias. In: Coura, J.R. (Ed.), *Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias*. 2ªed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013.

Organização Mundial da Saúde (OMS). *Control of Chagas disease.*, Geneva: WHO; 2002.

Organização Mundial da Saúde (OMS). *Chagas disease: control and elimination.* Geneva: WHO; 2008.

Organização Mundial da Saúde (OMS). *Working to over come the global impact of neglected tropical diseases.* Geneva: WHO; 2010[Acesso em 12 nov 2015]. Disponível em: <http://www.vargfakta.se/wp-content/uploads/2011/09/WHO-neglected-tropical-diseases-2010.pdf>.

Organização Mundial da Saúde (OMS). *Chagas disease.* Geneva: WHO; 2015[Acesso em 04 out 2015]. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/index.html>.

Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS). *Chagas disease.* 2014[Acesso em 04 out 2015]. Disponível em: <http://www.paho.org/world-health-day-2014/wp-content/uploads/2014/04/Chagas.pdf>.

Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS). *Doença de Chagas: Módulo III.* 2015 [Acesso em 01 dez 2015]. Disponível em:

http://www.paho.org/bra/index.php?option=com_docman&task=doc_view&gid=820&Itemid=614.

Osorio Y, Travi BL, Palma GI, Saravia NG. Infectivity of *Trypanosoma rangeli* in a promonocytic mammalian cell line. *J Parasitol*, 1995; 81:687-93.

Ostermayer AL, Passos ADC, Silveira AC, Ferreira AW, Macedo V, Prata AR. The national survey of seroprevalence for evaluation of the control of Chagas disease in Brazil (2001–2008). *Rev Soc Bras Med Trop*, 2011; 44(2):108–121.

Pacheco RS, De Brito CM, Sarquis O, Pires MQ, Borges-Pereira J, Lima MM. Genetic heterogeneity in *Trypanosoma cruzi* strains from naturally infected triatomine vectors in northeastern Brazil: epidemiological implications. *Biochem Genet.*, 2005; 43(9-10):519-30.

Paláu MT, Montilla M, Zúñiga CA. Estudio del comportamiento de dos cepas de *Trypanosoma rangeli*. *MedUNAB*, 2001; 4:166-72.

Pereira KS, Schmidt FL, Guaraldo AM, Franco RM, Dias VL, Passos LA. Chagas disease as a foodborne illness. *J Food Prot*, 2009; 72: 441–46.

Perlowagora-Szumlewicz A, Müller CA, Moreira CJ. Studies in search of a suitable experimental insect model for xenodiagnosis of hosts with Chagas disease. The reflection of parasite stock in the responsiveness of different vector species to chronic infection with different *Trypanosoma cruzi* stocks. *Rev. Saúde Pública*, 1990; 24:165–177.

Perlowagora-Szumlewicz A, Moreira CJ. In vitro differentiation of *Trypanosoma cruzi*. Experimental evidence of the influence of vector species on metacyclogenesis. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 1994; 89:603–618.

Pessoa GCD, Rosa ACL, Bedin C, Wilhelms T, Mello F, Coutinho HS et al. Susceptibility characterization of residual Brazilian populations of *Triatoma infestans* Klug, 1834 (Hemiptera: Reduviidae) to deltamethrin pyrethroid. *Rev Soc Bras Med Trop* 2015; 48(2):157-161.

Pimentel CFR. Herança de seqüências de minicírculos de kDNA integradas no genoma de células germinativas com persistência de nDNA de *Trypanosoma cruzi*. Dissertação [Mestrado em Patologia Molecular] – Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília; 2012.

Pinho IF. Diagnóstico molecular da infecção natural por *Trypanosoma cruzi* em triatomíneos nativos de área endêmica para doença de Chagas no estado do Ceará. Dissertação [Mestrado em Medicina Tropical] – Instituto Oswaldo Cruz; 2012.

Pinto AYN, Valente AS, Valente VC, Ferreira Junior AG, Coura JR. Fase aguda da doença de Chagas na Amazônia brasileira. Estudo de 233 casos do Pará, Amapá e Maranhão observados entre 1988 e 1995. *Rev Soc Bras Med Trop*, 2008; 41(6):602-614.

