Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas René Rachou
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

Avaliação da colonização de *Trypanosoma cruzi* e *Trypanosoma rangeli* no trato intestinal de *Rhodnius prolixus*

por

Roberta Carvalho Ferreira

Belo Horizonte
Fevereiro/2014

DISSERTAÇÃO MDIP-CPqRR R.C.FERREIRA 2014

Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas René Rachou
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

Avaliação da colonização de *Trypanosoma cruzi* e *Trypanosoma rangeli* no trato intestinal de *Rhodnius prolixus*

por

Roberta Carvalho Ferreira

Dissertação apresentada com vistas à obtenção do Título de Mestre em Ciências na área de concentração Doenças Infecciosas e Parasitárias

Orientação: Drª. Alessandra Aparecida Guarneri
Co-orientação: Dr. Marcelo Gustavo Lorenzo

Belo Horizonte
Fevereiro / 2014

Catalogação-na-fonte
Rede de Bibliotecas da FIOCRUZ
Biblioteca do CPqRR
Segemar Oliveira Magalhães CRB/6 1975

F383a Ferreira, Roberta Carvalho.
2014

Avaliação da colonização de *Trypanosoma cruzi* e *Trypanosoma rangeli* no trato intestinal de *Rhodnius prolixus* / Roberta Carvalho Ferreira. – Belo Horizonte, 2014.

XXI, 90 f.: il.; 210 x 297mm.
Bibliografia: f.: 83 - 112
Dissertação (Mestrado) – Dissertação para obtenção do título de Mestre em Ciências pelo Programa de Pós - Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou. Área de concentração: Doenças Infecciosas e Parasitárias.

1. Doença de Chagas/transmissão 2. *Trypanosoma cruzi* /patogenicidade 3. *Trypanosoma rangeli*/patogenicidade 4. Reação em Cadeia da Polimerase/utilização. III. Guarneri, Alessandra Aparecida (Orientação). IV. Lorenzo, Marcelo Gustavo (Co-orientação).

CDD – 22. ed. – 616.936 3

Ministério da Saúde

Fundação Oswaldo Cruz

Centro de Pesquisas René Rachou

Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

Avaliação da colonização de *Trypanosoma cruzi* e *Trypanosoma rangeli* no trato intestinal de *Rhodnius prolixus*

por

Roberta Carvalho Ferreira

Foi avaliada pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Dr. Marcelo Gustavo Lorenzo (Presidente)

Prof. Dr. Rodrigo Pedro Pinto Soares

Prof. Dr. Maurício Roberto Viana Sant'Anna

Suplente: Profa. Dra. Silvane Maria Fonseca Murta

Dissertação defendida e aprovada em: 24/02/2014

"Ninguém sabe tudo, assim como ninguém ignora tudo. O saber começa com a consciência do saber pouco. É sabendo que se sabe pouco que uma pessoa se prepara para saber mais (...). O homem como ser histórico, inserido num permanente movimento de procura, faz e refaz constantemente o seu saber."

Paulo Freire

Aos meus pais

Agradecimentos

Gostaria de agradecer a todos que de alguma forma contribuíram para minha formação acadêmica, o que culminou na presente dissertação. Primeiramente, gostaria de agradecer à minha orientadora Dra. Alessandra Guarneri, pela oportunidade e confiança no meu trabalho, pela orientação e atenção, pelas palavras de incentivo e, sobretudo, pelo entusiasmo transmitido em nossas conversas. Ao meu co-orientador Dr. Marcelo Lorenzo, pelas agradáveis e enriquecedoras discussões e disponibilidade para as correções. À Dra. Adriana de Melo Ferreira, por ser minha primeira professora dentro do universo científico, pela ajuda na padronização dos primeiros ensaios no alimentador artificial e nas infecções com o *T. cruzi* durante a iniciação científica. Obrigada pelo carinho, convivência e ensinamentos. Ao Dr. Jose Manuel Estivalis pela disponibilidade em discutir as questões sobre qPCR. À Dra. Juliana Alves da Silva, pelo carinho, simpatia e disponibilidade para sanar minhas dúvidas sobre biologia molecular. Ao Dr. Pedro Aguiar pela simpatia e gentileza em ceder o corante vital Eritrosina. À Dra. Silvane Murta por ceder gentilmente o meio RPMI sem soro para os ensaios de incubação *in vitro* com o *T. cruzi*. Ao Dr. Theo Mota pelo auxílio com a microscopia e à Dra. Regiana Oliveira pela enorme boa vontade e simpatia no auxílio com a microscopia, e pela breve, contudo, prazerosa convivência.

Aos professores do CPqRR, pelos ensinamentos durante as disciplinas do mestrado e pela disponibilidade em sanar minhas dúvidas. Aos professores do ICB/UFMG, pelos ensinamentos durante o curso de Ciências Biológicas, em especial aos Profs. Fernando Silveira, Alice Kumagai e Adalberto dos Santos durante as disciplinas de zoologia de invertebrados, e também aos Profs. Nelder Gontijo e Marcos Horácio Pereira durante a disciplina de parasitologia, pessoas que posteriormente fizeram parte não apenas da escolha da área do mestrado, mas também de discussões durante as várias etapas do presente trabalho. Muito obrigada pela disponibilidade e por transmitirem o entusiasmo pela ciência aos seus alunos.

Aos meus colegas da turma da pós-graduação, que tornaram as disciplinas mais agradáveis e enriquecedoras. Em especial à Laurinha, Marinely, Heverton e à querida amiga Josie, com quem tive a oportunidade de dividir novamente a sala de aula.

Aos meus colegas e ex-colegas do LATEC, por partilharem comigo um pouquinho de cada um durante a convivência do dia-a-dia. Em particular, agradeço aos colegas e ex-colegas do grupo de Comportamento de Vetores e Interação com Patógenos, por dividir o espaço, materiais, escalas de horários, ensinamentos, discussões de artigos e pela agradável convivência. À Rafa Paim pelos ensinamentos sobre qPCR em tempo real e pela convivência

prazerosa, no LATEC, no LFIH e durante os congressos. Ao Newmar Marliére por, com muito bom humor, boa vontade e carisma, ter me introduzido ao fantástico mundo dos triatomíneos durante a iniciação científica. Obrigada, New, por toda ajuda, ensinamentos, compreensão e amizade ao longo desses anos de agradável convívio dentro e fora do laboratório. À Luciana Ferreira, por ter me apresentado com tanto entusiasmo o *T. rangeli*. Lu, muito obrigada por todas as palavras de incentivo nos vários momentos da minha trajetória, desde a primeira RAIC, o primeiro congresso internacional, o fim da graduação, a seleção do mestrado e finalmente, muito obrigada por me apoiar durante os experimentos do mestrado e a dissertação. Obrigada por toda ajuda e convivência agradável ao longo desses anos no laboratório e nos congressos. À Raquel Fellet por compartilhar comigo a experiência acadêmica, que foram desde a organização dos afazeres semanais até a escrita do projeto e da dissertação. Obrigada pelas discussões de artigos, pela ajuda nas dúvidas de estatística, pela torcida na reta final dos experimentos e na finalização da dissertação. Sou grata pelos diversos ensinamentos acadêmicos, mas sou grata, principalmente, pela amizade sincera, apoio, carinho e cuidado. Sentirei falta dos almoços "em família". Ao Thiago Belinato, porque sei que, de maneiras distintas, também participou de grande parte desse processo, nas dúvidas sobre escrita e análises estatísticas. Muito obrigada também pela convivência prazerosa. À Juliana Rodrigues, tenho que agradecer, primeiramente, pela imensurável paciência, carinhosa recepção e pelos valiosos ensinamentos durante a iniciação científica. Obrigada por compartilhar comigo conhecimentos sobre cultivo e contagem de parasitos, pelos ensinamentos nos diversos procedimentos que se tornaram minha rotina no laboratório. Obrigada por me permitir ser sua companheira na aprendizagem das técnicas de biomol, no meio de tantas padronizações, de extrações e quantificações de DNA, curva-padrão, mapas de placas de qPCR, enfim, obrigada pela parceria. À querida Juju, tenho que agradecer, também, por ser minha inspiração de todos os dias. Você se tornou uma grande amiga, foi minha parceira dentro e fora do laboratório. Muito obrigada por tudo. De diversas formas você me ensinou a ser uma pessoa mais paciente, mais otimista, mais corajosa, mais concentrada e disciplinada. Você me incentiva a querer ser sempre melhor. Obrigada pela amizade sincera.

Às queridas amigas que ingressaram comigo no curso de Ciências Biológicas agradeço pelo convívio e amizade construída durante os anos de UFMG e mesmo após cada uma tomar seu caminho. Em especial à Marcela, Tatá, Lu e Bela pelo incentivo e apoio em minha jornada acadêmica e pelos momentos de descontração agradáveis. Muito obrigada, Rafa querido, por fazer parte do meu processo de crescimento ao longo da graduação e da pós-graduação. Obrigada, principalmente, por fazer parte da minha vida de forma especial e extremamente singular. Obrigada por me compreender, apoiar e respeitar, mesmo quando não

concordamos um com o outro. Obrigada pelas risadas e pelas lágrimas divididas. À companheira e amiga especial, Quelzinha, agradeço imensamente por fazer parte dessa caminhada mesmo antes de decidirmos nossos caminhos. Obrigada pela energia positiva sempre e por me ensinar o poder de um sorriso nos dias difíceis. Às "amigudas" Lelê, Thessinha, Gabi, Fabi, Raquelita, Ana Lu, Laurinha, Elisa pelos momentos de descontração recheados de boas risadas e pela amizade construída.

Não poderia deixar de agradecer aos amigos e familiares que, mesmo em sintonias diferentes, souberam respeitar minhas escolhas e torcer pelo meu sucesso nessa trajetória. "Família CH", obrigada por deixarem os momentos de lazer muito mais agradáveis, divertidos e leves. Em especial à Tê e à Nayara, pelo carinho, amizade sincera e por entenderem minha ausência. Aninha, que é minha, prima, irmã de coração e amiga, sou imensamente grata por estar sempre presente. Obrigada pelo amor simples e leve. Sou grata pela lealdade, cumplicidade e, principalmente, por estar nessa torcida desde o primeiro instante. Minhas Anas queridas, qualquer agradecimento a vocês soará limitado diante do real significado de vocês em minha vida, mas gostaria de agradecer, sobretudo, pelo carinho, apoio e amor desmedido. Flávia, Tici e Ana Beatriz, obrigada pelos anos de amizade sincera, por me apoiarem nessa caminhada entendendo minha ausência quando necessária. Carla, obrigada por estar presente mesmo distante. Obrigada por me acompanharem e entenderem minha abdicação nas festividades. Sem vocês, com certeza, o caminho seria mais tortuoso. Amo vocês e cada um sabe seu lugar em meu coração.

Lucas, meu parceiro, amigo, amante, cúmplice e companheiro na trajetória acadêmica e pessoal. Obrigada por estar presente em todos os momentos. Obrigada por se mostrar pontual em sanar minhas inquietudes, apoiar, motivar, por me trazer à razão e me fazer esquecer, mesmo que momentaneamente, da mesma quando necessário. Obrigada pela imensa paciência, pelas discussões metodológicas, pela ajuda na formatação da dissertação e durante as pesquisas nas bases de dados. Gostaria de agradecer também à Denise e ao Carmelo por entenderem e respeitarem, nos momentos finais da escrita, minha concentração e abdicação aos momentos de lazer.

Tenho que agradecer imensamente àqueles que certamente são os grandes responsáveis por, não apenas este trabalho, mas por tudo que já fiz e faço em minha vida. Sou imensamente grata por serem minha torcida de maior peso e meu alicerce. Agradeço aos meus avós, pelo exemplo de vida, por estarem presentes em nossas vidas mesmo que ausentes, já que a saudade mal cabe em mim. Mãe, pai, tia Zane, obrigada pelo exemplo, pelos valores e pelo apoio sem medidas em tudo que faço. As palavras são limitadas quando se trata de expressar a gratidão pelo amor, incondicional e imensurável, de vocês todos.

Meus sinceros agradecimentos, também, ao Biotério de Produção do CPqRR, na pessoa da coordenadora Fernanda Trindade pelo suporte necessário para realização dos experimentos deste trabalho, principalmente pelos camundongos indispensáveis na realização dos experimentos com o *T. cruzi*, e pelo convívio agradável. Ao Biotério de Experimentação do CPqRR, na pessoa da coordenadora Ana Carolina Teixeira, pelo suporte necessário para realização deste trabalho. Em especial ao Neviton Neves pela dedicação e cuidado diário no manejo dos camundongos e pelo auxílio durante os experimentos no biotex, sempre com boa vontade e um sorriso no rosto.

À Secretaria de Ensino, nas pessoas de Andrea Silva e Patrícia Parreiras, pela disponibilidade para resolver as questões burocráticas.

Agradeço à Biblioteca de Ciências da Saúde Prof. Zigman Brener do CPqRR e, principalmente, à Nuzia dos Santos, pela boa vontade, simpatia e pelo auxílio nas pesquisas, o que foi fundamental para minha formação durante o curso e para a escrita da dissertação. Agradeço também ao Segemar Magalhães pela catalogação e normalização da dissertação.

Agradeço às instituições financeiras que apoiaram diretamente esse trabalho, inclusive na fase de iniciação científica. Meus agradecimentos ao Centro de Pesquisas René Rachou/FIOCRUZ, na pessoa da sua diretora Zélia Maria Profeta da Luz e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, na pessoa do coordenador Edelberto Santos Dias, pela oportunidade e pelo suporte necessário para realização deste trabalho. À Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG), à Coordenação de Aperfeicoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e ao INCT - Institutos Nacionais de Ciência e Tecnologia.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS XIV
LISTA DE TABELAS XVIII
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS XIX
RESUMO XX
ABSTRACT XXI
1 INTRODUÇÃO 22
2 OBJETIVOS 26
2.1 Objetivo Geral 26
2.2 Objetivos Específicos 26
3 REVISÃO DA LITERATURA 27
3.1 Sobre a interação *Trypanosoma*-triatomíneos 27
3.2 *Trypanosoma cruzi* e suas interações com o hospedeiro invertebrado 29
3.3 Trypanosoma rangeli e suas interações com o hospedeiro invertebrado 35
4 MÉTODOS *41*
4.1 Triatomíneos 41
4.2 Parasitos 41
4.3 Ensaios biológicos 43
4.3.1 Avaliação do processo de colonização de *T. rangeli* e *T. cruzi* no intestino médio anterior de *R. prolixus* 43
4.3.2 Quantificação do *T. rangeli* e *T. cruzi* no intestino médio anterior de *R. prolixus* através de câmara de Neubauer ou do método a fresco de Brener (1962) 45
4.3.3 Avaliação do processo de diferenciação de formas tripomastigotas de *T. rangeli* e *T. cruzi* para formas epimastigotas no intestino médio anterior de *R. prolixus* 45
4.3.4 Extração de DNA e Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa em Tempo Real (qPCR) 46
4.3.5 Avaliação do tempo de viabilidade do DNA de *T. cruzi* no trato intestinal de *R prolixus* através da qPCR 47
4.3.6 Avaliação da adesão de *T. cruzi* no intestino médio anterior de *R. prolixus* 48
4.3.7 Avaliação *in vitro* da mortalidade de tripomastigotas sanguíneas de *T. cruzi* 48
4.4 Análise estatística 49
5 RESULTADOS *50*
5.1 Colonização do trato intestinal de *R. prolixus* por *T. rangeli* 50
5.1.1 Comparação das taxas de recuperação de parasitos no IMA após a infecção de *R. prolixus* com formas epimastigotas ou tripomastigotas de *T. rangeli* 50
5.1.2 Desenvolvimento do *T. rangeli* no IMA de *R. prolixus* 51
5.1.2.1 Quantificação do *T. rangeli* no IMA de *R. prolixus* ao longo do tempo 51
5.1.2.2 Diferenciação de tripomastigotas em epimastigotas de *T. rangeli* no IMA de *R. prolixus* 53
5.2 Colonização do trato intestinal de *R prolixus* por *T. cruzi* 54
5.2.1 Comparação das taxas de recuperação de parasitos no IMA após a infecção de *R. prolixus* com formas epimastigotas ou tripomastigotas de *T. cruzi* 54

5.2.2 Desenvolvimento do *T. cruzi* no IMA de *R. prolixus* 56
5.2.2.1 Diferenciação de tripomastigotas em epimastigotas 56
5.2.2.2 Avaliação da potencial relação entre a parasitemia do sangue do camundongo e o numero de parasitos recuperados no IMA de *R. prolixus* 58
5.2.2.3 Quantificação do *T. cruzi* através de contagem a fresco 59
5.2.3 Desenvolvimento do *T. cruzi* no IMP de *R. prolixus* 61
5.2.3.1 Diferenciação de tripomastigotas em epimastigotas 61
5.2.3.2 Quantificação do *T. cruzi* através de contagem a fresco 62
5.2.4 Quantificação do *T. cruzi* através de qPCR 64
5.2.4.1 Quantificação do *T. cruzi* no IMA de *R. prolixus* através de qPCR 64
5.2.4.2 Quantificação do *T. cruzi* no IMP de *R. prolixus* através de qPCR 66
5.2.4.3 Avaliação do tempo de viabilidade do DNA de *T. cruzi* para detecção por qPCR no trato intestinal de *R. prolixus* 67
5.2.5 Avaliação da adesão de *T. cruzi* no epitélio do IMA de *R. prolixus* 69
5.2.6 Avaliação *in vitro* da mortalidade de tripomastigotas sanguíneas de *T. cruzi* 69
6 DISCUSSÃO 72
7 CONCLUSÕES 82
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 83

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Formas de desenvolvimento do *T. cruzi* no inseto vetor: (A) formas tripomastigotas sanguíneas, circulares/esferomastigotas no intestino médio anterior, (B) formas epimastigotas, as quais são as formas replicativas no invertebrado, no intestino médio posterior e as (C) formas tripomastigotas metacíclicas, as quais são as formas infectantes ao hospedeiro vertebrado, e formas epimastigotas na ampola retal (Garcia *et al*., 2007). 30

Figura 2 - Estádios de desenvolvimento de *Rhodnius prolixus*: ovos, cincos estádios ninfais e adultos (Foto: Newmar Marliére). 33

Figura 3 - Formas de desenvolvimento do *T. rangeli* no inseto vetor: (A e B) formas epimastigotas encontradas no trato intestinal e na hemocele, (C) formas tripomastigotas metacíclicas, infectivas para os hospedeiros vertebrados, encontradas nas glândulas salivares (adaptado de Garcia *et al.*, 2007; Fellet, 2014). 37

Figura 4 - Alimentador artificial: alimentadores de vidro conectados ao banho-maria com circulação interna e externa de água, com sensor de temperatura (Foto: Mª Raquel Fellet)....42

Figura 5 - Esquema do tubo digestivo de um triatomíneo: (A) intestino médio anterior, (B) intestino médio posterior e (C) ampola retal (adaptado de Garcia *et al*., 2007; Rodrigues, 2013). 44

Figura 6 - Desenho esquemático das formas (A) epimastigota e (B) tripomastigota de Trypanosomatidae, com (1) cinetoplasto, (2) núcleo, (3) membrana ondulante e (4) flagelo (adaptado de Hoare *et al*., 1966).....45

Figura 7 – Porcentagem de parasitos recuperados no IMA de *R. prolixus* três horas após a alimentação infectiva com formas epimastigotas de cultura e formas tripomastigotas sanguíneas de *T. rangeli* (*n*=10 insetos por grupo). 51

Figura 8 – Perfil temporal da quantidade de parasitos/µl no IMA de *R. prolixus* após alimentação infectiva em (A) alimentador artificial contendo epimastigotas de *T. rangeli* e (B) em camundongo infectado com *T. cruzi*, quantificados por câmara de Neubauer. Cada ponto corresponde à quantificação dos parasitos de um inseto e cada barra horizontal corresponde à mediana do grupo avaliado (*n*≥5). 52

Figura 9 – Perfil temporal de diferenciação (%) das formas tripomastigotas sanguíneas de *T. rangeli* em formas intermediárias e epimastigotas no IMA de *R. prolixus*. A porcentagem de formas evolutivas presentes foi calculada a partir da contagem de 50 campos microscópicos em lâminas coradas pelo método de Giemsa (*n*=10 lâminas para cada tempo avaliado). 53

Figura 10 - Formas tripomastigotas (A e B), intermediárias (C e D) e epimastigotas (E e F) de *T. rangeli* encontradas no IMA de *R. prolixus*. Aumento de 1.000x 54

Figura 11 – Porcentagem de parasitos recuperados no IMA de *R. prolixus* três horas após alimentação infectiva com formas epimastigotas de cultura ou formas tripomastigotas sanguíneas de *T. cruzi* (*n*=20 insetos por grupo). 55

Figura 12 – Perfil temporal da quantidade de parasitos/µl no IMA de *R. prolixus* após alimentação infectiva em (A) alimentador artificial contendo epimastigotas de *T. cruzi* e (B) em camundongo infectado com *T. cruzi*, quantificados por câmara de Neubauer. Cada ponto representa a quantificação dos parasitos de um inseto e cada barra horizontal corresponde à mediana do grupo avaliado (*n*≥5). 56

Figura 13 – Perfil temporal da diferenciação (%) de formas tripomastigotas sanguíneas de *T. cruzi* em formas intermediárias no IMA de *R. prolixus*. A porcentagem de formas de desenvolvimento presentes foi calculada a partir da contagem de 50 campos microscópicos de lâminas coradas pelo método de Giemsa (*n*=5 lâminas para cada tempo avaliado) 57

Figura 14 – Formas tripomastigotas (A e B) e intermediárias (C, D e E) de *T. cruzi* encontradas no IMA de *R. prolixus*. Aumento de 1.000x. 57

Figura 15 - Porcentagem de parasitos recuperados no IMA de *R. prolixus* três horas após alimentação em camundongo infectado com de *T. cruzi* apresentando diferentes níveis de parasitemia. Cada ponto representa a quantificação dos parasitos de um inseto. 58
Figura 16 – Quantidade de parasitos/µl detectados no IMA de *R. prolixus* três horas após a alimentação em camundongo infectado com baixas (A) e altas (B) parasitemias de *T. cruzi*. Cada ponto representa a quantificação dos parasitos de um inseto e cada barra horizontal corresponde à mediana do grupo avaliado (*n*≥5).....59

Figura 17 – Perfil temporal da quantidade de parasitos/µl no intestino médio anterior de *R. prolixus* após alimentação infectiva em camundongos infectados com parasitemias baixas (A) e altas (B) de *T. cruzi*, quantificados por câmara de Neubauer. Cada ponto representa a quantificação dos parasitos de um inseto e cada linha horizontal corresponde à mediana do grupo avaliado. 60

Figura 18 – Perfil temporal de diferenciação (%) das formas tripomastigotas sanguíneas em formas intermediárias e epimastigotas de *T. cruzi* no IMP de *R. prolixus*. A porcentagem de formas evolutivas presentes foi calculada a partir da contagem de 50 campos microscópicos de lâminas coradas pelo método de Giemsa (*n*=5 lâminas para cada tempo avaliado).....61

Figura 19 – Formas tripomastigotas em processo de diferenciação (A), formas intermediárias (B e C) e epimastigotas (D) de *T. cruzi* encontradas no IMP de *R. prolixus*. Aumento de 1.000x. 62

Figura 20 – Quantidade de parasitos/µl no IMP de *R. prolixus* após 3 horas (A) e 24 horas (B) da alimentação em camundongos infectados com baixas ou altas parasitemia de *T. cruzi* quantificados pelo método a fresco de Brener (1962). Cada ponto representa a quantificação dos parasitos de um inseto e cada linha horizontal corresponde à mediana do grupo avaliado (*n*≥8). 63

Figura 21 – Perfil temporal da quantidade de parasitos/µl no IMP de *R. prolixus* após alimentação infectiva em camundongos infectados com parasitemias baixas (A) e altas (B) de *T. cruzi*, quantificados pelo método a fresco de Brener (1962) Cada ponto representa a quantificação dos parasitos de um inseto (proveniente dos ensaios com parasitemias baixas e altas) e cada linha horizontal corresponde à mediana do grupo avaliado (*n*≥8).....64

Figura 22 – Perfil temporal da quantidade de parasitos/µl no IMA de *R. prolixus* após alimentação infectiva em camundongos infectados com *T. cruzi*, quantificados através de câmara de Neubauer (A) e qPCR (B). Cada ponto representa a quantificação dos parasitos de um inseto e cada barra horizontal corresponde à média de cada grupo avaliado ($n \geq 8$). 65

Figura 23 – Perfil temporal da quantidade de parasitos/µl no IMP de *R. prolixus* após alimentação infectiva em camundongos infectados com *T. cruzi*, quantificados pelo método a fresco de Brener (1962) (A) e qPCR (B). Cada ponto representa a quantificação dos parasitos de um inseto e cada barra horizontal corresponde à mediana do grupo avaliado ($n \geq 8$).....67

Figura 24 – (A) Porcentagem de DNA de *T. cruzi* recuperado e (B) perfil temporal da quantidade de DNA que corresponde à quantidade de parasitos/µl no IMA de *R. prolixus* após alimentação com *T. cruzi* mortos. Cada ponto representa a quantificação de DNA de *T. cruzi* em um inseto e cada barra horizontal corresponde à média do grupo avaliado ($n \geq 8$). 68

Figura 25 – Redução da concentração de *T. cruzi* (porcentagem) em relação à concentração inicial de parasitos/µl após 12 horas de incubação em PBS. As barras correspondem à média+erro-padrão de 5 repetições. 70

Figura 26 – Redução da concentração de *T. cruzi* (porcentagem) em relação à concentração inicial de parasitos/µl após 24 horas de incubação em meio RPMI sem soro. As barras correspondem à média+erro-padrão de 5 repetições. 71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Quantidade de parasitos presentes no conteúdo e no epitélio do IMA de ninfas de *R. prolixus* alimentadas em camundongos infectados por *T. cruzi*, em diferentes períodos após a infecção.....69

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AR – ampola retal

BOD – *Biochemical Oxygen Demand*

CECAL – Centro de Criação de Animais de Laboratório

CEUA – Comitê de Ética no Uso de Animais

CPqRR – Centro de Pesquisas René Rachou

DMEM – meio de cultura (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*)

DNA – ácido desoxiribonucléico

dpi – dia pós-infecção

hpi – hora pós-infecção

IFN-γ – interferon gama

IMA – intestino médio anterior

IMP – intestino médio posterior

LATEC – Laboratório de Triatomíneos e Epidemiologia da Doença de Chagas

LIT – Meio de cultura (*Liver Infusion Tryptose)*

n – número amostral

n.s. – não significativo

OMS – Organização Mundial da Saúde

p – nível de significância

par/µl – parasitos/µl

pb – Pares de Bases

PBS – *Phosphate Buffered Saline*

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

pi – pós-infecção

qPCR – Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativo em Tempo Real

RPMI – meio de cultura (*Rosweel Park Memorial Institute*)

UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais

WHO – Organização Mundial de Saúde (*World Health Oganization*)

RESUMO

Os parasitos *Trypanosoma rangeli* e *Trypanosoma cruzi* entram no tubo digestivo do vetor através do repasto sanguíneo e o intestino médio anterior (IMA) é o local onde se dão as primeiras interações parasito-hospedeiro. Sendo assim, a colonização do IMA de *Rhodnius prolixus* por *T. cruzi* (cepa CL) e *T. rangeli* (cepa CHOACHI) foi avaliada no presente estudo. Inicialmente, o estabelecimento da infecção em ninfas infectadas com epimastigotas de cultura ou tripomastigotas sanguíneas foi comparativamente avaliado. A avaliação de diferentes parâmetros mostrou que a dinâmica de colonização foi diferente dependendo da forma do parasito utilizada para a infecção em ambas as espécies. Dessa forma, a avaliação da dinâmica de colonização dos parasitos no intestino de insetos infectados foi realizada com tripomastigotas sanguíneas, as formas naturalmente presentes no hospedeiro vertebrado. Além disso, a porção do trato intestinal onde ocorre a diferenciação das formas tripomastigotas para epimastigotas foi determinada para as duas espécies. Para infecções por *T. rangeli*, a diminuição gradativa no número de tripomastigotas no IMA e o concomitante aparecimento de formas intermediárias e epimastigotas a partir do primeiro dia pós-infecção (pi) indicaram que a sua diferenciação acontece nessa porção do intestino. No caso de infecções por *T. cruzi*, a presença de apenas formas tripomastigotas e intermediárias no IMA e a presença de formas intermediárias e epimastigotas no intestino médio posterior (IMP) dos insetos sugere que a sua diferenciação ocorre no IMP do vetor. A quantificação dos parasitos mostrou uma redução de mais de 80% nas populações de *T. cruzi* nas primeiras 24 horas pi. A primeira hipótese para avaliar esta redução seria a de que os parasitos estariam cruzando rapidamente o IMA e estabelecendo a infecção no IMP dos insetos. Entretanto, o reduzido número de parasitos encontrado no IMP não corroborou a hipótese. Na segunda hipótese, os parasitos poderiam estar aderidos ao epitélio do IMA e por essa razão não teriam sido quantificados nas contagens a fresco. A ausência de parasitos no IMA através da quantificação por qPCR, associada a análise do epitélio intestinal em miscroscópio, sugerem fortemente que o parasito não se adere ao epitélio intestinal do IMA. Finalmente, a possibilidade dos parasitos estarem sendo eliminados do IMA nestas primeiras horas pi foi avaliada. A significativa redução no número de parasitos incubados com diferentes tecidos de *R. prolixus*, particularmente com o IMA de insetos recém-alimentados, sugere que uma parte significativa da população de *T. cruzi* que entra no vetor juntamente com o repasto é eliminada por fatores presentes no IMA do inseto. Em conclusão, o presente estudo mostrou que embora *T. cruzi* e *T. rangeli* apresentem formas infectivas similares, os parasitos utilizam diferentes estratégias para iniciar a infecção nos seus hospedeiros invertebrados.

