



Mamíferos sinantrópicos no ciclo de transmissão do *Trypanosoma cruzi* em Yucatán, México

Maria A. Cab-Romero¹, Andrea P. Costa², Jaciara O. J. Costa³, Ingridi B. O. Manhães⁴, Ryan E. Silva³, Hugo A. Ruiz-Piña¹, Enrique A. Reyes-Novelo¹, Francisco J. Escobedo-Ortegon¹, Renata Tonhosolo⁵, Arlei Marcili^{3,4,*}

¹Regional Research Center Dr. Hideyo Noguchi, Mérida, Yucatán, México. ²Department of Pathology, State University of Maranhão, São Luís, Maranhão, Brazil. ³Department of Veterinary Medicine and Animal Health, University of São Paulo, São Paulo, Brazil. ⁴Program of Medicine and Animal Welfare and One Health - Santo Amaro University, São Paulo, SP, Brazil. ⁵Medical College - Santo Amaro University, São Paulo, SP, Brazil.

RESUMO

OBJETIVO

O *Trypanosoma cruzi* compreende populações altamente heterogêneas classificadas em seis unidades de tipagem discreta (DTU's) denominadas Tc-I a Tc-VI e TcBat. A história evolutiva do *T. cruzi* tem uma associação muito forte com seus hospedeiros mamíferos e alguns estudos filogenéticos e ecolobiológicos sugerem que ecótopos, hospedeiros e vetores são fatores que determinam as diferentes linhagens de *T. cruzi*.

MÉTODOS

Caracterizamos isolados de *T. cruzi* de indivíduos sinantrópicos de *Didelphis virginiana* e *Rattus rattus* capturados na aldeia de Molas, Yucatan.

RESULTADOS

Quarenta domicílios foram selecionados e armadilhas foram colocadas no quintal de janeiro a maio de 2014. Sessenta e seis gambás (*Didelphis virginiana*) e 25 ratos (*Rattus rattus*) foram capturados e 13 foram diagnosticados como *T. cruzi* infectados por microhematócrito e hemocultura. Dez isolados de *T. cruzi* foram obtidos para análise filogenética com os genes SSU rDNA, gGAPDH e Citocromo B para descrever as relações entre eles e classificá-los nos diferentes DTU's.

CONCLUSÕES

Este estudo demonstrou a participação dos animais sinantrópicos *D. virginiana* e *R. rattus* como reservatórios do *T. cruzi* em Yucatan_Mexico e os diferentes isolados do parasita pertenceram ao Tc-I. A proximidade dessas espécies com o ambiente doméstico favorece o contato do tripanossomo com a população humana no ambiente doméstico.

DESCRITORES

Gambá. Ratos. DTU's. Filogenia. Doença de Chagas.

Corresponding author:

Arlei Marcili

Universidade de Santo Amaro (UNISA). Rua Prof. Enéas de Siqueira Neto, 340 - Jardim das Imbuías, São Paulo - SP. E-mail: amarcili@prof.unisa.br
/ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0002-0478-6771>

Copyright: This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons

Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided that the original author and source are credited.

INTRODUÇÃO

A doença zoonótica Tripanossomíase americana ou doença de Chagas, tem distribuição que se estende desde o sul dos Estados Unidos até a América do Sul. Atualmente é considerada uma patologia parasitária que causa danos na saúde pública e na economia da América Latina¹⁻³.

A análise filogenética do *Trypanosoma cruzi* baseada em uma série de marcadores nucleares e mitocondriais indicam que o gênero *Trypanosoma* é monofilético^{4,5}. A hipótese da monofilia sugere que um parasita ancestral deu origem aos tripanossomos de mamíferos na África, América e Austrália. As primeiras formas do *T. cruzi* foram associadas aos marsupiais da família *Didelphidae* há 80 milhões de anos^{6,7}. Com o passar do tempo, o *T. cruzi* se adaptou a diferentes mamíferos e, devido aos hábitos hematófagos dos vetores⁸, desenvolveu ciclo digenético devido a diferentes pressões seletivas, originou extensa variedade de populações desse parasita⁹.

Durante anos, os estudos sobre o perfil eletroforético de isoenzimas^{10,11} e outras técnicas moleculares, foram realizados para identificar seis unidades de tipagem discreta (DTU) de *T. cruzi* geneticamente relacionados, denominados Tc-I a Tc-VI e TcBat que estão presentes em diferentes ecótopos e determinam a ecologia evolutiva do parasita de uma região e associam os caracteres biológicos às manifestações clínicas da doença¹²⁻¹⁴.

Todos os DTUs são considerados infecciosos para humanos, alguns estudos sugerem que Tc-II, Tc-III e Tc-IV estão associados a ambientes domésticos, com manifestações crônicas da doença, Tc-III e Tc-IV estão associados a ambientes selvagens e Tc-I com ambos os ambientes¹⁴⁻¹⁶.

No México, estudos vêm sendo realizados desde 1998 utilizando várias técnicas de caracterização molecular e biológica do *T. cruzi* isolados de triatomíneos, mamíferos hospedeiros e humanos, estudo que revelam a presença de *T. cruzi* grupo I principalmente no sudeste do México e *T. cruzi* II no centro deste país com variações no comportamento biológico em modelos murinos quanto à parasitemia, mortalidade e tropismo¹⁷⁻²².