Pinto CM, Kalko EKV, Cottontail I, Wellinghausen N, Cottontail VM. TcBat a bat-exclusive lineage of *Trypanosoma cruzi* in the Panama Canal Zone, with comments on its classification and the use of the 18S rRNA gene for lineage identification. *Infect Genet Evol.* 2012; 12: 1328–1332.

Pinto CM, Ocaña-Mayorga S, Tapia EE, Lobos SE, Zurita AP, Aguirre-Villacís F, et al. Bats, Trypanosomes, and Triatomines in Ecuador: New Insights into the Diversity, Transmission, and Origins of *Trypanosoma cruzi* and Chagas Disease. *PLoS ONE*, 2015; 10(10): e0139999.

Piron M, Fisa R, Casamitjana N, López-Chejade P, Puig L, Vergés M, et al. Development of a real-time PCR assay for *Trypanosoma cruzi* detection in blood samples. *Acta Tropica*, 2007; 103:195–200.

Qvarnstrom Y, Schijman AG, Veron V, Aznar C, Steurer F, da Silva AJ. Sensitive and Specific Detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in Clinical Specimens Using a Multi-Target Real-Time PCR Approach. *PLoS Negl Trop Dis*, 2012; 6(7):e1689.

Ramírez JD, Guhl F, Rendón LM, Rosas F, Marin-Neto JA, Morillo CA. Chagas Cardiomyopathy Manifestations and *Trypanosoma cruzi* Genotypes Circulating in Chronic Chagasic Patients. *PLoS Negl Trop Dis*, 2010; 4(11):e899.

Ramírez JD, Hernandez C, Montilla M, Zambran P, Florez AC, Parra E, et al. First Report of Human *Trypanosoma cruzi* Infection Attributed to TcBat Genotype. *Zoonoses and Public Health*, 2014; 61(7):477–479.

Ramos JR AN, Carvalho DM. Os diferentes significados da certificação conferida ao Brasil como estando livre da doença de Chagas. *Cad. Saúde Pública*, 2001; 17:1403-12.

Ramos JR AN. Inclusion of Chagas' disease reactivation as a condition for AIDS case definition to epidemiological surveillance in Brazil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 2004; 37:192–193.

Ramos JR AN, Martins-Melo FR, Barbosa JC, Heukelbach J.. The role of operational research and the challenges for integration of care and control of Chagas disease in the Brazilian Unified Health System. *Rev Soc Bras Med Trop*, 2010; 43(2):12–17.

Ray DS. Conserved sequence blocks in kinetoplast minicircles from diverse species of Trypanosomes. *Molecular and Cellular Biology* 1989; 9(3):1365-1367.

Requena JM, Lopez MC, Alonso C. Genomic repetitive DNA Elements of *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology today*, 1996; 12:279-282.

Rey L. Parasitologia: parasitos e doenças parasitárias do homem nos trópicos ocidentais. 4ª.ed[Reimpr]. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2011.

Rey L. Protozoários agentes de doenças humanas. In: Coura, J.R. (Ed.), *Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias*. 2ªed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013.

Ribeiro AR, Mendonça VJ, Alves RT, Martinez I, De Araújo RF, Mello F, et al. *Trypanosoma cruzi* strains from triatomine collected in Bahia and Rio Grande do Sul, Brazil. *Rev Saúde Pública*, 2014;48(2):295-302.

Rothhammer F, Allison MJ, Nuñez L, Staden V, Arriza B. Chagas disease in pre - Columbian South America. *Am J Phys Anthropol*, 1985; 68:495-498.

Ruas-Neto AL, Corseuil E. Hábitos, distribuição geográfica e potencialidade dos triatomíneos rupestres como vetores da doença de Chagas no Rio Grande do Sul, Brasil (Hemiptera, Reduviidae: Triatominae). *Entomologia y Vectores*, 2002; 9:231-249.

Russomando G, Arias AR, Almiron M, Figueredo A, Ferreira ME, Morita K. *Trypanosoma cruzi*: polymerase chain reaction based detection in dried feces of *Triatoma infestans*. *Exp Parasit* 1996; 83:62–6.

