PEDRO LUIZ SILVA PINTO

**CIRCULAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE
Trypanosoma cruzi ISOLADOS DE MAMÍFEROS
SILVESTRES CAPTURADOS NO ESTADO DE
SÃO PAULO – BRASIL.**

**Tese apresentada à Faculdade de Saúde Pública da Universidade de
São Paulo, Departamento de Epidemiologia, para obtenção do título de
Doutor em Saúde Pública.**

ORIENTADOR: Prof. Dr. José Maria Soares Barata

**São Paulo
2000**

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese, por processos fotocopiadores.

Assinatura:

Data:

40705 / 2003 (doc)

Dedico este trabalho:

à minha esposa Neuza

aos meus filhos Rafael e Daniel

à minha mãe Marlene

ao meu irmão Paulo

à memória de meu pai Alfredo

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. José Maria Soares Barata pela orientação e confiança em meu trabalho.

À Dra. Gentilda Kazuko Funayama Takeda, do Departamento de Ciências Biomédicas da USP, pelo incentivo e colaboração na caracterização biológica dos tripanossomos.

À Dra. Marta Maria Geraldês Teixeira, do Laboratório de Taxonomia de Tripanossomatídeos do Departamento de Parasitologia ICB-USP, por ter colocado à disposição, reagentes, equipamentos e funcionários para a realização da identificação e caracterização molecular dos tripanossomos.

À Marta Campaner, Carmem Silva Takata e Flávia Maia, do Laboratório de Taxonomia de Tripanossomatídeos do Departamento de Parasitologia ICB-USP, pela colaboração técnica na caracterização molecular.

À Dra. Teresinha Tizu Sato e Sueko Higa de Lima, do Laboratório de Acarologia do Departamento de Parasitologia ICB-USP, por terem disponibilizado o biotério de manutenção de roedores.

Ao Paulo Auricchio e aos membros da Seção de Mastozootologia do Museu de Zoologia USP pela colaboração na identificação de roedores.

À Dra. Júlia M. M. Souza Felipe e Dra. Márcia de Souza C. Melhem, da Diretoria de Divisão de Biologia Médica e do Serviço de Parasitologia do Instituto Adolfo Lutz - IAL, pelo apoio e incentivo constante.

À Elizabeth Visone Nunes, Carmem S. Guilherme, Oswaldo C. Oliveira Jr, Sansão Westphalen, do Laboratório de Criação de Triatomíneos da Seção de Parasitoses Sistêmicas do IAL, pela colaboração nos exames de xenodiagnóstico.

À Maria de Fátima L. Araújo, José E. Tolezano, Márcia da Conceição Bisugo e Elaine Aparecida Cunha, da Seção de Parasitoses Sistêmicas do IAL, pela colaboração no isolamento e manutenção dos tripanossomos em laboratório.

À Helena H. Higuchi, Rui Larosa e Carlos R. Elias, da Equipe de Campo da Seção de Parasitoses Sistêmicas do IAL, pela colaboração nas capturas dos animais silvestres.

Ao Luiz Eloy Pereira e Renato Pereira de Souza, da Equipe de Campo da Seção de Vírus Transmitidos por Artropodos do IAL, pela orientação na nomenclatura em uso de alguns roedores e nas capturas de animais silvestres da região de Iguape.

Ao João Luis M. Gil, João Maurício N. S. Filho e Bento Gregório de Jesus, do Laboratório de Triatomíneos do Departamento de Epidemiologia da Faculdade de Saúde Pública – USP – SESA Araraquara, pelo fornecimento de ninfas de triatomíneos e na colaboração nos trabalhos de captura de animais silvestres na região de Araraquara.

Ao Dr. João Aristeu da Rosa, do Departamento de Ciências Biológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas UNESP – Araraquara, pelo incentivo e apoio técnico nas coletas de sangue de animais silvestres capturados na região de Araraquara.

Ao Sidnei Stuchi, da Fundação Padre Albino - Catanduva, pela revisão do texto.

RESUMO

Pinto PLS. **Circulação e caracterização de *Trypanosoma cruzi* isolados de mamíferos silvestres capturados no Estado de São Paulo – Brasil.** São Paulo; 2000. [Tese de Doutorado – Faculdade de Saúde Pública da USP].

A circulação de *Trypanosoma cruzi* foi estudada em animais silvestres, capturados em duas regiões do Estado de São Paulo com características ecológicas e epidemiológicas distintas, tendo como parâmetro áreas com ou sem domiciliação de triatomíneos. As áreas estudadas compreenderam a região do Planalto Ocidental Paulista, município de Araraquara, antiga área endêmica e regiões do Vale do Ribeira e Litoral Norte, municípios de Eldorado, Iguape e Ilhabela, consideradas áreas indenes.

Dos 198 animais capturados, foram isoladas 16 amostras de tripanossomos de 11 hospedeiros mamíferos, sendo 1 *Didelphis albiventris*, 5 *D. marsupialis*, 2 *Proechimys iheringi* e 3 *Philander opossum*.

Das 16 amostras, 9 foram isoladas de xenocultura, 4 de hemocultura e 3 de cultura do aspirado de fígado e baço. Em um marsupial (*D. marsupialis*) foram isolados flagelados pelos três métodos, em outros marsupiais (1 *D. albiventris* e 2 *P. opossum*) os parasitas foram isolados por duas e em sete animais (5 marsupiais e 2 roedores) por um único procedimento.

Os critérios morfológicos permitiram classificar os 16 isolados como *T. cruzi*. Todas as amostras mostraram-se de baixa virulência para

ratos e camundongos. Foi possível através da utilização dessas 3 técnicas, selecionar diferentes populações de *T. cruzi* de um mesmo hospedeiro.

A amplificação do minicírculo de kDNA dos isolados, pela técnica de PCR, com os "primers" P35/36 confirmaram o diagnóstico de *T. cruzi*. A caracterização molecular dos isolados foi baseada na amplificação, pela técnica de PCR, de um segmento da região intergênica do gene de mini-exon, que define dois grupos genéticos maiores, *T. cruzi* I e *T. cruzi* II. Das 9 amostras isoladas de *Didelphis*, 7 foram classificadas como do tipo *T. cruzi* I e 2 como do tipo *T. cruzi* II. Estes achados confirmam a circulação preferencial da linhagem *T. cruzi* I em marsupiais do gênero *Didelphis*. Os isolados de *Proechimys* e *Philanders*, todos procedentes do município de Ilhabela, não puderam ser definidos pelo marcador molecular do gene de mini-exon.

A variabilidade dos isolados foi estudada pela técnica de RAPD. Os padrões dos isolados *T. cruzi* I foram distintos dos observados nos isolados *T. cruzi* II. Maiores similaridades foram observadas em isolados pertencentes à mesma espécie de animal reservatório e originário da mesma área geográfica. Estes dados sugerem uma maior homogeneidade das populações de *T. cruzi*, circulando em uma mesma área geográfica.

Descritores: Mamíferos silvestres. *Trypanosoma cruzi*. Caracterização biológica e molecular

SUMMARY

Pinto PLS. **Transmission and characterization of *Trypanosoma cruzi* isolates from sylvatic mammals captured in the state of São Paulo-Brazil.** São Paulo (BR); 2000. [Tese de Doutorado – Faculdade de Saúde Pública da USP].

The circulation of *Trypanosoma cruzi* among sylvatic animals was studied in two regions of São Paulo State. These regions have distinct ecological and epidemiological features based on human transmission in areas with and without the domestic presence of triatomines. The studied areas were: Planalto Ocidental Paulista region, county of Araraquara, an old endemic area and Vale do Ribeira and Litoral regions, counties of Eldorado, Iguape and Ilhabela, considered non-endemic areas.

Of the 198 animals examined at total, 16 isolates of trypanosomes were obtained from 11 mammals: 1 *Didelphis albiventris*, 5 *D. marsupialis*, 2 *Proechimys iheringe* and 3 *Philander opossum*.

Nine samples out of 16 isolated by xenoculture, 4 by hemoculture and 3 by culture of liver and spleen puncture. Using these 3 methodologies it was possible to select different populations of *T. cruzi* from the same host

Using morpho-biological criteria all 16 isolates were classified as *T. cruzi*. All of had low virulence to rats and mice.

The amplification of kDNA minicircle, by PCR, using P35/36 primers, also confirmed the identification of the isolates as *T. cruzi*.

The molecular characterization of isolates was based on the amplification, by PCR, of a mini-exon gene intergenic region segment, that defines two

major genetic groups: *T. cruzi* I and *T. cruzi* II. Out of 9 *Didelphis* isolates strains, 7 were classified as *T. cruzi* I and two as *T. cruzi* II. These findings confirm a preferential transmission of the group *T. cruzi* I in marsupials of the genus *Didelphis*. However, the isolates from *Proechimys* and *Philander* all of them coming from Ilhabela county, did not react with either of the molecular markers.

The variability of the isolates was studied by RAPD. By this method, the patterns of the isolates classified as *T. cruzi* I were distinct from those *T. cruzi* II. Great similarity was observed among isolates from the same host species and belonging to the same geographic area. These findings suggest the existence of *T. cruzi* populations more homogeneous features, circulating in same geographic area.

Descriptors: Sylvatic mammals. *Trypanosoma cruzi*. Biological and molecular characterizations

Abreviaturas

BHI	Brain Heart Infusion
°C	grau Celsius
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNA Polimerase	Enzima sintetizadora de uma nova fita de DNA
dNTP	Desoxirribonucleosídeos trifosfatos
EDTA	Ácido etileno diamino tetracético
kDNA	Ácido desoxirribonucleico de cinetoplasto
LIT	Liver Infusion Tryptose
M	Molar
mg	miligramas
ml	mililitros
mm	milímetros
mm ³	milímetros cúbicos
mM	milimolar
ng	nanogramas
nm	nanômetro
pb	pares de base
pH	potencial hidrogeniônico
PBS	Phosphate Buffered Solution
PCR	Polimerase Chain Reaction
RAPD	Random Amplification of Polymorphic DNA
RNAse	Ribonuclease
rRNA	Ácido ribonucleico ribossômico

Sarkosil	Lauril Sarcosinato de Sódio
SE	Tampão Tris Salino-EDTA
<i>Taq</i>	Enzima isolada de <i>Thermus aquaticus</i>
TE	Tampão Tris Clorídrico-EDTA
Tris	Hidroximetilaminometano
Tris-HCl	Tampão Tris Clorídrico
U	Unidade de enzima
μ m	micrometro
μ g	micrograma
μ l	microlitros
μ M	micromolar

ÍNDICE

I. INTRODUÇÃO.....	1
II. OBJETIVOS E JUSTIFICATIVA.....	21
III. MATERIAL E MÉTODOS.....	23
1. Escolha das áreas estudadas.....	23
1.1. Área endêmica.....	23
1.2. Área indene.....	24
2. Manutenção de colônia de triatomíneos em galinheiro experimental.....	26
3. Capturas de animais silvestres.....	27
3.1. Procedimentos específicos para a pesquisa de tripanossomos.....	29
3.1.1. Aplicação do xenodiagnóstico.....	29
3.1.2. Coleta das amostras sangüíneas.....	30
3.1.3. Coleta de vísceras.....	30
4. Isolamento de <i>T. cruzi</i> em animais silvestres.....	31
5. Caracterização biológica dos isolados.....	32
5.1. Comportamento da infecção em animais experimentais.....	32
5.2. Morfologia dos tripomastigotas sangüíneos.....	33
5.3. Pesquisa de amastigotas nos órgãos.....	34
5.4. Desenvolvimento dos flagelados em meio de cultura.....	34
5.5. Desenvolvimento dos flagelados nos vetores.....	34
6. Identificação e caracterização molecular.....	35
6.1. Extração do DNA total.....	35
6.2. “Polimerase Chain Reaction” – PCR.....	36
6.2.1. Identificação molecular pelo minicírculo de kDNA.....	36

6.2.2. Caracterização molecular.....	37
6.3. “Random Amplification of Polymorphic DNA” – RAPD.....	37
6.4. Construção de dendogramas baseados em fragmentos de DNA amplificados por RAPD.....	38
IV. RESULTADOS.....	40
1. Avaliação do potencial de domiciliação de triatomíneos.....	40
2. Capturas de animais silvestres.....	40
3. Pesquisa de flagelados nos animais silvestres.....	41
3.1. Isolamento de <i>T. cruzi</i> em animais silvestres.....	45
4. Caracterização biológica dos isolados.....	46
4.1. Comportamento da infecção em animais experimentais.....	46
4.2. Morfologia dos tripomastigotas sangüíneos.....	49
4.3. Pesquisa de amastigotas nos órgãos.....	50
4.4. Desenvolvimento dos flagelados em meio de cultura.....	52
4.5. Desenvolvimento dos flagelados nos vetores.....	54
5. Identificação e caracterização molecular.....	55
5.1. Identificação molecular pelo minicírculo de kDNA.....	55
5.2. Caracterização molecular.....	55
5.2.1. PCR de gene de mini-exon.....	55
5.2.2. Polimorfismo pelo RAPD.....	57
5.2.3. Análise do relacionamento genético através dos dendogramas.....	57
V. TABELAS E FIGURAS.....	60
VI. DISCUSSÃO.....	89
1. Situação epidemiológica da doença de Chagas.....	89
2. Avaliação do potencial de domiciliação de triatomíneos.....	90

3. Animais silvestres.....	92
4. Pesquisa de flagelados em animais silvestres.....	95
5. Infecção natural por <i>T. cruzi</i> em animais silvestres.....	98
6. Isolamento de <i>T. cruzi</i> em animais silvestres.....	103
7. Caracterização biológica dos isolados.....	104
8. Identificação molecular pelo minicírculo de kDNA.....	115
9. Caracterização molecular pelo gene de mini-exon.....	116
10. Polimorfismo genético entre tripanossomos isolados de animais silvestres.....	121
11. Considerações finais.....	122
VII. CONCLUSÕES.....	124
VIII. REFERÊNCIAS.....	127
ANEXOS	
Anexo 1. Meios de cultura.....	I
Anexo 2. Soluções.....	II

I. INTRODUÇÃO

O desenvolvimento tecnológico alcançado no final do século XX, inegavelmente, contribuiu para a melhoria da qualidade de vida de uma grande parcela da população mundial. Na área da Saúde, esse benefício pode ser avaliado pelo grau de desenvolvimento obtido no âmbito médico-assistencial e profilático de alguns agravos. De fato, a atual tecnologia contribuiu para a melhoria do diagnóstico clínico-laboratorial, colocando à disposição técnicas mais sensíveis e específicas. Com relação ao tratamento de algumas doenças, houve um progresso na qualidade terapêutica, no sentido de disponibilizar novas drogas com amplo espectro de ação, baixa toxicidade e com menores efeitos indesejáveis. Há que se destacar os avanços da biotecnologia na busca de meios alternativos no controle de doenças, como o desenvolvimento de vacinas com poder de proteção para as populações expostas.

Apesar de todos os avanços que a biotecnologia tem proporcionado, algumas doenças ainda figuram como questões relevantes para a Saúde Pública. É neste contexto que se insere a doença de Chagas ou tripanossomíase americana, parasitose determinada pelo *Trypanosoma cruzi*, protozoário que circula entre mamíferos e triatomíneos silvestres, em muitos focos naturais dispersos pelas Américas. Essa parasitose se apresenta sob forma endêmica em localidades onde ocorreu um processo adaptativo dos vetores, sobretudo, em moradias de áreas rurais e, com menor intensidade, em algumas de áreas urbanas (ACHA e SZYFRES, 1977). O processo vetorial é tido como principal mecanismo de veiculação

do flagelado e sua importância na transmissão da doença de Chagas está relacionada com a domiciliação dos triatomíneos. São apontados outros mecanismos de transmissão, ditos alternativos, destacando-se o transfusional, que passou a ganhar importância com o desenvolvimento urbano e conseqüente migração de indivíduos infectados da área rural para os grandes centros (DIAS, 1985; SCHMUNIS, 1991).

Este complexo relacionamento, envolvendo *T. cruzi*, o homem, o vetor e os animais reservatórios, faz da tripanossomíase americana uma das infecções parasitárias mais estudadas. É considerada enfermidade parasitária de maior impacto social na América Latina, apresentando elevada morbidade associada a diversas formas clínicas, expressivas taxas de mortalidade e de difícil controle (SILVEIRA e REZENDE, 1994; DIAS e SILVEIRA, 1996). Sua importância pode ser avaliada pela ampla literatura internacional e nacional produzida nas diferentes áreas do conhecimento, a partir da descrição do primeiro caso clínico, feita por Carlos Chagas, em 1909.

A patogênese da doença de Chagas e a variabilidade de formas clínicas não estão totalmente esclarecidas. Fatores ligados ao hospedeiro humano como: constituição genética, idade, resposta imunitária, estado nutricional, entre outros, poderiam estar associados direta ou indiretamente no processo (TAFURI, 1992). Por outro lado, fatores dependentes do parasita também poderiam estar correlacionados com os achados clínicos. A presença do parasita e seus antígenos associados às lesões cardíacas da doença de Chagas na fase crônica vêm reforçar essa hipótese (HIGUCHI et

alii, 1993). Tal fato é reforçado, ainda, pela existência de cepas de *T. cruzi*, isolados de casos humanos, que apresentam comportamentos biológicos distintos em animais de experimentação, algumas vezes com alta virulência e elevado grau de patogenicidade (BRENER, 1985).

A infecção humana é constituída por uma fase aguda, podendo ser assintomática, sintomática ou, em alguns casos, letal e uma fase crônica assintomática que, com o tempo, pode determinar o aparecimento de manifestações clínicas relacionadas com o comprometimento cardíaco, digestivo ou nervoso (PRATA, 1990). Formas com reativação da infecção e comprometimento de vários órgãos têm sido observadas em pacientes crônicos, quando submetidos à terapêutica imunossupressora ou associados a outras condições que levam à alteração da imunidade, como na infecção pelo HIV (KIRCHHOFF, 1993; SARTORI et alii, 1998).

As dificuldades encontradas no controle e prevenção da parasitose estão relacionadas às características dos vetores, dos reservatórios e do hospedeiro humano. Com relação aos triatomíneos, a grande diversidade de espécies e a capacidade de adaptação de algumas delas, em diferentes ambientes que não a domiciliar, representam limitações para o controle, uma vez que as medidas estão voltadas ao combate dos vetores domiciliados e, de maneira particular, para *Triatoma infestans* (SCHOFIELD e DIAS, 1991). Essas medidas têm sido efetivas, conseguindo-se conter a transmissão em algumas áreas da América Latina, incluindo o Brasil. No entanto, observa-se, nos últimos anos, em áreas submetidas à ação de inseticidas, colonização no ambiente doméstico e peridoméstico de espécies

ubiquistas como *T. sordida* e *Panstrongylus megistus* e de espécies antes tidas como exclusivamente silvestres, a exemplo de *Rhodnius neglectus*, *R. nasutus*, *T. vitticeps* e *T. rubrovaria*. A presença destas espécies de importância secundária, sobretudo no peridomicílio, tem levado à elaboração de novas estratégias para vigilância e controle, diferentes das utilizadas para espécies domiciliadas (SILVEIRA e REZENDE, 1994; DIAS, 1994; WANDERLEY, 1994).

Além disso, a existência de ampla variedade de mamíferos domésticos, sinantrópicos e silvestres, suscetíveis ao protozoário, fazem, destes animais, fontes permanentes de infecção e responsáveis pela circulação do *T. cruzi* nos diferentes ambientes (ROCHA e SILVA et alii, 1975; BARRETTO e RIBEIRO, 1979; WISNIVESKY-COLLI et alii, 1985).

A baixa eficácia das drogas para o tratamento etiológico na fase crônica e a inexistência de vacinas com potencial de imunização para as populações suscetíveis, também são fatores que dificultam o controle e a prevenção da doença (SILVEIRA e REZENDE, 1994). Outras formas de transmissão como a transfusional, por transplantes de órgãos, aleitamento materno, via congênita e contaminação acidental em laboratório são responsáveis pela transmissão da parasitose em áreas metropolitanas, requerendo aplicação de outras medidas de controle e prevenção (SHIKANAI et alii, 1990; DIAS, 1999). Vale ressaltar, ainda, que em áreas urbanas surgem outros fatores que podem agravar a evolução da doença de Chagas como o "stress" e a co-infecção pelo HIV (DIAS, 1999).

É evidente que a magnitude do problema foi maior no passado, mesmo assim, estima-se que a doença ocorra em 17 países da América Latina, com um contingente de 16 a 18 milhões de infectados e uma população exposta de aproximadamente 100 milhões de indivíduos (SCHOFIELD e DIAS, 1999). No Brasil, estes números também são expressivos. A infecção espalha-se por uma área de 3,5 milhões de quilômetros quadrados, abrangendo os Estados das regiões Nordeste, Centro-oeste, Sudeste e Sul do país (DIAS, 1987). Segundo dados da OMS, 1991 estima-se em cerca de 5 milhões de indivíduos infectados no Brasil.

Considerando as dimensões territoriais, as diversidades regionais, sob o ponto de vista das áreas geográficas, as características econômicas, sociais e culturais das populações expostas e dos recursos destinados aos programas de controle, a doença de Chagas assume importância variada nos diferentes Estados da federação. Tal fato pode ser evidenciado pela análise dos resultados do Primeiro Inquérito Sorológico Nacional e de outros inquéritos regionais mais recentes, onde as taxas de prevalência variam, consideravelmente, nas distintas unidades federadas, indicando a existência de significativas diferenças inter e intra-regionais (CAMARGO et alii, 1984; OLIVEIRA Jr., 1996; BORGES-PEREIRA et alii, 1996). Em recente estudo, envolvendo duas localidades do Nordeste, foram apontadas diferenças expressivas nas taxas de soro-prevalência de várias infecções, incluindo a de doença de Chagas, mostrando que fatores ecológicos específicos das regiões estudadas e a estabilidade populacional, sem a ocorrência de

significativa migração, podem condicionar tais variações (CERQUEIRA et alii, 1998).

Na região Norte, nos Estados que compõem a Amazônia brasileira, a doença de Chagas é tida como região indene, com ocorrência, até o momento, de 174 casos autóctones (VALENTE et alii, 1999). Os primeiros casos autoctones da região Amazônica foram descritos, no Estado do Pará, no final da década de 60 (SHAW et alii, 1969). Mais da metade dos casos registrados na Amazônia estão associados a microepidemias familiares, sem a presença de triatomíneos domiciliados, onde a transmissão por via oral parece ser a mais provável (VALENTE e VALENTE, 1996; VALENTE et alii, 1999).

Apesar das características peculiares que envolve a transmissão da doença de Chagas na Amazônia, alguns autores chamam a atenção para o risco de endemização da doença na região, devido à presença do ciclo enzoótico natural do *T. cruzi* e, da forma de ocupação do território, com intenso desmatamento, podendo acelerar, desta forma, o processo de domiciliação dos triatomíneos na região e a migração desordenada favorecer o deslocamento de indivíduos infectados originários das áreas endêmicas (FORATTINI, 1980a; BARATA et alii, 1988; VALENTE e VALENTE, 1996).

De maneira análoga à região Amazônica, consideram-se indenes as áreas correspondentes ao Sistema da Serra do Mar e litoral, formadas pela Floresta Perenifolia Higrófila Costeira e vegetação litorânea, respectivamente, que se estendem do sul do Estado de Santa Catarina até

o norte do Estado do Rio de Janeiro, abrangendo assim, as regiões Sul e Sudeste, respectivamente (FORATTINI, 1980a).

No Estado de São Paulo, o sistema de relevo acidentado e vegetação primária ainda preservada, é integrado por alguns municípios da Grande São Paulo e Vale do Ribeira, que, juntos com o litoral, formam parte da área indene do Estado (SILVA, 1980). Em algumas dessas áreas, já foram constatadas invasões de triatomíneos adultos nos domicílios e os poucos casos autóctones assinalados relacionam-se com atividades exercidas no ambiente silvestre, a exemplo dos casos descritos no Vale do Ribeira e litoral sul (FORATTINI et alii, 1980b; FORATTINI et alii, 1981; CIARAVOLO et alii, 1997).

Segundo FORATTINI (1980), é considerada, ainda como região não endêmica, a faixa territorial que percorre paralelamente o Sistema da Serra do Mar, formada a partir do Nordeste do Rio Grande do Sul, passando pelo Norte do Estado de São Paulo, na porção correspondente ao Vale do Paraíba, até o Sudeste do Estado da Bahia. Segundo o autor, trata-se de região de colonização antiga com domiciliação triatomínica esporádica, sendo que as razões para ausência ou baixa ocorrência da infecção humana não estão plenamente esclarecidas.

De forma particular no Estado de São Paulo e, sobretudo, na região do Planalto Ocidental Paulista, estudos entomológicos e sorológicos revelaram, no passado, altos índices de infestação domiciliar por *T. infestans* e taxa de infecção humana em torno de 10% (CORREA et alii, 1952; COUTINHO, 1962). Com o estabelecimento de um amplo programa

de controle químico, desencadeado pela Superintendência de Controle de Endemias (SUCEN), foi alcançada a erradicação da principal espécie domiciliada e interrupção da transmissão vetorial, mantendo-se atualmente as medidas de controle em fase de vigilância epidemiológica em todo Estado (WANDERLEY, 1991; WANDERLEY, 1994). Razões de natureza econômica e social também contribuíram para o atual estágio da parasitose em São Paulo. Assim, a expansão da atividade agro-industrial, ocupando extensas áreas e incorporando novas tecnologias de cultivo, alterou toda a estrutura agrária Paulista. As transformações ambientais produzidas pelo intenso desmatamento e a intensificação migratória das populações rurais para as áreas urbanas são reflexos deste processo (SILVA, 1980).

Em âmbito nacional, as medidas de controle vetorial e as alterações ambientais, tiveram impacto favorável no panorama atual da endemia, com a diminuição da densidade e das taxas de infecção natural dos triatomíneos domiciliares, reduzindo o risco da transmissão pelo vetor (SILVEIRA e REZENDE, 1994; DIAS e SILVEIRA, 1996).

Apesar da situação epidemiológica favorável, a erradicação do *T. cruzi* em áreas endêmicas dificilmente ocorrerá, devido à ampla distribuição dos focos naturais da infecção que, mesmo limitados a pequenos espaços, são responsáveis pela circulação do flagelado entre triatomíneos e mamíferos silvestres. Entre nós, uma análise pormenorizada da constituição dos focos naturais da tripanossomíase americana em regiões dos Estados de São Paulo e Minas Gerais mostrou grande variabilidade dos ecótopos, onde triatomíneos e mamíferos convivem (BARRETTO, 1967 b).

Os focos naturais são definidos como unidades ecológicas estáveis, onde existem biocenoses constituídas por mamíferos silvestres, parasitados por *T. cruzi*, que servem de fonte alimentar para triatomíneos silvestres e estes podem transmitir o flagelado a outros animais susceptíveis, sem a participação humana (BARRETTO, 1967b). Os focos naturais são estáveis, mas, quando alterados por fatores naturais ou pela interferência humana, podem ter os ecótopos destruídos, causando a eliminação, redução ou deslocamento da biocenose. Outra consequência considerada de grande importância epidemiológica é a possibilidade de ocorrer concentração de reservatórios e vetores silvestres em áreas de matas residuais com a potencialização dos focos naturais (BARRETTO, 1967a). Tais fatos podem explicar as diferenças observadas nas taxas de infecção natural por *T. cruzi* em animais silvestres e sinantrópicos de diferentes países do Continente Americano (KARSTEN et alii, 1992; WISNIVESKY-COLLI et alii, 1992; ZAVALA-VELÁZQUEZ et alii, 1996; HERRERA e URDANETA-MORALES, 1997) e de diversas regiões do Brasil (ROCHA e SILVA et alii, 1975; BARRETTO e RIBEIRO, 1979; FERNANDES et alii, 1999).

A infecção natural por *T. cruzi* tem sido assinalada em uma ampla variedade de animais silvestres, pertencentes às ordens Marsupialia, Rodentia, Edentata, Chiroptera, Carnivora, Lagomorfa, Artiodactyla e Primata. Contribuição importante, neste sentido, foi dada por BARRETTO e RIBEIRO (1979), que organizaram uma relação de reservatórios silvestres encontrados nos países Americanos, baseada em dados da literatura e de

observações resultantes da série de trabalhos denominada "Estudos sobre reservatórios e vetores silvestres do *Trypanosoma cruzi*". Muito embora, os autores admitissem a impossibilidade de relacionar todas as espécies com potencial de reservatório, devido à falta de critérios seguros na identificação dos flagelados, este compilado é um dos mais completos e abrangentes da área.

Contrapondo-se ao padrão da infecção humana, a evolução da infecção em animais reservatórios pode produzir parasitemias aparentes e de longa duração, como as observadas em marsupiais do Gênero *Didelphis* (FERNANDES et alii, 1991). De maneira particular, estes animais apresentam altos índices de infecção pelo *T. cruzi*, sem desenvolver, contudo, processos patogênicos gerais (FERNANDES et alii, 1989).

