



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CEILÂNDIA
CURSO DE FARMÁCIA**

CAMILLA BERNARDES FURTADO

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE LINHAGENS DE *Trypanosoma cruzi*
(Chagas, 1909) EM TRIATOMÍNEOS DO DISTRITO FEDERAL**

CEILÂNDIA - DF

2015

CAMILLA BERNARDES FURTADO

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE LINHAGENS DE *Trypanosoma cruzi*
(Chagas, 1909) EM TRIATOMÍNEOS DO DISTRITO FEDERAL**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado para
obtenção do grau de Farmacêutico na Faculdade de
Ceilândia, Universidade de Brasília (FCE/UnB).

Orientador: Prof. Dr. Marcos Takashi Obara

Co-orientador: Prof. Dr. Rodrigo Gurgel Gonçalves

CEILÂNDIA- DF

2015

CAMILLA BERNARDES FURTADO

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE LINHAGENS DE *Trypanosoma cruzi*
(Chagas, 1909) EM TRIATOMÍNEOS DO DISTRITO FEDERAL**

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. Marcos Takashi Obara
(FCE/Universidade de Brasília - UnB)

Prof. Dr. Andrey José de Andrade
(Faculdade de Medicina/Universidade de Brasília - UnB)

Prof. Dr. Vagner José de Mendonça
(Faculdade de Medicina/Universidade de Brasília - UnB)

CEILÂNDIA - DF

2015

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, minha tia e meus irmãos por todo o amor, carinho, dedicação e apoio, por acreditarem e confiarem em mim. Ao meu namorado pelo companheirismo, amor, incentivo e compreensão. Eles não mediram esforços para que eu chegasse até esta etapa de minha vida, portanto, essa vitória não é só minha, é nossa!

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	12
1.1. Doença de Chagas.....	12
1.2. Triatomíneos	13
1.2.1. Triatomíneos no Brasil.....	13
1.2.2. Triatomíneos no Distrito Federal.....	14
1.3. <i>Trypanosoma cruzi</i>	15
1.3.1. Ciclo de vida	16
1.3.2. Linhagens de <i>T. cruzi</i>	17
2. JUSTIFICATIVA.....	21
3. OBJETIVOS.....	22
3.1. Objetivos específicos	22
4. MATERIAL E MÉTODOS	23
4.1. Área de estudo.....	23
4.2. Obtenção dos insetos.....	24
4.3. Microscopia Óptica.....	24
4.4. Extração de DNA	25
4.5. PCR.....	25
4.6. Sequenciamento	27
5. RESULTADOS	28
6. DISCUSSÃO.....	33
7. CONCLUSÕES.....	36
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	37

RESUMO

Trypanosoma cruzi, agente etiológico da doença de Chagas, tem sido detectado em triatomíneos no Distrito Federal (DF), principalmente em *Panstrongylus megistus*. Atualmente, 6 linhagens de *T. cruzi* são reconhecidas (Tcl-TcVI) as quais estão relacionadas com a localidades, hospedeiros e com diferentes ciclos de transmissão. O presente estudo teve como objetivo analisar as linhagens de *T. cruzi* que ocorrem em triatomíneos coletados no DF. Os insetos foram obtidos por colaboradores da Diretoria de Vigilância Ambiental (DIVAL) capturados nos anos de 2012 a 2014, em nove Regiões Administrativas do DF. Após a identificação dos triatomíneos, o conteúdo retal foi analisado por microscopia óptica para detecção de tripanossomatídeos. O DNA de todos triatomíneos foi extraído de amostras de intestino para realização de PCR, utilizando os *primers* D75/D76. As amostras positivas foram selecionadas para confirmação em qPCR, usando TCZ1/TCZ2. Para a identificação das linhagens de *T. cruzi* foi realizada uma PCR, utilizando GPI-L/GPI-R. Os produtos da PCR foram eluídos do gel de agarose, purificados e enviados para o sequenciamento. Foram analisados 260 triatomíneos, 238 *P. megistus* e 22 *Triatoma pseudomaculata*. A microscopia óptica revelou 32 espécimes de *P. megistus* positivos para tripanossomatídeos (13,4%) e nenhum de *T. pseudomaculata*. A PCR revelou 87 espécimes de *P. megistus* positivos para *T. cruzi* (36,5%) e 5 de *T. pseudomaculata* (22%), confirmados pela qPCR. A análise das sequências obtidas na PCR GPI de *P. megistus* revelou que as amostras apresentaram 99-100% de identidade com sequências de Tcl (n=2) e TcII (n=6) disponíveis no GenBank. A linhagem Tcl já havia sido registrada no DF, porém TcII foi registrada pela primeira vez. A detecção de TcII em ninfa coletada no intradomicílio indica ciclos de transmissão domésticos reforçando a necessidade de uma vigilância continuada com participação comunitária para prevenção da transmissão da doença de Chagas no DF.

Palavras-chaves: Doença de Chagas; *Trypanosoma cruzi*; Unidade discreta de tipificação; Triatomíneos.

ABSTRACT

Trypanosoma cruzi, the etiological agent of Chagas disease, has been detected in triatomines in the Federal District of Brazil (DF), mainly *Panstrongylus megistus*. Currently, 6 *T. cruzi* lineages are recognized (TcI-TcVI), which are related to locations, hosts and with different transmission cycles. This study aimed to analyze the *T. cruzi* lineages that occur in triatomines collected in DF. The insects were obtained by employees of Environmental Surveillance Directory (DIVAL) and captured between 2012-2014, in nine administrative regions of DF. After identification of the insects, the rectal contents were analyzed by optical microscopy for trypanosomes detection. The DNA of all triatomines was extracted from intestine samples for PCR using the primers D75/D76. Positive samples were selected for confirmation in qPCR, using TCZ1/TCZ2. Identification of *T. cruzi* lineages was carried out by PCR, using GPI-L/GPI-R. PCR products were eluted from the agarose gel, purified and sent for sequencing. 260 triatomines were analyzed, 238 *P. megistus* and 22 *Triatoma pseudomaculata*. The optical microscopy revealed 32 specimens of *P. megistus* infected by trypanosomatids (13,4%) and none of *T. pseudomaculata*. PCR revealed *T. cruzi* in 87 specimens of *P. megistus* (36,5%) and in 5 specimens of *T. pseudomaculata* (22%), confirmed by qPCR. Sequence analysis of GPI PCR products of *P. megistus* revealed that the samples had 99-100% identity with sequences from TcI (n = 2) and TcII (n = 6) available in GenBank. The TcI lineage had already been recorded in the DF, however TcII was first recorded. TcII detection in a nymph collected inside a house suggests domestic transmission cycles reinforcing the need for continued vigilance with community participation to prevent the transmission of Chagas disease in DF.

Keywords: Chagas disease; *Trypanosoma cruzi*; Discrete typing unit; Triatomine.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Distribuição geográfica das espécies *Panstrongylus geniculatus* (a), *Panstrongylus megistus* (b), *Rhodnius neglectus* (c), *Triatoma costalimai* (d) e *Triatoma sordida* (e) no Brasil (Fonte: GURGEL-GONÇALVES et al., 2012). 14
- Figura 2: Formas encontradas no ciclo biológico de *Trypanosoma cruzi*: Amastigota (A), Epimastigota (B) e Tripomastigota (C). 16
- Figura 3: Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*. i: estágio infectante; d: fase de diagnóstico. As fases 2, 3 e 4 representam o ciclo no hospedeiro vertebrado e as fases 1, 5, 6, 7 e 8 o ciclo no triatomíneo (Fonte: Modificado de CDC, Atlanta). 17
- Figura 4: Distribuição geográfica dos DTUs. (Fonte: Who, how, what and where?, Box 1: *Trypanosoma cruzi* strains, Revista Nature). 18
- Figura 5: Regiões administrativas do Distrito Federal. (Disponível em: <<http://professormarcianodantas.blogspot.com.br/2015/04/o-distrito-federal.html>>. Acesso em: 30 de maio de 2015). 24
- Figura 6: Organograma dos métodos utilizados para detecção de tripanossomatídeos em triatomíneos coletados no Distrito Federal. 25
- Figura 7: Espécies de triatomíneos detectadas durante a pesquisa no Distrito Federal: *Panstrongylus megistus* (A) e *Triatoma pseudomaculata* (B). 28
- Figura 8: Amostras positivas para *Trypanosoma cruzi* de microscopia óptica com aumento de 1000X e corado com Giemsa. A: forma epimastigota e B: forma tripomastigota. 30
- Figura 9: Amostras confirmadas por meio de PCR usando os *primers* D75/D76, específico para tripanossomatídeos. M: marcador molecular; B: branco; CN: controle

negativo; 1 e 3 amostras positivas de *Blastocrithidia* sp. (~250pb); 2 amostra mista para *Trypanosoma cruzi* e *Blastocrithidia* sp.; 4 amostra positiva de *Trypanosoma cruzi*; TR: *Trypanosoma rangeli*; TC: Cultura de *Trypanosoma cruzi* da cepa Berenice.....31

