



UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO
PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL E INFECTOLOGIA
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: PARASITOLOGIA E IMUNOLOGIA APLICADAS

CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA E MOLECULAR DE CEPAS
MEXICANAS DE *Trypanosoma cruzi*

César Gómez Hernández

UBERABA – MG

2010

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

César Gómez Hernández

**CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA E MOLECULAR DE
CEPAS MEXICANAS DE *Trypanosoma cruzi***

**Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação
em Medicina Tropical e Infectologia (Área de
Concentração: Parasitologia e Imunologia Aplicadas)
da Universidade Federal do Triângulo Mineiro como
requisito parcial à obtenção do título de Mestre.**

**Orientador: Prof. Dr. Luis Eduardo Ramírez Giraldo
Co-orientador: Profa. Dra. Eliane Lages Silva**

UBERABA – MG

2010

“Mi propósito no es el de enseñar la manera que cada cual
debe seguir para guiar correctamente su razón...

...solamente es el de mostrar de que manera guió la mía”

(Anónimo)



DEDICATORIA

A mis padres José Luis y Martha Leticia por su motivación, mismo a distancia y extrañando mi presencia, por todo el apoyo incondicional y nunca midiendo los esfuerzos, siempre para que mi formación sea de las mejores.

A mis hermanos Héctor, Sandra y Luis Arturo, por apoyarme siempre y por siempre querer lo mejor para mí.

A Karine, por estar a mi lado siempre que necesitaba, por el estímulo cuando el desánimo venía atona y esforzándose para que extrañara menos mis costumbres, mi ciudad y mi gente. Por preocuparse para que siempre hablara y escribiera mejor el idioma portugués y por toda la ayuda valiosa que fue indispensable para la realización y conclusión de este trabajo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos aqueles que contribuíram e fizeram possível a realização deste trabalho.

Ao Prof. Luis Eduardo Ramírez, meu Orientador quem acreditou em mim quando muitos duvidaram, pela sua amizade e pela disposição em apoiar minhas idéias, muitas vezes “malucas” me fazendo compreender ver devemos tentar para verificar mediante as tentativas que não são possíveis algumas coisas.

A Profa. Eliane minha Co-Orientadora pelas múltiplas contribuições em meus projetos, assim como pela sua sincera amizade.

Aos professores da Pós-Graduação Wendell pela revisão do abstract, a Marlene Cabrine pela revisão gramatical da dissertação, Márcia, André, Luciana, Mário, Virmondes, Eliane que junto ao Prof. Luis Eduardo Ramírez compartilharam seus amplos conhecimentos e experiências que fizeram com que os meus se engrandecessem.

A los profesores del Centro Universitario del Sur, Universidad de Guadalajara, Dr. Antonio Peña, Dr. Alejandro Martínez Ibarra, el Dr. Francisco Trujillo Contreras del Centro Universitario de los Altos, Universidad de Guadalajara, que me apoyaron incondicionalmente y que han confiado en mi.

Aos funcionários do laboratório de Parasitologia, Aparecida Corrêa, Aparecida Dias, Ana Claudia Corrêa, Pollyana e Patrícia. Principalmente a Luciano Paiva que sempre com muita disposição me auxiliou no biotério e na manipulação dos animais durante os experimentos.

Aos colegas da Pós-Graduação Lara e Gabriel que me ajudaram principalmente na parte experimental, Gabriel que me auxiliou na revisão da estatística, Henrique que me ajudou na caracterização genética e padronização de técnicas de biologia molecular.

Sibeli, Marcelo, Gabriel, Rosilene, Keila, Jean, Wendell, Claudia, Ramírez, Eliane, Sandra, Taty, Fernanda, “Jeromim”, Elaine, Rafael pelo companheirismo e pelas maravilhosas e inesquecíveis confraternizações.

Aos Colegas do laboratório de imunologia principalmente a Marcos Vinicius e Juliana pela grande amizade e companheirismo.

A Beatriz Villas Boas pelo apoio no desenvolvimento do projeto de iniciação científica sobre efetividade *in vitro* e pela sua amizade.

A Tia Rosa, a Kelly e a Gisele pelo seu acolhimento e seu apoio nos momentos difíceis aqui no Brasil.

A família de Karine, o Sr. Ricardo, a Sra. Marilene e Ricardo filho, a José William, Maria Claret, Lucas, Taís por sempre ter-me acolhido com grande amabilidade.

Ao Sr. Ricardo e José William pelos belos arremessos nas pescarias inolvidáveis mesmo acontecendo coisas atrapalhadas, eles conseguem ver as coisas sempre de forma diferente e engraçada.

Apoio Financeiro: Programa de estudantes convênio (PEC-PG) do Ministério de Relações Exteriores México–Brasil, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), Fundação de Ensino e Pesquisa de Uberaba (FUNEPU) e Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM), Centro Universitario del Sur (CUSur).

LISTA DE ABREVIATURAS

PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
TcI	<i>T. cruzi</i> I
TcII	<i>T. cruzi</i> II
TcIII	<i>T. cruzi</i> III
TcIV	<i>T. cruzi</i> IV
TcV	<i>T. cruzi</i> V
TcVI	<i>T. cruzi</i> VI
MLEE	<i>Multilocus Enzyme Electrophoresis</i>
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
RAPD	<i>Randomly Amplified Polymorphic DNA</i>
rRNA	RNA Ribossômico
kDNA	DNA do cinetoplasto
UFTM	Universidade Federal do Triângulo Mineiro
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
h	Horas
LIT	<i>Liver Infusion Tryptose</i>
°C	Graus Centígrados
min	Minutos
mL	Mililitros
µL	Microlitros
x g	Aceleração da Gravidade no sistema MKS (9,81m/s ²)
dNTP	Desoxirribonucleotídeos Trifosfatados
V	Volts
Pb	Pares de Bases
MM	Marcador Molecular
fg	Fentograma
ng	Nanograma
mM	Milimolar
MK2	<i>Monkey Kidney 2</i>
VERO CCL-8	Fibroblasto de Rim de Macaco Verde Africano
TAU	<i>Triatomine Artificial Urine</i>

RESUMO

Durante muito tempo foi questionada a importância da doença de Chagas no México onde muitos a consideravam um padecimento exótico. Este fato contribuiu para que a doença não recebesse a atenção necessária, tornando-se endêmica no país, com uma prevalência que pode variar de 1,6 a 5,8%, sendo o Estado de Jalisco, um dos mais acometidos, com uma prevalência de 1,8 a 17,0%. Tanto no país quanto neste Estado casos agudos tem sido relatados, o que é indicativo de transmissão ativa. Considerando a grande diversidade genética existente entre os isolados de *Trypanosoma cruzi*, a importância da caracterização biológica e o escasso número de informações sobre os aspectos clínicos e biológicos da doença de Chagas no México, o objetivo deste trabalho foi realizar a caracterização biológica e molecular de isolados de *T. cruzi* originários de diferentes áreas endêmicas do México, principalmente do Estado de Jalisco.

Foram utilizadas oito cepas mexicanas de *T. cruzi*, seis procedentes de triatomíneos e duas de humanos e analisados o comportamento biológico *in vivo* (inoculação em camundongos: curvas de parasitemia, período pré-patente e patente, mortalidade, e análise histológica: parasitismo tecidual e processo inflamatório) e *in vitro* (infectividade em três linhagens celulares, MK2, VERO CCL-81 e macrófagos peritoneais de camundongo). Para a caracterização genética, foram utilizadas as seguintes técnicas moleculares: PCR específica para *T. cruzi*; PCR-Multiplex com os iniciadores D72, D75 e RG3 que detecta *T. cruzi* e *T. rangeli*; amplificação do espaço não transcrito dos genes do mini-éxon com os iniciadores Tc, Tc1 e Tc2 e classificação pela amplificação de regiões intergênicas dos genes do *spliced leader* com duas reações independentes SL-IRac e SL-IR I que detectam os diferentes grupos de *T. cruzi*; a amplificação das regiões polimórficas do gene do mini-éxon detecta os haplótipos do TcI mediante PCR independentes para cada um dos haplótipos e RAPD (*Randomly Amplified Polymorphic DNA*) que detecta variação intra-específica entre populações de *T. cruzi*. O produto destas técnicas foi observado em gel de poliacrilamida 6% após coloração pela prata. A análise do RAPD foi feita no programa Gel ComparII.

Os animais foram todos infectados, observando os tipos de parasitemia nos camundongos: patente com picos máximos de parasitemia que variavam de $4,6 \times 10^6$ a 10^7 , e subpatente com animais positivos ao microhematócrito até por um ano de observação. Independentemente do tipo de parasitemia, encontrou-se maior tropismo pelo músculo estriado (esquelético e cardíaco). O tecido intestinal representado pelas

junções esôfago-gástrica, gastro-duodenal e íleo-cecal apresentaram correlação entre a quantidade de ninhos de amastigotas e o processo inflamatório nos camundongos inoculados com *T. cruzi* exceto com as cepas CGH4 e CGH6. A mortalidade variou de 3,3 a 53,3% sendo maior nas cepas procedentes de humanos.

Os estudos *in vitro* demonstraram que parasitos de todas as cepas de *Trypanosoma cruzi* foram capazes de infectar macrófagos peritoneais de camundongos e que cepas NINOA e KR1 foram mais infectivas após 96 horas de cultura ($p<0,05$). Além disso, NINOA e INC-5 apresentaram maior capacidade infectiva às 24h de cultura em células MK2 ($p<0,05$). Não sendo observada as 24h após infecção, diferença significativa na infectividade nas células Vero-CCL81 entre os isolados de *T. cruzi* utilizados.

Identificou-se a presença de *T. cruzi* mediante a PCR específica e pela PCR multiplex, não sendo identificada a presença de DNA de *T. rangeli*. As técnicas utilizadas para a classificação de *T. cruzi*, demonstraram que todas as cepas mexicanas estudadas pertencem ao grupo do TcI, haplótipos Ia e Id. O dendograma gerado a partir dos perfis obtidos pela RAPD mostrou variação intra-específica das cepas mexicanas, separando as cepas humanas daquelas isoladas de triatomíneos. Além disso, foi possível distinguir estas últimas quanto ao tipo de parasitemia patente ou sub-patente.

Nossos resultados demonstram que as cepas de *T. cruzi* que circulam no México têm um tropismo tecidual predominante pelo músculo estriado, são altamente infectantes *in vitro* e *in vivo* e correspondem ao perfil *T. cruzi* I, haplótipos Ia e Id, ressaltando-se pela primeira vez a presença de haplótipos mistos de *T. cruzi* na América.

Palavras-chaves: *Trypanosoma cruzi*; México; Caracterização Biológica; Caracterização Genética.

ABSTRACT

For a long time the importance of Chagas disease in Mexico, where many regarded it as an exotic malady, has been questioned. This fact led to an insufficient attention given to this disease, which became endemic in this country presenting prevalence rates ranging from 1.6 to 5.8%, while in the Jalisco State, one of the most affected States these numbers range from 1.8 to 17.0%. The identification of acute cases in the country and mainly in this state consists in a clear indicative of active transmission. Considering the great genetic diversity among isolates of *Trypanosoma cruzi*, the importance of the biological characterization and the paucity of information on the clinical and biological aspects of Chagas disease in Mexico, the main objective of this study was to characterize biologically and molecularly the *Trypanosoma cruzi* isolates from different endemic areas of Mexico, especially of Jalisco State.

A total of eight Mexican *T. cruzi* strains were evaluated, six obtained from triatomineos and two from humans. This evaluation consisted in the determination of the biological behavior using two distinct pathways: *in vivo* (mice inoculation: curves of parasitemia, prepatent and patent period, mortality, and histological analysis: tissue parasitism and inflammation) and *in vitro* (infectivity in three cell lines, MK2, VERO-81 CCL and mouse peritoneal macrophages). Statistical analysis was performed using the Statsoft Statistica 8.0 software package. For the genetic characterization, the following molecular techniques were performed: PCR specific for *T. cruzi*; Multiplex-PCR using primers D72, D75 and RG3 which are able to detect *T. cruzi* and *T. rangeli*; amplification of the untranslated space region of the mini-exon gene with primers Tc, Tc1 and Tc2 and classification by amplification of the intergenic regions from spliced leader genes using two independent reactions SL-IRac and SL-IR I focused on the detection of the different *T. cruzi* groups, the amplification of polymorphic regions of the mini-exon gene intending to detect the TcI haplotypes via independent PCR for each haplotype and RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA) to detect intraspecific variation among populations of *T. cruzi*. The amplification products from these techniques were observed in 6% polyacrylamide gel after silver staining. The RAPD analysis was performed using the Gel ComparII software.

The totality (100%) of the studied animals was infected and two distinct parasitemia profiles were observed: a patent one with peaks ranging from 4.6×10^6 to 10^7 parasites, and a subpatent one with animals which were positive when the microhematocrit method was used, during the following year of observation. However,

regardless the type of parasitemia, a higher tropism was observed for striated muscle (skeletal and heart). The intestinal tissue represented by the esophageal-gastric, gastro-duodenal and ileocecal junction showed a high correlation between the number of amastigote nests and the inflammation detected in those mice inoculated with *Trypanosoma cruzi* strains except the ones with CGH4 and CGH6 strains. The mortality ranged from 3.3 to 53.3% showing higher rates in strains isolated from human hosts.

In vitro studies have demonstrated that parasites from all *Trypanosoma cruzi* strains were able to infect mice peritoneal macrophages, besides the NINOA and KR1 strains were more infective after 96 hours of culture ($p < 0.05$). Moreover, NINOA and INC-5 had a higher infective capacity after 24 hours of culture in MK2 cells ($p < 0.05$). Considering the used *T. cruzi* isolates, no significant infectivity difference in Vero CCL81 cells was observed after 24 hours of infection.

The presence of *T. cruzi* DNA was detected by specific and multiplex PCR while the *T. rangeli* DNA was undetectable. The techniques used for *T. cruzi* classification showed that all studied strains belonged to the Mexican group of TCI, haplotypes Ia and Id. A dendrogram analysis of the RAPD technique allowed the observation of intra-specific variation of the Mexican strains, discriminating the human strains isolated from those bugs. Furthermore, it was possible to distinguish the type of parasitaemia, patent or sub-patent.

Our results demonstrated that the *T. cruzi* strains circulating in Mexico have a tissue tropism predominantly to striated muscle, that are highly infectious *in vivo* and *in vitro* and that correspond to the profile *T. cruzi* I, haplotypes Ia and Id emphasizing the first report of the mixed haplotypes presence of *Trypanosoma cruzi* in America.

Keywords: *Trypanosoma cruzi*; México; Biological Characterization, Genetic Characterization.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Localização geográfica do Estado de Jalisco, México	21
FIGURA 2 – Curvas de parasitemia geradas pela inoculação via intraperitoneal (3×10^4 parasitos) de cepas mexicanas de <i>T. cruzi</i> em camundongos não isogênicos, utilizando o método de Brener e estudadas por 50 dias.....	40
FIGURA 3 – Curva acumulativa de sobrevivência dos camundongos inoculados via intraperitoneal (3×10^4 parasitos) com as diferentes cepas mexicanas de <i>T. cruzi</i> durante a fase aguda da infecção	41
FIGURA 4 – Percentagem de células MK2 infectadas pelas diferentes cepas mexicanas de <i>T. cruzi</i> na relação 1:2 (célula/parasito) às 24h após a infecção.....	52
FIGURA 5 — Percentagem de células Vero-CCL81 infectadas pelas diferentes cepas mexicanas de <i>T. cruzi</i> na relação 1:2 (célula/parasito) às 24h após a infecção.....	52
FIGURA 6 – Percentagem de macrófagos infectados pelas diferentes cepas mexicanas de <i>T. cruzi</i> na relação 1:2 (célula/parasito) às 24, 48, 72, 96 e 120h após a infecção.....	55
FIGURA 7 – Infectividade das cepas mexicanas de <i>T. cruzi</i> para as células MK2, Vero-CCL81 e macrófagos peritoneais de camundongos não isogênicos na relação 1:2 (célula/parasito) às 24h após infecção.....	57
FIGURA 8 – Gel de poliacrilamida 6% corado pela prata mostrando fragmentos específicos de <i>T. cruzi</i> de 330pb amplificado pela PCR com os iniciadores 121-122	57
FIGURA 9 – Gel de poliacrilamida 6% corado pela prata utilizando os iniciadores D72, D75 e RG3.....	58
FIGURA 10 – Gel de poliacrilamida 6% corado pela prata utilizando os iniciadores Tc, Tc1 e Tc2. Todas as amostras das cepas mexicanas de <i>T. cruzi</i> , amplificaram fragmentos de 350pb, específicos para TcI.	58
FIGURA 11 – Gel de poliacrilamida 6% corado pela prata utilizando os iniciadores UTCC e TCac. Todas as amostras das cepas mexicanas de <i>T. cruzi</i> , amplificaram fragmentos de 475pb, específicos para TcI.....	59
FIGURA 12 – Gel de poliacrilamida 6% corado pela prata. Observe que todas as amostras das cepas mexicanas de <i>T. cruzi</i> amplificam um fragmento de 275pb para o haplótipo Ia	59
FIGURA 13 – Gel de poliacrilamida 6% corado pela prata. Observe que todas as amostras das cepas mexicanas de <i>T. cruzi</i> amplificam um fragmento de 200pb para o haplótipo Id.....	60

FIGURA 14 – Fenograma das cepas mexicanas de *T. cruzi* gerado a partir dos perfis obtidos da RAPD com o iniciador λ 183R pelo programa Gel ComparII **61**

LISTA DE TABELAS

TABELA 01 – Porcentagem de camundongos que apresentaram infecção nos diferentes órgãos e/ou tecidos pelas diferentes cepas mexicanas de *T. cruzi* durante o pico máximo de parasitemia na fase aguda da doença 42

TABELA 02 – Porcentagem de camundongos que apresentarem infecção nos diferentes órgãos e/ou tecidos pelas diferentes cepas mexicanas de *T. cruzi* durante o pico máximo de parasitemia a fase crônica da doença..... 42

TABELA 03 – Processo inflamatório em camundongos inoculados pelas diferentes cepas mexicanas de *T. cruzi* nos órgãos e/ou tecidos estudados durante a fase aguda da doença 49

TABELA 04 – Processo inflamatório em camundongos inoculados pelas diferentes cepas mexicanas de *T. cruzi* nos órgãos e/ou tecidos estudados durante a fase crônica da doença 50

TABELA 05 – Correlação entre a quantidade de ninhos de amastigotas e o processo inflamatório nos órgãos e/ou tecidos de camundongos infectados com as diferentes cepas de *T. cruzi* durante a fase aguda da doença ($p<0,05$) 51

TABELA 06 – Correlação entre a quantidade de ninhos de amastigotas e o processo inflamatório nos órgãos e/ou tecidos de camundongos infectados com as diferentes cepas de *T. cruzi* durante a fase crônica da doença ($p<0,05$) 52

LISTA DE PRANCHAS

- PRANCHA 1** – Número de ninhos de amastigotas apresentados nos tecidos e/ou órgãos de camundongos infectados com as cepas mexicanas de *T. cruzi* (3×10^4 parasitos) durante a fase aguda da doença ($p < 0,05$) 44
- PRANCHA 2** – Número de ninhos de amastigotas apresentados nos tecidos e/ou órgãos de camundongos infectados com as cepas mexicanas de *T. cruzi* (3×10^4 parasitos) durante a fase crônica da doença ($p < 0,05$) 45
- PRANCHA 3** – Microfotografia de cortes histológicos dos órgãos dos camundongos infectados via intraperitoneal (3×10^4 parasitos) com as cepas mexicanas de *T. cruzi* (INC-5 e NINOA procedentes de humanos e com parasitemia patente) corados pela hematoxilina-eosina 46
- PRANCHA 4** – Microfotografia de cortes histológicos dos órgãos dos camundongos infectados via intraperitoneal (3×10^4 parasitos) com as cepas mexicanas de *T. cruzi* (CGH1 e KR1 procedentes de triatomíneos e com parasitemia subpatente) corados pela hematoxilina-eosina 47
- PRANCHA 5** – Microfotografia de cortes histológicos do pulmão dos camundongos infectados via intraperitoneal (3×10^4 parasitos) com cepas mexicanas de *T. cruzi* (INC-5, CGH4 e KR1) corados pela hematoxilina-eosina.... 48
- PRANCHA 6** – Células MK2 após 24h de infecção com *T. cruzi* (fotos 1-4) e controle: células MK2 não infectadas (fotos 5-6). Aumento 200X 53
- PRANCHA 7** – Células Vero CCL-81 após 24h de infecção com *T. cruzi* (fotos 1-4), aumento de 400X e controle: células Vero CCL-81 não infectadas (fotos 5-6), aumento de 200X 54
- PRANCHA 8** – Macrófagos peritoneais de camundongo não isogênico após 24h de infecção com *T. cruzi* (fotos 1-4) e controle: macrófagos não infectados (fotos 5-6). Aumento de 100X 56

LISTA DE ANEXOS

ANEXO I - Artigo – Prevalência de triatomíneos Infectados por <i>Trypanosoma cruzi</i> : Sazonalidade e Distribuição na Região Cienega do Estado de Jalisco, México.....	83
ANEXO II - Licenças emitidas pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA)	89
ANEXO III - Licenças emitidas pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA)	91
ANEXO IV - Dados sobre as cepas mexicanas de <i>T. cruzi</i>	92
ANEXO V – Resumo – Detecção de Haplótipos Mistos do <i>Trypanosoma cruzi</i> em Vetores Peri e Intradomiciliares no México	93
ANEXO VI – Resumo –Molecular Characterization of <i>Trypanosoma cruzi</i> Mexican Strains After Experimental Infection	94
ANEXO VII – Resumo – Pathogenic Potential of <i>T. cruzi</i> I in the Cycle Peridomestic of <i>Trypanosoma cruzi</i> in México: Miotropismo not Correlated with Parasitemia in Experimental Infection	95

SUMARIO

1. Introdução	19
1.1 Caracterização Genética e Biológica do <i>Trypanosoma cruzi</i>	22
2. Objetivos	26
2.1 Objetivo Geral	27
2.2 Objetivos Específicos	27
3. Material e Métodos	28
3.1 Procedência e Isolamento dos Parasitos	29
3.2 Camundongos	30
3.3 Estudos Parasitológicos	30
3.4 Parasitemia e Sobrevida	30
3.5 Histologia	31
3.6 Cultura dos Parasitos e Obtenção da Massa Parasitária	31
3.7 Caracterização Genética	32
3.7.1 Extração do DNA	32
3.7.2 PCR Específica para <i>Trypanosoma cruzi</i>	32
3.7.3 PCR-Multiplex com os Iniciadores D72, D75 e RG3	33
3.7.4 Amplificação do Espaço não Transcrito dos Genes do Mini-Exon ...	33
3.7.5 Classificação pela Amplificação de Regiões Intergênicas dos	
Genes do <i>Spliced Leader</i>	33
3.7.6 Amplificação das Regiões Polimórficas do Gene do Mini-Exon	34
3.7.7 RAPD (<i>Randomly Amplified Polymorphic DNA</i>)	35
3.7.8 Electroforese em Gel de Poliacrilamida	35
3.7.9 Construção dos Fenogramas	36
3.8 Infectividade <i>in vitro</i>	36
3.8.1 Obtenção dos Tripomastigotas de Diferentes Populações de <i>T.</i>	
<i>cruzi</i>	36
3.8.2 Obtenção das Diferentes Linhagens de Células Hospedeiras	37
3.8.2.1 MK2 e VERO CCL-81	37
3.8.2.2 Macrófagos Peritoneais de Camundongos não Isogênicos ...	37
3.8.3 Determinação da Infectividade dos Diferentes Isolados	
Mexicanos de <i>T. cruzi</i> em Células MK2, VERO CCL-81 e Macrófagos	
Peritoneais de Camundongos	38
3.9 Análise Estatística	38
4. Resultados	39
4.1 Estudos <i>in vivo</i>	40
4.1.1 Parasitemia	40
4.1.2 Mortalidade	41
4.1.3 Histologia	41
4.1.4 Processo Inflamatório Tecidual	49
4.1.5 Correlação Entre o Parasitismo e o Processo Inflamatório	50
4.2 Estudos <i>in vitro</i>	51
4.2.1 Infecção de Células MK2 Utilizando Tripomastigotas de	
Diferentes Cepas Mexicanas de <i>T. cruzi</i>	52
4.2.2 Infecção de Células VERO CCL-81 Utilizando Tripomastigotas	
de Diferentes Cepas Mexicanas de <i>T. cruzi</i>	52
4.2.3 Infecção de Macrófagos Utilizando Tripomastigotas de	
Diferentes Cepas Mexicanas de <i>T. cruzi</i>	55
4.3 Caracterização Genética	57
4.3.1 PCR Específica para <i>Trypanosoma cruzi</i>	57
4.3.2 PCR com Iniciadores D72, D75 E RG3	58

4.3.3 Amplificação do Espaço não Transcrito dos Genes do (ITS) mini-éxon	58
4.3.4 Classificação pela Amplificação das Regiões Intergênicas dos Genes do <i>Spliced Leader</i>	59
4.3.5 PCR para os Haplótipos do TcI	59
4.3.6 RAPD (<i>Randomly Amplified Polymorphic DNA</i>)	60
5. Discussão	62
6. Conclusões	70
7. Referências	72
8. Anexos	82
8.1 Anexo I	83
8.2 Anexo II	89
8.3 Anexo III	91
8.4 Anexo IV	92
8.5 Anexo V	93
8.6 Anexo VI	94
8.7 Anexo VII	95

1. INTRODUÇÃO

A doença de Chagas atualmente apresenta distribuição mundial devido ao intenso processo de migração de pessoas, embora na década passada fosse considerada exclusiva do continente Americano, onde se encontrava distribuída em 18 países. Esta doença é tratada como um problema de saúde pública devido à importante morbidade-mortalidade causada na América do Sul, América Central e no México onde a mesma é considerada negligenciada. Informes da Organização Mundial da Saúde relatam que aproximadamente oito milhões de pessoas estejam infectadas pelo *Trypanosoma cruzi* no continente Americano (TANOWITS *et al.*, 1992; MONCAYO, 1997; SCHOFIELD & DIAS, 1999; MONCAYO *et al.*, 2000; MONCAYO, 2003; URANGA & HERRANZ, 2003; DIAS, 2007; WHO, 2007; MONCAYO 2009).

Atualmente, em países do Cone Sul, a prevalência da doença de Chagas diminuiu de forma considerável devido a programas bem sucedidos de controle do vetor e à detecção oportuna da doença em doadores de sangue. Os primeiros países onde se observaram resultados satisfatórios foram o Brasil, o Uruguai, o Chile e a Argentina, principalmente. Por outro lado, em locais onde ocorreram programas de controle mais recentes, como nos países Andinos, América Central e México podem ser observados casos agudos da doença, o que é indicativo de transmissão ativa (SCHOFIELD & DIAS, 1999; WHO/OPS, 2006).

Durante muito tempo foi especulada a importância da doença de Chagas no México, considerando-a como um padecimento exótico, não recebendo os cuidados necessários. No México, antes do ano 2000, não existiam estudos realizados na população referentes à prevalência da doença de Chagas (MONCAYO *et al.*, 2000). Em 2001, a Secretaria de Saúde, baseada em casos suspeitos, notificou uma prevalência de 1,6% (GUZMÁN-BRACHO, 2001), o que podia estar subestimado (ATTARAN 2006; DUMONTIEL, 1999). Estudos mais recentes mostraram uma prevalência geral no país de 5,8%, variando nos diferentes Estados de 0,4 a 19,0% e nos bancos de sangue de 0,17 a 17,0% (DUMONTIEL, 1999; CRUZ-REYES & PICKERING-LÓPEZ, 2005; 2006). Já a prevalência da doença nas áreas rurais variou de 5 a 21,5% (CRUZ-REYES & PICKERING-LÓPEZ, 2005; 2006; YERENAS *et al.*, 2006). Cárdenas-Sánchez *et al.* (2003), Capps *et al.* (2004) e Sierra-Johnson *et al.*, (2005) estudaram a prevalência em pacientes que apresentavam miocardiopatia congestiva e observaram que esta variava de 17 a 82,5%.

A doença de Chagas no Estado de Jalisco, México, foi descrita pela primeira vez em 1967. Trabalhos realizados em diferentes regiões deste Estado, entre os anos de 1967

e 2006, descreveram as formas aguda e crônica da doença e identificaram as espécies de vetores. O estado de Jalisco (Figura 1) passou a ser considerado a região com maior número de casos agudos da doença de Chagas registrados no país, porém, desde esta época os casos agudos são diagnosticados de forma isolada, o que pode sugerir a existência de um grande número de doentes ainda não conhecido. No entanto, dados sorológicos fornecidos pela Secretaria da Saúde do Estado (2005) relatam uma baixa prevalência (1,81%), diferente dos outros estudos que mostram que esta varia de 12,0 a 17,0 % na população geral e 21,6% na população rural. Ressalta-se que, o total dos casos apresentados pela Secretaria de Saúde de Jalisco nos informes é produto de atividades realizadas nos cercos epidemiológicos e procura intencionada de casos, posterior ao relato de triatomíneos positivos. Esta discordância pode também ser devido à falta de pesquisas sistemáticas em pacientes febris e/ou ao desconhecimento de técnicas sorológicas e/ou à possibilidade que cepas de *T. cruzi* tenham baixa virulência e imunogenicidade.