Infecções experimentais, em *Didelphis marsupialis* e *Lutreolina crassicaudata*, demonstraram que o flagelado pode ser encontrado no interior das glândulas anais, sob as formas epimastigotas e tripomastigotas metacíclicas (DEANE et alii, 1984; STEINDEL et alii, 1988a). Em animais naturalmente infectados, este comportamento tem sido assinalado com menor frequência e intensidade (STEINDEL et alii, 1988b; FERNANDES et alii, 1989). Esses achados podem ter grande importância epidemiológica, considerando que, em animais infectados, o conteúdo das glândulas anais são eliminadas na porção posterior do reto, onde já foram observadas formas tripomastigotas metacíclicas (DEANE e JANSEN, 1988). Estes dados sugerem que os marsupiais, em certas circunstâncias, possam servir de

fonte de infecção e transmitir o protozoário pela contaminação de alimentos (MARCONDES et alii, 1988).

Entre os reservatórios silvestres e domésticos, a contaminação por via oral, a partir da ingestão de insetos infectados ou pela predação de animais infectados, representa outra forma de transmissão (PESSÔA, 1958; RIBEIRO et alii, 1987; SCHWEIGMANN et alii, 1995).

Entre animais domésticos, o cão e o gato constituem os principais reservatórios (WISNIVESKY-COLLI et alii, 1985). A importância epidemiológica desses reservatórios entre nós foi bem avaliada por MOTT (1978), que demonstrou associação entre soropositividade em crianças e a presença de animais domésticos infectados por *T. cruzi* em seus domicílios.

Em nosso meio, em estudos anteriores envolvendo reservatórios do *T. cruzi*, procurava-se estudar características biológicas do parasita com o intuito de verificar e diagnosticar a infecção natural nas mais diferentes espécies animais. (DEANE, 1964; BARRETTO, 1965; MELLO, 1982). Pesquisas mais recentes procuram avaliar não só a circulação do protozoário entre os reservatórios, mas a inter-relação dos ciclos de transmissão silvestre e domiciliar, com a preocupação de identificar possíveis re-introduções do flagelado em áreas submetidas ao programa de controle (FERNANDES et alii, 1991; DIOTAIUTI et alii, 1995) ou a sua introdução no ambiente doméstico, em regiões tidas como indene (FERNANDES et alii, 1999). A busca de marcadores epidemiológicos, através de características bioquímicas e moleculares dos parasitas,

constituem ferramentas valiosas para estes propósitos (MILES et alii, 1977; MILES et alii, 1980; ZINGALES et alii, 1998; FERNANDES et alii, 1999).

O isolamento do flagelado tem sido possível pelo xenodiagnóstico, pelo cultivo de sangue, fragmentos e aspirados de vísceras ou conteúdo intestinal dos vetores, em meios acelulares, e pela inoculação intraperitoneal de sangue dos reservatórios ou de fezes de triatomíneos infectados por *T. cruzi* em animais de experimentação.

Uma das questões relevantes nos estudos de reservatórios é a identificação precisa dos flagelados encontrados nesses animais, uma vez que outras espécies de tripanossomos podem estar presentes. Já foram assinalados, no Brasil, espécies dos subgêneros *Herpetosoma*, *Megatrypanum* e *Trypanozoon* parasitando animais silvestres e domésticos (BARRETTO e RIBEIRO, 1981; DEANE e JANSEN, 1990; NUNES e OSHIRO, 1990).

No entanto, apenas *T. (Herpetosoma) rangeli* apresenta importância médica-epidemiológica, pois mesmo considerado não patogênico para o hospedeiro humano, essa espécie pode evoluir nos mesmos vetores e reservatórios que *T. cruzi*. Em algumas áreas da América Latina e Central, sua ocorrência pode sobrepor à da espécie patogênica. No Brasil, já foram reconhecidos alguns vetores desse flagelado como: *Rhodnius pictipes*, *R. robustus* e *R. domesticus*, assim como mamíferos naturalmente infectados pertencentes a diferentes ordens (CUBA CUBA, 1998). MILES et alii (1983) foram os primeiros a caracterizar *T. rangeli* isolados de animais silvestres, triatomíneos e flebotomíneos da região Amazônica. Posteriormente,

STEINDEL et alii (1991) isolaram e identificaram este flagelado em *Echimyus dasythrix*, roedor silvestre, capturado no Estado de Santa Catarina. Mais recentemente, foram descritos, na região norte do Estado do Amazonas, os primeiros casos humanos da infecção (COURA et alii, 1996).

T. rangeli e *T. cruzi* apresentam características morfológicas e biológicas distintas; no entanto, algumas vezes, podem ocorrer dúvidas na identificação. Dentre os critérios biológicos, o exame concomitante das fezes, hemolinfa e glândulas salivares de triatomíneos naturalmente infectados ou provenientes de xenodiagnóstico, representa um bom parâmetro para o diagnóstico de *T. rangeli* (MANSFIELD, 1977). Atualmente, critérios bioquímicos e moleculares são usados na caracterização e identificação das espécies em amostras isoladas de vetores, casos humanos e animais silvestres (SCHOTTELIUS e MULLER, 1984; FRASCH et alii, 1981; VALLEJO et alii, 1994; RECINOS et alii, 1994).

Para a identificação de amostras de *T. cruzi* isoladas de reservatórios animais, têm sido empregados critérios morfológicos e biológicos. Assim, a morfologia associada aos índices biométricos; o comportamento da infecção em animais de laboratório, com o estudo da parasitemia, do viscerotropismo e da mortalidade; as provas de imunidade cruzada realizadas em animais experimentalmente infectados e reinoculados com amostras virulentas de *T. cruzi* de origem humana; a evolução dos flagelados no intestino posterior de triatomíneos e o desenvolvimento dos parasitas em meios celulares e acelulares, constituem parâmetros que, ao serem analisados em conjunto, podem levar a um diagnóstico mais seguro (BARRETTO, 1965; BARRETTO

et alii, 1980). No entanto, como ressaltaram ROCHA e SILVA et alii (1975), o emprego integral destes parâmetros apresentam restrições de ordem operacional e de custo, principalmente quando envolvem a identificação de vários isolados. Desta forma, o desenvolvimento dos parasitas em animais suscetíveis como os camundongos e ratos jovens, com a constatação de estágios intracelulares, e o encontro de tripanossomos no tubo intestinal de triatomíneos provenientes de xenodiagnóstico poderiam representar critérios mínimos para a identificação.

Recentemente têm sido utilizados procedimentos moleculares com o propósito de identificar e classificar diferentes tripanossomos. Dentro deste amplo grupo de protozoários, uma das estruturas mais estudadas tem sido o cinetoplasto, representado por uma região rica em DNA contido em uma mitocôndria presente em todos os flagelados pertencentes à ordem **Kinetoplastida**, incluindo o *T. cruzi*. O kDNA representa cerca de 25% de todo DNA do flagelado. Estruturalmente, o kDNA é formado por uma rede de moléculas interligadas de conformação circular de dois tamanhos, designados de maxicírculos e minicírculos (SIMPSON, 1986). As moléculas de minicírculos de kDNA, entre as espécies de tripanossomos, são heterogêneas em relação à sequência de nucleotídeos, fazendo com que seja possível a distinção entre as espécies por meio da análise molecular deste componente. Por outro lado, tem sido demonstrada, dentro da mesma espécie, a existência de regiões heterogêneas, intercaladas a regiões altamente homogêneas quanto à sequência, ao arranjo e à posição dos nucleotídeos nas moléculas (RAY, 1989). Sendo assim, estas características

do kDNA, quando analisadas por diferentes metodologias moleculares, como o tratamento das moléculas com endonucleases de restrição, originando diferentes padrões eletroforéticos, denominados Esquizodemas (MOREL et alii, 1980; FRASCH et alii, 1981) ou por amplificação de segmentos específicos pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) (STURM et alii, 1989), constituem marcadores genotípicos aplicados em taxonomia e diagnóstico.

Para *T. cruzi*, a metodologia que emprega a amplificação de segmentos da molécula de kDNA pela técnica de PCR tem sido usada na detecção de parasitas em amostras sangüíneas de chagásicos crônicos (AVILA et alii, 1993; JUNQUEIRA et alii, 1996) e de animais experimentalmente infectados (KIRCHHOFF et alii, 1996), em fezes de triatomíneos (SHIKANAI-YASUDA et alii, 1996) e na análise de diferentes isolados de origem humana, de triatomíneos e de animais reservatórios (AVILA et alii, 1990).

Outra questão importante no estudo dos isolados de *T. cruzi* está relacionada com as variações intra-específicas. Há, na literatura, ampla evidência de que o flagelado não está representado por uma população homogênea, mas por sub-populações que poderiam parasitar hospedeiros humanos e não humanos (MILES, 1979). Essas sub-populações, isoladas de diferentes hospedeiros, apresentam grande heterogeneidade quanto às características biológicas, antigênicas, bioquímicas e genéticas (BRENER, 1985). Em vista dessa variabilidade, tem sido sugerido uma possível relação entre populações de parasitas e predomínio de manifestações clínicas

observadas em determinadas áreas geográficas (MILES et alii, 1981). No entanto, como já assinalado no início desta introdução, o mecanismo patogênico e a variabilidade de formas clínicas não estão totalmente esclarecidos.

Alguns dos critérios empregados para distinguir *T. cruzi* de outras espécies de tripanossomos são também utilizados para a caracterização de isolados de *T. cruzi*. Assim, os parâmetros biológicos são baseados, sobretudo, no desenvolvimento dos parasitas em animais de experimentação, no comportamento em meios de cultura celular e acelular e na sensibilidade a agentes quimioterápicos, quando se tratam de isolados de origem humana (BRENER, 1985). O comportamento da infecção em animais de laboratório leva em conta a análise morfológica das formas sangüíneas, com distinção das formas delgadas, intermediárias e largas; o viscerotropismo e a virulência expressa pelo período pré-patente, curva de parasitemia e índice de mortalidade. Esses parâmetros têm sido amplamente usados na caracterização de isolados e sub-populações do flagelado (MARQUES de ARAÚJO e CHIARI, 1988; CARNEIRO et alii, 1991; MAGALHÃES e ANDRADE, 1991; OLIVEIRA et alii, 1993).

As características bioquímicas e moleculares também têm revelado uma grande variabilidade entre *T. cruzi*. MILES et alii (1977; 1978; 1980) definiram três padrões isoenzimáticos, denominados de Zimodemas, que foram relacionados com os ciclos de transmissão. O padrão Zimodema 2 (Z2) encontrado nos isolados provenientes de chagásicos crônicos e animais domésticos são resultantes do ciclo de transmissão doméstica e os

Zimodemas 1 e 3 (Z1 e Z3) apresentados pelos isolados de triatomíneos, animais silvestres e de casos humanos na Amazônia, resultam do ciclo de transmissão silvestre.

Metodologias baseadas em marcadores genéticos têm demonstrado que a população de flagelados está dividida em sub-populações heterogêneas. As análises dos padrões eletroforéticos, resultantes da clivagem do kDNA por endonucleases de restrição, Esquizodemas, têm sido empregadas para diferenciação de isolados (MOREL et alii, 1980) e, até mesmo, de sub-populações (clones) desta espécie que diferem em suas características biológicas (BRENER, 1985).

Para estudos de variabilidade genética foi desenvolvida a técnica de "Random Amplification Polymorphic DNA (RAPD)", que consiste na amplificação de fragmentos de DNA pela técnica de PCR, utilizando-se pequenos oligonucleotídeos de seqüências aleatórias como "primers". A variabilidade entre isolados pode ser determinada pela comparação dos perfis de fragmentos amplificados. Com esta abordagem, tem sido possível constatar o polimorfismo genético entre espécies e sub-espécies de protozoários, incluindo *T. cruzi* (TIBAYRENC et alii, 1993). Várias investigações, usando esta metodologia, têm mostrado aspectos distintos da estrutura genômica de *T. cruzi*. Em estudos realizados com isolados originários do Brasil, Bolívia, Chile e Venezuela, os resultados do RAPD confirmaram a existência de uma estrutura populacional clonal, já revelada por outras metodologias (TIBAYRENC et alii, 1993). A comparação dos perfis de RAPD entre os isolados, pertencentes ao mesmo Zimodema,

apresenta uma grande concordância, mostrando que, cada grupo é constituído por parasitas geneticamente mais relacionados (STEINDEL et alii, 1993).

Atualmente, os genes ribossômicos, (rRNA) e de mini-exon (SLRNA), têm sido investigados e utilizados como marcadores genéticos para estudos de evolução e ou de variabilidade entre diferentes gêneros e espécies de protozoários da ordem **Kinetoplastida** (MASLOV et alii, 1996; STURM et alii, 1995; FERNANDES et alii, 1994). Os genes ribossômicos são estruturalmente formados por seqüências codificadoras constituídas pelas subunidades LSU (subunidade maior 24S α e 24S β) e SSU (subunidade menor 18S), flanqueadas por seqüências espaçadoras que se repetem mais de 100 vezes no genoma desses organismos. As diferenças no arranjo dessas regiões têm sido utilizadas nas identificações de tripanosomatídeos. As análises das seqüências ribossômicas por enzimas de restrições “riboprinting” têm mostrado uma variabilidade genética no grupo (NOYES et alii, 1997). CLARK e PUNG (1994) ao estudarem o polimorfismo na subunidade SSU do gene rRNA, classificaram os isolados de *T. cruzi* em três grupos distintos, denominados de Ribodemas I, II e III.

Os genes de mini-exon apresentam unidades transcritas e não transcritas, alinhadas e repetidas ao longo do gene. A região transcrita é formada por um exon com 39 nucleotídeos, que é conservado entre os tripanosomatídeos, e por um intron de 55 a 101 pares de bases (pb), que mostra alguma variabilidade no grupo. A região não transcrita (espaçadora) apresenta alto grau de variabilidade entre os organismos. Diferenças no

tamanho da unidade de repetição e na sequência deste gene, têm sido usadas como parâmetros nos estudos de variabilidade entre as diferentes espécies de flagelados pertencentes à ordem **Kinetoplastida** (STURM et alii, 1995; FERNANDES et alii, 1994). Estudos comparativos entre as sequências da região não transcrita do gene de mini-exon de *T. cruzi*, isolado de casos humanos, triatomíneos e animais silvestres, mostraram uma baixa similaridade entre os isolados (SOUTO et alii, 1996).

A caracterização de isolados de *T. cruzi*, pela técnica de PCR, de sequências ribossômicas tais como a região promotora rRNA, subunidade 24S α e de sequências do gene do mini-exon, permitiu dividir os diferentes isolados em dois grandes grupos (NUNES et alii, 1997; SOUTO et alii, 1996). A análise pelo RAPD demonstrou que os dois grupos apresentaram uma correspondência entre duas linhagens de alta divergência filogenética, denominadas de Linhagem 1 e 2 (SOUTO et alii, 1996). Foi demonstrada uma associação da Linhagem 1 com o ciclo de transmissão doméstico e da Linhagem 2 com o ciclo de transmissão silvestre (FERNANDES et alii, 1998a; ZINGALES et alii, 1998).

O dimorfismo genético encontrado nos isolados de *T. cruzi* tem ampla relação com os Zimodemas Z1 e Z2 descritos por MILES et alii (1977; 1980) e com os Ribodemas propostos por CLARK e PUNG (1994). Assim, SOUTO et alii, 1996 verificaram uma concordância entre amostras classificadas como Zimodema Z2 e Linhagem 1 e de Zimodema 1 com a Linhagem 2. Da mesma maneira, uma correspondência entre Ribodema II / III com a Linhagem 2 e Ribodema I com Linhagem 1, também foram observadas

(CLARK e PUNG, 1994). Atualmente, na tentativa de unificar as designações entre as duas Linhagens foi proposto o uso de *T. cruzi* I, quando os isolados forem equivalentes ao Zimodema Z1 (MILES et alii, 1977; 1978), Linhagem 2 (SOUTO et alii, 1996) e Ribodema II / III (CLARK e PUNG, 1994) e *T. cruzi* II, quando os isolados forem equivalente ao Zimodema Z2, Linhagem 1 e Ribodema I. (MOMEN, 1999).

Em investigação recente, FERNANDES et alii (1999) descreveram, em área não endêmica de domínio da Mata Tropical Atlântica Costeira, a ocorrência das duas populações infectando animais silvestres. Os autores encontraram, também, uma relação direta entre *T. cruzi* I (nova designação) infectando *Didelphis marsupialis* e *T. cruzi* II (nova designação) infectando **Primates**, concluindo que as espécies de reservatórios poderiam atuar como filtros biológicos na seleção de um determinado genótipo do parasita. Estes dados são de grande importância epidemiológica mostrando a complexidade do ciclo silvestre, no sentido de uma co-existência das duas populações, circulando em distintos reservatórios, no mesmo ambiente. Fica patente a possibilidade do estabelecimento do ciclo doméstico, em área não endêmica ou em regiões onde a transmissão domiciliar já foi interrompida, às custas da introdução de reservatórios silvestres infectados com *T. cruzi* II e a presença de espécies de triatomíneos com hábitos ubiquistas. Diante do exposto, torna-se necessário empreender novos estudos, referentes aos isolados de *T. cruzi* em animais silvestres de outras regiões, que possam trazer subsídios para melhor entendimento destas questões.

II. OBJETIVOS E JUSTIFICATIVA

Este trabalho teve por objetivo geral estudar a circulação do *T. cruzi* e possíveis linhagens, em animais reservatórios capturados em duas regiões do Estado de São Paulo, que apresentam características ecológicas e epidemiológicas distintas para a transmissão humana. A primeira situada no Planalto Ocidental Atlântico, correspondente à antiga área endêmica do Estado, cuja principal característica era a presença de *T. infestans* domiciliado e que, atualmente, ainda conserva características de domiciliação por espécies secundárias como: *P. megistus* e *T. sordida*, revelada pela técnica de galinheiro experimental. A segunda região, compreendendo o Vale do Ribeira e Litoral Norte, sem a ocorrência de domiciliação pelas espécies citadas e, portanto, consideradas áreas indenes.

Como objetivos específicos, foram isolados e mantidos em laboratório os tripanossomos, para: a) criação de banco de cepas de diferentes regiões do Estado de São Paulo; b) identificação e caracterização biológica desses tripanossomos por meio dos parâmetros morfológicos, desenvolvimento em meio de cultura acelular, evolução em animais de experimentação e em vetores; c) identificação dos isolados por metodologias moleculares, como a técnica de PCR empregada nas análises de kDNA, para; d) caracterizar a(s) linhagem(s) de *T. cruzi* que circulam nas áreas estudadas, usando, como marcador genético, seqüências do gene de mini-exon amplificadas pela técnica de PCR; e e) estudar a variabilidade dos isolados de *T. cruzi* pela técnica de RAPD.

Com estas abordagens, pretende-se estudar a circulação do *T. cruzi* em animais silvestres, identificando os reservatórios de maior potencialidade nas áreas trabalhadas e possibilitando uma comparação com os dados já existentes em outras regiões do país. O conhecimento da variabilidade genética e do comportamento dos isolados de *T. cruzi* nos hospedeiros vertebrados poderá gerar subsídios para classificação de cepas quanto ao grau de virulência e patogenicidade. O conjunto das variações intra-específicas dos isolados obtidos com as análises morfológicas, biológicas e moleculares poderão ser usados como marcadores epidemiológicos

Pretende-se também estabelecer metodologias mais adequadas na caracterização fenotípica e genotípica de *T. cruzi* isolados de animais silvestres, que possam servir de apoio a programas de vigilância em laboratórios de Saúde Pública.

Finalmente, espera-se obter um instrumento que possa avaliar o potencial de risco, quando da introdução ou deslocamento de populações humanas e de animais reservatórios em áreas silvestres, onde haja condições ecológicas propícias para a manutenção da zoonose.

III. MATERIAL E MÉTODOS

1. Escolha das áreas estudadas:

As áreas de estudo foram selecionadas conforme o critério de divisão de “área endêmica” e “área indene” da doença de Chagas, definido por SILVA (1980). Assim, área endêmica refere-se às localidades onde foi registrada a domiciliação do *T. infestans* infectado por *T. cruzi*, e área indene, aquelas localidades onde não foi constatada a domiciliação do triatomíneo. Na Figura 1, está representada a delimitação da área endêmica em relação às quatro divisões morfo-estruturais do Estado de São Paulo.

Os trabalhos de captura de animais reservatórios foram realizados no Estado de São Paulo, nos municípios de Araraquara (região do Planalto Ocidental Paulista), Eldorado (região do Vale do Ribeira), Iguape (região do Vale do Ribeira), e Ilhabela (região do Litoral Norte). As localizações dos 4 municípios Paulistas estão assinaladas na Figura 2.

1.1. Área endêmica:

A área endêmica ocupa quase totalmente o Planalto Ocidental Paulista, toda a área que compreende a Depressão Periférica Paulista e parte do Planalto Cristalino Atlântico (Figura 1).

A micro-região homogênea de Araraquara situa-se nos limites oriental do Planalto e está contida nesta área. O município de Araraquara localiza-se no centro da referida micro-região (Figura 2), caracterizando-se por apresentar profundas alterações ambientais em função da intensa

atividade agrícola do tipo extensiva, com o predomínio da cultura da cana de açúcar e da laranja. A região apresentava cobertura vegetal original composta pela Floresta Subcaducifolia Tropical, persistindo atualmente algumas “ilhas florestadas” e áreas de cerrado. Do ponto de vista epidemiológico, há constatação de triatomíneos com hábitos domiciliares, revelados por galinheiro experimental instalado na área. As capturas de animais silvestres foram realizadas na reserva de mata da Fazenda São Lourenço e Sítio Carandá, onde, nesse último, já estava instalado o galinheiro experimental.

1.2. Área indene:

A área indene é constituída pela porção extremo ocidental do Planalto Paulista e pela parte oriental do Estado, correspondente às micro-regiões homogêneas do Vale do Ribeira, Baixada Santista e Litoral Norte, que formam, o litoral Paulista (Figura 2).

A região do Vale do Ribeira é composta pela Bacia Hidrográfica do Rio Ribeira de Iguape e inclui 16 municípios. A região é considerada de baixo desenvolvimento sócio-econômico devido, principalmente, à topografia acidentada e às condições climáticas que inviabilizam algumas práticas agrícolas, mas que favorecem as culturas da banana, arroz e chá. Grande parte dos municípios mantém áreas com vegetação natural intacta ou pouco alterada com cobertura do tipo Floresta Tropical Latifoliada. Do ponto de vista epidemiológico, não há registro de domiciliação de *T. infestans* no Vale do Ribeira. No entanto, já foi constatada a invasão de triatomíneos

adultos em domicílios (WANDERLEY,1994b). A circulação do parasita é reconhecida no meio silvestre e a transmissão humana já ocorreu de maneira casual, na ausência de triatomíneos domiciliados (FORATTINI et alii, 1980b; FORATTINI et alii, 1981). O município da Estância Turística de Eldorado, antiga Eldorado Paulista apesar de compor a micro-região homogênea do Vale do Ribeira, não guarda relações com o litoral, devido a sua posição ocidental; já o município de Iguape está localizado na porção oriental litorânea do Vale do Ribeira.

O município de Ilhabela, representa a delimitação entre o litoral norte e sul. Este município é composto por dezenas de ilhas, ilhotas e lajes com área total que corresponde a 336Km². Acima dos 500-600 metros de altitude, encontra-se densa vegetação de Mata Atlântica. A população concentra-se na faixa próxima ao mar, sendo que a atividade econômica básica está voltada para o turismo. Apresenta características epidemiológicas parecidas com a região descrita anteriormente, mas com isolamento geográfico.

As capturas de animais reservatórios foram realizadas em áreas florestadas dos municípios de Eldorado, Iguape e de Ilhabela. Em Eldorado, os trabalhos foram realizados em matas da periferia da cidade e em área de sítio no Bairro Cordas, distante 40 Km do centro urbano. Em Iguape as capturas foram feitas nas áreas de matas do “Centro Estadual de Educação Tecnológica Paula Souza” e nas localidades de Porto do Ribeira e Pedra Grande (Estrada do Icapara). Na Ilhabela, o estudo foi realizado nas localidades de Água Branca, Feiticeira, Reino, Cocaia e Buraco Fundo.

Essas capturas também estavam vinculadas ao projeto “Ecoepidemiologia da Leishmaniose Tegumentar Americana no Brasil, Estados de São Paulo e de Pernambuco. Áreas endêmicas de colonização antiga correspondentes à primária zona de cobertura da mata atlântica”.

2. Manutenção de colônia de triatomíneos em galinheiro experimental:

O galinheiro experimental vem sendo mantido pelo Laboratório de Criação de Triatomíneos, do Departamento de Epidemiologia, da Faculdade de Saúde Pública-USP, com o propósito de estudar a domiciliação e dinâmica populacional de triatomíneos no município de Araraquara, região do Planalto Ocidental Paulista. Foi instalado em uma área de mata residual localizada no Sítio Carandá, a 12 km do perímetro urbano desse município. As estruturas foram instaladas na área em meados de 1979 e, desde então, vêm sendo realizadas revisões trimestrais. O galinheiro experimental é formado por três paredes e teto de sapé de 1X1m, que internamente é revestido de tijolos de barro sobrepostos na altura de 0,5m. Esta unidade está contida em um quadrado de 3X3m totalmente telado, onde são mantidas 3 aves (um galo e duas galinhas), que servem como fontes de alimentação.

Nas revisões, a instalação interna é desmontada, com o propósito de pesquisar a presença de adultos e ninfas vivas ou mortas, exúvias e ovos férteis e inférteis. Todos os elementos são contados e os adultos e ninfas vivas são identificados nas partes laterais do dorso, por meio de tinta colorida. A cada revisão são trocadas as cores de marcação. Após a revisão,

as instalações são montadas e os adultos , ninfas e ovos férteis são devolvidos. Uma amostragem de cerca de 30% do total de adultos e ninfas vivas capturadas são separados aleatoriamente para a pesquisa de tripanossomos nas fezes. No presente estudo, os dados relativos ao galinheiro experimental tiveram maior importância na demonstração do comportamento de domiciliação dos triatomíneos da região.

3. Capturas de animais silvestres:

Foram efetuadas capturas de animais de diferentes ordens (Marsupialia, Rodentia e Carnívora) em ambientes florestais internos ou na sua margem, por meio de armadilhas tipo “Tomahawk” modificada e do tipo “Sherman” para roedores. Para as primeiras foram utilizadas como iscas laranja, banana, abacaxi, milho ou mandioca, com pelo menos três tipos de iscas por armadilha, já na segunda foi usada pasta de amendoim (tipo Amendocream). As armadilhas eram montadas no final de tarde e examinadas na manhã do dia seguinte. O acondicionamento dos animais capturados era feito na própria armadilha até o momento da manipulação.

Para cada região foram realizadas capturas bimestrais com duração de uma semana e por um período de dois anos. As capturas foram feitas pela Equipe de Campo da Seção de Parasitoses Sistêmicas do Instituto Adolfo Lutz-Central e/ou pela Equipe de Campo do Laboratório de Criação de Triatomíneos do Departamento de Epidemiologia, da Faculdade de Saúde Pública-USP, localizado em Araraquara. As capturas, manejo e transporte dos animais silvestres foram efetuados dentro dos limites

impostos pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) que concedeu autorização especial à Seção de Parasitoses Sistêmicas do Instituto Adolfo Lutz.

Os animais foram registrados e receberam uma inscrição composta pela letra inicial do município em que foram capturados, seguido de numeração seqüencial para cada região, como especificado abaixo:

Municípios	Numeração Seqüencial
A = Araraquara	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, ...
E = Eldorado	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, ...
G = Iguape	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, ...
I = Ilhabela	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, ...

Os animais capturados no município de Araraquara foram encaminhados ao Laboratório de Criação de Triatomíneos do Departamento de Epidemiologia, Faculdade de Saúde Pública-USP, onde foram submetidos aos procedimentos para pesquisa de tripanossomos. Após os exames, foram devolvidos à área de origem. Os animais capturados nos municípios de Eldorado, Iguape e Ilhabela foram remetidos à Seção de Parasitoses Sistêmicas do Instituto Adolfo Lutz-Central, onde foram sacrificados para a pesquisa de infecção natural de *Leishmania* e *Trypanosoma*. Em casos de mamíferos, sobretudo de roedores, que necessitaram de identificação mais segura, as carcaças foram fixadas em álcool 70% e encaminhadas à Seção de Mastozoologia do Museu de Zoologia-USP.