Figura 10: Amostras confirmadas por meio de PCR usando os *primers* GPI-L e GPI-R, específico para linhagens de *Trypanosoma cruzi*. M: marcador molecular; B: branco; CN: controle negativo; 1 a 4 amostras positivas de *Trypanosoma cruzi*; TC: Cultura de *Trypanosoma cruzi* da cepa Berenice.....32

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Distribuição de *Panstrongylus megistus* e *Triatoma pseudomaculata* conforme estágio de desenvolvimento, ecótopos e estado de conservação, no período de 2012 a 2014, no Distrito Federal, Brasil.....29

Tabela 2: Comparação da taxa de infecção natural segundo microscopia óptica e PCR nas espécies *Panstrongylus megistus* e *Triatoma pseudomaculata*, capturadas no Distrito Federal entre 2012 e 2014.....31

Tabela 3: Linhagens de *Trypanosoma cruzi* detectadas em *Panstrongylus megistus* e *Triatoma pseudomaculata* usando os primers GPI-L e GPI-R.....32

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

CDC	Centers for Disease Control and Prevention
DF	Distrito Federal
DIVAL	Diretoria de Vigilância Ambiental
DTU	Unidade Discreta de Tipificação
FUNASA	Fundação Nacional de Saúde
GPI	Isomerase de Glicose-6-Fosfato
MO	Microscopia Óptica
MS	Ministério da Saúde
PCR	Reação de Polimerase em Cadeia
PIT	Posto de Informação de Triatomíneo
pPCR	PCR em tempo real
RA	Região Administrativa
SCIA	Setor Complementar de Indústria e Abastecimento
SES	Secretaria de Estado de Saúde
SIA	Setor de Indústria e Abastecimento
UFRGS	Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
USP	Universidade de São Paulo

1. INTRODUÇÃO

1.1. Doença de Chagas

A doença de Chagas ou tripanossomíase americana foi descoberta por Carlos Chagas em Lassance, Minas Gerais, em 1909. O agente etiológico da doença, *Trypanosoma cruzi*, é transmitido principalmente por triatomíneos hematófagos da família Reduviidae e subfamília Triatominae (LENT & WYGODZINSKY, 1979). A doença de Chagas é uma infecção crônica e potencialmente fatal sendo considerada uma das infecções parasitárias de maior importância na América Latina levando a óbito pessoas com idade entre 30 a 50 anos, principalmente por causa das manifestações patológicas de cardiopatia chagásica (COURA e VIÑAS, 2010).

A principal via transmissão do *T.cruzi* é por meio das fezes contendo o parasito eliminadas por triatomíneos infectados sobre a pele do hospedeiro, durante o repasto sanguíneo. A picada do vetor provoca coceira no local, o que facilita a entrada do tripanossomatídeo. A deposição dessas fezes do vetor pode ocorrer sobre a mucosa dos olhos, nariz, boca, ferida e corte na pele. No entanto, existem outras vias de transmissão como: transfusão de sangue, transmissão vertical via placenta, transmissão oral, transplante de órgãos, manejo de animais infectados, via sexual (ferimentos, esperma, líquido menstrual) e acidentes em laboratórios (DIAS et al., 2011).

A doença de Chagas é uma das patologias de mais ampla distribuição no continente americano. Sem vacina e tratamento antiparasitário eficaz para curar a fase crônica da infecção, a principal estratégia de controle é a prevenção da transmissão vetorial, a partir da redução e/ou eliminação de triatomíneos domiciliados utilizando inseticidas e vigilância entomológica, com participação comunitária (COURA e VIÑAS, 2010). Em 1990, aproximadamente 16 a 18 milhões de pessoas estavam infectadas com *T. cruzi* na América Latina. Em meados de 2005, esse número foi reduzido para 9,8 milhões e o número de mortes também diminuiu de maneira drástica, fato que demonstra o sucesso das campanhas de controle vetorial (SCHOFIELD et al., 2006). Entre 1975 a 1983, houve a implementação do Programa Nacional de Controle da Doença de Chagas no Brasil (SILVEIRA et al., 1984). Nessa época foram registrados aproximadamente 100.000 novos casos por ano (CAMARGO et al., 1984). No ano de 1991, o Brasil ingressou na Iniciativa do Cone Sul, um consórcio internacional com o objetivo de reduzir a

transmissão vetorial da doença. Após 10 anos, houve uma redução de 94% da incidência da doença (WHO, 2002).

Atualmente, estima-se que existam cerca de 4,6 milhões de pessoas infectadas no Brasil (MARTINS-MELO et al., 2014) e 8 a 10 milhões no mundo, principalmente, na América Latina (COURA e VIÑAS, 2010).

1.2. Triatomíneos

1.2.1. Triatomíneos no Brasil

A distribuição dos vetores de *T. cruzi* no continente americano estende-se desde os Estados Unidos até Argentina e Chile, sendo no total, 22 países endêmicos para a doença de Chagas (COURA e VIÑAS, 2010). A distribuição dos vetores no Brasil foi revisada no estudo de Gurgel-Gonçalves et al. (2012). Das 148 espécies recentes e duas espécies fósseis conhecidas (GALVÃO e PAULA, 2014), 62 ocorrem no Brasil (63%). O maior número de espécies foi encontrado na Bahia (25), seguido por Mato Grosso (18), Pará, Tocantins e Minas Gerais (15) e Rio Grande do Sul (11). Essas 62 espécies foram agrupadas por biomas, assim notou-se que a maioria delas estão distribuídas em áreas abertas no Cerrado e Caatinga. As espécies *Panstrongylus geniculatus* e *Panstrongylus megistus* mostraram ampla distribuição geográfica e as espécies *Rhodnius neglectus*, *Triatoma costalimai* e *Triatoma sordida* ocorreram principalmente no Cerrado no Brasil Central (Figura 1).

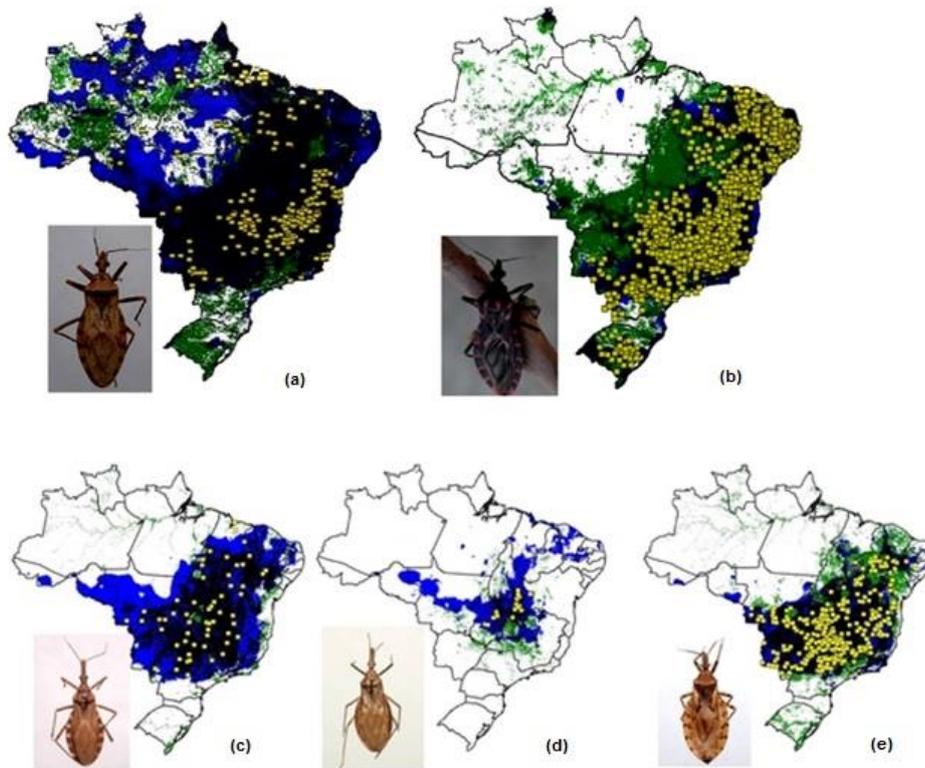


Figura 1: Distribuição geográfica das espécies *Panstrongylus geniculatus* (a), *Panstrongylus megistus* (b), *Rhodnius neglectus* (c), *Triatoma costalimai* (d) e *Triatoma sordida* (e) no Brasil (Fonte: GURGEL-GONÇALVES et al., 2012).