Estudos ainda são escassos, mas revelaram que as populações de *T. cruzi* circulam entre os mamíferos hospedeiros, vetores e ecótopos de forma seletiva, dependendo da associação (hospedeiro-parasita).

O presente estudo foi realizado no município de Molas, Yucatan, onde a proximidade entre as espécies silvestres, os animais domésticos e os triatomíneos podem representar risco para a transmissão do *T. cruzi* para humanos.

Nesse trabalho, caracterizamos filogeneticamente os isolados de *T. cruzi* que circulam na população sinantrópica de *D. virginiana* e *R. rattus* da cidade rural de Molas, Yucatán, México.

MÉTODOS

Área de estudo e mamíferos capturados

O estudo foi realizado na cidade de Molas (20 ° 48'00''N e 89 ° 38'00''W), localizada 16 km ao sul da cidade de Mérida, Yucatán, México. Esta cidade tem uma população de 2.014 habitantes e está dentro dos limites da Reserva Ecológica do Cuxtal. Possui clima sub-úmido quente com chuvas de verão com temperatura média anual superior a 26 °C. Em torno da zona peri-urbana, fragmentos de vegetação secundária predominam em diferentes estágios de sucessão, compostos por espécies nativas de floresta decídua baixa (*Ceiba aesculifolia* *Bombaceae*, *Bursera Simaruba* *Burceraceae* e *Talisia Olivaeformis* *Sapindaceae*, entre outras) e pequenos fragmentos com características desta selva cuja altura varia de 6 a 15 m.

A amostragem foi realizada em um total de 40 domicílios (5m para casas) no município de Molas (Figura 1) com 20 armadilhas Tomahawk Inc.®, 20 armadilhas Sherman® foram colocadas

em cada quintal usando frutas da estação e aveia com baunilha, como isca, respectivamente, por três dias consecutivos de cada mês no período de janeiro a maio de 2014. As armadilhas foram marcadas no momento de sua colocação com uma etiqueta no topo com as seguintes informações: data, número de indivíduos capturados e o número de residência atribuído.



Figura 1. Localização geográfica da cidade de Molas, Yucatan, México.

Os animais foram sedados com 1-5 mg/kg de cetamina e limpeza asséptica com solução de etanol 70% antes da coleta das amostras. Duas alíquotas de sangue foram coletadas por punção cardíaca, uma parte do sangue foi transferida para tubos estéreis contendo álcool para análise de PCR e a outra para hemocultura.

Para o teste de microhematócrito, dois tubos capilares heparinizados foram preenchidos com 50 ul e centrifugados a 3000g por 1 min. A camada leucocitária foi colocada em uma lâmina e coberta com uma lamínula, e toda a área da lâmina foi analisada sob a luz.

Todos os procedimentos de manuseio dos animais foram realizados de acordo com o Comitê de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de São Paulo, Brasil

Isolamento de Tripanossoma

Para detectar os tripanossomatídeos, amostras de sangue foram inoculadas em tubos Vacutainer contendo meio bifásico consistindo de 15% de hemácias de ovelha na fase sólida (base de ágar sangue), sobrepostas por meio de triptose de infusão de fígado líquido (LIT) suplementado com 20% de soro fetal bovino²³. A cultura foi incubada a 28°C e cultivada em meio LIT para preparação de DNA, e os isolados foram criopreservados em nitrogênio líquido na Coleção Brasileira de Tripanossomatídeos (CBT), no Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal da Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de São Paulo, Brasil. As amostras de sangue foram fixadas em etanol (amostras primárias) para detecção molecular.

Extração e amplificação de DNA de sangue e cultura

Foi extraído DNA das amostras das culturas de tripanossoma pelo método do fenol-clorofórmio. A extração do DNA do sangue foi realizada de acordo com o protocolo sugerido pelo fabricante do kit Purelink (Thermo Fisher Scientific Inc, 2012, EUA). As amostras de DNA foram submetidas à reação em cadeia da polimerase convencional (PCR), como resultados gerou-se fragmentos de ~900 pb correspondente ao rDNA V7V8 SSU^{12,23}, gGAPDH (~600pb)²⁴ e citocromo B (~400pb)¹². Os produtos da PCR do tamanho esperado foram purificados e sequenciados em sequenciador automático (ABI Prism 310, Applied Biosystems, Foster City, CA).

Análise filogenética

As sequências obtidas foram alinhadas com sequências previamente determinadas para outras espécies de tripanosomatídeos disponíveis no GenBank (Tabela 1) usando o programa ClustalX²⁵ e foram ajustadas manualmente usando o programa GeneDoc²⁶. As sequências foram usadas para construir árvores filogenéticas usando o método de Máximo parcimônia, por meio do programa PAUP versão 4.0b1027 com 500 réplicas de *bootstrap*. A análise bayesiana foi realizada usando MrBayes v3.1.2²⁸ com 1.000.000 de réplicas. Os primeiros 25% das árvores descartadas e as árvores restantes foram usadas para calcular a probabilidade bayesiana.

RESULTADOS

Um total de 91 mamíferos, entre *Rattus norvegicus* (n = 25) e *Didelphis virginiana* (n = 66) foram coletados da área de estudo e examinados. A taxa geral de infecção dos mamíferos

selvagens foi determinada pelo microhematócrito e hemocultura; 11,83% (13/91) foram positivas das quais 9,1% (10/91) foram positivadas após o cultivo estabelecido.