A contenção dos animais foi realizada mediante procedimentos físicos e/ou químicos. Para animais de pequeno porte, a contenção foi feita na própria gaiola ou em tela metálica de arame galvanizado. Para animais de

médio porte foi por meio de jaula com parede gradeada móvel. A contenção química foi realizada após a física, tendo como objetivo induzir o animal a um estado de imobilidade suficiente para a realização dos procedimentos pertinentes. As drogas usadas foram: Éter etílico, Cloridrato de Tiletamina (Zoletil), Cloridrato de Cetamina (Ketalar) e o Cloridrato de Xilazina (Rompum). A primeira, aplicada por inalação e as demais, por via intramuscular, isoladas ou em associação, variando a dose conforme a espécie animal e seu peso, seguindo especificações constantes nas respectivas bulas. Para o sacrifício, quando necessário, foram usadas as mesmas drogas como anestésicos profundos.

3.1. Procedimentos específicos para a pesquisa de tripanossomos:

3.1.1. Aplicação do Xenodiagnóstico:

Feita a imobilização do animal, foram colocadas caixas plásticas de 6,5x5,5 cm, contendo ninfas de II ou III estágio de desenvolvimento das espécies *Triatoma infestans*, *Panstrongylus megistus* e *Rhodnius neglectus*, em contato com a pele, na parte lateral do corpo ou na região abdominal, e presas por elásticos ou fitas de borrachas. O número de ninfas constantes em cada caixa e o número de caixas utilizadas dependeu do porte do animal. Assim, para roedores pequenos, uma caixa com 6 ninfas (2 exemplares de cada espécie), outros roedores ou marsupiais jovens, uma caixa com 9 ninfas (3 exemplares de cada espécie), e para marsupiais adultos ou carnívoros, duas caixas com 9 ninfas. O período de contato foi de 30 a 45 minutos. As ninfas foram examinadas trinta e sessenta dias após a

realização do xenodiagnóstico para a pesquisa de tripanossomos nas fezes, obtidas por compressão abdominal. As ninfas, para a realização dos xenodiagnósticos, foram fornecidas pelo Laboratório de Criação de Triatomíneos do Departamento de Epidemiologia da Faculdade de Saúde Pública-USP e pelo Laboratório de Triatomíneos do Instituto Adolfo Lutz.

3.1.2. Coleta das amostras sangüíneas:

Foram realizadas punções do plexo retro-orbital ou cardíaca em roedores; punções da veia lateral caudal ou cardíaca em marsupiais; punções da veia lateral caudal, ou da veia cefálica ou cardíaca, em carnívoros. As quantidades variaram de 0,5 a 3,0 ml, conforme o porte do animal. As amostras, assim obtidas, foram utilizadas para: **a)** semeadura em meio de cultura bifásico como: Ducrey como fase sólida e “Brain Heart Infusion” (BHI) como fase líquida ou Ducrey e “Liver Infusion Triptose” (LIT) como fase líquida, contendo 50µg/ml de gentamicina; **b)** exame direto a fresco; e **c)** confecção de esfregaços sangüíneos, corados pelo Giemsa.

Nota: As especificações dos meios de cultivo utilizados estão apresentadas no Anexo.

3.1.3. Coleta de vísceras:

Este procedimento foi realizado para animais capturados nos municípios de Eldorado, Iguape e Ilhabela que foram submetidos, simultaneamente, aos protocolos de isolamento de espécies de *Leishmania* e *Trypanosoma*. Assim, foram obtidos fragmentos de órgãos como:

coração, fígado e baço para pesquisa de amastigotas pela técnica de impressão de órgãos ("imprint") e pelo cultivo em meio bifásico do material resultante, após maceração ou aspiração das vísceras, por meio de agulha e seringa, contendo solução fisiológica estéril.

4. Isolamento de *T. cruzi* em animais silvestres:

Foram utilizados diferentes procedimentos para isolamento: **a)** Xenocultura (cultivo em meio bifásico do trato intestinal de ninfas infectadas provenientes do xenodiagnóstico), conforme técnica descrita por BISUGO et alii, 1998; **b)** hemocultivo em meio bifásico; e **c)** cultivo de fragmentos macerados ou conteúdo do aspirado de vísceras como descrito anteriormente. As culturas foram incubadas a 28 °C e examinadas semanalmente por trinta dias.

Os isolados, uma vez estabelecidos em cultivos, foram criopreservados. Às culturas ricas foi adicionada glicerina neutra estéril na concentração de 10% e acondicionadas em frascos apropriados para criopreservação e mantidas em geladeira por doze horas e transferidas para freezer a -70 °C. Depois do completo congelamento, foram armazenadas em nitrogênio líquido.

Para caracterização biológica e molecular, os isolados foram descongelados a 37 °C e os flagelados cultivados em meio LIT e mantidos em repiques semanais nas mesmas condições de incubação usadas no isolamento primário.

As amostras receberam os registros dos animais correspondentes, como já assinalado no item 3, acrescidas pelas siglas correspondentes ao nome não científico dos hospedeiros de origem e da técnica utilizada no isolamento. Abaixo estão assinaladas as especificações adotadas nos registros dos isolados.

Número do animal	Tipo de hospedeiro	Técnica de isolamento
A 1,2,3,4,5,6,7,8,9, ...	g = gambá	X = Xenocultura
E 1,2,3,4,5,6,7,8,9, ...	r = roedor	P = Hemocultura de Punção cardíaca
G 1,2,3,4,5,6,7,8,9, ...	c = cuíca	F/B = Cultura do material Das vísceras
I 1,2,3,4,5,6,7,8,9, ...		

5. Caracterização biológica dos isolados:

5.1. Comportamento da infecção em animais experimentais:

Tripomastigotas metacíclicos obtidos de meio LIT foram quantificadas em câmara de Neubauer e o inóculo acertado para 3×10^5 flagelados. Os parasitos assim obtidos foram inoculados por via intraperitoneal em quatro ratos Wistar e quatro camundongos BALB/ c, ambas espécies recém desmamadas. Dois animais de cada espécie foram imunodeprimidos, com o objetivo de facilitar o encontro dos flagelados na circulação sanguínea. Como imunodepressor, foi usada a ciclofosfamida (Genuxal-Astra 200mg), por via intraperitoneal, em duas dosagens, uma 24 horas antes da inoculação e outra no momento da aplicação do inóculo. As doses utilizadas foram de 2mg por camundongo e 3mg por rato.

O acompanhamento da infecção, tanto nos animais normais como nos imunodeprimidos, foi feito pelo exame direto de sangue da cauda de cada animal três vezes por semana. A partir da constatação de parasitemia patente, foram realizadas quantificações dos flagelados, conforme preconizado por BRENER, (1962). Estas observações se estenderam, no mínimo, 30 dias para camundongos e 45 dias para os ratos ou até a completa negativação. Foi considerado negativo, o animal que não apresentou parasitos em três exames consecutivos. Os animais, que persistiram com parasitemias negativas, durante o período de observação, foram submetidos aos exames de microhematócrito e/ou hemocultura, para detecção de parasitemias sub-patentes. Foram considerados, como parâmetros, o período pré-patente da infecção, os níveis máximos de parasitemia, a duração da fase aguda (período patente) e a mortalidade.

5.2. Morfologia dos tripomastigotas sangüíneos:

Uma vez estabelecidos os padrões de infecção de cada isolado, novos animais foram infectados, para estudos da morfologia das formas sangüíneas. Os tipos morfológicos foram estudados, ao longo da infecção experimental, pelo exame direto a fresco do sangue e pelo esfregaço sangüíneo corado pelo Giemsa, sendo classificados em formas delgadas, intermediárias, largas e muito largas, baseados em critérios preconizados por SCHELEMPER et alii (1986).

5.3. Pesquisa de amastigotas nos órgãos:

Para a avaliação da presença de amastigotas em órgãos como: fígado, baço, coração e medula óssea, foram realizadas impressões desses órgãos em lâminas ("imprint") e coradas pelo Giemsa, provenientes de animais de experimentação (camundongos e/ ou ratos) na fase aguda da infecção.

5.4. Desenvolvimento dos flagelados em meio de cultura:

Uma alíquota de meio de cultura contendo flagelados, com crescimento de seis dias (cultivo recente), foi lavada por três vezes em "Phosphate Buffered Solution" (PBS), com pH 7.2, e usadas na confecção de esfregaços, para avaliação das formas presentes. A taxa de metaciclogênese foi expressa de maneira qualitativa (+ baixa, ++ moderada e +++ intensa) por meio da observação dos isolados em diferentes períodos de cultivos (4, 7, 14, 21 e 28 dias).

5.5. Desenvolvimento dos flagelados nos vetores:

Para cada isolado, foram utilizadas ninfas de II ou III estágio de desenvolvimento das espécies: *Triatoma infestans*, *Panstrongylus megistus* e *Rhodnius neglectus*. O número de ninfas variou de 3 a 8 exemplares para cada espécie de triatomíneos. Como fonte de infecção para os artrópodes, foram usados camundongos BALB/c ou ratos Wistar infectados com 3×10^5 tripomastigotas metacíclicos obtidos de cultura. As ninfas foram alimentadas durante o período patente e, em alguns casos, no

período sub-patente da infecção nos animais de experimentação e os seus conteúdos intestinais foram examinados após trinta e/ou sessenta dias. O exame da hemolinfa e glândulas salivares, para a pesquisa de tripanossomos, foram realizados após sessenta dias do repasto sangüíneo.

6. Identificação e caracterização molecular:

6.1. Extração do DNA total:

Tripanossomos em meio LIT, na fase exponencial de crescimento, foram lavados em PBS (pH 7.2), por duas vezes, e o sedimento armazenado a -20 °C até o momento do uso.

A extração de DNA foi de acordo com o método de OSAKI e CZEKO (1984). Assim, os sedimentos contendo os flagelados foram descongelados em banho de gelo. A eles foram adicionados Tampão Tris Salino-EDTA (SE) (pH 8.0), na proporção de 1ml para 10⁹ tripomastigotas; Lauril Sarcosinato de Sódio (Sarkosil) 10%; Proteinase K (20ng/ml) e Ribonuclease (RNase) (10ng/ml). As misturas foram incubadas a 55-60 °C, por 2 horas. Em seguida, submetidas à extração: uma vez com Fenol-Tris; 3 vezes com Fenol-Clorofórmio (1/1); 2 vezes com Clorofórmio-Álcool isoamílico (24/1); e uma vez com Clorofórmio puro. Os DNAs das misturas foram precipitados com Etanol puro, gelado, na presença de Acetato de sódio a 0.3M (pH 7.0). Os precipitados foram coletados e transferidos para tubos “Eppendorf” e lavados com Etanol a 70%. Os “pellets” de DNA foram secos a 37 °C e dissolvidos em Tampão Tris Clorídrico-EDTA (TE) (pH 8.0) e as concentrações de DNA quantificadas por espectrofotômetro de luz ultra-

violeta (GeneQuant filtro 320nm). As concentrações foram acertadas para 2µg/µl de solução TE e armazenadas em temperatura de geladeira para uso nas técnicas de PCR e RAPD.

6.2. “Polimerase Chain Reaction” - PCR:

6.2.1. Identificação molecular pelo minicírculo de kDNA:

Para amplificação de fragmentos de minicírculo de kDNA, foram usados os “primers” P35 e P36, descritos por STURM et alii (1989). Nesta reação, os produtos resultantes apresentam 330 pares de base (pb) de comprimento, que correspondem à amplificação de segmento contendo região específica de minicírculo de kDNA do *T. cruzi*. As características da reação seguiram conforme protocolo estabelecido por AVILLA et alii (1990). Assim, 50ng de DNA genômico total foram incubados inicialmente a 96 °C por 2 minutos e adicionados a uma mistura contendo 100ng de cada “primer” (P35 e P36); 200µM de cada desoxirribonucleosídeos trifosfatos (dNTP); 2,5µl de tampão da reação; 2,5 U da enzima *Taq* DNA Polimerase e; 16,0µl de água bidestilada deionizada e autoclavada. As condições de amplificação em termociclador foram as seguintes: 1º Ciclo, 94 °C por 4 minutos, 55 °C por 20 segundos e 72 °C por 1 minuto; 2º Ciclo, 94 °C por 20 segundos, 55 °C por 20 segundos e 72 °C por 1 minuto; 3º Ciclo, 94 °C por 20 segundos, 55 °C por 20 segundos e 72 °C por 10 minutos. Amostras de 10µl dos produtos de kDNA amplificados foram separados por eletroforese em gel de agarose a 2%, corados com brometo de etidium e visualizados por luz ultravioleta. Amostras de 4µl de 100pb DNA Ladder Plus (MBI Fermentas) foram

utilizadas como marcador de peso molecular. Os produtos amplificados das cepas Y e G foram usados como controles na reação.

6.2.2. Caracterização molecular:

Para amplificação de parte da região intergênica do gene de mini-exon, foram usados 3 oligonucleotídeos: TC1 (5'-GTGTCCGCCACCTCCTTCGGGCC-3'), específico para isolados de *T. cruzi*, pertencentes à linhagem 1 (conforme nova designação *T. cruzi* II); TC2 (5'-CCTGCAGGCACACGTGTGTGTG-3'), específico para a linhagem 2 (conforme nova designação *T. cruzi* I); e TCC (5'-CCCCCTCCCAGGCCACACTG-3'), comum aos dois grupos, seguindo o protocolo estabelecido por SOUTO et alii (1996). Para a reação, 100ng de DNA genômico, com incubação inicial a 94 °C por 1 minuto, foram adicionados a uma mistura contendo 50ng de cada "primer"; 200µM de cada dNTP; 2,5µl de tampão da reação; 2,5 U de *Taq* DNA Polimerase e; 16,0µl de água bidestilada deionizada e autoclavada. As condições de amplificação em termociclador programado foram 27 ciclos de: 94 °C por 30 minutos; 55 °C por 30 segundos; 72 °C por 30 segundos e; 72 °C por 10 minutos. Os produtos amplificados das amostras e controles foram analisados da mesma forma que na reação de PCR para minicírculo de kDNA.

6.3. "Random Amplification of Polymorphic DNA" - RAPD:

Foram selecionados arbitrariamente os "primers": 625 (CCGCTGGAGC), 615 (CGTCGAGCGG), 606 (CGGTCGGCCA) e 601

(CCGCCCCACTG), escolhidos de um grupo de aproximadamente vinte “primers” de uso corrente no Laboratório de Taxonomia de tripanossomatídeos, do Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biomédicas da USP, utilizados para estudos de polimorfismo e relações filogenéticas entre diversos tripanossomatídeos. Os “primers” foram adquiridos da University of British Columbia, Biotechnology Laboratory. Para a reação, 100ng de DNA genômico, incubados previamente a 95 °C por 2 minutos foram adicionados a uma mistura contendo 100ng de cada “primer”; 200µM de cada dNTP; 5µl de tampão da reação; 2,5 U de *Taq* DNA Polymerase (Pharmacia) e; 50µl de água bidestilada deionizada e autoclavada. As condições de amplificação em termociclador foram as seguintes: 1 ciclo de, 95 °C por 3 minutos, 37 °C por 2 minutos e 72 °C por 2 minutos; 33 ciclos de 95 °C por 1 minuto, 37 °C por 2 minutos e 72 °C por 2 minutos e; 1 ciclo de 95 °C por 1 minuto, 37 °C por 2 minutos e 72 °C por 10 minutos. Os produtos amplificados das amostras e controles foram analisados da mesma forma que na reação de PCR para seqüências de minicírculo de kDNA e de mini-exon.

Uma estimativa preliminar do polimorfismo entre os isolados foi feita por comparação visual dos diferentes padrões de fragmentos gerados por RAPD.

6.4. Construção de dendogramas baseados em fragmentos de DNA amplificados por RAPD:

Para a construção dos dendogramas foram utilizadas as bandas geradas pelos 4 “primers” (625, 615, 606 e 601). Cada banda gerada

representou um caracter. O conjunto de caracteres foram empregados na construção de matriz de similaridade, utilizando o coeficiente de similaridade de Jaccard (JACCARD, 1908), ($D_{ij} = 1 - [c / (2N - c)]$), onde c = número de bandas comuns entre duas amostras e N = número total de bandas diferentes nas duas amostras. Os dados foram analisados pelo método de Neighbor Joining (SAITOU e NEI, 1987), disponível no programa PHYLIP 3.5 (FELSENSTEIN, 1989). Estes dados também foram analisados pelo programa MIX do PHYLIP, onde o relacionamento genético foi estimado segundo o método de Parsimônia de Wagner (LUCKOW e PIMENTEL, 1985). O programa SEQBOOT do PHYLIP foi usado para avaliar a consistência dos agrupamentos "clusters", formados pelo método de Parsimônia, por meio das análises de "bootstrap" (100 replicas).

IV. RESULTADOS

1. Avaliação do potencial de domiciliação de triatomíneos:

No município de Araraquara, a comprovação da existência de triatomíneos com hábitos de domiciliação foi verificada através da instalação e manutenção de galinheiro experimental. Os dados obtidos tiveram o objetivo de ilustrar esta característica epidemiológica nessa região. Entre maio de 1995 e junho de 1999, período que englobou a fase de captura de animais silvestres na região, foram efetuadas 7 verificações entre a 13^o e a 19^o revisões. *Panstrongylus megistus* foi a única espécie a colonizar a instalação. Adultos foram coletados e/ou recuperados nas 13^o, 14^o, 15^o e 19^o revisões. Ninfas de diferentes estádios foram coletadas em todas as revisões, com exceção da 18^o, como também as exúvias marcadas e não marcadas. Durante o período de observação do galinheiro experimental não foram encontrados triatomíneos infectados na amostragem examinada (30%).

2. Capturas de animais silvestres:

De março de 1996 a março de 1999, foram capturados e estudados 198 mamíferos pertencentes a 3 ordens (**Marsupialia**, **Carnivora** e **Rodentia**) e 17 gêneros. Da ordem **Marsupialia**, compuseram o estudo, 47(23,7%) *Didelphis albiventris* (gambá), 15(7,6%) *D. marsupialis* (gambá, mucura branca), 4(2,0%) *Gracilinanus sp* (marmosa), 4(2,0%) *Lutreonila crassicaudata* (gambeva, gambá marta), 1(0,5%) *Metachirus*

nudicaudatus (cuíca), e 35(17,7%) *Philander opossum* (cuíca, mucura); da ordem **Carnivora**, 5(2,5%) *Nasua nasua* (coatí); e da ordem **Rodentia**, 28(14,1%) *Akodon montensis* (rato da mata, do chão), 1(0,5%) *Cavia aperea* (preá), 7(3,5%) *Nectomys squamipes* (rato d'água), 1(0,5%) *Echimys (Nelomys) thomasi* (cururuá), 3(1,5%) *Oligoryzomys nigripes* (ratinho do arroz), 10(5,0%) *Oryzomys sp* (rato do arroz, do campo), 7(3,5%) *Oxymycterus quaestor* (rato cavador, focinhudo), 14(7,1%) *Proechimys iheringi* (rato sauiá, de espinho, fedido, que n), 3(1,5%) *Rattus norvegicus* (rato de esgoto, ratazana), 1(0,5%) *Rattus rattus* (rato pardo, do paiol, do telhado), 1(0,5%) *Sciurus ingrami* (caxinguelê, serelepe, coaticoco) e 11(5,5%) roedores não identificados. Os dados de capturas referentes a cada região geográfica estão especificados na Tabela 1. Todos os mamíferos procederam de áreas florestadas das diferentes regiões, com exceção do exemplar de *Rattus rattus* e dos três *Rattus norvegicus* que foram capturados em ambientes próximos aos domicílios em Cordas no município de Eldorado e em Buraco Fundo no município de Ilhabela, respectivamente.

3. Pesquisa de flagelados em animais silvestres:

Dos 198 animais capturados nos quatro municípios, 30 (15,1%) apresentaram flagelados em, pelo menos, um dos procedimentos utilizados. As frequências de positividade por município foram de 9,9% (9/91) para os animais capturados no município de Araraquara, 31,8% (7/22) para Eldorado, 4,5% (1/22) para Iguape e 20,6% (13/63) para Ilhabela.

Os resultados das análises de 9 animais silvestres, capturados no município de Araraquara, região do Planalto Ocidental Paulista, e que apresentaram pesquisa positiva para flagelados, estão especificados na Tabela 2. Dos 47 gambás, *Didelphis albiventris*, capturados nesta região, somente 1(2,1%) foi positivo para tripanossomos semelhantes a *T. cruzi*. Nesse animal, o exame direto e o esfregaço sangüíneo revelaram pequena quantidade de parasitos circulantes. O xenodiagnóstico e hemocultura também foram positivos e o isolamento dos flagelados foi obtido a partir do material originário das duas técnicas. Para as outras espécies de animais silvestres capturadas na região, não foi possível detectar tripanossomos do tipo *T. cruzi*. No entanto, flagelados semelhantes aos encontrados no subgênero *Megatrypanum*, com diagnóstico provável de *T. freitasi*, foram observados nos animais da ordem **Marsupialia** (Figura 3 A). As formas tripomastigotas apresentaram morfologia típica como descrita por HOARE (1972). Assim, os parasitos são grandes e largos, apresentando membrana ondulante bem evidente, cinetoplasto marginal afastado da extremidade posterior e situado próximo ao núcleo oval e de posição mediana em relação ao corpo. Esses tripanossomos foram observados no exame direto e/ou em esfregaços sangüíneos de 6(12,8%) *D. albiventris* e de 2(100,0%) marmosas, *Gracilinanus sp*, capturadas. Dois *D. albiventris* apresentaram flagelados semelhantes a *T. freitasi* nas hemoculturas, porém não foi possível manter esses tripanossomos por repiques sucessivos em meio acelular.

Os resultados dos exames realizados em 8 animais, capturados no Vale do Ribeira, que apresentaram pesquisa positiva para flagelados estão especificados na Tabela 3. Assim, no município de Eldorado, a infecção por tripanossomos foi evidenciada em 6(75,0%) dos 8 gambás, *D. marsupialis*, e em 1(33,3%) dos 3 camundongos do mato, *Oryzomys sp*, capturados. Entre os *D. marsupialis*, o xenodiagnóstico foi positivo em 3(37,5%), a hemocultura em 4(50,0%) e a cultura de material das vísceras e o esfregaço sangüíneo em apenas 1(12,5%). Destes, o parasitismo por *T. cruzi* foi, posteriormente, confirmado em 4(50,0%) animais. Em dois *D. marsupialis*, em que apenas as hemoculturas foram positivas, não foi possível a identificação dos flagelados, uma vez que estes não se adaptaram aos cultivos. Já, no único exemplar de *Oryzomys sp* parasitado, somente o exame direto apresentou formas flageladas e o exame da impressão de baço revelou amastigotas. Neste caso, não foi possível a identificação segura do agente com base nos resultados das duas técnicas. Dos 3 *D. marsupialis* capturados em Iguape, 1(33,3%) apresentou hemocultura positiva e xenodiagnóstico negativo para tripanossomos. Aqui, também não foi possível a identificação dos flagelados devido a não adaptação dos mesmos em cultura.

Os dados sobre as análises dos 13 mamíferos, parasitados e capturados no litoral Norte, estão representados na Tabela 4. No município de Ilhabela, houve maior diversidade de espécies de animais silvestres infectados por tripanossomos.

Desta maneira, a infecção foi observada em 1(25,0%) dos 4 gambás, *D. marsupialis*, em 4(11,8%) das 34 cuícas, *Philander opossum*, em 7(50,0%) dos 14 ratos sauiá, *Proechimys iheringe*, e em um roedor não identificado. O exemplar de *D. marsupialis* parasitado apresentou xenodiagnóstico positivo, mas a hemocultura, o exame direto e os esfregaços sangüíneos foram negativos. A identificação posterior do isolado, mostrou tratar-se de *T. cruzi*.

Nos *P. opossum*, tanto o xenodiagnóstico, como a cultura do material de aspirado de vísceras e a hemocultura, apresentaram resultados positivos. Cada técnica detectou parasitos em 2(5,9%) dos animais. As hemoscopias, neste grupo de animais, foram negativas e o isolamento de *T. cruzi* foi possível pelos três procedimentos em 3(8,8%) *P. opossum*. Em um animal com hemocultura positiva, a identificação dos tripanossomos não foi possível porque os flagelados não se mantiveram em meio de cultura.

Entre os *Proechimys iheringe*, o xenodiagnóstico foi positivo em 3(21,4%), a hemocultura em 1(7,1%), a cultura do aspirado de fígado e baço em 1(7,1%) e o exame hemoscópico em 4(28,6%). O isolamento do *T. cruzi* foi obtido apenas pelo material do xenodiagnóstico em dois *Proechimys*. No animal com hemocultura positiva não foi possível o isolamento dos flagelados por falta de adaptação ao cultivo. Neste caso, o exame do esfregaço sangüíneo revelou a presença de inúmeras formas tripomastigotas, características do subgênero *Herpetosoma*, isto é, formas finas de tamanho médio, apresentando membrana ondulante estreita e flagelo livre longo, cinetoplasto bem evidente situado próximo a extremidade

posterior e núcleo ocupando uma posição mais anterior ao corpo (Figura 3 B). Por outro lado, dois animais apresentaram tripanossomos somente ao exame de sangue direto, não sendo encontrado tripomastigotas nos esfregaços sangüíneos. Em outro *Proechimys*, foi isolado flagelado a partir do material de cultivo de aspirado de órgãos. Neste caso, o comportamento biológico do isolado em meio de cultura acelular e infecção em hamsters mostrou tratar-se do gênero *Leishmania*. No roedor de espécie não identificada, a hemocultura e a hemoscopia foram positivas, porém não se conseguiu o isolamento dos flagelados em meio de cultivo acelular. Contudo, as formas tripomastigotas, encontradas nos esfregaços sangüíneos deste animal, foram semelhantes àsquelas encontradas no subgênero *Herpetosoma* (Figura 3 B).

3.1. Isolamento de *T. cruzi* em animais silvestres:

As especificações de cada isolado, com as respectivas espécies de hospedeiros de origem, os tipos de procedimentos usados no isolamento e as origens geográficas constam na Tabela 5. Assim, considerando todas as regiões estudadas, foram isoladas 16 amostras de *T. cruzi* a partir de 11 animais silvestres, sendo 1 *Didelphis albiventris*, 5 *D. marsupialis*, 3 *Philander opossum* e, 2 *Proechimys iheringe*. Dos 16 isolados, 9(56,2%) foram obtidos pela xenocultura, 4(25,0%) pela hemocultura e 3(18,7%) pela cultura do material aspirado de fígado e baço. Em 1 *D. marsupialis*, foram isolados flagelados pelas três metodologias; já em 1 *D. albiventris* e 2 *P. opossum*, os parasitas foram isolados por dois dos procedimentos

(xenocultura e hemocultura; xenocultura e cultura do aspirado ou hemocultura e cultura do aspirado) e, em 4 *D. marsupialis*, 1 *P. opossum* e nos 2 *P. iheringe*, o isolamento ocorreu pela xenocultura ou pela hemocultura.

4. Caracterização biológica dos isolados:

4.1. Comportamento da infecção em animais experimentais:

O comportamento da infecção em camundongos BALB/c e ratos Wistar, recém desmamados, normais ou imunodeprimidos pela ciclofosfamida estão expressos nas Tabelas 6, 7, 8 e 9. Os níveis de parasitemias máximos e períodos pré-patente e patente, mínimos e máximos e a mortalidade variaram nos diferentes isolados e, também, conforme a espécie de animal de laboratório, normal ou imunodeprimido, utilizado no estudo. Nas Figuras 4 e 5 estão representados graficamente os tipos de infecção, patente ou sub-patente, determinados pelas amostras de *T. cruzi*, isoladas de animais silvestres, de diferentes gêneros em camundongos BALB/c e em ratos Wistar normais ou imunodeprimidos.

A evolução da infecção das diferentes amostras de *T. cruzi* em camundongos BALB/c, que não foram submetidos ao esquema de imunodepressão está assinala na Tabela 6. Nesses animais, as amostras **Ag5P**, **Ag5X** e **Eg23F/B**, isoladas de *Didelphis*, não produziram infecção patente, sendo que os exames de sangue (direto e microhematócrito) mantiveram-se negativos durante o período de trinta dias de observação. Hemoculturas realizadas após este tempo, também foram negativas. Da

mesma maneira, nas amostras, **Eg23P**, **Eg24X**, **Eg31P** e **Eg32X**, também isoladas de *Didelphis*, os exames de sangue foram negativos, entretanto foi possível detectar parasitemias sub-patentes por meio de hemocultura realizada ao final do 30^o dia após a inoculação. Já em dois isolados de *Didelphis* (**Eg23X** e **Ig42X**), nos dois de *Proechimys* (**Ir12X**, **Ir14X**) e nos cinco de *Philander* (**Ic70X**, **Ic74P**, **Ic74F/B**, **Ic76X** e **Ic76F/B**), as parasitemias foram patentes. As parasitemias máximas não alcançaram níveis elevados, ocorrendo entre o 12^o e 18^o dia após a infecção nos diferentes isolados. Os períodos pré-patente mínimos e máximos observados na infecção de camundongos normais foram de 5 e 7 dias para os isolados **Ir14X** e **Ic74F/B**; 7 e 10 dias para **Ic76F/B**; e 9 dias ou de 9 e 12 dias para as demais amostras. O período patente variou de, no mínimo, 11 dias, como observado no isolado **Ic70X** e, no máximo, de 42 dias, como na amostra **Eg23X**. A mortalidade foi nula para um período de acompanhamento de 69 dias.