De acordo com os mapas acima, as áreas mais favoráveis para a ocorrência destas espécies estão concentradas no Cerrado e Caatinga, na diagonal de áreas abertas do leste da América do Sul.

A maior parte do território brasileiro apresenta ocorrência de alguma espécie de triatomíneo, de tal forma que há o potencial risco da transmissão de *T. cruzi* em praticamente todo o Brasil, embora algumas áreas possuam um risco maior do que as outras (GURGEL-GONÇALVES et al., 2012, VINHAES et al. 2014).

1.2.2. Triatomíneos no Distrito Federal

Os registros de ocorrência dos triatomíneos no Distrito Federal (DF) começaram com um trabalho realizado pela Fundação Nacional de Saúde (Funasa) - Ministério da Saúde (MS), através de ações de controle das infestações domiciliares e peridomiciliares. A vigilância entomológica no DF teve início na

década de 1980 com a instalação de Postos de Informações de Triatomíneos (PITs), os quais tinham como objetivos informar, divulgar e atender as denúncias, além de, encaminhar os barbeiros para exames laboratoriais e realizar borrifações nas casas positivas.

De acordo com um inquérito sorológico, havia um número estimado de 71.736 soropositivos, mesmo o DF não sendo uma área endêmica quando comparado aos outros estados (GURGEL-GONÇALVES et al., 2004).

Após a descentralização das ações de saúde da Funasa, em 1999, as atividades de controle e vigilância de triatomíneos começaram a ser realizadas pela Diretoria de Vigilância Ambiental (DIVAL) da Secretaria de Estado de Saúde do Distrito Federal (SES-DF). Durante este período, as espécies registradas no DF foram *P. megistus*, *P. geniculatus*, *P. diasi*, *R. neglectus*, *T. pseudomaculata* e *T. sordida* (MAEDA et al., 2012).

1.3. *Trypanosoma cruzi*

O *Trypanosoma cruzi* é um protozoário flagelado que pode ser diferenciado de acordo com o seu tamanho, forma e posicionamento do cinetoplasto e flagelo. De acordo com o ciclo biológico e a fase do desenvolvimento (Figura 2):

- Amastigota (A): a forma é circular, sem flagelo livre, com núcleo grande e cinetoplasto bem visível ao lado do núcleo. Esta forma é intracelular e se multiplica por divisão binária nos tecidos do hospedeiro vertebrado.
- Epimastigota (B): forma fusiforme com cinetoplasto e bolso flagelar na parte anterior e justaposta ao núcleo. Esta forma possui flagelo e membrana ondulante, sendo encontrada apenas no vetor (tubo digestivo) e não é infectante para os vertebrados.
- Tripomastigota (C): forma fusiforme, fina e delgada, com cinetoplasto e bolso flagelar na parte posterior e distante do núcleo. Esta forma apresenta flagelo e membrana ondulante ao longo da extensão do parasito. Pode ser encontrada no hospedeiro vertebrado (tripomastigotas sanguíneos), sendo abundante na fase aguda da doença de Chagas e no reto dos triatomíneos (tripomastigota metacíclico) sendo esta a fase infectante para os vertebrados (UFRGS, 2015).



Figura 2: Formas encontradas no ciclo biológico de *Trypanosoma cruzi*: Amastigota (A), Epimastigota (B) e Tripomastigota (C).

De acordo com Herrera (2014), o *T. cruzi* circula em três ambientes: a) silvestre: envolve as populações silvestres de triatomíneos e mamíferos; b) peridoméstico: ocorre em estruturas artificiais que cercam habitações humanas, onde as populações de vetores associados aos animais domésticos e sinantrópicos vivem; e c) doméstico: ocorre em habitações humanas e envolve triatomíneos que vivem dentro de casa, além de reservatórios domésticos (cão e gato).

1.3.1. Ciclo de vida

O ciclo de vida do *T. cruzi* (Figura 3) se inicia com o triatomíneo infectado alimentando-se de sangue do vertebrado e eliminando pelas fezes tripomastigotas metacíclicos próximos ao local da picada, os quais entram no hospedeiro através da ferida ou das mucosas. Então, inicia-se o ciclo de vida no hospedeiro com os tripomastigotas invadindo células, onde se diferenciam em amastigotas (forma intracelular), os quais se multiplicam por divisão binária e se diferenciam em tripomastigotas, esses são liberados na corrente sanguínea. Os tripomastigotas infectam células e se diferenciam em amastigotas em novos locais de infecção (ciclo infectante contínuo). Os tripomastigotas não se replicam na corrente sanguínea. O ciclo no barbeiro se inicia quando o mesmo pica um hospedeiro vertebrado infectado com tripomastigotas, os quais são ingeridos pelo triatomíneo e transformados em epimastigotas no intestino. Então, os parasitos se multiplicam e se diferenciam em tripomastigotas os quais passam por um processo de metaciclogênese modificando-se em tripomastigotas metacíclicos, a forma infectante (CDC, 2015), habitando a porção posterior do intestino (ampola retal) sendo eliminados nas fezes.

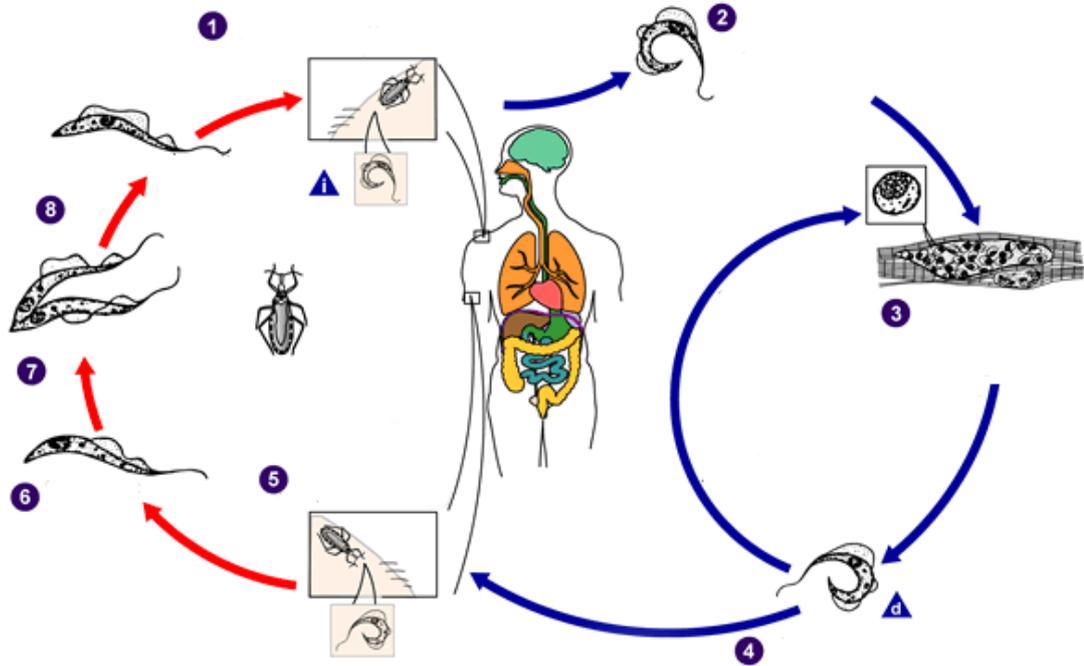


Figura 3: Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*. i: estágio infectante; d: fase de diagnóstico. As fases 2, 3 e 4 representam o ciclo no hospedeiro vertebrado e as fases 1, 5, 6, 7 e 8 o ciclo no triatomíneo (Fonte: Modificado de CDC, Atlanta).

1.3.2. Linhagens de *T. cruzi*

A diversidade biológica e bioquímica das cepas de *T. cruzi* tem sido reconhecida, juntamente com a sua complexidade eco epidemiológica. Ao longo dos anos, diversos estudos têm caracterizado a estrutura populacional de *T. cruzi*, visando definir o número de subgrupos relevantes, os quais receberam diversas nomenclaturas, por exemplo: zimodemas, biodemas, linhagens, clados, unidades discretas de tipificação (DTUs) e haplótipos (ZINGALES et al., 2009).

A diversidade genética foi amplamente demonstrada por diversos grupos de pesquisa, utilizando diferentes estratégias biológicas, bioquímicas e moleculares, visando diferentes marcadores genéticos. Os DTUs são definidos como os conjuntos que são identificáveis por meio de marcadores genéticos comuns, moleculares ou imunológicos (TIBAYRENC, 1998).

As populações de *T. cruzi* foram classificadas em 3 Zimodemas: Z1, Z2 e Z3 em razão dos perfis isoenzimáticos, o que levou à subdivisão em até 43 DTUs (TIBAYRENC, 1998). No entanto, em 2009, as cepas de *T. cruzi* foram designadas

apenas em seis DTUs, como TcI, TcII, TcIII, TcIV, TcV e TcVI (ZINGALES et al., 2009).