ABSTRACT

Trypanosoma rangeli and *Trypanosoma cruzi* enter the vector's intestinal tract together with the bloodmeal and the anterior midgut is the first compartment they interact with. Therefore, in the present study, the colonization of *Rhodnius prolixus* anterior midgut by *T. cruzi* (CL strain) and *T. rangeli* (CHOACHI strain) was evaluated. Initially, the parasite establishment was compared in the anterior midgut of nymphs infected with culture epimastigotes versus blood trypomastigotes. The evaluation of different parameters showed that the colonization dynamics was different according to the parasite development stage used in the infection, for both species. Thereby, the next objective was to evaluate the anterior midgut colonization in insects infected with blood trypomastigotes, which are the forms naturally present in the vertebrate host. Additionally, the midgut portion where trypomastigotes differentiate into epimastigotes was determined for both flagellates. In *T. rangeli* infections, the gradual decrease in trypomastigote numbers and the finding of intermediate and epimastigote forms 24 hours (pi) in the anterior midgut indicates that the differentiation of the parasite occurs in this portion of the midgut. During *T. cruzi* infections, only trypomastigote and intermediate forms were observed in the anterior midgut, and the finding of intermediate and epimastigote forms in the posterior midgut suggests that its differentiation occurs in the insect's posterior midgut. The parasite quantification showed that *T. cruzi* populations in the anterior midgut were reduced in about 80% during the first 24 hours pi. The first hypothesis to be tested evaluated wheter parasites rapidly crossed the anterior midgut and established infection in the posterior midgut. However, the low amount of parasites in the posterior midgut did not confirm this hypothesis. The other hypothesis suggests that parasites could be attached to the anterior midgut epithelium and, therefore, could not be quantified by the fresh counts. However, absence of parasites in the anterior midgut by qPCR and the analysis of the intestinal epithelium in the microscope showed that no parasites were attached to the anterior midgut at that period time point. Finally, the third hypothesis evaluated the possibility that parasites could have been killed in the anterior midgut during the first 24 hours pi. The reduction in number of parasites incubated with different tissues of *R. prolixus*, particularly with anterior midguts from blood fed insects indicates that a significant part of the *T. cruzi* population ingested with the blood meal is eliminated by factors present in the vector's anterior midgut. In conclusion, this study showed that although *T. cruzi* and *T. rangeli* present similar infective forms, the parasites present different strategies to initiate the infection on their invertebrate hosts.

1 INTRODUÇÃO

Atualmente, estima-se que 10 milhões de pessoas ao redor do mundo se encontrem infectadas pelo *Trypanosoma cruzi,* e que mais de 25 milhões se encontrem expostas ao risco de infecção na América Latina (Coura e Dias, 2009; WHO, 2013). Esse parasito é transmitido aos humanos por insetos vetores da subfamília Triatominae, principalmente pelas espécies pertencentes aos gêneros *Rhodnius, Triatoma* e *Panstrongylus* (Lent e Wygodzinsky, 1979). Atualmente a América Central é reconhecida pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como livre da transmissão da doença de Chagas pelo vetor doméstico, *Rhodnius prolixus*. Entretanto, essa espécie foi por muitos anos considerada o principal vetor da doença em diversos países da América Central e do Sul, e ainda é o principal vetor doméstico na Venezuela e Colômbia, tendo capacidade de abrigar e transmitir com eficiência o agente etiológico dessa enfermidade (Schofield, 1994; Hashimoto e Schofield, 2012). O *Trypanosoma rangeli,* outro protozoário do gênero *Trypanosoma*, infecta preferencialmente insetos pertencentes ao gênero *Rhodnius,* o que culmina na capacidade de *R. prolixus* manter infecções mistas de *T. cruzi* e *T. rangeli* que podem ser igualmente transmitidas aos hospedeiros mamíferos, inclusive o homem (Pifano *et al.,* 1949; Tobie, 1964; D' Alessandro, 1972; 1976; Cuba, 1975).

Tanto o *T. rangeli* quanto o *T. cruzi* entram no tubo digestivo do inseto vetor através do repasto sanguíneo e enfrentam as mesmas variações micro-ambientais, como enzimas digestivas, mudanças no pH, na osmolaridade, na temperatura. Indícios sugerem que na interação *T. cruzi*-inseto no interior do intestino exista uma série de fatores produzidos pelo vetor que podem afetar a sobrevivência do parasito (Pereira *et al.,* 1981; Mello *et al*., 1996; Kollien *et al.,* 2004; Terra e Ferreira, 2004; Azambuja *et al.,* 2005; Schaub, 2009). Além dos fatores presentes no lúmen e tecidos intestinais, os parasitos ainda estão sujeitos a períodos de escassez nutricional, que podem inclusive eliminar a infecção quando os períodos de jejum do inseto forem muito prolongados (Schaub *et al*., 1989). Poucos estudos têm sido publicados, entretanto, sobre o início do desenvolvimento desses parasitos no intestino de triatomíneos (Watkins,1969; 1971; Gregório e Ratcliffe, 1991; Eichler e Schaub, 2002).

A maioria dos trabalhos que avaliam o desenvolvimento desses protozoários no triatomíneo inicia o período de avaliação após dez ou mais dias da infecção (Tobie, 1961; Marinkelle, 1965; D'Alessandro e Mandel, 1969; Garcia e Gilliam, 1980; Añez, 1983; Schaub

e Böker, 1986; Mello *et al*., 1996; Alvarenga e Bronfen, 1997; Kollien *et al*., 1998; Kollien e Schaub, 1999; Carvalho-Moreira *et al*., 2003; Araújo *et al*., 2008; Gonzalez *et al*., 2011), período no qual os parasitos já não se encontram no intestino médio anterior, o primeiro ambiente a ser explorado pelos flagelados após o repasto sanguíneo.

O primeiro trabalho a explorar mais de um aspecto do ciclo de vida do *T. cruzi* no triatomíneo foi o de Dias (1934), seguido por Alvarenga (1979) que descreveu o ciclo de vida mais detalhadamente, avaliando as transformações que o parasito sofre ao passar pelo intestino do triatomíneo. Outros aspectos do ciclo de vida no vetor também foram investigados, como sua capacidade de infectar e se desenvolver em diferentes espécies de triatomíneos (Ryckman, 1965; Urdaneta-Morales, 1973; Miles *et al*., 1975; Zeledón, 1976; Perlawagora-Szumlewicz e Muller, 1979), e a comparação das peculiariedades de cepas e/ou clones do parasito que ocorrem no processo de metaciclogênsese na ampola retal do inseto (Urdaneta-Morales e Rueda, 1977; Garcia e Dvorak, 1982). Garcia e colaboradores (1984), observaram a diferenciação de diferentes cepas (W, Costa Rica 510 e Y) e clones (WA-250/1 e Esmereldo/2) do *T. cruzi I* no intestino médio anterior de *R. prolixus* durante cinco dias após a alimentação, porém utilizando métodos não esclarecidos no estudo. Añez (1983) por sua vez, descreveu a sequência morfológica do desenvolvimento do *T. rangeli* no canal alimentar de *R. prolixus*, e apesar das observações terem sido feitas no período de 6 horas até 45 dias após a infecção, o estudo apresentou um *n* amostral reduzido (dois insetos para cada período de observação) além de estar baseado nos registros biométricos das formas do parasito encontradas. Araújo e colaboradores (2008) ao estudarem o desenvolvimento do *T. cruzi* no trato digestivo de *T. brasiliensis*, determinaram as densidades do flagelado em três regiões do intestino em 3, 5 e 10 dias após a alimentação infectiva com parasitos mantidos em meio LIT, e o estudo das formas encontradas no intestino foi realizado entre 16-20 dias após a muda dos insetos para o quinto estádio. Henriques e colaboradores (2012) utilizaram o gene da luciferase integrado ao genoma do clone Dm28c do *T. cruzi* para analisar, com base na morfologia e na bioluminescência emitida pelos parasitos, as formas de desenvolvimento do mesmo em diferentes períodos da infecção em *R. prolixus*. Apesar do grande volume de trabalhos avaliando a interação de *T. cruzi* e *T. rangeli* com seus hospedeiros invertebrados, ainda não existem estudos que avaliem a colonização dos parasitos na fase inicial da infecção de forma quantitativa e que permita avaliar o processo de diferenciação dos mesmos no intestino médio anterior.

Sendo assim, o estudo da fase de colonização do trato intestinal do vetor por *T. cruzi* e *T. rangeli* se torna relevante, uma vez que a dinâmica populacional e as transformações pelas quais os parasitos passam durante o primeiro contato com o vetor determinarão o curso da infecção no triatomíneo, e consequentemente, o sucesso da sua transmissão para um novo hospedeiro vertebrado.

R. prolixus é uma espécie que pode ser mantida em laboratório por várias gerações (Nuñez e Segura, 1987 *Apud* Brener e Stoka, 1988), e desde que lhe seja ofertada a fonte alimentar que lhe permita uma eficiência reprodutiva elevada, pode chegar até três gerações por ano (McGuire *et al*.,1973; Valle *et al.*, 1987; Gomes *et al.*, 1990). Estudos comparativos determinaram que *R. prolixus* pode ser mantido em laboratório com pelo menos duas diferentes fontes alimentares, sangue humano e ovino, resultando na mesma eficiência reprodutiva (Gomes, Azambuja e Garcia, 1990). Adicionalmente, a espécie foi o modelo experimental utilizado para diversos estudos sobre da anatomia e fisiologia de insetos (Wigglesworth 1934, 1936, 1939, 1948, 1962, 1964, 1969; ver revisão Edwards, 1998). Tais fatores confirmam a escolha de *R. prolixus* para os estudos de interação parasito-vetor, bem como para pesquisas de diversos processos fisiológicos e comportamentais, o que faz com que a espécie seja adequada ao cumprimento dos objetivos que se propõe este trabalho.

Assim que o genoma do *T. cruzi* foi publicado (El-Sayed *et al*., 2005a), seu proteoma foi também descrito (Atwood *et al*., 2005). Na análise por espectrometria de massa foi observado que há diferenças nos quatro estádios do ciclo biológico de *T. cruzi* (epimastigotas, tripomastigotas metacíclicos, amastigotas e tripomastigotas). Embora cerca de 30% das proteínas identificadas tenham sido observadas em todos os estádios do ciclo de vida do parasito, pelo menos 248 proteínas são expressas em apenas um, o que demonstra mudanças significativas no perfil proteico do *T. cruzi* ao longo do seu ciclo biológico que provavelmente indicam alterações paralelas em determinados aspectos da sua fisiologia. Minning e colaboradores (2009) também salientaram que a expressão da maioria dos genes do parasito é alterada de acordo com o estádio de desenvolvimento.

Dado o contraste observado no perfil de proteínas expressas nas distintas formas do parasito, outro ponto de relevância para a execução de estudos de interação parasito-hospedeiro é a possibilidade de observar diferenças no decorrer da infecção de acordo com a forma evolutiva do parasito que é utilizada para infectar o vetor. Enquanto alguns trabalhos utilizam tripomastigotas sanguíneos (Eichler e Schaub, 2002; Carvalho-Moreira *et al.*, 2003; Whitten *et al.*, 2007; Oliveira *et al*., 2010; Buarque *et al.*, 2013), a maioria infecta os insetos

com epimastigotas originados em meio de cultura (Mello *et al*., 1996; Ratcliffe *et al*., 1996; Oliveira e Souza, 2001; 2003; Cortez *et al*., 2002; Gomes *et al.*, 2002; Azambuja *et al.*, 2004; Borges *et al*., 2006; Gonzalez *et al*., 2006; Araújo *et al.*, 2007; Nogueira *et al*., 2007; Whitten *et al.*, 2007; Gonzalez *et al*., 2011; Cortez *et al*., 2012; Uehara *et al.*, 2012). Cabe salientar que essa última situação não imita com fidelidade as condições naturais de transmissão do parasito. Sendo assim, o estudo do período de colonização do trato intestinal, utilizando-se formas sanguíneas dos parasitos se torna relevante para compreender os processos de estabelecimento do *T. cruzi* e do *T. rangeli* nos seus hospedeiros invertebrados.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a dinâmica inicial do processo de colonização por tripanossomas no intestino de *Rhodnius prolixus*.

2.2 Objetivos Específicos

a) Avaliar comparativamente a recuperação de parasitos no intestino médio anterior de ninfas de *R. prolixus* infectadas com epimastigotas de cultura ou tripomastigotas sanguíneas;

b) Determinar a porção do trato intestinal do inseto onde ocorre a diferenciação de *T. cruzi* e *T. rangeli* das suas formas tripomastigotas a epimastigotas;

c) Quantificar o desenvolvimento de *T. rangeli* no intestino médio anterior de ninfas de *R. prolixus* em diferentes períodos após a infecção;

d) Quantificar e avaliar o desenvolvimento de *T. cruzi* no intestino médio anterior e posterior de ninfas de *R. prolixus* em diferentes períodos após a infecção.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Sobre a interação *Trypanosoma*-triatomíneos

Centenas de espécies de tripanossomas já foram descritas infectando mamíferos de praticamente todas as ordens e em todos os continentes (Hoare, 1972; Stevens *et al*., 2001; Simpson *et al.*, 2006). Entretanto, apenas o *T. cruzi*, encontrado nas Américas, e o *Trypanosoma brucei*- subespécies *T. b. gambiense* e *T. b. rhodesiense* -, encontrado na África, são considerados patogênicos para o homem (Chagas, 1909; Bruce *et al*., 1912; WHO, 2013). O *T. rangeli* é capaz de infectar diversas espécies de mamíferos, inclusive o homem, entretanto sem causar doença a ele (Guhl e Vallejo, 2003). *T. cruzi* e *T. rangeli* são parasitos com ampla distribuição nas Américas Central e do Sul, com sobreposição não somente de áreas geográficas como também de hospedeiros vertebrados e invertebrados (Kagan *et. al.*, 1966; Guhl e Marinkelle, 1982; D'Alessandro, 1976). Apesar de não ser patogênico para o ser humano, o *T. rangeli* é capaz de induzir uma resposta imune humoral com elevados títulos de anticorpos, os quais determinam uma elevada reatividade cruzada com antígenos do *T. cruzi*, dificultando o diagnóstico sorológico da doença especialmente em sua fase crônica (Schotelius, 1987; Grisard *et al*., 1999). Essa reatividade cruzada tem sido relacionada com o compartilhamento de aproximadamente 60% dos antígenos de superfície entre *T. rangeli* e *T. cruzi* (Afchain *et al*., 1979). Além disso, a interpretação dos resultados de xenodiagnóstico é frequentemente duvidosa, pois algumas formas de desenvolvimento dos dois parasitos presentes no intestino do vetor são indiferenciáveis quando observadas a fresco ou em lâminas coradas (D'Alessandro, 1976; Schottelius, 1982; Schottelius e Muller, 1984).

As duas espécies de tripanossomas circulam no ambiente silvestre como enzootias e são transmitidas por triatomíneos associados a hospedeiros vertebrados (Hoare, 1972; Stevens *et al*., 2001; Simpson *et al*., 2006). Os triatomíneos pertencem à ordem Hemiptera, família Reduviidae, sendo a sua hematofagia uma característica presente em todas as espécies e estágios da subfamília Triatominae, (Lent e Wygodzinsky, 1979). A infecção pelo *T. cruzi* se transformou em uma antropozoonose nos últimos dois ou três séculos como consequência de

ações antrópicas em ambientes naturais nos quais os parasitos circulavam. Tais ações incluem a invasão dos ecótopos silvestres, o desmatamento das florestas e a remoção dos animais silvestres que atuavam como fonte de alimento dos triatomíneos (Coura, 2007; Coura e Dias, 2009). Os triatomíneos passaram a colonizar as habitações humanas e os anexos em seu peridomicílio, localizados próximo aos seus ecótopos naturais, utilizando o homem e seus animais como fonte de alimento, e estabelecendo, dessa forma, três ciclos: o ciclo silvestre, o peridoméstico e o doméstico (Barretto, l979; Forattini, 1980).

Em 1990 foi iniciada uma série de iniciativas buscando o controle e eliminação da doença de Chagas nos países endêmicos. Tais ações foram baseadas no controle vetorial, triagem dos doadores em bancos de sangue em todos os países endêmicos, e detecção e tratamento da transmissão congênita. Essas estratégias têm contribuído para a redução significativa do número de pessoas infectadas ao redor do mundo (Dias, 2006). Estima-se, entretanto, que atualmente se encontrem infectadas por essa antropozoonose 10 milhões de pessoas ao redor do mundo e que mais de 25 milhões se encontrem expostas ao risco de infecção na América Latina (Coura e Dias, 2009; WHO, 2013).

A epidemiologia da doença humana envolve, além da transmissão vetorial, a infecção com *T. cruzi* através de transfusão sanguínea (Young *et al.,* 2007), do transplante de órgãos de indivíduos infectados, da transmissão vertical (Gurtler *et al.,* 2003; Carlier *et al.,* 2011), de acidentes de laboratório (Dias, 1987) e da ingestão de comida ou bebida contaminadas, sendo esta última via de transmissão esporádica e circunstancial (Barbosa, 2006; Dias, 2006).

Desde que Carlos Chagas descobriu a tripanosomíase, em 1909, muitos estudos que envolvem o parasito, o vetor, os reservatórios silvestres e domésticos e a doença no ser humano têm sido desenvolvidos. Esses estudos permitiram compreender que o *T. cruzi*, flagelado heteroxênico, possui um ciclo de vida complexo, que envolve diferentes estádios de desenvolvimento, os quais compreendem as formas epimastigota e tripomastigota metacíclica, principais formas presentes no inseto vetor e as formas amastigota e tripomastigota sanguínea, principais formas presentes no hospedeiro vertebrado (Tanowitz *et al*., 1992).

3.2 *Trypanosoma cruzi* e suas interações com o hospedeiro invertebrado

O *T. cruzi* foi descoberto pelo médico e pesquisador Carlos Chagas em 1909, em Lassance, Minas Gerais. Chagas, em estudos subsequentes, estudou e descreveu diversos outros aspectos do parasito e da enfermidade que o mesmo causa no homem. Após a descoberta do *T. cruzi* e seu vetor, o autor encontrou o flagelado parasitando cães e gatos, os quais foram, então, considerados como reservatórios domésticos. O mesmo pesquisador detectou o ciclo silvestre envolvendo *Dasypus novemcinctus* e *Panstrongylus geniculatus* (Chagas, 1912) e, posteriormente, envolvendo macacos da espécie *Saimiri sciureus* na região amazônica brasileira (Chagas, 1924). Pouco depois da descoberta de Chritidias no intestino de *Panstrongylus megistus*, Chagas realizou uma série de experimentos em animais de laboratório (cobaias, cães e macacos) e no triatomíneo, completando os estudos sobre o ciclo de vida do parasito envolvendo seus hospedeiros vertebrados e invertebrados. O pesquisador também estudou as fases aguda e crônica da doença, bem como sua patogênese (Chagas, 1916a,b; Chagas e Villela, 1922).

O ciclo biológico do *T. cruzi* no hospedeiro invertebrado inicia-se quando o triatomíneo ingere formas tripomastigotas sanguíneas durante um repasto em mamífero infectado. O parasito então, se diferencia na forma epimastigota que se divide no intestino do inseto. Durante a colonização do intestino, as formas epimastigotas permanecem aderidas às membranas perimicrovilares no intestino médio posterior através da ancoragem dos flagelos (Nogueira *et al*., 2007). Após a fixação dos parasitos no epitélio da ampola retal, a qual ocorre através de interações hidrofóbicas e é também favorecida pelas características da cutícula do reto, as epimastigotas se transformam em tripomastigotas metacíclicos - formas não-replicativas, mas infectivas - as quais normalmente são transmitidas ao vertebrado através da contaminação das fezes ou ingestão dos triatomíneos infectados por mamíferos (Kollien e Schaub, 2000). É importante ressaltar que apesar de todos os estádios de desenvolvimento serem eliminados juntamente com as fezes e urina, apenas as formas tripomastigotas metacíclicas são infectivas ao hospedeiro mamífero (Schuster e Schaub, 2000 - figura 1).

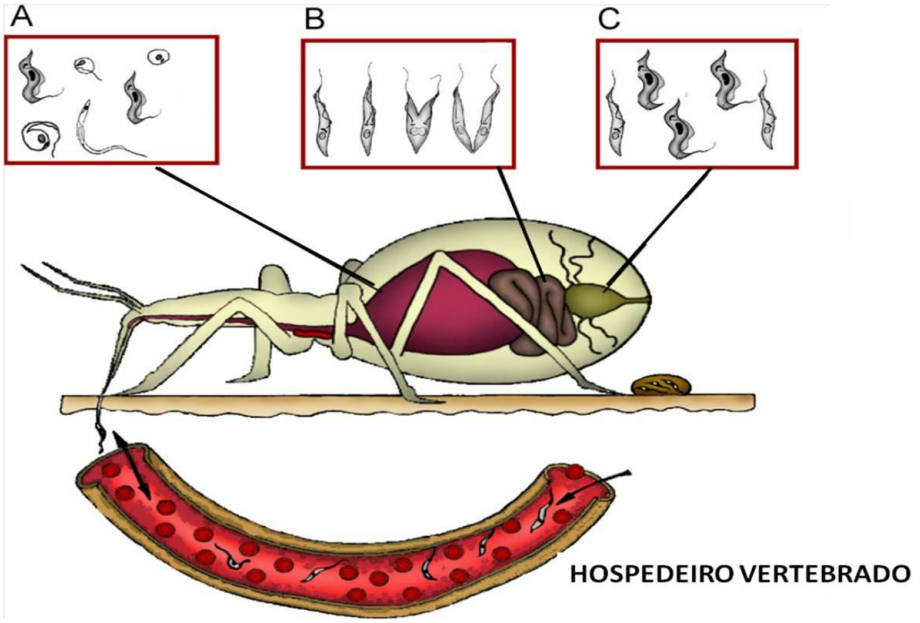

Figura 1 - Formas de desenvolvimento do *T. cruzi* no inseto vetor: (A) formas tripomastigotas sanguíneas, circulares/esferomastigotas no intestino médio anterior, (B) formas epimastigotas, as quais são as formas replicativas no invertebrado, no intestino médio posterior e as (C) formas tripomastigotas metacíclicas, as quais são as formas infectantes ao hospedeiro vertebrado, e formas epimastigotas na ampola retal (Garcia *et al*., 2007).

No hospedeiro mamífero, as formas tripomastigotas são capazes de invadir diversos tipos celulares, exceto neutrófilos e eosinófilos (Brener *et al.*, 2000). Uma vez invadindo a célula hospedeira, as tripomastigotas irão se diferenciar e se multiplicar sob a forma amastigota (Costa *et al*., 2006) e se dividir gerando as formas tripomastigotas sanguíneas, que entram na circulação e são infectantes para o triatomíneo (Brener, 1973; Zeledón, 1987; Garcia e Azambuja, 1991, Brener *et al.*, 2000).

Sabe-se que a taxa de infecção em diferentes vetores é variável (Schaub, 2009) tanto a partir de xenodiagnósticos realizados em pacientes sabidamente chagásicos, quanto em infecções experimentais, sendo que, inclusive há casos em que os parasitos são completamente eliminados no vetor (Garcia e Azambuja, 1991; Kollien *et al*., 1998; Schenone, 1999). Também é observado que as taxas de infecção no vetor podem ser muito diferentes entre uma área endêmica e outra, variando, por exemplo, de 79% em regiões da Bolívia (Medrano-Mercado *et al.*, 2008) para menos de 5% em um estudo realizado no Brasil, no qual foram examinados aproximadamente 500.000 triatomíneos pertencentes a diferentes espécies (Dias, 2002).