Os dados da infecção dos diferentes isolados em camundongos BALB/c submetidos à imunodepressão pela ciclofosfamida estão relacionados na Tabela 7. Nesses animais, o comportamento dos isolados, de maneira geral, foi semelhante ao dos camundongos normais. No entanto, diferiu nos níveis de parasitemias máximas que foram mais elevadas, na ligeira redução do período pré-patente e patente em alguns isolados e no índice de mortalidade. Vale ressaltar que a imunodepressão não alterou o comportamento dos isolados **Ag5P**, **Ag5X**, **Eg23P**, **Eg23F/B**, **Eg24X**, **Eg31P**

e **Eg32X**. No isolado **Eg31P**, a morte de um animal, sem parasitemia patente, provavelmente ocorreu devido a fatores não ligados à infecção.

A evolução da infecção das diferentes amostras de *T. cruzi* em ratos Wistar normais está assinalada na Tabela 8. Todas as amostras foram infectantes para estes animais, porém, nota-se que, nos isolados de *Didelphis*, **Ag5P** e **Ag5X**, os parasitos produziram infecção sub-patente, sendo os flagelados detectados ao longo de 45 dias de observação, pela técnica do microhematócrito. Para os isolados de *Didelphis*, **Eg23F/B**, **Eg32X**, **Ig42X**, de *Proechimys*, **Ir12X** e de *Philander*, **Ic70X**, **Ic74P** e **Ic74F/B** foram observadas parasitemias de baixa intensidade, atingindo o valor máximo de 40 tripomastigotas sangüíneos/ 5 mm³. Porém, nas amostras **Eg23F/B**, **Ig42X** e **Ic74F/B** essas parasitemias se apresentaram de maneira descontínua ao longo das observações realizadas. As parasitemias máximas dos outros isolados também não alcançaram níveis elevados. O pico parasitêmico foi verificado entre o 12^o e 35^o dia após a infecção. Os períodos pré-patente mínimos e máximos, observados na infecção de ratos normais, foram diferentes entre as amostras, variando de, no mínimo, 7 dias e, no máximo, 19 dias. A duração da fase aguda variou de, no mínimo, 5 a 7 dias, como observada nos isolados **Ic70X**, **Ir12X** e **Ir14X** e, de, no máximo, 26 dias, como nas amostras **Eg24X** e **Ic74P**. Não foi observada mortalidade neste grupo para um período de acompanhamento de 62 dias.

Os dados da infecção dos diferentes isolados em ratos Wistar submetidos à imunodepressão pela ciclofosfamida são mostrados na Tabela

9. Aqui, também, o comportamento não diferiu muito dos ratos normais. Assim, houve diferenças quanto aos níveis de parasitemia máxima que, nestes animais, foram mais elevadas, exceto para o isolado **Ig42X** que apresentou parasitemia baixa e intermitente, não permitindo estimar os períodos pré-patente e patente. Não houve, de maneira geral, alteração do período pré-patente, porém observa-se ligeiro aumento da duração da fase aguda. A mortalidade foi quase que inexistente, sendo registrada a morte de um único animal infectado com a amostra **Ic74P**.

4.2. Morfologia dos tripomastigotas sangüíneos:

Os tipos morfológicos dos tripomastigotas sangüíneos encontrados foram: formas delgadas, intermediárias, largas e muito largas. A Figura 6 mostra o polimorfismo observado entre tripomastigotas sangüíneos de *T. cruzi* dos diferentes isolados de animais silvestres.

As formas delgadas representaram tripomastigotas finas, de traçado sinuoso, núcleo alongado, cinetoplasto muito afastado da extremidade posterior, membrana ondulante não evidente e flagelo livre, continuando com a parte anterior sem apresentar limite nítido.

As formas intermediárias constituíram-se de tripomastigotas pouco mais largas que a forma anterior e de traçado menos sinuoso, núcleo alongado por vezes ovóide, cinetoplasto pouco afastado da extremidade posterior, membrana ondulante mais evidente e flagelo livre, continuando com a parte anterior apresentando limite nítido.

As formas largas foram caracterizadas por tripomastigotas em forma de "C", às vezes de "S", com núcleo esférico ou ligeiramente ovóide de posição mediana, cinetoplasto junto a extremidade posterior, membrana ondulante bem definida e flagelo longo e nítido.

As formas muito largas mostraram características comuns às anteriores, destacando-se por apresentar maior largura, citoplasma intensamente vacuolizado e núcleo, na maioria das vezes, situado na posição anterior.

O encontro dos tipos morfológicos das tripomastigotas sangüíneos na infecção experimental de cada isolado está assinalado na Tabela 10. As formas intermediárias e largas foram observadas na infecção experimental de todos os isolados com exceção dos **Ag5P** e **Ag5X** que apresentaram só formas largas. Nestes isolados, formas largas foram encontradas em esfregaços do creme leucocitário mediante o emprego da técnica do microhematócrito. Dentre todas as amostras, a **Eg23X** foi a única que apresentou as formas delgadas "clássicas". Tanto as formas delgadas quanto as formas intermediárias foram observadas no início da fase aguda da infecção, desaparecendo em seguida da circulação, quando prevaleceram as formas largas até o final do período patente. Formas muito largas foram observadas, sobretudo, em amostras isoladas de ***Didelphis***, cujo aparecimento se fez tardiamente.

4.3. Pesquisa de amastigotas nos órgãos:

O parasitismo tissular foi estudado em camundongos e ratos, submetidos ao esquema de imunodepressão proposto, inoculados e examinados na fase aguda da infecção pela técnica de impressão de órgãos. Em todas as amostras de tripanossomos estudadas foram encontradas amastigotas em pelo menos um dos órgãos. Os dados referentes ao parasitismo tecidual estão assinalados na Tabela 11.

Dos 16 isolados, 15 (93,7%) apresentaram amastigotas no coração. Somente o isolado **Ag5P** não apresentou formas teciduais no referido órgão. De maneira geral, o parasitismo no coração foi baixo, sendo encontradas amastigotas isoladas ou agrupadas em pequeno número. No entanto, nas amostras **Eg23X**, **Eg23P** e **Eg31P**, todas de *Didelphis*, o parasitismo cardíaco variou de moderado a intenso, sendo observadas amastigotas livres ou no citoplasma de macrófagos (Figura 7 A, B, C, D). Já nos isolados de *Proechimys* e *Philander*, as amastigotas evidenciadas em todas as preparações de coração, foram sempre em pequeno número.

Na medula óssea, foram observadas amastigotas livres ou intracelulares em 11 (68,7%) isolados (Figura 7 E, F). Nota-se que houve uma maior frequência dos parasitos nas amostras de *Proechimys* e *Philander*. Assim, entre as 7 amostras deste grupo, 6 (85,7%) apresentaram amastigotas. No entanto, a intensidade parasitária foi baixa, exceto para o isolado **Ic70X** que apresentou parasitismo moderado. Dos 9 isolados de *Didelphis*, 5 (55,5%) apresentaram amastigotas nesse órgão. Aqui, somente a amostra **Eg23X** mostrou parasitismo de intensidade moderada, sendo pequeno o número de parasitos encontrados nas demais amostras.

No fígado, também foram observadas amastigotas livres ou intracelulares em 9 (56,2%) isolados. Parasitismo mais freqüente e intenso foi observado nas amostras de tripanossomos isolados de *Proechimys* e *Philander* que, de 7 amostras, foram detectadas amastigotas em 6 (85,7%). A intensidade parasitária foi variada, sendo intensa nas amostras **Ir14X** e **lc70X**, moderada na amostra **lc76X** e baixa nas demais. Entre os isolados de *Didelphis*, apenas 3 (33,3%) apresentaram o parasito neste órgão. Na amostra **Eg23X** o parasitismo foi moderado, sendo baixo nas amostras **Eg23P** e **Eg31P**.

Neste estudo, o baço foi o órgão menos parasitado, sendo evidenciado o parasitismo em 8 (50,0%) dos isolados. Das 7 amostras de *Proechimys* e *Philander*, 4 (57,1%) apresentaram amastigotas. Parasitismo moderado foi observado nos isolados **Ir14X** e **lc70X**, sendo que, nas outras duas amostras, a intensidade parasitária foi baixa. Em *Didelphis*, 4 (44,4%) dos isolados foram positivos para a presença de amastigotas. Nesse grupo, apenas a amostra **Eg23X** apresentou intensidade parasitária moderada com a presença de macrófagos contendo amastigotas. Para as outras amostras positivas (**Ag5P**, **Eg31P** e **Eg32X**) o parasitismo foi baixo.

4.4. Desenvolvimento dos flagelados em meio de cultura:

No isolamento primário a partir de materiais originários do xenodiagnóstico, da punção cardíaca e do aspirado de fígado e baço, as 16 amostras apresentaram boa adaptação ao cultivo em meios bifásicos. Posteriormente, todos os isolados foram mantidos em meio LIT com repiques semanais. No isolado **lg42X**, houve, inicialmente, uma maior

difficuldade na adaptação dos flagelados em meio LIT, exigindo cuidados adicionais como agitação contínua durante a fase de crescimento e suplementação de soro fetal bovino. Os exames microscópicos diretos ou por meio de esfregaços corados pelo Giemsa, realizados em cultivos recentes, após um período de adaptação, revelaram crescimento exuberante em rosetas e inúmeras formas epimastigotas em fase de divisão (Figura 8 A). Houve acentuado polimorfismo das epimastigotas em todos os isolados. Os tipos morfológicos variaram entre formas epimastigotas longas e largas; longas e finas; médias e pequenas (Figura 8 A, B, C).

As formas tripomastigotas metacíclicas apresentaram dimorfismo evidente, sendo observados tipos celulares grandes com membrana ondulante, por vezes, destacada do corpo e metacíclicos de tamanho médio (Figura 8 D, E, F). O primeiro tipo foi predominante nos isolados de *Didelphis*, com exceção das amostras **Eg23X** e **Ig42X**; o segundo, encontrado nos demais isolados. Houve nítida diferença na taxa de metaciclogênese entre os diferentes isolados, como mostra a Tabela 12. De maneira geral, a diferenciação das formas epimastigotas em tripomastigotas metacíclicas ocorreu mais precocemente na maioria das amostras de *Didelphis*, sendo iniciada a partir do 4^o dia de cultivo e alcançando intensa diferenciação no 14^o dia. Este comportamento não foi observado para os isolados de *Didelphis*, **Eg23X** e **Ig42X** e para o isolado de *Philander*, **Ir12X**, que apresentaram baixa taxa de metaciclogênese ao longo de todo o período de observação. Para as demais amostras, a metaciclogênese

ocorreu de forma mais lenta, alcançando diferenciação de moderada a intensa no 28^o dia de cultivo.

4.5. Desenvolvimento dos flagelados nos vetores:

Todos os isolados evoluíram no tubo intestinal das três espécies de triatomíneos (*T. infestans*, *R. neglectus* e *P. megistus*), apresentando tripomastigotas metacíclicas nas fezes destes vetores, 30 ou 60 dias após a aplicação do xenodiagnóstico nos animais de experimentação inoculados com os diferentes isolados de *T. cruzi*. O número de ninfas positivas em relação ao número de ninfas aplicadas por espécies de triatomíneos e respectivo percentual de positividade está apresentada na Tabela 13. Exames da hemolinfa e da glândula salivar realizados nestes triatomíneos não revelaram a presença de outros flagelados.

Os percentuais de positividade do xenodiagnóstico aplicados nos animais de experimentação variaram conforme as espécies de triatomíneos usados e entre as amostras de tripanossomos estudadas. Os índices gerais de infectividade para as três espécies de triatomíneos foram de 50,7%, 49,3% e 50,7% para *Triatoma infestans*, *Rhodnius neglectus* e *Panstrongylus megistus*, respectivamente. Já, as taxas de positividade do xenodiagnóstico em relação às amostras de flagelados, variaram de 33,3% para os isolados Eg23X e Eg23F/B a 77,7% para o isolado Ic74F/B.

5. Identificação e caracterização molecular:

Para a identificação e caracterização molecular, foram usadas as 16 amostras de DNA dos isolados primários. Dados complementares sobre o hospedeiro de origem, técnica de isolamento e município procedente, estão assinalados na Tabela 5, como já mencionado anteriormente. Como controle, foram utilizadas amostras de DNA da cepa G, isolada de marsupial da região amazônica e da cepa Y, isolada de caso humano. Portanto, foram usados controles representativos dos ciclos de transmissão silvestre e domiciliar.

5.1. Identificação molecular pelo minicírculo de kDNA:

A amplificação de seqüência de minicírculo de kDNA, foi utilizada com o objetivo de confirmar o diagnóstico de *T. cruzi*. Os resultados dos produtos amplificados pela técnica de PCR, utilizando-se os “primers” P35 e P36 são mostrados na Figura 9. A banda de 330 pb, característica de *T. cruzi*, foi obtida nas 16 amostras de tripanossomos, incluindo os dois controles. Este dado aliado com os dos parâmetros biológicos identificam todos os isolados analisados como sendo *T. cruzi*. Além do fragmento de 330 pb, um produto de aproximadamente 400 pb foi amplificado em todas as amostras, com exceção da cepa Y, utilizada como controle.

5.2. Caracterização molecular:

5.2.1. PCR de gene de mini-exon:

A caracterização molecular foi baseada na amplificação, pela técnica de PCR, de um segmento da região intergênica do gene de mini-exon, que define o dimorfismo genético no grupo *T. cruzi*. A Figura 10 mostra os produtos resultantes desta reação. Os genótipos, *T. cruzi* I e *T. cruzi* II relativos às 16 amostras isoladas estão assinalados na Tabela 14.

Houve diferenças na distribuição dos tipos genéticos, conforme a espécie de hospedeiro e sua origem geográfica. Assim, as amostras **Ag5X** e **Ag5P**, isoladas de um mesmo marsupial da espécie *D. albiventris* capturado no município de Araraquara, apresentaram banda de 350 pb, que caracteriza a linhagem de *T. cruzi* I. Das 6 amostras isoladas de *D. marsupialis* capturados no município de Eldorado, Vale do Ribeira, 5 apresentaram a banda de 350 pb e, em apenas uma amostra, o produto de PCR foi de 300 pb, característico da linhagem *T. cruzi* II. Cabe ressaltar que, nas amostras **Eg23X**, **Eg23P** e **Eg23F/B**, isoladas de um mesmo *D. marsupialis*, foi identificada a banda de 300 pb para a primeira amostra e de 350 pb para a segunda e terceira amostra, respectivamente. Das 8 amostras de tripanossomos originários do município de Ilhabela, Litoral Norte, somente a amostra **Ig42X**, isolada de um *D. marsupialis*, apresentou banda de 300 pb. Os isolados de *Proechimys* e de *Philander* não apresentaram as bandas esperadas de 300 ou 350 pb. No entanto, foram obtidos nestas amostras bandas de aproximadamente 100 pb, mostrando que esses isolados não pertencem a nenhuma das linhagens descritas.

5.2.2. Polimorfismo pelo RAPD:

Os perfis de bandas produzidas pela técnica de RAPD foram também utilizadas na caracterização molecular dos 16 isolados de animais silvestres. Os padrões de bandas obtidas com os “primers” 625, 615, 606 e 601 são mostrados nas Figuras 11 A, 11 B, 12 A e 12 B

As análises comparativas dos fragmentos amplificados por RAPD revelaram diferentes padrões conforme o “primer” utilizado. Assim, o padrão obtido pelo “primer” 606 mostrou pequena heterogeneidade entre os isolados com o compartilhamento de dois fragmentos de aproximadamente 550 pb e 650 pb, comuns a todos os isolados, incluindo os controles da cepa G e Y (Figura 12 A). Padrões mais polimórficos, apresentando diferenças no número e no tamanho dos fragmentos amplificados, foram obtidos com os “primers” 625 e 615. Esses padrões permitiram distinguir os isolados pela espécie de hospedeiro e pelos tipos genéticos, definidos na caracterização molecular pelo gene de mini-exon (Figuras 11 A e 11 B). Já, pelo perfil de bandas produzidas pelo “primer” 601 foi possível separar as amostras de *T. cruzi* pela origem geográfica, independente da espécie de hospedeiro (Figura 12 B).

5.2.3. Análise do relacionamento genéticos através dos dendogramas:

Os quatro “primers” usados na técnica de RAPD geraram um total de 70 bandas (caracteres) que foram empregados na construção de matriz de similaridade para estudo do relacionamento genética. Os dendogramas obtidos pelos métodos de análises Neighbor Joinning e de Parsimônia de

Wagner apresentaram a mesma topologia. A topologia do dendograma e respectivos valores de “bootstrap” obtidos a partir do método de Parsimônia de Wagner estão assinalados na Figura 13. Os percentuais de similaridade entre os “clusters” de *T. cruzi* estão expressos na Tabela 15.

A análise da topologia do dendograma e dos valores de “bootstrap” de 100 replicas separaram as amostras de *T. cruzi*, isoladas de animais silvestres em três “clusters” (A, B e C). As amostras **Eg23X** e **Ig42X**, do tipo genético *T. cruzi* II, proveniente de *Didelphis*, capturados nos municípios de Eldorado e Ilhabela, respectivamente, não foram agrupadas nesta análise (Figura 13).

O “cluster” A incluiu todas as amostras isoladas de *Proechimys* e de *Philander* originárias do município de Ilhabela e, com genótipo não definido pelo gene de mini-exon. O valor de “bootstrap” para essas amostras correspondeu a 96 com índice de similaridade de 72% entres elas. Nesse grupo, os isolados foram sub-divididos em dois sub-“clusters”, um formado pelas duas amostras isoladas de *Proechimys* e, o outro formado pelas cinco amostras isoladas de *Philander*.

O “cluster” B foi constituído pelas cinco amostras do tipo *T. cruzi* I, isoladas de *Didelphis* capturados no município de Eldorado. Esse grupo apresentou valor de “bootstrap” de 86 e índice de similaridade de 82%.

O “cluster” C apresentou valor de “bootstrap” de 96 e percentual de similaridade de 100%, sendo constituído pelas duas amostras do tipo *T. cruzi* I, isoladas do mesmo animal capturado no município de Araraquara. O controle cepa G, também do tipo *T. cruzi* I, isolada de *Didelphis* da região

Amazônica apresentou percentual de similaridade de 54% em relação aos isolados de Araraquara, indicando um maior relacionamento genético com o “cluster” C (Tabela 15).

V. TABELAS E FIGURAS

Tabela 1. Número (N) e percentual (%) de espécies de mamíferos capturados nos municípios de Araraquara (Planalto Ocidental Paulista), Eldorado e Iguape (Vale do Ribeira e Ilhabela (Litoral norte), Estado de São Paulo, Brasil, no período de março de 1996 a março de 1999.

Mamíferos	Municípios				
	Araraquara	Eldorado	Iguape	Ilhabela	Total
	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)
<i>Didelphis albiventris</i>	47 (51,6)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	47 (23,7)
<i>Didelphis marsupialis</i>	0 (0,0)	8 (36,4)	3 (13,6)	4 (6,3)	15 (7,6)
<i>Gracilinanus sp</i>	2 (2,2)	1 (4,5)	0 (0,0)	1 (1,6)	4 (2,0)
<i>Lutreonila crassicaudata</i>	4 (4,4)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	4 (2,0)
<i>Metachirus nudicaudatus</i>	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (4,5)	0 (0,0)	1 (0,5)
<i>Philander opossum</i>	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (4,5)	34 (54,0)	35 (17,7)
<i>Nasua nasua</i>	5 (5,5)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	5 (2,5)
<i>Akodon montensis</i>	19 (20,9)	2 (9,1)	7 (31,8)	0 (0,0)	28 (14,1)
<i>Cavia aperea</i>	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (1,6)	1 (0,5)
<i>Nectomys squamipes</i>	7 (7,7)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	7 (3,5)
<i>Echimys thomasi</i>	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (1,6)	1 (0,5)
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	3 (3,3)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	3 (1,5)
<i>Oryzomys sp</i>	0 (0,0)	3 (13,6)	7 (31,8)	0 (0,0)	10 (5,0)
<i>Oxymycterus quaestor</i>	0 (0,0)	1 (4,5)	3 (13,6)	3 (4,8)	7 (3,5)
<i>Proechimys iheringi</i>	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	14 (22,2)	14 (7,1)
<i>Rattus norvegicus</i>	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	3 (4,8)	3 (1,5)
<i>Rattus rattus</i>	0 (0,0)	1 (4,5)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (0,5)
<i>Sciurus ingrami</i>	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (1,6)	1 (0,5)
Roedores não identificados	4 (4,4)	6 (27,3)	0 (0,0)	1 (1,6)	11 (5,5)
Total por municípios	91(100,0)	22 (100,0)	22 (100,0)	63 (100,0)	198 (100,0)

Tabela 2. Resultados da hemoscopia (direto e esfregaço sangüíneo), “imprint” de órgãos (coração, fígado e baço), cultura de órgãos (fígado e baço), hemocultura e xenodiagnóstico de nove animais silvestres, capturados no município de Araraquara (Planalto Ocidental Paulista), Estado de São Paulo, Brasil, que apresentaram pesquisa positiva para flagelados.

Registro do Animal	Espécie	Hemoscopia	“Imprint”	Cultura de órgãos	Hemocultura	Xeno-diagnóstico	Flagelados
A4	<i>Didelphis albiventris</i>	+	Nr	Nr	Neg	Neg	<i>T. freitasi</i> (?)
A5	<i>Didelphis albiventris</i>	+	Neg	Neg	+ *	+ *	<i>T. cruzi</i>
A24	<i>Gracilinanus sp</i>	+	Neg	Neg	Neg	Neg	<i>T. freitasi</i> (?)
A30	<i>Gracilinanus sp</i>	+	Neg	Neg	Neg	Neg	<i>T. freitasi</i> (?)
A55	<i>Didelphis albiventris</i>	+	Nr	Nr	Neg	Neg	<i>T. freitasi</i> (?)
A66	<i>Didelphis albiventris</i>	+	Nr	Nr	Neg	Neg	<i>T. freitasi</i> (?)
A82	<i>Didelphis albiventris</i>	+	Nr	Nr	Neg	Neg	<i>T. freitasi</i> (?)
A111	<i>Didelphis albiventris</i>	+	Nr	Nr	+	Neg	<i>T. freitasi</i> (?)
A112	<i>Didelphis albiventris</i>	Neg	Nr	Nr	+	Neg	<i>T. freitasi</i> (?)

Neg = negativo

Nr = exame não realizado

* amostra isolada

(?) diagnóstico provável baseado em critérios morfológicos e/ou biológicos

Tabela 3. Resultados da hemoscopia (direto e esfregaço sangüíneo), “imprint” de órgãos (coração, fígado e baço), cultura de órgãos (fígado e baço), hemocultura e xenodiagnóstico de oito animais silvestres, capturados nos municípios de Eldorado e Iguape (Vale do Ribeira), Estado de São Paulo, Brasil, que apresentaram pesquisa positiva para flagelados.

Registro do Animal	Espécie	Hemoscopia	“Imprint”	Cultura de órgãos	Hemocultura	Xeno-diagnóstico	Flagelados
E23	<i>Didelphis marsupialis</i>	+	Neg	+ *	+ *	+ *	<i>T.cruzi</i>
E24	<i>Didelphis marsupialis</i>	Neg	Neg	Neg	Neg	+ *	<i>T. cruzi</i>
E27	<i>Oryzomys sp</i>	+	+	Neg	Neg	Neg	<i>T. cruzi</i> (?)
E29	<i>Didelphis marsupialis</i>	Neg	Neg	Neg	+	Neg	Sd
E30	<i>Didelphis marsupialis</i>	Neg	Neg	Neg	+	Neg	Sd
E31	<i>Didelphis marsupialis</i>	+	Neg	Neg	+ *	Neg	<i>T. cruzi</i>
E32	<i>Didelphis marsupialis</i>	Neg	Neg	Neg	Neg	+ *	<i>T. cruzi</i>
G5	<i>Didelphis marsupialis</i>	Neg	Neg	Neg	+	Neg	Sd

Neg = negativo

Sd = sem diagnóstico

* amostra isolada

(?) diagnóstico provável baseado em critérios morfológicos e/ou biológicos

Tabela 4. Resultados da hemoscopia (direto e esfregaço sangüíneo), “imprint” de órgãos (coração, fígado e baço), cultura de órgãos (fígado e baço), hemocultura e xenodiagnóstico de treze animais silvestres, capturados no município de Ilha Bela (Litoral Norte), Estado de São Paulo, Brasil, que apresentaram pesquisa positiva para flagelados.

Registro do Animal	Espécie	Hemoscopia	“Imprint”	Cultura de órgãos	Hemocultura	Xeno-diagnóstico	Flagelados
I2	<i>Proechimys iheringi</i>	+	Neg	Neg	Neg	Neg	Sd
I3	<i>Proechimys iheringi</i>	Neg	Neg	Neg	Neg	+	<i>T. cruzi</i> (?)
I12	<i>Proechimys iheringi</i>	Neg	Neg	Neg	Neg	+ *	<i>T. cruzi</i>
I14	<i>Proechimys iheringi</i>	+	Neg	Neg	Neg	+ *	<i>T. cruzi</i>
I18	<i>Roedor</i>	+	Neg	Neg	+	Neg	<i>Herpetosoma</i> (?)
I20	<i>Proechimys iheringi</i>	+	Neg	Neg	Neg	Neg	Sd
I26	<i>Proechimys iheringi</i>	Neg	Neg	+	Neg	Neg	<i>Leishmania</i>
I34	<i>Proechimys iheringi</i>	+	Neg	Neg	+	Neg	<i>Herpetosoma</i> (?)
I42	<i>Didelphis marsupialis</i>	Neg	Neg	Neg	Neg	+ *	<i>T. cruzi</i>
I54	<i>Philander opossum</i>	Neg	Neg	Neg	+	Neg	Sd
I70	<i>Philander opossum</i>	Neg	Neg	Neg	Neg	+ *	<i>T. cruzi</i>
I74	<i>Philander opossum</i>	Neg	Neg	+ *	+ *	Neg	<i>T. cruzi</i>
I76	<i>Philander opossum</i>	Neg	Neg	+ *	Neg	+ *	<i>T. cruzi</i>

Neg = negativo, Sd = sem diagnóstico, * amostra isolada, (?) diagnóstico provável baseado em critérios morfológicos e/ou biológicos

Tabela 5. Amostras de *Trypanosoma cruzi* isolados de animais silvestres capturados no Estado de São Paulo, Brasil. Designação do isolado, hospedeiro de origem, técnica de isolamento e municípios de origem.