As sequências dos genes SSU rDNA, gGAPDH e citocromo B (CytB) foram obtidas de dez isolados e comparadas com sequências depositadas no GenBank e as topologias congruentes foram obtidas por máxima parcimônia e análise bayesiana.

Os isolados foram agrupados como *T. cruzi* (100% *bootstrap* / probabilidade 1,0 a posteriori). Todos os isolados de *T. cruzi* obtidos pertencem ao Grupo TCI (100% *bootstrap*/100% probabilidade a posteriori) (Figura 2A e 2B).

Análises intraespecíficas foram realizadas por meio do gene Cyt B (Figura 2C) quando comparadas às cepas de referência do GenBank dos isolados mexicanos oriundos de diferentes hospedeiros (*Triatoma dimidiata*, *Homo sapiens*, *Dipetalogaster maxim*, *Triatoma pallidipennis*)²⁹ não mostraram diferenças entre elas (100 %).

Tabela 1: Isolados de tripanossoma, hospedeiro e origem geográfica e sequências de SSU rDNA, gGAPDH e citocromo B usados para análise filogenética

Espécies de tripanosomatídeos	Código do Isolado	Hospedeiro	Origem geográfica	Número de acesso ^a			
				SSU rDNA	gGAPDH	CytB	
<i>Trypanosoma rangeli</i>	TCC643	<i>Platyrrhinus lineatus</i>	Miranda	MS	EU867803		
<i>T. dionisii</i>	CBT58	<i>Sturnira lillium</i>	Pinheiros	ES	KF557744	KF557735	
	CBT59	<i>Lophostoma braziliense</i>	Pinheiros	ES	KF557745	KF577736	
	PJ	<i>Pipistrellus pipistrellus</i>	Belgium		AJ009152		
	P3	<i>Pipistrellus pipistrellus</i>	England		AJ009151		
	TCC211	<i>Eptesicus brasiliensis</i>	São Paulo	SP		AJ620271	
	TCC289	<i>Eptesicus brasiliensis</i>	São Paulo	SP	FJ001651		
	TCC495	<i>Carollia perspicillata</i>	Porto Velho	RO		GQ140363	
TCC633	<i>Sturnira lillium</i>	Miranda	MS	EU867812			
<i>T. erneyi</i>	TCC1293	<i>Tadarida sp.</i>	Mozambique		JN040987	JN040964	
	TCC1294	<i>Tadarida sp.</i>	Mozambique		JN040988		
	TCC1932	<i>Mops condylurus</i>	Mozambique		JN040990		
	TCC1934	<i>Mops condylurus</i>	Mozambique		JN040991	JN040968	
<i>T. cruzi marinkellei</i>	CBT3	<i>Phyllostomus hastatus</i>	Confresa	MT	JX845151		
	CBT7	<i>Phyllostomus hastatus</i>	Confresa	MT	JX845154		
	CBT8	<i>Carollia perspicillata</i>	Confresa	MT	JX845155		
	CBT10	<i>Trachops cirrhosus</i>	Poconé	MT	JX845157		
	CBT67	<i>Myotis nigricans</i>	Pinheiros	ES		KF557743	
	B7	<i>Phyllostomus discolor</i>	São Felipe	BA	AJ009150		
	TCC420	<i>Chrotopterus auritus</i>	Barcelos	AM	FJ001636		
	TCC501	<i>Carollia perspicillata</i>	Porto Velho	AM		GQ140361	
	TCC708	<i>Chrotopterus auritus</i>	Barcelos	AM	FJ001648		
	CBT95	<i>Phyllostomus sp.</i>	Riachão	MA	KP197159	KP197169	
	CBT99	<i>Phyllostomus hastatus</i>	Riachão	MA	KP197160	KP197170	
	<i>T. cruzi</i>	Y	<i>Homo sapiens</i>	São Paulo	SP	AF301912	GQ140353
		CLBR	<i>Triatoma infestans</i>	São Paulo	SP	AF245383	
Peru		<i>Homo sapiens</i>	Peru		X53917		
JJ		<i>Homo sapiens</i>	Barcelos	AM	AY491761	GQ140355	
TCC463		<i>Cebus albifrons</i>	Barcelos	AM	EU755224		
NRd3		<i>Homo sapiens</i>	Chile		AF228685	GQ140357	
TCC186		<i>Homo sapiens</i>	Bolivia		FJ001630		
TCC862		<i>Euphractus sexcinctus</i>		RN	FJ183397		
TCC863		<i>Euphractus sexcinctus</i>		RN	FJ549376		
MT3663		<i>Panstrongylus geniculatus</i>		AM	AF288660	GQ140355	
TCC129		<i>Proechimys iheringi</i>	São Paulo	SP	FJ555652		
TCC793		<i>Myotis levis</i>	São Paulo	SP	FJ001634	GQ140358	
TCC480		<i>Noctilio albiventris</i>	Miranda	MS	EU867804		