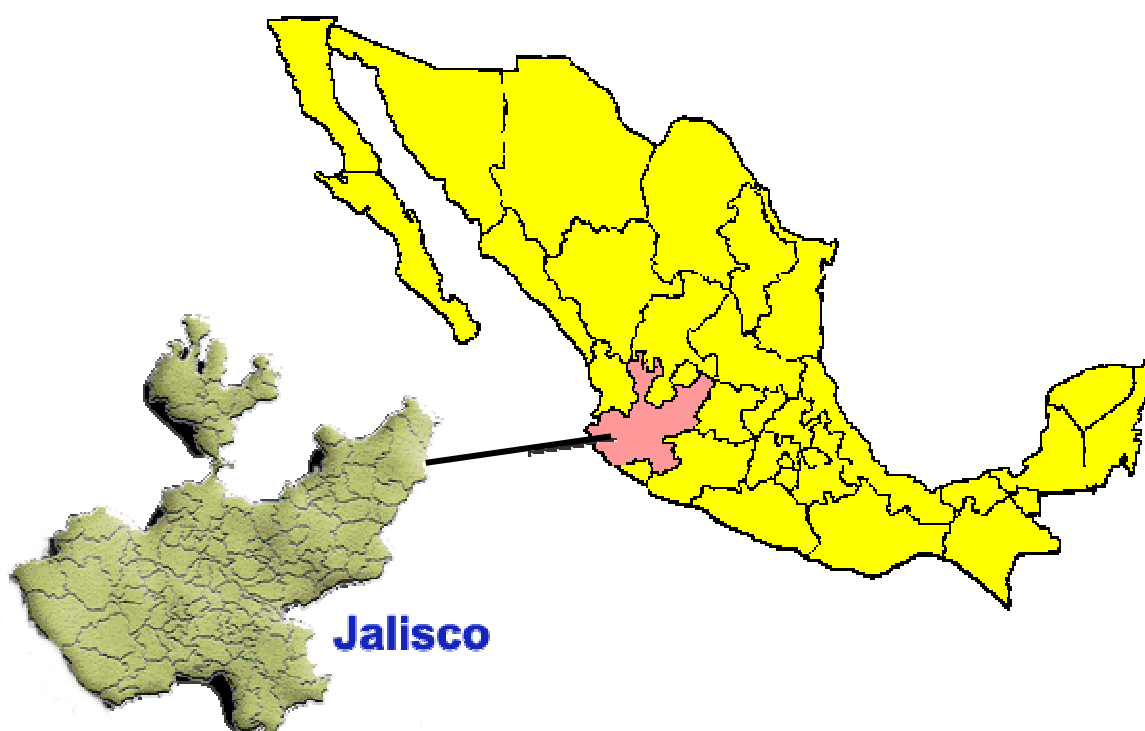


Figura 1 – Localização geográfica do Estado de Jalisco, México.

Apesar da incidência de casos agudos apresentarem variações importantes nos diferentes estudos realizados em Jalisco e no México em geral, a doença de Chagas, sem dúvida é um problema importante de saúde pública neste país (CUERTERO *et al.*, 1967; VELASCO-CASTREJÓN *et al.*, 1974; HERNÁNDEZ-MATHESON *et al.*, 1987; DELGADILLO-JAIME *et al.*, 1988; CASILLAS, 1993; TRUJILLO-CONTRERAS *et al.*, 1993; LÓPEZ-OLMOS *et al.*, 1998; CONTRERAS *et al.*, 2000; PEÑA *et al.*, 2002; SSJ, 2005; CRUZ-REYES & PICKERING-LOPEZ, 2005; 2006; YERENAS *et al.*, 2006; LOZANO-KASTEN *et al.*, 2008).

Estudos realizados por Gómez-Hernández *et al.*, (2008), mostraram a sazonalidade dos triatomíneos na região Cienega do Estado de Jalisco. Os autores observaram que estes eram mais abundantes nos meses de abril a junho e significativamente mais freqüentes na região rural que na urbana ($p < 0,05$), além de apresentarem uma positividade para *T. cruzi* de 57,3%. As espécies encontradas foram *Triatoma longipennis*, *T. barberi* e um exemplar de *T. dimidiata* positivo para *T. cruzi*. Este último triatomíneo não é originário da região, sendo o primeiro caso positivo descrito neste Estado (Anexo I).

1.1 CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA E GENÉTICA DO *Trypanosoma cruzi*

A grande diversidade de isolados de *T. cruzi* de diferentes hospedeiros, vetores e regiões geográficas, foi documentado através de estudos utilizando vários marcadores moleculares (TIBAYRENC & AYALA, 1988; CARNEIRO *et al.*, 1991; de LUCA D'ORO *et al.*, 1993; CARRASCO *et al.*, 1996; ANDRADE *et al.*, 1997; DUARTE-FERNANDES *et al.*, 1997; TIBAYRENC, 1998).

A caracterização biológica de isolados de *T. cruzi* de uma região geográfica é importante para o entendimento da epidemiologia do parasito. A causa da diversidade clínica da doença não é bem conhecida (ARAÚJO *et al.*, 1981; DUMONTIEL, 1999). A gravidade e os sintomas variam de acordo com as regiões geográficas. Foi sugerido que a variabilidade pode ser resultante tanto da heterogeneidade entre isolados de *T. cruzi* como da resposta imune dos hospedeiros (POSTAN *et al.*, 1984; SOUTO *et al.*, 1996; GUZMÁN-MARÍN, 1999; DUMONTIEL, 1999).

Foram descritos dois grupos genéticos principais de *T. cruzi*: o *T. cruzi* I (TcI) associado ao ciclo de transmissão silvestre, *T. cruzi* II (TcII), encontrado mais frequentemente no ambiente doméstico. O agrupamento em duas principais linhagens (TcI e TcII) foi subdividido posteriormente em TcI (haplótipos Ia, Ib, Ic, Id) e TcII (IIa,

I Ib, I Ic, I Id, I Ie, I II) (SOUTO *et al.*, 1996; TIBAYRENC, 1998; ANONYMUS, 1999; BRISSE *et al.*, 2000; 2001; MACEDO *et al.*, 2004; HERRERA *et al.*, 2007; BURGOS *et al.*, 2008; FALLA *et al.*, 2009). A classificação atual de *T. cruzi* foi estabelecida em consenso com a finalidade de unificar as técnicas e agrupamento do parasito, ficando estabelecidos os seguintes grupos: TcI, TcII, TcIII, TcIV, TcV, TcVI (ZINGALEZ *et al.*, 2009). O grupo pertencente ao TcI, em relação aos haplótipos propostos por Herrera (2007) não foi tratado neste consenso.

No México, pela análise do mini-exón de isolados obtidos de triatomíneos, reservatórios domésticos e silvestres e também de casos humanos associados a manifestações cardíacas, foram classificados como pertencentes ao grupo *T. cruzi* I (DUMONTIEL, 1999; GUZMÁN-MARÍN *et al.*, 1999; BOSSENO *et al.*, 2002; RUIZ-SANCHEZ *et al.*, 2005; BRENIÈRE *et al.*, 2007; LOZANO-KASTEN *et al.*, 2008; O'CONNOR *et al.*, 2007). Neste país existem poucos relatos a respeito do *T. cruzi* II (BOSSENO *et al.*, 2009).

Trabalhos realizados para a caracterização genética de cepas mexicanas de diferentes regiões do país utilizando técnicas como MLEE (*Multilocus Enzyme Electrophoresis*), RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphisms*), RAPD (*Randomly Amplified Polymorphic DNA*) e a técnica de hibridização do rRNA e kDNA, demonstram, mediante a análise dos dendogramas, divergências genotípicas entre os isolados mexicanos e os isolados procedentes de outros países da América, independente da origem biológica do parasito (ZAVALA-CASTRO *et al.*, 1992; LÓPEZ-OLMOS *et al.*, 1998; BOSSENO *et al.*, 2000; BOSSENO *et al.*, 2002; RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ *et al.*, 2004).

Em virtude do táxon *T. cruzi* ser composto por subpopulações heterogêneas do parasito, foi proposto o uso do termo “complexo *cruzi*”, com base na variação morfológica, genética, biológica, virulência, patogenicidade, aspectos imunológicos (cepa dependente) no hospedeiro vertebrado e diferenças nos padrões regionais da doença (DEVERA *et al.*, 2003). Estudos experimentais mostram que diferentes cepas de *T. cruzi* podem determinar lesões teciduais peculiares, que surgem em consequência de um tropismo específico e predominante para diferentes tipos de células de mamíferos, tais como macrófagos, células musculares cardíacas e esqueléticas e neurônios (ANDRADE, 1985; ANDRADE & MAGALHÃES, 1997; MOREL *et al.*, 1986; ZINGALES *et al.*, 1998; BURGOS *et al.*, 2005; 2008).

Estudos realizados no México mostraram diferenças entre os isolados quanto ao comportamento biológico (parasitemia, tropismo tecidual, mortalidade, patogenicidade dentre outros) entre cepas obtidas de diferentes hospedeiros (humanos, reservatórios e vetores) e de diferentes regiões endêmicas do país, assim como diferenças na resistência a drogas usadas no tratamento da infecção experimental (Benzonidazol e Nifurtimox). Em humanos, a manifestação predominante é a miocardiopatia, já que as alterações digestivas se apresentam em baixa proporção como foi demonstrado recentemente (BIAGI *et al.*, 1965; TAY *et al.*, 1968; MONTEÓN *et al.*, 1996; DUMONTIEL, 1999; VERA-CRUZ *et al.*, 2003; MELNIKOV *et al.*, 2005; ALVARADO, 2005a; 2005b; SANCHEZ-GUILLÉN *et al.*, 2006a; 2006b; LEÓN-PÉREZ *et al.*, 2007; LOZANO-KASTEN, 2008).

Trabalhos experimentais realizados com cepas mexicanas de *T. cruzi* para observação do tropismo tecidual, por técnicas de histologia e PCR, demonstraram que estas apresentam um tropismo significativamente maior para a musculatura cardíaca e esquelética em camundongos infectados (MONTEÓN *et al.*, 1996; BARRERA-PÉREZ *et al.*, 2001; VERA-CRUZ *et al.*, 2003; SANCHEZ-GUILLÉN *et al.*, 2006b). O estudo da mortalidade dos animais inoculados com essas cepas mostrou que a mesma variou entre 0 a 100% nos modelos experimentais utilizados (ESPINOZA *et al.*, 1998; BARRERA-PÉREZ *et al.*, 2001; VERA-CRUZ *et al.*, 2003). Também foi demonstrado que as cepas mexicanas são resistentes à lise mediada pelo complemento (LEÓN-PÉREZ *et al.*, 2007).

López-Olmos *et al.* (1998) realizaram um estudo comparativo, biológico e genético de cepas isoladas de diferentes regiões do México com aquelas isoladas no Brasil e Peru. Observaram que todos os isolados, independente da origem geográfica, cresciam melhor no meio LIT que no meio de Grace. O estudo *in vitro* demonstrou também que as cepas mexicanas tinham maior capacidade de infectar as células Vero CCL-81 (fibroblastos de rim de macaco verde africano) que as células P388 (linhagem de macrófago-like obtida de camundongos) e de multiplicar-se de forma mais significativa em células P388. Os isolados mexicanos eram geneticamente diferentes dos isolados do Brasil e do Peru. Isto levou aos autores a concluir que as cepas mexicanas diferiam daquelas provenientes da América do Sul (LÓPEZ-OLMOS *et al.*, 1998).

Estudos *in vitro* realizados por Alvarado *et al.* (2005a; 2005b) e por Leon-Perez *et al.* (2007) em camundongos infectados com cepas mexicanas de *T. cruzi* (incluindo a

cepa NINOA) demonstraram graus variáveis de resistência aos medicamentos usados para o tratamento etiológico da doença de Chagas, Nifurtimox (Lampit) e Benzonidazol (Rochagan).

Considerando a grande diversidade genética existente entre os isolados de *T. cruzi*, a importância da caracterização biológica destes e ao escasso número de informações sobre os aspectos clínicos e biológicos da doença de Chagas no México, este trabalho tem como objetivo caracterizar biológica e geneticamente os isolados de *T. cruzi* originários de diferentes áreas endêmicas do México, principalmente do Estado de Jalisco.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral:

Caracterizar biológica e geneticamente isolados de *T. cruzi* originários de diferentes áreas endêmicas do México.

2.2 Objetivos Específicos:

- I. Isolar tripanossomatídeos de triatomíneos do México;
- II. Avaliar o comportamento biológico dos isolados do México e de duas cepas procedentes de humanos do mesmo país, mantidas no laboratório do Instituto Politécnico Nacional, por meio de infecção experimental em camundongos não isogênicos e determinar o tropismo e processo inflamatório tecidual;
- III. Avaliar a infectividade das cepas mexicanas de *T. cruzi* em linhagens de células não fagocíticas (MK2 e VERO CCL-81) e fagocíticas (macrófagos peritoneais de camundongos não isogênicos);
- IV. Determinar as linhagens dos tripanossomatídeos isoladas, utilizando técnicas de biologia molecular (PCR);
- V. Caracterizar mediante a técnica de RAPD os perfis moleculares das cepas mexicanas e estabelecer as possíveis associações filogenéticas entre os isolados;

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 PROCEDÊNCIA E ISOLAMENTO DOS PARASITOS

Foram importados do México 20 triatomíneos positivos para *T. cruzi* (*Triatoma longipennis*, *Triatoma palillipennis*, *Triatoma picturata*) com autorização do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), Licenças 16424-1/ 2009 e 08BR002121/DF (Anexo II e III). Os triatomíneos foram capturados no Estado de Jalisco durante trabalhos de campo realizados pelo Dr. José Alejandro Martinez Ibarra, da Universidad de Guadalajara, Centro Universitario del Sur. Estes triatomíneos são considerados as espécies transmissoras mais importantes do *T. cruzi* na região (MAGALLON-GASTELUM 1998; NOGUEDA-TORRES *et al.*, 2000; MARTINEZ-IBARRA *et al.*, 2003).

Após a chegada destes triatomíneos ao laboratório da disciplina de Parasitologia da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM) foram realizados exames parasitológicos de fezes com a finalidade de comprovar a positividade dos mesmos para *T. cruzi*. Por cada amostra de fezes dos triatomíneos positivos foram inoculados via intraperitoneal em quatro camundongos não isogênicos. A partir das 24h estes animais foram examinados pelo microhematócrito para a procura de *Trypanosoma rangeli* e das 72h para a procura de *T. cruzi*. Dos camundongos positivos foram realizadas hemoculturas em meio LIT (*Liver Infusion Trypstone*) e repiques em mais cinco camundongos para obtenção de número suficiente de tripomastigotas sanguíneos para a realização do presente estudo.

Dos 20 triatomíneos conseguiram-se isolar seis cepas de *T. cruzi*: duas de *T. longipennis*, denominadas CGH1 e CGH3; três de *T. palidipennis*, denominadas CGH2, CGH4 e CGH6 e apenas uma de *T. picturata* denominada KR1. As cepas humanas INC-5 e NINOA foram gentilmente cedidas pelo Instituto Politécnico Nacional, México, onde eram mantidas por criopreservação, passagens em camundongos e em triatomíneos. A cepa NINOA foi obtida em 1986 mediante xenodiagnóstico realizado numa criança procedente do Estado de Oaxaca que apresentava a fase aguda da doença (MONTEÓN *et al.* 1993) e a cepa INC-5 foi obtida em 1996 de paciente adulto originário do Estado de Guanajuato que apresentava a fase crônica com a forma cardíaca (RUIZ-SANCHEZ *et al.*, 2005) (Anexo IV).

Todos os isolados obtidos de triatomíneos eram procedentes do Estado de Jalisco, assim os isolados CGH1, CGH2 e KR1 eram procedentes da região Sul; os isolados CGH3, CGH4 e CGH6 da região Cienega e os isolados NINOA e INC-5 eram procedentes dos Estados de Guanajuato e Oaxaca, respectivamente.

Para este trabalho foram utilizadas as cepas de referência *T. cruzi* I (MUT), *T. cruzi* II (HEL) e *T. rangeli* (PO2) mantidas no Laboratório de Parasitologia da UFTM.

Inicialmente realizaram-se estudos pilotos com objetivo de caracterizar a virulência e patogenicidade das oito cepas mexicanas. As cepas CGH3, CGH4, CGH6, NINOA e INC-5 apresentaram parasitemia patente em diferentes níveis, enquanto que as cepas CGH1, CGH2 e KR1 sempre foram subpatentes quando inoculados com tripomastigotas sanguíneos ou procedentes de meio de cultura LIT e/ou meio TAU (*Triatimine Artificial Urine*) (CONTRERAS *et al.*, 1985).

3.2 CAMUNDONGOS

Foram utilizados 240 camundongos *Swiss* não isogênicos, adultos machos (6 a 8 semanas), com peso médio entre 30 e 40g mantidos no biotério da disciplina de Parasitologia da UFTM em condições adequadas de temperatura, umidade e disponibilidade de água e alimento “*ad libitum*”.

Para a realização da parte experimental com animais, este projeto foi submetido ao Comitê de Ética de Animais da UFTM com o número de protocolo 153.

3.3 ESTUDOS PARASITOLÓGICOS

Cada cepa de *T. cruzi* foi inoculada intraperitonealmente em 30 camundongos sendo utilizados o inoculo de 3×10^4 tripomastigotas sanguíneos para as cepas com parasitemia patente no estudo piloto e 3×10^4 tripomastigotas metacíclicos obtidos do meio TAU. Para obtenção dos tripomastigotas foram inoculados 5×10^8 formas epimastigotas/mL em 10mL de meio TAU e incubados por 2h a 28°C; após este período foi realizada a contagem de parasitos, sendo inoculados $3-5 \times 10^6$ parasitos/mL em meio TAU suplementado com L-prolina, L-glutamato de sódio, L-aspartato de sódio e glicose, numa garrafa de cultura (25cm²), durante 3 a 4 dias, a 28°C. Realizada a metaciclogênese, foi feita à contagem dos parasitos e preparado o inóculo 3×10^4 tripomastigotas metacíclicos para os camundongos (CONTRERAS *et al.*, 1985).

3.4 PARASITEMIA E SOBREVIVÊNCIA

A detecção e quantificação dos tripomastigotas sanguíneos foram realizadas em dias alternados durante 50 dias. Foi utilizado o método do microhematócrito para aquelas cepas que apresentavam parasitemia subpatente. Vinte e cinco microlitros de sangue obtidos do plexo orbital foram coletados com auxílio de tubos microcapilares

heparinizados sendo os mesmos centrifugados a 11200xg por cinco minutos e observados ao microscópio com aumento de 100x. Além disso, o método de Brener foi aplicado para aquelas cepas que apresentavam parasitemia patente. Para isso 5µL de sangue, obtido da extremidade caudal dos animais, foram colocados entre lâmina e lamínula 22 x 22mm e observados ao microscópio na objetiva de 40x e contados o número de parasitos em 50 campos microscópicos.

A mortalidade foi anotada diariamente durante o seguimento da parasitemia.

3.5 HISTOLOGIA

Para os estudos histopatológicos, dez animais de cada cepa foram eutanasiados por deslocamento cervical no dia do pico máximo de parasitemia e os animais restantes, aos 120 dias após infecção. Foram coletados os seguintes órgãos e/ou tecidos: coração, músculo esquelético (quadríceps), pulmão, junções esôfago-gástrica, gastro-duodenal e íleo-cecal, fixados em formol tamponado a 10%, emblocados em parafina, obtidos cortes de 3-4µm em micrótomo e corados pela hematoxilina-eosina.

A quantificação dos ninhos de amastigotas foi realizada na totalidade do corte histológico e para o infiltrado inflamatório foi utilizada a seguinte escala semi-quantitativa: sem infiltrado, – (ausente); de 1-3 focos inflamatórios, + (discreto); de 4-6 focos inflamatórios, ++ (leve); de 6 a 10 focos inflamatórios, +++ (moderado) e mais de 10 focos inflamatórios ou quando os infiltrados inflamatórios fossem extensos, ++++ (intenso) (BEN YOUNÈS-CHENNOUFI *et al.*, 1988; SANTOS *et al.*, 1994; GARCIA *et al.*, 2006; FRANK *et al.*, 2008).

3.6 CULTURA DOS PARASITOS E OBTENÇÃO DA MASSA PARASITÁRIA

500µL de sangue obtido do plexo orbital dos camundongos infectados com os diferentes isolados de *T. cruzi* foram inoculados em meio LIT. As hemoculturas positivas foram mantidas em estufa a 28°C em meio LIT suplementado com 5% de soro fetal bovino. Para a obtenção da massa parasitária esta foi conseguida pela adição de meio LIT à cultura em fase exponencial de crescimento ate completar 20mL de volume final.

A cultura de 5mL foi duplicada com meio LIT a cada semana para gerar o crescimento exponencial do parasito. Uma semana depois de completados 20mL os parasitos foram lavados três vezes com solução fisiológica estéril, ressuspensos em

2mL e centrifugados a 2744xg/4°C/10min, decantados e os sedimentos foram estocados a -20°C até o momento da extração do DNA.

3.7 CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA

3.7.1 EXTRAÇÃO DO DNA

Foi realizada a extração de DNA total do parasito a partir de massas parasitárias. As amostras foram fervidas a 100°C em banho-maria, durante 15min para linearização dos minicírculos. A extração do DNA foi realizada pela técnica fenol–clorofórmio–álcool isoamílico, segundo Macedo *et al.* (1992). A desproteinização foi feita com fenol/ clorofórmio/ álcool isoamílico (25:24:1) e clorofórmio: álcool isoamílico (24:1). A precipitação do DNA ocorreu na presença de dois volumes de etanol absoluto gelado, 10% de acetato de sódio (3M, pH 5,2) em banho de gelo por 15min. Após centrifugação e volatilização do etanol, o precipitado foi diluído em 50µL de água miliQ estéril. As amostras extraídas foram mantidas a 4°C, por 36h para a solubilização do DNA, antes da realização da PCR. Para cada extração foi realizado um controle negativo.

3.7.2 PCR ESPECÍFICA PARA *Trypanosoma cruzi*

Foi realizada PCR das regiões hiper-variáveis dos minicírculos do kDNA (DNA do kinetoplasto), que encontram-se cercadas por regiões conservadas utilizadas como alvo da reação. Para a obtenção do produto amplificado específico para *T. cruzi* de 330pb (pares de bases) foram utilizados os iniciadores 121 (5'-AAA TAA TGT ACG GG(G/T) GAG ATG CAT GA-3') e 122 (5'-GGT TCG ATT GGG GTT GGT GTA ATA TA-3'), que tem 100% de especificidade e uma sensibilidade de 1fg de DNA. (WINCKER *et al.*, 1994). Foi utilizado 1ng de DNA obtido da massa parasitária. As reações de amplificação foram realizadas em um volume de 20µL contendo 0,2mM de desoxinucleotídeos trifosfatados (dATP, dCTP, dGTP, dTTP – Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), 3mM de MgCl₂, 2,5µM dos iniciadores 121 e 122, 10mM de Tris-HCl (pH 9,0), 50 mM de KCl, 0,1% de Triton® X-100 e 1,0U de Taq DNA polimerase (Promega, Madison, WI, USA). As amostras foram colocadas no termociclador PTC-100 com as seguintes especificações: desnaturação a 94°C durante 3min; 5 ciclos (68°C por 45s, 72°C por 45s, 94°C por 45s; seguidos de 35 ciclos (64°C por 45s, 72°C por 45s, 94°C por 45s) e uma extensão final a 72°C por 10min.

3.7.3 PCR-MULTIPLEX COM OS INICIADORES D72, D75 e RG3

Foi realizada uma PCR-Multiplex para o diagnóstico diferencial *T. cruzi*/*T. rangeli* com os iniciadores D72 (5'-TTT TCA GAA TGG CCG AAC AGT-3'), D75 (5'-GCA GAT CTT GGT TGG CGT AG-3') e RG3 (5'-GGC CAA AGG GTA AGG CTC-3') que amplificam regiões do domínio divergente D7 do gene 24Sα de acordo com Souto *et al.* (1999) um fragmento de 250pb correspondente ao TcI, de 265pb correspondente ao TcII e de 210pb correspondente ao *T. rangeli*. A PCR foi realizada num volume final de 20μL, contendo 10mM de Tris-HCL (pH=9,0), 0,1% Triton X-100, 3,5mM de MgCl₂, 0,4mM de cada dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP- Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) 1,0U de *Taq* DNA polimerase (Promega, Madison, WI, USA), 17pmol de cada iniciador (D72, D75 e RG3- Operon Technology Inc, alameda CA), 2μL de DNA (1ng/μl). O programa de amplificação consiste de uma desnaturação inicial a 94°C (4min) e de 30 ciclos com desnaturação a 94°C (1min), associação a 60°C (1min) e extensão a 72°C (1min) seguida de extensão final de 7min em um termociclador MJ Research PTC-100 (Inc. Watertown, MA, USA).

3.7.4 AMPLIFICAÇÃO DO ESPAÇO NÃO TRANSCRITO DOS GENES DO (ITS) MINI-ÉXON

Esta PCR foi realizada segundo Souto *et al.* (1996), utilizando o conjunto de iniciadores: TC (5' CCC - CCC TCC CAG CCG ACA CTG 3'), TC1 (5' GTG TCC CCG ACC TCC TTC GGG CC 3') e TC2 (5' CCT GCA GGC ACA CGT GTG TGT G 3'), amplificando um fragmento de 300pb correspondente ao TcII e de 350 para o TcI. As reações foram realizadas em um volume final de 20μL, contendo 10mM Tris-HCL (pH= 9,0), 50mM de KCL, 3,5mM de MgCl₂, 0,65U de *Taq* DNA-polimerase (Promega, Madison, WI, USA) 0,1% Triton X-100, 0,2mM de cada dNTP, 10pmol de cada iniciador, 1ng de DNA. Os ciclos de amplificação foram realizados em um PTC-100 térmica em 27 ciclos (30s a 94°C, 30s a 55°C, 30s a 72°C) seguidos por uma extensão final de 5min a 72°C.

3.7.5 AMPLIFICAÇÃO DE REGIÕES (ITS) INTERGÊNICAS DOS GENES DO *SPLICED LEADER*

Esta PCR foi realizada em 2 reações independentes denominadas SL-IRac e RL-IR I, sendo esta confirmatória para o TcI por ser específica.

SL-IRac – Na primeira reacção de PCR denominada SL-IRac foram utilizados os iniciadores: UTCC (5'-CGT ACC AAT ATA GTA CAG AAA CTG-3') e TCac (5'-CTC CCC AGT GTG GCC TGG G-3'), que amplifica um fragmento de 150pb correspondente a TcI, 200pb correspondente a TcII(a-c) e 157pb a TcII(b-d-e) e que tem sensibilidade de 1pg de DNA. Foi colocado 1ng de DNA no volume de 50µL da reacção de PCR contendo: 1,5mM dos iniciadores UTCC - TCac, 250µM de dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP – Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) e 3mM de MgCl₂, 1,0U de Taq polimerase (Promega, Madison, WI, USA). As amostras foram colocadas no termociclador PTC-100 com as seguintes condições: 94 por 5min, seguido de 3 ciclos (94°C por 45s, 70°C por 45s, 72°C por 45s), 3 ciclos (94°C por 45s, 68°C por 45s, 72°C por 45s), 3 ciclos (94°C por 45s, 66°C por 45s, 72°C por 45s), 3 ciclos (94°C por 45s, 64°C por 45s, 72°C por 45s), 33 ciclos (94°C por 45s, 62°C por 45s, 72°C por 45s) seguidos por uma extensão a 72°C por 5min (BURGOS *et al.*, 2007).

RL-IR I – Na segunda reacção de PCR denominada SL-IR I foram utilizados os iniciadores: UTCC (5'-CGT ACC AAT ATA GTA CAG AAA CTG-3') e TC2 (5'-CCT GCA GGC ACA CGT GTG TG-3'), que tem sensibilidade de 5pg de DNA. Esta PCR é confirmatória da anterior por ser específica para o TcI quando amplifica um fragmento de 475pb. Na reacção foi colocado 1ng de DNA no volume de 50µL contendo: 1,5mM dos iniciadores UTCC - TCac, 250µM de dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP – Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), 3mM de MgCl₂, 1,0U de Taq polimerase (Promega, Madison, WI, USA). As amostras foram colocadas no termociclador PTC-100, com as seguintes condições: 94°C por 5min seguido de 3 ciclos (94°C por 45s, 62°C por 45s, 72°C por 45s), 3 ciclos (94°C por 45s, 60°C por 45s, 72°C por 45s), 35 ciclos (94°C por 45s, 58°C por 45s, 72°C por 45s), seguidos por uma extensão a 72°C por 5min (BURGOS *et al.*, 2007).

3.7.6 AMPLIFICAÇÃO DAS REGIÕES POLIMORFICAS DO GENE DO MINI-EXON

As caracterizações do gene do mini-éxon do *T. cruzi* I foram realizadas segundo Falla *et al.*, (2009), utilizando os iniciadores: 1-A (5'-TGT GTG TGT ATG TAT GTG TGT GTG-3'), 1-B (5'-CGG AGC GGT GTG TGC AG-3') para o haplótipo Ia; os iniciadores: 2-A (5'-TGT GTG TGT GTA TGT ATG TAT GCT-3'), 2-B (5'-GGA ACA CAC GCG ACT AAT-3') para identificar os haplótipo Ib; e os iniciadores: 4-A

(5'-CTG CAG GCA CAC GTG TGT-3'), 4-B (5'-AAA AGA CGG GAA AAA AGC AA-3') para a identificação do haplotipo Id. A PCR foi realizada num volume de 20µL contendo 3ng de DNA, 2,5mM de MgCl₂, 0,2µM de cada iniciador e 0,5U de Taq polimerase (Promega, Madison, WI, USA). O ciclo de amplificação foi realizada em um PTC-100; iniciando com a desnaturação 5min a 94°C, seguido por 30 ciclos [30s por 94°C; 60°C por 30s (para o haplótipo Ib a temperatura foi modificada para 63°C); 72°C por 30s] seguido por uma extensão a 72°C por 10min.

3.7.7 RAPD (RANDOMLY AMPLIFIED POLYMORPHIC DNA)

Para determinar polimorfismos entre as cepas estudadas, foi realizada amplificação aleatória de fragmentos do DNA. Foi utilizado 1ng de DNA em um volume de 10µL contendo 1,0U de Taq DNA polimerase (Promega, Madison, WI, USA), 125µM de desoxosinucleotídeos trifosfatados (dATP, dCTP, dGTP, dTTP – Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), 1,5mM MgCl₂, 1,0µL de tampão 10x e 6,4pmol do iniciadores M13-40-F (5'-GTT TTC CCA GTC ACG AC-3'), λgt11-F (5'-GAC TCC TGG AGC CCG-3'), L-15996 (5'-CTC CAC CAT TAG CAC CCA AAG C-3'), λ31F (5'-GAA GGC ACA TGG CTG AAT ATC-3') e λ183R (5'-GCG AAA TAC GGG CAG ACA-3'). A mistura foi colocada no termociclador PTC-100, com o seguinte ciclo: desnaturação inicial a 95°C por 5min, seguida de 30°C por 2min para associação 72°C por 1min para extensão, 30s a 95°C para desnaturação, seguida de 33 ciclos onde a temperatura de associação é alterada para 40°C, ao termo dos ciclos 72°C por 5min.