O desenvolvimento do *T. cruzi* no vetor parece estar relacionando a múltiplos fatores, dentre eles, a relação entre cepa e espécie de triatomíneo. Variações na taxa de infecção em diferentes espécies de triatomíneos são vistas desde 1940, quando Dias observou que a mesma

cepa de *T. cruzi* infectou 90,4% dos *P. megistus* e apenas 54,7% dos *R. prolixus,* quando estes insetos foram alimentados em animais infectados. Em estudos mais recentes foi observado que o clone Dm28c e a cepa CL de *T. cruzi* são capazes de completar seu ciclo em *R. prolixus,* enquanto a cepa Y rapidamente desaparece do intestino do inseto (Azambuja, Feder e Garcia, 2004; Vallejo, Guhl e Schaub, 2009). As variações da fisiologia de diferentes espécies de triatomíneos também podem favorecer a transmissão do flagelado na natureza, uma variação relevante é, a velocidade de defecação durante e após a alimentação (Borges-Pereira *et al*., 1988; Schaub e Losh, 1988; Soares *et al*., 2000; Cabral *et al.*, 2001). Por exemplo, foi observado que ninfas de quarto e quinto estádio de *T. pseudomaculata* defecam imediatamente após a alimentação e com mais frequência que *T. brasiliensis* (Soares *et al.*, 2000) e que *T. protracta* demora, em média, 30,6 minutos enquanto *T. rubida* demora, em média, 0,1 a 6 minutos para defecar após a alimentação (Klotz *et al.,* 2009).

Uma vez dentro do triatomíneo, o *T. cruzi* se depara com componentes do intestino do inseto, tais como enzimas digestivas, hemolisinas e aglutininas, presentes tanto no intestino médio anterior quanto no posterior (Schaub, 2009; Terra e Ferreira, 2004; Kollien *et al.*, 2004). Os fatores hemolíticos presentes no intestino médio anterior dos triatomíneos possuem o papel essencial de lisar os eritrócitos para a liberação da hemoglobina para sua digestão no intestino médio posterior, mas podem também afetar as populações de *T. cruzi*, dependendo da cepa avaliada (Azambuja *et al.,* 2005). Estudos anteriores já apontavam para a presença de lectinas com diferentes atividades no estômago, intestino e hemolinfa de *R. prolixus*, e que os receptores de lectina seriam detectáveis nas formas epimastigotas mas não nas tripomastigotas. Tais fatos sugerem que a presença de lectinas com diferentes atividades no intestino de *R. prolixus* e suas reações seletivas com *T. cruzi* poderiam representar um papel regulatório da interação (Pereira *et al.*, 1981).

Uma vez que o parasito alcance o intestino médio posterior do inseto, as suas interações com as membranas perimicrovilares serão fundamentais para o seu desenvolvimento e para seu processo de metaciclogênese (Azambuja *et al.*, 2005; Bonaldo *et al*., 1988). Dentre os fatores que seriam essenciais para a adesão do parasito ao intestino médio posterior do triatomíneo está o peptídeo lisossomal mais abundante em epimastigotas de *T. cruzi*, a cruzipaína, que ao ter sua função bloqueada por cinco inibidores diferentes diminui significantemente a adesão do parasito ao epitélio intestinal de *R. prolixus* (Uehara *et al.*, 2012). O gp63, outro peptídeo, parece estar envolvido na adesão do parasito pelo mecanismo proteolítico-independente, que envolve reconhecimento e ligação a um receptor

que ainda não foi identificado (D'Avila-Levy *et al.*, 2006; Santos *et al.*, 2006). Os resultados de Gonzales e colaboradores (2011) indicam que os glicosaminoglicanos sulfatados também são determinantes tanto para adesão das epimastigotas às células do epitélio do intestino médio posterior quanto para a infecção do vetor pelo parasito. Os glicoinositolfosfolipídios presentes na superfície celular desses flagelados também têm sido associados a esse processo de adesão, uma vez que uma diminuição na expressão dessas moléculas na superfície das formas tripomastigotas diminui sua capacidade de adesão (Golgher *et al*., 1993; Zingales *et al*., 1982; Pereira-Chioccola *et al*., 2000), fazendo com que estas formas permaneçam livres na ampola retal do inseto (Nogueira *et al*., 2007). Além dos glicoinositolfosfolipídios, proteínas hidrofóbicas presentes na superfície de formas epimastigotas, bem como resíduos de carboidratos de glicoproteínas (principalmente ácido siálico e D-manose) das membranas perimicrovilares também parecem ser importantes fatores na interação parasito/vetor (Alves *et al*., 2007). Em adição, foi demonstrado que o *T. cruzi* é capaz de incorporar os fosfolipídios presentes na membrana perimicrovilar do intestino de *R. prolixus* (Folly *et al*., 1999). Além disso, recentemente, cisteíno peptidases da família das calpaínas foram relacionadas ao processo de adesão ao epitélio intestinal de *R. prolixus* de formas epimastigotas de *T. cruzi*, bem como ao processo de metaciclogênese (Ennes-Vidal *et al*, 2011).

Os triatomíneos são insetos paurometábolos que passam por cinco estádios ninfais até atingir a fase imaginal (figura 2). Para completar o seu desenvolvimento são necessários repastos sanguíneos, assim como para permitir a sua sobrevivência e sua produção de gametas na fase adulta. Sabe-se, entretanto, que os triatomíneos são capazes de resistir em jejum durante longos períodos (Friend e Smith, 1985). O *T. cruzi* parece competir com seu vetor por nutrientes, uma vez que em situações de jejum, a resistência dos insetos é reduzida (Schaub, 1989). O sangue ingerido pelos triatomíneos é constantemente digerido pela ação de proteases, que liberam aminoácidos, peptídeos e hemoglobina, sendo que esta última é finalmente degradada liberando seu grupo heme. Sabe-se que o *T. cruzi* utiliza o grupo heme como cofator nutricional e na produção de hemeproteínas essenciais para o seu metabolismo. Entretanto, o mesmo não possui uma via de biossíntese completa da molécula (Salzman *et al*., 1982; Lombardo *et al*., 2003), o que explica a dependência de heme extracelular presente no lúmen do intestino de seus hospedeiros invertebrados, quando alimentados. O estado nutricional do inseto pode então influenciar no desenvolvimento do *T. cruzi*, uma vez que diante de longos períodos de escassez nutricional, a infecção pode ser completamente eliminada, como já observado para *Triatoma infestans* infectados pelo parasito (Kollien e

Schaub, 1998). Luz e Borba (1968) observaram que apesar do jejum prolongado, *T. infestans* continua eliminando flagelados infectivos mesmo 812 dias após a infecção. Por outro lado, Phillips e Bertram (1967) observaram que apenas 45% das ninfas de *R. prolixus* mantiveram sua infecção após a muda para o estádio adulto ou após serem submetidas a um período de sete semanas de jejum. Sendo assim, a eliminação do *T. cruzi* do trato intestinal do inseto vai depender da espécie e do estádio de desenvolvimento do triatomíneo, da cepa do parasito, da sua dose inicial e da duração da infecção (Schaub e Böker, 1986).

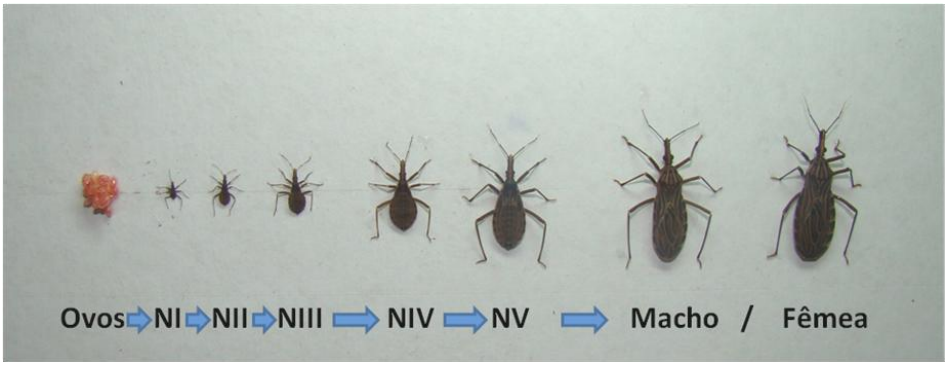

Figura 2 - Estádios de desenvolvimento de *Rhodnius prolixus*: ovos, cincos estádios ninfais e adultos (Foto: Newmar Marliére).

Uma vez que a metaciclogênese é um processo crucial no ciclo de vida do *T. cruzi*, esta tem sido amplamente estudada. Atualmente sabe-se de uma variedade de fatores que medeiam e podem estimular a metaciclogênese. Dentre estes, podemos citar o pH e a osmolaridade, a presença de soro de mamífero (Fraidenraich *et al.*, 1993), de componentes da hemolinfa (Mello *et al.*, 1996), de extratos intestinais (Isola *et al.*, 1986), de estresse metabólico e de AMPc (Rangel-Aldao *et al*., 1987). Uma baixa proporção de tripomastigotas metacíclicos parece estar correlacionada com cepas que apresentam um desenvolvimento mais lento (Schaub, 1989; Lana *et al.*,1998). Após a infecção de diferentes espécies de triatomíneos com a cepa Y de *T. cruzi*, observou-se que a proporção de formas tripomastigotas metacíclicos variou de 50% em *Rhodnius neglectus*, 37% em *R. prolixus*, 3% em *Triatoma brasiliensis* e 0% em *Triatoma pseudomaculata* no trato intestinal das diferentes espécies (Perlowagora-Szumlewicz e Moreira, 1994), o que sugere que o processo de metaciclogênese também depende da espécie de vetor. Outro fator que parece afetar o processo de diferenciação das formas infectantes do parasito é a temperatura, uma vez que

esta transformação é atrasada quando o sistema é submetido a temperaturas mais baixas (Asin e Catala, 1995).

Além dos fatores hemolíticos presentes no trato intestinal de triatomíneos, sabe-se que os simbiontes dos insetos possuem um papel significativo na promoção da sua sobrevivência e desenvolvimento. Wigglesworth (1936) já apontava a importância de duas regiões do intestino médio anterior para o desenvolvimento de simbiontes, e mais adiante, em outros estudos, a multiplicação dos simbiontes no trato intestinal após o repasto sanguíneo foi observada e quantificada (Hill *et al*., 1976; Ben-Yakir, 1987). Cabe evidenciar os resultados de Eicher e Schaub (2002), os quais observaram a preferência dos simbiontes *Rhodococcus rhodnii* e *Nocardia* sp. pelas porções anteriores do trato intestinal de ninfas de quinto estádio de *R. prolixus* e *T. infestans*, respectivamente, e a diminuição significativa dos mesmos no tubo digestivo de ambas as espécies entre as primeiras 12 horas após a alimentação, principalmente nessas regiões anteriores do intestino. Nas demais porções, como na ampola retal, a alimentação não afetou as populações das bactérias, e houve um aumento de quase 18 vezes no tamanho das populações dos simbiontes 10 dias após o repasto sanguíneo (Eicher e Schaub, 2002).

A importância dos simbiontes para a sobrevivência do próprio triatomíneo foi retratada por estudos que analisaram as consequências da eliminação de simbiontes sobre a fisiologia dos insetos. Foi observado que a ausência dos microorganismos leva a vários efeitos deletérios, que incluem o atraso do desenvolvimento (Brecher e Wigglesworth, 1944; Lake e Friend, 1967) e o aumento das taxas de mortalidade (Harrington, 1960), problemas durante a digestão e a excreção (Brecher e Wigglesworth, 1944; Eichler e Schaub, 1998) e redução do sistema traqueal (Eichler e Schaub, 1998).

Uma vez que o *T. cruzi* compartilha o microambiente do tubo digestivo do triatomíneo com simbiontes, vários estudos tentaram avaliar se o desenvolvimento de um poderia afetar ao outro. Muhlpfordt (1959), estudando a influência de *Nocardia rhodnii* no desenvolvimento e diferenciação do flagelado em *R. prolixus,* mostrou que o parasito se multiplica mais intensamente na ausência dos simbiontes. Azambuja e colaboradores (2004) relataram que *Serratia marcescens* produz prodigiosina, pigmento que seria responsável pela atividade tripanolítica observada no estômago de *R. prolixus* após a alimentação infectiva com a cepa Y de *T. cruzi*. Por outro lado, foi observado que o parasito não afeta as taxas de crescimento das bactérias ao analisar o desenvolvimento dos simbiontes *Nocardia sp*. e *Rhodococcus rhodnii* no intestino de *T. infestans* e *R. prolixus*, respectivamente, após infecção com formas

tripomastigotas sanguíneas do *T. cruzi* (Eichler e Schaub, 2002). Os autores sugeriram que o crescimento dos simbiontes não é alterado pela colonização do parasito devido ao fato de que a região do intestino em que o flagelado se desenvolve mais eficientemente, a ampola retal, não ser o sítio de colonização dos simbiontes.

Mais recentemente, Castro e colaboradores (2012) demonstraram que, em comparação ao controle não infectado, *R. prolixus* infectados com epimastigotas do clone Dm28c de *T. cruzi* apresentaram quantidade reduzida de bactérias na microbiota intestinal, quantidade aumentada de parasitos, produção reduzida de nitrito e nitrato e atividades fenoloxidase e antibacteriana aumentadas, concluindo que a infecção pelo parasito modifica a resposta imune do intestino do vetor a fim de diminuir a população da microbiota, e que tais mudanças são essenciais para o desenvolvimento do parasito no intestino do inseto vetor. Além disso, foi demonstrado previamente que a microbiota pode modular a competência vetorial do hospedeiro invertebrado, através da interação direta com os parasitos ou da competição por recursos no intestino (Azambuja, *et al.*, 1983; Mello *et al.*, 1996; Garcia *et al*., 2007, Garcia *et al*., 2010, Garcia *et al.*, 2010).

3.3 Trypanosoma rangeli e suas interações com o hospedeiro invertebrado

O *T. rangeli* foi nomeado e descrito por Tejera (1920) a partir de formas encontradas no intestino de *R. prolixus*, na Venezuela. Devido às suas semelhanças morfológicas com o *T. cruzi* e a escassez de estudos a respeito, por muitos anos acreditou-se que seu ciclo de vida no vetor estava, como no caso do *T. cruzi*, restrito ao tubo digestivo, até que Groot (1952) publicasse a observação do flagelado na hemolinfa de *R. prolixus*. A partir de sua descrição, diversos estudos indicaram a presença desta espécie na Colômbia (Rey e Ucros, 1939), Guatemala (de Leon, 1946), El Salvador (Zeledón, 1956), Costa Rica (Montero, 1958), Panamá (Sousa, 1966), Uruguai (Zeledón, 1954), Paraguai (Canese, 1964), Peru (Ayala, 1964), Brasil (Lucena e Marques, 1954), Chile e Argentina (Pessoa, 1963). Desde então o parasito tem sido observado praticamente em todos os países da América Central e do Sul (Grisard *et al*., 1999b; Guhl e Vallejo, 2003; Maia da Silva *et al.*, 2004a, 2007).

As formas de desenvolvimento que participam de parte do ciclo de vida do parasito foram descritas e estudadas por muitos autores após a descrição incial de Tejera (Grewal, 1956; Groot, 1953a; Groot *et al*., 1953; Herbig-Sandreuter, 1955; Pifano, 1954; Tobie, 1961; Zeledón, 1954). Apesar de existirem discordâncias em relação a alguns aspectos do ciclo, tais estudos eram consoantes em afirmar que após um repasto sanguíneo em um vertebrado infectado o desenvolvimento do parasito se iniciava no canal alimentar do triatomíneo, de onde os flagelados posteriormente atravessavam o epitélio intestinal, entravam na hemolinfa e finalmente invadiam as glândulas salivares alguns dias depois.

A transmissão do *T. rangeli* ocorre no momento em que o triatomíneo com as glândulas salivares infectadas se alimenta em um hospedeiro vertebrado (Groot, 1953b; Tobie, 14961). Apesar de hoje ser bem estabelecida na literatura, a transmissão do parasito através da picada do inseto não foi sugerida antes de Rey-Matiz (1941) relatar a visualização de formas intermediárias de *T. rangeli* nas glândulas salivares de *R. prolixus*, enquanto trabalhava na Colômbia, e de Pifano e Mayer (1949) relatarem a observação de *T. rangeli* nas glândulas salivares de *R. prolixus* naturalmente infectados na Venezuela.

Esses estudos permitiram o entendimento atual sobre o ciclo de vida do *T. rangeli* no hospedeiro invertebrado, o qual se inicia com a ingestão de formas tripomastigotas presentes na corrente sanguínea do vertebrado infectado juntamente com o repasto sanguíneo. Uma vez no intestino, os parasitos se diferenciam em formas epimastigotas longas e curtas, as quais se dividem e atravessam o epitélio intestinal alcançando assim a cavidade celômica. Na hemocele, os parasitos se multiplicam continuamente e migram para as glândulas salivares, local onde se diferenciam em tripomastigotas metacíclicos, que são transmitidos ao hospedeiro vertebrado junto com a saliva no momento da picada (D'Alessandro, 1976; D'Alessandro-Bacigalupo e Saravia, 1992 - figura 3).

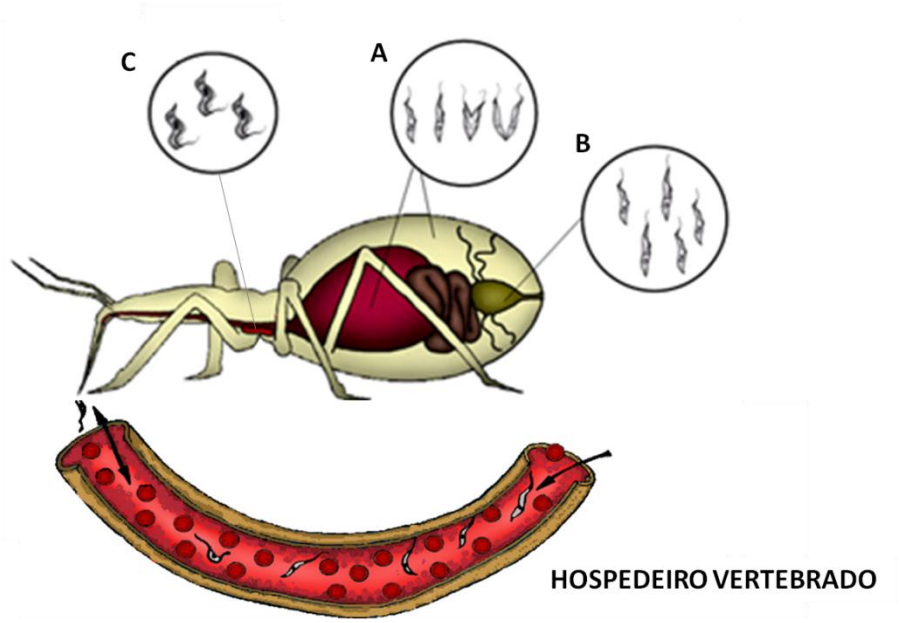

Figura 3 - Formas de desenvolvimento do *T. rangeli* no inseto vetor: (A e B) formas epimastigotas encontradas no trato intestinal e na hemocele, (C) formas tripomastigotas metacíclicas, infectivas para os hospedeiros vertebrados, encontradas nas glândulas salivares (adaptado de Garcia *et al.*, 2007; Fellet, 2014).

A persistência do *T. rangeli* no trato intestinal do triatomíneo, que é restringida ao lúmen, pode se prolongar até o fim da vida do vetor (Pifano *et al*., 1948; D'Alessandro, 1976; Cuba, 1975; Hecker *et al*., 1990) e é dependente de fatores nutricionais diretamente relacionados com a digestão do sangue (Vallejo *et al*., 1988). Apesar de alguns trabalhos indicarem a existência desses parasitos nas fezes de 31 a 70% dos insetos infectados (Pifano *et al*., 1948; D'Alessandro, 1976; Cuba, 1975; Hecker *et al*., 1990), Rey-Matiz (1941) e outros pesquisadores se referem a múltiplas tentativas de inocular *T. rangeli* em diferentes animais junto com fezes de *R. prolixus*, sempre com resultados negativos (Zeledón, 1954; Groot *et al*., 1951).

Sabe-se que a porcentagem de *T. rangeli* capazes de ultrapassar o epitélio intestinal de *R. prolixus*, permitindo assim seu desenvolvimento na hemocele, é baixa (D'Alessandro, 1963; Tobie, 1965; Ferreira *et al.*, 2010). O desenvolvimento completo do ciclo biológico do *T. rangeli* ocorre preferencialmente em triatomíneos do gênero *Rhodnius*, conhecimento decorrente de estudos realizados envolvendo tentativas de infectar experimentalmente outras espécies de triatomíneos com parasitos de cultura ou de hemolinfa de triatomíneo infectado (Pifano *et al.*, 1949; Tobie, 1964; D' Alessandro, 1972; 1976; Cuba, 1975). D'Alessandro (1972) observou infecção nas glândulas salivares de 18% de *R. prolixus* e de 38% de *R. neglectus* infectados experimentalmente com o parasito, mostrando que *R. neglectus* é uma

espécie capaz de albergar o parasito de forma tão eficiente quanto o vetor clássico, *R. prolixus*.

Diversas tentativas experimentais resultaram na infecção da hemolinfa de *Triatoma vitticeps*, *T. infestans* e *R. prolixus*, mas não de *P. megistus* (Coutinho e Nussenzweig *Apud* Zeledón, 1954). Sabe-se que o intestino de *T. infestans* - em comparação ao de *R. prolixus* - possui níveis mais altos de aglutininas contra *T. rangeli*, e embora não tenham sido encontradas evidências de atividade lítica contra o parasito, as aglutininas poderiam, juntamente com outras moléculas, conferir uma maior resistência ao desenvolvimento do *T. rangeli* no intestino do *T. infestans* (Gregório e Ratcliffe, 1991). Além disso, a saliva de *T. infestans* apresenta atividade lítica contra *T. rangeli* e, uma vez que parte da saliva injetada é ingerida pelo inseto durante o repasto sanguíneo, esta atividade poderia também estar relacionada com o baixo grau de desenvolvimento do parasito no intestino de *T. infestans* (Gregório e Ratcliffe, 1991).

Uma importante descoberta na interação do *T. rangeli* com o hospedeiro invertebrado foi a influência que a infecção pelo parasito tem sobre as populações de simbiontes do intestino de *R. prolixus* (Eichler e Schaub, 2002). Inicialmente foi demonstrado que formas de cultura de *T. rangeli* são capazes de inibir o crescimento dos simbiontes em placas de ágar (Watkins, 1971). Em experimentos *in vivo*, Watkins (1969) demonstrou que a infecção de *R. prolixus* pelo *T. rangeli* reduziu a densidade dos simbiontes no intestino dos insetos infectados. Em estudo posterior, Eichler e Schaub (2002) relataram que a infecção de *R. prolixus* pelo *T. rangeli* retardou o desenvolvimento de *R. rhodnii* presentes no conteúdo intestinal dos insetos, sendo essa redução significativa apenas na porção anterior do intestino.

Normalmente estes parasitos são encontrados livres no lúmen do intestino do triatomíneo (Hecker *et al*., 1990). Todavia, para alcançarem a hemocele do inseto, as epimastigotas de *T. rangeli* interagem com o epitélio intestinal, provavelmente utilizando lectinas/ligantes presentes na superfície do parasito e nas células epiteliais do inseto. Aparentemente, o protozoário pode se aderir tanto através do flagelo ou da região posterior a determinadas células epiteliais da região anterior do intestino médio posterior de *R. prolixus.* Assim, é possível que exista um reconhecimento dessas células pelos parasitos para sua subsequente adesão e invasão (Oliveira e Souza, 2001). As membranas perimicrovilares têm sido relacionadas como uma importante barreira física para o *T. rangeli* alcançar a hemocele (Gomes *et al.*, 2002). Os autores mostraram que a irradiação gama de *R. prolixus* infectados pelo parasito promoveu mudanças na organização ultraestrutural do intestino do inseto,

provocando o agrupamento de microvilos e a desorganização das membranas perimicrovilares, o que acelerou a invasão da hemolinfa pelo *T. rangeli* (Gomes *et al.*, 2002).

Acreditava-se que o *T. rangeli* possuía mecanismos para escapar das respostas humorais e celulares do inseto, sendo capaz, assim, de se dividir dentro das células fagocíticas (Tobie, 1968; 1970; Takle, 1988). Estudos mais recentes demonstraram, entretanto, que o *T. rangeli* é reconhecido e ativa o sistema de defesa do vetor, uma vez que o perfil celular da hemolinfa de *R. prolixus* se modifica após o primeiro dia de infecção por *T. rangeli* (Oliveira e Souza, 2003). Trabalhos dedicados a estudar a interação de *R. prolixus* e *T. rangeli* mostraram que a variedade de mecanismos humorais e celulares que o vetor apresenta age limitando o desenvolvimento do parasito. Dentre estes mecanismos, são apontados como mais significantes as lisozimas e os fatores tripanolíticos (Mello *et al*., 1995, 1999; Gomes *et al*., 1999), a ativação do sistema profenoloxidase (Mello *et al.*, 1995; Gomes *et al*., 1999; Garcia *et al*., 2004), a fagocitose e a microaglutinação de hemócitos (Takle, 1988; Mello *et a*l., 1995; Garcia *et al*., 2004) e a produção de óxido nítrico e superóxido, os quais estariam envolvidos na regulação da infecção (Whitten *et al*., 2001, 2007).

Mello e colaboradores (1995) inoculando *T. rangeli* (cepa San Agustin) na hemocele de *R. prolixus* demonstraram que numerosas formas epimastigotas curtas são observadas na hemolinfa do triatomíneo até o segundo dia da infecção e que depois desse período as formas epimastigotas longas são dominantes. Sabe-se que a fenoloxidase (PO) é uma enzima chave no processo de oxidação de fenóis a quinonas tóxicas, o qual é responsável pela melanização durante o encapsulamento de patógenos nos insetos (Andersen, 1985). Em *R. prolixus* a ativação da via profenoloxidase (proPO) tem sido observada em insetos inoculados com tripanosomatídeos (Azambuja *et al.*, 1989; Mello *et al.*, 1995, 1996; Gomes *et al.*, 1999). Gomes e colaboradores (2003) observaram em seu trabalho que a injeção de epimastigotas curtas, mas não longas, de *T. rangeli* (cepa H14) em *R. prolixus* alimentados com sangue não-infectado causou altos níveis de atividade PO até 24 horas após a inoculação. Outros trabalhos também vêm demonstrando que a resposta imune do inseto é direcionada, particularmente, às formas curtas do parasito, enquanto que as formas longas teriam a capacidade de escapar da resposta imune do inseto e seriam responsáveis pela manutenção da infecção (Mello *et al.*, 1995, 1999; Gomes *et al*., 1999, 2003).