TCC947	<i>Myotis nigricans</i>	São Paulo	SP	FJ001626		
TCC949	<i>Myotis nigricans</i>	São Paulo	SP	FJ001627		
TCC1122	<i>Myotis levis</i>	São Paulo	SP		GQ140359	
G	<i>Didelphis marsupialis</i>		AM	AF239981	GQ140351	
TCC642	<i>Carollia perspicillata</i>	Montenegro	RO			
TCC711	<i>Didelphis marsupialis</i>	Barcelos	AM	EU755229		
TCC1456	<i>Monodelphis brevicaudata</i>	Pará	PA	FJ555623		
Anitall	<i>Triatoma dimidiata</i>	Campeche	MX			JX431272
Cam6	<i>Triatoma dimidiata</i>	Campeche	MX			JX431273
Cristy	<i>Homo sapiens</i>	San Luiz Potosi	MX			JX431274
Mich1	<i>Triatoma dimidiata</i>	Michoacan	MX			JX431275
Ninoa	<i>Homo sapiens</i>	Oaxaca	MX			JX431276
PLI	<i>Dipetalogaster máxima</i>	Baja California Sur	MX			JX431277
QROI	<i>Triatoma Barberi</i>	Queretaro	MX			JX431278
TQI	<i>Triatoma pallidipenis</i>	Morelos	MX			JX431279
XAL1	<i>Triatoma dimidiata</i>	Veracruz	MX			JX431280
CBT169	<i>Rattus rattus</i>	Molás	MX	MK652762	MK681431	MK681141
CBT170	<i>Rattus rattus</i>	Molás	MX	MK652763	MK681432	MK681142
CBT171	<i>Rattus rattus</i>	Molás	MX	MK652764	MK681433	MK681143
CBT172	<i>Didelphis virginiana</i>	Molás	MX	MK652765	MK681434	MK681143
CBT173	<i>Didelphis virginiana</i>	Molás	MX	MK652766	MK681435	MK681144
CBT183	<i>Didelphis virginiana</i>	Molás	MX	MK652767	MK681436	MK681145
CBT184	<i>Didelphis virginiana</i>	Molás	MX	MK652768	MK681137	MK681146
CBT185	<i>Didelphis virginiana</i>	Molás	MX	MK652769	MK681138	MK681147
CBT186	<i>Didelphis virginiana</i>	Molás	MX	MK652770	MK681139	MK681148
CBT187	<i>Didelphis virginiana</i>	Molás	MX	MK652671	MK681140	MK681149

* As sequências determinadas neste estudo e depositadas no GenBank estão sublinhadas em negrito. México (MX) e estados brasileiros: Espírito Santo (ES); São Paulo (SP); Rondônia (RO); Mato Grosso (MT); Bahia (BA); Mato Grosso do Sul (MS); Amazonas (AM); Rio Grande do Norte (RN); Maranhão (MA).