Os DTUs são distribuídos geograficamente da seguinte forma (Figura 4): TcI é o principal agente da doença de Chagas ao norte da Amazônia. TcII, TcV e TcVI são os principais agentes da doença na região do Cone Sul. Até agora, TcIII e TcIV infectam, esporadicamente, os seres humanos. TcIV tem genótipos divergentes na América do Sul e América do Norte.

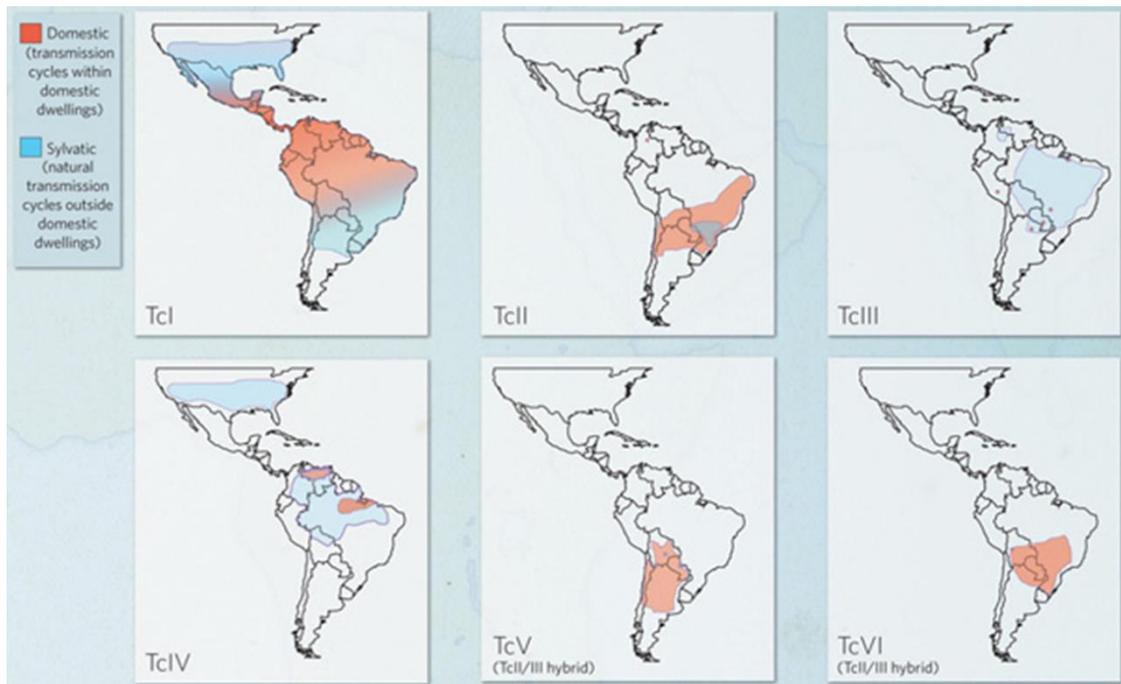


Figura 4: Distribuição geográfica dos DTUs. (Fonte: Who, how, what and where?, Box 1: *Trypanosoma cruzi* strains, Revista Nature).

A variação genética da região não transcrita do gene espaçador mini-exon foi anteriormente proposta para discriminar TcI, TcII e TcIV. Além disso, entre os genes de manutenção, a isomerase de glicose-6-fosfato (GPI), um gene nuclear de cópia única, apresentou um polimorfismo de sequência que é valioso para a caracterização de DTUs (BRENIÈRE et al., 2012).

O grupo TcI pode estar associado com ciclos silvestre e doméstico. A infecção humana com TcI está concentrada no norte da América do Sul e Central e está associado com cardiomiopatia chagásica (ZINGALES et al., 2012). De acordo com o estudo de Brenière et al. (2012), TcI é prevalente em diferentes ciclos silvestres e

responsável pela maioria das infecções humanas na Bacia Amazônica e nos países ao norte. Esse grupo está associado a marsupiais e triatomíneos silvestres. Além disso, alguns estudos tem mostrado que TcI apresenta marcante variabilidade genética nas Américas, podendo ser diferenciado em TcIa a TcIe (CURA et al, 2010).

Os grupos TcII, V e VI estão principalmente associados aos ciclos domésticos e prevalentes em infecções humanas nos países do Cone Sul (BRENIÉRE et al. 2012). O grupo TcII é encontrado predominantemente nas regiões sul e central da América do Sul e está associado a manifestações cardíacas e podem desenvolver megaesôfago e megacólon concomitantemente. Pode estar associado principalmente com ciclo doméstico. Os grupos TcV e TcVI estão associados ao sul e centro da América do Sul e são genótipos híbridos, cujos antepassados são do TcII e TcIII (ZINGALES et al., 2012).

Finalmente, os grupos TcIII e IV são mais raramente amostrados em toda a área endêmica e parecem estar mais relacionados aos ciclos silvestres, com poucos relatos de infecção humana (BRENIÉRE et al., 2012). TcIII é geralmente associado com o ciclo silvestre no Brasil e países adjacentes, sendo as infecções humanas documentadas raras. É também isolado, ocasionalmente, de cães domésticos. O grupo TcIV ocorre com mais frequência em seres humanos. Cinco novos isolados de TcIV de primatas e oito de *Rhodnius brethesi* na bacia amazônica foram recuperados, confirmando que TcIV pode ter um ecótopo arbóreo (ZINGALES et al., 2012).

No Brasil, a detecção de *T. cruzi* em triatomíneos tem sido realizada pelos serviços de saúde por meio da microscopia óptica (MO), observando as formas flageladas em amostras fecais (SILVEIRA e DIAS, 2011). Além disso, também é possível diferenciar morfologicamente epimastigotas de *T. cruzi* e *T. rangeli* em amostras de fezes de triatomíneos coradas com Giemsa (CUBA-CUBA, 1998). Entretanto, alguns estudos têm mostrado baixa sensibilidade da microscopia óptica para detecção de *T. cruzi* e outros tripanossomatídeos em triatomíneos (SCHIJMAN et al., 2006; PIZARRO et al., 2007). Outros métodos, como a Reação de Polimerase em Cadeia (PCR) tem sido usado para a detecção de tripanossomatídeos em triatomíneos, a qual amplifica sequências específicas dos parasitos, sendo considerada uma técnica mais sensível. Com a inovação tecnológica, surgiu uma

técnica mais rápida e precisa, apresentando capacidade de gerar resultados quantitativos, a chamada PCR em tempo real (qPCR).

2. JUSTIFICATIVA

A caracterização molecular dos parasitos isolados de triatomíneos permite conhecimento das inter-relações entre ciclos silvestres e domésticos e a distribuição das diferentes linhagens de *T. cruzi* no Distrito Federal. Em ambos os ciclos, as relações entre *T. cruzi* e os triatomíneos são multifatoriais e bastante complexas. O protozoário *T. cruzi* não é uma espécie homogênea, ou seja, é composta por uma diversidade de subgrupos com diferentes propriedades clínicas e biológicas que podem resultar em uma variedade de tropismos e infecções mistas nos humanos, reservatórios e triatomíneos. Dessa forma, a correta e específica identificação de infecções mistas em isolados de *T. cruzi*, procedentes de populações silvestres e domiciliadas de triatomíneos poderá contribuir na separação dos diferentes grupos de *T. cruzi*, assim como determinar padrões de infecções, conforme as diferentes procedências dos triatomíneos analisados. Por fim, os resultados obtidos fornecerão informações fundamentais a respeito das diferentes linhagens de *T. cruzi* que são importantes para as diferentes formas clínicas nos humanos. O conhecimento da circulação desses subgrupos de *T. cruzi* é de extrema importância para o manejo clínico e tratamento desse grande contingente populacional, tendo em vista a existência dos diferentes tipos de tropismos em humanos já relatados na literatura.

3. OBJETIVOS

Analisar a ocorrência de *T. cruzi* em triatomíneos coletados no Distrito Federal (DF) – Brasil, no período de 2012 a 2014.

3.1. Objetivos específicos

- Determinar a taxa de infecção natural nas espécies capturadas no DF;
- Caracterizar molecularmente os diferentes grupos de *T. cruzi* (DTUs) que circulam em triatomíneos no DF;
- Detectar os DTUs em adultos e ninfas de triatomíneos, conforme os ciclos de transmissão.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Área de estudo

O Distrito Federal está localizado na região Centro-Oeste, ocupando o centro do Brasil e o centro-leste do Estado de Goiás em uma das áreas mais elevadas da região, o Planalto Central. Encontra-se em um patamar elevado (1000m acima do nível do mar) e é marcado por um planalto de topografias suaves.