Rutledge RG, Cote C. Mathematics of quantitative PCR and the applications of standard curves. *Nucleic Acids Research*. 2003; 31:e93.

Sarquis O, Borges-Pereira J, Mac Cord JR, Gomes TF, Cabello PH, Lima MM. Epidemiology of Chagas disease in Jaguaruana, Ceará, Brasil. I. Presence of triatomines and rates of *Trypanosoma cruzi* infection in four localities of a rural area. *Mem Inst Osw Cruz*, 2004; 99: 263-70.

Sarquis O, Carvalho-Costa FA, Oliveira LS, Duarte R, D'Andrea PS, De Oliveira TG, et al. Ecology of *Triatoma brasiliensis* in northeastern Brazil: seasonal distribution, feeding resources, and *Trypanosoma cruzi* infection in a sylvatic population. *Journal of Vector Ecology*, 2010; 35(2):385-394.

Sarquis O, Carvalho-Costa FA, Toma HK, Georg I, Burgoa MR, Lima MM. Eco-epidemiology of Chagas disease in northeastern Brazil: *Triatoma brasiliensis*, *T. pseudomaculata* and *Rhodnius nasutus* in the sylvatic, peridomestic and domestic environments. *Parasitol Res*, 2012; 110:1481–1485.

Schaub GA, Lösch P. Parasite/host-interrelationships of the trypanosomatids *Trypanosoma cruzi* and *Blastocrithidia triatomae* and the reduviid bug *Triatoma infestans*: influence of starvation of the bug. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, 1989; 83:215–223.

Schofield CJ, Diotaiuti L, Dujardin JP. The process of domestication in Triatominae. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1994; 89(I):375-378.

Schofield CJ, Dias JC. The Southern Cone Initiative against Chagas disease. *Adv Parasitol*, 1999; 42:1-27.

Schofield CJ, Diotaiuti L, Dujardin JP. The process of domestication in Triatominae. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 1999; 94(1):375-8.

Schofield CJ, Galvão C. Classification, evolution and species groups within the Triatominae. *Acta Trop.*, 2009 May-Jun; 110(2-3):88-100.

Schrader C, Schielke A, Ellerbroek L, Johne R. PCR inhibitors - occurrence, properties and removal. *J Appl Microbiol*, 2012; 113:1014–1026.

Sherlock IA. Vetores S In: Brener Z, Andrade Z (eds). *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, p. 42-88, 1979.

Shikanai-Yasuda MA, Brisola CM, Guedes LA, Siqueira GS, Barone AA, Dias JCP et al. Possible oral transmission of acute Chagas disease in Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop.* 1991; 33(5):351-7.

Shikanai-Yasuda MA, Carvalho NB. Oral transmission of Chagas disease. *Clin. Infect. Dis.* 2012; 54(6):845-52.

Silber AM, Búa J, Porcel BM, Segura EL, Ruiz AM. *Trypanosoma cruzi*: specific detection of parasites by PCR in infected humans and vectors using a set of primers (BP1:BP2) targeted to a nuclear DNA sequence. *Exp. Parasitol.* 1997; (85):225–232.

Schmunis GA, Yadon ZE. Chagas disease: a Latin American health problem becoming a world health problem. *Acta Trop.*, 2010; 115:14–21.

Silva IG, Luquetti AO, Silva HHG. Importância do método de obtenção das dejeções dos triatomíneos na avaliação da susceptibilidade triatomínica para *Trypanosoma cruzi*. *Rev Soc Bras Med Trop*, 1993; 26:19-24.

Silveira A, Vinhaes M. Elimination of vector-borne transmission of Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 1999; 94(I):405-411.

Silveira AC. Current situation with Chagas disease vector control in the Americas. *Cad. Saúde Pública*, 2000; 16(2):35-42.

Silveira AC. O Controle da Doença de Chagas nos Países do Cone Sul da América: História de uma iniciativa internacional 1991-2001. Brasília: Organização Pan-Americana da Saúde 2002; p.15-43.

Simões AJP, Tupinambá AA. Investigações epidemiológicas sobre a doença de Chagas no Rio Grande do Sul. *Arquivos do Departamento Estadual de Saúde - Rio Grande do Sul*, 1942; (3):143-151.