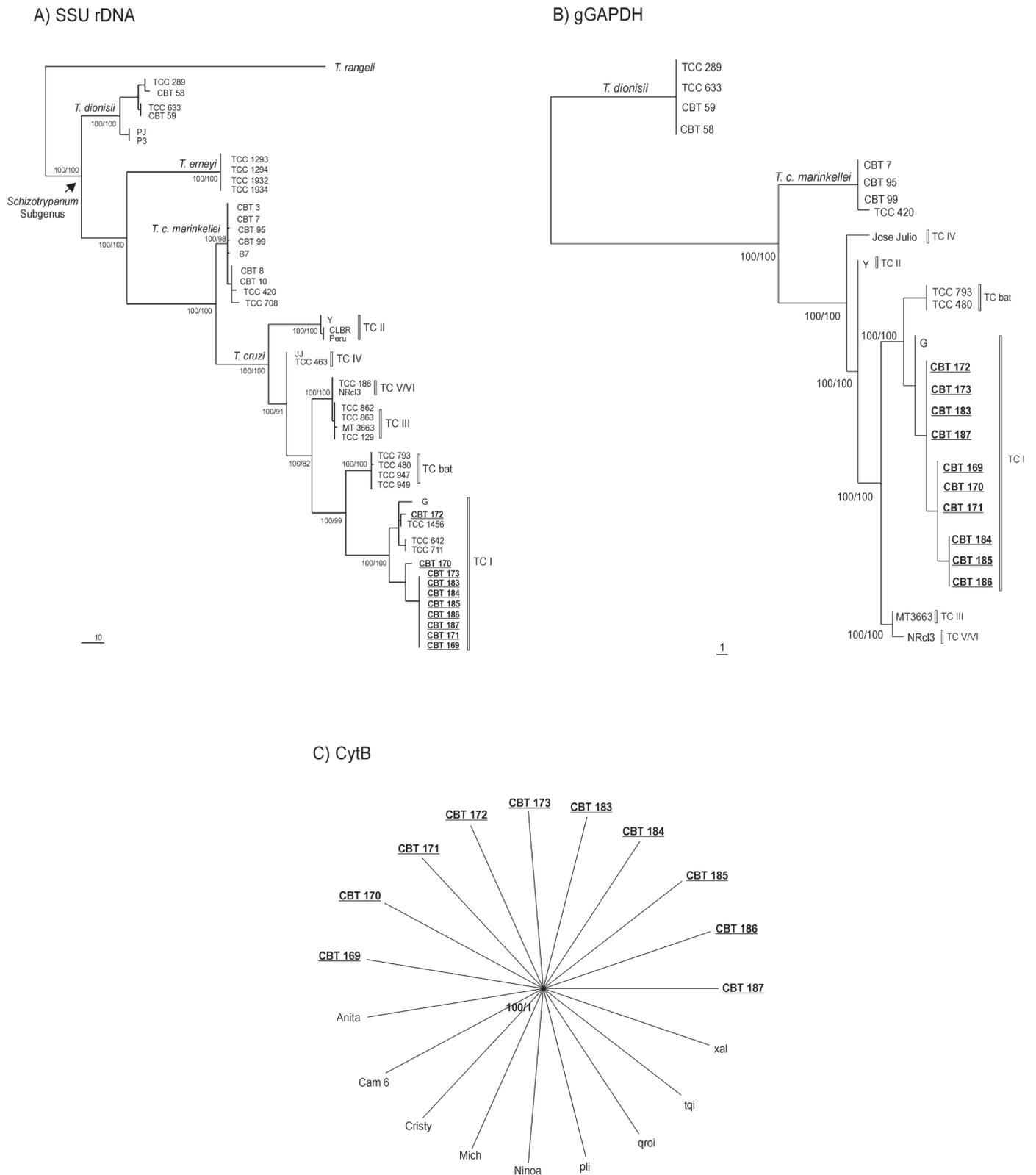


Figura 2. Árvores filogenéticas inferidas por máxima parcimônia e inferência bayesiana. A. Gene SSU rDNA com 48 sequências de tripanosomatídeos do GenBank com *T. rangeli* como grupo externo. Os números dos nós são os valores de suporte para os ramos principais (*Bootstrap* / probabilidade posterior); Gene B. gGAPDH com 20 sequências de tripanosomatídeos do GenBank com *T. dionisii* como grupo externo. Os números dos nós são os valores de suporte para os ramos principais (*Bootstrap* / probabilidade posterior); C. Gene Cyt B com 19 sequências de tripanosomatídeos do GenBank. Os números dos nós são os valores de suporte para os ramos principais (*Bootstrap* / probabilidade posterior). Os isolados do estudo foram sublinhados.

DISCUSSÃO

A ocorrência de infecção por *T. cruzi* no sangue de mamíferos sinantrópicos é de 11,83% detectada por meio de microhematócrito. Os resultados do nosso estudo mostram semelhanças com outros estudos realizados em *Didelphis*³⁰⁻³², demonstrando a importância dos gambás do gênero *Didelphis* em várias zonas geográficas de Yucatan, como reservatórios de *T. cruzi*.

As análises filogenéticas de *T. cruzi* dos isolados de *D. virginiana* e *R. rattus* obtidos de Molas foram agrupadas em Tc-I, o DTU mais comum no México. A positividade do *T. cruzi* em mamíferos sinantrópicos de Molas foi de 11,83%. Os resultados do nosso estudo mostram semelhanças com estudos anteriores e recentes³⁰⁻³².

No entanto, os resultados sobre o genótipo de *T. cruzi* que está presente na população sinantrópica de *D. virginiana* e *R. rattus* da cidade de Molas, estão de acordo com os relatos feitos desde 1992 das cepas de Yucatecan de vetores, de animais silvestres e de humanos^{33,34}, bem como outras regiões do México^{34,17,19,35,36} relatando que a linhagem 1 (classificação antiga) está circulando em diferentes ciclos de transmissão desse parasita.

Bosseno e colaboradores¹⁹ obtiveram 56 isolados (*T. longipennis*, *T. pallidipennis*, *Humanos*, *T. barberi*, *D. virginiana*, *T. phyllostoma*, *T. picturata*, *D. marsupialis* e gambá *Philander*) de nove estados da República Mexicana (Colima, Guanajuato, Jalisco, Morelos, Nayarit, Oaxaca, Veracruz, Yucatan e Zacatecas) de acordo com as análises relatadas, todos os isolados corresponderam à linhagem I exceto 2,4% destes, por estarem agrupados a linhagem II; que corresponderam aos isolados localizados em Veracruz de *D. virginiana* e gambá *Philander*.

Em 2012, o primeiro relato feito no México, detectou diferentes DTU circulando nos mesmos ciclos de transmissão, este estudo foi realizado capturando 300 triatomíneos (*T. dimidiata*) em residências e peridomicílios das localidades de Orizaba e Cordova em Veracruz, encontrando infecção natural por *T. cruzi* em 13,7% (41/300) e os seguintes UDTs foram detectados por vários métodos moleculares: Tc- I: 27% (9/33), Tc-II: 12% (4/33), Tc-III: 15% (5/33), Tc-IV: 18% (6/33) e Tc-V : 27% (9/33), indicando nítida diversidade com altas frequências dos diferentes DTUs do *T. cruzi* apesar do número limitado de amostras²².

Apesar dos diferentes estudos que mostram diferentes DTU distribuídas no México, a predominância de Tc-I em nosso estudo pode ser devido ao fato de que foi demonstrado que os vetores podem atuar como filtros biológicos, selecionando as populações do parasita a serem transmitidas por meio de mecanismos específicos como fatores imunes intestinais, enzimas digestivas e fatores líticos entre outros^{37,38} dessa forma, determinam a etiologia das cepas de *T. cruzi* envolvidas no ciclo de transmissão³⁹.