Uma vez que o parasito consegue colonizar e se manter na hemolinfa, a invasão das glândulas salivares é a etapa final para a produção de formas infectivas. Como já salientado anteriormente, Rey-Matiz (1941) foi o primeiro a observar formas de desenvolvimento de *T.*

rangeli nas glândulas salivares de *R. prolixus*, e, mais adiante, o acompanhamento do ciclo biológico do parasito no vetor até sua invasão nas glândulas salivares foi elucidado por Groot (1953) e Groot e Sanmartin (1953). Groot (1954) em um estudo comparativo de quatro cepas de *T. rangeli* em *R. prolixus* observou que em uma cepa (*ariarii*) a invasão das glândulas salivares do triatomíneo ocorria apenas em insetos que apresentavam o flagelado na hemolinfa, o que já sugeria que a passagem pela hemocele do invertebrado é essencial para o que o parasito complete seu ciclo no vetor. Sabe-se, entretanto, que as taxas de infecção das glândulas salivares são bastante variáveis quando os insetos são infectados oralmente, ficando entre 2-50% (D'Alessandro, 1963; Tobie, 1965; Ferreira *et al.*, 2010).

A presença do parasito nas glândulas salivares do triatomíneo pode causar uma série de alterações fisiológicas e comportamentais no inseto, como alterações nas atividades anti-hemostáticas salivares, redução das atividades anticoagulantes, redução da eficiência do repasto sanguíneo, alterações no pH da saliva, modificações na coloração das glândulas salivares e redução dos níveis de proteínas salivares, que pode levar a mudanças no comportamento alimentar, tais como o aumento do tempo de sondagem e do número de picadas no hospedeiro vertebrado (Anez e East, 1984; Garcia *et al.*,1994; Paim *et al.*, 2013).

4 MÉTODOS

4.1 Triatomíneos

Os exemplares de *R. prolixus* utilizados no presente trabalho foram provenientes do insetário do Laboratório de Triatomíneos e Epidemiologia da doença de Chagas, de colônia iniciada a partir de insetos coletados em Honduras. Os insetos foram alimentados semanalmente em galinhas, camundongos suíços anestesiados ou alimentador artificial contendo sangue citratado (10%) de coelho proveniente do Centro de Criação de Animais de Laboratório da Fundação Oswaldo Cruz (Cecal FIOCRUZ – RJ). A sala do insetário é mantida em temperatura de 26+1°C, umidade relativa de 65+10% e ciclo natural de iluminação. Os protocolos que utilizaram animais seguiram as normas da FIOCRUZ para a experimentação animal e foram aprovadas pelo Comitê de Ética na Utilização de Animais (CEUA-FIOCRUZ-MG) sob o número LW-61/2012.

Ninfas de quinto estádio, com 30 dias pós-muda, foram utilizadas nos ensaios biológicos.

4.2 Parasitos

As formas epimastigotas de *T. rangeli*, cepa CHOACHI, isolada de glândulas salivares de *R. prolixus* na Colômbia, e de *T. cruzi*, cepa CL, isolada de *T. infestans* no Rio Grande do Sul, foram obtidas a partir de seu crescimento em meio LIT (*Liver Infusion Tryptose*) acrescido de 15% de soro fetal bovino e antibiótico na concentração de 100 unidades de penicilina e 100µg de estreptomicina por mililitro, mantidos em BOD à temperatura de 27°C e sob repiques semanais.

A obtenção das formas tripomastigotas sanguíneas de *T. rangeli* se deu por meio da infecção de camundongos suíços com tripomastigotas diferenciados em meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*). A quantidade de parasitos utilizada foi de $12x10^7$ parasitos, dos quais 82% se diferenciaram em tripomastigota após 7-10 dias mantido no meio de cultura. Uma vez que a morte parasitária é bastante elevada durante esse processo de diferenciação *in vitro*, os camundongos foram inoculados com todo o restante dos parasitos ressuspendidos em PBS. As formas tripomastigotas sanguíneas do *T. cruzi* foram obtidas de camundongos B6.129S7 *knockout* para INF-γ, obtidos do Biotério Central do CPqRR. Os animais foram inicialmente inoculados com parasitos de culturas antigas de *T. cruzi* (de aproximadamente 30 dias, contendo formas epimastigotas, mas também tripomastigotas que se diferenciaram nessa forma devido ao estresse nutricional a que foram submetidas). A manutenção do parasito foi realizada através do inóculo de formas tripomastigotas sanguíneas obtidas a partir de punções cardíacas em camundongos anestesiados e previamente infectados, em camundongos saudáveis.

A alimentação artificial foi realizada em alimentadores de vidro conectados a um banho-maria com circulação interna e externa de água, o qual possui um sensor de temperatura que é regulado para ser mantido a 37 ± 1ºC durante a alimentação dos triatomíneos a fim de mimetizar as condições de temperatura de um hospedeiro vertebrado (figura 4).

Figura 4 - Alimentador artificial: alimentadores de vidro conectados ao banho-maria com circulação interna e externa de água, com sensor de temperatura (Foto: Mª Raquel Fellet).

4.3 Ensaios biológicos

4.3.1 Avaliação do processo de colonização de *T. rangeli* e *T. cruzi* no intestino médio anterior de *R. prolixus*

Ninfas de quinto estádio de *R. prolixus* foram individualizadas em frascos plásticos (3,5 x 2cm), contendo papel de filtro como substrato e cobertos com tecido. As ninfas foram individualmente pesadas antes e imediatamente após a alimentação, a fim de se estimar a quantidade de sangue ingerida no repasto. A alimentação se deu:

[a] no alimentador artificial contendo sangue de coelho citratado e previamente incubado a 56ºC por 30 minutos para a inativação do sistema complemento, para os experimentos com as formas epimastigotas de cultura dos parasitos, na concentração de $1x10^3$parasitos/µl;

[b] no camundongo (suíço infectado por *T. rangeli* e B6.129S7 *knockout* para INF-γ infectado por *T. cruzi)*, previamente anestesiado intraperitonealmente com uma mistura de ketamina a 150 mg/kg (Cristalia- Brasil) e xilazina a 10 mg/kg (Bayer- Brasil), para os experimentos com as formas tripomastigotas sanguíneas, nos quais a concentração de parasitos foi avaliada através de contagem a fresco segundo Brener (1962) imediatamente antes do início dos ensaios.

As ninfas foram alimentadas por pelo tempo necessário para a ingestão de aproximadamente 20-30µl de sangue e tiveram o intestino médio anterior (IMA) e intestino médio posterior (IMP) dissecados nos tempos:

[a] 1-7, 10 e 15 dias após a alimentação infectiva, para os ensaios realizados com *T. rangeli*;

[b] 3, 24, 48, 96 horas e 7 e 15 dias após a alimentação infectiva, para os ensaios realizados com *T. cruzi*.

O IMA dos insetos foi dissecado, separado do IMP (figura 5) e macerado em 20µl de *phosphate buffered saline* (PBS; 0.15 M NaCl em 0.01 M de sódio fosfato, pH 7,2). Deste conteúdo, 5µl foram utilizados para a confecção de esfregaços corados com Giemsa (usados para a avaliação da diferenciação das formas tripomastigotas em epimastigotas), 5µl foram

destinados à contagem dos parasitos pelo método de Brener (1962) ou em câmara de Neubauer (a fim de se estimar a quantidade dos parasitos recuperados). Para os experimentos com *T. cruzi*, o restante da amostra foi transferido para microtubos de 1,5 mL contendo 20µL de PBS estéril e mantidos a -20ºC para posterior extração de DNA e Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa em Tempo Real (qPCR), a fim de se quantificar os parasitos recuperados e comparar com os resultados obtidos pela contagem a fresco.

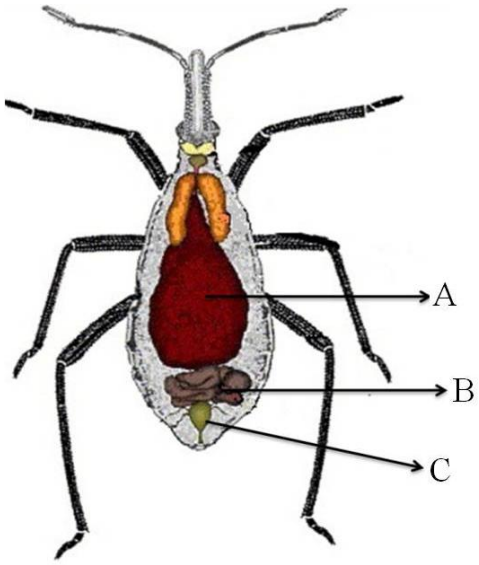

Figura 5 - Esquema do tubo digestivo de um triatomíneo: (A) intestino médio anterior, (B) intestino médio posterior e (C) ampola retal (adaptado de Garcia *et al*., 2007; Rodrigues, 2013).

A recuperação dos parasitos no IMA das ninfas foi calculada considerando-se o volume de sangue ingerido por cada inseto durante o repasto, a concentração dos flagelados presentes no sangue que serviu de fonte de infecção dos triatomíneos e a quantificação dos parasitos realizada em câmara de Neubauer ou pelo método de Brener (1962).

Uma vez que a concentração de parasitos no sangue dos camundongos que serviram como fonte para a infecção por *T. cruzi* foi bastante variável, o teste de correlação de Spearman foi feito para avaliar se a parasitemia dos camundongos influenciaria na porcentagem de parasitos ingeridos. A partir do resultado da correlação foi realizada uma análise através do teste de variância (ANOVA) e posterior teste de comparações múltiplas de Tukey, para classificar as parasitemias dos camundongos como baixas e altas, sendo as diferenças observadas consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$.

4.3.2 Quantificação do *T. rangeli* e *T. cruzi* no intestino médio anterior de *R. prolixus* através de câmara de Neubauer ou do método a fresco de Brener (1962)

As amostras foram quantificadas por contagem em câmara de Neubauer ou pelo método a fresco de Brener (1962) dependendo da quantidade de parasitos existente. Nas contagens em câmara de Neubauer, uma alíquota de 5µl de cada amostra foi diluída em PBS (1:10), enquanto que nas contagens pelo método a fresco de Brener (1962) as amostras tiveram 5 µl destinados à contagem.

4.3.3 Avaliação do processo de diferenciação de formas tripomastigotas de *T. rangeli* e *T. cruzi* para formas epimastigotas no intestino médio anterior de *R. prolixus*

As amostras de IMA e IMP obtidas nos ensaios biológicos tiveram 5µl destinados para a confecção de esfregaços delgados corados pelo método de Giemsa. Foram contados 50 campos microscópicos ou 100 células de 5 – 10 intestinos para cada tempo avaliado, em microscópio óptico no aumento de 1.000x (CX31 - Olympus). A distinção entre os estádios evolutivos tripomastigota e epimastigota dos parasitos foi realizada segundo a classificação de Hoare e colaboradores (1966) para Trypanosomatidae, considerando-se a posição do cinetoplasto e do flagelo no corpo celular do parasito (figura 6). As formas nas quais não era possível determinar a posição anterior ou posterior do cinetoplasto foram denominadas formas intermediárias.

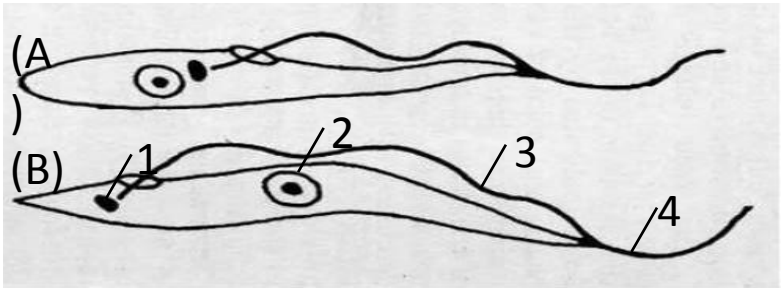

Figura 6 - Desenho esquemático das formas (A) epimastigota e (B) tripomastigota de Trypanosomatidae, com (1) cinetoplasto, (2) núcleo, (3) membrana ondulante e (4) flagelo (adaptado de Hoare *et al*., 1966).

4.3.4 Extração de DNA e Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa em Tempo Real (qPCR)

A extração de DNA foi realizada utilizando-se o Kit *Wizard Genomic DNA Purification (Promega)*, segundo instruções do fabricante para extração de DNA de amostras de sangue. Para os controles positivo e negativo foram extraídos, respectivamente, DNA de parasitos mantidos em meio de cultura e DNA de amostras de intestinos de insetos não infectados, utilizando o mesmo kit, segundo o protocolo do fabricante para amostras de culturas de células. A qualidade e concentração do DNA extraído foram mensuradas em espectrofotômetro *Nanodrop 2000c Spectrophotometer* (*Termo Fisher Scientific Inc*.), sendo o grau de pureza das amostras averiguado através das absorbâncias a 260 nm e 280 nm.

Os produtos obtidos nas extrações de DNA foram amplificados por qPCR utilizando iniciadores específicos para o gene da TCZ de *T. cruzi* (Cummings e Tarleton, 2003; Caldas *et al*., 2012) em equipamento *ABI Prism 7500 Sequence Detection System* (*Applied Biosystems*). A sequência dos iniciadores está mostrada no quadro 1.

Quadro 1. Iniciadores utilizados para a amplificação de produtos de DNA extraídos do IMA e IMP de ninfas de *R. prolixus.*

Iniciador	Sequência
TCZ__F	5’ GCTCTTGCCCACAMGGGTGC 3’
TCZ__R	5’ CCAAGCAGCGGATAGTTCAGG 3’

A qPCR foi realizada em um volume final de 25µl contendo 300nM de cada iniciador, 2µl do DNA molde e 12,5µl do *Power SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems*) nas seguintes condições: desnaturação inicial a 95ºC por 10 min seguida de 40 ciclos de desnaturação a 95ºC por 15 seg, ligação dos iniciadores e extensão a 60ºC por 1 min. Uma

curva padrão foi construída a fim de serem utilizadas para estimar o número de cópias de DNA do parasito em cada amostra.

A curva padrão para os experimentos com *T. cruzi* foi construída segundo Caldas e colaboradores (2012), utilizando diluição em série de uma mistura de DNAs de sangue de camundongo B6.129S7 *knockout* para INF-γ não-infectado e parasitos de meio de cultura contendo a sequência de 182pb, relacionada ao gene de multicópias TCZ, como descrito por Cummings e Tarleton (2003).

Durante as reações, foram feitas análises das curvas de dissociação dos amplificados de cada amostra a fim de verificar se as qPCRs estavam gerando mais de um produto.

4.3.5 Avaliação do tempo de viabilidade do DNA de *T. cruzi* no trato intestinal de *R prolixus* através da qPCR

Uma alíquota de epimastigotas foi retirada da cultura, os parasitos quantificados pelo método a fresco de Brener (1962), mortos mediante tratamento à 65ºC por cinco minutos e transferidos para um microtubo de 1,5ml contendo sangue de coelho citratado. A morte dos parasitos foi confirmada em microscópio óptico através da ausência de movimento flagelar e da utilização do corante viral Eritrosina. A concentração final dos parasitos no sangue foi ajustada para $1x10^3$ parasitos/µl e então o sangue infectado com os parasitos mortos foi transferido para o alimentador artificial. Alíquotas do sangue infectado foram mantidas a -20ºC para posterior extração de DNA e quantificação por qPCR.

Ninfas foram individualizadas, pesadas antes e imediatamente após a alimentação em alimentador artificial pelo tempo necessário para a ingestão de 20-30µl de sangue e tiveram o IMA dissecado nos tempos: 3, 24, 48, 96 horas e 7 dias após a alimentação contendo os parasitos mortos. O IMA dos insetos foi dissecado, separado do IMP e macerado em 20µl de PBS. Deste conteúdo, 5µl foram destinados à contagem dos parasitos pelo método de Brener (1962) e o restante foi transferido para microtubos de 1,5 ml contendo 20 µl de PBS estéril e mantidos a -20ºC para posterior extração de DNA e qPCR conforme descrito no item 4.3.4.

4.3.6 Avaliação da adesão de *T. cruzi* no intestino médio anterior de *R. prolixus*

Ninfas de *R. prolixus* foram submetidas às mesmas condições dos ensaios biológicos anteriores, alimentadas em camundongo B6.129S7 *knockout* para INF-γ infectado por *T. cruzi* pelo tempo necessário para a ingestão de 20-30µl de sangue e tiveram o IMA e IMP dissecados nos tempos: 3, 24, 48 horas e 15 dias após a alimentação infectiva.

Os IMA dos insetos foram dissecados, separados, cortados longitudinalmente (a fim de expor o lúmen) e lavados individualmente em gotas de 5µl de PBS. Do conteúdo intestinal, 5µl foram destinados à contagem dos parasitos pelo método a fresco de Brener (1962). A membrana intestinal cortada longitudinalmente foi colocada distendida em lâmina e observada a fresco em microscópio óptico para a busca de parasitos aderidos ao epitélio intestinal (Nogueira *et al.*, 2007). Foram contados 50 campos microscópicos em cada segmento intestinal avaliado.

4.3.7 Avaliação *in vitro* da mortalidade de tripomastigotas sanguíneas de *T. cruzi*

Um camundongo B6.129S7 *knockout* para INF-γ infectado por *T. cruzi*, previamente anestesiado intraperitonealmente com uma mistura de ketamina a 150 mg/kg (Cristalia-Brasil) e xilazina a 10 mg/kg (Bayer- Brasil), foi sangrado através de punção cardíaca e teve sua parasitemia verificada através de contagem a fresco segundo Brener (1962). O sangue foi transferido para microtubos de 1,5 ml contendo:

(a) um intestino médio anterior de *R. prolixus* não-alimentado e PBS;
(b) um intestino médio anterior de *R. prolixus* recém-alimentado em camundongo *knockout* para INF-γ sem infecção e PBS;
(c) um par de glândulas salivares de *R. prolixus* e PBS;
(d) PBS;
(e) um intestino médio anterior de *R. prolixus* não-alimentado e meio RPMI (*Roswell Park Memorial Institute*) sem soro;

(f) um intestino médio anterior de *R. prolixus* recém-alimentado em camundongo *knockout* para INF-γ sem infecção e meio RPMI sem soro;

(g) um par de glândulas salivares de *R. prolixus* e meio RPMI sem soro;

(h) meio RPMI sem soro;

O IMA dos insetos foram dissecados, separados e tiveram seus lumens expostos. As glândulas salivares dissecadas também tiveram seus conteúdos expostos antes de serem incubadas com o parasito. A quantidade de parasitos/µl foi verificada através de contagem a fresco segundo Brener (1962) nos tempos 0 e 24h após o período de incubação. A viabilidade celular foi avaliada através de observação da movimentação flagelar dos parasitos e do corante vital Eritrosina.

4.4 Análise estatística

Todas as análises estatísticas foram realizadas no *GraphPad Prism 5*. A normalidade dos dados foi testada através do teste Kolmogorov-Smirnov. A correlação entre a parasitemia dos camundongos e a recuperação dos parasitos no IMA das ninfas foi realizada através da correlação de Spearman. As análises dos dados normais foram realizadas através do teste t para comparação de duas amostras não pareadas, e a comparação entre mais de duas amostras foi realizada através do teste de variância (ANOVA) e posterior teste de comparações múltiplas de Tukey. As análises dos dados não-paramétricos foram realizadas através do teste Mann Whitney para comparação de duas amostras, e a comparação entre mais de duas amostras foi realizada através do teste de Kruskal-Wallis e posterior teste para comparações múltiplas de Dunn, sendo as diferenças observadas consideradas estatisticamente significativas quando $p<0,05$. A análise dos dados do ensaio de incubação foi realizada através do teste ANOVA e posterior teste de Dunnett para comparações dos grupos testes com o grupo controle, sendo as diferenças observadas consideradas estatisticamente significativas quando $p<0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Colonização do trato intestinal de *R. prolixus* por *T. rangeli*

5.1.1 Comparação das taxas de recuperação de parasitos no IMA após a infecção de *R. prolixus* com formas epimastigotas ou tripomastigotas de *T. rangeli*

Uma vez que a maioria dos trabalhos publicados utiliza formas epimastigotas de cultura de tripanossomos para a infecção dos triatomíneos, o primeiro objetivo do presente estudo foi avaliar se a forma de desenvolvimento do parasito utilizada na infecção poderia modificar a dinâmica de colonização do IMA de *R. prolixus*. Inicialmente, a porcentagem de recuperação de parasitos em relação à concentração inicial dos mesmos no sangue oferecido no alimentador artificial (epimastigotas) e no sangue de camundongos infectados (tripomastigotas) foi avaliada (figura 7). A concentração inicial dos parasitos no sangue que serviu como fonte para a alimentação foi de 10^4 epimastigotas/µl e $10^3 \pm 500$ tripomastigotas/µl. A porcentagem de parasitos recuperados no IMA de *R. prolixus* após alimentação com formas epimastigotas de cultura e com formas tripomastigotas sanguíneas de *T. rangeli* apresentou um perfil semelhante (teste t, p=0,93) em três horas pós-infecção (hpi), quando 54±12% dos epimastigotas e 55±8% dos tripomastigotas foram encontrados na primeira porção do trato digestivo do inseto (figura 7).

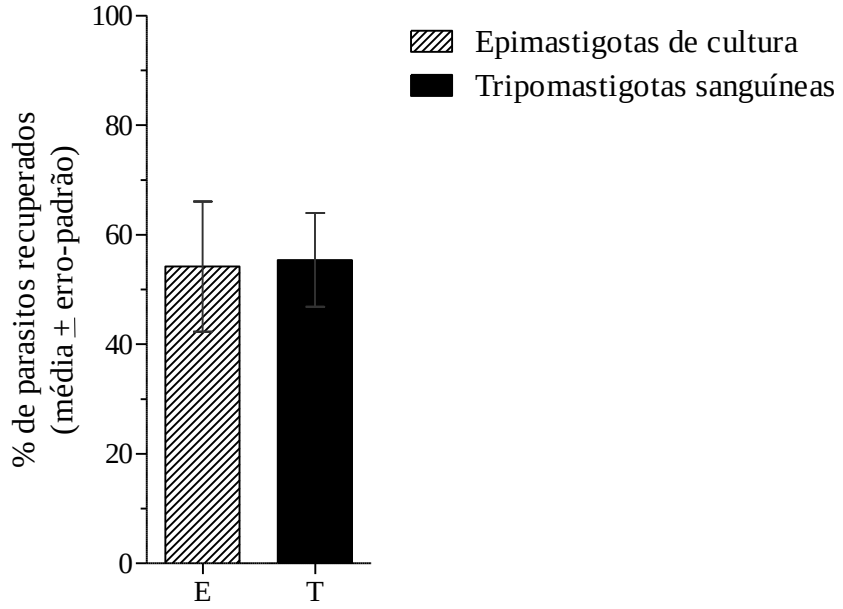

Figura 7 – Porcentagem de parasitos recuperados no IMA de *R. prolixus* três horas após a alimentação infectiva com formas epimastigotas de cultura e formas tripomastigotas sanguíneas de *T. rangeli* (*n*=10 insetos por grupo).

5.1.2 Desenvolvimento do *T. rangeli* no IMA de *R. prolixus*

5.1.2.1 Quantificação do *T. rangeli* no IMA de *R. prolixus* ao longo do tempo

A fim de determinar por quanto tempo os parasitos permanecem no IMA das ninfas, o seu número foi registrado periodicamente após o início de infecções, tanto para aquelas iniciadas com formas epimastigotas quanto para as iniciadas com tripomastigotas. A quantidade de parasitos ao longo de diferentes dias pós-infecção (dpi) está mostrada na figura 8. Apesar das semelhantes porcentagens de parasitos recuperados no IMA nas primeiras horas da infecção, a dinâmica de crescimento dos flagelados durante o percurso da infecção foi bem diferente dependendo da sua forma inicial. O número de epimastigotas variou em função do tempo de infecção dos insetos (ANOVA, p=0,0001). Uma redução significativa no número de parasitos foi observada no dia 5 pós-infecção (pi) em relação aos outros períodos avaliados (figura 8A; Tukey, p<0,05). Os valores médios observados foram de 5.418$\pm$1.186, 7.528$\pm$443,

6.464±593 e 1.478±486 par/µl para os dias 0, 1, 2 e 5 pi, respectivamente. O número de parasitos presentes no IMA de insetos alimentados com formas tripomastigotas também variou ao longo do período de infecção (ANOVA, p=0,0089). Neste caso foi observado um aumento significativo no número de parasitos no dia 2 pi em relação aos dias 0 e 15 pi (figura 8B; Tukey, p<0,05). Os valores médios observados foram de 716±103, 1.123±298, 3.564±1.147, 2.714±874, 808±713 e 110±39 par/µl para os dias 1, 2, 7, 10 e 15 pi, respectivamente.

Comparando-se os números de parasitos registrados para os dois grupos para cada dpi, foram observadas diferenças significativas entre a concentração de parasitos observados no IMA dos insetos em 0, 1 e 2 dpi (figura 8; ANOVA, p<0,0001; Tukey p<0,05).