Simpson L. The genomic organization of guide RNA genes in kinetoplastid protozoa: several conundrums and their solutions. *Mol. Biochem. Parasitol.* 1997; 86:133-141.

Souto RP, Fernandes O, Macedo AM, Campbell DA, Zingales B. DNA markers define two major phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol.* 1996; 83:141-52.

Souza W. Doenças negligenciadas. Rio de Janeiro: Academia Brasileira de Ciências 2010.

Stanaway JD, Roth G. The Burden of Chagas Disease: Estimates and Challenges. *gReview*, 2015; 10(3):139-144.

Stevens JR, Gibson W. The evolution of pathogenic trypanosomes. *Cad Saúde Publica* 1999; 15:673-684.

Sturm NR, Degraeve W, Morel C, Simpson L. Sensitive detection and schizodeme classification of *Trypanosoma cruzi* cells by amplification of kinetoplast minicircle DNA sequences: use in diagnosis of Chagas disease. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 1989; 33(3):205-214.

Sturm NR, Campbell DA. Alternative lifestyles: the population structure of *Trypanosoma cruzi*. *Acta Trop.*, 2010; 115:35–43.

Stevens, J.R.; Gibson, W. The evolution of pathogenic trypanosomes. *Cad Saúde Publica* 1999; 15:673-684.

Tanouraka K, Yanagi T, Matta de García V, Kanbara H. *Trypanosoma rangeli* – *In vitro* metacyclogenesis and fate of metacyclic trypomastigotes after infection to mice and fibroblast cultures. *J Euk Microbiol*, 1989; 46:43-8.

Thomaz S, Martinez IT, Westenberger SJ, Sturm NR. A population study of the minicircles in *Trypanosoma cruzi*: predicting guide RNAs in the absence of empirical RNA editing. *BMC Genomics* 2007; 8(133).

Tibayrenc M, Ward P, Moya A, Ayala FJ. Natural populations of *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease, have a complex multiclonal structure. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1986; 83:115-119.

Tibayrenc M; Ayala FJ. Isozyme variability of *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas' disease: genetical, taxonomical and epidemiological significance. *Evolution*. 1988; 42:277-292.

Tibayrenc M, Ayala FJ. Towards a population genetics of microorganisms: the clonal theory of parasitic protozoa. *Parasitol Today*. 1991; 7:228-232.

Tibayrenc M. Population genetics of parasitic protozoa and other microorganisms. *Adv Parasitol.*, 1995; 36:47-115.

Tibayrenc M. Genetic epidemiology of parasitic protozoa and other infectious agents: the need for an integrated approach. *Int J Parasitol*, 1998; 28: 85-104.

Tobie EJ. Biological factors influencing transmission of *Trypanosoma rangeli* by *Rhodnius prolixus*. *J. Parasitol.*, 1965; 51:837-841.

Tobie EJ. Observation on the development of *Trypanosoma rangeli* in the hemocoel of *Rhodnius prolixus*. *J Invertebr Pathol*, 1970; 16:118-125.

Uehara LA, Moreira OC, Oliveira AC, Azambuja P, Lima APCA, et al. Cruzipain Promotes *Trypanosoma cruzi* Adhesion to *Rhodnius prolixus* Midgut. *PLoS Negl Trop Dis*, 2012; 6(12): e1958.

Valente SAS. Epidemiologia da transmissão oral da doença de Chagas. In: Exposição na mesa redonda Situação atual da doença de Chagas na Amazônia. XLI Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical; 2005. Florianópolis.

Vallejo GA, Guhl F, Chiari E, Macedo AM. Species specific detection of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* in vector and mammalian hosts by polymerase chain reaction amplification of kinetoplast minicircle DNA. *Acta Tropica* 1999; (72):203-212.

Vallejo GA, Guhl F, Carranza JG, Moreno J, Triana O, Grisard EC. et al. - Parity between kinetoplast DNA and mini exon gene sequences support either clonal evolution or speciation in *Trypanosoma rangeli* strains isolated from *Rhodnius colombiensis*, *R. pallescens* and *R. prolixus* in Colombia. *Infect. Gen. Evol.*, 2002; 67: 1-7.