O principal bioma do DF é o cerrado e sua vegetação apresenta algumas características peculiares: é marcada por pequenos arbustos, árvores com troncos retorcidos, raízes profundas, cascas grossas e folhas recobertas de pelugem. Mas, ainda é possível diferenciar algumas variações conhecidas como cerradões, campos limpos, campos sujos e matas secas. Além disso, fitofisionomias úmidas como matas de galeria, veredas e campos úmidos compõem o mosaico de paisagens encontradas no Distrito Federal (RIBEIRO e WALTER, 1998).

O clima predominante é conhecido como Tropical de Altitude, mas existem autores que afirmam que também pode ser definido como Tropical Semiúmido, com verão úmido e chuvoso e inverno seco e frio. A precipitação média anual é de 1.545 milímetros, com uma estação seca (precipitação <100 mm) de maio a setembro e uma estação chuvosa de outubro a abril, e as temperaturas médias anuais variam 20 a 21°C.

A hidrografia é composta pelos rios Descoberto, Maranhão, Paranoá, Preto, São Bartolomeu e Sobradinho. No entanto, o rio Paranoá foi represado para a construção do Lago Paranoá, com cerca de 40 quilômetros quadrados de extensão, com o objetivo de aumentar a quantidade de água disponível.

O DF consiste em um território autônomo, dividido em 31 Regiões Administrativas (RAs) (Figura 5).

parasitológico específico (CUBA-CUBA, 1998). O fluxo do material estudado está representado no organograma a seguir, conforme mostra a figura 6:

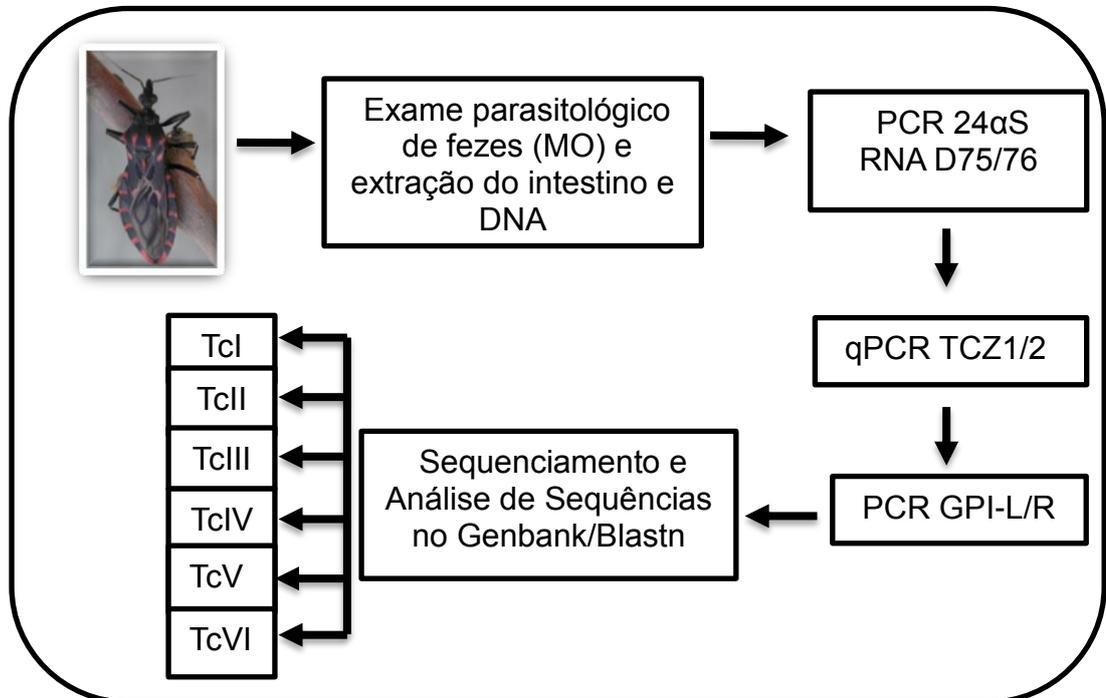


Figura 6: Organograma dos métodos utilizados para detecção de tripanossomatídeos em triatomíneos coletados no Distrito Federal.

4.4. Extração de DNA

O DNA foi extraído de amostras de intestino de todos triatomíneos, os quais foram armazenados em eppendorf de 1,5mL com 1,0mL da solução de 1x PBS. Para a extração de DNA de amostras foi utilizado o protocolo *Tissue&cells genomic Prep Mini Spin* do Kit da *GE Healthcare*, seguindo todas as instruções do fabricante.

4.5. PCR

Após a extração de DNA, foi realizado o método de PCR *touch-down*, utilizando os *primers* específicos para a amplificação de DNA 24sα ribossomal (rDNA), sendo eles: D75 – GCAGATCTTGGTTGGCGTAG (posição 01-20) e D76 – GGTCTCTGTTGCCCTTTT (posição 279-298), amplificando em torno de 250pb (SCHIJMAN et al.,2006). Esses iniciadores são capazes de discriminar vários tipos

de tripanossomatídeos que ocorrem em triatomíneos, como *Blastocrithidia*, *T. cruzi* e *T. rangeli*.

O protocolo inicia-se com a desnaturação inicial de 3 minutos a 94°C seguido de quatro rodadas com 3 ciclos cada uma, compostas por 1 minuto de desnaturação a 94°C, 1 min de anelamento em 60, 58, 56 e 54°C da primeira a quarta rodada e mais 1 minuto de extensão a 72°C, completando as quatro rodadas. A quinta rodada consiste em 35 ciclos de 1 minuto de desnaturação a 94°C, 1 minuto de anelamento a 52°C e 1 minuto de extensão a 72°C. A rodada final é de extensão por 10 minutos a 72°C e terminam os ciclos da PCR permanecendo por 4°C. A reação de amplificação foi realizada com um volume final de 25µL das seguintes condições padronizadas: 1x de tampão, 1,5µM de MgCl₂, 0,2µM de dNTPs, 2µM *primers* D75 e D76, 1,5U Taq Polimerase, 5µL de DNA (20ng de DNA) e água MiliQ. Os produtos desta primeira PCR foram colocados em gel de agarose 2,0% com brometo de etídeo e em seguida, visualizados por meio de um transluminador de ultravioleta (UV).

A análise molecular, qPCR, foi realizada com os *primers* TCZ1 (5'-CGAGCTCTTGCCACACGGGTGCT-3') e TCZ2 (5'-CCTCCAAGCAGCGGATAGTTCAGG-3') (MOSER et al., 1989), pois amplificam uma região microssatélite de DNA em 188pb. A reação foi realizada num volume de 20µL, com 10µL da mistura de *Sybr*[®] *Green*, 0,4µL de cada *primers* e 2µL da amostra de DNA (2 ng/µL). As amostras foram amplificadas num termociclador ABI Prism 7500 (*Applied Biosystems*) com as seguintes condições: 50°C durante 10 minutos, 95°C durante 10 minutos e 40 ciclos a 95°C durante 15 segundos, 57°C durante 1 min e 72 ° C durante 30 segundos. Os resultados foram analisados com o Gene Amp 7500 *Sequence Detector System*[®] *Software* (*Applied Biosystems*) mostrando fluorescência *versus* número de ciclos.

Para a identificação das linhagens de *T. cruzi* foi realizada uma PCR com base em 652pb do fragmento de cópia única de gene nuclear de glucose-6-fosfato-isomerase (GPI) (BRENIÈRE et al., 2012). A PCR foi realizada utilizando os seguintes *primers*: GPI-L - 5'-CGCCATGTTGT-GAATATTGG-3' (na posição 591 do gene) e GPI-R - 5'-TTCCATTGCTTTCATGTCA-3' (na posição 1246). O ciclo de amplificação segue com as condições: 94°C durante 3 min; 94°C durante 1 min, 58°C durante 1 min, 72°C durante 1 min (35 ciclos); 74°C durante 5 min e terminam os ciclos permanecendo por 4°C. A reação da amplificação foi realizada num volume

final de 25µL, contendo 1x de tampão, 1,5µM MgCl₂, 0,2µM dNTP's, 2µM µM de *primers*, 1,5UTaq Polimerase Platinum, 3µL de DNA (20ng de DNA) e água MiliQ. Os produtos desta PCR foram colocados em gel de agarose 1,0% com brometo de etídeo e em seguida, visualizados por meio de um transluminador de UV. Em seguida, as amostras foram re-amplificadas nas mesmas condições descritas acima, utilizando os iniciadores GPI-L e GPI-R para o sequenciamento.