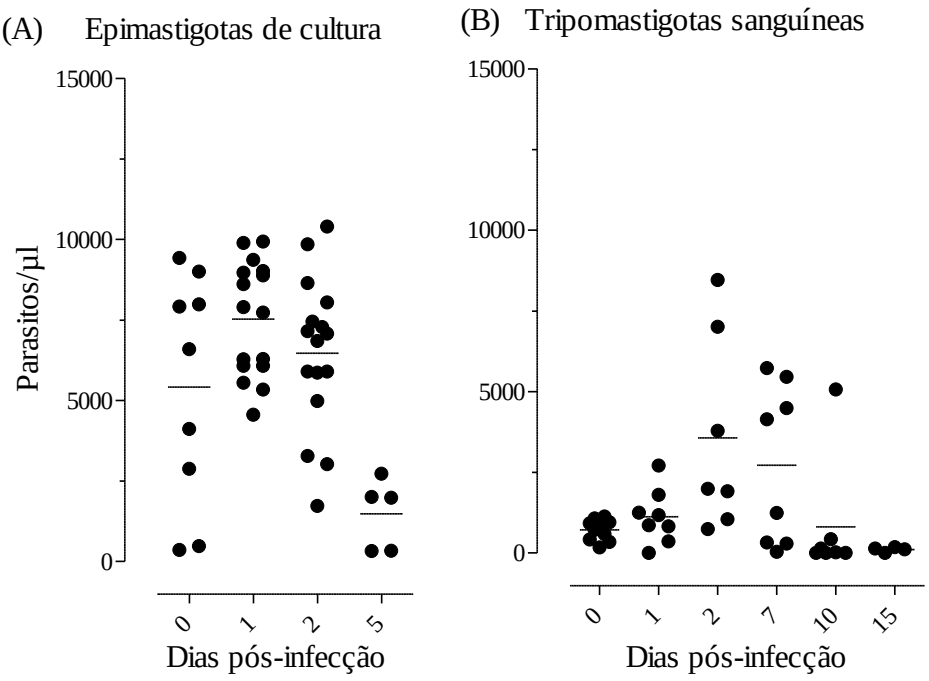

Figura 8 – Perfil temporal da quantidade de parasitos/µl no IMA de *R. prolixus* após alimentação infectiva em (A) alimentador artificial contendo epimastigotas de *T. rangeli* e (B) em camundongo infectado com *T. cruzi*, quantificados por câmara de Neubauer. Cada ponto corresponde à quantificação dos parasitos de um inseto e cada barra horizontal corresponde à mediana do grupo avaliado ($n \geq 5$).

5.1.2.2 Diferenciação de tripomastigotas em epimastigotas de *T. rangeli* no IMA de *R. prolixus*

O processo de diferenciação das formas tripomastigotas para formas epimastigotas do *T. rangeli* foi avaliado nos ensaios onde os insetos foram alimentados em camundongos infectados (figura 9). Três diferentes formas do parasito foram encontradas no IMA (figura 9): formas tripomastigotas sanguíneas (figura 10A e B), formas arredondadas nas quais não foi possível determinar a posição do cinetoplasto e, sendo assim, foram denominadas formas intermediárias (figura 10C e D) e formas epimastigotas (figura 10E e F). A proporção de formas tripomastigotas de *T. rangeli* foi diminuindo gradativamente ao longo do período estudado, desaparecendo completamente a partir do dia 7pi (figura 9). O aparecimento de formas intermediárias foi observado a partir do primeiro dpi, já somando cerca de 35% dos parasitos encontrados, proporção que se manteve até o sétimo dpi (figura 9). As formas epimastigotas de *T. rangeli* apareceram a partir do primeiro dpi e foram gradativamente aumentando sua proporção até serem a única forma presente no IMA no 15º dpi (figura 9).

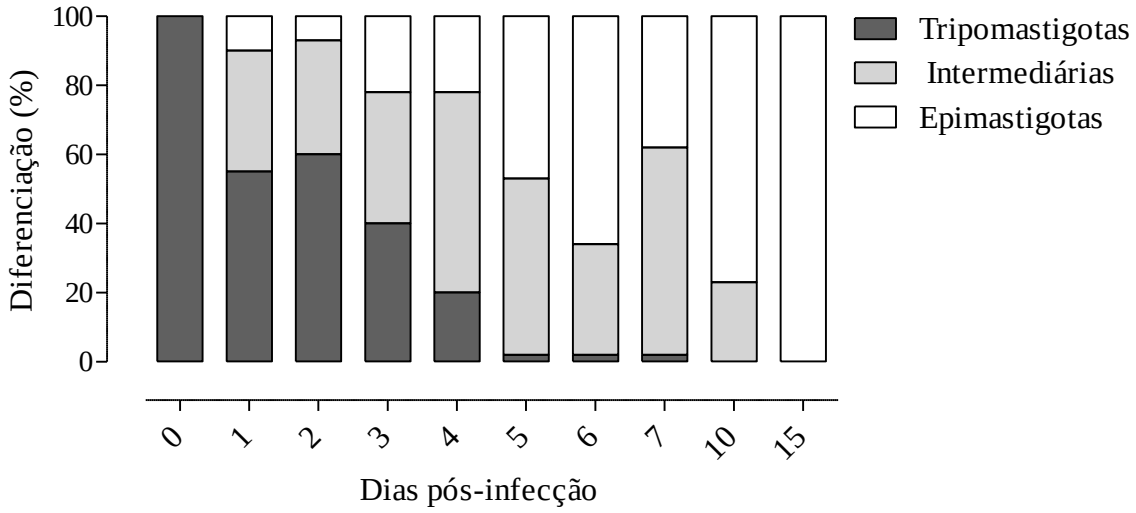

Figura 9 – Perfil temporal de diferenciação (%) das formas tripomastigotas sanguíneas de *T. rangeli* em formas intermediárias e epimastigotas no IMA de *R. prolixus*. A porcentagem de formas evolutivas presentes foi calculada a partir da contagem de 50 campos microscópicos em lâminas coradas pelo método de Giemsa (*n*=10 lâminas para cada tempo avaliado).

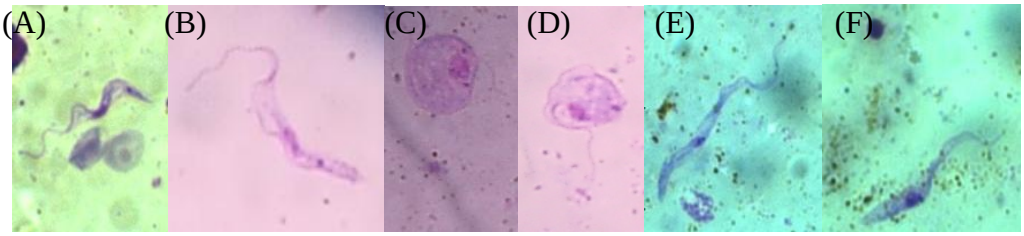

Figura 10 - Formas tripomastigotas (A e B), intermediárias (C e D) e epimastigotas (E e F) de *T. rangeli* encontradas no IMA de *R. prolixus*. Aumento de 1.000x.

5.2 Colonização do trato intestinal de *R prolixus* por *T. cruzi*

5.2.1 Comparação das taxas de recuperação de parasitos no IMA após a infecção de *R. prolixus* com formas epimastigotas ou tripomastigotas de *T. cruzi*

Da mesma forma que nos ensaios de *T. rangeli*, o primeiro ensaio de *T. cruzi* teve como objetivo comparar as taxas de recuperação de parasitos em insetos que ingeriram formas epimastigotas de cultura ou formas tripomastigotas sanguíneas. As concentrações iniciais de parasitos presentes no sangue que serviu como fonte para a infecção dos insetos foram de 10^4 epimastigotas/µl ou 10^3 tripomastigotas/µl. A porcentagem de parasitos recuperados no IMA de *R. prolixus* após alimentação infectiva com formas epimastigotas de cultura não diferiu da obtida quando os insetos ingeriram formas tripomastigotas sanguíneas (figura 11; teste t, p=0,37). A porcentagem média de parasitos recuperados no IMA após a alimentação foi de 23,0$\pm$3,5% para epimastigotas e 25,0$\pm$5,3% para tripomastigotas.

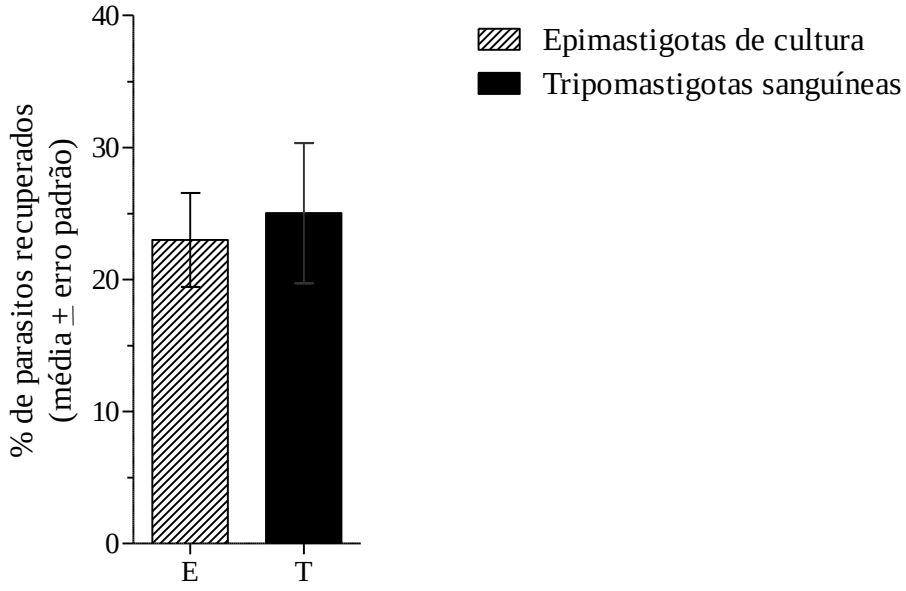

Figura 11 – Porcentagem de parasitos recuperados no IMA de *R. prolixus* três horas após alimentação infectiva com formas epimastigotas de cultura ou formas tripomastigotas sanguíneas de *T. cruzi* (*n*=20 insetos por grupo).

A concentração de parasitos obtida no IMA dos insetos em diferentes momentos após a infecção está mostrada na figura 12. Independentemente da forma do parasito que iniciou a infecção, a concentração dos mesmos variou ao longo do tempo (Kruskal-Wallis, p=0,0003 para insetos alimentados com formas epimastigotas e p<0,001 para insetos alimentados com formas tripomastigotas). Entretanto, a dinâmica de crescimento dos parasitos foi diferente dependendo do tratamento. Para os insetos alimentados com sangue contendo epimastigotas de cultura foi observada uma redução significativa no número de parasitos em 72 horas pós-infecção (hpi) (figura 12A; Dunn, p<0,05; medianas para 3, 24, 48 e 72 hpi: 2077, 1795, 1101 e 0 par/µl, respectivamente). A partir de 72 hpi não foram mais encontrados parasitos no IMA (figura 12A). No caso dos insetos alimentados em camundongos contendo formas tripomastigotas sanguíneas, uma redução significativa na concentração de parasitos foi observada entre 3 e 48 hpi (figura 12B; Dunn, p<0,05; medianas em 3, 24 e 48 hpi: 755, 142, 0 par/µl, respectivamente). Não foram encontrados parasitos no IMA nos períodos subsequentes (96 e 168 hpi).

Comparando-se os números das diferentes formas evolutivas para cada dpi, foram observadas diferenças significativas na concentração de epimastigotas e tripomastigotas observados no IMA dos insetos em 24 e 48 dpi (figura 12; Kruskal-Wallis, p<0,0001; Dunn p<0,05). Uma vez que a dinâmica de colonização do *T. cruzi* foi diferente quando a infecção

dos insetos foi realizada com epimastigotas de cultura, os seguintes ensaios foram realizados utilizando-se somente insetos alimentados em camundongos infectados.

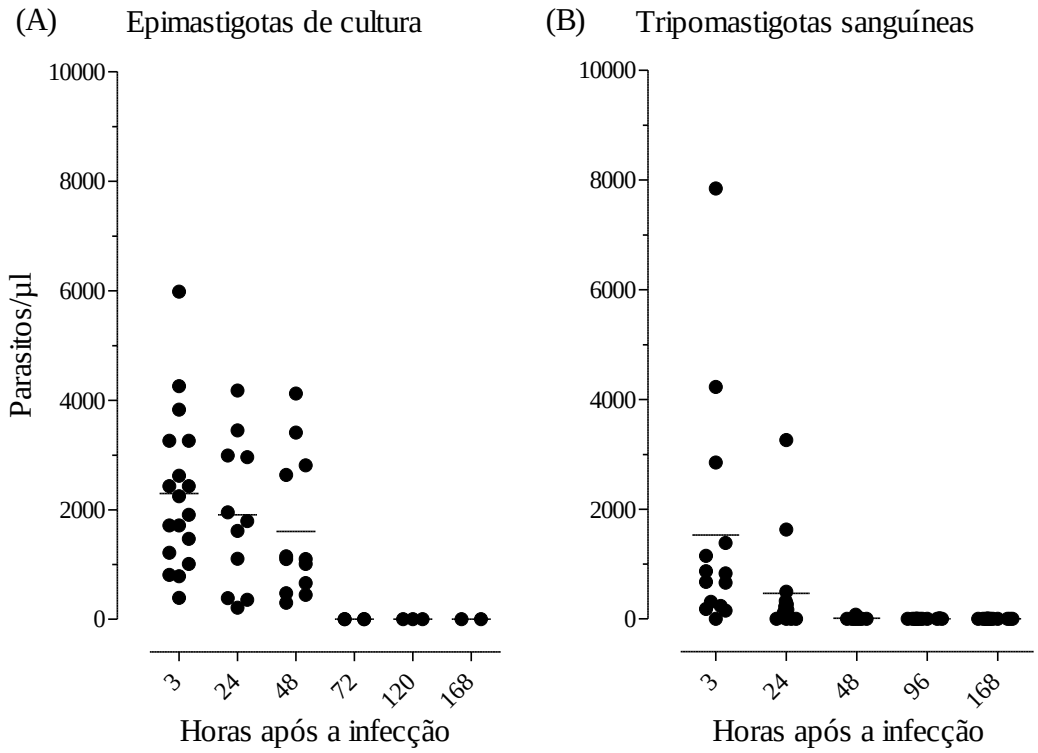

Figura 12 – Perfil temporal da quantidade de parasitos/µl no IMA de *R. prolixus* após alimentação infectiva em (A) alimentador artificial contendo epimastigotas de *T. cruzi* e (B) em camundongo infectado com *T. cruzi*, quantificados por câmara de Neubauer. Cada ponto representa a quantificação dos parasitos de um inseto e cada barra horizontal corresponde à mediana do grupo avaliado ($n \geq 5$).

5.2.2 Desenvolvimento do *T. cruzi* no IMA de *R. prolixus*

5.2.2.1 Diferenciação de tripomastigotas em epimastigotas

Para avaliar o processo de colonização de *T. cruzi* no IMA de *R. prolixus*, o seguinte objetivo foi caracterizar a dinâmica de diferenciação das formas tripomastigotas sanguíneas para epimastigotas. Durante o período avaliado, apenas formas tripomastigotas sanguíneas

(figuras 14A e B) e intermediárias foram observadas no IMA (figuras 14C, D e E). Além disso, foi também possível observar uma gradativa diminuição de formas tripomastigotas e um aumento das formas intermediárias do parasito ao longo do tempo (figura 13). Uma vez que as formas epimastigotas não foram encontradas nessa porção do intestino, foi necessário avaliar o processo de diferenciação também no intestino médio posterior dos insetos.

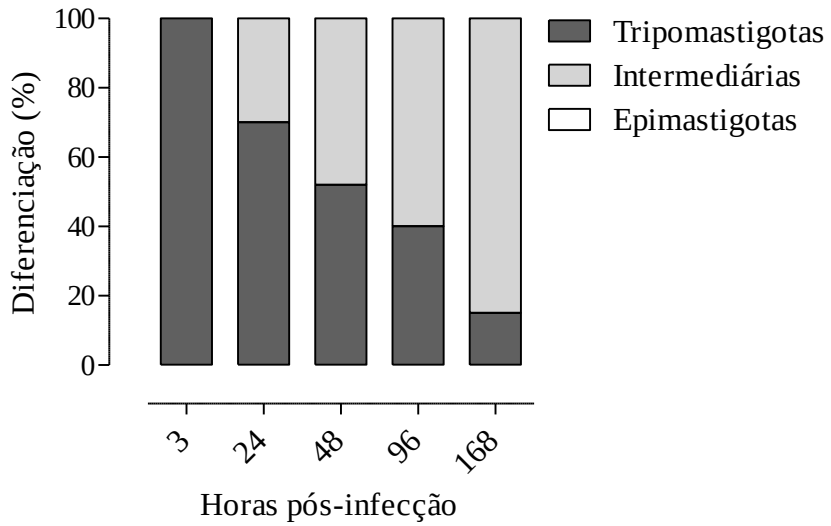

Figura 13 – Perfil temporal da diferenciação (%) de formas tripomastigotas sanguíneas de *T. cruzi* em formas intermediárias no IMA de *R. prolixus*. A porcentagem de formas de desenvolvimento presentes foi calculada a partir da contagem de 50 campos microscópicos de lâminas coradas pelo método de Giemsa (*n*=5 lâminas para cada tempo avaliado).

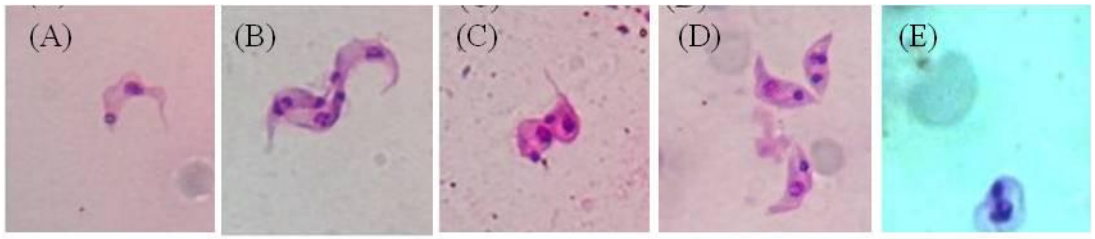

Figura 14 – Formas tripomastigotas (A e B) e intermediárias (C, D e E) de *T. cruzi* encontradas no IMA de *R. prolixus*. Aumento de 1.000x.

5.2.2.2 Avaliação da potencial relação entre a parasitemia do sangue do camundongo e o numero de parasitos recuperados no IMA de *R. prolixus*

A parasitemia dos camundongos utilizados para infectar os insetos apresentou uma considerável variação entre os ensaios. Sendo assim, inicialmente os dados de parasitemia *vs* parasitos observados em 3 hpi foram avaliados pelo teste de correlação de Spearman. A análise mostrou que a porcentagem de parasitos recuperados no IMA de *R. prolixus* no período de três hpi foi diretamente correlacionada com o número de parasitos circulantes no camundongo utilizado (figura 15; teste de Spearman, r=0,9148, p<0,0001).

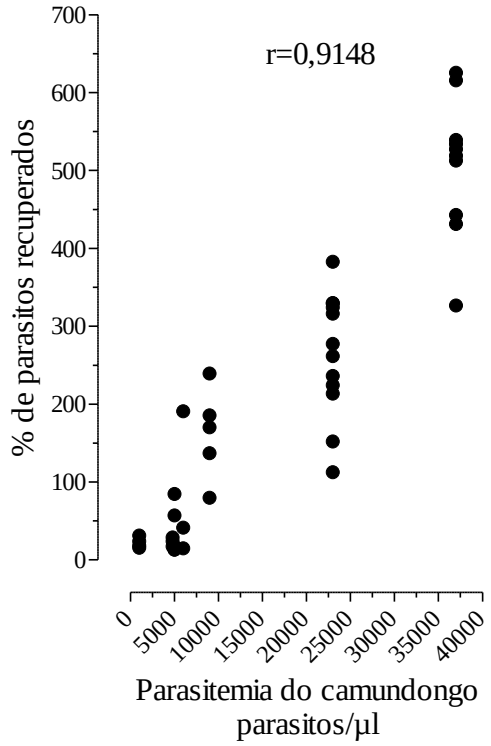

Figura 15 - Porcentagem de parasitos recuperados no IMA de *R. prolixus* três horas após alimentação em camundongo infectado com de *T. cruzi* apresentando diferentes níveis de parasitemia. Cada ponto representa a quantificação dos parasitos de um inseto.

Uma vez que a parasitemia dos camundongos influenciou na quantidade de parasitos observados no IMA 3 hpi, os dados foram então submetidos à análise de variância (ANOVA, p<0,001) e contrastes *a posteriori* para se definir a partir de qual concentração a parasitemia influenciaria na quantidade de parasitos observados. A análise dos contrastes permitiu dividir

os ensaios em dois diferentes perfis, um de parasitemias baixas (entre 1.000 e 5.000 par/µl) e outro de parasitemias altas (valores acima de 9.000 par/µl) (Tukey, 1.000 *vs* 5.000 – n.s; 1.000 *vs* 9.000, 23.000, 37.000 – $p<0,05$ para todas as comparações; 5.000 *vs* 9.000, 23.000, 37.000 – $p<0,05$ para todas as comparações). A concentração média de parasitos/µl no IMA dos insetos alimentados em camundongos com baixas parasitemias foi de 832 par/µl (figura 16A), enquanto que a observada para aqueles insetos que se alimentaram em camundongos com parasitemias altas foi de 515.929 par/µl (figura 16B).

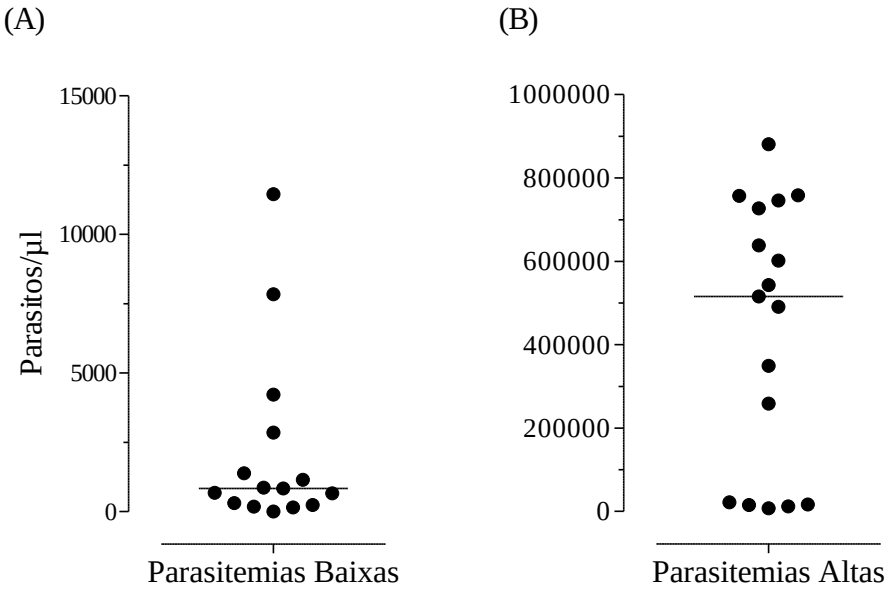

Figura 16 – Quantidade de parasitos/µl detectados no IMA de *R. prolixus* três horas após a alimentação em camundongo infectado com baixas (A) e altas (B) parasitemias de *T. cruzi*. Cada ponto representa a quantificação dos parasitos de um inseto e cada barra horizontal corresponde à mediana do grupo avaliado ($n \geq 5$).

5.2.2.3 Quantificação do *T. cruzi* através de contagem a fresco

Os insetos alimentados em camundongos com baixas parasitemias apresentaram diferenças significativas no número de parasitos/µl ao longo do tempo (figura 17A; Kruskal-Wallis, $p<0,0001$), sendo observada uma redução significativa na concentração do parasito de 3 para 48 hpi, e de 24 para 96 hpi (Dunn, $p<0,05$). Os valores de mediana encontrados para cada período avaliado foram de 832 e 142 par/µl em 3, 24, respectivamente e 0 par/µl em 48, 96 e 168 hpi (figura 17A).

Da mesma forma, os insetos alimentados em camundongos com altas parasitemias, também apresentaram diferenças no número de parasitos/µl ao longo do tempo (figura 17B; Kruskal-Wallis, p<0,0001), sendo observada uma redução significativa na concentração do parasito de 3 para 24 hpi (Dunn, p<0,05). Os valores de mediana para cada p

eríodo avaliado (3, 24, 48 e 96 hpi) foram 503.352, 252, 290 e 0 par/µl, respectivamente (figura 17B).

Entretanto, independentemente da quantidade inicial de parasitos ingeridos, foi observada uma significativa redução no número de flagelados nas primeiras 48 hpi (figura 17; Dunn, p<0,05 para parasitemias baixas e altas). Em adição, em nenhum dos tratamentos avaliados foram detectados parasitos no IMA dos insetos após 96 horas de infecção (figura 17).

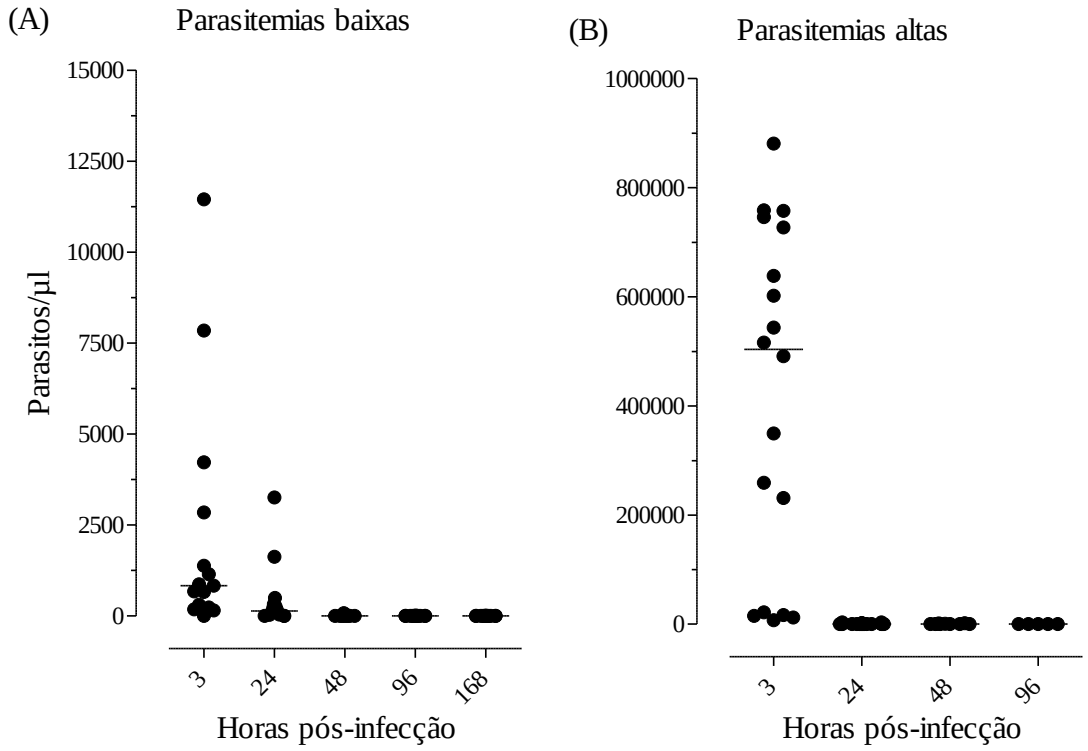

Figura 17 – Perfil temporal da quantidade de parasitos/µl no intestino médio anterior de *R. prolixus* após alimentação infectiva em camundongos infectados com parasitemias baixas (A) e altas (B) de *T. cruzi*, quantificados por câmara de Neubauer. Cada ponto representa a quantificação dos parasitos de um inseto e cada linha horizontal corresponde à mediana do grupo avaliado.