Vargas N, Pedroso A, Zingales B. Chromosomal polymorphism, gene synteny and genome size in *T. cruzi* I and *T. cruzi* II groups. *Mol Biochem Parasitol*, 2004; 138: 131–141.

Velasco AJ, Gómez JR, Agirre X, Barrios M, Navarro G, Enériz ESJ, et al. PCR en tiempo real, una nueva herramienta para la toma de decisiones clínicas. *Haematologica edición española*, 2006; 91(1):27-34.

Verlag U, Verlag F. Unlocking the secrets of Trypanosome kinetoplast DNA network replication. *Protist* 2001; 152:255-62.

Villacis AG, Ocana-Mayorga S, Lascano MS, Yumiseva CA, Baus EG, Grijalva MJ. Abundance, Natural Infection with Trypanosomes, and Food Source of an Endemic Species of Triatomine, *Panstrongylus howardi* (Neiva 1911), on the Ecuadorian Central Coast. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 2015; 92(1):187-192.

Virreira M, Torrico F, Truyens C, Alonso-Vega C, Solano M, Carlier Y, et al. Comparison of Polymerase Chain Reaction methods for reliable and easy detection of congenital *Trypanosoma cruzi* infection. *Am J Trop Med Hyg*, 2003; 68(5): 574-582.

Vitzthum F, Geiger G, Bisswanger H, Brunner H, Bernhagen J. A quantitative fluorescence-based microplate assay for the determination of double-stranded DNA using SYBR Green I and a standard ultraviolet transilluminator gel imaging system. *Anal Biochem.*, 1999; 276(1): 59-64.

Wagner W, So M. Genomic variation of *Trypanosoma cruzi*: Involvement of multicopy genes. *Infect Immun*. 1990; 58(10):3217-3224.

Watkins R. Histology of *Rhodnius prolixus* infected with *Trypanosoma rangeli*. *J Invertebr Pathol.*, 1971;17:59–66.

Westenberger SJ, Cerqueira GC, El-Sayed NM, Zingales B, Campbell DA, Sturm NR. *Trypanosoma cruzi* mitochondrial maxicircles display species and strain-specific variation and a conserved element in the non-coding region. *BMC Genomics* 2006; 62: 30-46.

Wincker P, Britto C, Pereira JB, Cardoso MA, Oelemann W, Morel CM. Use of a simplified polymerase chain reaction procedure to detect *Trypanosoma cruzi* in blood samples from chronic chagasic patients in a rural endemic area. *Am J Trop. Med. Hyg*. 1994; 51:771-777.

Yang S, Rothman RE. PCR-based diagnostics for infectious diseases: uses, limitations, and future applications in acute-care settings. *The Lancet Infectious Diseases*, 2004; 4:337-348.

Zeledón R, Rabinovich JE. Chagas disease: An ecological appraisal with special emphasis on its insect vectors. *Annu Rev Entomol*, 1981; 26: 101-133.

Zingales B, Stolf BS, Souto RP, Fernandes O, Briones MR. Epidemiology, biochemistry and evolution of *Trypanosoma cruzi* lineages based on ribosomal RNA sequences. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 1999; 94:159–164.

Zingales B, Andrade SG, Briones MR, Campbell DA, Chiari E, Fernandes O, et al. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 2009; 104(7):1051-1054.

Zingales B. *Trypanosoma cruzi*: um parasita, dois parasitas ou vários parasitas da doença de chagas? *Revista da Biologia*, 2011; 6b:44-48.

Zingales B, Miles MA, Campbell DA, Tibayrenc M, Macedo AM, Teixeira MM, et al. The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: rationale, epidemiological relevance and research applications. *Infect Genet Evol.*, 2012; 12:240-253.

Zipper H, Brunner H, Bernhagen J, Vitzthum F. Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I, its structure determination and methodological implications. *Nucleic Acids Research*, 2004; 32:e103.

Zúñiga C, Paláu MT, Penin P, Gamallo C, De Diego JA. Characterization of a *Trypanosoma rangeli* strain of Colombian origin. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 1997; 92:523-30.