Isolado	Hospedeiro de origem	Técnica de isolamento	Municípios
Ag5P	<i>Didelphis albiventris</i>	Punção cardíaca	Araraquara
Ag5X	<i>Didelphis albiventris</i>	Xenocultura	Araraquara
Eg23X	<i>Didelphis marsupialis</i>	Xenocultura	Eldorado
Eg23P	<i>Didelphis marsupialis</i>	Punção cardíaca	Eldorado
Eg23F/B	<i>Didelphis marsupialis</i>	Aspirado fígado/baço	Eldorado
Eg24X	<i>Didelphis marsupialis</i>	Xenocultura	Eldorado
Eg31P	<i>Didelphis marsupialis</i>	Punção cardíaca	Eldorado
Eg32X	<i>Didelphis marsupialis</i>	Xenocultura	Eldorado
Ir12X	<i>Proechimys iheringi</i>	Xenocultura	Ilhabela
Ir14X	<i>Proechimys iheringi</i>	Xenocultura	Ilhabela
Ig42X	<i>Didelphis marsupialis</i>	Xenocultura	Ilhabela
Ic70X	<i>Philander opossum</i>	Xenocultura	Ilhabela
Ic74P	<i>Philander opossum</i>	Punção cardíaca	Ilhabela
Ic74F/B	<i>Philander opossum</i>	Aspirado fígado/baço	Ilhabela
Ic76X	<i>Philander opossum</i>	Xenocultura	Ilhabela
Ic76F/B	<i>Philander opossum</i>	Aspirado fígado/baço	Ilhabela

Tabela 6. Evolução da infecção em camundongos BALB/c normais, inoculados com 3×10^5 tripomastigotas metacíclicas de *Trypanosoma cruzi*, isolados de animais silvestres capturados no Estado de São Paulo, Brasil. Períodos pré-patente e patente expressos em dias após infecção (d.p.i)

Isolado	Períodos		Parasitemia máxima		nº tripo/5 mm ³	d.p.i	Mortalidade m/i
	pré-patente mín.	máx.	patente mín.	máx.			
Ag5P	nd	nd	nd	nd	0	nd	(0/2)
Ag5X	nd	nd	nd	nd	0	nd	(0/2)
Eg23X	9	9	40	42	1080	16	(0/2)
Eg23P	nd	nd	nd	nd	sp *	nd	(0/2)
Eg23F/B	nd	nd	nd	nd	0	nd	(0/2)
Eg24X	nd	nd	nd	nd	sp *	nd	(0/2)
Eg31P	nd	nd	nd	nd	sp *	nd	(0/2)
Eg32X	nd	nd	nd	nd	sp *	nd	(0/2)
Ig42X	9	12	21	40	120	16	(0/2)
Ir12X	9	12	12	21	240	14	(0/2)
Ir14X	5	7	12	23	160	14	(0/2)
Ic70X	9	9	11	31	120	14	(0/2)
Ic74P	9	12	19	39	40	14	(0/2)
Ic74F/B	5	7	14	24	120	14	(0/2)
Ic76X	9	12	34	36	280	18	(0/2)
Ic76F/B	7	10	14	21	240	12	(0/2)

sp * = parasitemia sub-patente revelada pela hemocultura

nd = não detectado

min. = mínimo

máx. = máximo

m/i = relação entre animais mortos e infectados

Tabela 7. Evolução da infecção em camundongos BALB/c imunodeprimidos com ciclofosfamida, inoculados com 3×10^5 tripomastigotas metacíclicas de *Trypanosoma cruzi*, isolados de animais silvestres capturados no Estado de São Paulo, Brasil. Períodos pré-patente e patente expressos em dias após infecção (d.p.i)

Isolado	Períodos		Parasitemia máxima		nº tripo/5 mm ³	d.p.i	Mortalidade m/i
	pré-patente mín.	máx.	patente mín.	máx.			
Ag5P	nd	nd	nd	nd	0	nd	(0/2)
Ag5X	nd	nd	nd	nd	0	nd	(0/2)
Eg23X	5	7	30	35	1640	19	(2/2)
Eg23P	nd	nd	nd	nd	sp *	nd	(0/2)
Eg23F/B	nd	nd	nd	nd	0	nd	(0/2)
Eg24X	nd	nd	nd	nd	sp *	nd	(0/2)
Eg31P	nd	nd	nd	nd	sp *	nd	(1/2)
Eg32X	nd	nd	nd	nd	sp *	nd	(0/2)
Ig42X	7	9	21	26	320	19	(2/2)
Ir12X	5	7	16	23	18400	14	(2/2)
Ir14X	5	7	19	28	3200	17	(0/2)
Ic70X	9	9	26	33	1160	14	(2/2)
Ic74P	9	9	19	40	320	14	(1/2)
Ic74F/B	5	7	19	30	1280	17	(0/2)
Ic76X	7	9	36	39	1760	13	(2/2)
Ic76F/B	7	7	33	42	1120	14	(1/2)

sp * = parasitemia sub-patente revelada pela hemocultura

nd = não detectado

min. = mínimo

máx. = máximo

m/i = relação entre animais mortos e infectados

Tabela 8. Evolução da infecção em ratos Wistar normais, inoculados com 3×10^5 tripomastigotas metacíclicas de *Trypanosoma cruzi*, isolados de animais silvestres capturados no Estado de São Paulo, Brasil. Períodos pré-patente e patente expressos em dias após infecção (d.p.i)

Isolado	Períodos		Parasitemia máxima		nº tripo/5 mm ³	d.p.i	Mortalidade m/i
	pré-patente mín.	máx.	patente mín.	máx.			
Ag5P	nd	nd	nd	nd	sp *	nd	(0/2)
Ag5X	nd	nd	nd	nd	sp *	nd	(0/2)
Eg23X	7	9	14	21	1680	21	(0/2)
Eg23P	14	19	12	21	320	28	(0/2)
Eg23F/B	nd	nd	nd	nd	40	35	(0/2)
Eg24X	9	9	21	26	840	26	(0/2)
Eg31P	7	10	16	17	400	19	(0/2)
Eg32X	19	19	14	23	40	31	(0/2)
Ig42X	nd	nd	nd	nd	40	22	(0/2)
Ir12X	9	16	7	7	40	16	(0/2)
Ir14X	10	12	7	7	80	14	(0/2)
Ic70X	14	16	5	10	40	16	(0/2)
Ic74P	14	14	14	26	40	14	(0/2)
Ic74F/B	nd	nd	nd	nd	40	12	(0/2)
Ic76X	13	15	5	12	120	18	(0/2)
Ic76F/B	12	12	9	12	160	17	(0/2)

sp * = parasitemia sub-patente revelada pelo microhematócrito

nd = não detectado

min. = mínimo

máx. = máximo

m/i = relação entre animais mortos e infectados

Tabela 9. Evolução da infecção em ratos Wistar imunodeprimidos com ciclofosfamida, inoculados com 3×10^5 tripomastigotas metacíclicas de *Trypanosoma cruzi*, isolados de animais silvestres capturados no Estado de São Paulo, Brasil. Períodos pré-patente e patente expressos em dias após infecção (d.p.i)

Isolado	Períodos				Parasitemia máxima		Mortalidade m/i
	pré-patente mín.	máx.	patente mín.	máx.	nº tripo/5 mm ³	d.p.i	
Ag5P	nd	nd	nd	nd	sp *	nd	(0/2)
Ag5X	nd	nd	nd	nd	sp *	nd	(0/2)
Eg23X	7	9	26	33	2440	21	(0/2)
Eg23P	13	13	36	49	1240	24	(0/2)
Eg23F/B	13	17	20	32	40	26	(0/2)
Eg24X	7	9	38	45	1200	26	(0/2)
Eg31P	7	10	25	33	1480	26	(0/2)
Eg32X	13	17	11	29	280	21	(0/2)
Ig42X	nd	nd	nd	nd	40	19	(0/2)
Ir12X	12	14	14	21	1640	19	(0/2)
Ir14X	10	10	18	37	1800	19	(0/2)
Ic70X	14	16	26	35	2880	23	(0/2)
Ic74P	14	16	7	16	80	21	(1/2)
Ic74F/B	10	13	23	25	2360	26	(0/2)
Ic76X	12	12	30	38	1040	26	(0/2)
Ic76F/B	12	14	26	28	1640	26	(0/2)

sp * = parasitemia sub-patente revelada pelo microhematócrito

nd = não detectado

min. = mínimo

máx. = máximo

m/i = relação entre animais mortos e infectados

Tabela 10. Tipos morfológicos de tripomastigotas sanguíneos, observados na infecção experimental das amostras de *Trypanosoma cruzi*, isolados de animais silvestres capturados no Estado de São Paulo.

Isolado	Animal de experimentação	Trípomastigota sanguínea
Ag5P	Ratos Wistar *	Larga
Ag5X	Ratos Wistar *	Larga
Eg23X	Ratos Wistar	Delgada/ Intermediária/ Larga/ Muito Larga
Eg23P	Ratos Wistar	Intermediária/ Larga/ Muito Larga
Eg23F/B	Ratos Wistar	Intermediária/ Larga/ Muito Larga
Eg24X	Ratos Wistar	Intermediária/ Larga/ Muito Larga
Eg31P	Ratos Wistar	Intermediária/ Larga/ Muito Larga
Eg32X	Ratos Wistar	Intermediária/ Larga/ Muito Larga
Ir12X	Camundongos BALB/c	Intermediária/ Larga
Ir14X	Camundongos BALB/c	Intermediária/ Larga
Ig42X	Camundongos BALB/c	Intermediária/ Larga
Ic70X	Ratos Wistar	Intermediária/ Larga/ Muito Larga
Ic74P	Camundongos BALB/c	Intermediária/ Larga
Ic74F/B	Ratos Wistar	Intermediária/ Larga
Ic76X	Camundongos BALB/c	Intermediária/ Larga
Ic76F/B	Camundongos BALB/c	Intermediária/ Larga

* parasitemia sub-patente (tripomastigotas no creme leucocitário)

Tabela 11. Presença de amastigotas reveladas pela técnica de impressão de órgãos "imprint" do coração, medula óssea, fígado e baço, de camundongos (*) ou ratos (**), inoculados com as diferentes cepas. Dados qualitativos.

Isolado	Coração	Órgãos			Baço
		Medula Óssea	Fígado		
Ag5P **	neg	neg	neg		+
Ag5X **	+	neg	neg		neg
Eg23X *	+++	++	++		++
Eg23P **	++	+	+		neg
Eg23F/B **	+	neg	neg		neg
Eg24X **	+	neg	neg		neg
Eg31P **	+++	+	+		+
Eg32X **	+	+	neg		+
Ig42X *	+	+	neg		neg
Ir12X *	+	+	+		+
Ir14X *	+	+	+++		++
Ic70X *	+	++	+++		++
Ic74P *	+	+	neg		neg
Ic74F/B *	+	neg	+		neg
Ic76X *	+	+	++		+
Ic76F/B *	+	+	+		neg

parasitismo: + baixo, ++ moderado, +++ intenso
neg = negativo

Tabela 12. Desenvolvimento das diferentes amostras de *Trypanosoma cruzi*, isoladas de animais silvestres, em meio LIT. Dados quantitativos sobre a metaciclogênese em função do tempo de cultivo.

Isolado	Tempo de cultivo em dias				
	4	7	14	21	28
Ag5P	sm	+	+++	++	nr
Ag5X	+	++	+++	nr	+++
Eg23X	sm	+	+	+	nr
Eg23P	++	++	+++	nr	nr
Eg23F/B	+	++	++	+++	nr
Eg24X	+	++	+++	+++	nr
Eg31P	++	++	+++	nr	nr
Eg32X	+	++	+++	+++	+++
Ig42X	sm	+	+	+	+
Ir12X	sm	sm	+	+	nr
Ir14X	sm	+	++	++	+++
Ic70X	sm	+	+	++	++
Ic74P	sm	sm	+	++	nr
Ic74F/B	+	+	++	++	+++
Ic76X	+	+	++	nr	+++
Ic76F/B	+	+	++	++	+++

metaciclogêneses: + baixa; ++ moderada; +++ intensa

sm = sem tripomastigota metacíclico

nr = não realizado

Tabela 13. Resultados do xenodiagnóstico, aplicado em animais de experimentação, infectados com *Trypanosoma cruzi*, isolados de animais silvestres capturados no Estado de São Paulo, Brasil. Dados expressos em número de ninfas positivas (NP) em relação ao número de ninfas aplicadas (NA) por espécies de triatomíneo e respectivo percentual de positividade (%).

Isolado	<i>T. infestans</i> NP/NA (%)	<i>R. neglectus</i> NP/NA (%)	<i>P. megistus</i> NP/NA (%)	Total NP/NA (%)
Ag5P	6/8 (75,0)	6/8 (75,0)	3/6 (50,0)	15/22 (68,2)
Ag5X	4/8 (50,0)	3/8 (37,5)	2/4 (50,0)	9/20 (45,0)
Eg23X	2/6 (33,3)	2/6 (33,3)	2/6 (33,3)	6/18 (33,3)
Eg23P	2/3 (66,6)	1/3 (33,3)	3/3 (100,0)	6/9 (66,6)
Eg23F/B	1/6 (16,6)	3/6 (50,0)	2/6 (33,3)	6/18 (33,3)
Eg24X	2/6 (33,3)	3/6 (50,0)	2/6 (33,3)	7/18 (38,9)
Eg31P	1/3 (33,3)	3/3 (100,0)	2/3 (66,6)	6/9 (66,6)
Eg32X	1/3 (33,3)	2/3 (66,6)	2/3 (66,6)	5/9 (55,5)
Ig42X	1/3 (33,3)	2/3 (66,6)	1/3 (33,3)	4/9 (44,4)
Ir12X	2/3 (66,6)	1/3 (33,3)	2/3 (66,6)	5/9 (55,5)
Ir14X	4/6 (66,6)	2/6 (33,3)	3/6 (50,0)	9/18 (50,0)
Ic70X	4/6 (66,6)	1/6 (16,6)	3/6 (50,0)	8/18 (44,4)
Ic74P	2/3 (66,6)	1/3 (33,3)	2/3 (66,6)	5/9 (55,5)
Ic74F/B	1/3 (33,3)	3/3 (100,0)	3/3 (100,0)	7/9 (77,7)
Ic76X	2/3 (66,6)	2/3 (66,6)	1/3 (33,3)	5/9 (55,5)
Ic76F/B	2/3 (66,6)	1/3 (33,3)	1/3 (33,3)	4/9 (44,4)
Total	37/73 (50,7)	36/73 (49,3)	34/67 (50,7)	107/213 (50,2)

Tabela 14. Polimorfismo genético observado entre as 16 amostras de *Trypanosoma cruzi*, isoladas de mamíferos silvestres capturados no Estado de São Paulo. Distribuição do número de amostras e respectivos hospedeiros, segundo os municípios de origem e os genótipos de *T. cruzi*.

	Municípios			Total
	Araraquara	Eldorado	Ilhabela	
<i>T. cruzi</i> I	2 <i>Didelphis</i>	5 <i>Didelphis</i>	0	7
<i>T. cruzi</i> II	0	1 <i>Didelphis</i>	1 <i>Didelphis</i>	2
Não Definido	0	0	2 <i>Proechimys</i> 5 <i>Philander</i>	7
Total	2	6	8	16

Tabela 15. Índice de similaridade entre os “clustres” de *T. cruzi*, isolados de animais silvestres, determinados pela técnica de RAPD. Os números representam os percentuais de bandas compartilhadas entre os isolados. A, B e C correspondem aos “clusters” derivados a partir do método de Parsimônia de Wagner.

	A	B	C	Eg23X	Ig42X	G
A	72					
B	25	82				
C	32	51	100			
Eg23X	26	33	33	100		
Ig42X	31	24	31	31	100	
G	29	31	54	25	23	100

A = isolados de *Proechimys* e de *Philander*, sem genotipo definido pelo gene de mini-exon, da Ilhabela; B = isolados de *Didelphis* tipo *T. cruzi* I de Eldorado; Eg23X = isolado de *Didelphis* tipo *T. cruzi* II de Eldorado; C = isolados de *Didelphis* tipo *T. cruzi* I de Araraquara; Ig42X = isolado de *Didelphis* tipo *T. cruzi* II de Ilhabela e G = controle cepa G.

Figura 1. Mapa do Estado de São Paulo mostrando os limites oriental e ocidental que delimitam a antiga área endêmica, em relação aos domínios morfo-estruturais. Reproduzido e adaptado de Silva, 1980.

Figura 2. Mapa do Estado de São Paulo mostrando a localização das micro-regiões homogêneas e respectivos municípios estudados.

10µm

FIGURA 3. Esfregaço sangüíneo corado pelo Giemsa: A) Forma tripomastigota do subgênero ***Megatrypanum***, provavelmente ***Trypanosoma freitasi***, encontrado em ***Didelphis albiventris*** (A4); B) Formas tripomastigotas do subgênero ***Herpetosoma*** encontradas em ***Proechimys iheringe*** (I34).

Figura 4. Níveis de parasitemias máximas observadas em ratos Wistar e camundongos BALB/c, normais e submetidos à imunodepressão pela ciclofosfamida, inoculados com 3×10^5 metacíclicos de *Trypanosoma cruzi* isolados de *Didelphis marsupialis* e *D. albiventris*, capturados no Estado de São Paulo.

Figura 5. Níveis de parasitemias máximas observadas em ratos Wistar e camundongos BALB/c, normais e submetidos à imunodepressão pela ciclofosfamida, inoculados com 3×10^5 metacíclicos de *Trypanosoma cruzi* isolados de *Philander opossum* e *Proechimys iheringi*, capturados no Estado de São Paulo.

10µm

Figura 6. Esfregaço sangüíneo corado pelo Giemsa:

- A) tripomastigota delgada (**Eg23X**);
- B) e C) tripomastigotas intermediárias (**Eg23X** e **Ic76X**);
- D) tripomastigota larga em forma de “C” (**Eg23X**);
- E) tripomastigota muito larga (**Eg31P**);
- F) tripomastigota muito larga com núcleo situado na porção anterior (**Eg24X**).

Figura 7. Impressão de órgãos "imprint" corado pelo Giemsa:

- A) e B) formas amastigotas no citoplasma de macrófagos no coração (**Eg23X**);
 C) amastigota isolada no coração (**Eg31P**);
 D) amastigotas agrupadas no coração (**Eg31P**);
 E) amastigotas intracelulares na medula óssea (**Ic70X**);
 F) amastigotas livres na medula óssea (**Ic70X**).

FIGURA 8. Esfregaço de cultura em meio LIT corado pelo Giemsa:

- A) epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* em divisão (lc74F/B);
- B) epimastigotas longa e larga (lc70X);
- C) epimastigotas apresentando variabilidade de formas (lr12X);
- D) epimastigotamédia e tripomastigota metacíclica longa (Eg24X);
- E) tripomastigota metacíclica longa (Eg31P);
- F) tripomastigota metacíclica de tamanho médio entre duas epimastigotas (lr14X).

100pb = marcador de peso molecular

pb = pares de bases

G = cepa referência de *T. cruzi* isolada de *Didelphis* da Amazônia

Y = cepa referência de *T. cruzi* isolada de caso humano

Figura 9. Resultados dos produtos amplificados pela técnica de PCR, do fragmento de kDNA minicírculo, de 16 amostras de *Trypanosoma cruzi* isoladas de animais silvestres capturados no Estado de São Paulo, Brasil. Eletroforese em gel de agarose 2%, corado com Brometo de etidium, mostrando os produtos de 330 pb, específicos para *T. cruzi*.

100pb = marcador de peso molecular

pb = pares de bases

G = cepa referência de *T. cruzi* isolada de *Didelphis* da Amazônia

Y = cepa referência de *T. cruzi* isolada de caso humano

Figura 10. Resultados dos produtos amplificados pela técnica de PCR, de um segmento da região intergênica do gene de mini-exon, de 16 amostras de *Trypanosoma cruzi* isoladas de animais silvestres capturados no Estado de São Paulo, Brasil. Eletroforese em gel de agarose 2%, corado com Brometo de etidium, mostrando os produtos de 350 pb que caracterizam *T. cruzi* I e, de 300 pb que caracterizam *T. cruzi* II.

Figura 11. Padrões de RAPD obtidos com a amplificação de DNA de *Trypanosoma cruzi* isolados de animais silvestres, capturados no Estado de São Paulo, com os “primers”: A) 625; B) 615.

Figura 12. Padrões de RAPD obtidos com a amplificação de DNA de *Trypanosoma cruzi* isolados de animais silvestres, capturados no Estado de São Paulo, com os "primers": A) 606; B) 601.

Figura 13. Dendrograma das 16 amostras de *Trypanosoma cruzi* isoladas de animais silvestres construído a partir de padrões de RAPD com o método de Parsimônia de Wagner. Os números correspondem aos valores de "bootstrap" de 100 replicas.

VI. DISCUSSÃO

1. Situação epidemiológica da doença de Chagas:

O Estado de São Paulo e, sobretudo, a região do Planalto Ocidental Paulista, já representou uma importante área endêmica de doença de Chagas no país. Com o estabelecimento de um amplo programa de controle da transmissão da doença, iniciada na década de 50, obteve-se a erradicação da infestação intradomiciliar do *T. infestans* e a interrupção da transmissão por triatomíneos. Por outro lado, em áreas como o Vale do Ribeira e Litoral Paulista, onde não há evidências, até o momento, de domiciliação triatomínica, os raros casos agudos registrados de infecção humana por transmissão vetorial foram vinculados ao contato do homem com o ambiente silvestre (CIARAVOLO et alii, 1997). Atualmente, nessas regiões, têm sido desenvolvidas atividades de vigilância entomológica com ações integrando o órgão executor, a rede de atenção à saúde e a participação da população na notificação dos triatomíneos (WANDERLEY, 1994b).

Muito embora o Estado de São Paulo apresente uma situação epidemiológica que não favorece a transmissão humana da tripanossomíase americana, a constatação da presença de triatomíneos com hábitos de domiciliação, como *P. megistus* e *T. sordida*, em áreas submetidas ao Programa de Vigilância Epidemiológica, é de grande importância. Estudos sobre dinâmica populacional desses artrópodes no intradomicílio e peridomicílio ou pelo emprego de galinheiros experimentais, mostraram que

essas espécies podem reinfestar áreas já controladas e manter a circulação do *T. cruzi* nesses ambientes (FORATTINI et alii, 1977, 1979 e 1984).

Dados relativos ao Programa de Controle no Estado, também apontaram estas características, havendo diferenças entre as duas espécies quanto à densidade de colonização nos ambientes e nos índices de infecção natural (WANDERLEY, 1994b). Dessa forma, *P. megistus* tem apresentado maiores taxas de infecção por *T. cruzi*, contrastando com uma menor frequência no ambiente domiciliar. Em outras regiões do país, comportamento semelhante também tem sido assinalado. Assim, DIOTAIUTI et alii (1993) mostraram, em algumas regiões do Estado de Minas Gerais, que *T. sordida* e *P. megistus* são espécies que têm predominado nas casas de áreas rurais, depois da eliminação do *T. infestans* no intradomicílio. FERNANDES et alii (1992) mostraram a possibilidade do *P. megistus* reintroduzir a transmissão natural da doença de Chagas em Bambuí, MG. A captura, na região, de exemplares parasitados por *T. cruzi*, pertencentes aos Zimodemas Z1 e Z2, sugere que essa espécie esteja atuando como elemento de ligação entre os diferentes ciclos epidemiológicos de transmissão.

2. Avaliação do potencial de domiciliação de triatomíneos:

No presente estudo, o potencial de domiciliação de triatomíneos foi demonstrado pela colonização de adultos e ninfas de *P. megistus* em ecótopo artificial, utilizando-se galinheiro experimental instalado em um

resíduo de mata no sítio Carandá, localizado a 12 Km da área urbana do município de Araraquara, região do Planalto Ocidental Paulista.

Segundo FORATTINI et alii (1980a), a tendência dessa espécie em ocupar ecótopos artificiais parece estar relacionada com as alterações ambientais, responsáveis pela diminuição das matas úmidas e pelas características climáticas regionais, definidas por inverno seco e verão chuvoso. Nestas condições *P. megistus* mantém este comportamento em ambientes de matas residuais ou, até mesmo, em pequenas áreas florestadas. Os resultados obtidos na área em estudo, onde o galinheiro foi instalado e onde tem sido demonstrada a domiciliação triatomínica vem confirmar essas observações.

Quanto à infecção natural por *T. cruzi*, essa não foi observada sendo a pesquisa de tripanossomos nas fezes dos triatomíneos realizada por amostragem, sugerindo ser baixa a circulação do parasita na área. Por questões operacionais não foram instalados galinheiros experimentais nas regiões do Vale do Ribeira e Litoral Norte. Mas, dados da literatura mostram que, em áreas florestais mais preservadas do domínio tropical atlântico, como nesses casos, a domiciliação triatomínica em ecótopos artificiais não tem ocorrido (FORATTINI et alii 1980a). Porém, infecção natural por *T. cruzi* já foi assinalada em triatomíneos adultos, capturados no ambiente humano, em áreas rurais dos municípios do Vale do Ribeira e Litoral, demonstrando, desta forma, a circulação enzoótica do flagelado nestas regiões (CIARAVOLO et alii, 1997).

Indiscutivelmente, o controle da transmissão vetorial no Estado de São Paulo fez com que a doença de Chagas deixasse de ser um problema de Saúde Pública. Neste processo, foram gerados profundos conhecimentos sobre populações triatomínicas e suas interrelações com o ambiente humano, que serviram de base e, até mesmo, nortearam as ações de controle e vigilância. No entanto, informações sobre animais reservatórios e populações de *T. cruzi* que circulam em ambientes remanescentes não foram produzidas na mesma intensidade. Foi dentro desta perspectiva que o presente estudo foi direcionado, qual seja, o de contribuir para o reconhecimento dos animais reservatórios responsáveis pela manutenção da zoonose e a identificação dos flagelados neles encontrados, para que esses conhecimentos possam servir de apoio ao Programa de Vigilância Epidemiológica. Principalmente, devido a existência, no Estado, de focos naturais preservados, em áreas de antiga transmissão e sob controle, e de focos ainda desconhecidos em áreas consideradas indenes e que merecem a atenção por parte da vigilância epidemiológica.

3. Animais silvestres:

A infecção natural pelo *T. cruzi* em reservatórios animais tem sido observada e estudada na maioria dos países do Continente Americano (BARRETTO, 1985), mesmo em regiões onde a tripanossomíase não é endêmica (KARSTEN et alii, 1992; KIRCHHOFF, 1993). Segundo a OMS (1991), já foram descritas mais de 150 espécies e subespécies de animais silvestres, sinantrópicos e domésticos infectados pelo protozoário.

BARRETTO e RIBEIRO (1979) em trabalho de revisão já haviam reconhecido, no entanto, mais de 200 espécies de mamíferos distribuídos desde os Estados Unidos da América até a Argentina. No Brasil, a infecção natural pelo flagelado já foi constatada em aproximadamente um quarto das espécies de animais reservatórios descritas para o Continente.

Os mamíferos pertencentes às ordens **Marsupialia** e **Rodentia** são os reservatórios mais importantes de *T. cruzi*. A importância desses animais tem sido assegurada por apresentarem características como: capacidade em colonizar ecótopos naturais e artificiais variados, alta densidade, ampla distribuição geográfica, alto grau de relacionamento com espécies triatomínicas transmissoras e elevadas taxas de infecção natural, (BARRETTO, 1985; MELLO et alii, 1982; SCHLEMPER et alii, 1985).

Neste estudo, os animais procederam de ambientes silvestres, exceto os roedores do gênero *Rattus*, que foram capturados em áreas de matas próximas aos domicílios. Os mamíferos da ordem **Marsupialia** representaram 53,5% (106/198) do total de animais capturados. As espécies dos Gêneros *Didelphis* e *Philander* foram as mais freqüentes, com taxas de captura de 31,3% (62/198) e 17,7% (35/198), respectivamente. Quanto à distribuição desses animais, houve diferenças específicas para cada região. Assim, *D. albiventris* representou a espécie predominante na região do Planalto Ocidental Paulista 51,6% (47/91), já *D. marsupialis* teve sua ocorrência assinalada no Vale do Ribeira (municípios de Eldorado e Iguape) e Litoral Norte; perfazendo 25,0% (11/44) e 6,3% (4/63) do total das capturas nas duas regiões, respectivamente. Da mesma forma, *Philander opossum*

foi espécie predominante no Litoral Norte, com índice de captura de 54,0% (35/63).

Os mamíferos da ordem **Rodentia** representaram 43,9% (87/198) do total de animais estudados. Este grupo apresentou maior diversidade de espécies, sendo os gêneros **Akodon**, **Proechimys** e **Oryzomys** os mais freqüentes, com taxas de capturas de 14,1% (28/198), 7,1% (14/198) e 5,1% (10/198), respectivamente. Como observado na ordem **Marsupialia**, os roedores também apresentaram diferenças quanto à distribuição geográfica das espécies. Assim, a ocorrência do gênero **Akodon** foi assinalada no Planalto Ocidental Paulista e Vale do Ribeira, com índices de capturas de 20,9% (19/91) e 20,4% (9/44), respectivamente. Já a espécie **Proechimys iheringi** predominou no Litoral Norte, correspondendo a 22,2% (14/63) das capturas, enquanto que **Oryzomys** foi encontrado, exclusivamente, no Vale do Ribeira, representando 22,7% (10/44) dos animais capturados na região.

Os mamíferos da ordem **Carnivora** apresentaram menores índices de captura, 2,5% (5/198), sendo representados por exemplares do gênero **Nasua**, procedentes da região do Planalto Ocidental Paulista. Cabe ressaltar que a metodologia adotada nas capturas dos animais silvestres, com o emprego de armadilhas do tipo Tomahawk e Sherman, como também, os tipos de iscas utilizadas favoreceram as capturas de marsupiais e roedores.

Durante o período de capturas dos reservatórios algumas tentativas foram feitas para localizar refúgios naturais de **Didelphis** e roedores, com o intuito de encontrar triatomíneos associados e estudar os tripanossomos neles encontrados. Mesmo que esta atividade não tenha sido realizada de

maneira sistemática, na maioria das vezes, falharam em revelar tais refúgios, mas quando encontrados não apresentaram triatomíneos.

Resultados diferentes foram relatados por vários autores em outras regiões do país. Assim, MELLO (1981) encontrou 24% dos biótopos silvestres com triatomíneos, em áreas não endêmicas para a doença de Chagas, na região de cerrado do Estado de Goiás. Já, em área endêmica do mesmo Estado, este índice alcançou 34,2% (MELLO, 1982). SCHLEMPER Jr et alii (1985), no Estado de Santa Catarina, encontraram triatomíneos em cerca de 25% dos ninhos de animais silvestres examinados. MILES (1976), ao testar um novo dispositivo para seguimento de animais silvestres no interior de florestas, encontrou triatomíneos em 20% dos refúgios naturais localizados. É possível que diferenças metodológicas utilizadas para a localização dos biótopos e na coleta dos triatomíneos sejam responsáveis pelos resultados discrepantes.