5.2.3 Desenvolvimento do *T. cruzi* no IMP de *R. prolixus*

5.2.3.1 Diferenciação de tripomastigotas em epimastigotas

Uma vez que não foram encontradas formas epimastigotas no IMA dos insetos, amostras de IMP foram coradas e analisadas em microscópio óptico para determinar a possível presença dos parasitos neste órgão. O reduzido número de parasitos encontrado nesta porção do intestino somente permitiu a avaliação de 15±6 flagelados em 50 campos avaliados. A análise mostrou a presença de raras formas tripomastigotas, a maioria já em processo de diferenciação (figura 19A), além de formas intermediárias (figura 19B e C) e epimastigotas (figura 19C), as últimas se tornando as formas mais frequentemente observadas 15dpi (figura 18).

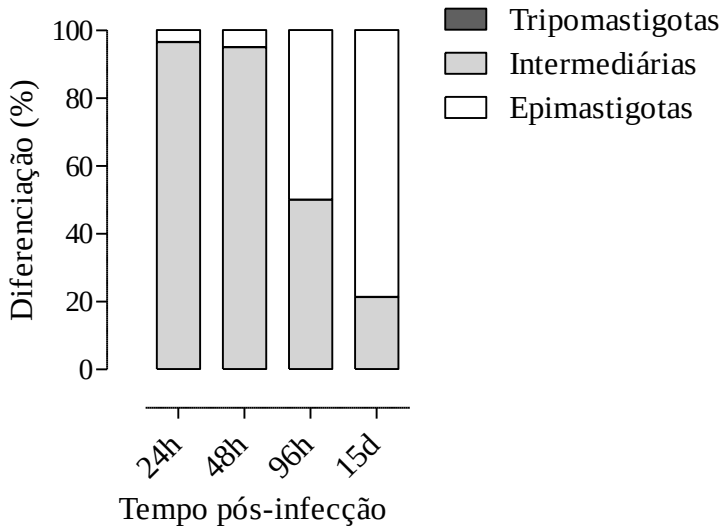

Figura 18 – Perfil temporal de diferenciação (%) das formas tripomastigotas sanguíneas em formas intermediárias e epimastigotas de *T. cruzi* no IMP de *R. prolixus*. A porcentagem de formas evolutivas presentes foi calculada a partir da contagem de 50 campos microscópicos de lâminas coradas pelo método de Giemsa (*n*=5 lâminas para cada tempo avaliado).

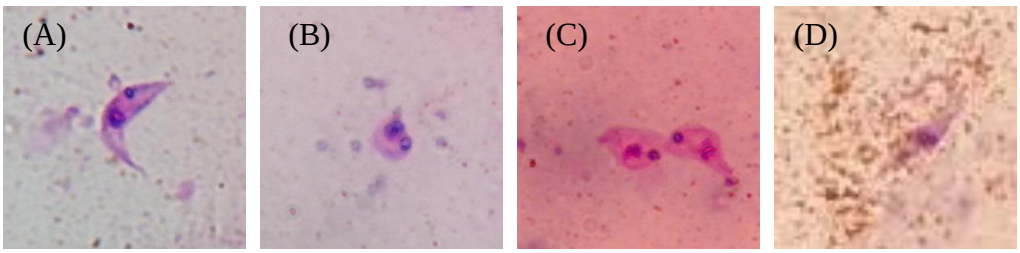

Figura 19 – Formas tripomastigotas em processo de diferenciação (A), formas intermediárias (B e C) e epimastigotas (D) de *T. cruzi* encontradas no IMP de *R. prolixus*. Aumento de 1.000x.

5.2.3.2 Quantificação do *T. cruzi* através de contagem a fresco

A figura 20 mostra os números de parasitos registrados 3 e 24 hpi nos ensaios com parasitemias altas e baixas (figura 20A e B, respectivamente). Conforme esperado, os insetos alimentados em camundongos com parasitemias altas apresentaram mais flagelados 3 hpi (figura 20A; Mann-Whitney, p=0,0077). Enquanto os insetos alimentados em camundongos com baixas parasitemias não apresentaram parasitos, o valor de mediana observado para aqueles alimentados em camundongos com altas parasitemias foi de 1,5 par/µl. Apesar das diferenças observadas após as primeiras 3 hpi, não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos 24 hpi (Mann-Whitney, p=0,92), sendo o valor de mediana de 0 par/µl para insetos alimentados em camundongos com baixas e altas parasitemias (figura 20B).

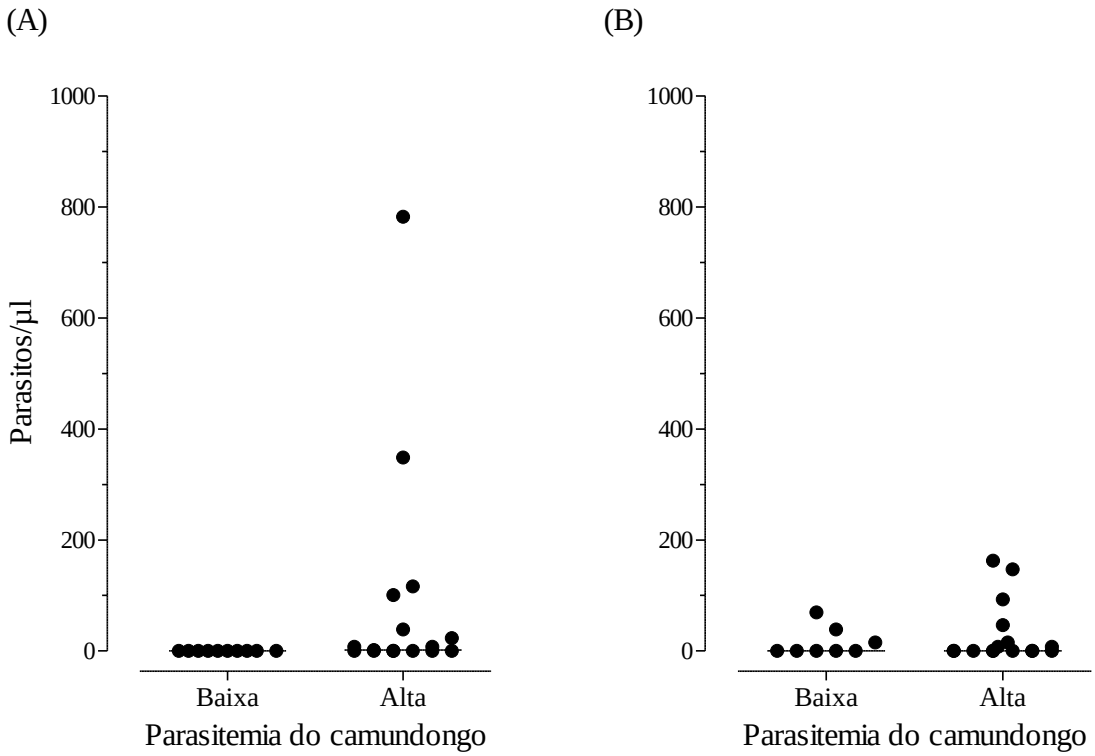

Figura 20 – Quantidade de parasitos/µl no IMP de *R. prolixus* após 3 horas (A) e 24 horas (B) da alimentação em camundongos infectados com baixas ou altas parasitemia de *T. cruzi* quantificados pelo método a fresco de Brener (1962). Cada ponto representa a quantificação dos parasitos de um inseto e cada linha horizontal corresponde à mediana do grupo avaliado ($n \geq 8$).

Da mesma forma que para o IMA, o número de parasitos também foi quantificado ao longo do tempo no IMP dos insetos. De maneira semelhante, também foi observada uma influência do tempo transcorrido após infecção na quantidade de flagelados registrada (figura 21; Kruskal-Wallis; $p<0,0001$). Como esperado, foi observada uma tendência de aumento no número de parasitos ao longo do tempo. Entretanto, apenas em 15 dpi foi observado uma quantidade de parasitos significantemente maior do que os outros tempos avaliados (figura 21; Dunn, $p<0,05$). Os valores de mediana registrados para cada período avaliado foram de 0 parasitos/µl em 3, 24, 48, 96 hpi e 7 dpi e 54 parasitos/µl em 15 dpi.

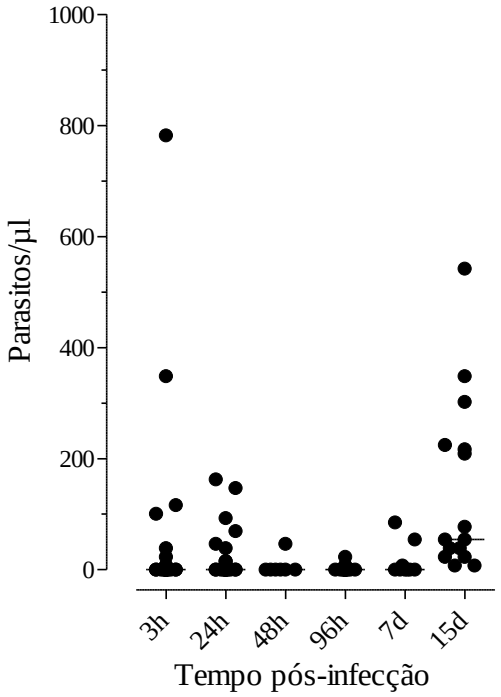

Figura 21 – Perfil temporal da quantidade de parasitos/µl no IMP de *R. prolixus* após alimentação infectiva em camundongos infectados com parasitemias baixas (A) e altas (B) de *T. cruzi*, quantificados pelo método a fresco de Brener (1962) Cada ponto representa a quantificação dos parasitos de um inseto (proveniente dos ensaios com parasitemias baixas e altas) e cada linha horizontal corresponde à mediana do grupo avaliado ($n \geq 8$).

5.2.4 Quantificação do *T. cruzi* através de qPCR

5.2.4.1 Quantificação do *T. cruzi* no IMA de *R. prolixus* através de qPCR

Para avaliar a possibilidade dos parasitos estarem aderidos ao epitélio intestinal e que devido a isso sua quantificação tivesse sido subestimada na contagem a fresco, parte das amostras também foi submetida à quantificação por qPCR. Uma vez que a extração de DNA foi realizada a partir de um macerado do IMA, assume-se que a qPCR poderia detectar parasitos aderidos ao epitélio. Consistentemente, a quantificação dos parasitos no IMA variou ao longo do tempo em ambos os métodos (ANOVA, p=0,0007 e p=0,0026 para quantificação através do método a fresco e da qPCR, respectivamente). Os resultados mostraram que

enquanto nas contagens a fresco houve uma redução de 5.150±1.707 par/µl para 1.011±419 par/µl nas primeiras 24 horas (figura 22A; Tukey, $p<0,05$), a quantificação pela qPCR manteve valores semelhantes durante as primeiras 48 horas (Tukey, $p>0,05$) detectando uma redução significativa na quantidade de DNA correspondente ao número de parasitos somente de 48 para 96 hpi (figura 22B; Tukey, $p<0,05$). Dessa maneira, a qPCR continuou detectando DNA dos parasitos nos períodos subsequentes quando não mais se observava flagelados nas contagens a fresco (figura 22). A quantificação realizada através da contagem a fresco mostrou valores médios de 5.150±1.707, 1.011±419 e 477±259 par/µl em 3, 24, 48 hpi e 0 parasitos em 96 hpi, 7 e 15 dpi, respectivamente (figura 22A). Para a quantificação realizada através da qPCR os valores médios foram de 2.227±444, 1.589±412, 2.687±1.161, 256±147, 109±21, 9±8 par/µl em 3, 24, 48, 96 hpi, e 7 e 15 dpi, respectivamente (figura 22B).

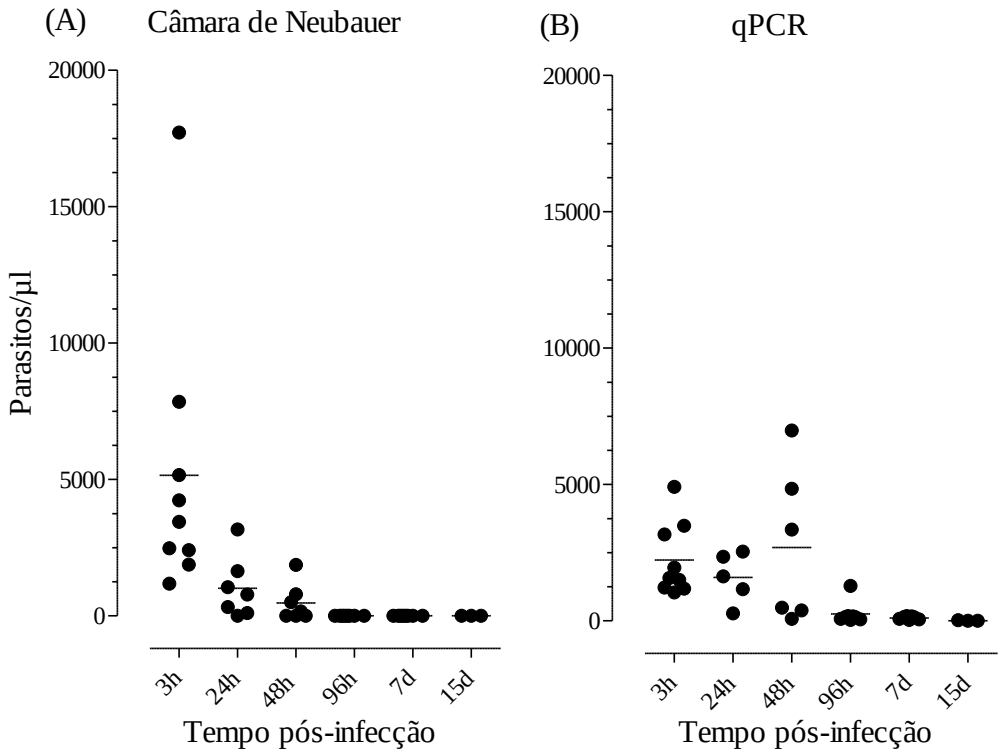

Figura 22 – Perfil temporal da quantidade de parasitos/µl no IMA de *R. prolixus* após alimentação infectiva em camundongos infectados com *T. cruzi*, quantificados através de câmara de Neubauer (A) e qPCR (B). Cada ponto representa a quantificação dos parasitos de um inseto e cada barra horizontal corresponde à média de cada grupo avaliado ($n \geq 8$).

5.2.4.2 Quantificação do *T. cruzi* no IMP de *R. prolixus* através de qPCR

Da mesma forma que o realizado para o IMA, parte das amostras de IMP foram quantificadas a fresco (Brener, 1962) e pela qPCR. Na quantificação a fresco o número de parasitos variou ao longo do tempo (Kruskal-Wallis, p=0,0009), e foram observados valores de mediana de 349, 0, 0, 0 e 77 par/µl em 3, 24, 48, 96 hpi e 15 dpi, respectivamente. Especificamente, foi observada uma redução significativa no número de parasitos de 3 para 48 hpi, enquanto posteriormente houve um aumento neste parâmetro entre 48 hpi para 15 dpi (figura 23A; teste de Dunn, p<0,05;). Curiosamente, a qPCR não mostrou variação significativa da quantidade de DNA correspondente ao número de parasitos ao longo do tempo (Kruskal-Wallis, p=0,1119). Os valores (medianas) foram de 8, 88, 58, 8 e 35 parasitos/µl em 3, 24, 48, 96 hpi e 15 dpi, respectivamente.

A comparação dos resultados obtidos pelos dois métodos mostrou diferenças significativas nos períodos de 3-96hpi (figura 23; Mann Whitney, p=0,03, p=0,004, p=0,0001 e p=0,03 para 3, 24, 48 e 96 hpi, respectivamente), porém em 15 dpi não foram observadas diferenças entre os dois métodos de quantificação (figura 23; Mann Whitney, p=0,05).

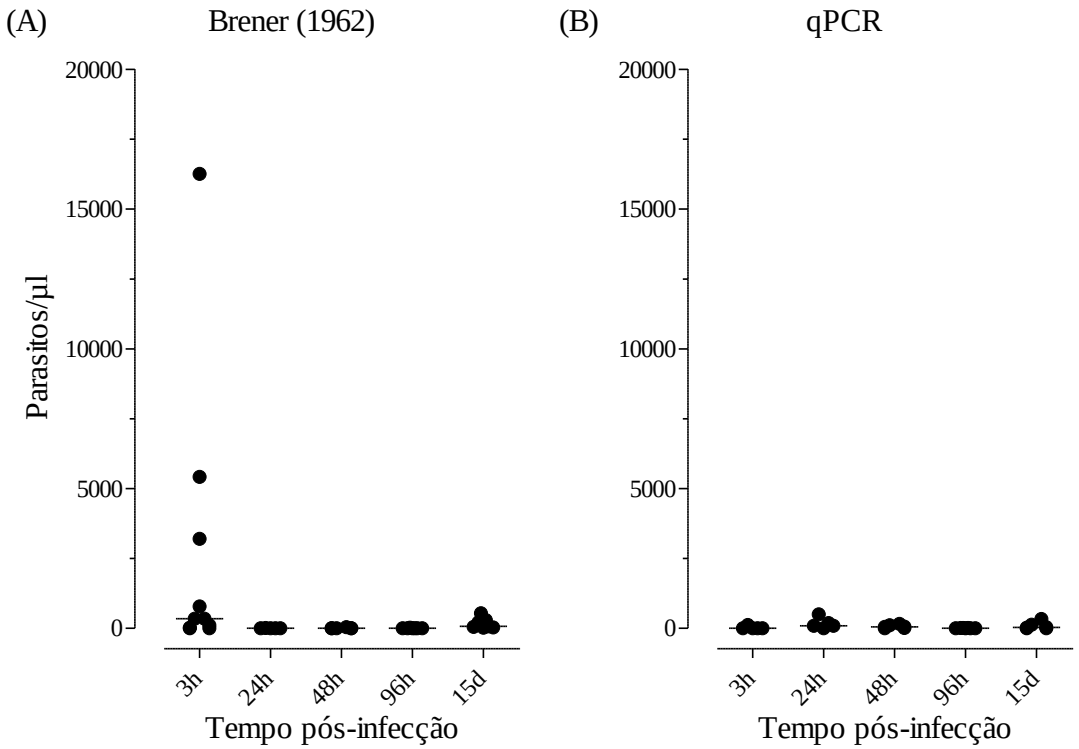

Figura 23 – Perfil temporal da quantidade de parasitos/µl no IMP de *R. prolixus* após alimentação infectiva em camundongos infectados com *T. cruzi*, quantificados pelo método a fresco de Brener (1962) (A) e qPCR (B). Cada ponto representa a quantificação dos parasitos de um inseto e cada barra horizontal corresponde à mediana do grupo avaliado ($n \geq 8$).

5.2.4.3 Avaliação do tempo de viabilidade do DNA de *T. cruzi* para detecção por qPCR no trato intestinal de *R. prolixus*

A molécula de DNA possui uma alta estabilidade química mesmo após longos períodos (Breslauer *et al.*, 1986; Thompson *et al.*, 1993; Stryer, 1996; Clausen-Schaumann *et al.*, 2000) e uma PCR pode produzir resultados positivos ainda que seja detectado 26% de degradação na amostra de DNA (Almeida *et al.*, 2009). Sendo assim, para saber se o DNA detectado pela qPCR era proveniente de parasitos vivos, um ensaio foi desenhado com o objetivo de avaliar por quanto tempo após a morte dos parasitos o seu DNA poderia ser quantificado pela qPCR. A figura 24A mostra a porcentagem de recuperação do DNA no IMA das ninfas que se alimentaram de sangue contendo parasitos mortos em relação a

concentração inicial do mesmo. Os resultados mostram que a qPCR foi capaz de quantificar o DNA dos parasitos mortos, uma vez que foi detectado um valor que corresponderia a 13.217±1.461 par/µl em 3 hpi (figura 24B), o que representa uma recuperação de 83±24% no IMA das ninfas em relação ao que foi oferecido inicialmente as mesmas (figura 24A). Mesmo com uma redução significativa nas primeiras 24 hpi (figura 24B; ANOVA, p<0,0001; Tukey, p<0,05), os resultados mostram que o DNA de parasitos mortos pode ser detectado mesmo 96 horas após a ingestão do mesmo. Os valores quantificados pela qPCR foram correspondentes a 13.217±1.461, 343±241, 129±49, 3.196±1.495, 77±19 par/µl em 3, 24, 48, 96 hpi e 7 dpi, respectivamente.

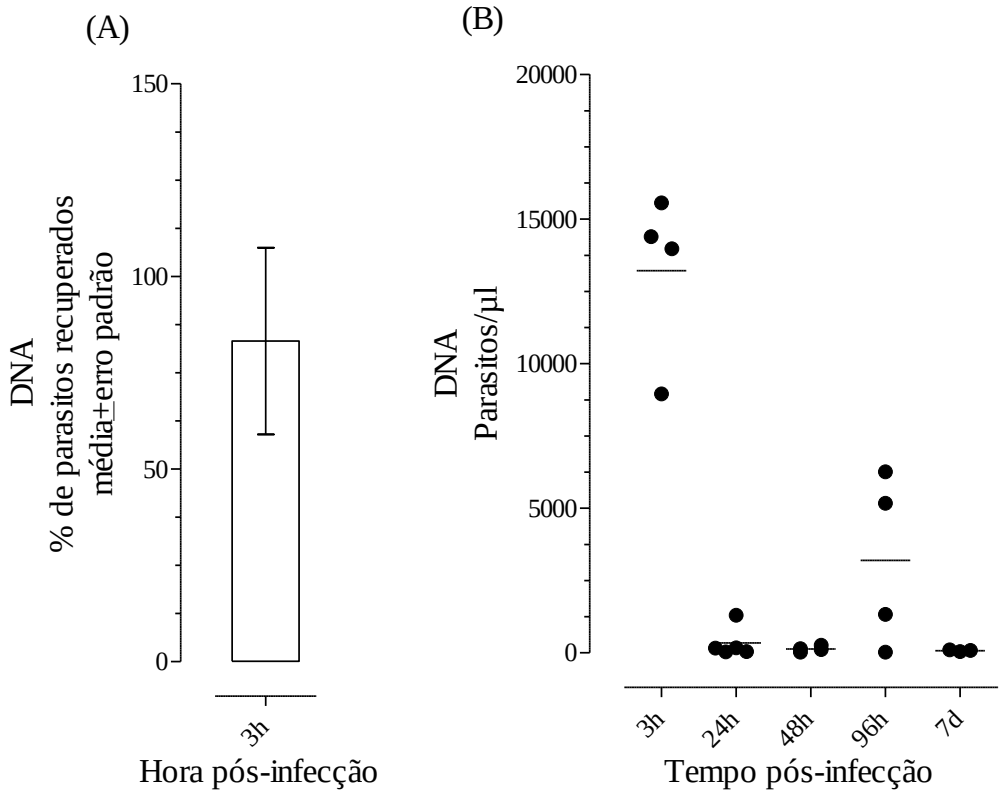

Figura 24 – (A) Porcentagem de DNA de *T. cruzi* recuperado e (B) perfil temporal da quantidade de DNA que corresponde à quantidade de parasitos/µl no IMA de *R. prolixus* após alimentação com *T. cruzi* mortos. Cada ponto representa a quantificação de DNA de *T. cruzi* em um inseto e cada barra horizontal corresponde à média do grupo avaliado ($n \geq 8$).

5.2.5 Avaliação da adesão de *T. cruzi* no epitélio do IMA de *R. prolixus*

Para avaliar o processo de adesão dos parasitos ao epitélio intestinal, o conteúdo e o epitélio do IMA foram examinados em microscópio óptico em diferentes tempos após a infecção das ninfas. No conteúdo intestinal do IMA foram observados parasitos apenas em 3 e 24 hpi (tabela 1), sendo observada um redução significativa na concentração de parasitos no período de 24 hpi (teste t, p=0,04). Após esse período nenhum flagelado foi detectado. Não foram observados parasitos aderidos à membrana em nenhum dos tempos avaliados (tabela 1).

Tabela 1 – QUANTIDADE DE PARASITOS PRESENTES NO CONTEÚDO E ADERIDOS AO EPITÉLIO DO IMA DE NINFAS DE *R. PROLIXUS* ALIMENTADAS EM CAMUNDONGOS INFECTADOS POR *T. CRUZI*, EM DIFERENTES PERÍODOS APÓS A INFECÇÃO

Período pós-infecção (horas)	**Conteúdo** **Parasitos/µl**	**Epitélio** **Parasitos**
3	8.669±7.169	0
24	808,5±409,8	0
48	0	0

O conteúdo intestinal foi avaliado através do método a fresco de brener (1962); o epitélio intestinal foi distendido em lâmina e teve 50 campos microscópicos analisados; média+erro padrão de 4-5 insetos por período avaliado.

5.2.6 Avaliação *in vitro* da mortalidade de tripomastigotas sanguíneas de *T. cruzi*

O objetivo deste ensaio foi avaliar se a redução da população de parasitos nas primeiras 24 hpi poderia ter sido causada pela eliminação dos mesmos ao entrarem em contato com o IMA do vetor. Para isso, a quantidade de parasitos vivos foi avaliada *in vitro*

quando em contato com IMA de inseto alimentado (IA), IMA de inseto em jejum (IJ) e glândulas salivares (GS) de *R. prolixus* nos períodos de 12 e 24 horas.

Inicialmente, os parasitos foram incubados com os diferentes tecidos de *R. prolixus* pelo período de 12h (em PBS). Após este período, o número de parasitos incubados com GS, IMA-IJ e IMA-IA diminuiu em 57±1, 65±1 e 75±2% em relação à sua concentração inicial, respectivamente. O número de parasitos incubados apenas com PBS apresentou uma redução de 7±4% em relação à concentração inicial (figura 25). A análise de variância mostrou que o número de flagelados variou significativamente com os tratamentos (ANOVA, $p<0,0001$). A comparação de cada tratamento com o grupo controle mostrou reduções significativas no número de parasitos em todos os casos (figura 25; Dunnett, $p<0,05$ para todos os tratamentos). Vinte e quatro horas após o início da incubação todas as amostras, inclusive as do tratamento controle, praticamente não apresentaram parasitos (dados não mostrados).