3.7.8 ELECTROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA 6%

Uma amostra de 3 a 5µL do produto amplificado, diluída (v/v) com tampão da amostra 2x (0,5% de azul de bromofenol; 0,5% de xileno-cianol; 60% de glicerol) foi aplicada em cada canaleta. A corrida electroforética em gel de poliacrilamida 6% não desnaturante foi realizada a 80-100V durante, aproximadamente 3h, ou seja, com migração de 6-7cm do corante xileno-cianol. O tamanho das bandas amplificadas foi monitorado com um marcador molecular de 100pb. Após a electroforese, os géis foram transferidos para solução fixadora (etanol absoluto 10%; ácido acético 0,5%) durante 5 minutos. As bandas de DNA foram reveladas pela coloração com 0,2% de nitrato de prata (AgNO₃), em solução fixadora durante 10min, seguida pela redução dos sais de prata com NaOH 3%(p/v) e 0,3% de formaldeído durante 10min como descrito por

Santos *et al.*, (1993). Após a observação das bandas, a revelação era interrompida com solução fixadora e os géis fotografados.

3.7.9 CONSTRUÇÃO DOS FENOGRAMAS

Os perfis de bandas dos isolados de *T. cruzi* foram obtidos pela reação de RAPD, analisados visualmente e inseridos manualmente no computador. A análise de proporção de bandas compartilhadas entre as cepas e os fenogramas foram realizados pelo programa Gel Compar II[®] (versão 5.0).

O programa Gel Compar II usa como princípio básico a divisão vertical do gel em níveis de mobilidade, no qual um nível é definido pela presença de pelo menos uma banda em qualquer uma das canaletas do gel. De acordo com o número de canaletas e as posições das diferentes bandas, é calculada a proporção de compartilhamento de bandas entre as mesmas.

3.8 INFECTIVIDADE *IN VITRO*

3.8.1 OBTENÇÃO DOS TRIPOMASTIGOTAS DE DIFERENTES POPULAÇÕES DE *T. cruzi*.

Foram utilizados tripomastigotas das cepas CGH1, KR1 (cepas de parasitemia subpatente) , NINOA e INC-5 (cepas de parasitemia patente), obtidos do sangue de camundongos infectados com as referidas cepas. O sangue contendo cada uma das populações foi submetido à centrifugação a 224xg por cinco minutos, reservando-se o plasma para separação dos parasitos. Mais duas centrifugações foram realizadas com meio incompleto F12, isolando-se desta maneira os parasitos para posterior cultivo. As células MK2 (Monkey Kidney 2) foram infectadas com tripomastigotas das diferentes populações e cultivadas em meio completo F12 (Gibco BRL, USA), 80mg/L de Garamicina (Schering-Ploug, Brasil) e 5% de soro fetal bovino (Gibco BRL, USA). Dois repiques foram feitos antes que os parasitos fossem utilizados nos experimentos descritos abaixo, com a finalidade de sincronizar a população parasitária e obter a quantidade necessária dos mesmos. Vale ressaltar que o meio de cultura das garrafas foi trocado diariamente, mantendo a cultura com o mínimo possível de formas amastigotas.

3.8.2 OBTENÇÃO DAS DIFERENTES LINHAGENS DE CÉLULAS HOSPEDEIRAS

Foram utilizadas três diferentes linhagens de células hospedeiras: MK2, VERO CCL-81 e macrófagos peritoneais de camundongos não isogênicos.

3.8.2.1 MK2 e VERO CCL-81

As células epiteliais do rim do macaco (MK2) e fibroblasto de rim de macaco verde africano (VERO CCL-81) foram mantidas em cultura com meio F12 suplementado com 5% de soro fetal bovino, para posterior infecção pelas diferentes cepas de *T. cruzi*. Estas células foram obtidas do banco de células do laboratório de Parasitologia da UFTM.

3.8.2.2 MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGOS NÃO ISOGÊNICOS

Os macrófagos peritoneais foram obtidos de camundongos não isogênicos de quatro meses de idade mantidos no biotério do laboratório de Parasitologia da UFTM. Os animais foram sacrificados por deslocamento cervical. A colheita dos macrófagos foi realizada injetando-se 10mL de meio F12 incompleto na cavidade peritoneal dos animais seguida de massagem abdominal e posterior obtenção do líquido peritoneal contendo macrófagos. O líquido coletado foi submetido a centrifugação por 10min (224xg) a 15°C, sendo descartado o sobrenadante e os macrófagos ressuspensos em meio de cultura completo. Para avaliação da viabilidade celular, foi utilizado o corante Turk (180µL de corante/20µL de solução de células). Após a contagem de células viáveis na câmara de Neubauer, os macrófagos foram plaqueados (2×10^5 células/poço) em placa de cultura de 24 poços (Falcon, Switzerland), e realizado um exame qualitativo, utilizando-se um microscópio invertido Axiovert 25 (Zeiss) com o fim de observar-se o sucesso do procedimento. Cada placa foi incubada por duas horas em estufa de CO₂ (5% de CO₂) a 37°C em atmosfera úmida. As células que não aderiram foram removidas através da lavagem da cultura com meio incompleto, e, em seguida cultivadas em meio F12 suplementado com 5% de soro bovino fetal por 24h.

3.8.2.3 DETERMINAÇÃO DA INFECTIVIDADE DOS DIFERENTES ISOLADOS MEXICANOS DE *T. cruzi* EM CÉLULAS MK2, VERO CCL-81 E MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGOS.

Foram utilizadas 3×10^5 células/poço das linhagens MK2, VERO e macrófagos peritoneais e cultivadas em meio F12 suplementado com 5% de soro bovino fetal em placas de 24 poços contendo lamínulas redondas (13,0 x 0,17 mm). Após incubação por 24h, estas células foram infectadas com tripomastigotas das diferentes cepas de *T. cruzi* (dois parasitos/célula) e realizada lavagem 2h após a infecção com a finalidade de remover os parasitos que não aderiram e/ou não invadiram neste período. Após 24, 48, 72, 96 e 120h, o material de cada poço foi fixado com metanol por 30s e corado com azul de toluidina por 20seg. A porcentagem de células infectadas foi determinada contando-se o número de células que apresentaram amastigotas em um total de 200 células por lamínula, usando-se microscópio óptico (Zeiss).

3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foram realizados os testes de Shapiro-Wilk para observar a normalidade da distribuição dos dados e o teste de Levene para observar a homogeneidade das variâncias.

Foram realizados os seguintes testes para comparação entre duas amostras, Mann Whitney (amostras independentes) e Wilcoxon (amostras dependentes).

Para três ou mais amostras foram realizados testes de comparação múltipla como Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunn (para amostras independentes) e Friedman, seguido do teste da diferença mínima significativa não paramétrica.

Para a análise de correlação entre duas variáveis foi utilizado o coeficiente de correlação de Spearman.

Para a análise da parasitemia foi realizada o cálculo da área sob a curva pelo método de Bezout (regra dos trapézios) para obter um parâmetro da parasitemia global em relação aos dias de infecção.

A mortalidade acumulada em função do tempo foi analisada pela curva de sobrevida de Kaplan-Meier.

As análises estatísticas foram realizadas por meio do software Statsoft Statistica 8.0 e o nível de significância foi fixado em $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1 ESTUDOS *in vivo*

4.1.1 PRASITEMIA

Os oito isolados de *T. cruzi* analisados infectaram todos os camundongos inoculados (n=240). Cinco cepas (62,5%) apresentaram parasitemia patente pelo método de Brener (1962), três procedentes de triatomíneos (CGH3, CGH4, CGH6) e duas de humanos (INC-5, NINOA), e três (37,5%) apresentaram parasitemia subpatente pelo microhematócrito, todas procedentes de triatomíneos (CGH1, CGH2, KR1). Todos os animais, tanto de parasitemia patente quanto subpatente, foram estudados pelo período de 50 dias.

O período pré-patente foi similar em todas as cepas, apresentando variação de dois a 11 dias após infecção, não sendo observada diferença significativa durante os 50 dias de estudo, ($p=0,21$).

O pico máximo de parasitemia foi observado aos 27 dias nos isolados CGH6 e INC-5, aos 29 dias no CGH4 e aos 33 dias no CGH3. Já o isolado NINOA apresentou dois picos aos 27 e 33 dias após infecção. A cepa CGH3 apresentou maior parasitemia que as cepas INC-5 e CGH4, quando determinada pela área sob a curva o que foi estaticamente significativo ($p= 0,032$), e pelo pico máximo quando comparada com a cepa CGH4 ($p=0,01$) (Figura 2).

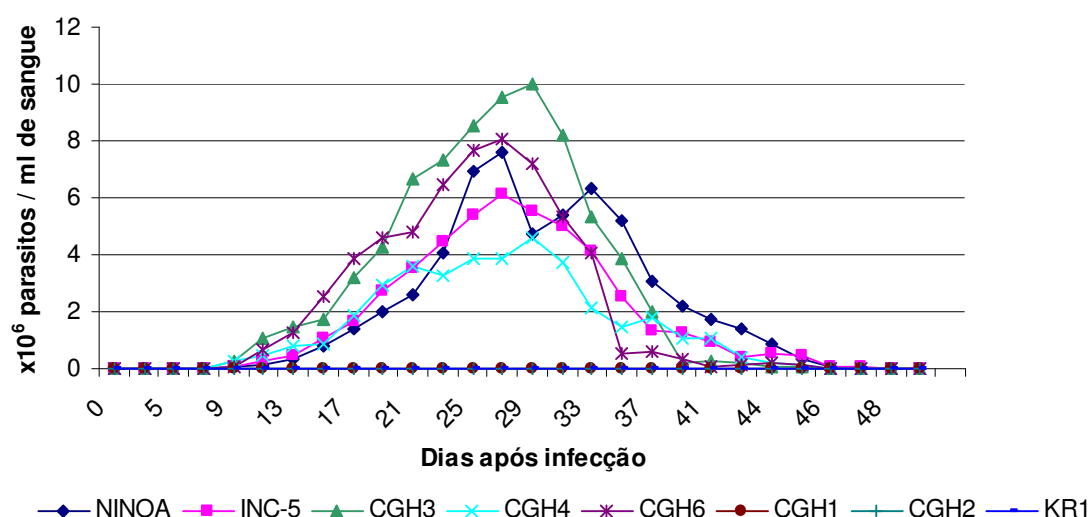


FIGURA 2 – Curvas de parasitemia geradas pelas cepas mexicanas de *T. cruzi* quando inoculadas via intraperitoneal (3×10^4 parasitos) em camundongos não isogênicos, utilizando o método de Brener e estudadas por 50 dias.

4.1.2 MORTALIDADE

A maior mortalidade observada foi nos camundongos inoculados com a cepa INC-5 (53,3%), seguido das cepas NINOA (20%) e CGH4 (16,6%). As outras cepas apresentaram uma baixa mortalidade que oscilou entre 3,3 e 10,0% ($p < 0,05$) (Figura 3)

Não foi observada correlação entre a intensidade de parasitemia e a mortalidade apresentada pelas diferentes cepas (Figuras 1, 2 e Anexo IV).

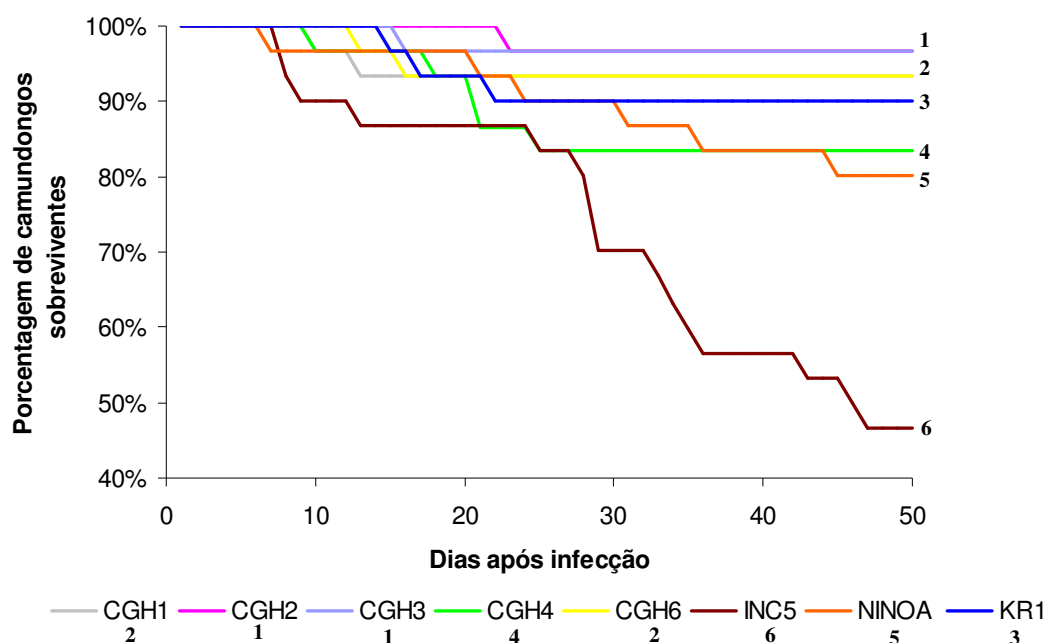


FIGURA 3 – Curva acumulativa de sobrevivência dos camundongos inoculados via intraperitoneal (3×10^4 parasitos) com as diferentes cepas mexicanas de *T. cruzi* durante a fase aguda da infecção.

4.1.3 HISTOLOGIA

O estudo do parasitismo tecidual nos camundongos inoculados com as diferentes cepas de *T. cruzi* tanto na fase aguda quanto crônica, mostrou que em todos os tecidos dos animais infectados foram encontrados ninhos de amastigotas (Tabelas 1 e 2), sendo que os animais inoculados com a cepa INC-5 apresentaram maior porcentagem de tecidos infectados em ambas as fases. Além disso, o músculo esquelético foi o único tecido no qual foram encontrados parasitos em 100% dos animais, em ambas as fases, exceto a cepa NINOA que apresentou ninhos neste tecido em 92,8% dos casos na fase crônica (Tabelas 1 e 2, Prancha 3).

As cepas menos infectantes na fase aguda foram às cepas CGH4, CGH3 e CGH2. Na fase crônica a menos infectante foi a CGH1. Porém, ressalta-se que as cepas

CGH3, CGH4, CGH2 e KR1 foram mais infectantes na fase crônica que na aguda (Tabelas 1 e 2).

TABELA 1 – Porcentagem de camundongos que apresentaram infecção nos diferentes órgãos e/ou tecidos pelas diferentes cepas mexicanas de *T. cruzi* durante o pico máximo de parasitemia na fase aguda da doença.

Órgão \ Cepa	CGH1	CGH2	CGH3	CGH4	CGH6	KR1	NINOA	INC-5
	%	%	%	%	%	%	%	%
Átrio	100	70	50	11,1	100	100	70	100
Ventrículo	40	20	20	11,1	100	30	60	100
Músculo Esquelético	100	100	100	100	100	100	100	100
Pulmão	50	60	40	100	60	80	90	87,5
JEG	40	40	40	44,4	40	50	60	87,5
JGD	60	40	60	44,4	40	20	90	75
JIC	30	40	0	44,4	50	20	80	75

JEG: junção esôfago-gástrica; JGD: junção gastro-duodenal; JIC: junção íleo-cecal.

TABELA 2 – Porcentagem de camundongos que apresentarem infecção nos diferentes órgão e/ou tecidos pelas diferentes cepas mexicanas de *T. cruzi* durante o pico máximo de parasitemia na fase crônica da doença.

Órgão \ Cepa	CGH1	CGH2	CGH3	CGH4	CGH6	KR1	NINOA	INC-5
	%	%	%	%	%	%	%	%
Átrio	80	70	66,6	42,1	100	100	42,8	100
Ventrículo	10	20	11,1	15,7	60	100	42,8	100
Músculo Esquelético	100	100	100	100	100	100	92,8	100
Pulmão	60	60	55,5	73,6	50	50	57,1	66,6
JEG	30	50	66,6	52,6	40	60	57,1	83,3
JGD	30	60	55,5	57,8	30	50	85,7	83,3
JIC	40	50	55,5	57,8	20	50	50	33,3

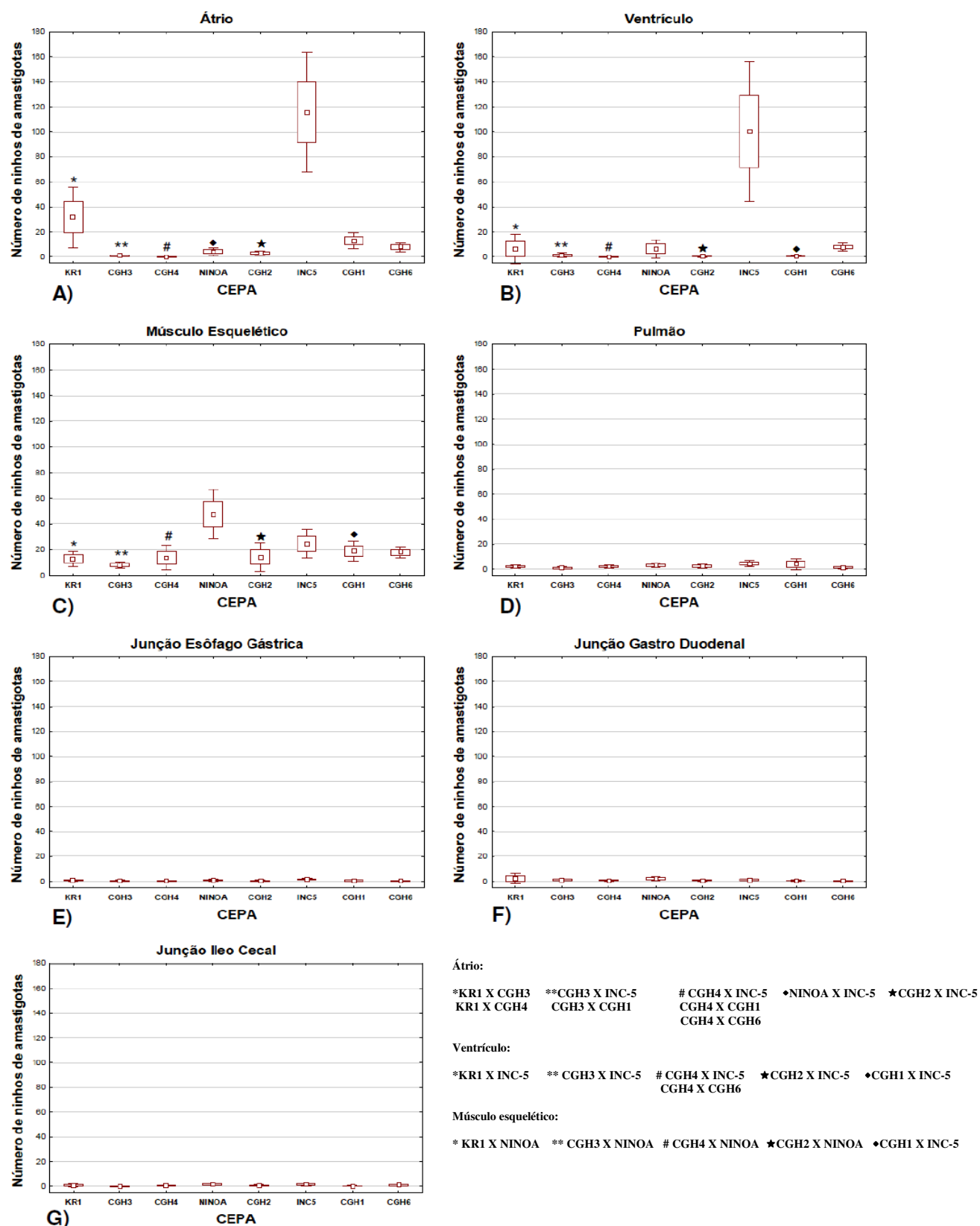
JEG: junção esôfago-gástrica; JGD: junção gastro-duodenal; JIC: junção íleo-cecal.

Independente da fase da infecção encontrou-se maior número de ninhos de amastigotas nos animais inoculados com a cepa INC-5 tanto nos átrios quanto nos ventrículos. Nos átrios, na fase aguda, o numero de ninhos foi significativamente maior quando comparado com as cepas CGH2, CGH3, CGH4 e NINOA e na fase crônica quando comparado com as cepas CGH2, CGH3 e CGH4. Já no ventrículo este foi significativamente maior durante a fase aguda quando comparado com as cepas CGH1,

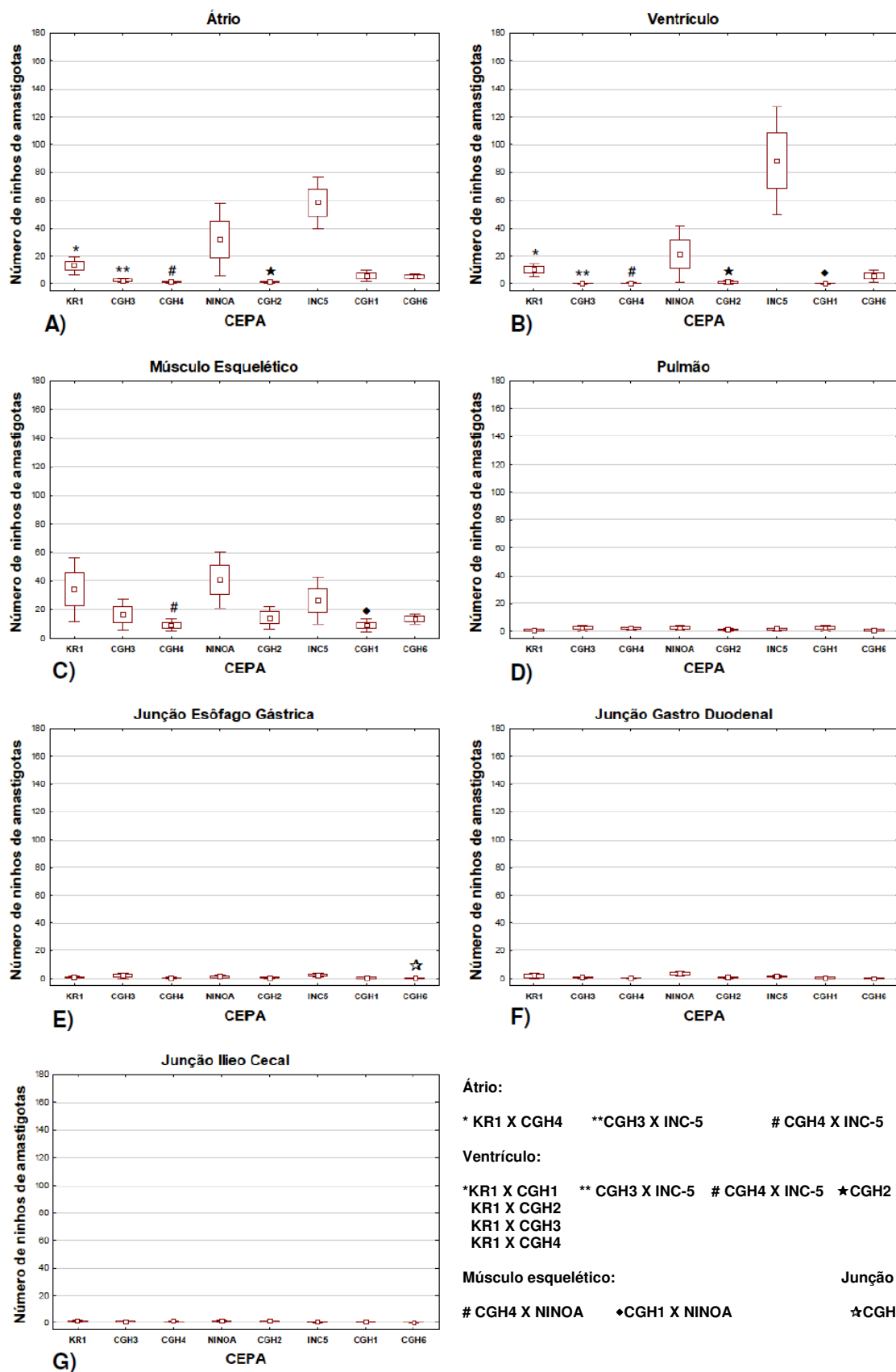
CGH2, CGH3, CGH4 e KR1 e na fase crônica quando comparado com as cepas CGH1, CGH2, CGH3 e CGH4 ($p<0,001$), (Prancha 1 e 2, Figuras A e B; Prancha 3).

Os camundongos inoculados com a cepa NINOA apresentaram maior quantidade de ninhos de amastigotas no músculo esquelético na fase aguda quando comparados com as cepas CGH2, CGH3 CGH4 e KR1 e na fase crônica quando comparados com as cepas CGH1 e CGH4 ($p<0,01$) (Pranchas 1 e 2; Gráfico C).

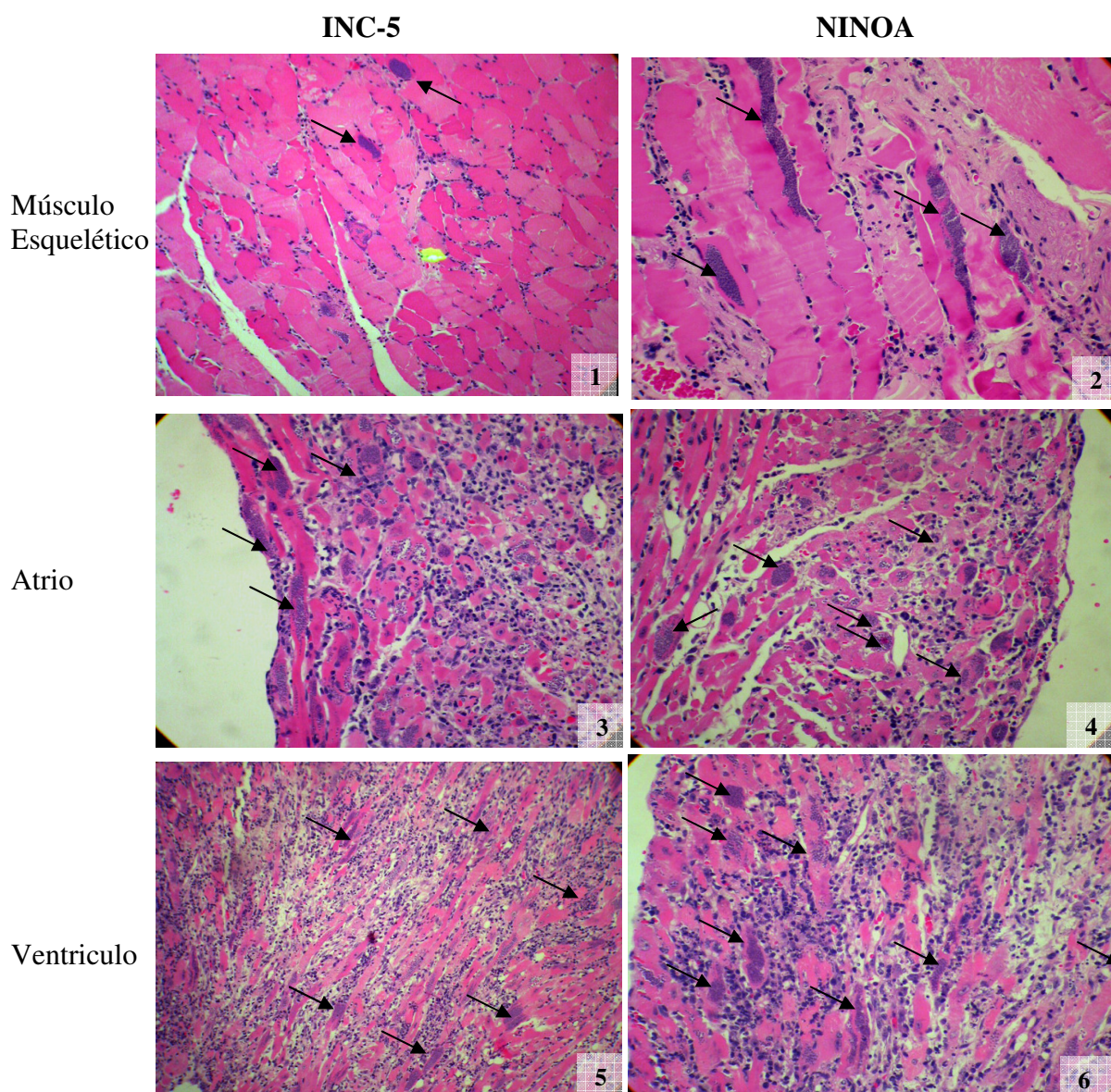
Somente a cepa NINOA em relação a cepas CGH6 apresentou diferença significativa ($p=0,022$) na junção esôfago-gástrica. Não houve diferença significativa quanto ao número de ninhos de amastigotas ao comparar pulmão, junções esôfago-gástrica e íleo-cecal de animais inoculados com as cepas utilizadas neste estudo (Pranchas 1 e 2; Figuras D, E e G).



PRANCHA 1 – Número de ninhos de amastigotas apresentados nos tecidos e/ou órgãos de camundongos infectados com as cepas mexicanas de *T. cruzi* (3×10^4 parasitos) durante a fase aguda da doença ($p < 0,05$).



PRANCHA 2 – Número de ninhos de amastigotas apresentados nos tecidos e/ou órgãos de camundongos infectados com as cepas mexicanas de *T. cruzi* (3×10^4 parasitos) durante a fase crônica da doença ($p < 0,05$).



PRANCHA 3 – Microfotografia de cortes histológicos dos órgãos dos camundongos infectados via intraperitoneal (3×10^4 parasitos) com as cepas mexicanas de *T. cruzi* (INC-5 e NINOA procedentes de humanos e com parasitemia patente) corados pela hematoxilina-eosina. **Seta** – indica a presença de ninhos de amastigotas.