Por outro lado, deve-se mencionar que nossos resultados são compatíveis com os estudos de Roelling e colaboradores^{40,41} que demonstraram a associação genótipo-hospedeiro no sudeste dos Estados Unidos com duas espécies de marsupiais por infecção experimental (*Monodelphis domestica* e *D. virginiana*), onde a associação de *Didelphis* com DTU I, sugere que a dinâmica de infecção das diferentes cepas de *T. cruzi* pode variar consideravelmente em diferentes hospedeiros selvagens.

No estado de Yucatan, apenas 42 casos humanos foram documentados com cardiomiopatia chagásica entre 1970-1985^{43,44}, uma característica predominante do DTU I. Estudos recentes mostraram que em Yucatan, a soroprevalência varia entre 1% em áreas urbanas e até 4 % em localidades rurais^{45,46}. Neste estudo, é possível que o fluxo genético das populações de *T. cruzi* seja o mesmo entre *D. virginiana* e *R. rattus*, quais transitam entre o ecótopo silvestre e doméstico devido ao seu comportamento sinantrópico, estabelecendo abrigos dentro e fora das moradias humanas, obrigando os vetores (*T. dimidiata*) à adaptação domiciliar, onde encontram abrigo e alimento

suficiente tanto de sangue humano como de animais domésticos, em consequência, a população humana pode ser exposta ao *T. cruzi* e desenvolver Doença de Chagas.

Os ciclos de transmissão do *T. cruzi* nesta área estão ligados principalmente por populações sinantrópicas e seus padrões de movimento. Nos EUA, *D. virginiana* apresenta comportamento familiar e tem movimentação constante em seu território⁴⁷⁻⁵⁰. Nos ciclos silvestres de transmissão do *Trypanosoma cruzi* são mantidos por mamíferos selvagens terrestres e triatomíneos¹². No Brasil, populações domésticas de *R. rattus* são responsáveis pela manutenção de colônias intradomiciliares de espécies de *Triatoma*¹². *D. virginiana* é uma espécie silvestre que possui hábitos sinantrópicos para a busca de alimento, por outro lado, *R. rattus* é uma espécie totalmente sinantrópica e sempre associada às ocupações humanas. A proximidade dessas espécies com o ambiente doméstico favorece o contato do tripanossomo com a população humana e a domiciliação das espécies de triatomíneos ao ambiente doméstico.

CONCLUSÃO

Este estudo demonstra a participação ativa de mamíferos sinantrópicos de alta densidade populacional no ciclo de transmissão da doença de Chagas no município de Molas, Mérida, Yucatán, México

AGRADECIMENTOS

Agradecemos o apoio do CONACYT. Promep 103.5 / 13/5270 e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

REFERÊNCIAS

1. Chagas C. Nova tripanozomíase humana: Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. Mem. Inst. Osw. Cruz. 1909; 1: 159-218.
2. WHO- World Health Organization. Control of Chagas disease. Technical Report series. Geneva. 2002; 66.
3. Muñoz-Saravia S G, Sucre SBH, Berlin CU, Haberland A, Berlin CU, Wallukat G. Chronic Chagas' heart disease: a disease on its way to becoming a worldwide health problem: epidemiology, etiopathology, treatment, pathogenesis and laboratory medicine. Heart. Fail. Rev. 2012; 1: 45-64.
4. Lake JA, De La Cruz VF, Ferreira PCG, Morel C, Simpson L. Evolution of parasitism: Kinetoplastid protozoan history reconstructed from mitochondrial rRNA gene sequences. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1988; 85: 4779-4783.
5. Stevens J, Rambaut, A. Evolutionary rate differences in trypanosomes. Infect. Genet. Evol. 2001; 1: 143-150.
6. Briones MR, Souto RP, Stolf BS, Zingales B. The evolution of two *Trypanosoma cruzi* subgroups inferred from rRNA genes can be correlated with the interchange of American mammalian faunas in the Cenozoic and has implications to pathogenicity and host specificity. Mol. Biochem. Parasitol. 1999; 104:19-232.
7. Buscaglia CA, Di Noia JM. *Trypanosoma cruzi* clonal diversity and the epidemiology of Chagas' disease. Microbes. Infect. 2013; 5: 419-427.
8. Calderón-Arguedas O, Chinchilla M, García F, Vargas M. Variaciones biológicas de *Trypanosoma cruzi* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) asociadas con la ingestión de diferentes tipos de sangre por el vector *Triatoma dimidiata* (Hemiptera: Reduviidae). Parasitol. Latinoam. 2003; 58: 3-10.