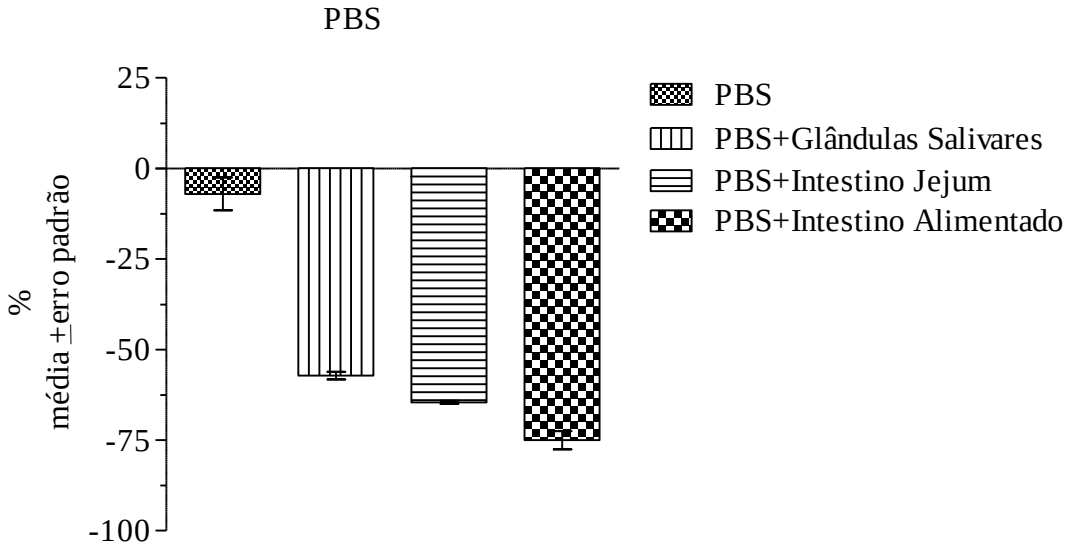

Figura 25 – Redução da concentração de *T. cruzi* (porcentagem) em relação à concentração inicial de parasitos/µl após 12 horas de incubação em PBS. As barras correspondem à média±erro-padrão de 5 repetições.

A fim de manter as formas tripomastigotas sanguíneas de *T. cruzi* vivas pelo período de 24 horas, estas foram incubadas com os diferentes tecidos em meio RPMI sem soro por 24 horas (Chuenkova e Pereira, 2000; Roffê *et al.*, 2011). O número de parasitos mantidos no meio RPMI apresentou uma redução média de 6±6% em relação à sua concentração inicial (figura 26). Interessantemente, os números de parasitos incubados com GS, IMA-IJ e IMA-IA

diminuíram em 15±8, 19±11 e 38±6% em relação à sua concentração inicial, respectivamente. Semelhantemente ao resultado do experimento anterior, foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos analisados (ANOVA, $p<0,0001$). Entretanto, somente o tratamento no qual os parasitos foram incubados com IMA-IA apresentou uma redução significativa em relação ao grupo controle (figura 26; Dunnett, $p<0,05$).

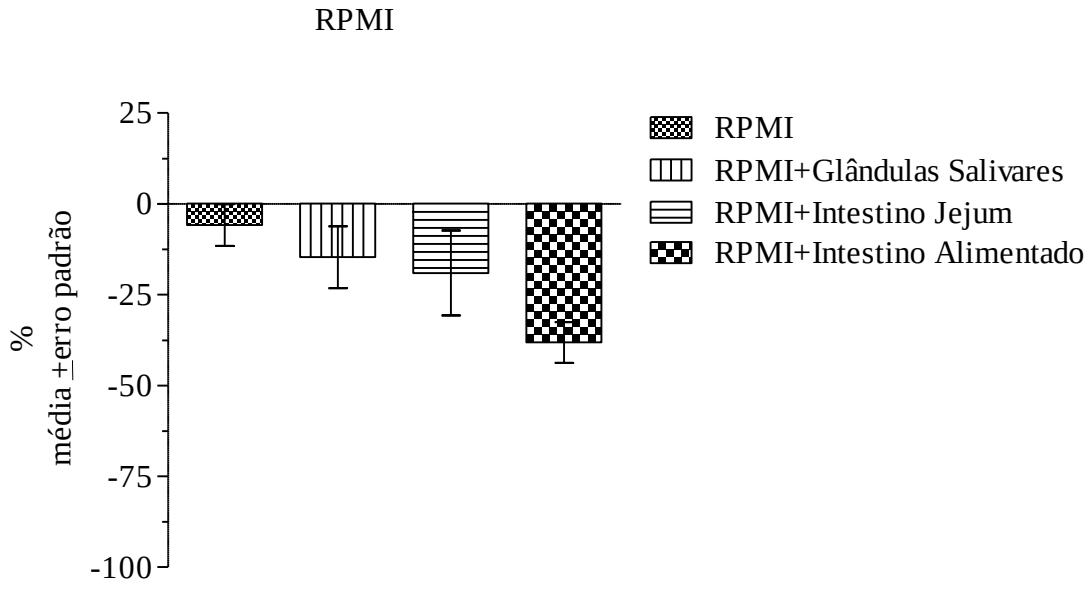

Figura 26 – Redução da concentração de *T. cruzi* (porcentagem) em relação à concentração inicial de parasitos/µl após 24 horas de incubação em meio RPMI sem soro. As barras correspondem à média±erro-padrão de 5 repetições.

6 DISCUSSÃO

Quando ingeridos juntamente com o repasto sanguíneo, *T. cruzi* e *T. rangeli* passam rapidamente pela probóscide e pelo intestino anterior do triatomíneo. Sendo assim, o primeiro local a ser colonizado pelos parasitos, representando o local de início da sua interação com o vetor, é o intestino médio anterior (IMA). O tempo que os parasitos permanecem nesse local pode ser determinante para o curso da infecção, pois nele estão presentes vários fatores que podem afetar a sobrevivência dos parasitos. Dessa maneira, o tempo de permanência no IMA poderia determinar, mesmo que de forma indireta, o estabelecimento da infecção no vetor e permitir a posterior transmissão dos parasitos a um novo mamífero. Entretanto, apesar de existirem diversos trabalhos sobre o desenvolvimento do *T. cruzi* e/ou do *T. rangeli* nos triatomíneos, poucos se concentram nessas fases inicias da infecção; a maioria inicia o período de avaliação após dez ou mais dias da infecção (Tobie, 1961; Marinkelle, 1965; D'Alessandro e Mandel, 1969; Garcia e Gilliam, 1980; Añez, 1983; Schaub e Böker, 1986; Mello *et al*., 1996; Alvarenga e Bronfen, 1997; Kollien *et al*., 1998; Kollien e Schaub, 1999; Carvalho-Moreira *et al*., 2003; Araújo *et al*., 2008; Gonzalez *et al*., 2011), quando, de acordo com os nossos dados, os parasitos já deixaram o intestino médio anterior.

No ciclo de vida dos dois tripanosomatídeos em questão a forma infectante para o vetor é a tripomastigota sanguínea, que é transmitida durante o repasto em um mamífero infectado. Apesar de alguns trabalhos utilizarem tripomastigotas sanguíneas para infectar o vetor (Eicher e Schaub, 2002; Carvalho-Moreira *et al.*, 2003; Whitten *et al.*, 2007; Cordero *et al.*, 2008; Botto-Mahan, 2009; Benitez-Hernandez *et al.*, 2010; Oliveira *et al*., 2010; Buarque *et al.*, 2013), a maioria dos estudos publicados infecta os triatomíneos com formas epimastigotas de cultura (Mello *et al*., 1996; Oliveira e Souza, 2001; 2003; Cortez *et al*., 2002; Gomes *et al*., 2002; Azambuja *et al.*, 2004; Borges *et al.*, 2006; Gonzalez *et al*., 2006; Araújo *et al.*, 2007; Nogueira *et al*., 2007; Whitten *et al.*, 2007; Gonzalez *et al*., 2011, Cortez *et al*., 2012; Uehara *et al.*, 2012). Sendo assim, o primeiro objetivo do presente estudo foi avaliar se a forma de desenvolvimento do parasito utilizada na infecção poderia modificar a dinâmica de colonização do IMA de *R. prolixus*. Para isso, dois parâmetros foram avaliados comparativamente. O primeiro foi relacionado à quantidade de parasitos encontrada no IMA do inseto após um repasto sanguíneo contendo uma concentração conhecida de parasitos

(recuperação de parasitos). O segundo parâmetro foi a quantificação dos parasitos no IMA em diferentes tempos pós-infecção (pi).

Nas infecções por *T. rangeli*, a porcentagem de recuperação de formas epimastigotas e tripomastigotas no IMA de *R. prolixus* foi semelhante, sendo que aproximadamente 50% dos parasitos presentes na dose inicial da dieta foram observados 3 horas pós-infecção (hpi). É importante ressaltar que nos ensaios com epimastigotas a alimentação se deu em alimentador artificial com uma concentração inicial de $1x10^4$ par/µl enquanto que nos ensaios com formas tripomastigotas os insetos se alimentaram em camundongos infectados com parasitemias por volta de $1x10^3$ par/µl. Essa diferença fez com que a quantidade de parasitos encontrados no IMA dos insetos alimentados com epimastigotas, 3 hpi, fosse 7,5 vezes maior do que a encontrada no IMA daqueles insetos alimentados com tripomastigotas. Esta maior quantidade de parasitos nos ensaios iniciados com formas epimastigotas foi observada até o segundo dia pós-infecção (dpi) (figura 9). A partir desse período, a população de parasitos dos ensaios iniciados com epimastigotas diminuiu, provavelmente devido à passagem dos mesmos para o intestino médio posterior (IMP) juntamente com o sangue. A análise de lâminas coradas (Giemsa) das amostras de conteúdo intestinal nos ensaios iniciados com formas tripomastigotas mostrou uma diminuição gradativa no número de parasitos em relação à população total de parasitos, as mesmas não sendo mais encontradas a partir do 7º dpi. O aparecimento de formas intermediárias e formas epimastigotas a partir do primeiro dpi, sugere fortemente que a diferenciação das tripomastigotas de *T. rangeli* acontece no IMA do inseto. O aumento no número de parasitos no 2º dpi que se manteve até o 7º dpi é possivelmente devido à diferenciação das formas tripomastigotas em epimastigotas e multiplicação das últimas. Interessante ressaltar que as formas diferenciadas no IMA permaneceram por mais tempo nesta porção do intestino do que aquelas provenientes de meio de cultura, sugerindo diferenças fisiológicas entre as duas. O sangue ingerido por *R. prolixus* é estocado no IMA (Garcia, 1987; Ribeiro, 1987) onde ocorre a absorção de água (Barret, 1982) e lise das hemácias (Azambuja *et al.*, 1983). A digestão de proteínas e, provavelmente, a disponibilização de nutrientes somente ocorre no IMP (Terra, 1990), o que justificaria a saída das epimastigotas do IMA nos primeiros dias após a infecção. Além disso, nossos dados também podem sugerir que a interferência no desenvolvimento de simbiontes amplamente estudada em infecções por *T. rangeli* (Watkins, 1969, 1971; Eichler e Schaub, 2002) poderia ser uma consequência da manutenção de populações de epimastigotas no IMA nos primeiros dias após a infecção, o que seria interessante ser avaliado em estudos posteriores.

Existem poucos estudos sobre o desenvolvimento do *T. rangeli* no trato intestinal do vetor durante os primeiros dias da infecção, a maioria se atém ao estudo do seu desenvolvimento na hemolinfa ou glândulas salivares do triatomíneo (Zeledón, 1965; Ormerod, 1967; Tobie, 1970; Watkins, 1971; Minter-Goedbloed e Oliveira, 1975; Añez, 1979, 1983; Hecker *et al*., 1990; Oliveira e de Souza, 2003; Meirelles *et al.*, 2005) e dos efeitos patogênicos ou mudanças de comportamento decorrentes da infecção no vetor (Watkins, 1971; Añez e East, 1984; Tovar *et al*., 1989; Garcia *et al.*, 2004). Estudando o desenvolvimento de parasitos da cepa Betijoque, (isolada de *R. prolixus* na Venezuela; Añez, 1981a), Añez (1983) relatou que no IMA dos insetos apareciam formas intermediárias arredondadas entre 6-24 hpi, assim como epimastigotas a partir do 1º dpi o que coincide com o observado no presente estudo. Em adição, o autor sugere que há um aumento no número das formas epimastigotas ao longo do tempo. Vallejo e colaboradores (1988), estudando o desenvolvimento da cepa San Agostin de *T. rangeli* (isolada de *R. prolixus* na Colômbia; Vallejo *et al.*, 1988) em *R. prolixus*, também observaram a presença de formas intermediárias arredondadas, denominadas de amastigotiformas, que aumentaram em número inicialmente, mas depois diminuíram ao longo do tempo e permaneceram no IMA das ninfas por até 7 semanas após a infecção. Os autores, entretanto, iniciaram a avaliação apenas na 2ª semana de infecção e a fizeram em intervalos semanais, não sendo possível a comparação dos dados com os resultados do presente estudo.

Para os ensaios realizados com *T. cruzi*, a porcentagem de parasitos recuperados no IMA de *R. prolixus* após alimentação com formas epimastigotas de cultura e tripomastigotas sanguíneas de *T. cruzi* (em ensaios com camundongos com parasitemias de 1 x 10^3 par/μl) também foi igual entre os dois tratamentos. Entretanto, em condições semelhantes aos ensaios com *T. rangeli*, os insetos ingeriram apenas 20% dos *T. cruzi* presentes na dieta inicial, cerca de duas vezes menos do que o observado com o primeiro parasito. Sendo assim, estes dados sugerem que o *T. rangeli* parece ser mais facilmente ingerido, mesmo quando os insetos se alimentam em camundongos infectados. Esse fato se torna relevante quando se leva em consideração o número de parasitos circulantes normalmente encontrados em camundongos infectados pelas duas espécies, onde, de maneira geral, as populações circulantes de *T. rangeli* são bastante menores do que as de *T. cruzi* (Tobie, 1961; Wrightsman, Krassner e Watson, 1982; Urdaneta-Morales e Tejero, 1985; Vallejo, 1986; Osório *et al.*, 1995; Zuniga *et al.*, 1997; Marinho *et al.*, 1999; Tanoura *et al.*, 1999; Eger-Mangrich *et al.*, 2001). Os

mecanismos de transmissão desses parasitos para os hospedeiros invertebrados merecem ser melhor investigados.

Apesar dos perfis iniciais de recuperação semelhantes, a partir de 24 hpi a dinâmica de colonização das duas infecções se modificou consideravelmente. Enquanto nos ensaios iniciados com epimastigotas de *T. cruzi* o número de parasitos sofreu uma redução de 13,6% em relação à população de 3 hpi, esses valores chegaram a 82,9% nos ensaios iniciados com as formas tripomastigotas. Além disso, os insetos infectados com tripomastigotas sanguíneas, não apresentaram mais parasitos nas contagens a fresco a partir de 48 hpi. Nos insetos infectados com epimastigotas foi possível encontrar parasitos nas contagens a fresco até o período de 72 hpi. Diferentemente do observado para os ensaios com *T. rangeli*, não foi observado um aumento no número de parasitos ao longo do tempo, independentemente do tratamento. Tanto nos ensaios iniciados com epimastigotas quanto naqueles iniciados com tripomastigotas, a população de flagelados diminuiu ao longo do período avaliado até não ser mais possível a sua detecção a fresco. Esses dados sugeriram que a multiplicação de formas epimastigotas de *T. cruzi* não aconteceria no IMA, e que, provavelmente, a diferenciação das formas tripomastigotas também não ocorreria nesta porção do intestino. A análise de lâminas coradas (Giemsa) apoia essa hipótese, uma vez que não foram encontradas formas epimastigotas no IMA de insetos infectados por formas tripomastigotas do parasito. A maioria dos trabalhos da literatura assume que após alguns dias no IMA as tripomastigotas se diferenciam em esferomastigotas e epimastigotas (Garcia e Azambuja, 1991; Kollien e Schaub, 2000; Rey, 2001; Azambuja *et al*., 2005; Garcia *et al.*, 2010), mas se baseia num único estudo de revisão de literatura publicado por Zeledón (1987). A citada revisão inclui trabalhos descritivos produzidos na década de 70 que relatam a presença de epimastigotas no IMA em situações específicas, sendo mais comum que as formas sanguíneas atinjam a porção posterior do intestino médio logo após o repasto sanguíneo, o que corrobora as observações do presente estudo. A partir dos nossos dados, que mostraram que não há formas epimastigotas de *T. cruzi* no IMA, sugerimos que a diferenciação das formas tripomastigotas sanguíneas ocorra no IMP de *R. prolixus*. O raro encontro de parasitos no IMP em 3 hpi impediu a demonstração consistente de que a diferenciação dos flagelados aconteça no local naquele intervalo. Cabe salientar que durante o período mencionado algumas formas tripomastigotas foram observadas nesta porção do intestino. No período de 24 hpi, com um número maior de parasitos, a presença de formas em processo de diferenciação, formas intermediárias e epimastigotas puderam ser consistentemente observadas. Estudos posteriores

são necessários para confirmar se a diferenciação ocorre a partir de formas tripomastigotas que conseguem cruzar o IMA ou a partir das formas intermediárias, que se diferenciariam apenas no IMP em consequência de mudanças químicas detectadas na passagem entre esses microambientes. Estas formas intermediárias têm sido detectadas em todo o trato intestinal do inseto e são normalmente consideradas como uma forma que se desenvolve sob estresse (revisado por Kollien e Schaub, 2000).

Uma vez que as formas que naturalmente iniciam a infecção no vetor são as tripomastigotas sanguíneas, mesmo que seja possível realizar todo o processo de infecção com formas epimastigotas (Cortez *et al*., 2002; Borges *et al.*, 2006; Araújo *et al.*, 2007; Cortez *et al*., 2012; Uehara *et al.*, 2012), a avaliação do processo de colonização somente pode ser realizada utilizando-se as primeiras como formas infectivas. Sendo assim, os ensaios subsequentemente desenvolvidos no presente estudo foram realizados com formas tripomastigotas provenientes de camundongos infectados. Utilizamos camundongos *knockout* para IFN-γ como via para promover parasitemias elevadas. O IFN-γ é uma das citocinas mais estreitamente relacionadas com a resistência à infecção pelo *T. cruzi* e desempenha papel central em induzir a ativação de macrófagos e a inibição da replicação intracelular dos parasitos (Nogueira e Cohn, 1978; Silva *et al*., 1991; Gazzinelli *et al*., 1992). De fato, quando administrado *in vivo* a camundongos aumenta a resistência destes à infecção, levando a uma concomitante diminuição de parasitemia e promovendo um aumento da sobrevida (Reed, 1988). Em infecções agudas com altas parasitemias o processo de diferenciação de tripomastigotas-amastigotas-tripomastigotas sanguíneas ocorre em uma velocidade muito alta. Esse fato combinado com as características do sistema imune do camundongo *knockout* para INF-γ gerou animais com variações significativas no número de parasitos circulantes, mesmo quando o tempo de infecção e inóculo inicial foram controlados. Essa variação inicial, consequentemente, levou a uma elevada variação no número de parasitos ingeridos pelos triatomíneos, relação esta que foi confirmada pelo teste de correlação de Spearman. A partir da identificação desta relação foi possível definir dois perfis diferenciados para o estabelecimento da infecção, um sendo decorrente de infecções com parasitemias baixas (entre 1.000 e 5.000 par/µl) e outro de infecções com parasitemias altas (acima de 5.000 par/µl). Sendo assim, os dados obtidos neste estudo demonstraram que o número de parasitos circulantes no hospedeiro vertebrado afeta diretamente a quantidade de parasitos que o inseto vai ingerir. Consequentemente, este fator poderia afetar o perfil da infecção subsequente, uma vez que a quantificação dos parasitos no IMP 3 hpi mostrou um maior número de parasitos

naqueles insetos que se alimentaram em camundongos que apresentaram parasitemias maiores (figura 20A).

Entretanto, independentemente da quantidade de parasitos ingerida pelos insetos, foi observada uma drástica diminuição na sua população, uma vez que em 24 hpi todos os insetos avaliados apresentaram uma redução de mais de 80% na quantidade de parasitos. Particularmente, nos ensaios com parasitemias baixas o número de parasitos encontrados no IMA sofreu uma redução de 82,9% entre 3 e 24 hpi, enquanto nos ensaios com altas parasitemias a redução foi ainda mais acentuada, i.e., 99%. Adicionalmente, nas avaliações a fresco, não foram encontrados parasitos após 96 hpi. Borges e colaboradores (2006) avaliaram a concentração do clone Dm28c de *T. cruzi* no IMA, IMP e na ampola retal de ninfas de quinto estádio de *R. prolixus* em 0, 5, 10 e 15 dias após a alimentação. Estes autores observaram uma redução de 97,5% na quantidade de parasitos encontrados no IMA das ninfas cinco dias após o início da infecção. Outro trabalho utilizando os mesmos organismos (parasito e vetor) mostrou uma redução de 99% na população de parasitos do IMA dos insetos ao longo de 10 dias após a alimentação infectiva (Cortez *et al.*, 2002). Além disso, estudos desenvolvidos com *T. brucei* também sugerem que 99% dos parasitos ingeridos são eliminados na fase inicial do seu desenvolvimento no vetor *Glossina morsitans* (Abbeele *et al*.,1999). Para explicar esta drástica redução na quantidade de parasitos após as primeiras 24 horas da infecção, trabalhamos com três diferentes hipóteses no presente estudo. Na primeira, os parasitos cruzariam rapidamente o IMA, alcançando o IMP onde se diferenciariam como epimastigotas e multiplicariam posteriormente. Neste caso, um número elevado de parasitos deveria ser encontrado no IMP nas primeiras horas após a infecção. Entretanto, a quantificação dos flagelados no IMP não confirmou essa hipótese, uma vez que, independente do tratamento, uma quantidade relativamente pequena de parasitos foi encontrada no IMP em 24 hpi, período onde se observou a redução populacional no IMA (figura 21). O crescimento do número de parasitos somente foi observado após vários dias de infecção, mesmo assim sendo bem inferior daquele ingerido inicialmente. A avaliação pela qPCR no IMP corroborou a ideia de que os parasitos não estariam colonizando rapidamente o IMP e sim reduzindo suas populações no IMA.

Na nossa segunda hipótese, a diminuição do número de parasitos no IMA de *R. prolixus* poderia ser devida a uma adesão dos mesmos no epitélio intestinal do inseto, gerando um viés negativo na contagem dos flagelados pelos métodos de quantificação a fresco. Para testar essa hipótese, uma parte das amostras foi avaliada comparativamente por quantificação

a fresco e por qPCR. O método tradicional de quantificação de parasitos através de microscopia direta é considerado exaustivo, sujeito a erros e com sensibilidade reduzida (Uehara *et al.*, 2012). Por outro lado, a qPCR é tida como uma técnica de amplificação extremamente sensível, uma vez que hipoteticamente poderia detectar uma única molécula de DNA em uma amostra. A multiplicação de uma única cópia de DNA em milhões de cópias permite a detecção e a quantificação de agentes etiológicos antes não detectados pelos métodos parasitológicos tradicionais (Breniere *et al*., 1995; Junqueira *et al*.;1996; Gomes *et al*; 1999). A análise dos dados de IMA mostrou uma gradativa redução no número de parasitos entre 3-96 hpi na contagem a fresco enquanto os valores iniciais foram mantidos durante este período na quantificação pela qPCR. Estes resultados poderiam sugerir uma adesão dos parasitos na parede do IMA a partir do 1º dia de infecção. Entretanto, sabendo-se que o DNA se mantém estável por longos períodos (Breslauer *et al*., 1986; Thompson *et al*., 1993; Stryer, 1996; Clausen-Schaumann *et al.*, 2000), ainda existiria a possibilidade da qPCR detectar DNA de parasitos mortos. Sendo assim, foi montado um ensaio utilizando-se parasitos mortos oferecidos no sangue apresentado no alimentador artificial para determinar se a qPCR poderia detectar o DNA dos parasitos mortos e por quanto tempo o DNA poderia ser detectado nas amostras. Os dados desse ensaio confirmaram a detecção de DNA de parasitos mortos e ainda mostraram uma taxa de recuperação próxima de 80%, bastante superior à observada nos ensaios que utilizaram parasitos vivos no alimentador artificial (próximas de 20%). Os dados de quantificação ao longo do tempo, apesar de variáveis, mostraram claramente que o DNA de parasitos mortos pode ser detectado em até 7 dpi, sugerindo que uma porcentagem significativa do DNA detectado pela qPCR possa ser proveniente de parasitos mortos no IMA. Entretanto, a presença de DNA de *T. cruzi* no IMA em 15 dpi, mesmo que em número reduzido, merece ser estudada mais detalhadamente no futuro. A ausência de adesão dos parasitos foi confirmada através do exame da membrana do IMA em diferentes períodos pós infecção após a lavagem do conteúdo intestinal com solução de PBS. Para confirmação deste dado, novos ensaios serão realizados utilizando-se técnicas de coloração associadas à microscopia.

Uma vez que os nossos dados indicaram que as tripomastigotas provavalmente não cruzam rapidamente o IMA, se diferenciando no IMP, nem ficam aderidas ao epitélio intestinal, a última hipótese seria que a maioria das tripomastigotas que entram no IMA seria eliminada nas primeiras 24 hpi. Turner, Barry e Vickerman (1988) relatam que a maioria das formas sanguíneas de *T. brucei* são rapidamente mortas no intestino médio anterior e posterior

das moscas tse-tse. Para testar essa hipótese, tripomastigotas sanguíneas foram incubadas com diferentes tecidos de *R. prolixus* e soluções de incubação contendo ou não recursos nutricionais (RPMI e PBS, respectivamente) para os parasitos, o que permitiu, no caso da utilização do meio RPMI sem soro, a avaliação do ensaio por um período mais longo. Foram testados separadamente o efeito da adição do IMA de insetos em jejum, suas glândulas salivares e o IMA de insetos recém alimentados. As glândulas salivares foram incluídas no ensaio, uma vez que Amino e colaboradores (2002) identificaram uma molécula formadora de poros na saliva de *T. infestans*, denominada de trialisina, capaz de lisar formas tripomastigotas de *T. cruzi*. Além disso, uma vez que grande parte da saliva dos triatomíneos é ingerida durante a sua alimentação (Ribeiro e Francischetti, 2002; Soares *et al.*, 2006) o IMA de insetos alimentados também foi incluído. Os resultados mostraram que independentemente da presença de recursos nutricionais, houve uma redução significativa no número de parasitos incubados com o intestino de insetos alimentados, o que comprova a hipótese de que as formas tripomastigotas são eliminadas quando entram no IMA do inseto vetor. De acordo com os dados, fatores produzidos tanto na saliva quanto no IMA têm um papel importante na eliminação do parasito nas primeiras horas após a infecção. A presença de nutrientes disponíveis para o parasito parece reduzir a sua mortalidade, como observado nos ensaios onde o meio RPMI sem soro foi utilizado. Estudos adicionais serão necessários para o entendimento dos mecanismos de eliminação do parasito, sendo que alguns possíveis agentes já foram descritos na literatura. Uma vez no IMA do triatomíneo, o *T. cruzi* se depara com componentes tais como enzimas digestivas, hemolisinas e aglutininas (Schaub, 2009; Terra e Ferreira, 2004; Kollien *et al.*, 2004). Os fatores hemolíticos presentes no IMA dos triatomíneos além de lisarem os eritrócitos para a liberação da hemoglobina para sua digestão no IMP, podem também afetar as populações de *T. cruzi*, dependendo da cepa avaliada (Azambuja *et al.*, 2005). Além disso, algumas moléculas, tais como os fatores líticos do estômago (Azambuja *et al.*, 1983, 1989), as lectinas (Pereira *et al.*, 1981; Mello *et al*., 1996) e os fragmentos de hemoglobina (Garcia *et al.*, 1995) também parecem estar envolvidas no estabelecimento da infecção do vetor pelo *T. cruzi*. Estudos sugerem que a presença de lectinas com diferentes atividades no intestino de *R. prolixus* e suas reações seletivas com *T. cruzi* poderiam representar um papel regulatório nas interações entre o parasito e o vetor durante seu ciclo de vida (Pereira *et al.*, 1981).