Os controles positivos usados nas reações de PCR foram obtidos a partir de culturas de *T. cruzi* (cepa Berenice) e água destilada e uma amostra negativa foi utilizada para os controles negativos de triatomíneos provenientes de colônias de *Dipetalogaster maxima* do Núcleo de Medicina Tropical, na Universidade de Brasília.

4.6. Sequenciamento

Os produtos da reamplificação da PCR foram eluídos do gel de agarose e purificados por meio do protocolo do *Kit GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit GE Healthcare*, e posteriormente, enviados para o sequenciamento na Universidade de São Paulo (USP) para identificação das linhagens genéticas de *T. cruzi*. As sequências obtidas foram editadas usando o software *Genious* e comparadas com o banco de dados depositado no GenBank, usando o algoritmo BLASTn/NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

5. RESULTADOS

No total, foram coletados e analisados 260 triatomíneos, sendo 238 *Panstrongylus megistus* e 22 *Triatoma pseudomaculata* (Figura 7), capturados nos anos de 2012 a 2014, nas nove RAs do DF.



Figura 7: Espécies de triatomíneos detectadas durante a pesquisa no Distrito Federal: *Panstrongylus megistus* (A) e *Triatoma pseudomaculata* (B).

No geral, dos 260 triatomíneos coletados, 156 eram adultos, sendo 97 fêmeas e 59 machos, e o restante foi composto por 101 ninfas de estágios I-V. Dentre os 238 triatomíneos da espécie *P. megistus*, 47 foram capturados no intradomicílio, 190 no peridomicílio e 1 sem identificação do local de captura. Essa espécie foi encontrada nas RAs do Paranoá, Park Way, Gama, Planaltina, Águas Claras, Vicente Pires, Taguatinga, Lago Norte e Asa Sul. A maioria foi na RA do Paranoá com 173 triatomíneos capturados. Os 22 triatomíneos da espécie *T. pseudomaculata*, 21 foram capturados no intradomicílio e apenas 1 sem identificação do local de captura. Essa espécie foi encontrada nas RAs do Paranoá e Planaltina, sendo esta última com 19 triatomíneos capturados (Tabela 1).

Tabela 1: Distribuição de *Panstrongylus megistus* e *Triatoma pseudomaculata* conforme estágio de desenvolvimento, ecótopos e estado de conservação, no período de 2012 a 2014, no Distrito Federal, Brasil.

Espécie	Adultos		Ninfas					SI*	Intradomicílio	Peridomicílio	SI*	Vivo	Morto
	Machos	Fêmeas	I	II	III	IV	V						
<i>P. megistus</i> (n=238)	53	94	-	3	10	22	53	3	47	190	1	58	179
<i>T. pseudomaculata</i> (n=22)	6	3	-	-	6	-	7	-	21	-	1	-	21
TOTAL	156				101				68	190	2	58	200

*SI = Sem Identificação

Por meio da microscopia óptica pode-se observar 32 espécimes de *P. megistus* positivos para flagelados morfologicamente similares a *T. cruzi*, resultando em uma taxa de infecção de 13,4%. Todos os insetos *T. pseudomaculata* estavam negativos para tripanossomatídeos (Figura 8 e Tabela 2).

A partir da PCR D75/D76 observou-se 87 espécimes de *P. megistus* positivos para *T. cruzi* com taxa de infecção de 36,5%, os quais foram confirmados pela PCR em tempo real. Para *T. pseudomaculata*, a PCR revelou 5 triatomíneos positivos para *T. cruzi*, com taxa de infecção de 22%, e esses também foram confirmados pela qPCR (Figura 9 e Tabela 2).

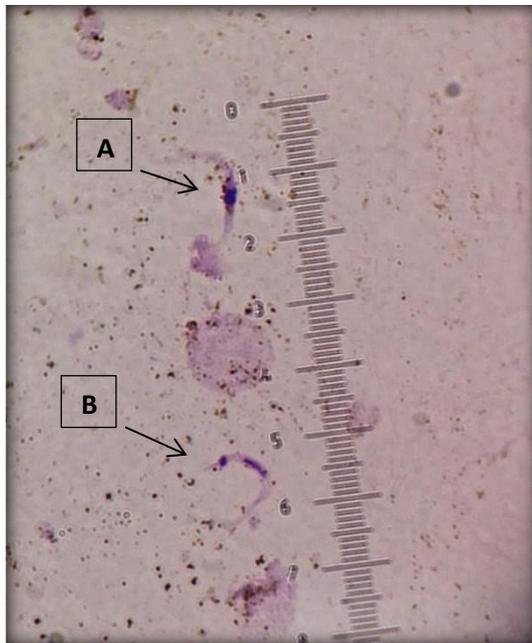


Figura 8: Amostras positivas para *Trypanosoma cruzi* de microscopia óptica com aumento de 1000X e corado com Giemsa. A: forma epimastigota e B: forma tripomastigota.

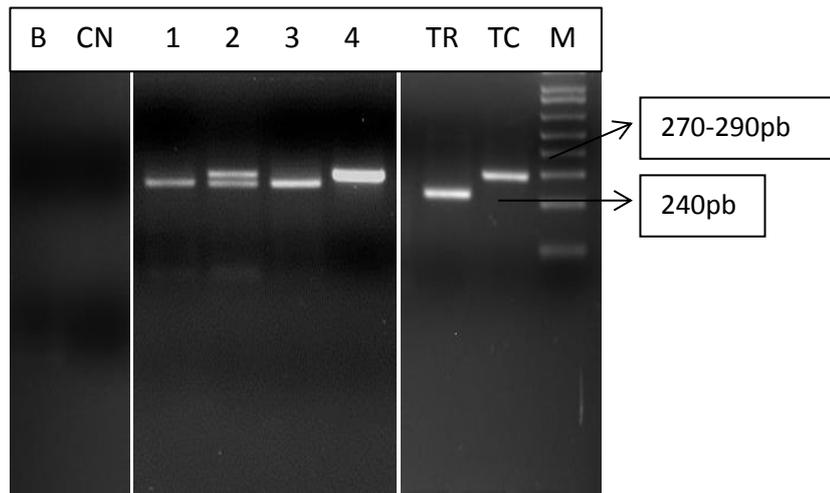


Figura 9: Amostras confirmadas por meio de PCR usando os *primers* D75/D76, específico para tripanossomatídeos. M: marcador molecular; B: branco; CN: controle negativo; 1 e 3 amostras positivas de *Blastocrithidia sp.* (~250pb); 2 amostra mista para *Trypanosoma cruzi* e *Blastocrithidia sp.*; 4 amostra positiva de *Trypanosoma cruzi*; TR: *Trypanosoma rangeli*; TC: Cultura de *Trypanosoma cruzi* da cepa Berenice.

Tabela 2: Comparação da taxa de infecção natural segundo microscopia óptica e PCR nas espécies *Panstrongylus megistus* e *Triatoma pseudomaculata*, capturadas no Distrito Federal entre 2012 e 2014.

Métodos de Diagnóstico	<i>P. megistus</i> (n= 238)		<i>T. pseudomaculata</i> (n= 22)	
	Positivos	Taxa de infecção (%)	Positivos	Taxa de infecção (%)
MO	32	13,4	0	-
PCR	87	36,5	5	22%

Do total de 92 triatomíneos positivos para *T. cruzi* na PCR utilizando D75/76, uma amostra de cada unidade domiciliar foi selecionada para a realização da PCR usando os *primers* GPI-L e GPI-R, específica para linhagens de *T. cruzi* (Figura 10). Dentre as oito amostras positivas nesta PCR, duas amostras apresentaram 99-100% de identidade com sequência de TcI e seis amostras com sequência de TcII disponíveis no GenBank (Tabela 3).

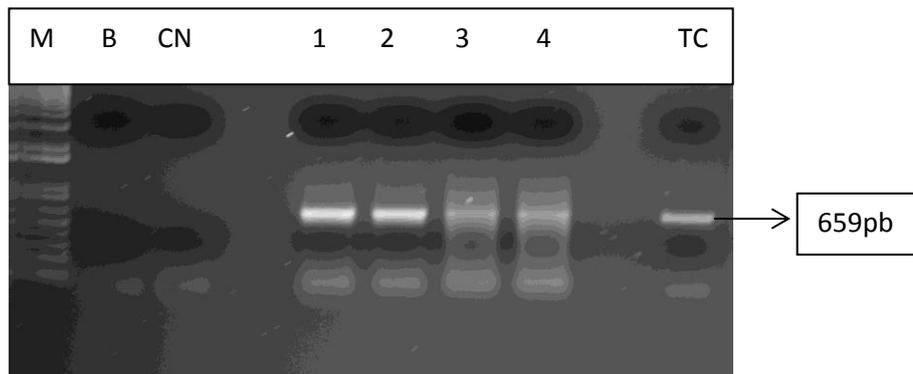


Figura 10: Amostras confirmadas por meio de PCR usando os *primers* GPI-L e GPI-R, específico para linhagens de *Trypanosoma cruzi*. M: marcador molecular; B: branco; CN: controle negativo; 1 a 4 amostras positivas de *Trypanosoma cruzi*; TC: Cultura de *Trypanosoma cruzi* da cepa Berenice.