10 ANEXO



Ministério do Meio Ambiente - MMA
 Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
 Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Licença permanente para coleta de material zoológico

Número: 43394-1	Data da Emissão: 07/05/2014 17:18
Dados do titular	
Nome: Teresa Cristina Monte Gonçalves	CPF: 515.481.607-25
Nome da Instituição : Instituto Oswaldo Cruz - IOC/FIOCRUZ	CNPJ: 33.781.055/0012-98

Observações e ressalvas

1	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passada, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
2	A licença permanente não é válida para: a) coleta ou transporte de espécies que constem nas listas oficiais de espécies ameaçadas de extinção; b) manutenção de espécimes de fauna silvestre em cativeiro; c) recebimento ou envio de material biológico ao exterior; e d) realização de pesquisa em unidade de conservação federal ou em caverna. A restrição prevista no item d não se aplica às categorias Reserva Particular do Patrimônio Natural, Área de Relevante Interesse Ecológico e Área de Proteção Ambiental constituídas por terras privadas.
3	O pesquisador titular da licença permanente, quando acompanhado, deverá registrar a expedição de campo no Sisbio e informar o nome e CPF dos membros da sua equipe, bem como dados da expedição, que constarão no comprovante de registro de expedição para eventual apresentação à fiscalização;
4	Esta licença permanente NÃO exime o pesquisador titular da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor de terra indígena (FUNAI), da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal.
5	Esta licença permanente não poderá ser utilizada para fins comerciais, industriais ou esportivos ou para realização de atividades integrantes do processo de licenciamento ambiental de empreendimentos.
6	Este documento NÃO exime o pesquisador titular da necessidade de atender ao disposto na Instrução Normativa Ibama nº 27/2002, que regulamenta o Sistema Nacional de Anilhamento de Aves Silvestres.
7	O pesquisador titular da licença permanente será responsável pelos atos dos membros da equipe (quando for o caso)
8	O órgão gestor de unidade de conservação estadual, distrital ou municipal poderá, a despeito da licença permanente e das autorizações concedidas pelo ICMBio, estabelecer outras condições para a realização de pesquisa nessas unidades de conservação.
9	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
10	O titular da licença permanente deverá apresentar, anualmente, relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias após o aniversário de emissão da licença permanente.
11	O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando da violação da legislação vigente, ou quando da inadequação, omissão ou falsa descrição de informações relevantes que subsidiaram a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo ICMBio e o material biológico coletado apreendido nos termos da legislação brasileira em vigor.
12	A licença permanente será válida enquanto durar o vínculo empregatício do pesquisador com a instituição científica a qual ele estava vinculado por ocasião da solicitação.
13	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em www.mma.gov.br/cgen .

Táxons autorizados

#	Nível taxonômico	Táxon(s)
1	FAMÍLIA	Reduviidae
2		

Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo Destino
1	Instituto Oswaldo Cruz - IOC/FIOCRUZ	

Este documento (Licença permanente para coleta de material zoológico) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 11824694



Página 1/2



Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Licença permanente para coleta de material zoológico

Número: 43394-1	Data da Emissão: 07/05/2014 17:18
Dados do titular	
Nome: Teresa Cristina Monte Gonçalves	CPF: 515.481.607-25
Nome da Instituição : Instituto Oswaldo Cruz - IOC/FIOCRUZ	CNPJ: 33.781.055/0012-98

Registro de coleta imprevista de material biológico

De acordo com a Instrução Normativa nº154/2007, a coleta imprevista de material biológico ou de substrato não contemplado na autorização ou na licença permanente deverá ser anotada na mesma, em campo específico, por ocasião da coleta, devendo esta coleta imprevista ser comunicada por meio do relatório de atividades. O transporte do material biológico ou do substrato deverá ser acompanhado da autorização ou da licença permanente com a devida anotação. O material biológico coletado de forma imprevista, deverá ser destinado à instituição científica e, depositado, preferencialmente, em coleção biológica científica registrada no Cadastro Nacional de Coleções Biológicas (CCBIO).

Táxon*	Qtde.	Tipo de amostra	Qtde.	Data

* Identificar o espécime no nível taxonômico possível.

Este documento (Licença permanente para coleta de material zoológico) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 11824694



Página 2/2