4. Pesquisa de flagelados em animais silvestres:

No decorrer dos procedimentos para isolamento de *T. cruzi* em animais silvestres, foram constatadas infecções por outros flagelados pertencentes aos gêneros *Leishmania* e *Trypanosoma*. Dos 30 (15,1%) animais que apresentaram flagelados, em, pelo menos um procedimento, 6 (20,0%) não foram identificados por falta de dados que permitissem um diagnóstico correto.

De um roedor da espécie *P. iheringi*, procedente do município da Ilhabela, Litoral Norte, foi isolado protozoário do sub-gênero *L.*

(*Leishmania*). Cabe ressaltar que, na mesma região, durante a investigação de campo, foram diagnosticados, por outro grupo de trabalho, casos humanos e caninos de Leishmaniose Cutânea Americana devido à *L. (Viannia) braziliensis*. Este dado mostra a existência de diferentes subgêneros de *Leishmania* circulando na região (TOLEZANO et alii, 1999). Essa característica epidemiológica já foi assinalada em outras áreas do Estado de São Paulo, tendo como reservatórios descritos, roedores dos gêneros *Oryzomys* e *Akodon* (FORATTINI et alii, 1973; TOLEZANO et alii, 1988) e marsupial da espécie *D. marsupialis* (YOSHIDA et alii, 1979).

A identificação presumível de *T. freitasi* foi baseada em critérios morfológicos dos tripomastigotas sangüíneos e no comportamento biológico. Apesar de ser constatada baixa parasitemia, *T. freitasi* foi detectado no sangue circulante de 7 (87,5%), dos 8 animais parasitados. O não desenvolvimento em triatomíneos e a dificuldade no isolamento e na manutenção dos flagelados em meio de cultura acelular, foram outras características observadas que confirmaram os relatos de outros autores (REGO et alii, 1957; Deane, 1964; Silva et alii, 1976).

Ao que tudo indica, *T. freitasi* apresenta uma especificidade quanto ao hospedeiro vertebrado. O primeiro encontro do flagelado foi descrito por REGO et alii (1957), no município de Ribeirão Preto, Estado de São Paulo, no sangue de exemplares de *D. albiventris*. Posteriormente, DEANE (1964) registrou o encontro do protozoário em um *D. marsupialis* capturado na região amazônica. Mais recentemente, DEANE e JANSEN (1986) assinalaram o encontro dessa espécie no conteúdo das glândulas anais de

D. marsupialis, provenientes do Estado do Rio de Janeiro, mostrando que este comportamento não se restringe somente ao *T. cruzi*.

Na presente investigação, *T. freitasi* foi observado em mamíferos da ordem **Marsupialia**, sendo 6 *D. albiventris* e 2 *Gracilinanus sp* (antigo gênero **Marmosa**), todos capturados no município de Araraquara, região do Planalto Ocidental Paulista (Figura 3 A). A taxa de infecção geral foi de 9,8% (9/91), não sendo observado parasitismo associado com outros tripanossomos. Já, DEANE e JANSEN (1990) encontraram em *D. marsupialis*, taxas de infecção de 38,7%, em alguns animais apresentando infecções associadas com *T. cruzi*. As diferenças observadas entre as taxas de infecções podem estar relacionadas com a metodologia do isolamento primário. THOMAZ e DEANE (1990), confirmaram as dificuldades no estabelecimento de cultivo “in vitro” quando utilizados meios bifásicos ou meios líquidos convencionais. Segundo os autores, só foi possível obter crescimento exuberante e contínuo dos flagelados quando utilizaram, para cultivo, linhagens de células de fibroblastos de camundongos.

A presença de tripanossomos do subgênero **Herpetosoma** foi constatada em dois roedores capturados no município de Ilhabela, sendo um *P. iheringi* e outro de espécie não identificada. Nesse subgênero está incluído, sobretudo, espécies de tripanossomos parasitas de roedores. Segundo BARRETTO e RIBEIRO (1981), este grupo de flagelados apresenta características comuns quanto à morfologia, biologia e especificidade em relação ao seus hospedeiros vertebrados.

Neste estudo, as formas tripomastigotas sangüíneas, encontradas nos dois animais, eram semelhantes àquelas descritas para o referido subgênero (Figura 3 B). Não foram evidenciadas formas parasitárias de desenvolvimento intracelular através do exame das impressões de órgãos e do cultivo de vísceras. O exame das hemoculturas provenientes dos dois roedores apresentaram inicialmente flagelados, no entanto, não foi possível a manutenção continuada desses protozoários. O fato do xenodiagnóstico ser negativo nos dois roedores parasitados, aliado a morfologia típica, vem reforçar o diagnóstico de tripanossomos pertencentes ao subgênero ***Herpetosoma***.

Tentativas de estabelecimento de tripanossomos do subgênero ***Herpetosoma*** em meios de cultura convencionais sempre resultaram em insucessos (DEANE, 1961; BARRETO e RIBEIRO, 1981). Por outro lado, TOLEZANO et alii (1984) demonstraram que tripanossomos do subgênero ***Herpetosoma*** isolados de ***P. iheringi***, apresentavam intenso crescimento em meios de cultura convencionais, quando estes eram suplementados com sangue de vertebrados da espécie da qual foi obtido o isolamento.

5. Infecção natural por *T. cruzi* em animais silvestres:

Ao contrário de outros tripanossomos, ***T. cruzi*** apresentou um carácter eurixeno, ou seja, foi observado em marsupiais e roedores de diferentes espécies. Assim, a infecção natural por ***T. cruzi*** foi encontrada em 13 mamíferos capturados nas três regiões estudadas, sendo um ***D. albiventris***, 5 ***D. marsupialis***, 3 ***P. opossum***, 3 ***P. iheringe*** e 1 ***Oryzomys***

sp. Todas as espécies animais, aqui encontradas, já foram assinaladas por outros autores em várias regiões (BARRETTO e RIBEIRO, 1979; BARRETTO, 1985 ; OMS, 1991), não ocorrendo, desta forma, a descrição de novos reservatórios.

Houve nítida diferença nas taxas de infecção geral e por espécies de animais reservatórios nas três regiões estudadas. Desta forma, no Planalto Ocidental Paulista, município de Araraquara, o índice de infecção geral foi de 1,1% (1/91). Entre os animais do gênero ***Didelphis***, este índice foi de 2,1% (1/47). Já, nos 33 roedores capturados, neste município, nenhum apresentou infecção por ***T. cruzi*** ou por outro tripanossomo. No Vale do Ribeira, nos municípios de Eldorado e Iguape, a taxa de infecção geral para ***T. cruzi*** foi de 11,4% (5/44). Entre os ***Didelphis***, o índice de infecção foi de 36,3% (4/11) e, dentre os roedores, de 3,3% (1/30). No Litoral Norte, município de Ilhabela, a taxa de infecção geral foi de 11,1% (7/63), semelhante à observada no Vale do Ribeira. Porém os índices de infecção variaram de 25,0% (1/4) entre os ***Didelphis***, 8,8% (3/34) entre os ***Philander*** e, 21,4% (3/14) entre os ***Proechimys***.

Cabe ressaltar que em Araraquara foi registrado o mais baixo índice de infecção natural entre animais reservatórios (1,1%). Considerando que esta região foi marcada por grandes transformações econômicas, sociais e ambientais e, ainda, pelas ações do Programa de Controle da doença de Chagas, torna-se lícito admitir que tais ocorrências possam ter repercutido sobre o ciclo de transmissão silvestre do ***T. cruzi***. Isso pode significar que a área estudada represente um foco natural residual em extinção ou em plena

dispersão. Por outro lado, não se pode deixar de considerar, também, como foco natural originalmente de baixa atividade. Já, nas regiões do Vale do Ribeira e Litoral Norte, onde a situação econômica e social tem sido mais estável e as alterações ambientais menos intensas, as taxas gerais de infecção natural foram de 11,4% a 11,1%, respectivamente.

Recentemente, FERNANDES et alii (1999) observaram diferenças significativas nas taxas de infecções em *Didelphis* capturados em distintas localidades do Estado do Rio de Janeiro, mas pertencentes ao mesmo sistema ecológico (Mata Tropical Atlântica Costeira). Estes achados levaram os autores a concluir que, em relação à transmissão do *T. cruzi*, cada ecótopo representa uma unidade com características epidemiológicas próprias, não permitindo que se faça generalizações entre diferentes áreas em estudo.

Com relação aos índices de infecção por espécies, os dados aqui alcançados confirmam a importância dos marsupiais, sobretudo, do gênero *Didelphis*, na transmissão silvestre do *T. cruzi*. Para a espécie *D. albiventris*, MELLO (1982) encontrou índice de infecção de 20,6% (15/73) em região de cerrado, no município de Mambai, Estado de Goiás. Já, FERNANDES et alii (1991), em área sob Vigilância Epidemiológica para o controle da doença de Chagas, no Estado de Minas Gerais, obtiveram taxas de 37,9% (44/116). Para o Estado de São Paulo, BARRETTO e RIBEIRO (1979), em revisão detalhada, apontaram índices de infecção natural que variaram de 18,6% a 21,4%, para vários municípios Paulistas. Da mesma forma, para *D. marsupialis*, os mesmos autores relataram taxas

semelhantes de infecção para o Estado de São Paulo de 19,8% e índices mais elevados de 91,7% e 35,7%, em outros Estados.

Neste estudo, outro marsupial encontrado naturalmente infectado foi do gênero *Philander*, que apresentou uma frequência de positividade de 8,8% (3/34) para os animais capturados no município de Ilhabela. Entre nós, DEANE (1964) descreveu pela primeira vez esta espécie como reservatório de *T. cruzi* em exemplares capturados na região amazônica. O autor obteve taxa de 40% de infecção natural, mesmo em um pequeno número de espécimes capturada (2/5), ressaltando a importância desse gênero na transmissão silvestre do flagelado na região. Recentemente, FERNANDES et alii (1999) encontraram índice de infecção para este gênero de 43% (18/42), utilizando como técnica de isolamento a hemocultura, aplicada em animais procedentes de diversas localidades do Estado do Rio de Janeiro.

Em relação aos roedores, os dados aqui obtidos confirmam a menor importância do grupo, em relação aos marsupiais, na transmissão silvestre da tripanossomíase americana em algumas regiões. Assim, foram obtidos índices de infecção de 3,3% no Vale do Ribeira, com o encontro de 1 *Oryzomys sp* infectado entre os 30 animais examinados e, índice nulo para roedores capturados em Araraquara. Por outro lado, o encontro de 21,4% (3/14) de *P. iheringi* naturalmente infectados, no município de Ilhabela, mostra que, para a região, esta espécie representa um elemento importante no ciclo enzoótico do flagelado.

Diferenças nas frequências de infecção natural entre roedores silvestres já foram assinaladas por outros autores na mesma região e em

regiões diferentes do país. MELLO (1981), no município de Formosa, Estado de Goiás, relatou o encontro de um exemplar de *Calomys callosus*, infectado entre 963 roedores estudados. Posteriormente, o mesmo autor verificou que, entre os 151 roedores capturados no município de Mambai, Estado de Goiás, 2 *Trychomys apereoides*, 1 *Zygodontomys lasiurus* e 1 *C. callosus* estavam infectados com *T. cruzi* (MELLO, 1982). No Estado de São Paulo, FORATTINI (1969) havia observado frequência de infecção de 0,28% para *Akodon arviculoides* e de 0,14% para *Oryzomys nigripes*, capturados em região de cerrado do município de Salto de Pirapora. Porém, BARRETTO e RIBEIRO (1979) apontaram cifras de 12,8% para *Cavia aperea*, 15,8% para *Dasyprocta azarae* e 18,4% para *A. arviculoides*, capturados na região de Ribeirão Preto.

Por não ter sido possível isolar parasitas em dois roedores dos gêneros *Proechimys* e *Oryzomys*, o diagnóstico presumível da infecção natural por *T. cruzi* foi baseada, para a primeira espécie animal, no encontro de formas tripomastigotas metacíclicas nas fezes de ninfas de triatomíneos provenientes do xenodiagnóstico e, para a segunda espécie, no encontro de flagelados no exame direto e presença de formas amastigotas no baço. Nos outros onze animais, o diagnóstico da infecção por *T. cruzi* foi obtido a partir da caracterização biológica dos isolados por meio de critérios morfológicos, desenvolvimento dos flagelos em meio de cultura acelular e celular, evolução em animais de experimentação e em vetores. Para confirmação diagnóstica, foi usada metodologia molecular com análise do minicírculo de kDNA pela técnica de PCR.

6. Isolamento de *T. cruzi* em animais silvestres:

O isolamento de *T. cruzi* foi obtido por 3 procedimentos diferentes. Desta maneira, a partir dos 11 animais silvestres, foram isoladas 16 amostras do protozoário, sendo 56,2% (9/16) delas por xenocultura, 25,% (4/16) por hemocultura e 18,7% (3/16) pela cultura do material de aspirado de vísceras. Dentre as técnicas utilizadas, a xenocultura foi a que apresentou melhor eficiência no isolamento das amostras. Este processo consistiu no cultivo, em meio acelular, do conteúdo intestinal de ninfas infectadas usadas no xenodiagnóstico. O bom desempenho do processo já foi constatado no isolamento de amostras humanas (BISUGO et alii, 1998) e de mamíferos silvestres capturados em outras regiões (PIETROKOVSKY et alii, 1991; WISNIVESKY-COLI et alii, 1992).

As variações na eficiência das três técnicas usadas para isolamento poderiam ser explicadas pelas baixas parasitemias observadas na maioria dos animais estudados. Assim, nos 11 animais, em que foi possível o isolamento de amostras do protozoário, 6 (54,5%) não apresentaram flagelados no exame direto, indicando que, no momento da realização dos procedimentos, as parasitemias eram baixas ou subpatentes. Além disso, os animais foram submetidos aos três procedimentos no mesmo momento e em uma única vez. Neste sentido, RIBEIRO et alii (1984) demonstraram que, quando o xenodiagnóstico e a hemocultura foram empregados de forma seriada, em *Didelphis* naturalmente infectados por *T. cruzi*, ocorreu um aumento significativo na eficiência dos dois métodos. Segundo os autores, as parasitemias em animais com infecção natural são, geralmente,

subpatentes e de longa duração, como observadas nas infecções humanas crônicas.

Tem sido demonstrado que isolados de *T. cruzi*, originários de casos humanos, de vetores e de animais silvestres, após período de adaptação em condições de laboratório, adquirem padrões de comportamento biológico bem definidos, relacionados com a morfologia, virulência, tropismo tecidual, entre outros. Essas características biológicas representam apenas alguns dos critérios adotados no diagnóstico específico, na classificação e nos estudos de variabilidade dentro do grupo (ANDRADE, 1974; BRENER, 1985; MAGALHÃES e ANDRADE, 1991; ZINGALES et alii, 1997).

7. Caracterização biológica dos isolados:

O acompanhamento da infecção em animais de laboratório permite obter informações sobre a morfologia das formas sangüíneas, sobre a virulência, através do estabelecimento dos períodos pré-patente e patente, níveis de parasitemia e mortalidade, e sobre a patogenicidade, avaliada pela capacidade de invasão dos flagelados nos tecidos e pelas características das lesões produzidas nos órgãos. Desta forma, ANDRADE (1974) descreveu três padrões de comportamento em camundongos experimentalmente infectados com cepas de *T. cruzi* isoladas de casos humanos. Assim, esse autor estabeleceu que cepas do tipo I apresentam, como características biológicas, a alta virulência, o predomínio de tripomastigotas delgadas e reticulotropismo no início da infecção e miotropismo aparecendo tardiamente; do tipo II, apresentam média

virulência, o predomínio de formas tripomastigotas largas, com formas delgadas, aparecendo somente no início da infecção e com miotropismo predominante; e do tipo III, apresentam baixa virulência, com predomínio de formas largas e miotropismo em todo o curso da infecção.

Tem sido aceito que amostras isoladas de animais reservatórios, em geral, são menos virulentas para animais de laboratório do que as amostras isoladas de casos humanos (BARRETTO, 1965; MELLO, 1979; FERNANDES et alii, 1991; HERRERA e URDANETA-MORALES, 1992; HERRERA e URDANETA-MORALES ,1997). Segundo BARRETTO (1965), os dados da literatura sobre o comportamento da infecção em animais de experimentação não podem ser comparados devido à falta de padronização dos ensaios. O autor aponta, como fatores que podem influenciar nos resultados, o inóculo (número e forma) e o animal de laboratório utilizado (idade, espécie e sexo). No entanto, mesmo dentro de condições padronizadas, tem sido observadas diferenças na evolução da infecção experimental entre amostras isoladas de diferentes espécies de animais silvestres, sobretudo de *Didelphis*, com a ocorrência de algumas amostras infectando camundongos e ratos e outras infectando somente ratos (BARRETTO et alii, 1980).

Considerando, no presente estudo, que foram usados isolados recentes, utilizou-se como inóculo 3×10^5 tripomastigotas metacíclicas obtidas de meio LIT, por animal e administradas pela via intraperitoneal. Nestas condições, todas as amostras infectaram animais de laboratório, havendo, no entanto, variações quanto ao comportamento da infecção

conforme a espécie de animal de experimentação utilizada. Assim, foram observados três perfis de comportamento: perfil I. com parasitemias patentes em ratos e camundongos; perfil II. parasitemias patentes em ratos e sub-patentes em camundongos e; perfil III. parasitemias baixas ou sub-patentes em ratos e ausentes em camundongos. As amostras de *T. cruzi* isoladas de *Didelphis* apresentaram os 3 perfis de comportamento, confirmando a existência de variações comportamentais entre os isolados de *T. cruzi* originários dessa espécie de reservatório. Já, as amostras isoladas de *Proechimys* e *Philander* apresentaram somente o perfil I.

No *Didelphis* E23, capturado no Vale do Ribeira, município de Eldorado, em que foi possível isolar o flagelado pelas três metodologias (Eg23X, pela xenocultura; Eg23P, pela hemocultura e; Eg23F/B, pela cultura do material de aspirado de vísceras), as amostras apresentaram os três perfis de comportamento. Este dado mostra a possibilidade de seleção de diferentes populações de tripanossomos circulantes em um mesmo reservatório, quando utilizados diferentes procedimentos para o isolamento.

Admite-se que diferentes cepas de *T. cruzi* poderiam ser selecionadas de uma população heterogênea. O processo de seleção atuaria no ciclo de transmissão natural, explicando, desta forma, a predominância de certas populações de parasitas em diferentes regiões geográficas, ou em condições experimentais, determinadas pelas passagens seriadas em animais de laboratório ou em meios de cultura (DEANE et alii, 1984; CARNEIRO et alii, 1991). Experimentalmente, DEANE et alii (1984) demonstraram a co-existência de mais de uma população de *T. cruzi* no

mesmo hospedeiro. Os autores, também, mostraram que o uso de diferentes esquemas de inoculação, re-inoculação e re-isolamento, podem favorecer a circulação de uma ou de outra população de parasitas no hospedeiro. Por outro lado, alguns autores não constataram a seleção de subpopulações de *T. cruzi*, quando utilizado os processos de isolamento pelo xenodiagnóstico ou pela hemocultura (ROMANHA et alii, 1989; FERNANDES et alii, 1991).

Considerando que, no presente estudo, o objetivo inicial da caracterização biológica foi verificar se os isolados apresentavam infectividade para ratos Wistar e/ou camundongos BALB/c, como critério de identificação de *T. cruzi*, o número de animais por experimento foi reduzido. Desta forma, foram utilizados como parâmetros os valores mínimos e máximos do período pré-patente e patente, os níveis máximos de parasitemias e a mortalidade. Pela análise destes parâmetros constantes nas Tabela 6 e 8, e dentro das condições de padronização dos experimentos, todos os isolados estudados apresentaram baixa virulência para animais de laboratório, concordando com os relatos de outros autores para animais silvestres já citados.

Como os níveis máximos de parasitemias em camundongos BALB/c e ratos Wistar foram baixos e, em alguns casos, não detectados no exame direto, foram utilizados animais das duas espécies submetidos à imunodepressão pela ciclofosfamida. Este procedimento teve a finalidade de induzir a elevação da parasitemia e do parasitismo tecidual. O esquema de imunodepressão foi baseado em experiência prévia, estabelecida pela Dra. Gentilda Kazuko Funayama Takeda, do Instituto de Ciências Biomédicas da

USP (comunicação pessoal). A utilização de substância imunodepressora no esquema aqui preconizado proporcionou parasitemias mais elevadas em relação aos animais normais (Tabelas 7 e 9), facilitando o encontro dos flagelados no sangue e nos órgãos. Este procedimento representou um recurso útil nos estudos iniciais dos isolados de animais silvestres. Mesmo assim, nas amostras **Ag5X** e **Ag5P**, isoladas de um *Didelphis* capturado em Araraquara, a administração do imunodepressor não exacerbou as parasitemias. Cabe ressaltar, no entanto, que parâmetros como o período pré-patente, patente e mortalidade, sobretudo, em camundongos BALB/c, sofreram variações decorrentes, provavelmente, da utilização do imunodepressor.

Os aspectos morfológicos das tripomastigotas sangüíneas representam o primeiro elemento de identificação entre os tripanossomos (BARRETTO, 1965; HOARE, 1972). Contudo, a identificação baseada somente nas características morfológicas pode induzir a erros no diagnóstico, uma vez que há tripanossomos com características morfológicas semelhantes a *T. cruzi*. A biometria das formas encontradas no sangue do hospedeiro vertebrado fornece parâmetros como o comprimento do corpo e do flagelo que, juntos com o índice nuclear e do cinetoplasto, auxiliam na identificação de tripanossomos. Porém, BARRETTO (1965) chama à atenção de que esses dados só apresentam valores no diagnóstico específico, quando são analisados com outros elementos. Segundo o autor, por existir variações acentuadas nas medidas dos flagelados em diferentes

amostras isoladas de hospedeiro da mesma espécie e em uma mesma amostra, tal fato limita a utilização do parâmetro isoladamente.

As tripomastigotas sangüíneas têm mostrado grande variabilidade na morfologia ao longo da infecção aguda em animais de experimentação. Desta forma, os flagelados têm sido classificados em formas delgadas, intermediárias, largas e muito largas (BRENER e CHIARI, 1963; BRENER, 1985; SCHLEMPER et alii, 1986).

Cepas de *T. cruzi* mantidas por longos períodos em condições experimentais, apresentam padrões de comportamento mais homogêneos, sendo usados como cepas de referência para estudos de caracterização, incluindo a morfobiológica. Assim a cepa Y, isolada de caso humano, tem como característica o predomínio de formas delgadas “clássicas” no início da fase aguda, apresentando, posteriormente, as formas intermediárias (ANDRADE, 1974). Já, na cepa CL, isolada a partir de fezes de triatomíneos, há predomínio das formas largas e muito largas (BRENER e CHIARI, 1963).

Tripomastigotas sangüíneas do tipo largo têm predominado na maioria das amostras de *T. cruzi*, isolados de casos humanos, triatomíneos e mamíferos silvestres (ANDRADE, 1974; BRENER e CHIARI, 1963; SCHLEMPER et alii, 1986). BRENER e CHIARI (1963) e, posteriormente, SCHLEMPER et alii (1986) apontaram o encontro de formas muito largas em amostras isoladas de triatomíneos e animais silvestres procedentes da região Sul do país, sugerindo que este padrão morfológico possa representar uma característica regional.

No presente trabalho, os tipos morfológicos foram estudadas ao longo da infecção experimental, como assinalado na Tabela 10. Foi observado polimorfismo, predominando, em todos os isolados, as formas intermediárias e largas. Formas muito largas apareceram no final da infecção, em amostras isoladas de *Didelphis*, sobretudo originárias do Vale do Ribeira, região sudeste do Estado de São Paulo. É possível que este dado venha reforçar a sugestão de que tripomastigotas sangüíneos do tipo muito largos, possam ter distribuição regional mais restrita.

O encontro de formas delgadas “clássicas” na amostra **Eg23X**, isolada de *Didelphis*, não teve, ao que tudo indica, relação com o aumento da virulência na infecção experimental. Este achado, no entanto, difere dos dados da literatura, onde as formas delgadas estão associadas à intensa reprodução tecidual, parasitemias elevadas e ascendentes e, alta mortalidade (BRENER, 1985). É possível que o resultado, aqui alcançado, tenha sido influenciado pelo seu recente isolamento. Neste sentido, BRENER e CHIARI (1963) relataram, por exemplo, que para a amostra CL, atingir níveis elevados de parasitemia em camundongos albinos foram necessárias 25 passagens, nesses animais, com intervalos de 8 a 10 dias entre elas.

O encontro de parasitas nos tecidos, como assinala a Tabela 11, reafirma a infectividade das 16 amostras de *T. cruzi*, isoladas de animais silvestres. Apesar do encontro de amastigotas na medula óssea, fígado e baço, de intensidade variável, na maioria das amostras estudadas, o coração foi o órgão mais infectado, sendo constatada a presença do parasita

em 15(93,7%) das 16 amostras estudadas. Elevada intensidade de parasitismo foi observado, neste órgão, nos isolados **Eg23X**, **Eg23P** e **Eg31P**, todos de *Didelphis*. Desta forma, os dados evidenciam um maior tropismo para a musculatura cardíaca, como já apontado por diferentes autores, para amostras isoladas de animais silvestres (MELLO et alii, 1979; BARRETTO et alii, 1980; HERRERA e URDANETA-MORALES, 1997). Nota-se porém, que, nas amostras isoladas de *Proechimys* e *Philander*, houve igual tropismo, tanto para o coração, quanto para órgãos ricos em macrófagos como medula óssea, fígado e baço. Este “duplo tropismo”, provavelmente, deve estar relacionado com a heterogeneidade das formas sangüíneas encontradas. Com relação a esse aspecto, vários autores já mostraram, na infecção experimental, uma associação direta entre formas delgadas com parasitismo de macrófagos e formas largas com parasitismo cardíaco (ANDRADE, 1974; BRENER, 1985).

A técnica de impressão de órgãos “imprint” fornece uma idéia da capacidade de invasão dos flagelados em diferentes tecidos, não permitindo, no entanto, avaliar as características das lesões produzidas. Mas, estudos histopatológicos das amostras de *T. cruzi* isoladas de animais silvestres e de baixa virulência, em modelos experimentais murinos, têm mostrado padrões de lesões semelhantes às observadas na infecção natural em humanos e, na infecção experimental com cepas de origem humana (MELLO, 1978).

Com relação à cultivabilidade, em geral, todos os isolados apresentaram crescimento expressivo em meio LIT. A má adaptação inicial

observada na amostra **Ig42X** pode estar relacionada com as condições de criopreservação ou de descongelamento do isolado primário. Após o período de adaptação, foi possível a manutenção continuada, em meio LIT, das 16 amostras de *T. cruzi*, mediante repiques sucessivos, com intervalos semanais. Estes dados concordam com a literatura, onde amostras de *T. cruzi*, isoladas de casos humanos, triatomíneos e animais silvestres apresentam um bom desenvolvimento em meios artificiais bifásicos ou líquidos (CAMARGO, 1964; CHIARI, 1974; BARRETTO, 1980).

Os tipos morfológicos das tripomastigotas metacíclicas guardaram relação com o hospedeiro de origem, com o comportamento da infecção em animais de laboratório e, com a taxa de metaciclogênese. Assim, as tripomastigotas metacíclicas grandes e com membrana ondulante, por vezes, destacada do corpo, foram predominantes nos isolados de *Didelphis*, com exceção das amostras **Eg23X** e **Ig42X**. A evolução da infecção experimental, destas amostras, apresentou os perfis II e III, ou seja, determinou parasitemias sub-patentes ou ausentes em camundongos BALB/c, diferentemente das amostras com predomínio de tripomastigotas metacíclicas médias que apresentaram somente o perfil I. Além disso, houve diferenças acentuadas nas taxas de metaciclogênese em função do tempo de cultivo. Assim, a diferenciação das formas epimastigotas em tripomastigotas ocorreram a partir do 4º dia de cultivo para as amostras de *Didelphis*, com exceção, novamente, dos isolados **Eg23X** e **Ig42X**. Estes achados sugerem a existência de, pelo menos, duas populações de

tripomastigotas metacíclicos originários de animais silvestres, que puderam ser diferenciadas por características morfológicas.