9. Schofield CJ, Galvão C. Classification, evolution and species groups within the *Triatominae*. *Acta Trop.* 2009; 100: 88-100.
10. Jansen MA, Rodrigues AL. 2010. Domestic and Wild Mammalian Reservoirs. En: J. Telleria., M. Tibayrenc. (Eds). *American Trypanosomiasis Chagas Disease One Hundred Years of Research*. USA: Elsevier. 2010; 251-278.
11. Miles MA, Toyé 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: 217-225.
12. Miles MA, Souza A, Povoá M, Shaw JJ, Lainson R., Toyé PJ. Isozymic heterogeneity of *Trypanosoma cruzi* in the first autochthonous patients with Chagas' disease in Amazonian Brazil. *Nature.* 1978; 272: 819-821.
13. Marcili A, Lima L, Cavazzana Jr M, Junqueira ACV, Veludo HH, Maia da Silva F, et al. A new genotype of *Trypanosoma cruzi* associated with bats evidenced by phylogenetic analyses using SSU rDNA, cytochrome band Histone H2B genes and genotyping based on ITS 1 rDNA. *Parasitology.* 2009a; 136: 641-655.
14. Zingales B, Andrade SG, Briones MRS, Campbell DA, Chiari E, Fernandes O, Guhl F, et al. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. *Mem. Instit. Oswaldo Cruz.* 2009; 104: 1051-1054.
15. Zingales B, Miles MA, Campbell DA, Tibayrenc M, Macedo AM, Teixeira MM, et al. The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: rationale, epidemiological relevance and research applications. *Infect Genet Evol.* 2012; 12: 240-253.
16. Miles MA, Llewellyn MS, Lewis MD, Yeo M, Baleela R, Fitzpatrick S, et al. The molecular epidemiology and phylogeography of *Trypanosoma cruzi* and parallel research on *Leishmania*: looking back and to the future. *Parasitology.* 2009; 136: 1509-1528.
17. Yeo M, Acosta N, Llewellyn M, Sánchez H, Adamson S, Miles GA et al. Origins of Chagas disease: *Didelphis* species are natural hosts of *Trypanosoma cruzi* I and armadillos hosts of *Trypanosoma cruzi* II, including hybrids. *Int J Parasitol.* 2005; 35: 225-233.
18. Espinoza B, Vera-Cruz JM, González H, Ortega E, Hernández R. Genotype and virulence correlation within Mexican stocks of *Trypanosoma cruzi* isolated from patients. *Acta Tropica.* 1998; 70: 63-72.
19. Barrera-Pérez MA, Rodríguez ME, Guzmán-Marin E, Zavala-Velázquez J, Dumonteil E. Biological behaviour of three strains of *Trypanosoma cruzi* from Yucatan, México. *Revista Biomedica.* 2001; 12: 224-230.
20. Bosseno M, Barnabé C, Magallón E, Lozano F. Predominance of *Trypanosoma cruzi* I lineage in Mexico. *J. Clin. Microbiol.* 2002; 40: 627-632.
21. Bosseno M, Barnabé C, Sierra MJ, Kengne P, Guerrero S, Lozano F. Wild ecotopes and food habitats of *Triatoma longipennis* infected by *Trypanosoma cruzi* lineages I and II in Mexico. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2009; 80: 988-991.
22. Gómez-Hernandez C, Rezende-Oliveira K, Nogueira GA, Rocha L, Borges H, Martínez-Ibarra JA, et al. Molecular characterization of *Trypanosoma cruzi* Mexican strains and their behavior in the mouse experimental model. *Ver. Soc. Bras. Med. Trop.* 2011; 44: 684-690.
23. Ramos-Ligonio A, Torres-Montero J, López-Monteón A, Dumonteil E. Extensive diversity of *Trypanosoma cruzi* discrete typing units circulating in *Triatoma dimidiata* from central Veracruz, Mexico. *Infect. Genet. Evol.* 2012; 12: 1341-1343.
24. Marcili A, Costa AP, Soares HS, Acosta IC, Lima JTR, Minervino AHH, et al. First Report of *Trypanosoma* sp. in Spectacled Caiman (*Caiman crocodilus*): Morphological and Phylogenetic Relationships. *Parasitol.* 2013: 1-7.
25. Hamilton PB, Stevens JR, Gaunt MW, Gidley J, Gibson WC: Trypanosomes are monophyletic: evidence from genes for glyceraldehyde phosphate dehydrogenase and small subunit ribosomal RNA. *Int J Parasitol.* 2004; 34:1393-404.
26. Thompson JD, Gibson TJ. The CLUSTAL X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic. Acids. Res.* 1997; 25: 4876-4882.
27. Nicholas KB, Nicholas Jr HB, Deerfield DW: GeneDoc: analysis and visualization of genetic variation. *Embnew News.* 1997; 4:14.
28. Swofford DL: PAUP: Phylogenetic analysis using parsimony. Beta Version 4.0b10. Sunderland, Massachusetts, USA: Sinauer and Associates. 2002.
29. Ronquist F, Huelsenbeck JP. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics.* 2003; 19: 1572-1574.
30. Zumaya-Estrada FA, Messenger LA, Lopez-Ordóñez T, Lewis MD, Flores-Lopez CA, Martínez-Ibarra AJ, et al. North American import? Charting the origins of an enigmatic *Trypanosoma cruzi* domestic genotype. *Parasit. Vectors.* 2012; 5: 226.
31. Ruiz-Piña H, Cruz-Reyes A. The opossum *Didelphis virginiana* as a synanthropic reservoir of *Trypanosoma cruzi* in Dzildzilché, Yucatán, México. *Mem. Inst. Osw. Cruz.* 2002; 5: 613-620.
32. Parada-López J, Hernández-Betancourt SF, Ruiz-Piña HA, Escobedo-Ortegón FJ, Medina-Peralta S, Panti-May JA. *Trypanosoma cruzi* Infection in *Didelphis virginiana* in Relation to Population Parameters and Variables Associated with Presence in Rural Community Dwellings in Yucatan, Mexico. *EcoHealth.* 2013; 10: 31-35.
33. Tamy-Segovia P, Blum-Dominguez SC, Núñez-Oreza LA, Martínez-Hernandez F, Gómez-Solano MI, Maldonado-Velasquez MG, Retana-Guiascón OG. Presence of Virginia opossum (*Didelphis virginiana*) and Pic (*Triatoma dimidiata*) infected with *Trypanosoma cruzi* in urban areas: preliminary evaluation in the city of Campeche, Mexico. *Austral J. Vet. Sci.* 2017; 49: 35-38.
34. Zavala-Castro JE, Velasco-Castrejon O, Hernandez R. Molecular characterization of Mexican stocks of *Trypanosoma cruzi* using total DNA. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1992; 47: 201-209.
35. López-Olmos V, Pérez-Nasser N, Pinero D, Ortega E, Hernandez R, Espinoza B. Biological characterization and genetic diversity of Mexican isolates of *Trypanosoma cruzi*. *Acta. Trop.* 1998; 69: 239-254.
36. Ruiz- Sánchez R., De León P, Matta V, Reyes P, Monteón V. *Trypanosoma cruzi* isolates from Mexican and Guatemalan acute and chronic chagasic cardiopathy patients belong to *Trypanosoma cruzi* I. *Mem. Inst. Oswaldo. Cruz.* 2005; 100: 281-83.
37. Sánchez-Guillén MC, Bernabé C, Tibayrenc M, Zavala-Castro J, Totolhua JL, Méndez-López J, et al. *Trypanosoma cruzi* strains isolated from human, vector, and animal reservoir in the same endemic region in Mexico and typed as *T. cruzi* I, discrete unit 1 exhibit considerable biological diversity. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 2006; 101: 585-590.
38. García E, Azambuja P. Development and interactions of *Trypanosoma cruzi* within the insect vector. *Parasitology Today.* 1991; 9:240-244.
39. Cuervo P, Cupolillo E, Segura I, Saravia N, Fernandes O. Genetic diversity of Colombian sylvatic *Trypanosoma cruzi* isolates revealed by the ribosomal DNA. *Mem. Inst. Osw. Cruz.* 2002; 97:877-880.