Microfotografia 1- Músculo Esquelético infectado com a cepa INC-5 de *T. cruzi* (200X)

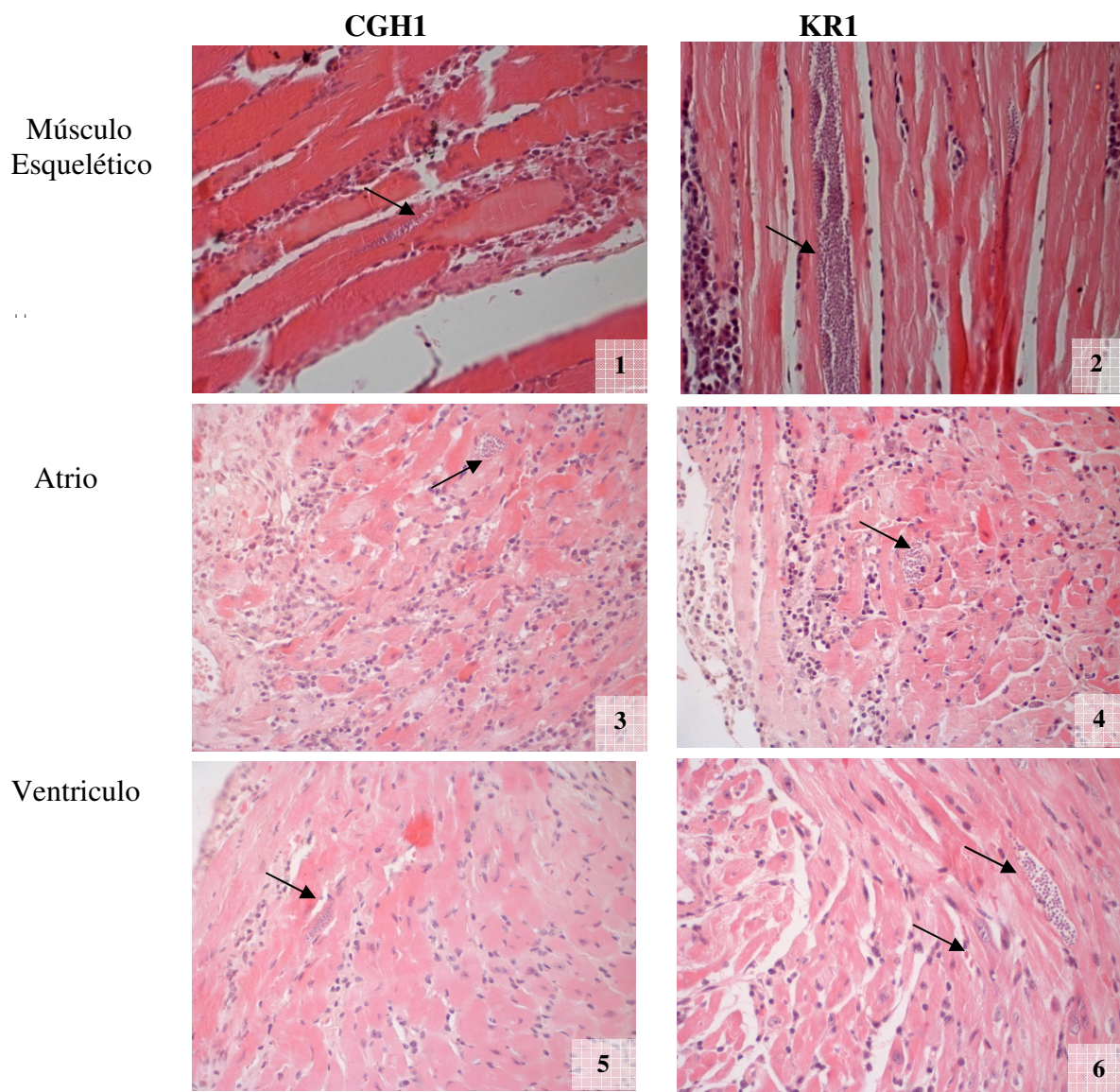
Microfotografia 2- Músculo Esquelético infectado com a cepa NINOA de *T. cruzi* (200X)

Microfotografia 3- Átrio infectado com a cepa INC-5 de *T. cruzi* (200X)

Microfotografia 4- Átrio infectado com a cepa NINOA de *T. cruzi* (200X)

Microfotografia 5- Ventriculo infectado com a cepa INC-5 de *T. cruzi* (100X)

Microfotografia 6- Ventriculo infectado com a cepa NINOA de *T. cruzi* (200X)



PRANCHA 4 – Microfotografia de cortes histológicos dos órgãos dos camundongos infectados via intraperitoneal (3×10^4 parasitos) com as cepas mexicanas de *T. cruzi* (CGH1 e KR1 procedentes de triatomíneos e com parasitemia subpatente) corados pela hematoxilina-eosina. **Seta** – indica a presença de ninhos de amastigotas.

Microfotogràfia 1- Músculo Esquelético infectado com a cepa CGH1 de *T. cruzi* (200X)

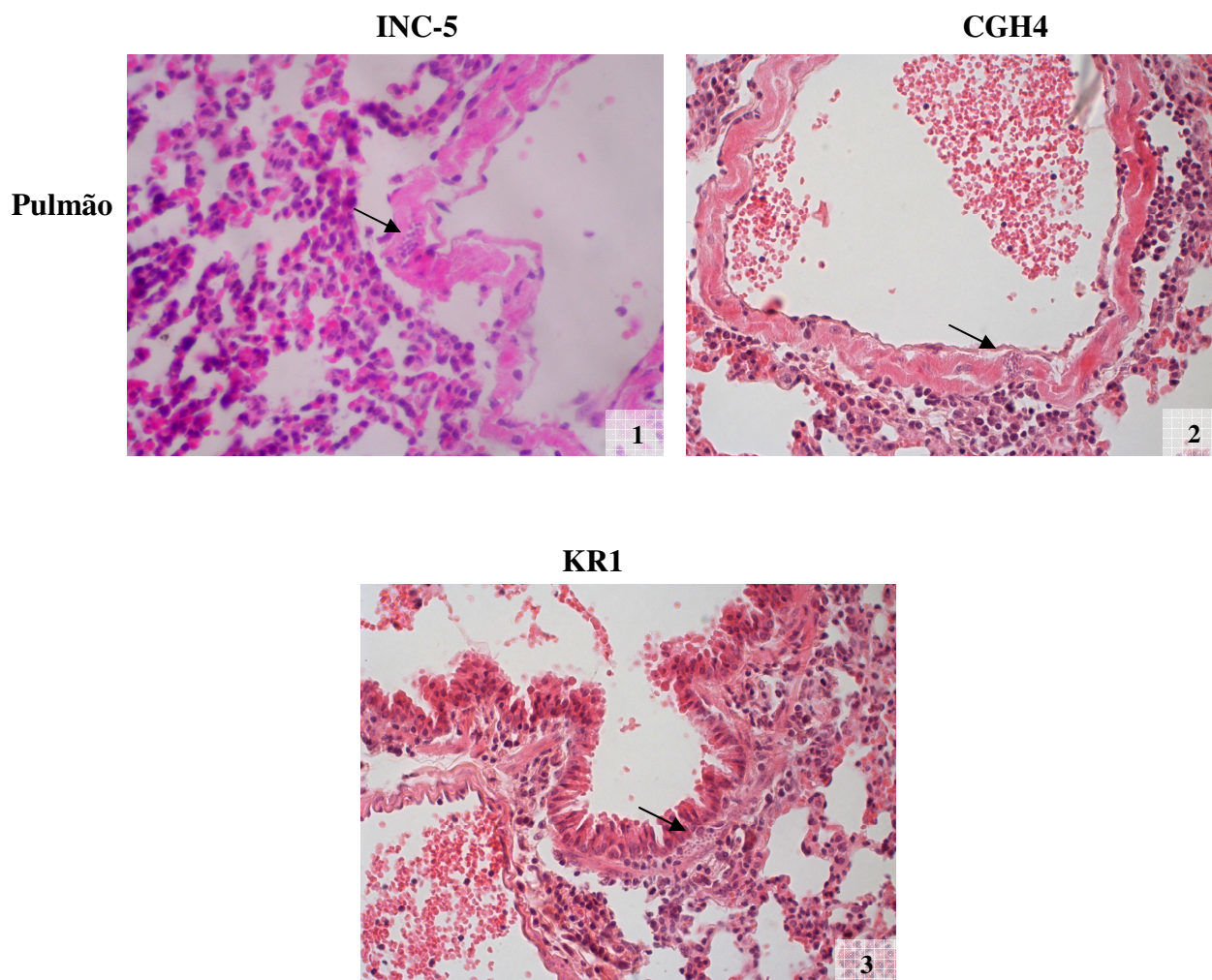
Microfotogràfia 2- Músculo Esquelético infectado com a cepa KR1 de *T. cruzi* (200X)

Microfotogràfia 3- Átrio infectado com a cepa CGH1 de *T. cruzi* (100X)

Microfotogràfia 4- Átrio infectado com a cepa KR1 de *T. cruzi* (100X)

Microfotogràfia 5- Ventriculo infectado com a cepa CGH1 de *T. cruzi* (100X)

Microfotogràfia 6- Ventriculo infectado com a cepa KR1 de *T. cruzi* (100X)



PRANCHA 5 – Microfotografia de cortes histológicos do pulmão dos camundongos infectados via intraperitoneal (3×10^4 parasitos) com cepas mexicanas de *T. cruzi* (INC-5, CGH4 e KR1) corados pela hematoxilina-eosina. **Seta** – indica a presença de ninhos de amastigotas.

Microfotografia 1- Pulmão infectado com parasitos da cepa INC-5 de *T. cruzi* (200X)

Microfotografia 2- Pulmão infectado com parasitos da cepa NINOA de *T. cruzi* (200X)

Microfotografia 3- Pulmão infectado com parasitos da cepa KR1 de *T. cruzi* (200X)

4.1.4 PROCESSO INFLAMATORIO TECIDUAL

A cepa que induziu um processo inflamatório mais intenso e em maior quantidade de tecidos foi a cepa INC-5 quando cotejadas às demais cepas em ambas as fases da doença (Tabelas 3 e 4).

Na fase aguda as cepas INC-5 e CGH1 apresentaram processos inflamatórios de moderados a intensos nos átrios e os isolados CGH2, CGH6 e NINOA apresentaram processos inflamatórios moderados. Foram observados processos inflamatórios de moderados a intensos no músculo esquelético nos animais inoculados com as cepas CGH2, CGH3, CGH4, NINOA e INC-5. No ventrículo a cepa INC-5 apresentou inflamação de moderada intensa. No pulmão de todos os camundongos inoculados com as cepas observaram-se processos inflamatórios de leves a moderados. Nos demais tecidos examinados os processos inflamatórios eram inexistentes ou leves (Tabela 3).

Durante a fase crônica a cepa INC-5 apresentou no átrio um processo inflamatório intenso; o isolado NINOA apresentou esse processo de moderado a intenso e nos isolados CGH1, CGH2, CGH4, CGH6 e KR1 variou de leve a moderado neste tecido. A cepa INC-5 foi a que apresentou o processo inflamatório mais intenso no ventrículo. No músculo esquelético os isolados CGH2, NINOA e INC-5 apresentaram processo inflamatório de moderado a intenso e os demais isolados de leve a moderado. No pulmão todas as cepas apresentaram um processo inflamatório de leve a moderado. Nos demais tecidos o processo inflamatório não existia ou era muito escasso (Tabela 4).

TABELA 3 – Processo inflamatório em camundongos inoculados pelas diferentes cepas mexicanas de *T. cruzi* nos órgãos e/ou tecidos estudados durante a fase aguda da doença.

Tecido \ Cepa	CGH1	CGH2	CGH3	CGH4	CGH6	KR1	NINOA	INC-5
Átrio	Moderado-Intenso	Moderado	Discreto-Leve	Discreto	Moderado	Leve	Moderado	Moderado-Intenso
Ventrículo	Discreto	Discreto	Discreto	Discreto	Discreto	Discreto	Discreto-Leve	Moderado-Intenso
Músculo Esquelético	Leve-Moderado	Moderado-Intenso	Moderado-Intenso	Moderado-Intenso	Discreto-Leve	Leve-Moderado	Moderado-Intenso	Moderado-Intenso
Pulmão	Leve-Moderado	Leve-Moderado	Leve-Moderado	Leve-Moderado	Leve-Moderado	Leve-Moderado	Leve-Moderado	Leve-Moderado
Junção Esôfago Gástrica	Discreto	Discreto	Leve	Discreto	Discreto	Discreto	Discreto	Discreto
Junção Gastro Duodenal	Discreto	Discreto	Leve	Discreto	Discreto	Discreto	Discreto	Discreto
Junção Íleo Cecal	Discreto	Discreto	Discreto	Discreto	Discreto	Discreto	Discreto	Discreto

TABELA 4 – Processo inflamatório em camundongos inoculados pelas diferentes cepas mexicanas de *T. cruzi* nos órgãos e/ou tecidos estudados durante a fase crônica da doença.

Tecido \ Cepa	CGH1	CGH2	CGH3	CGH4	CGH6	KR1	NINOA	INC-5
Átrio	Moderado	Moderado	Discreto	Leve-Moderado	Leve-Moderado	Leve-Moderado	Moderado-Intenso	Intenso
Ventrículo	Discreto	Discreto	Discreto	Discreto-Leve	Discreto	Discreto-Leve	Discreto-Leve	Intenso
Músculo Esquelético	Leve-Moderado	Moderado-Intenso	Leve-Moderado	Leve-Moderado	Leve-Moderado	Leve-Moderado	Moderado-Intenso	Moderado-Intenso
Pulmão	Leve-Moderado	Leve-Moderado	Leve-Moderado	Leve-Moderado	Leve-Moderado	Leve-Moderado	Leve-Moderado	Leve-Moderado
Junção Esôfago Gástrica	Discreto	Discreto	Discreto-Leve	Discreto	Discreto	Discreto	Discreto-Leve	Discreto
Junção Gastro Duodenal	Discreto	Discreto	Discreto	Discreto	Discreto	Discreto	Discreto	Discreto
Junção Íleo Cecal	Discreto	Discreto	Discreto	Discreto	Discreto	Discreto	Discreto	Discreto

4.1.5 CORRELAÇÃO ENTRE O PARASITISMO E O PROCESSO INFLAMATÓRIO

Foi realizado o test de correlação entre o parasitismo tecidual e o processo inflamatório das diferentes cepas em ambas as fases da doença. Observou-se durante a fase aguda que as cepas CGH1 e INC-5 apresentaram uma forte correlação ($0,81 \geq r < 1$) entre o processo parasitário e tecidual nas junções íleo-cecal e esôfago-gástrica, respectivamente. As cepas CGH2 (átrio e JEG), CGH3 (JEG) e KR1 (pulmão, JGD e JIC) a correlação foi moderada ($0,51 \geq r < 0,8$) e a cepa CGH4 apresentou uma correlação fraca ($0,01 \geq r < 0,5$) no pulmão (Tabela 3).

Na fase crônica foi observada uma forte correlação ($0,81 \geq r < 1$) nas cepas CGH2 (JGD), CGH3 (JGD e JIC) e KR1(JIC) e moderada ($0,51 \geq r < 0,8$) nas cepas CGH3 (JEG), KR1(JEG e JGD) e NINOA (ventrículo e JIC) (Tabela 4).

Deve-se ressaltar que a cepa CGH6 não apresentou correlação nos tecidos estudados em nenhuma das fases da infecção. As cepas CGH1 e INC-5 na fase aguda tiveram uma forte correlação entre o processo inflamatório e parasitário, contudo, na fase crônica essa correlação não foi observada em nenhum dos órgãos estudados. Ressalta-se que o tecido intestinal foi o único tecido que apresentou correlação entre o processo inflamatório e a quantidade de ninhos de amastigotas na maioria das cepas de *T. cruzi* em ambas as fases da infecção (Tabelas 5 e 6).

TABELA 5 – Correlação entre a quantidade de ninhos de amastigotas e o processo inflamatório nos órgãos e/ou tecidos de camundongos infectados com as diferentes cepas de *T. cruzi* durante a fase aguda da doença ($p < 0,05$).

Correlação de Spearman (r)			
CEPA	Fraca	Moderada	Forte
	$0,01 \geq r < 0,5$	$0,51 \geq r < 0,8$	$0,81 \geq r < 1$
CGH1			JIC
CGH2		Átrio	
CGH3		JEG	
CGH4	Pulmão	JEG	
CGH6			
		Pulmão	
KR1		JGD	
		JIC	
NINOA			
INC-5			JEG

TABELA 6 – Correlação entre a quantidade de ninhos de amastigotas e o processo inflamatório nos órgãos e/ou tecidos de camundongos infectados com as diferentes cepas de *T. cruzi* durante a fase crônica da doença ($p < 0,05$).

Correlação de Spearman (r)			
CEPA	Fraca	Moderada	Forte
	$0,01 \geq r < 0,5$	$0,51 \geq r < 0,79$	$0,8 > r < 1$
CGH1			
CGH2			JGD
CGH3		JEG	JGD JIC
CGH4			
CGH6			
KR1		JEG JGD	JIC
NINOA		Ventrículo	
INC-5		JIC	

4.2 ESTUDOS *in vitro*

Para observar a capacidade de infectar os diferentes tipos celulares por *T. cruzi* foram utilizadas as cepas CGH1 e KR1 subpatentes e as cepas NINOA e INC-5 patentes.

4.2.1 INFECCÃO DE CÉLULAS MK2 UTILIZANDO TRIPOMASTIGOTAS DE DIFERENTES CEPAS MEXICANAS DE *T. cruzi*

Na infecção *in vitro* das células MK2, os isolados INC-5 e NINOA apresentaram maior infectividade às 24h após infecção, 81,5 e 77,2% respectivamente, quando cotejados aos isolados CGH1 (47,5%) e KR1 (23,2%) ($p<0,05$), (Figura 4; Prancha 4).

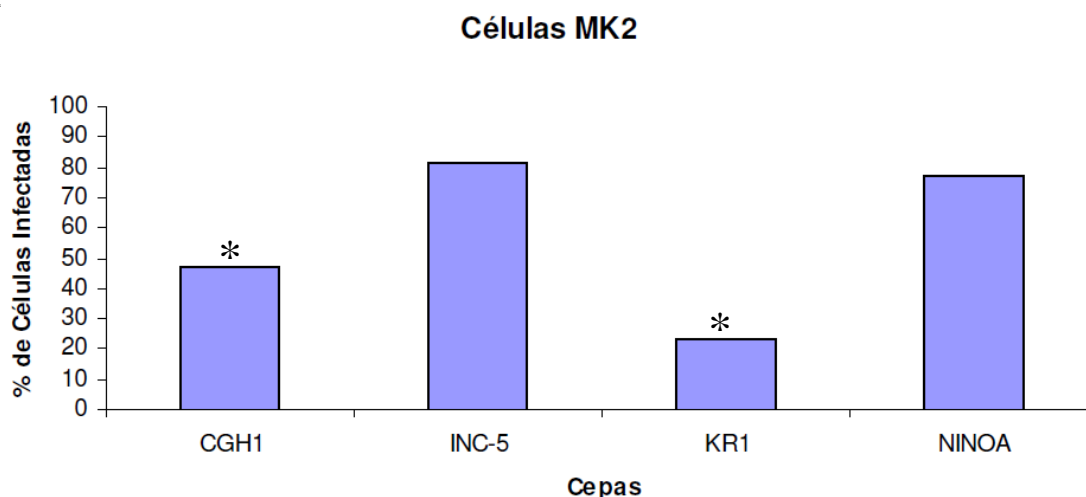


FIGURA 4 – Percentagem de células MK2 infectadas pelas diferentes cepas mexicanas de *T. cruzi* na relação 1:2 (célula/parasito) às 24h após a infecção. (*) as cepas CGH1 e KR1 apresentaram diferencia significativa quando comparadas com as cepas NINOA e INC-5 ($p<0,05$).

4.2.2 INFECCÃO DE CÉLULAS VERO CCL-81 UTILIZANDO TRIPOMASTIGOTAS DE DIFERENTES CEPAS MEXICANAS DE *T. cruzi*

Não foi detectada diferença significativa entre a infectividade dos isolados INC-5, NINOA, CGH1 e KR1 às 24 hs após infecção em as células Vero-CCL-81 (Figura 5; Prancha 5).

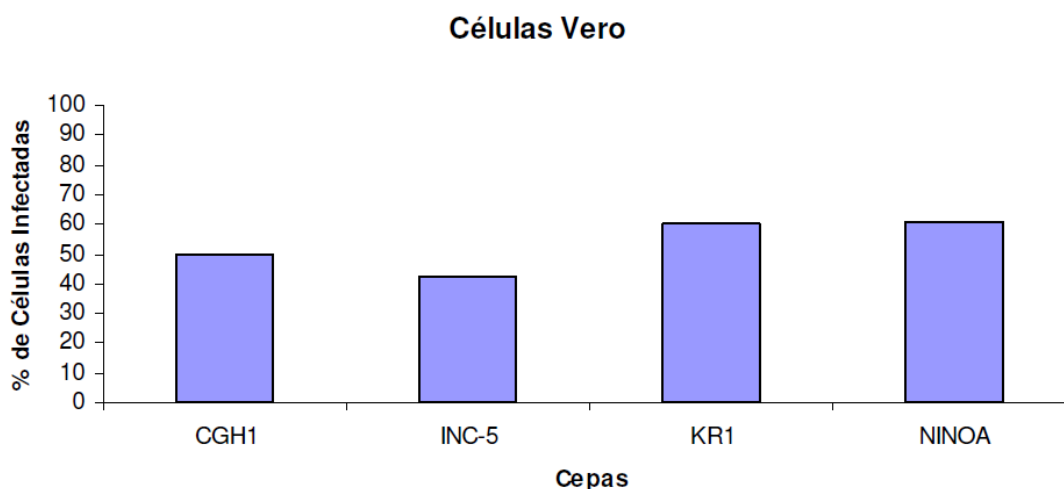
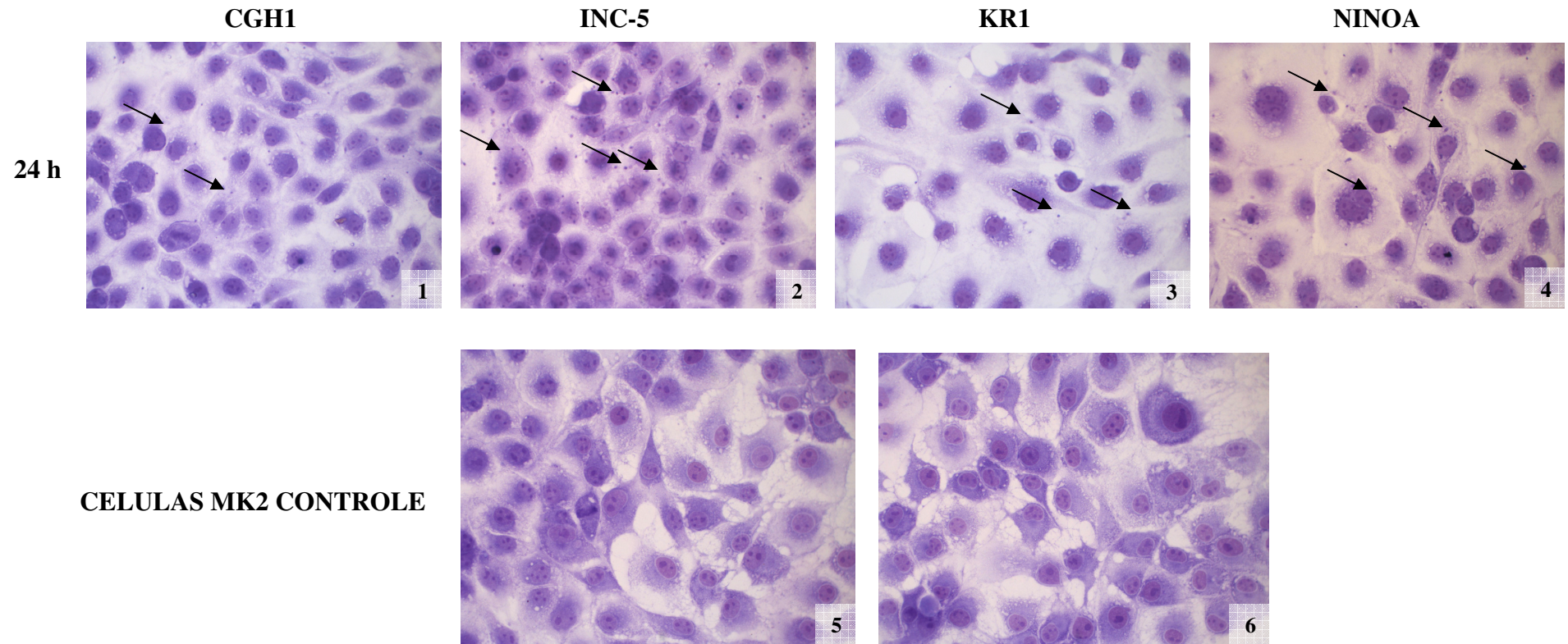
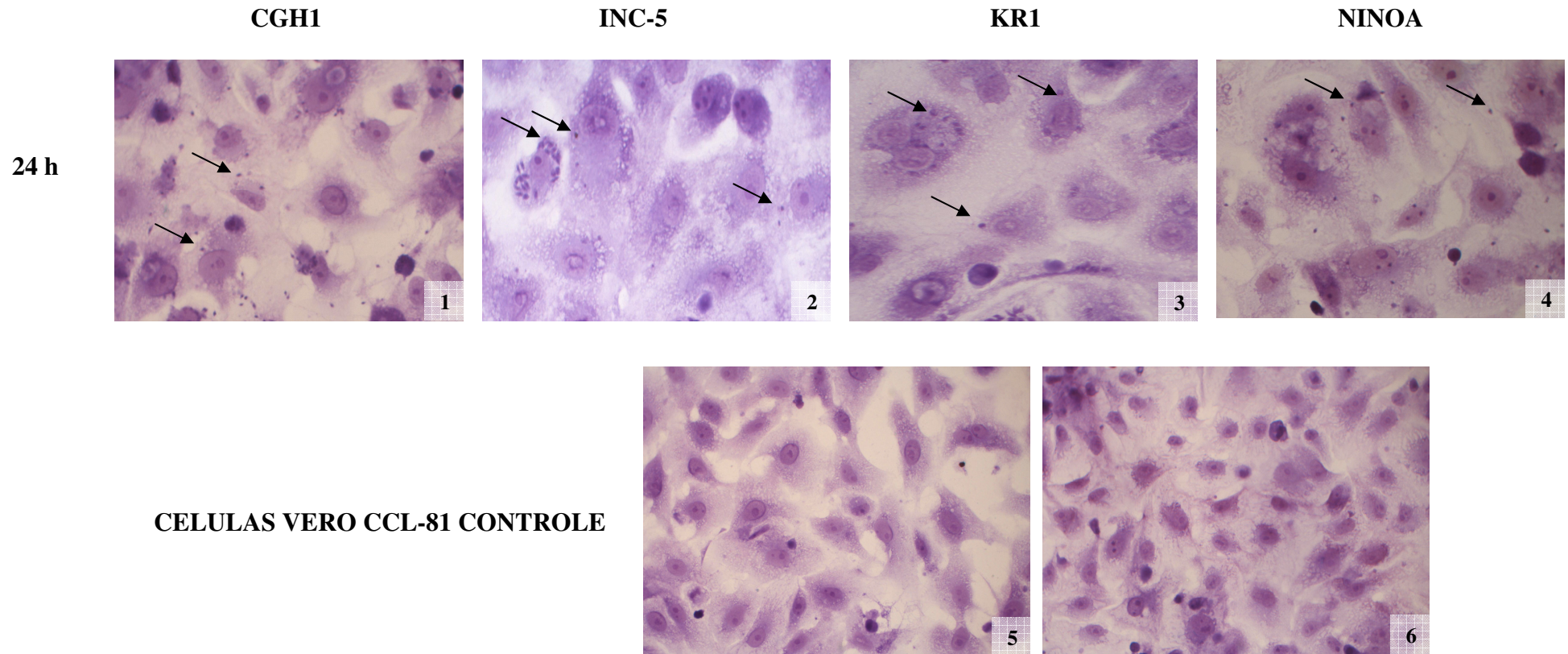


FIGURA 5 – Percentagem de células Vero-CCL81 infectadas pelas diferentes cepas mexicanas de *T. cruzi* na relação 1:2 (célula/parasito) às 24h após a infecção.



PRANCHA 6 – Células MK2 após 24h de infecção com *T. cruzi* na relação 1:2 (célula/parasito), (fotos 1-4) e controle: células MK2 não infectadas (fotos 5-6). Aumento 200X. **Seta:** indica a presença de amastigotas.



PRANCHA 7 – Células Vero CCL-81 após 24h de infecção com *T. cruzi* na relação 1:2 (célula/parasito) (fotos 1-4), aumento de 400X e controle: células Vero CCL-81 não infectadas (fotos 5-6), aumento de 200X. **Seta:** indica a presença de amastigotas.

4.2.3 INFECÇÃO DE MACRÓFAGOS UTILIZANDO TRIPOMASTIGOTAS DE DIFERENTES CEPAS MEXICANAS DE *T. cruzi*

Tripomastigotas obtidos de cultura celular de todas as cepas de *T. cruzi* foram capazes de infectar macrófagos peritoneais de camundongos durante os períodos de cultivo (24, 48, 72, 96 e 120h). Entretanto, os isolados NINOA e KR1 apresentaram aumento significativo na porcentagem de infectividade dos macrófagos a partir de 96h após a adição de tripomastigotas na cultura (98-100%, respectivamente) ($p<0,05$). O padrão de infectividade dos outros isolados manteve-se constante (Figura 6; Prancha 6).