Tabela 3: Linhagens de *Trypanosoma cruzi* detectadas em *Panstrongylus megistus* e *Triatoma pseudomaculata* usando os *primers* GPI-L e GPI-R.

Número	Espécie	Local	¹ Blastn	Número de acesso	Identidade
199/13	<i>P. megistus</i>	Paranoá	TcII (Tu18cl2)	gb AY484477.1	619/622 (99%)
369/12	<i>P. megistus</i>	Asa Sul	TcII (Tu18cl2)	gb AY484477.1	625/627(99%)
377/11	<i>T. pseudomaculata</i>	Planaltina	TcII (Tu18cl2)	gb AY484477.1	593/595(99%)
169	<i>P. megistus</i>	Park Way	TcII (Tu18cl2)	gb AY484477.1	625/625(100%)
173	<i>T. pseudomaculata</i>	Planaltina	TcII (Tu18cl2)	gb AY484477.1	626/626(100%)
Sa1	<i>P. megistus</i>	Vicente Pires	TcII (Tu18cl2)	gb AY484477.1	629/629(100%)
75	<i>P. megistus</i>	Park Way	Tcl (OPS21cl11)	gb AY484472.1	626/626(100%)
375/12	<i>P. megistus</i>	Águas Claras	Tcl (OPS21cl11)	gb AY484472.1	626/626(100%)

1: Basic Local Alignment Search Tool.

Um dos espécimes infectados por Tcl foi capturado em apartamento no 12º andar da RA Águas Claras e o outro em um galinheiro na RA Park Way. Os espécimes infectados por TcII foram capturados em galinheiro (RA Paranoá) e no interior de casas nas RAs Asa Sul, Vicente Pires e Planaltina, neste último caso os espécimes eram ninfas.

6. DISCUSSÃO

As linhagens genéticas identificadas nas amostras positivas foram TcI, previamente registrada em mamíferos silvestres no DF (GURGEL-GONÇALVES et al., 2004) e TcII que foi registrado pela primeira vez na região. A linhagem TcI está associada com ciclos silvestres e domésticos, sendo responsável pela maioria das infecções humanas ao norte da América do Sul (ZINGALES et al., 2012). Geralmente, ocorrendo em marsupiais e triatomíneos silvestres (BRENIÈRE et al., 2012). TcI já foi registrado no marsupial *Didelphis albiventris* nas matas de galeria do DF (GURGEL-GONÇALVES et al., 2004). A detecção dessa linhagem em *P. megistus* sugere que a mesma é mantida em ciclos enzoóticos. O grupo TcII está associado, principalmente, ao ciclo doméstico e prevalente em infecções humanas (BRENIÈRE et al., 2012), sendo encontrado nas regiões sul e central da América do Sul. Neste estudo, foi registrado a linhagem genética de TcII em ninfa de estágio V de *T. pseudomaculata* capturada no intradomicílio na RA Planaltina, sugerindo ciclos de transmissão domésticos e potencial risco de infecção humana.

A espécie *P. megistus* mostrou uma taxa de infecção natural de 13,4% e 36,5% por meio da microscopia óptica e PCR, respectivamente. Essa espécie foi a mais capturada no DF no período analisado (2012-2014), corroborando com os resultados obtidos por MAEDA et al. (2012) que analisou a ocorrência dessa espécie entre 2002 e 2010.

As taxas de infecção natural de *P. megistus* por *T. cruzi* no presente trabalho foram similares ou maiores que as descritas na literatura (DIAS et al., 2000; VILLELA et al., 2009; MAEDA et al., 2012). Espécimes de *P. megistus* vivem em ocos de árvores onde geralmente se alimentam de marsupiais do gênero *Didelphis* (CARCAVALLO et al., 1998). No DF, a espécie *D. albiventris* é muito frequente e estudos anteriores mostraram altas taxas de infecção desses marsupiais por *T. cruzi* em matas de galeria (GURGEL-GONÇALVES et al., 2004), o que poderia explicar as altas taxas de infecção de *P. megistus*.

O presente estudo ainda mostrou frequente invasão de adultos de *P. megistus* em casas e a presença de colônias no peridomicílio, ilustrando importante comportamento sinantrópico e diferentes graus de adaptação ao ambiente doméstico. No Rio Grande do Sul ocorre principalmente em ecótopos silvestres (BEDIN et al., 2009) ao contrário das regiões sudeste e nordeste, onde colônias de

P. megistus são frequentemente encontradas no intradomicílio e peridomicílio (DIAS et al., 2000; VILLELA et al., 2009). Na região Centro-Oeste, particularmente no estado de Goiás, *P. megistus* é menos frequente que *T. sordida* e *R. neglectus* (PEREIRA et al., 2013) o que difere da situação encontrada no DF. Provavelmente a presença das matas de galeria próximas às habitações humanas, cenário frequente no DF, possa influenciar uma maior ocorrência dessa espécie neste distrito, particularmente nas RAs do Paranoá e Park Way, onde a maioria dos espécimes foram capturadas.

A presença de *T. pseudomaculata* em unidades domiciliares também era esperada considerando que essa foi a terceira espécie mais capturada entre 2002 e 2010 no DF (MAEDA et al., 2012). Esses autores detectaram uma colônia dessa espécie dentro de uma casa em Planaltina, indicando seu potencial de domiciliação. Apesar de *T. pseudomaculata* ser mais frequente no peridomicílio, a colonização em domicílios tem sido observada sugerindo a adaptação dessa espécie neste ambiente (ASSIS et al., 2009).

Outro aspecto foi a detecção da infecção natural de *T. pseudomaculata* por *T. cruzi* pela primeira vez no DF, com taxa de 22% por meio da técnica de PCR. Interessante ressaltar que esse resultado foi obtido somente quando os métodos moleculares foram aplicados. Esse resultado é relevante considerando que alguns espécimes infectados foram detectados no interior das casas ilustrando o potencial de transmissão de *T. cruzi* para os moradores da localidade.

De acordo com o estudo de Schijman (2006), a infecção por tripanossomatídeos em triatomíneos é detectada tradicionalmente por meio da microscopia óptica. Entretanto, a eficácia desse método depende de vários fatores como: i) condição do inseto examinado, sendo improvável o encontro de flagelados em insetos mortos e secos, ii) qualidade das colorações das lâminas com amostras de fezes, iii) experiência do examinador na diferenciação entre *T. cruzi*, *T. rangeli* e outros tripanossomatídeos (CUBA-CUBA, 1998; SCHIJMAN et al., 2006). Portanto, a PCR seria um método promissor para detectar a infecção dos triatomíneos por tripanossomatídeos.

A PCR que utiliza os *primers* D75 e D76 amplifica DNA 24S α ribossomal (rDNA). Esses iniciadores podem ser utilizados em uma única PCR e discriminar vários tipos de tripanossomatídeos que ocorrem em triatomíneos, como *T. cruzi* e *T. rangeli*. Portanto, tais técnicas servem para diferenciar eficientemente

tripanossomatídeos em amostras de fezes de triatomíneos. Notou-se que o número de positivos aumentou, demonstrando que a análise molecular é uma ferramenta útil e promissora, o que está de acordo com o trabalho de Schijman et al. (2006). Nossos resultados indicaram que a técnica de microscopia óptica atualmente utilizada para realização da pesquisa de *T. cruzi* necessita ser aprimorada por meio da dissecação do intestino com posterior maceração e pesquisa de *T. cruzi* em triatomíneos.

As amostras positivas para *T. cruzi* foram confirmadas por meio da PCR em tempo real (CURA et al., 2015) utilizando os *primers* TCZ1 e TCZ2, que amplificam uma região microssatélite de DNA. Esses iniciadores são específicos para *T. cruzi*, dessa forma foram utilizados na qPCR para confirmarem se as amostras estavam verdadeiramente positivas.

A GPI é uma enzima importante envolvida na glicólise e sequências do gene GPI são específicas para cada DTU (BROUTIN et al., 2006). As amostras foram enviadas para o sequenciamento e apresentaram 99-100% de identidade com sequências de TcI e TcII. Essas amostras foram selecionadas de cada unidade domiciliar, portanto, sugere-se que os demais triatomíneos que circulavam na mesma unidade domiciliar sejam da mesma linhagem de *T. cruzi* identificada.