40. Patterson SJ, Guhl F. Domestic and Wild Mammalian Reservoirs. En: J. Telleria., M. Tibayrenc. (Eds). American Trypanosomiasis Chagas Disease One Hundred Years of Research. USA: Elsevier. 2010; p. 94.
41. Roellig DM, Ellis AE, Yabsley MJ. . Genetically different isolates of *Trypanosoma cruzi* elicit different infection dynamics in raccoons (*Procyon lotor*) and Virginia opossums (*Didelphis virginiana*). Int. J. Parasitol. 2009a; 39: 1603-1610.
42. Roellig DM, McMillan K, Ellis AE, Vandeberg JL, Champagne DE, Yabsley MJ. Experimental infection of two South American reservoirs with four distinct strains of *Trypanosoma cruzi*. Parasitology. 2009b; 137: 959-966.
43. O'Connor, O., Bosseno, M.F., Barnabé, C., Douzery, E.J.P., Benière, S.F., 2007. Genetic clustering of *Trypanosoma cruzi* I lineage evidenced by intergenic miniexon gene sequencing. Infect. Genet. Evol. 7, 587-593.
44. López-Cancino SA, Tun-Ku E, Cruz-Félix HK, Ibarra-Cerdeña CN, Izeta-Alberdi A, Pech-May A, et al. Landscape ecology of *Trypanosoma cruzi* in the southern Yucatan Peninsula. Acta Trop. 2015; 51: 58-72.
45. Barrera-Pérez M, Rodríguez-Félix ME, Guzmán-Marín E, Zavala-Velázquez J. Enfermedad de Chagas en el estado de Yucatán. Revisión de casos clínicos en fase aguda de 1970-1989. Revista Biomédica. 1990; 1: 185-195.
46. Zavala-Castro JE, Gutiérrez-Flota H, Barrera-Pérez MA, Bolio-Solis AJ, Zavala-Velázquez JE. Chronic Chagas cardiomyopathy detected in patients at the Regional General Hospital O´Horan, Merida, Yucatan, Mexico. Arch. Inst. Cardiol. Mex. 1995; 65: 546-550.
47. Sosa-Estani S, Gamboa-Leon MR., Del Cid-Lemus J, Althabe F, Alger J, Almendares O. Use of a rapid test on umbilical cord blood to screen for *Trypanosoma cruzi* infection in pregnant women in Argentina, Bolivia, Honduras and México. Am. J. Trop. Med. Hyg. 2008; 79: 755-759.
48. Gamboa-León R, Ramirez-Gonzalez C, Pacheco-Tucuch FS, O´Shea M, Rosecrans K, Pippitt J. Seroprevalence of *Trypanosoma cruzi* among mothers and children in rural Mayan communities and associated reproductive outcomes. Am. J. Trop. Med. Hyg. 2014; 91: 348-53.
49. Wiseman GL, Hendrickson GO. Notes on the life history and ecology of the opossum in Southeast Iowa. J. Mamm. 1950; 31: 331-336.
50. Long CA, Copes FA. Note on the rate of dispersion of the opossum in Wisconsin. Am. Midl. Nat. 1968; 80: 283-284.
51. Gehrt SD, Clark DE, Fritzell EK. Population dynamics and ecology of Virginia opossum in southern Texas. Southwest. Nat. 1997; 42: 170-176.