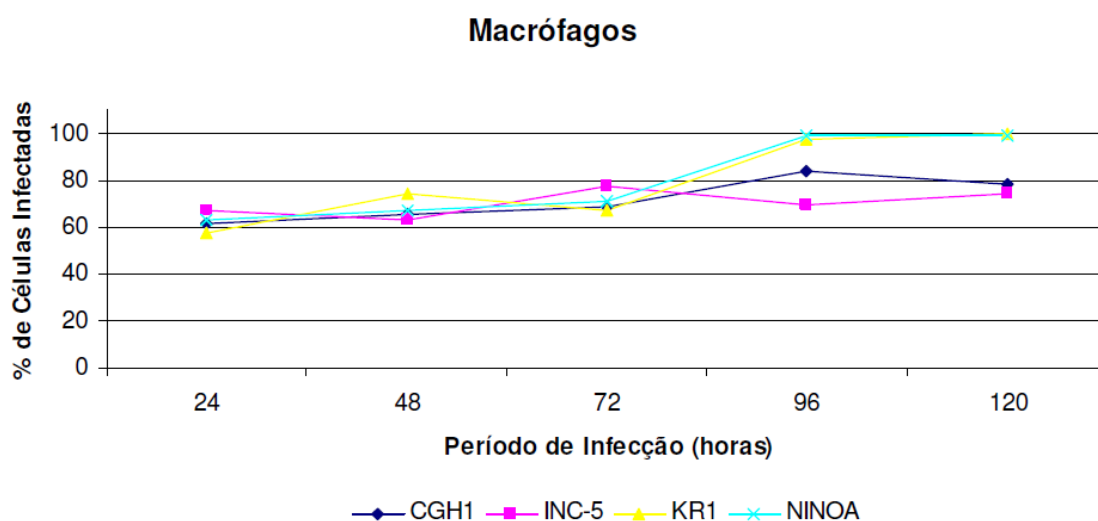
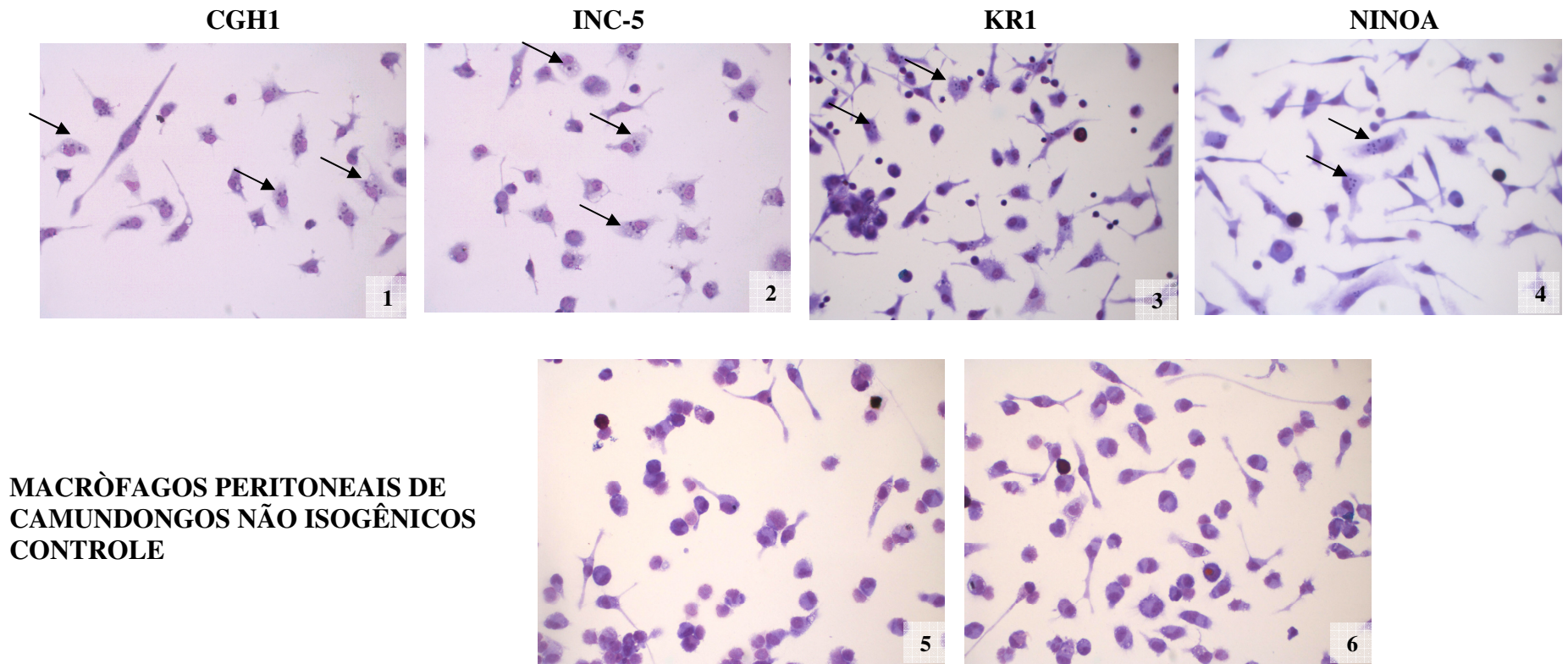


FIGURA 6 – Porcentagem de macrófagos infectados pelas diferentes cepas mexicanas de *T. cruzi* na relação 1:2 (célula/parasito) às 24, 48, 72, 96 e 120h após a infecção.

Quando comparamos a infectividade por isolado entre os três tipos celulares foi observado que a cepa INC-5, às 24hs após infecção apresentou a menor infectividade em células VERO (42%) quando comparado as células MK2 (81,5%) e macrófagos (67%)($p<0,05$). A cepa KR1, 24h após a adição dos parasitos nas culturas de células MK2, apresentou o menor índice de infectividade (23%) quando comparadas às culturas de células VERO (60,2%) e macrófagos (57,5%) ($p<0,05$). A cepa NINOA apresentou a maior infectividade nas células MK2 às 24h de cultivo quando equiparadas com as outras duas linhagens celulares ($p<0,05$). Já os índices de infectividade apresentados pela cepa CGH1, nas três linhagens de células hospedeiras não foram significativos (Figura7).



PRANCHA 8 – Macrófagos peritoneais de camundongo não isogênico após 24h de infecção com *T. cruzi* na relação 1:2 (célula/parasito) (fotos 1-4) e controle: macrófagos não infectados (fotos 5-6). Aumento de 100X. **Seta:** indica a presença de amastigotas

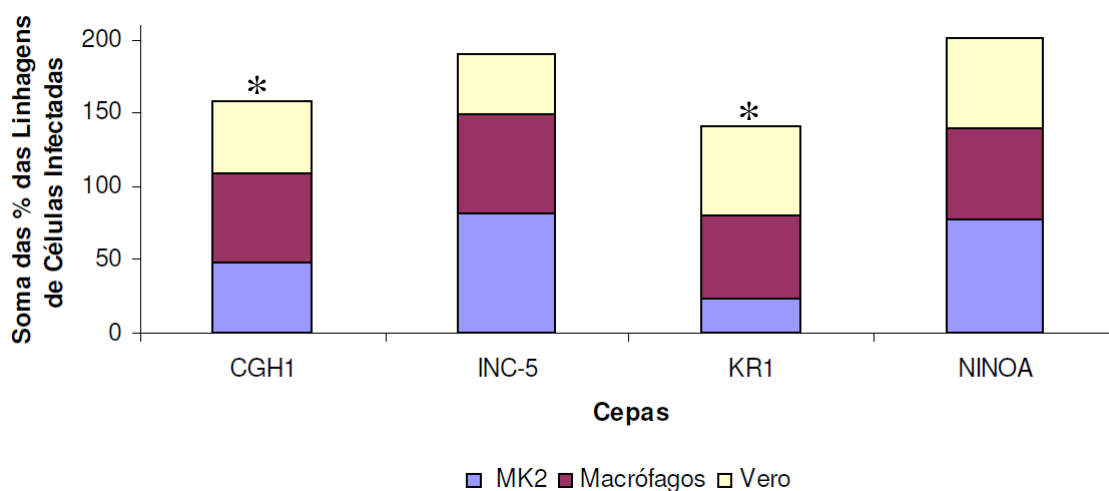


FIGURA 7 – Infectividade pelas cepas mexicanas de *T. cruzi* das células MK2, Vero-CCL81 e macrófagos peritoneais de camundongos não isogênicos na relação 1:2 (célula/parasito) às 24h após infecção. (*) as cepas CGH1 e KR1 apresentaram diferença significativa quando comparadas com as cepas NINOA e INC-5 ($p < 0,05$).

4.3 CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA

4.3.1 PCR ESPECÍFICA PARA *Trypanosoma cruzi*

Foi realizado a PCR com os iniciadores 121-122 para verificar a presença de *T. cruzi* nas amostras. Todas as amostras amplificaram o fragmento 330pb específico para *T. cruzi* (Figura 8).

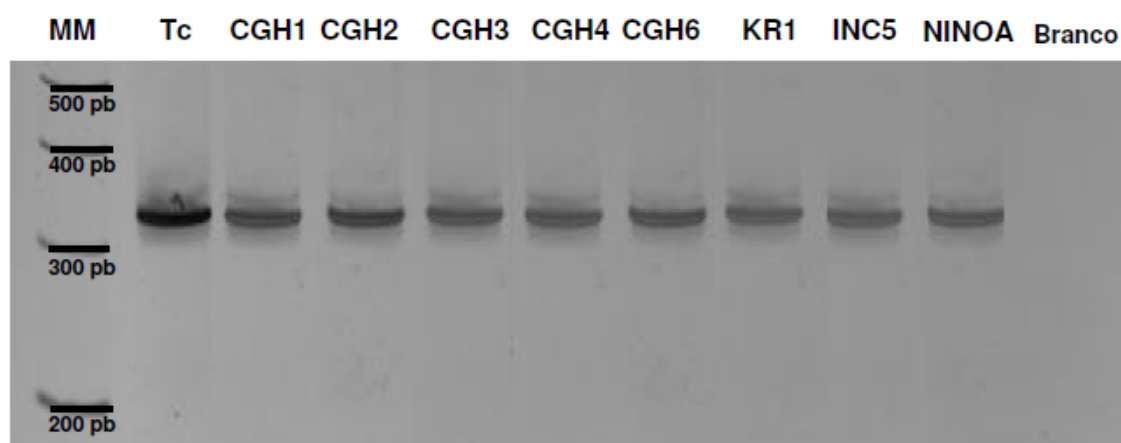


FIGURA 8 – Gel de poliacrilamida 6% corado pela prata mostrando fragmentos específicos de *T. cruzi* de 330pb amplificado pela PCR com os iniciadores 121-122. MM: Peso molecular, Tc: cepa MUT, CGH1, CGH2, CGH3, CGH4, CGH6, KR1, NINOA e INC-5 isolados mexicanos, **Branco**: controle negativo.

4.3.2 PCR COM PRIMERS D72, D75 E RG3

A realização da PCR multiplex com os iniciadores D72, D75 e RG3 nas amostras de *T. cruzi* estudadas mostrou amplificação de um fragmento de 250pb, correspondente ao TcI. Esse resultado também mostrou ausência de *T. rangeli* em nossos isolados (Figura 9).

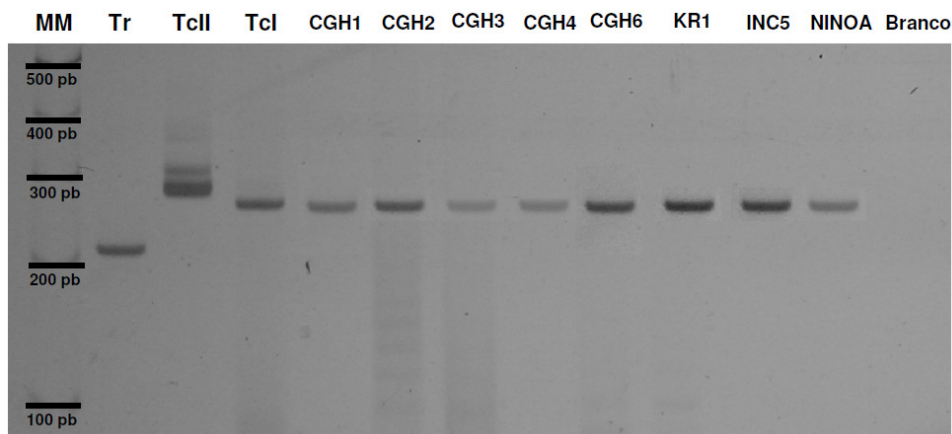


FIGURA 9 – Gel de poliacrilamida 6% corado pela prata utilizando os iniciadores D72, D75 e RG3. Observe-se que as cepas mexicanas de *T. cruzi* todas apresentaram o fragmento de 250pb correspondente a *T. cruzi* I. Canaletas: **MM**: peso molecular; **Tr**: cepa P02 de *T. Rangeli* (210pb); **TcII**: cepa HEL de *T. cruzi* II (265pb); **TcI**: cepa MUT de *T. cruzi* I (250pb); **Branco**: controle negativo.

4.3.3 AMPLIFICAÇÃO DO ESPAÇO NÃO TRANSCRITO DOS GENES DO (ITS) MINI-ÉXON

Mediante amplificação de regiões conservadas do mini-éxon, todas as cepas utilizadas foram classificadas como *Trypanosoma cruzi* I (banda de 350pb). Observe o controle do TcII que apresentou a banda de (300pb) (Figura 10).

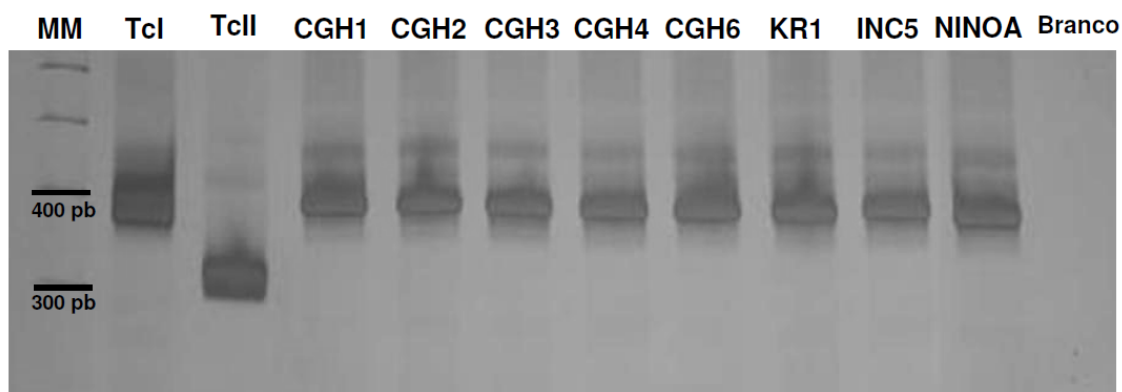


FIGURA 10: Gel de poliacrilamida 6% corado pela prata utilizando os iniciadores Tc, Tc1 e Tc2. Todas as amostras das cepas mexicanas de *T. cruzi*, amplificaram fragmentos de 350pb, específicos para TcI. Canaletas: **MM**: peso molecular; **TcI**: cepa MUT de *T. cruzi* I (350pb), **TcII**: cepa HEL de *T. cruzi* II (300pb); **Branco**: controle negativo.

4.3.4 AMPLIFICAÇÃO DAS REGIÕES INTERGÊNICAS DOS GENES DO *SPLICED LEADER*

Mediante esta técnica foi confirmado que todos os isolados mexicanos de *T. cruzi* pertencem ao grupo TcI (banda de 475 pb) (Figura 11).

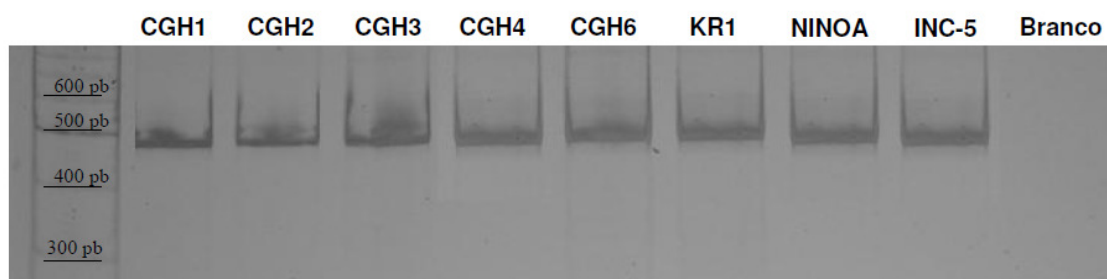


FIGURA 11 – Gel de poliacrilamida 6% corado pela prata utilizando os iniciadores UTCC e TCac. Todas as amostras das cepas mexicanas de *T. cruzi*, amplificaram fragmentos de 475pb, específicos para TcI. MM: peso molecular; Branco: controle negativo.

4.3.5 PCR PARA OS HAPLÓTIPOS DO TcI

Tendo o conhecimento que nossos isolados pertencem ao TcI como demonstrado pelas técnicas do mini-éxon e o *Spliced Leader* foi realizada a PCR específica para classificação dos haplótipos deste grupo como descrito por Falla *et al.*, (2009). Os oito isolados estudados amplificaram um fragmento de 275pb correspondentes ao haplótipo Ia (Figura 11) e o fragmento de 200pb correspondente ao haplótipo Id (Figura 12).

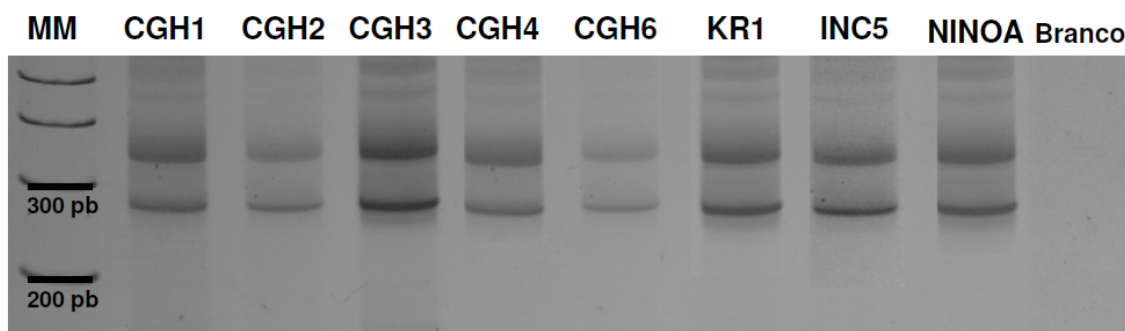


FIGURA 12 – Gel de poliacrilamida 6% corado pela prata. Observe que todas as amostras das cepas mexicanas de *T. cruzi* amplificam um fragmento de 275pb para o haplótipo Ia. MM: peso molecular; Branco: controle negativo.

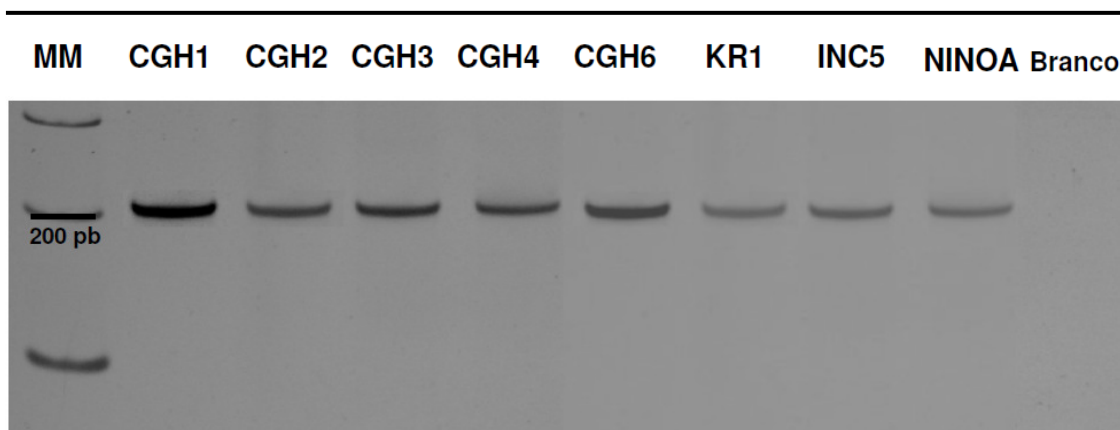


FIGURA 13 – Gel de poliacrilamida 6% corado pela prata. Observe que todas as amostras das cepas mexicanas de *T. cruzi* amplificam um fragmento de 200pb para o haplótipo Id. MM: peso molecular; Branco: controle negativo.

4.3.6 RAPD (*RANDOMLY AMPLIFIED POLYMORPHIC DNA*)

O iniciador $\lambda 183R$ foi o que melhor classificou os isolados mexicanos de *T. cruzi*, por isso foi escolhido para gerar o fenograma. As cepas de *T. cruzi* mexicanas foram distribuídas em dois braços polimórficos com 28,4% de coeficiente de similaridade (CS). O primeiro braço foi constituído pelas seis cepas obtidas de triatomíneos (CGH3, CGH6, CGH4, CGH1, CGH2 e KR1). O segundo braço foi constituído pelas cepas de origem humana (NINOA e INC-5) apresentando 50% de CS. Três fatos interessantes que chamaram a atenção foram: 1 – a cepa KR1, proveniente de *T. picturata*, encontra-se separada das cepas CGH3, CGH6, CGH4, CGH1 e CGH2 que são provenientes de *T. palillipennis* ou *T. longipennis* apresentando um CS de 45,2%; 2 – as cepas que apresentaram parasitemia patente estavam separadas daquelas que apresentavam parasitemia subpatente e 3 – foi possível a separação pela origem geográfica (Figura - 14).

Os outros quatro iniciadores (M13-40-F, $\lambda gt11$ -F, L-15996, $\lambda 31F$) utilizados não apresentaram resultados homogêneos que nos permitiram fazer um análise dentre as cepas.

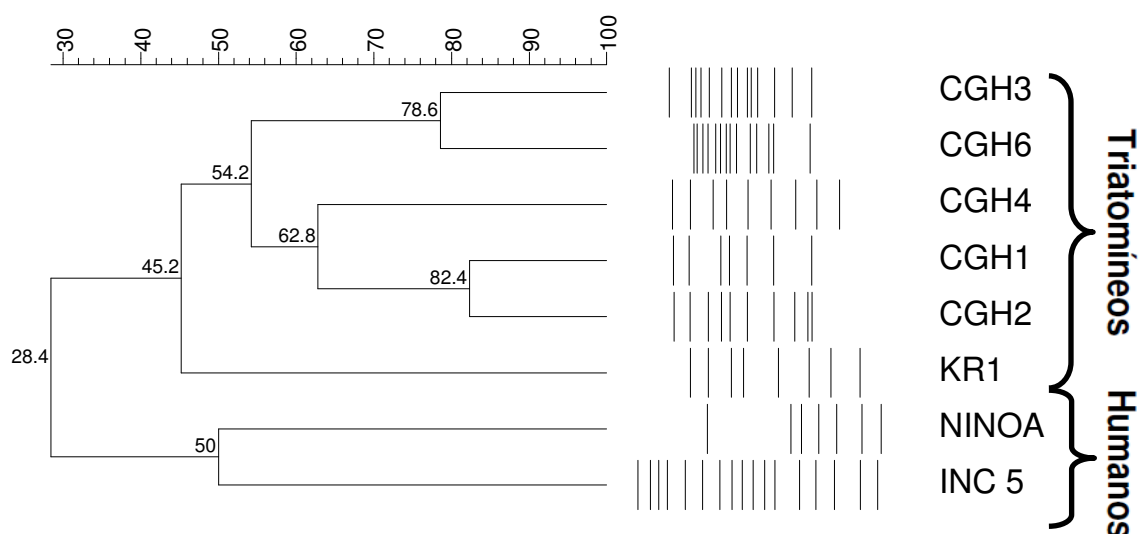


FIGURA 14 – Fenograma das cepas mexicanas de *T. cruzi* gerado a partir dos perfis obtidos da RAPD com o iniciador λ 183R pelo programa Gel ComparII. Os valores representados indicam o coeficiente de similaridade entre as cepas mexicanas de *T. cruzi*. As cepas CGH3, CGH6, CGH4, CGH1, CGH2 e KR1 isoladas de triatomíneos são procedentes do Estado de Jalisco. As cepas NINOA e INC-5 isoladas de humanos são procedentes dos Estados de Oaxaca e Guanajuato respectivamente.

5. DISCUSSÃO

O México é um país tropical, onde as doenças próprias deste clima estão presentes, dentre elas a doença de Chagas. Recentemente, neste país, foram implementados programas de controle da doença de Chagas e do vetor enquanto nos países de América do Sul os mesmos já se encontravam em andamento algum tempo (SCHOFIELD & DIAS, 1999; WHO/OPS, 2006; MONCAYO 2009). Os altos índices de infecção dos triatomíneos encontrados no Estado de Jalisco, México, sugerem uma elevada exposição das pessoas desta região ao *T. cruzi* (MAGALLÓN-GASTELÚM *et al.*, 1998; GÓMEZ-HERNÁNDEZ *et al.*, 2008) (Anexo I) o que despertou nosso interesse de estudar as cepas circulantes neste estado realizando a caracterização biológica e molecular das mesmas.

Considera-se importante a caracterização biológica e genética de isolados de *T. cruzi* de regiões endêmicas deste país para a compreensão da epidemiologia e biologia do parasito nestas áreas. Desde 1950 tem-se realizado diferentes estudos sobre cepas de *T. cruzi* o que tem permitido estabelecer que este parasito pode ser encontrado em diferentes vetores e reservatórios, e que em regiões do mesmo país, se comportam de forma diferente ao serem inoculados em modelos experimentais (BICE *et al.*, 1970; MAGALHAES *et al.*, 1996)

Nossas cepas mostraram elevada infectividade por apresentar positividade em 100% dos camundongos inoculados. No México não existem relatos que mostrem o perfil de infectividade de diferentes isolados de *T. cruzi* em camundongos.

Neste estudo, observamos que das oito cepas estudadas, cinco demonstraram parasitemia patente (CGH3, CGH4, CGH6, NINOA e INC-5), sendo esta o tipo mais freqüentemente relatado nos estudos experimentais (ESPINOZA *et al.*, 1998; ARAUJO *et al.*, 1999; VERA-CRUZ *et al.*, 2003; LISBOA *et al.*, 2007). Três cepas (CGH1, CGH2 e KR1) apresentaram parasitemia subpatente, o que não é relatado na literatura em modelos experimentais de cepas de *T. cruzi* procedentes do México.

As cepas deste estudo induziram uma mortalidade que oscilou entre 3,3 e 53,3% nos camundongos inoculados. No México e, especificamente no Estado de Jalisco, já foram descritos estudos que mostram que as cepas procedentes deste Estado podem matar de 0 a 100% dos animais infectados experimentalmente (ESPINOZA *et al.*, 1998; BARRERA-PÉREZ *et al.*, 2001; VERA-CRUZ *et al.*, 2003)

Os camundongos inoculados com as cepas subpatentes (CGH1, CGH2 e KR1) apresentaram-se positivos durante um ano de acompanhamento pelo método do microhematocrito. Roellig *et al.* (2010) observaram que parasitos pertencentes ao grupo

TcI e TcIIe (TcVI da nova classificação Zingales *et al.*, 2009) apresentaram genótipos que se caracterizaram por manter parasitemia subpatente na fase crônica e infectar *Rhodnius prolixus*. Segundo esses autores, a manutenção do ciclo silvestre do *T. cruzi* depende de vetores competitivos que encontrem hospedeiros infectados. Destaca-se que as cepas utilizadas em nosso estudo pertencem ao grupo TcI. A diversidade biológica e genética do *T. cruzi* e a capacidade de infectar diversas espécies de hospedeiros mamíferos sustentam a hipótese que algumas espécies de animais podem manter parasitemias por maior tempo que outras o que os tornaria reservatórios. As diferenças entre reservatórios potenciais podem ser baseadas na espécie e na genética do hospedeiro, no genótipo do parasito ou na combinação de ambos.

Os isolados mexicanos utilizados neste estudo apresentaram um tropismo por músculo esquelético e pelo coração, sendo que o tropismo por estes tecidos já foi relatado em cepas encontradas no Estado de Jalisco, bem como em outras regiões do México (BIAGI *et al.*, 1965). No Brasil Andrade *et al.* (1985; 1997) descreveram diferenças no comportamento na infecção experimental relacionado com o tropismo das cepas, identificando cepas reticulotrópicas ou miotrópicas.

Atualmente não se conhece muito sobre a importância do tropismo tecidual no pulmão pelo *T. cruzi*, talvez porque este não seja tão intenso quanto nos outros tecidos, como músculo cardíaco e esquelético, ou até mesmo porque não provoque alterações no órgão (GUARNER *et al.*, 2001; MELNIKOV *et al.* 2005). Melnikov *et al.* (2005), observaram raros ninhos de amastigotas no pulmão de camundongos infectados com isolados mexicanos de *T. cruzi*, onde chegou a ser detectado em 32-90% dos camundongos. Além disso, dependendo da cepa, foram observadas lesões brônquicas, edema e inflamação sendo que alguns apresentavam hemorragia alveolar. Em nosso estudo foi detectada infectividade neste órgão de 40 a 100% dos animais na fase aguda e de 50 a 73% dos camundongos na fase crônica, porém, com baixa quantidade de ninhos de amastigotas como relatado por Melnikov *et al.* (2005). Estes dados podem confirmar que as cepas mexicanas tenham um tropismo pelo o músculo liso dos grandes vasos pulmonares e da região peribrônquica dos pulmões.

Isolados de *T. cruzi* podem apresentar diferenças na imunogenicidade desencadeada em diferentes órgãos e/ou tecidos os quais este infecta. Este fato pode ter influenciado na correlação entre o número de ninhos de amastigotas e o processo inflamatório, isto é, quanto maior o processo inflamatório maior a probabilidade de se encontrar maior quantidade de ninhos amastigotas.

Interessante notar que em alguns animais inoculados com cepas de *T. cruzi* que apresentaram parasitemia patente (NINOA e INC-5) foi observada paresia nas extremidades, principalmente nos membros traseiros, e o animal foi a óbito poucas horas depois (dados não apresentados). Os estudos histopatológicos realizados nestes animais mostraram intenso parasitismo tecidual no músculo estriado que em ocasiões ocupavam toda a fibra muscular (Prancha 3 e 4).

A morfologia, infectividade, virulência e patogenicidade das formas tripomastigotas de *T. cruzi* têm sido utilizadas para caracterizar os isolados do parasito. A virulência de uma cepa está relacionada com a sua multiplicação no hospedeiro. Em nosso estudo *in vitro* foi possível estabelecer um perfil de infectividade de quatro isolados mexicanos em culturas de células MK2, VERO e macrófagos peritoneais. Após a penetração na célula-alvo os tripomastigotas transformam-se em amastigotas que proliferam e diferenciam-se em novos tripomastigotas. Após a ruptura da célula parasitada, há invasão de novas células. Assim, a duração do ciclo celular e o tempo necessário para as transformações de formas evolutivas são fatores que devem ser considerados quando se analisam as percentagens de células infectadas. Nossos dados mostraram que os isolados INC-5 e NINOA apresentaram maior infectividade às 24h após a infecção em células MK2 (81,5 e 77,25%, respectivamente) quando comparados aos isolados CGH1 (47,5%) e KR1 (23,2%). Vale ressaltar que em nosso estudo *in vivo* os isolados INC-5 e NINOA apresentaram índice de parasitismo de, aproximadamente, 100% em músculo esquelético demonstrando a sua alta capacidade infectante. Além disso, ninhos de amastigotas da cepa INC-5 foram encontrados de forma significativa em grande número no músculo cardíaco em relação aos outros isolados.

Estes resultados demonstram que independente do tipo celular, parasitos das cepas INC-5 e NINOA são capazes de infectar em forma significativa. E esta é uma característica que pode estar sendo influenciada pelas diferentes moléculas de superfície e mecanismos de invasão celular. No experimento utilizando células VERO, não foi detectada diferença significativa entre a infectividade dos quatro isolados às 24h após infecção.