Vale salientar, ainda, que YOSHIDA (1983) demonstrou diferenças na constituição antigênica e na suscetibilidade à lise mediada por complemento, em tripomastigotas metacíclicas de várias cepas de *T. cruzi*. Segundo o autor, extrato de tripomastigotas da cepa G, isolado de marsupial da região Amazônica, apresentou marcadas diferenças na composição dos antígenos de superfície, quando comparado com as cepas virulentas Y e CL, isoladas de casos humanos e de triatomíneos, respectivamente. Da mesma maneira, as cepas Y e CL, foram resistentes à lise "in-vitro" por anti-soro contra a forma metacíclica. Já, no mesmo ensaio, as tripomastigotas da cepa G foram completamente lisadas pelo mesmo anti-soro. Sugeriu, o autor, que essas características imunológicas podem ser usadas como critérios na distinção entre cepas virulentas e não virulentas.

Foi demonstrado que todas as amostras estudadas evoluíram no tubo intestinal de triatomíneos. Este dado aliado à ausência de flagelados na hemolinfa e glândula salivar dos insetos, reforça o diagnóstico de *T. cruzi*. Porém, há de se destacar que, segundo BARRETTO (1965), apesar do *T. cruzi* apresentar bom desenvolvimento no intestino de triatomíneos, esta característica não é exclusiva da espécie, existindo outros tripanossomos como *T. sanmartini* e *T. diasi* que podem evoluir no mesmo vetor, produzindo formas metacíclicas no intestino posterior.

No estudo do desenvolvimento dos tripanossomos nos vetores, nota-se que os índices de positividade foram relativamente baixos. Esses dados

são significativos, uma vez que os xenodiagnósticos foram aplicados, na maioria dos animais de experimentação, na fase de parasitemia patente, onde foram observadas, com exceção do **Eg23X**, formas intermediária, larga e muito larga, que são mais adaptadas ao vetor. Neste caso, é possível que fatores ligados ao parasita, ao triatomíneo ou, até mesmo, à metodologia possam ter influenciado nos resultados. Neste sentido, têm sido relatadas variações na positividade do xenodiagnóstico, conforme a espécie de triatomíneo usada, tanto na infecção humana como em animais silvestres (ALVARENGA e BROFEN et alii, 1984; BORGES-PEREIRA et alii, 1996b; RIBEIRO et alii, 1984). Diferenças de infectividade entre cepas de *T. cruzi* e diferentes espécies de vetores foram mostradas por PERLOWAGORA-SZUMLEWICZ et alii (1990). Assim, os autores encontraram uma associação entre alta infectividade de cepas de *T. cruzi* do tipo biológico II e Zimodema Z2, e baixa infectividade para cepas do tipo III e Zimodema Z1.

Além disso, outros parâmetros relacionados com a interação do *T. cruzi* no trato intestinal do vetor podem influenciar na suscetibilidade entre as espécies de triatomíneos (GARCIA e AZAMBUJA, 1991). Desta forma, o número mínimo de flagelados requeridos para a infecção dos triatomíneos e a atividade lítica existente no intestino dos artrópodes, após alimentação, são alguns fatores que podem influenciar na inter-relação entre o parasita e seu vetor (GARCIA e AZAMBUJA, 1991).

Pelo exposto, os critérios morfológicos permitiram classificar os 16 isolados de animais reservatórios como *T. cruzi*, uma vez que: a) os tripanossomos evoluíram bem em meios de cultura acelulares com o

aparecimento de formas metacíclicas características dessa espécie; **b)** as formas metacíclicas infectaram animais de laboratório, produzindo parasitemias patentes e sub-patentes; **c)** os tripanossomos sangüíneos apresentaram aspectos morfológicos concordantes com a descrição de *T. cruzi*; **d)** foram observadas formas amastigotas nos órgãos dos animais de experimentação; **e)** ninfas de triatomíneos, alimentadas em animais experimentalmente infectados, eliminaram tripomastigotas metacíclicas nas fezes, e estas formas não foram observadas na hemolinfa e glândulas salivares.

8. Identificação molecular pelo minicírculo de kDNA:

A técnica de PCR para amplificação de seqüência de minicírculo de kDNA com os “primers” P35/P36, foi utilizada com o propósito de avaliar um método molecular para a identificação de amostras de tripanossomos isolados de animais silvestres, já que, até o momento, a maioria dos métodos descritos para o diagnóstico molecular de *T. cruzi* foram aplicados em amostras humanas e de triatomíneos. Neste caso, os 16 isolados foram confirmados como *T. cruzi*, pela visualização de banda específica de 330 pb (Figura 9). Estes dados são concordantes com os parâmetros biológicos já apresentados e confirmam os relatos de outros autores, que consideram o produto de 330 pb, derivado da amplificação de uma seqüência que abrange uma região variável e parte de uma região conservada do minicírculo de kDNA, como sendo espécie específica e cepa independente (STURM et alii, 1989; AVILA et alii, 1990; AVILA et alii, 1993).

A obtenção da banda de aproximadamente 400 pb em todos os isolados silvestres, incluindo o controle cepa G, representa um dado novo. Levando em consideração a padronização do ensaio, o encontro deste produto poderia representar um marcador de cepas de animais silvestres. No entanto, o verdadeiro significado deste achado só poderá ser avaliado, em futuros estudos, pelo uso de ensaios de hibridização com sondas específicas.

STURM et alii (1989), ao utilizarem o mesmo grupo de “primers” na amplificação de minicírculo de kDNA da cepa CL, isolada de *T. infestans* e das cepas Y e Peruana, isoladas de casos humanos, obtiveram um único fragmento de 330 pb. Posteriormente, AVILA et alii (1990) estenderam o estudo para 56 amostras de *T. cruzi* isoladas de casos humanos, animais reservatórios e triatomíneos procedentes do Brasil, Venezuela, Colômbia e Costa Rica, e obtiveram os mesmos resultados. Por outro lado, já foi demonstrado que a amplificação de seqüências não esperadas pode ser obtida, com o mesmo grupo de “primers”, quando mudanças no protocolo de extração de DNA e nas condições da técnica de PCR são introduzidas (GOMES et alii, 1998).

9. Caracterização molecular pelo gene de mini-exon:

A amplificação pela técnica de PCR de uma seqüência variável, localizada na região não transcrita do gene de mini-exon de *T. cruzi*, resulta em produtos de 300 ou 350 pb, indicando a existência de dimorfismo nesta seqüência gênica entre isolados dessa espécie. Essa característica também

foi observada na sequência do gene 24S α rDNA, outro marcador genético que apresenta dimorfismo entre isolados de *T. cruzi* (SOUTO et alii, 1996).

As diferenças nas seqüências gênicas observadas com esses marcadores, têm permitido agrupar amostras de *T. cruzi*, isoladas de casos humanos, triatomíneos e animais reservatórios, em dois grupos designados *T. cruzi* I e *T. cruzi* II; existindo, porém, um agrupamento híbrido que apresenta um duplo genótipo (SOUTO et alii, 1996; FERNANDES et alii, 1998a). Estudos de variabilidade genética, pela técnica de RAPD, de isolados pertencentes aos dois grupos mostraram a existência de ampla distância filogenética, suficiente para separa-los em duas linhagens (SOUTO et alii, 1996; ZINGALES et alii, 1998).

Do ponto de vista filogenético, a origem desses grupos ainda não está esclarecida. No entanto, admite-se duas hipóteses: a primeira, considerando a existência de ancestrais distintos que evoluíram separadamente, tendo o grupo híbrido surgido como consequência de uma transferência genética do *T. cruzi* I para *T. cruzi* II. A segunda, considerando a evolução a partir de ancestral comum, pertencente ao grupo *T. cruzi* I, que divergiu durante a evolução clonal em *T. cruzi* II e no grupo híbrido (SOUTO et alii, 1996).

Mais recentemente, FERNANDES et alii (1998b) mostraram que algumas amostras de *T. cruzi*, isoladas da região Amazônica, não puderam ser classificadas como *T. cruzi* I ou *T. cruzi* II, quando utilizado, como marcador, o gene de mini-exon. Segundo os autores estes isolados seriam classificados como uma sub-linhagem derivada do *T. cruzi* I, a qual estaria relacionada com o Zimodema Z3.

Para um melhor entendimento da questão, vários autores têm procurado investigar a distribuição dos dois genótipos em reservatórios vertebrados e invertebrados. Desta forma, estudos epidemiológicos usando marcadores de genes ribossômicos têm mostrado uma associação preferencial de *T. cruzi* II, com o ciclo de transmissão doméstica e de *T. cruzi* I, com o ciclo de transmissão silvestre (ZINGALES et alii, 1998; FERNANDES et alii, 1998a).

FERNANDES et alii (1999) encontraram os dois grupos de *T. cruzi* co-existindo no mesmo ambiente natural, demonstrando ser o ciclo de transmissão silvestre mais complexo do que o admitido. Associações dos dois genótipos com as espécies de reservatórios naturais também foram observadas. Assim, *D. marsupialis*, capturados em áreas silvestres do Estado do Rio de Janeiro, apresentaram flagelados do tipo *T. cruzi* I ou de linhagem híbrida, enquanto que em isolados de *P. opossum* foram encontrados os tipos *T. cruzi* I e *T. cruzi* II. Entre os primatas, capturados na mesma região, todos os isolados foram reconhecidos como do tipo *T. cruzi* II. No mesmo estudo, os isolados de triatomíneos, também, apresentaram associações preferenciais, sendo todos os isolados de *Rhodnius sp* classificados como *T. cruzi* I e de *Triatoma vitticeps* como *T. cruzi* II.

No presente estudo, foi possível agrupar amostras de *T. cruzi* isoladas de animais silvestres, nos dois genótipos já descritos e em um grupo de isolados não classificado por essa metodologia (Figura 10). Das 9 amostras isoladas de *Didelphis*, 7 (77,8%) foram classificadas como do tipo

T. cruzi I e 2 (22.2%) como do tipo *T. cruzi* II. As duas amostras isoladas de um mesmo *D. albiventris* capturado no município de Araraquara, foram classificadas como *T. cruzi* I. Das 6 amostras isoladas de *D. marsupialis* capturados no município de Eldorado, 5 foram do tipo *T. cruzi* I e uma do tipo *T. cruzi* II. O isolado de *D. marsupialis* capturado no município de Ilhabela foi classificado como do tipo *T. cruzi* II. Os isolados de *Proechimys* e *Philanders*, originários dessa última região, não puderam ser definidos por essa metodologia. Esses achados confirmam a associação preferencial do *T. cruzi* I com marsupiais do gênero *Didelphis*.

Características genotípicas puderam ser relacionadas com algumas características biológicas. Deste modo, as amostras caracterizadas como *T. cruzi* I determinaram na infecção experimental de ratos e camundongos perfis de comportamentos II (parasitemias patentes em ratos e sub-patentes em camundongos) e III (parasitemias baixas ou sub-patentes em ratos e ausentes em camundongos). As amostras *T. cruzi* II e as que não foram definidas pelo marcador do gene de mini-exon apresentaram o perfil I (parasitemias patentes em ratos e camundongos). A metaciclogênese observada nos cultivos em meio LIT também apresentou relação com os genótipos. Os isolados *T. cruzi* I apresentaram maior taxa de metaciclogênese, que os isolados *T. cruzi* II e, nas amostras sem genótipo definido, as taxas foram intermediárias. Estes dados mostram uma similaridade no comportamento biológico entre os isolados de *Didelphis* do tipo *T. cruzi* II, com os isolados de *Proechimys* e *Philanders*. Contudo, uma possível relação destes últimos isolados com a sub-linhagem

relacionada ao Zimodema Z3 e ao ciclo de transmissão silvestre, como descrita na região Amazônica, não pode ser totalmente descartada, e será futuramente investigada com outros marcadores genéticos.

Muito embora seja reconhecida a divisão do taxon *T. cruzi* em pelo menos dois grupos, o verdadeiro significado desses genótipos necessita de melhores esclarecimentos. Algumas evidências sugerem que *T. cruzi* II possa servir como fator de pré-disposição para o aparecimento da doença de Chagas em algumas áreas (SOUTO et alii, 1996). Assim, tem sido mostrado uma predominância desse grupo em espécies de triatomíneos encontrados no ambiente doméstico e peridoméstico.

Outra evidência relaciona-se com a associação dos diferentes genótipos e a infecção humana. FERNANDES et alii (1998a) mostraram que isolados humanos do tipo *T. cruzi* II predominam em áreas endêmicas onde há elevada soroprevalência e maiores percentuais de alterações eletrocardiográficas. Nas áreas indenes onde os casos humanos são esporádicos e as alterações eletrocardiográficas são menos freqüentes, como no caso da região Amazônica, há relatos de isolados humanos do tipo *T. cruzi* I e da sub-linhagem associada ao Zimodema Z3, ambas relacionadas ao ciclo de transmissão silvestre (FERNANDES et alii, 1998b). Nesse sentido, as linhagens poderiam ser usadas como marcadores epidemiológicos para os estudos de inter-relação dos ciclos de transmissão silvestre e domiciliar, visando avaliar o risco de restabelecimento do ciclo de transmissão domiciliar em áreas controladas ou no risco de sua introdução em áreas indenes.

10. Polimorfismo genético entre tripanossomos isolados de animais silvestres:

Nesta investigação, o grau de variabilidade entre os isolados de *T. cruzi* foi avaliado pela técnica de RAPD. Essa metodologia tem sido amplamente utilizada em estudos populacionais de parasitas devido a sua capacidade de detectar polimorfismo mesmo entre organismos geneticamente relacionados e a sua simplicidade, uma vez que não há necessidade de informações prévias sobre as seqüências de DNA-alvo que serão amplificadas nos ensaios (STEINDEL et alii, 1993; TIBAYRENC et alii, 1993).

As análises por RAPD confirmaram a existência de variabilidade genética entre os isolados de *T. cruzi* estudados. Os padrões de RAPD dos isolados *T. cruzi* I foram distintos dos observados nos isolados *T. cruzi* II, confirmando a existência de uma distância genética entre os grupos (Figura 13). Nas amostras pertencentes ao genótipo *T. cruzi* I foi observado um maior grau de similaridade entre elas. O mesmo não ocorreu com os isolados classificados como *T. cruzi* II, que apresentaram índices de similaridade inferiores quando comparados entre si (Tabela 15). De maneira geral, os padrões de RAPD tenderam a ser similares nas amostras isoladas da mesma espécie de animal silvestre, originárias da mesma área geográfica e pertencentes ao mesmo genótipo (Figuras 11 A, 11 B, 12 A, 12 B). Esses dados, sugerem a existência de populações de *T. cruzi* mais homogêneas, quanto às características genéticas, circulando em uma dada

área geográfica. Mesmo assim, um número variado de genótipos individuais foi observado dentro de cada grupo.

11. Considerações finais:

Devido ao pequeno número de isolados originários do Planalto Ocidental Paulista, município de Araraquara (antiga região endêmica), não foi possível correlacionar as características genéticas e biológicas com esta área geográfica. As duas amostras de *T. cruzi*, isoladas de um mesmo *D. albiventris*, foram caracterizadas como *T. cruzi* I, apresentando alta similaridade entre elas e mesmo comportamento biológico.

As amostras isoladas de animais reservatórios capturados no Vale do Ribeira, município de Eldorado (região indene), foram constituídas de isolados exclusivamente de *Didelphis*. Nesta região foi constatada a circulação das duas populações *T. cruzi* I e *T. cruzi* II, sendo que, de um mesmo animal foi possível o isolamento dos dois genótipos, quando usadas metodologias diferentes. Assim, pela xenocultura foi isolada a amostra **Eg23X**, do tipo *T. cruzi* II e, pela hemocultura e cultura de aspirado de vísceras foram isoladas as amostras **Eg23P** e **Eg23F/B**, ambas do tipo *T. cruzi* I. Nesse caso, os isolados diferiram tanto no grau de variabilidade genética quanto nas características biológicas.

No litoral Norte, município de Ilhabela (área indene) houve maior diversidade de espécies de animais reservatórios naturalmente infectados por *T. cruzi*. As amostras isoladas foram de *Didelphis*, *Proechimys* e *Philander*. O isolado de *Didelphis* foi caracterizado como *T. cruzi* II e as

demais não foram definidas pelo marcador genético utilizado. Este último grupo de isolados apresentou baixo grau de similaridade, pela técnica de RAPD, em relação aos tipos *T. cruzi* I (não encontrado na região) e *T. cruzi* II. Contudo, as características biológicas foram similares às encontradas nas amostras do tipo *T. cruzi* II. Destaca-se o fato da ausência do genótipo *T. cruzi* I circulando na região. É possível que neste caso, o isolamento geográfico tenha influência na circulação da população do flagelado na região. O real significado dos isolados de *Proechimys* e *Philander* serão esclarecidos em estudos futuros, utilizando-se outros marcadores moleculares e com maior número de isolados.

VII. CONCLUSÕES

1) O potencial de domiciliação de *Panstrongylus megistus* na antiga área endêmica do Estado de São Paulo, foi demonstrado pela colonização de ecótopo artificial. A infecção natural por *T. cruzi* nestes triatomíneos não foi observada, sugerindo ser baixa a circulação do parasita na área;

2) No decorrer dos procedimentos para isolamento de *T. cruzi*, foram constatadas infecções por outros flagelados pertencentes aos sub-gêneros *L. (Leishmania)*, *T. (Herpetosoma)* e *T. (Megatrypanum)*.

3) Os índices de infecção natural para *T. cruzi* foram de 1,1%, 11,4% e 11,1% para as regiões do Planalto Ocidental Paulista, Vale do Ribeira e Litoral Norte, respectivamente;

4) Os índices de infecção natural por espécies confirmaram a importância dos marsupiais, sobretudo, do gênero *Didelphis*, na transmissão silvestre do *T. cruzi*;

5) Foram isoladas 16 amostras de tripanossomos de 11 animais pela xenocultura, hemocultura e/ou cultura do aspirado de vísceras. A xenocultura foi a técnica que apresentou melhor eficiência no isolamento das amostras;

6) Os critérios morfobiológicos permitiram identificar todas as amostras estudadas como *T. cruzi*. Assim, os isolados apresentaram baixa virulência para animais de laboratório; formas amastigotas foram encontradas na medula óssea, fígado, baço e coração; as formas sangüíneas apresentaram aspectos morfológicos concordantes com a

descrição de *T. cruzi*; os tripanossomos evoluíram bem em meios de cultura acelulares e; infectaram ninfas de triatomíneos com presença de formas tripomastigotas metacíclicas nas fezes e ausentes na hemolinfa e glândulas salivares;

7) A amplificação de sequência de minicírculo de kDNA dos 16 isolados pela técnica de PCR confirmou o diagnóstico de *T. cruzi*, revelando um produto espécie específico e cepa independente de 330pb;

8) Na caracterização molecular, a amplificação de um fragmento da região intergênica do gene de mini-exon, resultou, para os isolados de *Didelphis*, em produtos de 300 ou 350pb. Desta forma, 77,8% foram classificados como *T. cruzi* I e 22,2% como *T. cruzi* II. Uma associação preferencial do genótipo *T. cruzi* I com marsupiais do gênero *Didelphis* foi observada;

9) Os isolados de *Proechimys* e *Philander*, todos procedentes do município de Ilhabela, não apresentaram os produtos esperados de 300 ou 350pb, não sendo possível a definição dos genótipos *T. cruzi* I e *T. cruzi* II, pelo marcador molecular do gene de mini-exon;

10) Os padrões de RAPD demonstraram variabilidade entre os isolados pertencentes aos tipos *T. cruzi* I, *T. cruzi* II e no grupo sem genótipo definido. Maior similaridade foi observada entre as amostras pertencentes ao mesmo grupo. Foi possível, também, agrupar os padrões de RAPD conforme a espécie de hospedeiro e a origem geográfica.

11) Em um mesmo *Didelphis* foi possível selecionar duas populações de flagelados que apresentaram características biológicas e genéticas distintas.

VIII. REFERÊNCIAS

Acha PN, Szyfres B. **Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales**. Washington (DC); 1977 (OPS-Publicación Científica, 354).

Alvarenga NJ, Bronfen E. Interação do *Trypanosoma cruzi* com diferentes vetores: uso para o xenodiagnóstico. **Rev Soc Bras Med Trop** 1984; 17: 145-9.

Andrade SG. Caracterização de cepas do *Trypanosoma cruzi* isoladas no Recôncavo Baiano. **Rev Patol Trop** 1974; 3: 65-121.

Avila H, Gonçalves AM, Nehme NS, Morel CM, Simpson L. Schizodeme analysis of *Trypanosoma cruzi* from South and Central America by analysis of PCR-amplified minicircle variable region sequences. **Mol Biochem Parasitol** 1990; 42: 175-88.

Avila H, Pereira JB, Thiemann O, De Paiva E, Degrave W, Morel CM, Simpson L. Detection of *Trypanosoma cruzi* in blood specimens of chronic chagasic patients by polymerase chain reaction amplification of kinetoplast minicircle DNA: Comparison with serology and xenodiagnosis. **J Clin Microbiol** 1993; 31: 2421-6.

Barata JMS, Rocha RM, Rodrigues VLCC, Ferraz-Filho NA. Primeiro caso autóctone de tripanossomíase americana do Estado do Acre (Brasil) e sua correlação com as cepas isoladas do caso humano e de triatomíneos silvestres da área. **Rev Saúde Pública** 1988; 22: 401-10.

Barretto MP. Tripanossomos semelhantes ao *Trypanosoma cruzi* em animais silvestres e sua identificação com o agente etiológico da doença de Chagas. **Rev Inst Med Trop São Paulo** 1965; 7: 305-15.

Barretto MP. Estudos sobre reservatórios e vetores silvestres do *Trypanosoma cruzi*. XXII. Modificações dos focos naturais da tripanossomose americana e suas consequências. **Rev Soc Bras Med Trop** 1967a; 1: 167-73.

Barretto MP. Estudos sobre reservatórios e vetores silvestres do *Trypanosoma cruzi*. XVII. Contribuição para o estudo dos focos naturais da tripanossomose americana, com especial referência à região nordeste do Estado de São Paulo, Brasil. **Rev Soc Bras Med Trop** 1967b; 2: 23-35.

Barretto MP, Ribeiro RD. Reservatórios silvestres do *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* Chagas, 1909. **Rev Inst Adolfo Lutz** 1979; 39: 25-36.

Barretto MP, Ribeiro RD, Ferriolli Filho F. Estudos sôbre reservatórios e vectores silvestres do *Trypanosoma cruzi*. LXXV: Estudo de amostras de *T. cruzi* isoladas de gambás do gênero *Didelphis*. **Rev Bras Biol** 1980; 40: 387-91.

Barretto MP, Ribeiro RD. Estudos sobre tripanossomos do subgênero *Herpetosoma* Doflein, 1901 em roedores silvestres, com a descrição de três novas espécies. **Rev Bras Biol** 1981; 41: 485-97.

Bisugo MC, Araújo MFL, Nunes EV, Cunha EA, Oliveira Junior OC, Guilherme CS, et al. Isolamento de *Trypanosoma cruzi* por xenocultura após aplicação de xenodiagnóstico *In vivo* e/ou *In vitro* em pacientes na fase crônica da doença de Chagas e na co-infecção pelo HIV. **Rev Inst Adolfo Lutz** 1998; 57: 89-96.

Borges-Pereira J, Abreu LL, Aguilar HVM, Benites CDV, Coura JR. Avaliação da prevalência e da morbidade da infecção chagásica humana em áreas endêmicas dos Estados de Minas Gerais (Região Sudeste) e da Paraíba (Região Nordeste), Brasil. I. Contribuição ao estudo do custo da doença de Chagas. **Rev Soc Bras Med Trop** 1996 a; 29 Supl 2: 107-9.

Borges-Pereira J, Junqueira ACV, Santa LC, Castro JAF, Araujo IB, Coura JR. Xenodiagnóstico na doença de Chagas crônica. I. Sensibilidade de *Panstrongylus megistus* e *Triatoma infestans*. **Rev Soc Bras Med Trop** 1996 b; 29: 341-7.

Brener Z. Therapeutic activity and criterion of cure of mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. **Rev Inst Med Trop São Paulo** 1962; 4: 389-96.

Brener Z, Chiari E. Variações morfológicas observadas em diferentes amostras de *Trypanosoma cruzi*. **Rev Inst Med Trop São Paulo** 1963; 5: 220-4.

Brener Z. General review on *Trypanosoma cruzi* classification and taxonomy. **Rev Soc Bras Med Trop** 1985; 18 Supl 1: 1-8.

Camargo EP. Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi*. I. Origin of metacyclic trypanosomes in liquid media. **Rev Inst Med Trop São Paulo** 1964; 4: 93-100.

Camargo ME, Silva GR, Castilho EA, Silveira AC. Inquérito sorológico da prevalência de infecção chagásica no Brasil 1975/1980. **Rev Inst Med Trop São Paulo** 1984; 26: 92-204.

Carneiro M, Romanha AJ, Chiari E. Biological characterization of *Trypanosoma cruzi* strains from different zymodemes and schizodemes. **Mem Inst Oswaldo Cruz** 1991; 86: 387-93.

Cerqueira RL, Kawarabayashi M, Guimarães ACS, Nakamura PM, Ferraz SN, Pinto PLS, Andrade Jr HF. Santo Inácio revisited: Protozoan diseases in na isolated village in Northeastern Brazil after twenty years. **Am J Med Hyg** 1998; 59: 736-40.

Chiari E, Growth and differentiation of *Trypanosoma cruzi* culture forms kept in laboratory for different periods of time. **Rev Inst Med Trop São Paulo** 1974; 16: 81-7.

Ciaravolo RMC, Domingos MF, Wanderley DMV, Gersi LJ, Chieffi PP, Peres BA, Umezawa ES. Autochthonous acute Chagas' disease in São Paulo State, Brazil. Epidemiological aspects. **Rev Inst Med Trop São Paulo** 1997; 39: 171-4.

Clark CG, Pung OJ. Host specificity of ribosomal DNA variation in sylvatic *Trypanosoma cruzi* from North America. **Mol Biochem Parasitol** 1994; 66: 175-9.

Correa, RR, Lima FC, Carvalho PL. Da infecção natural pelo *Trypanosoma cruzi* nas ninfas e adultos do *Triatoma infestans*. **Arq Hig Saúde Pública Univ São Paulo** 1952; 17: 9-14.

Coura JR, Fernandez O, Arboleda M, Barett TV, Carrara N, Degrave W, Campbell, DA. Human infection by *Trypanosoma rangeli* in the Brazilian Amazon. **Trans R Soc Med Hyg** 1996; 90: 278-9.

Coutinho, JO. Contribuição ao estudo da epidemiologia da doença de Chagas. **Arq Hig Saúde Pública Univ São Paulo** 1962; 27: 317-33.

Cuba Cuba AC Revisión de los aspectos biológicos y diagnósticos del *Trypanosoma (Herpetosoma) rangeli*. **Rev Soc Bras Med Trop** 1998; 31: 207-20.

Deane LM. Tripanosomídeos de mamíferos da Região Amazônica. I. Alguns flagelados encontrados no sangue de mamíferos silvestres do Estado do Pará. **Rev Inst Med Trop São Paulo** 1961; 3: 15-28.

Deane LM. Tripanosomídeos de maníferos da Região Amazônica. III Hemoscopia e xenodiagnóstico de animais silvestres dos arredores de Belém, Pará. **Rev Inst Med Trop São Paulo** 1964; 6: 225-32.

Deane MP, Lenzi HL, Jansen AM. *Trypanosoma cruzi* vertebrate and invertebrate cycles in the same mammal host the Opossum *Didelphis marsupialis*. **Mem Inst Oswaldo Cruz** 1984; 79: 513-5.

Deane MP, Jansen AM. Another *Trypanosoma*, distinct from *T. cruzi*, multiplies in the lumen of the anal glands of the opossum *Didelphis marsupialis*. **Mem Inst Oswaldo Cruz** 1986; 81: 131-2.

Deane MP, Jansen AM. From a mono to digenetic life-cycle: How was the jump for flagellates of the family trypanisomatidae? **Mem Inst Oswaldo Cruz** 1988; 83: 273-5.

Deane MP, Jansen AM. Developmental stages of *Trypanosoma (Megatrypanum) freitasi* Rego, Magalhães & Siqueira, 1957 in the opossum *Didelphis marsupialis* (Marsupialia, Didelphidae). **J Protozool** 1990; 37: 44-7.

Dias JCP. Aspectos socio-culturales y economicos relativos al vector de la enfermedad de Chagas. In: Carcavallo RU, Rabinovich JE, Tonn RJ. **Factores biológicos y ecológicos en la enfermedad de Chagas**. Buenos Aires; Ministério de Salud y Acción Social; 1985. V 2: Parasitos – reservorios – control – situacion regional.

Dias JCP. The control of Chagas diseases in Brazil. **Parasitol Today** 1987; 3: 336-41.

Dias JCP. Estratégias e perspectivas atuais da consolidação do controle de vetores na etapa de vigilância epidemiológica. **Rev Soc Bras Med Trop** 1994; 27Supl 2: 63-6.