O estudo apresentou algumas limitações, tais como: i) recebimento de amostras de triatomíneos mortos, danificados e sem identificação correta e precisa na sua procedência; ii) a PCR é sujeita de contaminação e pode exigir grande número de reações; iii) os *primers* GPI-L/GPI-R não amplificaram algumas amostras e outras não funcionaram quando enviadas para o sequenciamento.

Recomenda-se para futuras pesquisas a utilização da PCR multiplex em tempo real utilizando TaqMan (MTQ-PCR), a qual identifica os seis DTUs em uma ou duas reações de amplificação com sensibilidade adequada para analisar amostras biológicas distintas. Essa análise molecular reduz a contaminação e é passível de quantificação e automação (CURA et al., 2015). Também recomenda-se manter uma vigilância continuada com participação comunitária, a fim de monitorar a colonização e/ou invasão de triatomíneos no ambiente doméstico, e conseqüentemente, prevenindo novos casos de transmissão da doença de Chagas no DF.

7. CONCLUSÕES

- *P. megistus* foi a espécie com maior taxa de infecção por *T. cruzi* no DF, quando comparado a *T. pseudomaculata*.

- Na espécie *T. pseudomaculata* foi identificada a linhagem genética TcII, enquanto que em *P. megistus* foram caracterizadas TcI e TcII, sendo esta última registrada pela primeira vez no DF.

- A detecção de TcII em ninfa coletada no intradomicílio indica ciclos de transmissão domésticos, evidenciando o risco de infecção humana.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASSIS, G.F.M. et al. Entomological surveillance of Chagas disease in Berilo municipality, Jequitinhonha Valley, State of Minas Gerais, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 42, n. 6, p. 615-621, 2009.

BEDIN, C. et al. Vigilância ambiental: Doença de Chagas no Rio Grande do Sul. **Boletim Epidemiológico**, v. 11, n. 3, p.1-8, 2009.

BRENIÈRE, S.F. et al. Genetic Characterization of *Trypanosoma cruzi* DTUs in Wild *Triatoma infestans* from Bolivia: Predominance of TcI. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 5, 2012.

BROUTIN, H. et al. Phylogenetic analysis of the glucose-6-phosphate isomerase gene in *Trypanosoma cruzi*. **Experimental Parasitology**, v. 113, n. 1, p. 1-7, 2006.

CAMARGO, M.E. et al. Serological survey of the prevalence of Chagas infection in Brazil, 1975/1980. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 26, n. 4, p.192-204, 1984.

Parasites - American Trypanosomiasis (also known as Chagas Disease). CDC – Centers for Disease Control and Prevention, 2015. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/parasites/chagas/biology.html>>. Acesso em: 24 de maio de 2015.

CARCAVALLO, R.U. et al. Habitats and related fauna. In: Carcavallo RU, Galíndez Girón I, Jurberg J, Lent H, editors. **Atlas of Chagas Disease Vectors in Americas**, v. II, p. 561-600, ed. Fiocruz, Rio de Janeiro, 1998.

COURA, J.R.; VIÑAS, P.A. Chagas disease: a New Worldwide Challenge. **Nature**, v. 465, p. S6-S7, 2010.

CUBA-CUBA, C.A. Revisión de los aspectos biológicos y diagnósticos del *Trypanosoma* (Herpetosoma) *rangeli*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 31, p. 207-220, 1998.

CURA, C.I. et al. *Trypanosoma cruzi* I genotypes in different geographical regions and transmission cycles based on a microsatellite motif of the intergenic spacer of spliced-leader genes. **International Journal for Parasitology**, v. 40, n. 14, p. 1599-1607, 2010.

CURA, C.I. et al. Multiplex Real-Time PCR Assay Using TaqMan Probes for the Identification of *Trypanosoma cruzi* DTUs in Biological and Clinical Samples. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 5, 2015.

DIAS, J.C.P. et al. Esboço geral e perspectivas da doença de Chagas no Nordeste do Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 16, p. S13-S34, 2000.

DIAS, J.C.P.; NETO, V.A.; LUNA, E.J.A. Mecanismos alternativos de transmissão do *Trypanosoma cruzi* no Brasil e sugestões para sua prevenção. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, n. 3, p. 375 -379, 2011.

GALVÃO, C.; PAULA, A.S. Sistemática e evolução dos vetores. In: GALVÃO, C. **Vetores da doença de chagas no Brasil** [online]. Curitiba: Sociedade Brasileira de Zoologia, pp. 26-32, 2014. Zoologia: guias e manuais de identificação series.

GURGEL-GONÇALVES, R. et al. Enzootic transmission of *Trypanosoma cruzi* and *T. rangeli* in the Federal District of Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 46, n.6, p. 323-330, 2004.

GURGEL-GONÇALVES, R. et al. Geographic Distribution of Chagas Disease Vectors in Brazil Based on Ecological Niche Modeling. **Journal of Tropical Medicine**, v. 2012, 2012.

HERRERA, L. *Trypanosoma cruzi*, causal agent of Chagas disease: The borderline between wild and domestic cycles in Venezuela. **Frontiers in Public Health**, v. 2, 2014.

LENT, H.; WYGODZINSKY, P. Revision of the triatominae (Hemiptera, Reduviidae), and their significance as vectors of Chagas Disease. **Bulletin American Museum of Natural History**, v. 163, p. 520-529, 1979.

MAEDA, M.H.; KNOX, M.B.; GURGEL-GONÇALVES, R. Occurrence of synanthropic triatomines (Hemiptera: Reduviidae) in the Federal District of Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 45, n. 1, p. 71-76, 2012.

MARTINS-MELO, F.R. et al. Prevalence of Chagas disease in Brazil: a systematic review and meta-analysis. **Acta Tropica**, v. 130, p. 167-174, 2014.

MOSER, D.R. et al. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 27, n. 7, p. 1477-1482, 1989.

PEREIRA, J.M. et al. Climatic factors influencing triatomine occurrence in Central-West Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 108, p. 335-341, 2013.

PIZARRO, J.C.; LUCERO, D.E.; STEVENS, L. PCR reveals significantly higher rates of *Trypanosoma cruzi* infection than microscopy in the Chagas vector, *Triatoma infestans*: High rates found in Chuquisaca, Bolivia. **BMC Infectious Diseases**, v. 7, n. 66, p. 1-8, 2007.

RIBEIRO, J.F.; WALTER, B.M.T. Fitofisionomias do bioma Cerrado. **Cerrado Ambiente e Flora**, p. 89-166. Embrapa, Planaltina, Brasil, 1998.

SCHIJMAN, A.G. et al. Differential detection of *Blastocrithidia triatomae* and *Trypanosoma cruzi* by amplification of 24Salpha ribosomal RNA genes in faeces of sylvatic triatomine species from rural northwestern Argentina. **Acta Tropica**, v. 99, n. 1, p. 50-54, 2006.

SCHOFIELD, C.J.; JANNIN, J.; SALVATELLA, R. The future of Chagas disease control. **Trends in Parasitology**, v. 22, n. 12, p. 583-588, 2006.

SILVEIRA, A.C.; DIAS, J.C.P. O controle da transmissão vetorial. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, n. 52, p. 63, 2011.

SILVEIRA, A.C.; FEITOSA, V.R.; BORGES, R. Distribution of triatominae captured in a domestic environment, 1975/83, Brazil. **Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais**, v. 36, p. 15-312, 1984.

TIBAYRENC, M. Genetic epidemiology of parasitic protozoa and other infectious agents: the need for an integrated approach. **International Journal for Parasitology**, v. 28, n. 1, p. 85-104, 1998.

Trypanosoma cruzi. UFRGS – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Disponível em: <<http://www.ufrgs.br/parasite/siteantigo/Imagensatlas/Protozoa/Trypanosomacruz.htm>>. Acesso em: 30 de maio de 2015.

VILLELA, M.M. et al. Avaliação do Programa de Controle da Doença de Chagas em relação à presença de *Panstrongylus megistus* na região centro-oeste do Estado de Minas Gerais, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 25, p. 907-917, 2009.

VINHAES, M.C. et al. Assessing the vulnerability of Brazilian municipalities to the vectorial transmission of *Trypanosoma cruzi* using multi-criteria decision analysis. **Acta Tropica**, v. 137, p. 105-110, 2014.

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

ZINGALES, B. et al. The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: Rationale, epidemiological relevance and research applications. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 12, n. 2, p. 240-253, 2012.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION, "Control of Chagas disease," Tech. Rep. series 905, WHO, Geneva, Switzerland, Second report of the WHO Expert Committee, 2002.

Who, how, what and where?, Box 1: Trypanosoma cruzi strains. **Nature**, v. 465, p. S8-S9, 2010. Disponível em: <http://www.nature.com/nature/journal/v465/n7301_supp/pdf/nature09222.pdf>. Acesso em: 30 de maio de 2015.