A adesão e a invasão de células de vertebrados por tripomastigotas dependem de glicoproteínas do tipo mucinas da superfície dos tripomastigotas (SCHENKMAN *et al.*, 1993; CAMARGO *et al.*, 1997; RUIZ *et al.*, 1998; revisão em ACOSTA-SERRANO, 2001; YOSHIDA 2006; 2009). A interação destas moléculas de superfície com seus receptores na membrana do hospedeiro ativam diferentes vias de sinalização capazes de

engatilhar sinais de transdução diferenciados, que culminam com o processo de invasão, seja em menor ou maior intensidade (NEIRA *et al.*, 2002; YOSHIDA 2006; 2009). Existe variabilidade entre diferentes populações de *T. cruzi* quanto à expressão dessas moléculas (RUIZ *et al.*, 1998; NEIRA *et al.*, 2002; DOSREIS, 2002; YOSHIDA 2006; 2009). Ruiz *et al.* (1998) encontraram relação inversa entre infectividade e expressão de gp90 e gp35/50. Assim detectaram baixa expressão de gp35/50 e nenhuma expressão de gp90 em tripomastigotas da cepa CL que tem alta capacidade invasiva, ao contrário do observado na cepa G pouco invasiva. Não há estudos semelhantes comparando isolados mexicanos quanto à expressão de moléculas de superfície sendo um dos próximos objetivos de nossa equipe.

Acredita-se que populações de *T. cruzi* com maior quantidade de transialidases sejam mais invasivas (SOUTO-PADRON *et al.*, 1990). A família das transialidases, responsáveis pela transferência de ácido siálico da célula hospedeira para mucinas da superfície do parasito, bem como a das moléculas transialidase-like, são abundantemente expressas na superfície de tripomastigotas de *T. cruzi* e apresentam diversidade funcional (FRASCH, 2000). Sendo assim, sugere-se que os isolados INC-5 e NINOA apresentem peculiaridades quanto à expressão de moléculas de superfície e que este fato possa ter contribuído na diferença de infectividade observada nas culturas de células MK2. Somente estudos futuros poderão esclarecer se estas moléculas, bem como as mucinas aceptoras de ácido siálico, participam da resposta diferencial das populações agora estudadas.

Tripomastigotas de todas as cepas de *T. cruzi* utilizadas neste estudo foram capazes de infectar macrófagos peritoneais de camundongos durante os períodos de cultivo considerados. Entretanto, analisando a eficiência de interiorização de tripomastigotas das diferentes populações de *T. cruzi* em culturas de macrófagos peritoneais, verificamos que tripomastigotas das cepas NINOA e KR1 apresentaram aumento significativo na porcentagem de infectividade dos macrófagos a partir de 96h de cultura.

O processo de adesão e invasão do *T. cruzi* em macrófagos envolve interações moleculares entre as membranas do parasito e da célula hospedeira, aspectos já discutidos anteriormente para MK2 e VERO CCL-81.

Alcantara & Brener (1978) e Meireles *et al.* (1982) trabalhando com culturas de macrófagos infectados com as cepas Y (TcII) e CL (TcVI) observaram o processo de interiorização em macrófagos. A cepa Y, mesmo após o processo de opsonização pelo

sistema complemento, foi capaz de se multiplicar e liberar novos tripomastigotas no meio. Já a cepa CL foi destruída extensivamente dentro do macrófago. Estes autores acreditam que componentes da membrana do parasito e diferentes receptores do macrófago, estejam influenciando não só no fenômeno de interiorização como também na sobrevivência do parasito na célula hospedeira.

Em nosso estudo observamos que parasitos das cepas INC-5, NINOA, CGH1 e KR1 foram capazes de invadir e se multiplicarem dentro de macrófagos de forma significativa. Embora estes isolados pertençam a grupos do *T. cruzi* diferentes das cepas utilizadas por Alcantara & Brener (1978) e Meireles et al. (1982), acredita-se que, independente de grupos genéticos, estes parasitos apresentem mecanismos similares para invadir e sobreviver dentro de células fagocíticas.

As glicoproteínas da superfície do parasito são responsáveis por engatilhar o fenômeno de mobilização de Ca^{2+} intracelular tanto do hospedeiro quanto do parasito, importante para o processo de invasão (TARDIEUX *et al.*, 1992; YOSHIDA 2006; 2009). Eventos intracelulares ocorrem no citoplasma do parasito e podem induzir sinais distintos para mobilização de Ca^{2+} na célula hospedeira conforme visto para células de caráter não fagocítico, a exemplo da expressão da oligopeptidases B. Moléculas do parasito estão envolvidas na ativação da trifosfatoinositol cinase (PI3K). Esta enzima contribui para o processo de fagocitose e apresenta como alvo, um complexo (PKB/c-akt), que quando ativado é essencial para o translocação de enzimas digestivas até a membrana do hospedeiro, possibilitando sucesso no mecanismo de invasão do parasito. Sendo assim, destaca-se o importante papel que as enzimas da cascata de transdução possuem no processo de fagocitose. Tripomastigotas são também capazes de engatilhar processos importantes na célula hospedeira como mecanismos de reparo de membrana, úteis para a invasão e sobrevivência intracelular. Estes processos são mediados pela interação direta entre moléculas da superfície do hospedeiro e da membrana do parasito (revisão em ANDREWS, 2002). Assim as diferenças observadas *in vitro* entre os diferentes isolados mexicanos de *T. cruzi* podem ter acontecido, em virtude de alguma peculiaridade nos mecanismos de engatilhamento de cascata de sinalização, durante o processo de invasão, conforme visto para outras populações de *T. cruzi* (YOSHIDA 2006; 2009).

Na década passada foram descritos dois grupos genéticos principais de *T. cruzi*: o *T. cruzi* I (TcI) associado ao ciclo de transmissão silvestre, e *T. cruzi* II (TcII), encontrado com maior frequência no ambiente doméstico. Esta relação entre genótipos e

o ciclo do *T. cruzi*, não pode ser aplicada a países da América Central e o México, pois o genótipo TcI é predominante no ciclo doméstico, peridoméstico e silvestre nestas regiões diferentemente ao observado em países do Cone Sul onde o TcII é predominante no ciclo doméstico (DUMONTIEL, 1999; GUZMÁN-MARÍN *et al.*, 1999; BOSSENO *et al.*, 2002; AÑEZ *et al.*, 2004; RUIZ-SANCHEZ *et al.*, 2005; BRENIÈRE *et al.*, 2007; LOZANO-KASTEN *et al.*, 2008; O'CONNOR *et al.*, 2007; BOSSENO *et al.*, 2009). Comprovamos que os nossos isolados pertencem ao grupo TcI pela PCR dos diferentes alvos.

Foram relatados na Colômbia, por Herrera *et al.* (2007), quatro haplótipos pertencentes ao grupo TcI. Falla *et al.*, (2009) descreveram os iniciadores da PCR para esta classificação a qual amplifica para o haplótipo Ia (228pb), Ib (250pb) e para Id (200pb). Ainda não foram descritos iniciadores que consigam amplificar algum fragmento específico do haplótipo Ic.

Pela PCR descrita por Falla *et al.*, (2009), nossos isolados, amplificaram dos fragmentos um de 200pb e outro de 275pb. O primeiro corresponde ao haplótipo Id e o segundo ao haplótipo Ia embora o fragmento descrito por Falla *et al.* (2009) com seus iniciadores específicos para este haplótipo foi de 228pb. Porém, não existem relatos de outros trabalhos realizados em outros países e mesmo da Colômbia que permitam comparar os resultados de Falla *et al.*, e os nossos. Nós poderíamos ter esclarecido em parte, essa divergência, se tivéssemos utilizado cepas de referência colombianas dos autores mencionados para comprovar nossos resultados. As cepas mexicanas mostraram haplótipos mistos, que não foram observados nos trabalhos realizados por Herrera *et al.*, (2007) e Falla *et al.*, (2009). A caracterização molecular dos haplótipos de 29 isolados de *T. cruzi* I do Brasil mostrou amplificação do fragmento correspondente ao haplótipo Id em apenas cinco das amostras (KAPPEL *et al.*, 2009). Tendo em conta estes resultados conclui-se que as cepas mexicanas deste estudo são diferentes das cepas colombianas e brasileiras de TcI.

A técnica do RAPD se caracteriza por amplificar fragmentos de DNA de forma randômica. Alguns dos iniciadores utilizados para a realização desta técnica podem permitir o agrupamento das amostras de interesse pela procedência geográfica e/ou biológica (STEINDEL *et al.*, 1993). Neste trabalho o iniciador λ 183R foi o que classificou melhor as cepas mexicanas de *T. cruzi*. Com este iniciador nossas cepas foram agrupadas de acordo a origem biológica (humano e triatomíneo) e origem geográfica. Bosseno *et al.* (2002) observaram elevada homogeneidade entre isolados

mexicanos de *T. cruzi* obtidos de diferentes hospedeiros, com esta técnica, porém, esta homogeneidade não foi correlacionada com a virulência das cepas. As variações intra-específicas de nossas cepas poderiam estar relacionadas às diferenças no comportamento biológico *in vivo* e *in vitro*. Andrade *et al.*, (1999) mostraram que duas populações do parasito das cepas JG e Coll.7G2, com perfis genéticos diferentes observados pela técnica LSSP-PCR (*Low-Stringency Single Specific Primer Polymerase Chain Reaction*), apresentavam tropismo tecidual e patogenicidade diferentes em camundongos. Lana *et al.*, (2000) observaram que os genótipos clonais de *T. cruzi* diferem significativamente em sua infectividade demonstrando uma associação entre a diversidade genotípica, tropismo e patogenicidade.

Em conclusão, neste trabalho demonstramos que as cepas mexicanas de *T. cruzi* apresentam polimorfismos do parasito desde o ponto de vista biológico e genético que pode ser relacionado em parte, a origem geográfica dos isolados e aos hospedeiros de onde foram obtidos. Além disso, demonstramos que as cepas mexicanas pertencem ao genótipo TcI haplótipos mistos Ia e Id o que é demonstrado pela primeira vez na literatura

6. CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

As cepas mexicanas de *T. cruzi* são infectantes para camundongo gerando parasitemia patente ou subpatente dependendo da cepa e além disso, apresentam tropismo predominante por músculo esquelético e cardíaco;

Não houve correlação entre mortalidade nos animais que receberam inóculos de *T. cruzi* com parasitemia patente ou subpatente já que, em ambos os grupos, observou-se mortalidade, porém, sendo maior nos isolados procedentes de humanos;

Neste estudo comprovamos que nossas cepas correspondem ao TcI, haplótipos Ia e Id demonstrando-se pela primeira vez a presença de haplótipos mistos nas cepas TcI;

As cepas de TcI, mediante a técnica RAPD puderam ser agrupadas de acordo a sua origem biológica e geográfica;

Os isolados de casos humanos (INC-5 e NINOA) são mais infectantes as 24h para as células MK2, Vero-CCL81 e macrófagos do que as demais cepas, embora todas foram capazes de penetrar e multiplicar em todos os tipos celulares.

7. REFERÊNCIAS

Acosta-Serrano A; Almeida I.C; Freitas-Junior L.H; Yoshida N; Schenkman S. The mucin-like glycoprotein super-family of *Trypanosoma cruzi*: structure and biological roles. *Mol Biochem Parasitol.*, v.114, p.143-50, 2001.

Alcantara A; Brener Z. The *in vitro* interaction of *Trypanosoma cruzi* bloodstream forms and mouse peritoneal macrophages. *Acta Trop.*, v.35, p.209-19, 1978.

Alvarado Ch.A. Estudio del Efecto Tripanomicida de los Ésteres Etílico Y Bencílico del Ácido N-Propil Oxámico sobre Fases Intracelulares de *Trypanosoma cruzi* y Sobre la Parasitemia en Ratón. Tese de Doutorado, Instituto Politecnico Nacional, México 2005a.

Alvarado Ch.A; Páez L.R; Ramírez I.B; Noguera-Torres B; Ramírez W. Estudio del Éster Bencílico del Ácido N-Propil Oxámico como un profármaco con posible actividad tripanomicida. Memorias del XIV Congreso de Bioenergética y Biomembranas. Sociedad Mexicana de Bioquímica A.C. 2005b.

Andrade LO; Machado CRS; Chiari E; Pena SDJ; Macedo AM. Differential tissue distribution of diverse clones of *Trypanosoma cruzi* in infected mice. *Mol and Bio Parasitology*. Vol 100, p. 163–172, 1999.

Andrade S.G, Magalhães J.B. Biodemes and zymodemes of *Trypanosoma cruzi* strains: correlations with clinical data and experimental pathology. *Rev Soc Bras Med Trop*. Vol. 30, p. 27-35, 1997.

Andrade SG. Morphological and behavioural characterization of *Trypanosoma cruzi* strains. *Rev Soc Bras Med Trop (Supl 18.)*. p. 39-46, 1985.

Andrews, N.W. Lysosomes and the plasma membrane: trypanosome reveals a secret relationship. *J. Cell. Biol.*, v 158, n. 3, p. 389-94, 2002.

Anonymus. Recomendations from a Satellite Meeting. International Symposium to commemorate the 90th anniversary of the discovery of Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz 94 (Supl I)*: 429-432, 1999.

Añez N; Crisante G; Maia da Silva F; Rojas A; Cararsco H; Umezawa ES; Stolf AMS; Ramírez JL; Teixeira MMG. Predominance of lineage I among *Trypanosoma cruzi* isolates from Venezuela patients with different clinical profiles of acute Chagas disease. *Trop Med and Inter Health*. Vol 9 (supl.112), pag 1319 – 1326, 2004.

Araújo FG, Remington JS. Characterization of stages and strains of *Trypanosoma cruzi* by analysis of cell membrane components. *J Immunol* 127 : 855-859, 1981.

Araujo SM; Guilherme ANF; Toledo MJO; Oliveira PJG; Silva JC; Gomes ML. Biology of *Trypanosoma cruzi* strains isolated from chagasic patients from different geographic origins residing in northwestern region of the state of Paraná, Brasil. *Acta Scientiarum*. Vol 21 (2), pag 229 – 235, 1999.

Attaran A. Chagas' disease in Mexico. *The Lancet*. Vol. 368 Pag. 1768. Nov. 2006

Barrera-Pérez M.A; Rodríguez-Félix M.E; Guzmán-Marín E; Zavala-Velázquez J; Dumonteil E. Biological behaviour of three strains of *Trypanosoma cruzi* from Yucatan, Mexico. Rev Biomed. Vol. 12, Pag. 224-230, 2001.

Ben Younès-Chennoufi, A., Said, G., Eisen, H., Durand, A., Hontebeyrie-Joskowicz, M., Cellular immunity to *Trypanosoma cruzi* is mediated by helper T cells (CD4+). Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, v. 82, p. 84-89, 1988.

Biagi, F., F; Tay, J; Gutiérrez, M. Behavior of Different Mexican Strains of *Trypanosoma cruzi* in the White Mouse. Progress in Protozoology. Excerpta Med (Amsterdam) 142 pp., 1965.

Bice DE, Zeledón R. Comparison of infectivity of strains of *Trypanosoma cruzi* J Parasitol, Vol. (56) pag 663-670, 1970;

Bosseno M.F; Espinoza B; Sánchez B; Brenière S.F. Mexican *Trypanosoma cruzi* Stocks: Analysis of Minicircle kDNA Homologies by Cross-hybridization Mem Inst Oswaldo Cruz. Vol. 95 (4). Pag 473-476, 2000.

Bosseno MF; Barnabé C; Magallón-Gastélum E; Lozano-Kasten F; Ramsey J; Espinoza B; Brenière SB. Predominance of *Trypanosoma cruzi* Lineage I in Mexico. Journal of Clinical Microbiology. Vol. 40 (2) pag 627-632, 2002

Brenière SF, Bosseno M, Magallón-Gastélum E, Ruvalcaba EGC, Gutierrez MS, Luna ECM, Basulto JT, Mathieu-Daudé F, Walter A, Lozano-Kasten F. Peridomestic colonization of *Triatoma longipennis* (Hemiptera, Reduviidae) and *Triatoma barberi* (Hemiptera, Reduviidae) in a rural community with active transmission of *Trypanosoma cruzi* in Jalisco State, Mexico. Acta Tropica 101: 249-257, 2007.

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

Burgos J.M; Begher S; Silva H.M.V; Bisio M; Duffy T; Levin M.J; Macedo A.M; Schijman A.G. Case Report: Molecular Identification of *Trypanosoma cruzi* I Tropism for Central Nervous System in Chagas Reactivation Due to AIDS. Am. J. Trop. Med. Hyg., 78(2), pp. 294-297, 2008.

Burgos J.M; Begher S.B; Freitas J.M; Bisio M; Duffy T; Altcheh J; Teijeiro R; Alcoba H.L; Deccarlina F; Freilij H; Levin M.J; Levalle J; Macedo A.M; Schijman A.G. Molecular Diagnosis And Typing Of *Trypanosoma cruzi* Populations And Lineages In Cerebral Chagas Disease In A Patient With Aids. Am. J. Trop. Med. Hyg. Vol. 73 (6), Pag. 1016-1018, 2005.

Camargo MM; Almeida, IC; Pereira MES; Ferguson MJ; Travassos LR; Gazinelli RT. Glycosylphosphatidylinositol-anchored mucin-like glycoproteins isolated from *Trypanosoma cruzi* tripomastigotes initiate the synthesis of proinflammatory cytokines by macrophages. J.Immunol., v.158, p.5890-5901, 1997.

Capps L, Begoña A. Chagas cardiomyopathy and serologic testing in a small rural hospital in Chiapas, Mexico. *Rev Panam Salud Pública*. Vol. 15, Pag. 337–340, 2004.

Cárdenas-Sánchez J; Mazariego-Arana M; Utrilla-Pascacio F; Monteón-Padilla V; Altuzar-González M. Anticuerpos anti-*Trypanosoma cruzi* en pacientes con cardiomiopatía dilatada. *Rev Med IMSS*. Vol. 41, Pag. 111–114, 2003.

Carneiro M, Romanha AJ, Chiari E. Biological characterization of *Trypanosoma cruzi* strains from different zymodemes and schizodemes. *Mem Inst Oswaldo Cruz* Vol. 86 pag. 387-393, 1991.

Carrasco HJ, Frame IA, Valente SA, Miles MA. Genetic exchange as a possible source of genomic diversity in sylvatic populations of *Trypanosoma cruzi*. *Am J Trop Med Hyg*. Vol. 54, pag 4184-4124, 1996.

Casillas P.P. Doença de Chagas no México: Especial Referencia aos estudos realizados no Estado de Jalisco. *Resumo Tese Mestrado, Instituto Oswaldo Cruz* . 1993.

Contreras FT, Yerenas L, Gutiérrez MS, Anaya MR, Corder AJ. Serological follow-up of *Trypanosoma cruzi* infection from 1987 to 1994 in individuals studies in 50 counties of the State of Jalisco, Mexico. *Rev Soc Bras Med Trop*;33:591-596, 2000.

Contreras V.T; Morel C.M; Goldenberg S. Stage Especific gene expression precedes morphological changes during *Trypanosoma cruzi* metaciclogenesis. *Molecular Biochemical Parasitology*. Vol 14, Pag. 83-96, 1985.

Cruz-Reyes A, Pickering-López JM. Base de datos “CHAGMEX® 1928-2004, sobre la Enfermedad de Chagas en México, con un enfoque biológico, geográfico y socioeconómico. <http://www.ibiologia.unam.mx> (Acesso: 29/10/2007), 2005.

Cruz-Reyez A. & Pickering-López JM. Chagas disease in México: Análisis of geographical distribution during the past 76 years – A Review. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, Vol. 101 (4), Pag. 345-354. 2006.

Cuartero CM, Ponce C, Recio R. Cinco nuevos casos de enfermedad de Chagas en Zacatecas y Jalisco, en la República Mexicana. *Rev Inves Salud Publica*, Vol. (27), pag.29-36, 1967.

de Luca D'Oro G M, Gardenal C N, Perret B, Crisci J V Montamat EE. Genetic structure of *Trypanosoma cruzi* populations from Argentina estimated from enzyme polymorphism. *Parasitol*. Vol. 107, pag 405-10, 1993.

de Lana M; Pinto AS; Bastrenta ; Barnabé C; Noe S; Tibayrenc M. *Trypanosoma cruzi*: Infectivity of Clonal Genotype Infections in Acute and Chronic Phases in Mice. *Experimental Parasitology*. Vol 96, pag 61–66, 2000.

Delgadillo-Jaime C, Paredes-Casillas P, Velasco-Rodríguez F, Gómez-Salcedo H, Estrada-Espinosa M, Paredes-Espinoza M. Brote de enfermedad de Chagas aguda en Jalisco: reporte preliminar. Guadalajara: UNED/Gobierno de Jalisco/Secretaría General Unidad Editorial Guadalajara, 1988.

Devera R; Fernandes O; Coura J.R. Should *Trypanosoma cruzi* be Called “cruzi” Complex? A Review of the Parasite Diversity and the Potential of Selecting Population after in Vitro Culturing and Mice Infection. Mem Inst Oswaldo Cruz, Vol. 98 (1) .Pag. 1-12, 2003.

Dias, J.C.P. Eradication of Chagas disease: what are its possibilities? In: Update of American Trypanosomiasis and Leishmaniasis Control and Research: Final Report. PAHO/WHO, p. 65-72, 2007.

Duarte-Fernandes C, Fonseca-Murta SM, Penna-Ceravolo I, Percival-Krug L, Vidigal P G, Steindel M, et al. Characterization of *Trypanosoma cruzi* strains isolated from chronic chagasic patients, triatomines and opossums naturally infected from the State of Rio Grande do Sul, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. Vol. 92, pag 343-351, 1997.

Dumonteil E. Update on Chagas’ disease in Mexico. Salud Publica Mex, Vol. 41, Pag 322-327, 1999.

Dosreis GA; Peçanha LM; Bellio M; Previato JO; Mendonça-Previato L. Glycoinositol phospholipids from *Trypanosoma cruzi* transmit signals to the cells of the host immune system through both ceramide and glycan chains. Microbes Infect., v.4, n.9, p. 1007-13, 2002.

Espinoza B; Vera-Cruz JM; González H; Ortega E; Hernández. Genotype and virulence correlation within Mexican stocks of *Trypanosoma cruzi* isolated from patients. Acta Tropica Vol 70. pag 63 – 72, 1998.

Falla A, Herrera C, Fajardo A, Montilla M, Vallejo GA, Guhl F. Haplotype identification within *Trypanosoma cruzi* I in Colombian isolates from several reservoirs, vectors and humans. Acta Trop 110: 15-21, 2009.

Frasch ACC. Functional diversity in the trans-sialidase and mucin families in *Trypanosoma cruzi*., Parasitology Today, v.16, n.7, p.282-86, 2000.

Frank, F.M.; Cazorla, S.I.; Sartori, M.J.; Corral, R.S. Elicitation of specific, Th1-biased immune response precludes skeletal muscle damage in cruzipain - vaccinated mice. Experimental and Molecular Pathology, v. 84, p. 64-70, 2008.

García, G.A.; Arnaiz, M.R.; Laucella, S.A.; Esteva, M.I.; Ainciart, N., Riarte, A.; Garavaglia, P.A.; Fichera, L.E.; Ruiz, A.M. Immunological and pathological responses in BALB/c mice induced by genetic administration of Tc 13 Tul antigen of *Trypanosoma cruzi*. Parasitology, v. 132, p. 855-866, 2006.

Gomes ML, Macedo AM, Pena SDJ, Chiari E Genetic relationship between *Trypanosoma cruzi* strains isolated from chronic chagasic patients in southern Brazil as revealed by RAPD and SSR-PCR analysis. Acta Trop Vol 69, Pag 99–109, 1998.

Gómez-Hernández C; Rezende-Oliveira K; Zarate AC; Zarate EC; Trujillo-Contreras F; Ramírez LE. Prevalência de triatomíneos (*Hemiptera: Reduviidae: Triatominae*) infectados por *Trypanosoma cruzi*: sazonalidade e distribuição na região Ciénega do Estado de Jalisco, México.

Guarner J; Bartlett J; Kaki SF; Colley DG; Grijalva MJ Powell MR. Mouse model for Chagas disease: immunohistoquimical distribution of different stages in *Trypanosoma cruzi* in tissue throughout infection. Am J Trop Med Hyg. Vol 65, pag 152 – 158, 2001.

Guzmán-Bracho C. Epidemiology of Chagas disease in México: an update, Trends in Parasitology. Vol. 17 (8) pag 372-376, 2001.

Guzmán-Marín E; Zavala-Castro J.E; Acosta-Viana K.Y; Rosado-Barrera M.E. Importancia de la caracterización de cepas de *Trypanosoma cruzi*. Rev Biomed. Vol. 10, pag. 177-184, 1999.

Hernández-Matheson IM, Ericsson CD, Delgadillo-Jaime C, Paredes-Casillas P, Paredes-Espinoza M. New focus of Chagas' disease in Mexico. Lancet, Vol (1) pag. 100, 1987.

Herrera C; Bargues M.D; Fajardo A; Montilla M; Triana O; Vallejo G.A; Guhl F. Identifying four *Trypanosoma cruzi* I isolate haplotypes from different geographic regions in Colombia. Infection, Genetics and Evolution. Vol. 7, pag. 535–539, 2007.

Kappel H.B; Marquez D.S; Gómez-Hernández C; Correia D; Ramirez L.E; Lages-Silva E. Intraespecific variability of *Trypanosoma cruzi* I in brazilian endemic regions of Chagas disease. XIII International Congress of Protistology; XXV Annual Meeting on Basic Research in Chagas Disease. Armação do Buzios, RJ, 2009.

León-Pérez F; Gómez-García L; Alejandro-Aguilar R; López R; Monteón V.M. Mexican *Trypanosoma cruzi* Isolates: *In Vitro* Susceptibility of Epimastigotes to Anti-*Trypanosoma cruzi* Drugs and Metacyclic Forms to Complement-Mediated Lysis. Vector-Borne and Zoonotic Diseases. Vol. 7, No. 3, pag. 330-336, 2007

Lisboa CV; Pinho AP; Monteiro RF; Jansen AM. *Trypanosoma cruzi* (kinetoplastida Trypanosomatidae): Biological heterogeneidade in the isolates derived from wild host. Experimental Parasitology. Doi: 10.1016/j.exppara.2006.12.005, 2007.

López-Olmos V, Pérez-Nassar N, Pinero D, Ortega E, Hernández R, Espinoza B. Biological characterization and genetic diversity of Mexican isolates of *Trypanosoma cruzi*. Acta Trop 1998; 69:239-254.

Lozano-Kasten F; Magallón-Gastélum E; Soto-Gutiérrez M; Kasten-Monges M; Bosseno M.F; Brenière S.F. Conocimiento epidemiológico y situación actual de la enfermedad de Chagas en el estado de Jalisco, México. Salud Pública de México vol. 50, no. 6, 2008.

Magalhaes JB; Andrade SG; Sherlock Y. *Trypanosoma cruzi* strain: after pasaje into autochthonous or foreign species of triatimine (biological and biochemical patterns). Rev Ins Med Trop São Paulo. Vol 38 pag 23-28, 1996.

Magallón-Gastélum E Magdaleno-Peñaloza NC; Kattahain-Duchateau G; Trujillo-Contreras F; Lozano-Kasten FJ; Hernández-Gutiérrez RJ. Distribución de los vectores de la enfermedad de Chagas Hemiptera: Reduviidae: Triatominae en el estado de Jalisco, México. Revista Biomédica 9: 151-157, 1998.

Martínez-Ibarra JA; Grant-Guillén Y; Martínez-Grant DM. Feeding, Defecation, and Development Times of *Meccus longipennis* Usinger, 1939 (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) under Laboratory Conditions. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Vol. 98 (7), pag 899-903, 2003

Meireles, MNL; Chiari E; De Souza W. Interaction of bloodstream, tissue culture-derived and axenic culture- derived trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi* with macrophages. *Acta Trop.*, v.39, p.195-203, 1982.

Melnikov V.G; Velasco F.F; Gómez F.E; Rodriguez F.G; Dobrovinskaya O.R. Pathologic chages in lungs caused by mexican isolates of *Trypanosoma cruzi* in the acute phase of infection in mices. *Am J Med Trop Hyg*. 73 (2) pag 301-306, 2005.

Moncayo A. Progress towards elimination of transmission of Chagas disease in Latin America. *WHO World Health Statistics Quarterly*, 50:195–198, 1997.

Moncayo A.; Guhl F.; Stein C. Carga Mundial De La Enfermedad De Chagas En 2000 2002_2408-sp.doc

Moncayo A. Chagas disease: current epidemiological trends after the interruption of vectorial and transfusional transmission in the Southern Cone Countries. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 98 : 577-591, 2003

Moncayo A; Silveira AC. Current epidemiological trends for Chagas disease in Latin America and future challenges in epidemiological, surveillances and health policy. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. Vol 104 (I) pag 17 – 30, 2009.

Monteón VM; Ramos AE; Reyes PA. Reactividad de sueros de pacientes chagásicos crónicos con extractos de aislamientos mexicanos de *Trypanosoma cruzi*. *Revista de Biología Tropical*. Vol. 41, pag, 861 – 865, 1993.

Monteon VM.; Furuzawa-Carballeda J; Alejandre-Aguilar R; Aranda-Fraustro A; Rosales-Encina JL; Reyes PA. American Trypanosomosis: *In Situ* and Generalized Features of Parasitism and Inflammation Kinetics in a Murine Model. *Experimental Parasitology* 83, 267–274. 1996.

Morel CM, Deane MP, Gonçalves AM. The complexity of *Trypanosoma cruzi* populations revealed by schizodeme analysis. *Parasitology Today* 2: 97-100, 1986.

Neira I; Ferreira AT; Yoshida N. Activation of disting signal transduction pathways in *Trypanosoma cruzi* isolates with differential capacity to invade host cells. *Int. J. Parasitol.*, v.32, p.405-14, 2002.

Nogueda-Torres B; Alejandre-Aguilar R; Isita-Tornell L; D. Camacho AD. Defaecation Pattern in Seven Species of Triatomines (Insecta, Reduviidae) Present in México. *Revista Latinoamericana de Microbiología*. Vol 42, pag 145-148, 2000.

O'Connor O; Bosseno M.F; Barnabe´ C; Douzery E.J.P; Brenière S.F. Genetic clustering of *Trypanosoma cruzi* I lineage evidenced by intergenic miniexon gene sequencing *Infection, Genetics and Evolution*. Vol.7, pag. 587–593, 2007.

Peña JA, Trujillo-Contreras F, Jiménez-Cordero A. Enfermedad de Chagas en cadáveres en una zona endémica en el estado de Jalisco. Rev Jal Cien Foren. Vol.2, pag 32-37, 2002.