Dias JCP, Silveira AC. Situação atual da doença de Chagas no Brasil. **Rev Soc Bras Med Trop** 1996; 29 Supl 2: 63-6.

Dias JCP. O desafio da doença de Chagas nos centros urbanos. **Rev Soc Bras Med Trop** 1999; 32 Supl 2: 45-8.

Diotaiuti L, Loiola CF, Falcão PL, Dias JCP. The ecology of *Triatoma sordida* in natural environments in two different regions of the State of Minas Gerais, Brazil. **Rev Inst Med Trop São Paulo** 1993; 35: 237-46.

Diotaiuti L, Pereira AS, Loiola CF, Fernandes AL, Schofield JC, Dujardin JP et al. Inter-relation of sylvatic and transmission of *Trypanosoma cruzi* in areas with and without domestic vectorial transmission in Minas Gerais, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz** 1995; 90: 443-8.

Felsenstein J. PHYLIP – Phylogeny Inference Package (Version 3.2). **Cladistics** 1989; 5: 164-6.

Fernandes AJ, Diotaiuti L, Dias JCP, Romanha AJ, Chiari E. Infecção natural das glândulas de gambá (*Didelphis albiventris*) pelo *Trypanosoma cruzi* no município de Bambuí-MG. **Mem Inst Oswaldo Cruz** 1989; 84: 87-93.

Fernandes AJ, Chiari E, Rodrigues RR, Dias JCP, Romanha AJ. The importance of Opossum (*Didelphis albiventris*) as a reservoir for *Trypanosoma cruzi* in Bambuí, Minas Gerais State. **Mem Inst Oswaldo Cruz** 1991; 86: 81-5.

Fernandes AJ, Chiari E, Casanova C, Dias JCP, Romanha AJ. The threat of reintroduction of natural transmission of Chagas' diseases in Bambuí, Minas Gerais State, Brazil, due to *Panstrongylus megistus*. **Mem Inst Oswaldo Cruz** 1992; 87: 285-9.

Fernandes O, Murthy VK, Kurath U, Degraeve WM, Campbell DA. Mini-exon gene variation in human pathogenic *Leishmania* species. **Mol Biochem Parasitol** 1994; 66: 261-71.

Fernandes O, Souto RP, Castro JÁ, Pereira JB, Fernandes NC, Junqueira CV, et al. Brazilian isolates of *Trypanosoma cruzi* from humans and triatomines classified into two lineages using mini-exon and ribosomal RNA sequences. **Am J Trop Med Hyg** 1998a; 58: 807-11.

Fernandes O, Sturm NR, Derré R, Campbell DA. The mini-exon gene: A genetic marker for zymodeme III of *Trypanosoma cruzi*. **Mol Biochem Parasitol** 1998b; 95: 129-133.

Fernandes O, Mangia RH, Lisboa CV, Pinho AP, Morel CM, Zingales B, et al. The complexity of the sylvatic cycle of *Trypanosoma cruzi* in Rio de Janeiro state (Brazil) revealed by the non-transcribed spacer of the mini-exon gene. **Parasitology** 1999; 118: 161-6.

Forattini OP, Juarez E, Rabello EX, Pattoli D, Corrêa RR. Infestação domiciliar por *Triatoma infestans* e alguns aspectos epidemiológicos da tripanossomíase americana em área do Estado de São Paulo, Brasil. **Rev Saúde Pública** 1969; 3: 159-72.

Forattini OP, Pattoli DBG, Rabello EX, Ferreira AO. Nota sobre a infecção natural de *Oryzomys capito laticeps* em foco enzoótico de Leishmaniose Tegumentar no Estado de São Paulo, Brasil. **Rev Saúde Pública** 1973; 6: 225-61.

Forattini OP, Rocha e Silva EO, Ferreira AO, Rabello EX, Santos JLF, Lima AR. Aspectos ecológicos da Tripanossomíase americana. XI. Domiciliação de *Panstrongylus megistus* e potencial enzoótico. **Rev Saúde Pública** 1977; 11: 527-50.

Forattini OP, Ferreira AO, Rocha e Silva EO, Rabello EX. Aspectos ecológicos da Tripanossomíase americana. XIV. Persistência e potencial de domiciliação de populações triatomínicas silvestres em região de intensa atividade agropecuária. **Rev Saúde Pública** 1979; 13: 123-46.

Forattini OP. Biogeografia, origem e distribuição da domiciliação de triatomíneos no Brasil. **Rev Saúde Pública** 1980a; 14: 265-99.

Forattini OP, Rocha e Silva EO, Barata JMS, Boainaim E. Nota sobre caso autóctone de Tripanossomíase americana no litoral sul do Estado de São Paulo, Brasil. **Rev Saúde Pública** 1980b; 14: 143-9.

Forattini OP, Rocha e Silva EO, Barata JMS, Boainaim E. Nota sobre novo caso autóctone de Tripanossomíase americana no litoral sul do Estado de São Paulo, Brasil. **Rev Saúde Pública** 1981; 15: 350-2.

Forattini OP, Rabello EX, Ferreira AO, Rocha e Silva EO, Santos JLF. Aspectos ecológicos da Tripanossomíase americana. XXI. Comportamento de espécies triatomíneas silvestres na reinfestação do intra e peridomicílio. **Rev Saúde Pública** 1984; 18: 185-208.

Frasch ACC, Goijman SG, Cazzulo JJ, Stoppani AOM. Constant and variable regions in DNA mini-circles from *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli*: Application to species and stock differentiation. **Mol Biochem Parasitol** 1981; 4: 163-70.

Garcia ES, Azambuja P. Development and interaction of *Trypanosoma cruzi* within the insect vector. **Parasitol Today** 1991; 7: 240-4.

Gomes ML, Macedo AM, Vago AR, Pena SDI, Galvão LMC, Chiari E. *Trypanosoma cruzi*: Optimization of polymerase chain reaction for detection in human blood. **Exp Parasitol** 1998; 88: 28-33.

Herrera L, Urdaneta-Morales S. *Didelphis marsupialis*: a primary reservoir of *Trypanosoma cruzi* in urban areas of Caracas, Venezuela. **Ann Trop Med Parasitol** 1992; 86: 607-12.

Herrera L, Urdaneta-Morales S. Synanthropic rodent reservoirs of *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* in the Valley of Caracas, Venezuela. **Rev Inst Med Trop São Paulo** 1997; 39: 279-82.

Higuchi ML, De Brito T, Reis MM, Barbosa A, Bellotti G, Pereira-Barreto AC, Pileggi F. Correlation between *Trypanosoma cruzi* parasitism and myocardial inflammatory infiltrate in human chronic chagasic myocarditis: Light microscopy and immunohistochemical findings **Cardiovasc Pathol** 1993; 2: 101-6.

Hoare CA. **The trypanosomes of mammals. A zoological monograph.** Oxford: Blackwell; 1972. p. 214.

Jaccard DB. **Soc V Science Naturelle** 1908; 44: 223-70.

Junqueira ACV, Chiari E, Wincker P. Comparison of the polymerase chain reaction with two classical parasitological methods for the diagnosis of Chagas disease in endemic region of north-eastern Brazil. **Trans R Soc Trop Med Hyg** 1996; 90: 129-32.

Karsten V, Davis C, Kuhn R. *Trypanosoma cruzi* in wild raccoons and opossums in North Carolina. **J Parasitol** 1992; 78: 547-9.

Kirchhoff LV. American trypanosomiasis (Chaga's diseases) a tropical disease now in the United State. **N Engl J Med** 1993; 329: 639-44.

Kirchhoff LV, Votava JR, Ochs DE, Moser DR. Comparison of PCR and microscopic methods for detecting *Trypanosoma cruzi*. **J Clin Microbiol** 1996; 34: 1171-5.

Luckow M, Pimentel D. Na empirical comparison of numerical Wagner computer programs. **Cladistics** 1985; 1: 47-66.

Magalhães JB; Andrade SG. Estudo do comportamento de cepas de *Trypanosoma cruzi* após passagem em diferentes espécies de triatomíneos. **Rev Soc Bras Med Trop** 1991; 24: 209-16.

Mansfield JM. Non pathogenic trypanosomes of mammals. In: Kreier JP, editor. **Parasitic Protozoa I. Taxonomy, kinetoplastids, and flagellates of fish**. New York: Academic Press; 1977. p.297-327.

Marcondes CB, Guedes LA, Mendonça DD. Surto de doença de Chagas de provável contaminação oral, em Catolé do Rocha (Paraíba) – Encontro de *Didelphis albiventris* naturalmente infectado. In: 24^a Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical; 1988 Manaus, Amazonas. Resumo 29.

Marques de Araújo S; Chiari E. Caracterização biológica de clones das cepas Y, CL e MR de *Trypanosoma cruzi* em camundongos C3H isogênicos. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 1988; 83: 175-81.

Maslov DA, Lukes J, Jirku M, Simpson L. Phylogeny of trypanosomes as inferred from the small and large subunit rRNAs: implications for the evolution of parasitism in the trypanosomatid protozoa. **Mol Biochem Parasitol** 1996; 75: 197-205.

Mello DA, Valin E, Teixeira ML. Alguns aspectos do comportamento de cepas silvestres de *Trypanosoma cruzi* em camundongos e *Calomys callosus* (Rodentia). **Rev Saúde Pública** 1979; 13: 314-25.

Mello DA. Aspectos do ciclo silvestre do *Trypanosoma cruzi* em região de cerrado (município de Formosa, Estado de Goiás). **Mem Inst Oswaldo Cruz** 1981; 76: 227-46.

Mello DA. Roedores, marsupiais e triatomíneos silvestres capturados no município de Mambai-Goiás. Infecção natural pelo *Trypanosoma cruzi*. **Rev Saúde Pública** 1982; 16: 282-91.

Miles MA, Tøye PJ, Oswald SC, Godfrey DG. The identification by isoenzyme patterns of two distinct strain-groups of *Trypanosoma cruzi* circulating independently in a rural area of Brazil. **Trans R Soc Trop Med Hyg** 1977; 71: 217-25.

Miles MA, Souza A, Póvoa M, Shaw JJ, Lainson R, Tøye PJ. Isozymic heterogeneity of *Trypanosoma cruzi* in the first autochthonous patients with Chagas' disease in the Amazonian Brazil. **Nature** 1978; 22: 819-21.

Miles MA. Transmission cycles and the heterogeneity of *Trypanosoma cruzi*. In: Lumsden WHR, Evans DA, editors, **Biology of the Kinetoplastida**. London: Academic Press; 1979 v 2, p. 117-96.

Miles MA, Lanham SM, Souza AA, Póvoa M. Further enzymic characters of *Trypanosoma cruzi* and their evaluation for strain identification. **Trans R Soc Trop Med Hyg** 1980; 74: 221-37.

Miles MA, Cedillos RA, Póvoa MM, De Souza AA, Prata A, Macedo V. Do radically dissimilar *Trypanosoma cruzi* strains (zymodemes) cause Venezuelan and Brazilian forms of Chagas' disease? **Lancet** 1981; 20: 1338-40.

Miles MA, Arias JE, Valente SAS, Naiff RD, Souza AA, Póvoa MM, Lima JAN, Cedillos RA. Vertebrate hosts and vectors of *Trypanosoma rangeli* in the Amazon Basin of Brazil. **Am J Trop Med Hyg** 1983; 32: 1251-8.

Momen H. Taxonomy of *Trypanosoma cruzi*: a Commentary on Characterization and Nomenclature. **Mem Inst Oswaldo Cruz** 1999; 94 Supl 1: 181-4.

Morel CM, Chiari E, Plessmann Camargo E, Mattei DM, Romanha AJ, Simpson L. Strains and clones of *Trypanosoma cruzi* can be characterized by pattern of restriction endonuclease products of kinetoplast DNA mini-circles. **Proc Nat Acad Sci** 1980; 77: 6810-4.

Mott KE, Mota EA, Sherlock I, Hoff R, Muniz TM, Oliveira TS, Draper CC. *Trypanosoma cruzi* infection in dogs and cats and household seroreactivity to *T. cruzi* in a rural community in Northeast Brazil. **Am J Trop Med Hyg** 1978; 27:1123-7.

Noyes HA, Stevens JR, Teixeira MMG, Phelan J, Holz PA. A nested PCR for the ssrRNA gene detects *Trypanosoma binneyi* in the platypus and *Trypanosoma sp.* in wombats and kangaroos in Australia. **Int J Parasitol** 1998; 29: 331-9.

Nunes VLB, Oshiro ET. *Trypanosoma (Trypanozoon) evansi* in the coati from the Pantanal region of Mato Grosso do Sul State, Brazil. **Trans R Soc Trop Med Hyg** 1990; 84: 692.

Nunes LR, Carvalho MRC, Buck GA. *Trypanosoma cruzi* strains partition into two groups based on the structure and function of the spliced leader RNA and rRNA gene promoters. **Mol Biochem Parasitol** 1997; 86: 211-24.

Oliveira EC, Stefani MMA, Luquetti AO, Vêncio EF, Moreira MAR, Souza C, Rezende. *Trypanosoma cruzi* and experimental Chagas'disease: Characterization of a stock isolated from a patient with associated digestive and cardiac form. **Rev Soc Bras Med Trop** 1993; 26: 25-33.

Oliveira Jr W. Prevalência da infecção chagásica e das formas da doença na região Nordeste. **Rev Soc Bras Med Trop** 1996; 29 Supl 2: 105-6.

Organisation Mondiale de la Santé. **Lutte contre la maladie de Chagas**: rapport d'un Comité OMS d'experts. Genève: OMS; 1991 (Série de Rapports Techniques, 811).

Osaki LS, Czeko YMT. Genomic DNA cloning and related techniques. In: Morel CM, editor. **Genes and antigens of parasites, a laboratory manual**. Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz; 1984. p.165-85.

Perlowagora-Szumlewicz A, Muller CA, Moreira CJC. Studies in search of suitable experimental insect model for xenodiagnosis of hosts with Chaga's diseases. 4 – The reflection of parasite stock in the responsiveness of different vector species to chronic infection with different *Trypanosoma cruzi* stocks. **Rev Saúde Pública** 1990; 24: 165-77.

Pessôa SB. Hospedeiros vertebrados não humanos do *Trypanosoma cruzi*. **Rev Goiana Med** 1958; 4: 83-101.

Petrokovsky SM, Schweigmann NJ, Riarte A, Alberti A, Conti O, Montoya S, Wisnivesky-Coli C. The skunk *Conetatus chinga* as new host of *Trypanosoma cruzi* in Argentina. **J Parasitol** 1991; 77: 643-5.

Prata A. Classificação da infecção chagásica no homem. **Rev Soc Bras Med Trop** 1990; 23: 109-13.

Ray DS. Conserved sequence blocks in kinetoplast minicircles from diverse species of trypanosomes. **Mol Cell Biol** 1989; 9: 1365-7.

Recinos FR, Kirchhoff LV, Donelson JE. Characterization of kinetoplast DNA minicircles in *Trypanosoma rangeli*. **Mol Biochem Parasitol** 1994; 63: 59-67.

Rêgo SFM, Magalhães AEA, Siqueira AF. Um novo trypanossomo do gambá, *Trypanosoma freitase* n. sp. **Rev Bras Malariol Doenças Trop** 1957; 9: 277-84.

Ribeiro RD, Barretto MP, Camargo CA, Takeda EKF. Estudo comparativo entre a eficiência de hemoculturas e xenodiagnósticos seriados efetuados em gambás do gênero *Didelphis*, naturalmente infectados pelo *Trypanosoma cruzi*. **Rev Bras Biol** 1984; 44: 389-94.

Ribeiro RD, Rissato Garcia TA, Bonoma WC. Contribuição para o estudo dos mecanismos de transmissão do agente etiológico da doença de Chagas. **Rev Saúde Pública** 1987; 21: 51-4.

Rocha e Silva EO, Andrade LCR, Lima AR. Importância dos animais sinantrópicos no controle da endemia chagásica. **Rev Saúde Pública** 1975; 9: 371-81.

Saiton N, Nei M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. **Mol Biol Evolution** 1987; 4: 406-25.

Sartori AMC, Shikanai-Yasuda MA, Amato Neto V, Lopes MH. Follow-up of 18 patients with human immunodeficiency virus infection and chronic Chaga's disease, with reactivation of Chaga's disease causing cardiac disease in three patients. **Clin Infect Dis** 1998; 26: 177-9.

Schlemper Jr BR, Ishida MMI, Steindel M, Gargioni R. Tripomastigota muito largo como padrão morfológico de cepas do *Trypanosoma cruzi* do extremo Sul do Brasil? **Mem Inst Oswaldo Cruz** 1986; 81: 191-8.

Schmuniz GA. *Trypanosoma cruzi*, the etiologic agent of Chagas disease: status in the blood supply in endemic and nonendemic countries. **Transfusion** 1991; 31: 547-57.

Schofield CJ, Dias JCP. A cost-benefit analysis of Chagas diseases control. **Mem Inst Oswaldo Cruz** 1991; 86:285-95.

Schofield CJ, Dias JCP. The southern cone initiative against Chagas' disease. In: Baker JR, Muller R, Rollinson D, editors. **Advances in Parasitology** London: Academic Press; 1999. p. 2-22.

Schottelius J, Muller V. Interspecific differentiation of *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma conodhini* and *Trypanosoma rangeli* by lectins and combination with complement lysis. **Acta Trop** 1984; 41: 29-38.

Schweigmann NJ, Pietrokovsky S, Bottazzi V, Conti O, Wisnivesky-Coli C. Interaction between *Didelphis albiventris* and *Triatoma infestans* in relation to *Trypanosoma cruzi* transmission. **Mem Inst Oswaldo Cruz** 1995; 90: 679-82.

Shaw JJ, Lainson R, Fraiha H. Considerações sobre a epidemiologia dos primeiros casos autóctones de doença de Chagas registrados em Belém, Pará, Brasil. **Rev Saúde Pública** 1969; 3: 153-7.

Shikanai-Yasuda MA, Lopes MH, Tolezano JE, Umezawa E, Amato Neto V, Pereira Barreto AC, et al. Doença de Chagas aguda: Vias de transmissão, aspectos clínicos e resposta à terapêutica específica em casos diagnosticados em um centro urbano. **Rev Inst Med Trop São Paulo** 1990; 32: 16-27.

Shikanai-Yasuda MA, Ochs DE, Tolezano JE, Kirchhoff LV. Use of the polymerase chain reaction for detecting *Trypanosoma cruzi* in triatomine vectors. **Trans R Soc Trop Med Hyg** 1996; 90: 649-51.

Silva EOR, Pattoli DBG, Camargo JC. Novo encontro do *Trypanosoma (Megatrypanum) freitasi*, parasita do gambá. **Rev Saúde Pública** 1976; 10: 121-4.

Silva LJ. **Evolução da doença de Chagas no Estado de São Paulo**. Ribeirão Preto; 1980. [Tese de Doutorado - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto /USP].

Silveira AC, Rezende DF. Epidemiologia e controle da transmissão vetorial da doença de Chagas no Brasil. **Rev Soc Bras Med Trop** 1994; 27 Supl 3: 11-22.

Simpson L. Kinetoplast DNA in trypanosomatid flagellates. **Int Rev Cytol** 1986; 99: 119-79.

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

Steindel M, Pinto CJC. *Trypanosoma cruzi* development in the anal glands of experimentally infected *Lutreolina crassicaudata* (Marsupialia, Didelphidae). **Mem Inst Oswaldo Cruz** 1988a; 83: 397.

Steindel M, Scholz A, Toma HK, Schlemper Jr BR. Presence of *Trypanosoma cruzi* in the anal glands of naturally infected opossum (*Didelphis marsupialis*) in the state of Santa Catarina, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz** 1988b; 83: 135-7.

Steindel M, Pinto CJC, Toma HK, Mangia RHR, Rodrigues RR, Romanha AJ. *Trypanosoma rangeli* (Tejera, 1920) in Santa Catarina Island, Santa Catarina State: First report of this trypanosome in southern Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz** 1991; 86: 73-9.

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

Sturm NR, Degraeve W, Morel C, Simpson L. Sensitive detection and schizodeme classification of *Trypanosoma cruzi* cells by amplification of kinetoplast minicircle DNA sequences: use in diagnosis of Chagas' disease. **Mol Biochem Parasitol** 1989; 33: 205-14.

Sturm NR, Fernandes O, Campbell DA. The mini-exon of three *Phytomonas* isolates that differ in plant tissue tropism. **Fed Euro Microbiol Soc Microbiol Lett** 1995; 130: 177-82.

Tafuri WL. Patogênese. **Rev Soc Bras Med Trop** 1992; 25 Supl 3: 19-22.

Thomaz N, Deane MP. Continuous growth and differentiation of *Trypanosoma (Megatrypanum) freitasi* Rego, Magalhães & Siqueira, 1957, in vitro. **J Protozool** 1990; 37: 40-43

Tibayrenc M, Neubauer K, Barnabé C, Guerrini F, Skarecky D, Ayala FJ. Genetic characterization of six parasitic protozoa: Parity between random-primer DNA typing and multilocus enzyme eletrophoresis. **Proc Natl Acad Sci USA** 1993; 90: 1335-9.

Tolezano JE, Chieffi PP, Dias RMDS, Nunes EV, D'Ándrade OM, Pereira LE, et al. *Trypanosoma* do subgênero *Herpetosoma* Doflein, 1901 em *Proechimys iheringi* Thomas, 1911 capturados no Estado de São Paulo, Brasil. **Rev Inst Adolfo Lutz** 1984; 44: 47-53.

Tolezano JE, Araujo MFL, Balanco IMF, Valentin AM, Barca ML. *Leishmania* sp isolated from blood heart of *Akodon* sp (Rodentia, Cricetidae) caught in Iguape City, São Paulo State, Brazil. **Proceedings of 15th Annual Meeting on Basic Research in Chagas'diseases**; 1988. Caxambu, Minas Gerais, Brazil.

Tolezano JE, Taniguchi HH, Bisugo MC, Araujo MFL, Cunha EA, Elias CR, Larosa R. Occurence of natural *Leishmania*(*Leishmania*) infection in *Proechimys iheringi* in an endemic area of human na canine American Cutaneous Leishmaniasis due to *Leishmania (Viannia) braziliensis* in Ilha bela, São Paulo, Brazil. **Rev Soc Bras Med Trop** 1999; 32 Supl 1: 254-5.

Valente SAS, Valente VC. Reservatórios e vetores do *Trypanosoma cruzi* e a vigilância epidemiológica da doença de Chagas na Amazônia brasileira. **NewsLab** 1996; 16: 33-5.

Valente SAS, Valente VC Fraiha Neto H. Considerações sobre a epidemiologia e transmissão da doença de Chagas na Amazônia brasileira. **Rev Soc Bras Med Trop** 1999; 32 Supl 2: 51-5.

Vallejo GA, Macedo AM, Chiari E, Pena SDJ. Kinetoplast DNA from *Trypanosoma rangeli* contains two distinct classes of minicircles with different size and molecular organization. **Mol Biochem Parasitol** 1994; 67: 245-53.

Wanderley DMV. Vigilância entomológica da doença de Chagas no Estado de São Paulo. **Rev Saúde Pública** 1991; 25: 28-32.

Wanderley DMV. Planejamento, problemas e resultados da vigilância epidemiológica da doença de Chagas no Estado de São Paulo. **Rev Soc Bras Med Trop** 1994a; 27 Supl 2: 68-70.

Wanderley DMV. **Perspectivas de controle da doença de Chagas no Estado de São Paulo**. São Paulo; 1994b. [Tese de Doutorado - Faculdade de Saúde Pública/USP].

Wisnivesky-Colli C, Gurtler RE, Solarz ND, Lauricella MA, Segura EL. Epidemiological role of humans, dogs and cats in the transmission of *Trypanosoma cruzi* in a central area of Argentina. **Rev Inst Med Trop São Paulo** 1985; 27:346-52.

Wisnivesky-Colli C, Schweigmann NJ, Alberti A, Pietrokovsky SM, Conti O, Montoya S, Riarte A, Rivas C. Sylvatic American trypanosomiasis in Argentina. *Trypanosoma cruzi* infection in mammals from the Chaco forest in Santiago del Estero. **Trans R Soc Trop Hyg** 1992; 86: 38-41.

Yoshida ELA, Silva RL, Cortez LS, Corrêa FMA. Encontro de espécies do gênero *Leishmania* em *Didelphis marsupialis aurita* no Estado de São paulo, Brasil. **Rev Inst Med Trop São Paulo** 1979; 21:110-3.

Yoshida N. Surface antigens of metacyclic trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. **Infect Immun** 1983; 40: 836-9.

Zavala-Velázquez J, Barrera-Pérez M, Rodriguez-Félix ME, Guzmán-Marín E, Ruiz-Piña H. Infection by *Trypanosoma cruzi* in mammals in Yucatan, Mexico: A serological and parasitological study. **Rev Inst Med Trop São Paulo** 1996; 38: 289-92.

Zingales B, Pereira ME, Almeida KA, Umezawa ES, Nehme NS, Oliveira RP, et al. Biological parameters and molecular markers of clone CL Brener. The reference organism of the *Trypanosoma cruzi* Genome Project. **Mem Inst Oswaldo Cruz** 1997; 92: 811-4.

Zingales B, Souto RP, Mangia RH, Lisboa CV, Campbell DA, Coura JR, et al. Molecular epidemiology of American trypanosomiasis in Brazil based on dimorphisms of rRNA and mini-exon gene sequences. **Int J Parasitol** 1998; 28: 105-12.

ANEXOS

1. Meios de cultura:

1.1. Caldo BHI (Instituto Adolfo Lutz):

Composição do meio básico (Difco):

Infusão de cérebro de carneiro.....	200,0 g
Infusão de coração de boi.....	250,0 g
Proteose peptona.....	10,0 g
Dextrose.....	2,0 g
NaCl.....	5,0 g
Fosfato de sódio.....	25,0 g

Dissolver 37g do meio básico em 1000 ml de água destilada. Acertar para pH 7,4. Distribuir 2,0 ml do meio em tubos estéreis de rosca (12X120 mm). Autoclavar a 121 °C, 15 minutos. Deixar em temperatura de 28 °C por 48 horas para teste de esterilização. Conservar em geladeira.

1.2. Ducrey – Segundo Salles Gomes (Instituto Adolfo Lutz):

Agar infusão de batata (Difco).....	14,7g
Glicerina P.A (Merck).....	2,0 ml
Água destilada q.s.p.....	210,0 ml

Dissolver o agar em água quente e adicionar a glicerina. Autoclavar a 121 °C, 15 minutos. Resfriar a base a 50 °C e adicionar 90 ml de sangue desfibrinado de coelho a 30%. Homogeneizar. Distribuir 5,0 ml do meio em tubos estéreis de rosca (16X160 mm). Inclinar os tubos e deixar em repouso por 24 horas. Conservar em geladeira.

1.3. LIT (Departamento de Parasitologia ICB-USP):

Infusão de fígado.....	5,0 g
Triptose.....	5,0 g
NaCl.....	4,0 g
KCl.....	0,4 g
Na ₂ HPO ₄	8,0 g

Dissolver os componentes em água. Adicionar Hemina (10 mg/ml). Acertar para pH 7,2 com HCl 0,3M. Completar o volume com água para 850 ml. Autoclavar a 121 °C, 30 minutos. A parte dissolver 2,0 g de glicose em 50,0 ml de água. Autoclavar 121 °C, 15 minutos. Juntar esterilmente, 850,0 ml do meio, 50,0 ml de glicose e 100,0 ml de soro fetal bovino inativado a 56 °C

por 1 hora. Aliquotar em volume de 250,0 ml. Deixar a 28 °C por 48 horas para teste de esterilização. Conservar em geladeira.

2. Soluções:

2.1. PBS (pH 7,2):

Na₂HPO₄ 4mM
KH₂PO₄ 4mM
NaCl 140 mM
KCl 2mM

2.2. Tampão Tris Salino-EDTA (SE):

NaCl 0,15M.....100,0 ml
EDTA 2,5 mM (pH 8,0).....1,0 ml
Tris 2,5 mM (pH 8,0).....100,0 ml

Solução 1. NaCl 0,15M

Adicionar 1,75 g de NaCl em 200 ml de água destilada. Autoclavar 120 °C, 30 minutos.

Solução 2. EDTA 2,5 mM (pH 8,0)

Adicionar 9,3 g em 50,0 ml de água destilada. Ajustar (pH 8,0) com NaOH em pastilhas. Autoclavar 120 °C, 30 minutos.

Solução 3. Tris 2,5 mM (pH 8,0)

Adicionar 0,06 g em 200,0 ml de água destilada. Autoclavar 120 °C, 30 minutos.

2.3. Tampão Tris Clorídrico-EDTA (TE):

10 mM Tris-HCl (pH 7,4)
1 mM EDTA (pH 8,0)

2.4. Tampão da reação de PCR:

200 mM Tris-HCl (pH 8,4)
500 mM KCl
1,5 mM MgCl₂