Postan M, McDaniel J, Dvorak J. Studies of *Trypanosoma cruzi* clones in inbred mice. II. Course of infection of C57BL/6 mice with single-cell isolated stocks. Am J Trop Med Hyg. Vol. 33, pag 235-238, 1984.

Roellig DM; McMillan K.; Ellis AE; Vandeberg JL; Champagne DE; Yabsley MJ. Experimental infection of two South American reservoirs with four distinct strains of *Trypanosoma cruzi*. Parasitology. doi:10.1017/S0031182009991995, 2010.

Rodríguez-González I; Marin C; Hitos AB; Rosales MJ; Gutierrez-Sánchez R; Sánchez-Moreno M. Biochemical Characterization of new strain of *Trypanosoma cruzi* and *T. rangeli* isolates from Peru and México. Parasitol Res. Vol 94, pag 294–300, 2004.

Ruiz RC; Favoreto J; Dorta ML; Oshiro MEM; Ferreira AT; Manque PM; Yoshida N. Infectivity of *Trypanosoma cruzi* strains is associated with differential expression of surface glycoproteins with differential Ca²⁺ signalling activity. *Biochem. J.*, v.330, p. 505-11, 1998.

Ruíz-Sánchez R; León MP; Matta V; Reyes PA, López R; Jay D; Monteón VM. *Trypanosoma cruzi* isolates from Mexican and Guatemalan acute and chronic chagasic cardiopathy patients belong to *Trypanosoma cruzi* I. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Vol. 100 (3), pag 281-283, 2005.

Sánchez-Guillén M.C; López-Colombo A; Ordóñez-Toquero G; Gomez-Albino I; Ramos-Jimenez J; Torres-Rasgado E; Salgado-Rosas H; Romero-Díaz M; Pulido-Pérez P; Pérez-Fuentes R. Clinical forms of *Trypanosoma cruzi* infected individuals in the chronic phase of Chagas disease in Puebla, México. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Vol. 101(7), pag 733-739, 2006a.

Sánchez-Guillén M.C; Bernabé C; Tibayrenc M; Zavala-Castro J; Totolhua J.L; Méndez-López J; González-Mejía M.E; Torres-Rasgado E; López-Colombo A; Pérez-Fuentes R. *Trypanosoma cruzi* strains isolated from human, vector, and animal reservoir in the same endemic region in Mexico and typed as *T. cruzi* I, discrete typing unit 1 exhibit considerable biological diversity. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Vol. 101 (6), Pag. 585-590, 2006b.

Santos, V.M., Lima, M.A., Cabrine-Santos, M., Marquez, D.S., Pereira, G.A., Lages-Silva, E., Ramírez, L.E. Functional and histopathological study of the pancreas in hamsters (*Mesocricetus auratus*) infected and reinfected with *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology Research*. 94, 125-133, 1994.

Schofield CJ, Dias JCP. The Southern Cone programme against Chagas' disease. *Advances in Parasitology* 42:1-25,1999.

Schenkman S; Ferguson M.A.J; Heise N; Alemida M.C; Mortara R.A; Yoshida N. Mucin-like glycoproteins linked to the membrane by glycosylphosphatidylinositol anchor are the major acceptors of sialic acid in a reaction catalyzed by trans-sialidase in metacyclic forms of *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Bioch. Parasitol.*, v.59, p.293-304, 1993.

Sierra-Johnson J; Olivera-Mar A; Monteón-Padilla VM; Reyes PA; Vallejo M. Panorama epidemiológico y clínico de la cardiopatía chagásica crónica en México. *Revista de Saúde Publica*, Vol. 39 (5), pag 754-760, 2005.

Souto-Padron T; Harth G; Souza W. Immunocytochemical localization of neuraminidase in *Trypanosoma cruzi*. *Infect Immun.*, v.58, n.3, p.586-92, 1990.

Souto RP, Fernandes O, Macedo AM, Campbell DA, Zingales B. DNA markers define two major phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol* 83: 141-152, 1996.

Souto RP, Vargas N, Zingales B. *Trypanosoma rangeli* : discrimination from *Trypanosoma cruzi* based on a variable domain from the large subunit ribosomal RNA gene. *Exp Parasitol*, Vol. 91, Pag. 306–314, 1999.

SSJ (Secretaria de Salud Jalisco), Realiza SSJ Acciones Para Erradicar La Enfermedad De Chagas, Boletín Informativo, 13 mayo 2005.

Steindel M, Dias Neto E, Menezes CLP, Romanha AJ, Simpson AJG. Random amplified polymorphic DNA analysis of *Trypanosoma cruzi* strains. *Mol Biochem Parasitol* 60: 71-80, 1993.

Tanowitz H.B.; Kirchhoff Z.V.; Simon D.; Morris S.A.; Weiss L.M.; Witfner M. Chagas Disease, *Clinical Microbiology Reviews*, Oct. 1992, p.400-419 Vol. 5, No.4

Tardieux I; Webster P; Ravesloot J; Boron W; Lunn JA; Heuser JE; Andrews NW. Lysosome recruitment and fusion are early events required for trypanosome invasion of mammalian cells. *Cell*, v.71, n.7, p. 1117-30, 1992.

Tay, F., Biagi-F., F.; de B. de Biagi, A.M. Estado actual de conocimientos sobre triatomas y enfermedad de Chagas en el estado de Zacatecas. *Med Méx* 48 (1032) pag. 21-129, 1968.

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

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

Trujillo-Contreras F, Lozano-Kasten F, Soto-Gutiérrez MM, Hernández-Gutiérrez R. Prevalencia de Infección a *Trypanosoma cruzi* en donadores de sangre en el estado de Jalisco, México. *Rev Soc Bras Med Trop*;26:89-92, 1993.

Uranga N. & Herranz E. Chagas: enfermedad silenciosa y silenciada, *Medicos Sin Fronteras* 2003.

Velasco-Castrejón O, Tay J, Luna-Valadez A. Chagas' disease in the State of Jalisco: Mexican Republic. Report of three new human cases. *Rev Inves Salud Publica*, Vol (34), pag.107-113,1974.

Vera-Cruz J.M; Magallón-Gastelum E; Grijalva G; Rincón A.R; Ramos-Garcia C; Armendáriz-Borunda J. Molecular diagnosis of Chagas disease and use of animal model to study parasite tropism. *Parasitol Res*. Vol. 89, pag. 480-486, 2003.

WHO (World Health Organization). New global effort to eliminate Chagas disease. *Weekly epidemiological record*, v. 82, n. 28-29, p. 259-260, 2007.

WHO/OPS, Chagas en las Américas, : Iniciativas de los Países de América para el Control de la Transmisión Vectorial, Transfusional y la Atención Médica de la Enfermedad de Chagas, 2006.

Winker P; Bosseno M,F; Brito C; Yaksic N; Cardoso M,A; Morel C,M. High correlation between Chagas disease serology and PCR-based detection of *Trypanosoma cruzi* kinetoplastid DNA in Bolivian children living in an endemic area. *FEMS microbial Letter*, Vol 124, Pag. 419-423, 1994.

Yerenas M.L.A; Contreras F.T; Hernandez C.G; Hernandez L.A.G; Zarate A.C; Anguiano R.R.L; Flores P.T; Lara J.P.R; Sanchez A.U.F; Aceves F.F.C; Gonzalez A.F; Briceño P.C. Estudio seroepidemiológico de la enfermedad en la zona rural del municipio de La barca, Jalisco, Mexico 2005. *In: Resumos do XLII Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, Brasilia p. 197, 2006.

Yoshida N. Molecular basis of mammalian cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. *An Acad Bras Cienc* Vol 78 pag 87 – 111, 2006.

Yoshida N. Molecular mechanisms of *Trypanosoma cruzi* infection by oral route. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. Vol 104 (I) pag 101 – 107, 2009.

Zavala-Castro J.E; Velasco-Castrejon O; Hernandez R. Molecular Characterization of Mexican Stocks of *Trypanosoma cruzi* Using Total DNA. *Am J Trop Méd Hyg*. Vol. 47 (2), Pág. 201-209, 1992.

Zingales B; Souto R.P; Mangia R.H; Lisboa C.V; Campbell DA; Coura JR; Jansen AM; Fernandes O. Molecular Epidemiology of American Trypanosomiasis in Brazil based on dimorphisms of rRNA and mini-exon gene sequences. *Intern J Parasitol* Vol. 28, pag. 105-112, 1998.

Zingales B; Andrade S.G; Briones M.R.S; Campbell D.A; Chiari E; Fernandes O; Guhl F; Lages-Silva E; Macedo A.M; Machado C.R; Miles M.A; Romanha A.J; Sturm N.R; Tibayrenc M; Schijman A.G. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, Vol. 104 (7), Pág. 1051-1054, 2009.

8. ANEXOS

ANEXO I

Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 41(3):257-262, mai-jun, 2008

ARTIGO-ARTICLE

Prevalência de triatomíneos (*Hemiptera: Reduviidae: Triatominae*) infectados por *Trypanosoma cruzi*: sazonalidade e distribuição na região Ciénega do Estado de Jalisco, México

Prevalence of triatomines (*Hemiptera: Reduviidae: Triatominae*) infected by *Trypanosoma cruzi*: seasonality and distribution in the Ciénega region of the State of Jalisco, Mexico

César Gómez-Hernández¹, Karine Rezende-Oliveira², Agustín Cortés Zárate³,
Esperanza Cortés Zárate³, Francisco Trujillo-Contreras⁴ e Luis Eduardo Ramirez¹

RESUMO

As características físico-geográficas da região Ciénega, Jalisco, México a tornam propícia para transmissão do *Trypanosoma cruzi*, causador da doença de Chagas. Este trabalho caracteriza a prevalência de triatomíneos infectados pelo parasita, sua sazonalidade e distribuição nesta região. Foram analisados 328 triatomíneos no período de janeiro de 2005 a junho de 2007 procedentes de 13 municípios da região, sendo abril, maio e junho os meses de maior captura. Dos triatomíneos analisados, 57,3% foram positivos para *Trypanosoma cruzi*, correspondendo 15,4% para a área urbana e 84,6% para a área rural. A espécie mais freqüente foi *Triatoma longipennis* e a mais parasitada foi *Triatoma barberi* com índice de infecção de 83,3% quando comparada a *Triatoma longipennis* (67,5%) ($p < 0,05$). A infecção natural dos vetores capturados pode indicar alta exposição das pessoas ao *Trypanosoma cruzi*. O achado recente do *Triatoma dimidiata* positivo nesta região, sugere a adaptação de novas espécies às condições ecológicas destas populações.

Palavras-chaves: *Trypanosoma cruzi*. Triatomíneos. Doença de Chagas.

ABSTRACT

The physical and geographical characteristics of the Ciénega region, Jalisco, Mexico make it suitable for transmission of *Trypanosoma cruzi*, the causative agent for Chagas disease. This study characterizes the prevalence of triatomines infected by this parasite, their seasonality and their distribution in this region. A total of 328 triatomines were evaluated between January 2005 and June 2007, from 13 municipalities in the region. April, May and June were the months with the highest capture levels. Among the triatomines examined, 57.3% were positive for *Trypanosoma cruzi*, corresponding to 15.4% in urban areas and 84.6% in rural areas. The species with greatest prevalence was *Triatoma longipennis* and the species with the highest parasitism rate was *Triatoma barberi*, with an infection rate of 83.3%, whereas the rate for *Triatoma longipennis* was 67.5% ($p < 0.05$). This natural infection in the captured vectors may indicate that individuals in this region have high exposure to *Trypanosoma cruzi*. The recent findings of positive *Triatoma dimidiata* in this region suggest that new species are becoming adapted to the ecological conditions of these populations.

Key-words: *Trypanosoma cruzi*. Triatomines. Chagas disease.

A doença de Chagas, também conhecida como tripanossomíase americana é considerada um problema de saúde pública em 17 países latino-americanos. Cerca de 10 a 12 milhões de pessoas estão infectadas com o *Trypanosoma cruzi*, sendo esta uma das principais doenças transmitidas por insetos triatomíneos, na América Latina e endêmica em vários estados do México^{7,24}.

No México, existem 33 espécies de triatomíneos¹⁰ dos quais 18 têm sido encontradas infectadas naturalmente por *Trypanosoma cruzi*^{22,26}. No Estado de Jalisco, tem-se conhecimento destes insetos em decorrência de estudos realizados por Magallón-Gastélum e col¹⁶ e Martínez-Ibarra e col¹⁷ mostrando sua distribuição estadual e sua relação com a infecção natural, considerando os complexos

1. Laboratório de Parasitologia, Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, MG. 2. Laboratório de Imunologia, Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, MG. 3. Secretaria de Salud Jalisco (SSJ), Región Sanitaria IV, Jalisco México. 4. Centro Universitario de los Altos (UdeG), Universidad de Guadalajara, Jalisco, México.

Endereço para correspondência: Dr. Luis Eduardo Ramirez. Laboratório de Parasitologia/UFTM. Av. Getúlio Guaritá s/n, Bairro Abadia, 38025-440 Uberaba, MG.

Tel: 55 34 3318-5258.

e-mail: parasito_fmfm@mednet.com.br

Recebido para publicação em: 21/11/2007

Aceito em: 09/05/2008

Phyllosoma e *Proctata* os mais importantes no processo de transmissão do *Trypanosoma cruzi*^{16 17}. A distribuição destes complexos está relacionada com índices de dispersão, infestação e infecção por *Trypanosoma cruzi* junto a fatores ecológicos e, sobretudo, aos hábitos domiciliares do inseto e à presença da doença de Chagas^{1 2 16 26}. Têm-se descrito em alguns municípios deste estado índices elevados de infestação que variam de 26,1% a 58,3%, colonização de triatomíneos no peridomicílio de 58,3% a 85,7% e infecção por *Trypanosoma cruzi* de 41,2% a 60,2%, os quais aumentam durante a temporada seca¹⁶.

Estudo realizado em 124 municípios do estado de Jalisco, entre 1987-1994 demonstrou uma soroprevalência da doença de Chagas na população geral de 18% em 124 municípios⁵. Recentemente, Yerenas e cols²⁵, no ano de 2006, encontraram no município de La Barca, Jalisco, uma soroprevalência de 21,6% na população rural²⁵.

Devido às elevadas taxas de prevalência de anticorpos na população de diferentes áreas do estado de Jalisco, aos elevados índices de infestação, colonização e infecção dos triatomíneos pelo *Trypanosoma cruzi*, nosso grupo de pesquisa realizou um estudo transversal, descritivo e observacional na região Ciénega, considerada montanhosa, localizada neste mesmo estado com objetivo de avaliar a prevalência de triatomíneos infectados pelo *Trypanosoma cruzi*, sua sazonalidade e distribuição nesta região.

MATERIAL E MÉTODOS

A região Ciénega apresenta uma superfície total de 4.892km² equivalente a 6,1% da superfície do Estado de Jalisco. A altitude

da região é de 1.564m ao nível do mar (manm), com alturas mínimas de 1.520 manm nos municípios de Poncitlán e La Barca e máximas de 1.780 manm no município de Degollado. A temperatura média regional é de 20,2°C, com mínimas de 19,5°C em Tuxcueca e Jocotepec e máximas de 21,1°C em Atotonilco e Ayotlán, sendo seu clima semiquente a semi-seco. Esta região tem 463.039 habitantes, abrangendo um dos índices mais altos da população total do Estado de Jalisco²⁰, representando uma densidade populacional de 94,65 habitantes/km² (Figura 1).

Foi realizada uma busca de triatomíneos peri e intradomiciliar durante o período de janeiro de 2005 a junho de 2007 em 13 municípios da região: Atotonilco, Ayotlán, Chapala, Degollado, Jamay, Jocotepec, La Barca, Ocotlán, Poncitlán, Tizapán, Tototlán, Tuxcueca, Zapotlán del Rey (Tabela 1).

A coleta foi manual com auxílio de pinças e lâmpadas, não sendo utilizadas armadilhas. O tempo de captura foi de aproximadamente uma hora/homem/casa¹⁵. Os triatomíneos coletados foram colocados em recipientes de plástico rotulados com endereço e data da captura e enviados para identificação e diagnóstico de *Trypanosoma cruzi* ao laboratório de Secretaria de Salud Jalisco. A identificação dos triatomíneos foi realizada utilizando os critérios da classificação de *Triatoma* do México de Lent & Wigodzinski¹⁴. A frequência de captura nos municípios foi uma vez a cada 30 dias, e os endereços foram selecionados utilizando a tabela de números aleatórios. Ao todo, foram analisados 340 (10%) domicílios.

A procura do *Trypanosoma cruzi* nas fezes dos triatomíneos foi realizada pelo exame á fresco pela compressão do abdômen e

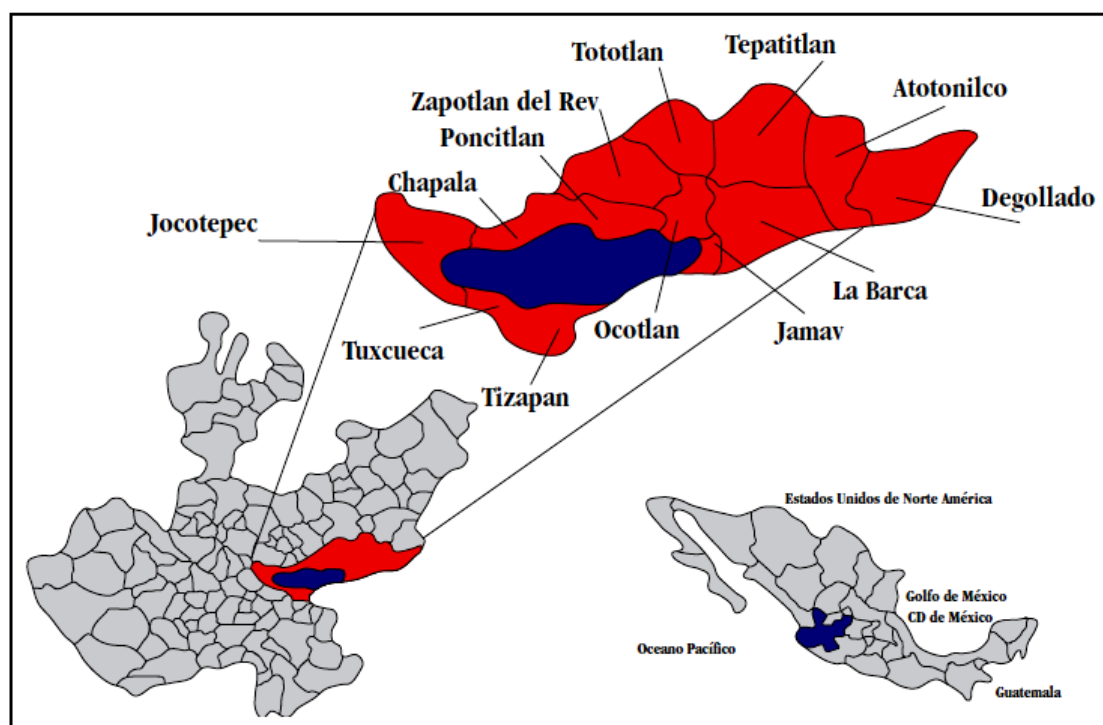


Figura 1 - Região Ciénega, Estado de Jalisco, México.

Tabela 1 - Distribuição de triatomíneos por espécie e com infecção natural por *Trypanosoma cruzi* capturados em municípios da região Ciénega do Estado de Jalisco no período 2005 - 2007.

Município	Espécies	Tritomíneos (n°)		IINPE	IIN
		capturados	positivos		
Atotonilco	<i>Triatoma longipennis</i>	14	8	57,1	69,5
	<i>Triatoma barberi</i>	5	5	100,0	
	ninfas <i>sp</i>	4	3	75,0	
Ayotlán	<i>Triatoma longipennis</i>	12	7	58,3	43,7
	<i>Triatoma barberi</i>	0	0	0,0	
	ninfas <i>sp</i>	4	0	0,0	
Chapala	<i>Triatoma longipennis</i>	6	4	66,6	60,0
	<i>Triatoma barberi</i>	1	1	100,0	
	ninfas <i>sp</i>	3	1	33,3	
Degollado	<i>Triatoma longipennis</i>	11	8	72,7	75,0
	<i>Triatoma barberi</i>	1	1	100,0	
	ninfas <i>sp</i>	0	0	0,0	
Jamay	<i>Triatoma longipennis</i>	8	7	87,5	75,0
	<i>Triatoma barberi</i>	5	5	100,0	
	ninfas <i>sp</i>	3	0	0,0	
Jocotepec	<i>Triatoma longipennis</i>	25	21	84,0	67,6
	<i>Triatoma barberi</i>	1	0	0,0	
	ninfas <i>sp</i>	8	3	37,5	
La Barca	<i>Triatoma longipennis</i>	21	15	71,4	33,7
	<i>Triatoma barberi</i>	15	11	73,3	
	<i>Triatoma dimidiata</i>	1	1	100,0	
	ninfas <i>sp</i>	46	1	2,1	
Ocotlán	<i>Triatoma longipennis</i>	6	5	83,3	94,4
	<i>Triatoma barberi</i>	12	12	100,0	
	ninfas <i>sp</i>	0	0	0	
Poncitlán	<i>Triatoma longipennis</i>	30	16	53,3	56,5
	<i>Triatoma barberi</i>	3	2	66,6	
	ninfas <i>sp</i>	13	8	61,5	
Tizapán	<i>Triatoma longipennis</i>	4	2	50,0	50,0
	<i>Triatoma barberi</i>	2	1	50,0	
	ninfas <i>sp</i>	4	2	50,0	
Tototlán	<i>Triatoma longipennis</i>	1	1	100,0	50,0
	<i>Triatoma barberi</i>	1	0	0,0	
	ninfas <i>sp</i>	0	0	0,0	
Tuxcueca	<i>Triatoma longipennis</i>	23	16	69,5	62,5
	<i>Triatoma barberi</i>	0	0	0,0	
	ninfas <i>sp</i>	9	4	44,4	
Zapotlán del Rey	<i>Triatoma longipennis</i>	20	14	70,0	69,2
	<i>Triatoma barberi</i>	2	2	100,0	
	ninfas <i>sp</i>	4	2	50,0	
Total		328	188		57,3

IINPE: índice de infecção natural por espécie, IIN: índice de infecção natural.

pelo esfregaço corado pelo Giemsa para identificação morfológica dos parasitas¹⁶.

O cálculo dos índices entomológicos de distribuição geográfica foi realizado de acordo com a definição da Organização Mundial de Saúde (WHO)²⁴ onde se considera o índice de infecção natural (número de triatomíneos infectados x 100/número de triatomíneos capturados) e índice de infestação (número de unidades domiciliares com presença de triatomíneos x 100/número de unidades domiciliares pesquisadas).

A análise estatística foi realizada utilizando o método de qui-quadrado de Fisher para comparação entre a prevalência das diferentes espécies de triatomíneos capturados ($p < 0,05$). Os dados foram analisados com o auxílio dos programas Statistica, 6.0 e Statview for Windows.

RESULTADOS

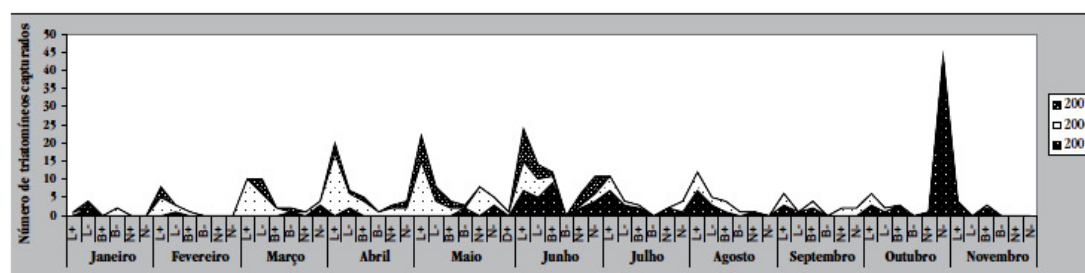
Foram coletados no período de 2005-2007 um total de 328 exemplares em 13 municípios da região Ciénega: Atotonilco (23), Ayotlán (16), Chapala (10), Degollado (12), Jamay (16), Jocotepec (34), La Barca (83), Ocotlán (18), Poncitlán (46), Tizapán (10), Tototlán (2), Tuxcueca (32), Zapotlán del Rey (26) (Tabela 1).

A porcentagem de exemplares coletados em 2005 foi de 38,4%, em 2006 de 45,1% e em 2007 de 16,4%, sendo La Barca, Poncitlán, Jocotepec e Tuxcueca os que apresentaram o maior índice de captura 59,4% (195/328). A prevalência de triatomíneos foi: *Triatoma longipennis* 182/328 (55,4%) que apresentou um índice de infestação de 18,7% na área intradomiciliar urbana, 26,9% na área intradomiciliar rural e 53,8% na região peridomiciliar rural. *Triatoma barberi* 50/328 (15,2%), com índice de infestação de 3,3% na área intradomiciliar urbana, 3,9% na área intradomiciliar rural e 19,2% na região peridomiciliar rural e foram capturadas 98 (29,8%) ninfas *sp*, sendo 6% encontradas na área intradomiciliar urbana, 6,6% na área intradomiciliar rural e 41,2% na região peridomiciliar rural (Tabela 2). Os maiores índices de captura de triatomíneos foram observados nos meses de abril, maio e junho, correspondendo ao período de fim do inverno, época da seca e período anterior às chuvas (Figura 2 e Tabela 3).

Dos 328 triatomíneos capturados, 188 (57,3%) apresentaram infecção natural por *Trypanosoma cruzi*, sendo encontrados positivos na região rural 102/147 (53,4%) *Triatoma longipennis*, 35/43 (81,3%) *Triatoma barberi* e 22/87 (25,2%) ninfas; na região urbana 22/35 (62,8%) *Triatoma longipennis*, 6/7 (85,7%) *Triatoma barberi* e 2/11 (18,1%) ninfas *sp*. Foi capturado apenas um exemplar de *Triatoma dimidiata* no município de La Barca, o qual se encontrava positivo para *Trypanosoma cruzi* (Figura 3).

Tabela 2 - Distribuição por espécie peri e intradomiciliar dos triatomíneos capturados

espécie/zona de captura	Urbano	Rural	
	intradomicílio	intradomicílio	peridomicílio
<i>Triatoma longipennis</i>	34	49	98
<i>Triatoma barberi</i>	6	7	35
Ninfas <i>sp</i>	11	12	75
<i>Triatoma dimidiata</i>	1		
Total	52	68	208



L+: *Triatoma longipennis* positivo, L-: *Triatoma longipennis* negativo, B+: *Triatoma barberi* positivo, B-: *Triatoma barberi* negativo, N+: ninfas sp positivas, N-: ninfas sp negativas, D+: *Triatoma dimidiata* positivo.

Figura 2 - Gráfico da sazonalidade das diferentes espécies de triatomíneos entre os anos 2005 a 2007.

Tabela 3 - Amostragem de triatomíneos capturados por mês em 13 localidades da região Clénega do Estado de Jalisco, México no período 2005-2007.

2005-2007																						
Ano	2005							2006							2007							
Mês/espécie	L+	L-	B+	B-	N+	N-	Total	L+	L-	B+	B-	N+	N-	D+	Total	L+	L-	B+	B-	N+	N-	Total
Janeiro		2					2	1			2				3		2					2
Fevereiro		1					1	5	2	1					8	3						3
Março						3	3	10	6	2		1	1		20		4		1			5
Abril		2					2	17	4	4	1	2	2		30	3	1	1		1	2	8
Maio				2		3	5	15	4	2		8	2	1	32	7	4	2	1			14
Junho	7	5	9		2	4	27	8	5	2		1	2		18	9	4	1		3	5	22
Julho	7	3	2		2	1	15	4	1	1			3		10							
Agosto	6	3	1		1		11	5	2	3	1				10							
Setembro	3	1	2				6	3		2		2	2		9							
Outubro	3	1	2		1	41	48	3	1				3		7							
Novembro	4		2				6			1					1							
Total	30	18	18	2	6	52	126	71	25	18	4	14	15	1	148	22	15	4	2	4	7	54

L+: *Triatoma longipennis* positivo, L-: *Triatoma longipennis* negativo, B+: *Triatoma barberi* positivo, B-: *Triatoma barberi* negativo, N+: ninfas positivas, N-: ninfas negativas, D+: *Triatoma dimidiata* positivo.

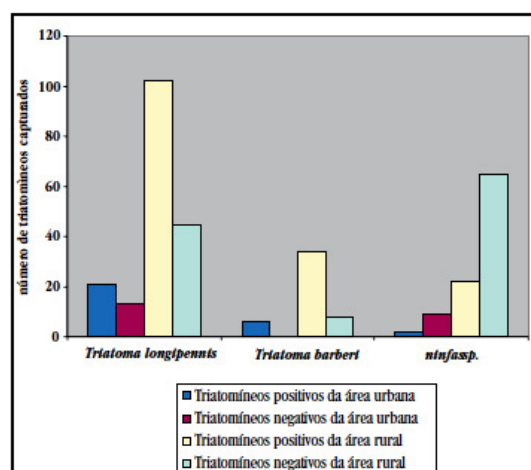


Figura 3 - Níveis de infecção de diferentes espécies de triatomíneos por *Trypanosoma cruzi* em área rural e urbana da região Clénega ($p < 0,05$).

DISCUSSÃO

O sucesso do controle vetorial na América do Sul diminuiu o número de pessoas infetadas de 16-18 milhões (1991) para 10-12 milhões (1999). A transmissão da doença foi controlada em alguns países como Uruguai, Chile e em alguns estados

brasileiros e quatro províncias argentinas^{18, 23}. No entanto, em países da América Central e México cerca de 2,3 milhões de pessoas se encontram infetadas, com uma incidência anual de 70 mil indivíduos²⁴.

O México não possui um programa efetivo em relação aos aspectos de diagnóstico, vigilância, prevenção e controle da doença, havendo poucos trabalhos publicados sobre o mesmo^{6, 7}.

A realização de diversos estudos na região oeste do Estado de Jalisco, México, tem mostrado que a invasão de triatomíneos de hábitos peridomiciliar na área domiciliar, ocorre na época de seca, antecedendo ao período chuvoso. Este fator representa um elevado risco de transmissão de *Trypanosoma cruzi*, o que pode acarretar um aumento da infecção nas populações urbanas e rurais que estão dentro da área de distribuição^{2, 15, 16, 17}.

Em nosso trabalho observamos que a época de maiores índices de captura ocorriam no período anterior as chuvas. Estudos têm demonstrado que a temperatura é o principal fator para o desenvolvimento acelerado do ciclo biológico dos triatomíneos. Temperaturas baixas influenciam o processo de embriogênese e o desenvolvimento das mudas, retardando o seu ciclo evolutivo. Já as temperaturas elevadas ocasionam desidratação e elevada mortalidade, diminuindo a densidade dos mesmos. As mudanças climáticas obrigam os triatomíneos (silvestres e peridomésticos) a procurarem um novo abrigo, tornando a área domiciliar

favorável para sua reprodução e aumentando, portanto, o risco de transmissão do parasita⁴.

Ao invadir os domicílios, os triatomíneos entram em contato com lugares propícios para sobrevivência e reprodução. As casas são geralmente construídas com barro, lâminas (asbesto, zinco, entre outras) e pau-a-pique, tornando o ambiente favorável para o encontro destes vetores^{4,24}. Estes fatores justificam o alto (84,1%) índice de captura nos domicílios rurais, sendo que destes, 84,5% foram positivos para *Trypanosoma cruzi* (Figura 3). Estes dados podem justificar os achados de Yerenas e cols que detectaram uma soroprevalência de 21,6% na população rural do município de La Barca, Jalisco²⁵.

O indicador de colonização por espécie não foi calculado porque algumas casas estavam infestadas com mais de uma espécie de triatomíneo e as ninfas são muito similares, não existindo chaves de classificação para diferenciá-las a nível espécie. Este mesmo fato ocorreu no trabalho realizado por Magallón-Gastélum e cols¹⁵, no ano de 2006. Em nosso estudo observou-se um comportamento contrário na positividade das ninfas *sp* quando comparado com as formas adultas (*Triatoma longipennis* e *Triatoma barberti*), sugerindo uma menor suscetibilidade ao parasito nos estádios jovens.

Os índices de infestação por triatomíneos em áreas intradomiciliar e peridomiciliar descritos neste trabalho são similares aos índices encontrados por outros estudos realizados em outras regiões do Estado de Jalisco²². Os indicadores de infestação (a maioria no ambiente peridomiciliar) podem ser justificados, provavelmente, pelo comportamento ornitófilo das espécies encontradas em nosso estudo, como mencionado por outros trabalhos^{15,16}.

Triatoma dimidiata é o segundo vetor de maior importância na doença de Chagas nos países andinos (Colômbia, Equador e Venezuela), nos países da América Central (Nicarágua, Guatemala, Honduras, Costa Rica e Belize) e no México. Esta espécie se caracteriza pela sua capacidade de reinfestação das casas após tratamento com inseticidas. Os estudos de mobilidade indicam que tanto as ninfas como os adultos apresentam capacidade de deslocamento, influenciando diretamente nas estratégias de controle^{8,11,19,22}. No México, o *Triatoma dimidiata* pode ser encontrado na península de Yucatán (Yucatán, Quintana Roo), istmo de Tehuantepec, e ao longo do litoral do Golfo do México (Veracruz, Tabasco Campeche,) e do Oceano Pacífico (Chiapas, Oaxaca, Guerrero). Dumonteil & Gourbière⁹ demonstraram que, no estado de Yucatán, o *Triatoma dimidiata* era mais abundante nos domicílios nos meses de abril a junho (correspondentes à época de calor), apresentando maiores índices de infecção por *Trypanosoma cruzi* e sugerindo um maior risco de transmissão neste período⁹. Este triatomíneo é considerado um dos melhores transmissores do *Trypanosoma cruzi* apesar da baixa densidade populacional^{16,7,8,11,12,16,23}, e de ser considerada como uma das espécies de maior adaptabilidade aos diferentes habitats^{12,16,26}. Não se tem registros de *Triatoma dimidiata* em regiões montanhosas do centro do país. Em nosso trabalho foi encontrado apenas um exemplar de *Triatoma dimidiata*, o qual era positivo para *Trypanosoma cruzi*. Este é o primeiro registro desta espécie

positivo na região Ciénega, sugerindo que este vetor esteja se adaptando a novos ecótopos, tornando-se um candidato para transmissão do parasita.

Martínez-Ibarra e cols¹⁷ consideram o *Triatoma longipennis* como principal transmissor do *Trypanosoma cruzi* por ser encontrado em grandes quantidades e apresentar índices de infecção natural mais alto quando comparado a outras espécies¹⁶. Nosso estudo demonstra que esta espécie foi a mais abundante, porém, o *Triatoma barberti* apresentou maior índice de infecção natural.

Em resumo, nosso trabalho mostra que na região Ciénega, Estado de Jalisco, o índice de triatomíneos positivos para *Trypanosoma cruzi* é elevado (57,3%) quando comparado com outras regiões do mesmo estado, sendo a maior frequência nos meses de abril, maio e junho correspondendo à época da seca. Demonstramos que as duas espécies mais importantes são *Triatoma longipennis* e *Triatoma barberti* sendo a primeira mais abundante e a segunda caracterizada por apresentar maior índice de positividade. Além disso, registrou-se o primeiro achado de *Triatoma dimidiata* positivo nesta região. Os altos índices de infecção dos vetores capturados sugerem uma elevada exposição das pessoas ao *Trypanosoma cruzi*.

REFERÊNCIAS

1. Acha PN, Sztyfres B. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. Organización Panamericana de la Salud Organización Mundial de la Salud, Publicación científica n° 503, 1986.
2. Brenière SF, Bosseno M, Magallón-Gastélum E, Ruvalcaba EGC, Gutierrez MS, Luna ECM, Basulto JT, Mathieu-Daudé F, Walter A, Lozano-Kasten E. Peridomestic colonization of *Triatoma longipennis* (Hemiptera, Reduviidae) and *Triatoma barberti* (Hemiptera, Reduviidae) in a rural community with active transmission of *Trypanosoma cruzi* in Jalisco State, Mexico. Acta Tropica 101: 249-257, 2007.
3. Brenner Z, Andrade ZA. O parasito. In: Brenner Z, Andrade ZA (eds) Relações hospedeiro parasito em *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, p. 530, 1979.
4. Cabello DR, Lizano E, Valderrama A. Efecto de la temperatura y la dieta sobre el ciclo de vida de *Rhodnius neivai* LENT, 1953 (Hemiptera: Reduviidae). Caribbean Journal of Science 34: 99-105, 1998.
5. Contreras FT, Yerenas MV, Gutierrez MS, Anaya MR, Corder AJ. Serological follow-up of *Trypanosoma cruzi* infection from 1987 to 1994 in individuals studies in 50 counties of the State of Jalisco, Mexico. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 33: 591-596, 2000.
6. Cruz-Reyes A, Pickering-López JM. Base de datos "CHAGMEX@ 1928-2004, sobre la Enfermedad de Chagas en México, con un enfoque biológico, geográfico y socioeconómico. <http://www.ibiologia.unam.mx> (Acesso: 29/10/2007), 2005.
7. Cruz-Reyes A, Pickering-López JM. Chagas disease in Mexico: an analysis of geographical distribution during the past 76 years. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 101: 345-354, 2006.
8. Dorn PL, Monroy C, Curtis A. *Triatoma dimidiata* (Latreille, 1811): A review of its diversity across its geographic range and the relationship among populations. Infection, Genetics and Evolution 7: 343-352, 2007.
9. Dumonteil E, Gourbière S. Predicción de la abundancia y tasa de infección de *Triatoma dimidiata*: un mapa de riesgo de transmisión natural de la enfermedad de Chagas en la Península de Yucatán, México. Revista Biomédica. 15: 221-231, 2004.
10. Galvão C, Carcavallo RU, Rocha DS, Jurberg J. A checklist of the current valid species of the subfamily *Triatominae* jeannel, 1919 (Hemiptera, Reduviidae)

- and their geographical distribution, with nomenclatural and taxonomic notes. *Zootaxa* 202: 1-36, 2003.
11. Guzmán-Bracho MC. Epidemiology of Chagas disease in Mexico: an update 2001. *Trends in Parasitology* 17: 372-376, 2002.
 12. Guzmán-Marín ES, Barrera-Pérez MA, Rodríguez-Félix ME, Zavala-Velázquez JE. Hábitos biológicos de *Triatoma dimidiata* en el estado de Yucatán, México. *Revista Biomédica* 3: 125-131, 1992.
 13. Jiménez ML, Palacios C. Estudio sobre la incidencia de la chinche piedra *Dipetalogaster maximus* (Uhler) (Hemiptera: Heteroptera: Reduviidae) vector de *Trypanosoma cruzi* en zonas urbanas de La Paz, BCS, México. *Annals del Instituto de Biología de la Universidad Nacional Autónoma de México* 70: 215-221, 1999.
 14. Lent H, Wigodzinsky P. Revision of the triatominae (Hemiptera: Reduviidae), and their significance as vectors of Chagas disease. *Bulletin of the American Museum of Natural History* 163: 520, 1979.
 15. Magallón-Gastélum E, Lozano-Kasten F, Gutierrez MS, Flores-Perez A, Sanchez B, Espinoza B, Bosseno M, Brenière SF. Epidemiological risk for *Trypanosoma cruzi* transmission by species of *Phyllosoma* complex in the occidental part of Mexico. *Acta Tropica* 97: 331-338, 2006.
 16. Magallón-Gastélum E, Magdaleno-Peñaloza NC, Kattahain-Duchateau G, Trujillo-Contreras F, Lozano-Kasten FJ, Hernández-Gutiérrez RJ. Distribución de los vectores de la enfermedad de Chagas Hemiptera: Reduviidae: Triatominae en el estado de Jalisco, México. *Revista Biomédica* 9: 151-157, 1998.
 17. Martínez-Ibarra JA, Barcenat-Ortega NM, Noguera-Torres B, Alejandro-Aguilar R, Lino-Rodríguez M, Magallón-Gastélum E, Lopez-Martínez V, Romero-Napoles J. Role of two *Triatoma* Hemiptera: Reduviidae: Triatominae species in the transmission of *Trypanosoma cruzi* Kinetoplastida: Trypanosomatidae to man in the west coast of Mexico. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 96: 141-144, 2001.
 18. Salazar-Shetino PM, Haro-Arteaga I, Ubribarren-Berrueta T. Chagas disease in México. *Parasitology Today* 4: 348-352, 1988.
 19. Schofield CJ, Dias JCP. The Southern Cone programme against Chagas' disease. *Advances in Parasitology* 42:1-25,1999.
 20. Secretaría de Salud Jalisco. Taller Nacional de Vigilancia Epidemiológica. Prevención y control de la enfermedad de Chagas en México. Organización Panamericana de la Salud. <http://www.paho.org/spanish/AD/DPC/CD/chagas> (Acesso: 29/10/2007), 2003.
 21. Velasco-Castrejón O, Guzmán-Bracho C. Importancia de la Enfermedad de Chagas en México. *Revista Latino-americana de Microbiología* 28: 275-283, 1986.
 22. Vidal-Acosta V, Ibáñez-Bernal S, Martínez-Campos C. Infección natural de chinches Triatominae con *Trypanosoma cruzi* asociadas a la vivienda humana en México. *Salud Pública de México* 42: 496-503, 2000.
 23. Walter A, Lozano-Kasten F, Bosseno M, Ruvalcaba EGC, Gutierrez MS, Luna CEM, Baunaure F, Phélinas P, Magallón-Gastélum E, Brenière SF. Peridomestic habitat and risk factors for *Triatoma* Infestation in a rural community of the Mexican occident. *The American Journal Tropical Medicine and Hygiene* 76: 508-515, 2007.
 24. World Health Organization. Control of Chagas disease. Technical Report Series 905: 40-55, 2002.
 25. Yerenas MIA, Contreras FT, Hernandez CG, Hernandez LAG, Zarate AC, Anguiano RRL, Flores PT, Lara JPR, Sanchez AUF, Aceves FFC, Gonzalez AF, Briceño PC. Estudio seroepidemiológico de la enfermedad en la zona rural del municipio de La Barca, Jalisco, Mexico 2005. In: Resumos do XLII Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Brasília p. 197, 2006.
 26. Zarate LG, Zarate RA. Checklist of the triatominae (Hemiptera: reduviidae) of Mexico. *International Journal Entomology* 27: 102-127, 1985.
 27. Zeledon R. Vectores de la Enfermedad de Chagas y sus características ecofisiológicas. *Interciencia* 8: 384-395, 1983.

ANEXO II Licenças emitidas pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA)



Ministério do Meio Ambiente - MMA

Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis - IBAMA

Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio

Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 16424-1	Data da Emissão: 07/07/2008 16:57	Data de Validade: 07/07/2009
Dados do titular		
Registro no Ibama: 2552475	Nome: César Gómez Hernández	CPF: 017.466.806-60
Título do Projeto: Caracterização Biológica e Molecular de Cepas de Tripanosomatídeos Isoladas de barbelos do Estado de Jalisco México		
Nome da Instituição : Universidade Federal do Triângulo Mineiro		CNPJ: 25.437.484/0001-61

Observações, ressalvas e condicionantes

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 passa da, 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	Esta autorização não exime o titular e a sua equipe 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.
3	Esta autorização não poderá ser utilizada para fins comerciais, industriais, esportivos ou para realização de atividades inerentes ao processo de licenciamento ambiental de empreendimentos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
4	A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico www.ibama.gov.br/cites . Em caso de material consignado, consulte www.ibama.gov.br/sisbio - menu Exportação.
5	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.
6	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.
7	Em caso de pesquisa em Unidade de Conservação Federal, o pesquisador titular deverá contactar a administração dessa unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infra-estrutura da unidade.

Equipe

#	Nome	Função	CPF	Doc. Identidade	Nacionalidade
1	Patrícia Helena Lins Gomes Marques	Técnico/biomedico	039.197.896-95	11016874 SSP-MG	Brasileira
2	Luciano Henrique de Paiva	Técnico/Biologo	965.358.656-49	M7264663 SSP/MG-MG	Brasileira
3	Ana Cláudia Corrêa da Silva	Técnico/Biologa	863.579.056-15	4725046 SSP-MG	Brasileira
4	Eliane Lages Silva	professora colaboradora	373.066.346-15	M705502 SSPMG-MG	Brasileira
5	Luis Eduardo Ramirez Giraldo	Coordenador/professor orientador	456.427.616-68	M-2674403 SSP-MG	Brasileira

Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Município	UF	Descrição do local	Tipo
1	UBERABA	MG	Triângulo Mineiro	Fora de UC

Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxons
1	Coleta/transporte de espécimes da fauna silvestre in situ	Triatoma (*Qtde: 20)
2	Recebimento de espécimes vivos provenientes do exterior	Triatoma

* Qtde. de indivíduos por espécie/localidade/unidade de conservação, a serem coletados durante um ano.

Material e métodos

1	Método de captura/coleta (Invertebrados Terrestres)	Captura manual
---	---	----------------

Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo Destino
1	Universidade Federal do Triângulo Mineiro	Laboratório da Disciplina de Parasitologia da Universidade Federal do Triângulo Mineiro

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa Ibama nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Ibama/Sisbio na internet (www.ibama.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 61219676



Página 1/2



Ministério do Meio Ambiente - MMA

Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis - IBAMA

Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio

Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 16424-1	Data da Emissão: 07/07/2008 16:57	Data de Validade: 07/07/2009
Dados do titular		
Registro no Ibama: 2552475	Nome: César Gómez Hernández	CPF: 017.466.806-60
Título do Projeto: Caracterização Biológica e Molecular de Cepas de Tripanosomatídeos Isoladas de barbeiros do Estado de Jalisco México		
Nome da Instituição : Universidade Federal do Triângulo Mineiro		CNPJ: 25.437.484/0001-61

Anexo para registrar Coletas Imprevistas de Material Biológico

De acordo com a Instrução Normativa Ibama 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).

Nível	Táxon*	Qtde.	Amostra	Qtde.	Data

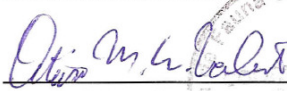
* Identificar o espécime no nível taxonômico mais específico possível.

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa Ibama nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Ibama/Sisbio na Internet (www.ibama.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 61219676

Página 2/2

ANEXO III

 REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE - MMA INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS - IBAMA SCEN Trecho 2 - Ed. Sede - Caixa Postal nº 09870 - CEP 70816-900 - Brasília-DF		 INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS - IBAMA		1) Pag. Nº 1/1 2) Data Emissão/Issuing Date: 02/07/2008 3) Válido Até/Valid Until: 02/01/2009
4) Licença nº/Permit nº: 08BR002121/DF	6) Selo nº/Stamp nº: ***** 7) Selo/Stamp *****	8) Controle/Check #: 1PJXV15XGPMS2TRW 9) Autoridade Adm. Emitente/Issuing Management Authority  Assinatura/Signature		
5) Licença de/Permit for Importação				
10) Importador/Importer César Gómez Hernández Praça Doutor Thomaz Olhã 594 UBERABA - fone: - cesar_cgh@hotmail.com Brasil - BR		11) Exportador(Re-exportador)/Exporter(Re-exporter) Alejandro Martinez Ibarra Avenida prolongación Colón s/n, Km. 1, carretera Ciudad Guzmán Cd Guzman - 49000 fone: - México - MX		
12) País Importador/Country of Import Brasil - BR		13) País Exportador(Re-exportador)/Country of Export(Re-export) México - MX		
14) Objetivo da Operação/Purpose of the transaction S - Científico/Fins científicos...				
15) Condições Especiais/Special Conditions For live animals, this permit or certificate is only valid if the transport conditions conform to the Guidelines for Transport and preparation for shipment of live wild animals and plants or, in the case of air transport, to the IATA Live Animals Regulations				
16) Dados do Transporte/Transportation Data Local/Place: ALF/Al São Paulo Data Provável/Probable Date: 31/07/2008				
ESTA LICENÇA É VÁLIDA SOMENTE PARA UMA OPERAÇÃO/ THIS PERMIT OR CERTIFICATE IS ONLY VALID FOR ONE SHIPMENT.				
17) Item	21) Anexo/Origem Appendix/Source	18) Produto/Product 22) Descrição: Parte Quantidade-Unidade-Marcação Description: Part Quantity-Unit-Mark	19) Quantidade-Unidade Medida/Quantity Unit 23) Cód. País de Origem-Comprovante-Data Country of Origin-Permit-Date 24) Cód. País de reexportador-Certificado-Data Country reexportation-Certificate-Date	
20) 1. Triatoma spp.	21) NC W	18) ANIMAL VIVO/ALIVE ANIMAL 22) animal vivo/alive animal 20,00 UN -	19) -- 20,00 UN -- 23) - - 24) - -	
Fim dos Itens/Items End				

ANEXO IV

Dados sobre as cepas mexicanas de *T. cruzi*.

Nome	CGH1	CGH2	CGH3	CGH4	CGH6	KR1	NINOA	INC5
Procedência biológica	<i>T. longipennis</i>	<i>T. pallidipennis</i>	<i>T. longipennis</i>	<i>T. pallidipennis</i>	<i>T. palillipennis</i>	<i>T. picturata</i>	Humana Fase aguda	Humana Fase crônica
Procedência geográfica	Sáyula, Jalisco	Usmajac, Jalisco	Região Ciénega, Jalisco.	Região Ciénega, Jalisco.	Região Ciénega, Jalisco.	Tapalpa de Allende, Jalisco.	Oaxaca	Guanajuato
Pico da parasitemia (dias)	Não tem	Não tem	31	29	27	Não tem	27 e 33	27
Pico Maximo	Não tem	Não tem	10 ⁷	4,6 x 10 ⁶	8 x 10 ⁶	Não tem	7,5 x 10 ⁶	6,1 x 10 ⁶
Parasitemia	Sub-patente	Sub-patente	Patente	Patente	Patente	Sub-patente	Patente	patente
Mortalidade em camundongos (%)	6,6	3,3	3,3	16,6	6,6	10	20	53,3
Linhagem	Tc I	Tc I	Tc I	Tc I	Tc I	Tc I	Tc I	Tc I
Haplótipo	Ia-d	Ia-d	Ia-d	Ia-d	Ia-d	Ia-d	Ia-d	Ia-d
* Nomenclatura da cepa	TLON/MX/2008/CGH1-Tc1	TPAP/MX/2008/CGH2-Tc1	TLON/MX/2008/CGH3-Tc1	TPAP/MX/2008/CGH4-Tc1	TPAP/MX/2008/CGH6-Tc1	TPIR/ MX/2008/KR1-Tc1	MHOM/MX/1986/NINOA-Tc1	MHOM/MX/1996/INC-5-Tc1

ANEXO V



**XXI Congresso Brasileiro de Parasitologia
II Encontro de Parasitologia do Mercosul
NOVOS HORIZONTES EM PARASITOLOGIA**
26 a 30 de outubro de 2009



DETECÇÃO DE HAPLOTIPOS MISTOS DO *Trypanosoma cruzi* EM VETORES PERI E INTRADOMICILIARES NO MÉXICO

César Gómez-Hernández^{1*}, Henrique B. Kappel¹, José A. Martínez-Ibarra³, Karine Rezende-Oliveira², Gabriel A. N. Nascentes¹, Lara R. Batista¹, Eliane Lages-Silva¹, Luis E. Ramirez¹

¹Universidade Federal do Triângulo Mineiro. ²Universidade Federal de Uberlândia, Campus do Pontal. ³Centro Universitário del Sur, U de G.
E-mail: *cesar_cgh@hotmail.com

México é um dos países onde a doença de Chagas ainda é endêmica sendo Jalisco um dos Estados mais acometidos, apresentando prevalência em torno de 17%. Neste Estado, a maioria dos estudos são relatos isolados de casos humanos e dados de prevalência em bancos de sangue. Neste trabalho, as populações de tripanossomatídeos circulantes em triatomíneos naturalmente infectados da região sul do Estado de Jalisco foram identificadas e caracterizadas por meio de marcadores genéticos. Foram avaliadas 19 amostras isoladas de fezes de triatomíneos peridomiciliares correspondentes ao *Triatoma pallidipennis* (6) e *T. longipennis* (5), e intradomiciliares do *Triatoma pallidipennis* (4), *T. longipennis* (3), *T. picturata* (1). As amostras de fezes dos triatomíneos foram preservadas em guanidina-EDTA e a extração de DNA realizada pela técnica de fenol-cloroformio. A identificação do *Trypanosoma cruzi* e *Trypanosoma rangeli* foi realizada por meio dos iniciadores 121-122 que amplificam o k-DNA e pela PCR multiplex (D71-72/RG3). Na caracterização genética dos genótipos do *T. cruzi* foram utilizados diferentes marcadores direcionados para o gene do mini-éxon, domínio D7 do gene 24Sα e 18S do rDNA. Os haplótipos do *T. cruzi* I foram determinados pela análise da região intergênica do mini-éxon. Os produtos de PCR obtidos foram visualizados em géis de poliacrilamida a 6% corados pelo nitrato de prata. Em 100% das amostras analisadas, foram evidenciadas apenas populações correspondentes ao *T. cruzi* I e foi detectada a presença em todas as amostras dos haplótipos A–D, com diferença de bandas no haplótipo A tanto no peridomicílio quanto no intradomicílio, destas o 57,8% (11/19) amplificaram a banda única de 250 pb e 42,2% (8/19) amplificaram as bandas de 250pb e 300pb. Não foi detectada a presença do *T. rangeli*. Os dados demonstram a presença exclusiva do *T. cruzi* I tanto no ciclo peridoméstico como intradomiciliar no Estado de Jalisco. Também foi evidenciada variabilidade intraespecífica do *T. cruzi* I nessas populações no haplótipos A. A presença de haplótipos mistos A e D circulantes nas áreas estudadas parecem ser geneticamente diferentes daqueles previamente detectados nas cepas colombianas. Esses fatos corroboram a maior frequência do *T. cruzi* I no México onde é associado com casos de cardiomiopatia, fato que talvez esteja relacionado com a variabilidade haplotípica dessas populações. Apoio: FAPEMIG, CAPES, CNPq e FUNEP-UFMTM.

ANEXO VI



XIII International Congress of Protistology
XXV Annual Meeting of the Brazilian Society of Protozoology
XXXVI Annual Meeting on Basic Research in Chagas' Disease
Armação dos Búzios, RJ 23-28 August, 2009

147

**BM041 - MOLECULAR CHARACTERIZATION OF *Trypanosoma cruzi* MEXICAN STRAINS
AFTER EXPERIMENTAL INFECTION**

Gómez-Hernández C.^{1*}, Nascentes G.A. N.¹, Batista L.R.¹, Kappel H. B.¹, Rezende-Oliveira K.²,
Martínez-Ibarra J.A.³, Lages-Silva E.¹, Ramirez L.E.¹

¹Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Minas Gerais, Brasil.

²Universidade Federal de Uberlândia, Campus do Pontal, Minas Gerais, Brasil

³Centro Universitario del Sur, Universidad de Guadalajara, Jalisco, México.

*cesar_cgh@hotmail.com

The Chagas' disease is widely distributed in Mexico, in which Jalisco is one of the most affected states. The prevalence of seropositivity for *Trypanosoma cruzi* in this state is approximately 17%, but few epidemiological studies, control blood donors and human cases of the disease have been performed. The objective of this study was to observe the behavior in mice infected with Mexican strains of *Trypanosoma cruzi* isolated from different hosts and genetically characterize them. These strains were obtained from peridomestic triatomine vectors (*Triatoma pallidipennis*, *T. longipennis*, *T. picturata*) and from human cases in the acute and chronic phases of the disease. The strains had been grown in LIT medium for parasite mass producing and subsequent DNA extraction. The strain classification was performed by PCR analysis of the subunit rRNA, mini-exon, D7 domain of 24Sα and 18s of genes' region. The haplotypes of *Trypanosoma cruzi* I strains were determined by analysis the mini-exon gene intergenic region. The results of amplifications were observed on a 6% polyacrylamide gel by silver staining. The parasitemia curves profile was accompanied by the microhematocrit method when necessary or by method of Brener in non isogonic mice inoculated with 3×10^5 trypomastigotes of each strain and the mortality was followed daily. There was low, medium or high which mortality that was not always associated with parasitemia curves ranging from a subpatente way (positive only in microhematocrit) to a patent with maximum peak between 4.6×10^6 and 1.0×10^7 parasites/ml of blood. The existence of *T. rangeli* was ruled out by molecular analysis and all samples were classified as *Trypanosoma cruzi* I corresponding Ia (250pb) – Id (200pb) haplotype. These results lead us to conclude that the *Trypanosoma cruzi* I Mexican strains presented different biological characteristics, but all showed the same haplotype.

Financial Support: FAPEMIG, CAPES, CNPq and FUNEPU-UFTM

ANEXO VII



PATHOGENIC POTENTIAL OF *T. CRUZI* I IN THE CYCLE PERIDOMESTIC OF *TRYPANOSOMA CRUZI* IN MEXICO: MIOTROPISMO NOT CORRELATED WITH PARASITEMIA IN EXPERIMENTAL INFECTION

César Gómez Hernández 1; Lara Rocha Batista 1; Henrique Borges Kappel 1; Gabriel Antonio Nogueira Nascentes 1; Kerine Rezende de Oliveira 2; Luciano Henrique de Paiva 1; José Alejandro Martínez Ibarra 3; Eliane Lages Silva 1; Luis Eduardo Ramírez 1.

1. Universidade Federal do Triângulo Mineiro; 2. Universidade Federal de Uberlândia, Campus do Pontal; 3. Centro Universitario del Sur, Universidad de Guadalajara

The Chagas' disease in México shows wide geographical distribution with significant rates of natural infection in vectors and various clinical manifestations. The Jalisco State is an important endemic region, however, few studies have been conducted and these are related to epidemiological aspects, control of blood banks and case reports. This work was carried out a genetic characterization of *Trypanosoma cruzi* populations isolated from different vectors species in the region of Jalisco, and was also evaluated the performance of these isolate in non isogonics mice experimental infected. Isolated KR1, CGH3 and CGH4 were derived from peridomestic species *Triatoma picturata*, *Triatoma longipennis* and *Triatoma pallidipennis*, respectively, and were inoculated into mice to obtain trypomastigotes and in LIT medium for the obtaining of parasitic mass and subsequent DNA extraction. The biological behavior (parasitemia and histopathology) was evaluated in mice inoculated with 3×10^4 blood trypomastigotes of each isolate and the parasitemia was monitored every two days during 30 days by the method of Brener and/or the microhematocrit when the fresh examination was negative. Histopathological analysis was performed on the peak of parasitemia and in the end of the patent period when the animals were euthanized and were organs collected (heart, skeletal muscle, junctions esophagogastric, gastroduodenal and ileocecal, pancreas and lung). These samples were fixed in formalin buffered to 10% and stained by HE. The genetic characterization of isolates was performed by using different molecular markers: Targeted to the variable region domain from large subunit rRNA to identify and differentiate *T. cruzi* I and II and *T. rangeli*, markers targeted to the gene of the mini-exon, D7 domain of 24S α gene and the 18S rDNA and others over miniexon gene intergenic region to identify haplotypes of *T. cruzi* I. The parasitemia of the isolate KR1 was not patent during the evaluation period of 30 days, the strains CGH3 and CGH4 showed patent parasitemia with maximum peak at 28 days of 9.54×10^6 and $8,00 \times 10^6$ trypomastigotes / ml blood, respectively. Histologically, the cardiac tissue parasitism was more intense in animals infected with the isolate KR1 (not patent) when compared with CGH3 and CGH4 which was followed by an inflammatory process variable from moderate to intense in the headset and the pericardium. However, inflammatory processes were not detected in ventricles. In skeletal muscle tissue it was observed a higher parasitism in animals infected with isolates KR1 and CGH4 than those infected with CGH3 and the myositis between moderate and intense in the three isolates. The parasitism and the inflammatory processes were discrete in the gastrointestinal junctions. Pneumonitis in the lung was observed with mild to moderate increased tissue parasitism in animals infected with the strains KR1 and CGH4 when compared with the strain CGH3. In the pancreas, although the presence of parasites was not detected, there was intense pancreatitis with destruction of pancreatic parenchyma. The characterization of *T. cruzi* isolated (18S, 24S α and miniexon) showed that all three strains corresponded to the *Trypanosoma cruzi* I group, with haplotypes corresponding to a band of 250pb with the primers Ia and a band of 200pb with Id. Molecular analysis did not identify the presence of *Trypanosoma rangeli* in the studied samples. The data presented here demonstrated the presence of TcI in natural infections of vectors in the State of Jalisco and despite the low parasitism observed with the isolated KR1, this has great pathogenic potential in experimental infections, which was demonstrated by the intense miotropism especially in heart and skeletal muscle. In the current study the TcI populations seems to correspond to different haplotypes from those found in Colombia, highlighting the need for further biological and genetic studies to assess the performance of the TcI. Supported by CNPq, CAPES, FAPEMIG and FUNEP-UFMT.



Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)