Um outro ponto relevante no desenvolvimento do *T. cruzi*, é sua interação com os simbiontes intestinais dos triatomíneos. Eicher e Schaub (2002) observaram um aumento de

quase 80 vezes no tamanho das populações de simbiontes *Rhodococcus rhodnii* e *Nocardia* sp. nas regiões anteriores do trato intestinal das ninfas de quinto estádio de *R. prolixus* e *T. infestans*, respectivamente, após o repasto sanguíneo, sendo estas porções do intestino os locais onde os simbiontes são encontrados em maior número. Uma vez que o *T. cruzi* compartilha o microambiente do tubo digestivo do triatomíneo com os simbiontes, vários trabalhos tentaram avaliar se o desenvolvimento de um poderia afetar o crescimento do outro. Wigglesworth (1936) demonstrou que um dos simbiontes de *R. prolixus*, o *Rhodococcus rhodnii*, se desenvolve principalmente no IMA do triatomíneo, e que se multiplica após o repasto sanguíneo. Muhlpfordt (1959), estudando a influência de *Nocardia rhodnii* no desenvolvimento e diferenciação do flagelado em *R. prolixus*, mostrou que o parasito se multiplica mais intensamente na ausência dos simbiontes. Azambuja e colaboradores (2004) relataram que *Serratia marcescens* produz prodigiosina, pigmento que seria responsável pela atividade tripanolítica observada no estômago de *R. prolixus* após a alimentação infectiva com a cepa Y de *T. cruzi*. Nossos dados poderiam sugerir que como grande parte da população de *T. cruzi* é eliminada do IMA do inseto nas primeiras 24 horas após a infecção seria improvável que um número reduzido de flagelados pudesse interferir no desenvolvimento dos simbiontes nessa porção do intestino. Eicher e Schaub (2002) observaram que as concentrações do simbionte *R. rhodnii* não foram alteradas pela infecção pelo *T. cruzi*, contudo não avaliam se a presença dos simbiontes afeta a população do parasito. Dessa forma, a diminuição na população de parasitos poderia, pelo menos em parte, estar relacionada com a presença dos simbiontes no IMA do inseto, e diante dessa possibilidade, seria interessante estudos posteriores que avaliem essa relação mais detalhadamente.

Em conclusão, a partir dos dados obtidos no presente estudo, propomos dois mecanismos diferentes de colonização do IMA para *T. rangeli* e *T. cruzi*. No caso do *T. rangeli*, as formas tripomastigotas entrariam no IMA e já nas primeiras horas de infecção se diferenciariam para formas epimastigotas multiplicativas, que gradativamente deixariam o IMA e colonizariam o restante do trato intestinal, hemolinfa e glândulas salivares do inseto. A diferenciação do parasito e a multiplicação das formas epimastigotas ainda no IMA poderiam estar relacionadas a uma rápida diferenciação tripo-epimastigota, associada a uma resistência do parasito frente aos fatores líticos (sugerido a partir da ausência de mortalidade observada no presente estudo). Além disso, a redução na atividade de fatores da resposta imunológica do inseto promovida pela presença do parasito no IMA (Gomes *et al*., 2003; Garcia *et al*., 2004;

Whitten *et al*., 2007) poderia contribuir para a manutenção das populações nesta porção do intestino.

Já no caso do *T. cruzi*, fatores pré-existentes no IMA (sugeridos a partir dos resultados obtidos nos ensaios *in vitro* do presente estudo) seriam responsáveis por uma relevante redução da população de tripomastigotas nesta porção do intestino no início da infecção. A indução de diferentes fatores da resposta imunológica do inseto também no início da infecção (Whitten *et al*., 2007; Ursic-Bedoya *et al.*, 2008), que também ocorre como forma de controle do crescimento das populações de simbiontes (Garcia *et al*., 2010), contribuiriam igualmente para que o IMA se tornasse um ambiente inóspito para o *T. cruzi*. A solução encontrada pelo parasito seria o escape de uma fração minoritária das tripomastigotas para o IMP, onde os fatores de lise encontrados no IMA provavelmente estariam ausentes, possibilitando a sua diferenciação para a forma epimastigota. Alternativamente, as formas tripomastigotas ainda no IMA poderiam rapidamente se diferenciar em formas intermediárias, mais resistentes ao estresse fisiológico. Estas formas, então, alcançariam o IMP e se diferenciariam nas formas epimastigotas, responsáveis pela colonização do trato intestinal. As respostas antimicrobianas, reduzidas no IMP (Castro *et al.*, 2012) em consequência do menor número de simbiontes (Eicher e Schaub, 2002) permitiriam a multiplicação dos parasitos e o estabelecimento da infecção.

7 CONCLUSÕES

- As taxas iniciais de recuperação de *T. rangeli* no intestino médio anterior dos insetos foram semelhantes independentemente da forma de desenvolvimento utilizada, o que sugere que as duas formas do parasito são capazes de iniciar a infecção do vetor.

- Os dados parecem indicar que a dinâmica de colonização do intestino médio anterior dos insetos por *T. rangeli* varia dependendo da forma de desenvolvimento do parasito utilizada. Novos experimentos deverão avaliar o assunto de maneira mais detalhada.

- O perfil temporal da proporção de formas de desenvolvimento sugere que a diferenciação do *T. rangeli* acontece no intestino médio anterior do inseto.

- De maneira semelhante ao observado com *T. rangeli*, as taxas iniciais de recuperação de *T. cruzi* no intestino médio anterior dos insetos foram semelhantes independentemente da fase de desenvolvimento utilizada.

- Apesar disso, as duas formas do parasito não parecem ter a mesma efetividade para iniciar a infecção do vetor já que as epimastigotas detectadas inicialmente sofreram uma redução de apenas 13% após 24h de infecção, enquanto as tripomastigotas mostraram uma redução de 82% nesse mesmo período.

- De maneira diferente ao definido para *T. rangeli*, o perfil temporal observado para a proporção de formas de desenvolvimento sugere que a diferenciação do *T. cruzi* acontece no intestino médio posterior do inseto.

- Os dados obtidos nos experimentos *in vitro* sugerem que existam fatores produzidos pelos insetos, e presentes no intestino médio anterior após a sua alimentação, que induzem alta mortalidade parasitária.

- Esta mortalidade é consistente com a observada nos ensaios *in vivo* durante a fase inicial da infecção com tripomastigotas sanguíneas.

- O baixo número de parasitos inicialmente detectado no intestino médio posterior e a falta de evidências da sua adesão no epitélio do intestino médio anterior de *R. prolixus* sugerem que a maioria dos *T. cruzi* ingeridos é eliminada no intestino médio anterior do inseto e que a colonização do intestino médio posterior acontece a partir de poucos indivíduos que conseguem atravessar o intestino médio anterior.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbeele JVD, Claes Y, Bockstaele DV, Ray DL e Coosemans M 1999 *Trypanosoma brucei* spp. development in the tsetse fly: characterization of the post-mesocyclic stages in the foregut and proboscis. *Parasitology*, 118:469-478.

Afchain D, Leray D, Fruit J, Capron A 1979 Antigenic make-up of *Trypanosoma cruzi* culture forms: Identification of a specific component. *Journal of Parasitology,* 65: 507-514.

Almeida GC, Montagner F., Endo MS e Gomes BPFA 2009 Detecção da degradação do DNA genômico extraído através da espectofotometria e da reação de PCR. 7ª mostra acadêmica Unimep.

Alvarenga NJ 1979 Development of *Trypanosoma cruzi* in the vector. *Congresso Internacional sobre Doença de Chagas*, Rio de Janeiro, p. E3-E5.

Alvarenga NJ, Bronfen E 1997 Metaciclogênese do *Trypanosoma cruzi* como parâmetro de interação do parasita com o triatomíneo vetor. *Rev Soc Bras Med Trop* 30(3):247-250.

Alves CR, Albuquerque-Cunha JM, Mello CB, Garcia ES, Nogueira NF, Bourguingnon SC, Souza W, Azambuja P, Gonzalez MS 2007 *Trypanosoma cruzi*: Attachment to perimicrovillar membrane glycoproteins of *Rhodnius prolixus*. *Exp. Parasitol*., 116, 44-52.

Amino R, Martins RM, Procopio J, Hirata IY, Juliano MA e Schenkman S 2002 Trialysin, a novel pore-forming protein from saliva of hematophagous insects activated by limited proteolysis. *J. Biol. Chem*., 277, 6207-6213.

Añez N 1981a Studies o *Trypansoma rangeli* Tejera, 1920. I. - Deposition, migration and growth of *T. rangeli* in two mammals. *Parasitological Topics* sp. publi. Nº I: 19-25. *Soc. Protozool. Allen Press*. Kansas.

Añez N 1983 Studies on *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920: V - Developmental pattern in the alimentary canal of *Rhodnius prolixus*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz,* Rio de Janeiro,78(2):183-191.

Añez N 1983 Studies on *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920: VI - Developmental pattern in the hemolynph of *Rhodnius prolixus*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz,* Rio de Janeiro,78(2):413-419.

Añez N e East JS 1984 Studies in *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920.II. Its effects on the feeding behavior in triatomine bugs. *Acta Trop,* 41:93–95.

Araújo CAC, Cabello PH, Jansen AM 2007 Growth behaviour of two *Trypanosomacruzi* strains in single and mixed infections: in vitro and in the intestinal tract of the blood-sucking bug, *Triatoma brasiliensis. Acta Trop.,* 101,225–231.

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

Asin S e Catala S 1995 Development of *Trypanosoma cruzi* in *Triatoma infestans:* influence of temperature and blood consumption. *J. Parasitol,* 81, 1–7.

Atwood JA, Weatherly DB, Minning TA, Bundy B, Cavola C, Opperdoes FR, Orlando R, Tarleton RL 2005 The *Trypanosoma cruzi* proteome. *Science,* 309: 473-476.

Ayala FM 1964 Presencia de un hemoflagelado semejante al *Trypanosoma rangeli* Tejera 1920, em El mono *Saimiri boliviensis* em La región amazônica, Peru. *Rev. Inst. Med. Trop*. S. Paulo, 6 47.

Azambuja P e Garcia ES 2005 *Trypanosoma rangeli* interactions within the vector*Rhodnius prolixus* - A mini review. *Mem Inst Oswaldo Cruz,* Rio de Janeiro, *100*(5): 567-572.

Azambuja P, de Mello CB e Garcia ES 1989a Immunity of *Rhodnius prolixus*. Inducible peptides active against bacteria and trypanosomes. Host regulated developmental mechanisms in vector arthropods: *Proceedings of the Second Symposium,* Vero Beach, Florida, February 13-16, 1989: 270-276.

Azambuja P, Feder D, Garcia ES 2004 Isolation of Iin the midgut of *Rhodnius prolixus*: impact on the establishment of the parasite in the vector. *Exp Parasitol,* 107: 89–96.

Azambuja P, Guimaraes JA, Garcia ES 1983 Haemolytic factor from the crop of *Rhodnius prolixus*: evidence and partial characterization. *J. Insect Physiol*., 29:833-37.

Azambuja P, Mello CB e Garcia ES 1999 Immunity in *Rhodnius prolixus*: trypanosomatid-vector interactions**.** *Mem. Inst. Oswaldo Cruz,* 94(1):219-222.

Azambuja P, Mello D'Escoffier LN, Garcia ES 1989b *In vitro* cytotoxic effect of *Rhodnius prolixus* hemolytic factor and mellitin on different trypanosomatids. *Brazilian Journal of Biological Research* 22, 597–599.

Azambuja P, Ratcliffe NA e Garcia ES 2005 Towards an understanding of the interactions of*Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* within the reduviid insect host *Rhodnius prolixus*. *An Acad Bras Cienc,* 77(3): 397-404.

Baernstein H D e Tobie E J 1951 *Fed. Am. Soc. Exp. Biol*., 10:159.

Barbosa PRB 2006 The oral transmission of Chagas' disease: an acute form of infection responsible for regional outbreaks. *International Journal of Cardiology,* 112: 132-133.

Barreto MP 1979 Epidemiologia En: *trypanosoma cruzi* doença de Chagas. Brener e Andrade (Eds.) Brasil, Guanabara Koogan, 89-151.

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

Barrett F M 1982 Absorption of fluid from the anterior midgut of *Rhodnius. J. Insect Physiol*., 28:335-41.

Barretto MP 1967 Estudos sobre reservatórios e vetores naturais do *Trypanosoma cruzi*. XVII. Contribuição para o estudo dos focos naturais da Tripanosomose Americana, com especial referência à região nordeste do Estado de São Paulo, Brasil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 1: 23-35.*

Benitez-Hernandez I, Mendez-Enriquez E, Ostoa P, Fortoul T, Ramirez JA, Stempin C, Cerban F, Soldevila G e Garcia-Zepeda EA 2010 Proteolytic cleavage of chemokines by *Trypanosoma cruzi*'s cruzipain inhibits chemokine functions by promoting the generation of antagonists. *Immunobiology,* 215:413-426.

Ben-Yakir D 1987 Growth retardiation of *Rhodnius prolixus* symbionts by immunizing host agains *Nocardia* (Rhodococcus) *rhodnii*. *J Insect Physiol,* 33:379-383.

Bice DE e Ze1edón R 1970 Comparison of infective of strain of *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909). *J. Parasitol.,* 56(4):633-670.

Bonaldo MC, Souto-Padron T, de Souza W, Goldenberg S 1988 Cell-substrate adhesion during *Trypanosoma cruzi* differentiation. *Journal of Cell Biology,* 106, 349–1358.

Borges EC, Machado EM, Garcia ES, Azambuja P 2006 *Trypanosoma cruzi*: effects of infection on cathepsin D activity in themidgut of *Rhodnius prolixus*. *Experimental Parasitology,* 112, 130–133.

Borges-Pereira J, Pessoa I, Coura JR 1988 Observações sobre as dejeções e o número de *T. cruzi* eliminados por diferentes espécies de triatomíneos durante a alimentação. *Mem Inst Oswaldo Cruz,* 83 (Suppl. I):7.

Botto-Mahan C 2009 *Trypanosoma cruzi* Induces Life-History Trait Changes in the Wild Kissing Bug *Mepraia spinolai*: Implications for Parasite Transmission. *Vector-Borne and Zoonotc Diseases* 9(5):505-510.

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

Brener Z 1962 Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi. Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo* 4, 389–396.

Brener Z 1973 Biology of *Trypanosoma cruzi. Annu. Rev. Microbiol*. 27, 347-382.

Brener Z e Gazzinelli RT 1997 Immunological control of *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas' disease. *International Archives of Allergy and Applied Immunology*, 114, 103-110.

Brener Z, Andrade ZA, Barral-Neto M 2000 *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. 2ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.55-56.

Breniere SF, Bosseno MF, Telleria J *et al*. 1995 Field amplification of polymerase chain reaction diagnosis and strain typing of *Trypanosoma cruzi* in bolivian triatomines. *Am. J. Trop. Med. Hyg*. 53:179-184.

Brenner RIL e Stoka IM 1988 *Chagas Disease Vectors.* Boca Raton: CRC Press, vols. 1-3.

Breslauer KJ, Frank R, Blocker H e Marky LA 1986. Predicting DNA duplex stability from the base sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci.*USA. 83:3746 –3750.

Bruce D, Harvey D, Hamerton AE, Davey JB e Lady B 1912 The morphology of the trypanosome causing disease in man in Nyasaland. *Proc. R. Soc*., 85, 423-433.

Buarque DS, Braz GRC, Martins RM, Tanaka-Azevedo AM, Gomes CM, Oliveira FAA, Shenkman S, Tanaka AS 2013 Differential Expression Profiles in the Midgut of *Triatoma infestans* Infected with *Trypanosoma cruzi. Plos One*, 8(5):61203.

Cabral MM, Azambuja P, Gottlieb OR, Kleffmann T, Garcia ES, Schaub GA 2001 Burchellin: effects on *Triatoma infestans* and on *Trypanosoma cruzi* within this vector. *Parasitol Res,*. 87(9):730-5.

Canese A 1964 Triatomíneos con *Trypanosoma cruzi* Chagas 1909, y *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920, en el distrito de Villeta (Paraguay). Hallazgos de hemolinfas positivas. *Rev. Méd*. Paraguay, 6:135.

Carlier Y, Torrico F, Sosa-Estnai S, Russomando G, Luquetti A, Frelij H, Albajar Vinas P 2011 Congenital chagas disease: recommendations for diagnosis, treatment and control of newborns, siblings and pregnant women. *Plos Neglected Tropical Disease,* 5:e1250.

Carvalheiro J R e Collares E F 1965 Estudos sobre o comportamento, em camundongos, de uma amostra altamente virulenta de *T. cruzi* (amostra Y), após passagens em triatomíneos, ratos e culturas. *Rev. Brasil. Biol*., 25:169:175.

Carvalho-Moreira C J, Spata MCD, CouraJR, Garcia ES, Azambuja P, Gonzalez MS e Mello CB 2003 *In vivo* and *in vitro* metacyclogenesis tests of two strains of *Trypanosoma cruzi* in the triatomine vectors *Triatoma pseudomaculata* and *Rhodnius neglectus*: short, long-term and comparative study. *Experimental Parasitology*, 103, 102–111.

Castro DP, Moraes CS, Gonzalez MS, Ratcliffe NA, Azambuja P, Garcia ES 2012 *Trypanosoma cruzi* immune response modulation decreases microbiota in *Rhodnius prolixus* gut and is crucial for parasite survival and development. *PloS One*, 7:5e365912012.

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

Chagas C 1912 Sobre um trypanosomo do tatú, *Tatusia novemcincta*, transmittido pela *Triatoma geniculata* Latr. (1811). Possibilidade de ser o tatú um depositario do *Trypanosoma Cruzi* no mundo exterior. *Brazil-Med,* I: 305-306.

Chagas C 1913 Revisão do cyclo evolutivo do "*Trypanosoma Cruzi*". *Brazil-Med*, 27: 225.

Chagas C 1916a Processos patojênicos da tripanozomiase americana. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 8: 5-35.

Chagas C 1916b Trypanosomiase americana. Forma aguda da moléstia. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 8: 37-65.

Chagas C 1924 Sobre a verificação do "*Trypanosoma cruzi*" em macacos do Pará (*Chrysothrix sciureus*). *Scien Med*, 2: 75-76.

Chagas C e Villela E 1922 Forma cardíaca da tripanossomíase americana. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 14: 5-61.

Chiari E 1971 Crescimento, diferenciação e infectividade de formas de cultura do Trypanosoma cruzi mantidas em laboratório por diferentes períodos. Thesis. Univ. Fed. Minas Gerais. 72 pp.

Chiari E 1974 Infectivity of *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigotes from culture kept in laboratory for different periods of time. *Revista do Instituto de Medicina Tropical* São Paulo, 16, 61–67.

Chuenkova MV e Pereira 2000 A Trypanosomal Proteub Synergizes with the Cytokines Ciliary Neurotrophic Factor and Leukemia Inhibitory Factor to Prevent Apoptosis pf Neuronal Cells *Mol Biol Cell*, 11(4): 1487-1498.

Clausen-Schaumann H, Rief M, Tolksdorf C e Gaub HE 2000 Mechanical Stability of Single DNA Molecules *Biophysical Journal,* 78:1997-2007.

Contreras VT, Salles JM, Thomas N, Morel CM, Goldenberg S 1985 *In vitro* differentiation of *Trypanosoma cruzi* under chemically defined conditions. *Mol Biochem Parasitol,* 16: 315–327.

Cordero EM, Gentil LG, Crisante G, Ramirez JL, Yoshida N, Anez N, da Silveira JF 2008 Expression of GP82 and GP90 surface glycoprotein genes of *Trypanosomacruzi* during *in vivo* metacyclogenesis in the insect vector *Rhodnius prolixus Acta Tropica,* .105(1):87-91.

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

Cortez MR, Provençano A, Silva CE, Mello CB, Zimmermann LT, Schaub GA, Garcia ES, Azambuja P, Gonzalez MS 2012 *Trypanosoma cruzi*: Effects of azadirachtin and ecdysone on the dynamicdevelopment in *Rhodnius prolixus* larvae. *Experimental Parasitology,* 131:363-371.

Costa VM, Torres KC, Mendonça RZ, Gresser I, Gollob KJ, Abrahamsohn IA 2006 Type I IFNs stimulate nitric oxide production and resistance to *Trypanosoma cruzi* infection. *J Immunol,* 177(5):3193-3200.

Coura JR 2007 Chagas disease: What is know and what is needed – A background article. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz,* 102, 113–122.

Coura JR e Dias JC 2009 Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease: 100 years after its discovery. *Mem Inst Oswaldo Cruz,* 104: Suppl 131–40.

Coutinho JO e Nussenzweig V 1952 Infecção experimental de triatomíneos pelo *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920. *Folia Cim. Biol*. São Paulo, 18, 181-188.

Cuba CA 1975 Estudo de uma cepa peruana de *Trypanosoma rangeli*. VI. Observações sobre sua evolução e morfogênese na hemocele e nas glândulas salivares de *Rhodnius ecuatoriensis*. *Rev Inst Med Trop São Paulo,* 17: 283-297.

Cuba-Cuba C 1998 Review of the biologic and diagnostic aspects of *Trypanosoma (Herpetosoma) rangeli*. *Rev. Soc. Brás. Med. Trop*., 31(2):207-220.

Cummings KL e Tarleton RL 2003 Rapid quantitation of *Trypanosoma cruzi* in host tissue by real-time PCR. *Molecular and Biochemical Parasitology,* 129, 53–59.

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

D'Alessandro A e Mandel S 1969 Natural infections and behaviour of *Trypanosoma rangeli* and *Trypanosoma cruzi* in the vector *Rhodnius prolixus* in Colombia. *J. Parasitol,* 54: 846-852.

D'Alessandro-Bacigalupo A e Saraiva NG 1992. *Trypanosoma rangeli*. In: Kreir, J.P. e Baker, J. (eds.) *Parasitic Protozoa*. vol. 2, *Academic Press*, London, p. 1-54.

D'Avila-Levy CM, Araujo FM, Vermelho AB, Soares RM, Santos AL, *et al*. 2005 Proteolytic expression in Blastocrithidia culicis: influence of the endosymbiontand similarities with virulence factors of pathogenic trypanosomatids. *Parasitol* 130: 413–420.

D'Alessandro A 1963 The life cycle of *Trypanosoma rangeli* in triatomid bugs as it occurs in nature. *Bull. Tulane Univ. Med. Fac*., 23:21-30.

D'Alessandro A 1972 New experimental vectors of Colombian *Trypanosoma rangeli*. *J Med Entomol* ,9: 187-195.

D'Alessandro A e Saravia NG 1992 *Trypanosoma rangeli*. InJP Kreier, JP Barker (eds),Parasitic Protozoa, 2nd ed., *Academic Press Inc*., San Diego, p. 1-54.

D'Avila-Levy CM, Marinho FA, Santos LO, Martins JL, Santos ALS, Branquinha MH 2006 Antileishmanial activity of MDL 28170, a potent calpain inhibitor. *Int J Antimicrob Agents*, 28:138–142

de León JR 1946 Contribución al estúdio de La Enfermedad de Chagas en Guatemala. Trab presentado I *Congreso Inter Med*. Poligrafiado 10.

de León JR 1949 *Trypanosoma rangeli* observado en seres humanos en Guatemala. Instituto de Investigaciones Científicas, Universidad de San Carlos, Guatemala, 3: 32.

Dias E 1934 Estudos sobre o *Schizotrypanum cruzi. Mem Inst Oswaldo Cruz,* 28: 1-110.

Dias E 1940 Técnica do xenodiagnóstico na moléstia de Chagas. *Mem Inst Oswaldo Cruz,* 35: 335-342.

Dias E 1940 Xenodiagnósticos seriados em cães infectados com amostras venezuelanas de *Schizotrypanum cruzi. Bras Med,* 54: 859-861.

Dias JCP 2002 Controle da doença de Chagas no Brasil. *In* Controle da Doença de Chagas nos Países do Cone Sul da América (Silveira, A. C., ed.), *Pan American Health Organization,* 145–239.

Dias JCP 2006 Notas sobre o *Trypanosoma cruzi* e suas características bio-ecológicas, como agente de enfermidades transmitidas por alimentos. *Rev Soc Bras Med Trop,* 39: 370-375.

Edwards JS 1998 Sir Vincent Wigglesworth and the coming of age of insect development. *The International Journal of Developmental Biology* 42: 471-473.

Eger-Mangrich I, Oliveira MA, Grisard EC, Souza W, Steindel M 2001. Interaction of *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920 with different cell lines in vitro. *Parasitol Res,* 87: 505-509.

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

Eichler S e Schaub GA 2002 Development of symbionts in Triatomine bugs and the effects of infections with trypanosomatids. *Exp. Parasitol,*. 100, 17-27.

El-Sayed NM, Myler PJ, Bartholomeu DC, Nilsson D, Aggarwal G, Tran AN, Ghedin E, Worthey EA, Delcher AL, Blandin G, Wiesenberger SJ, Caler E, Cerqueira GC, Branche C, Haas B, Anupama A, Arner E, Aslund L, Attipoe P, Bontempi E, Bringaud F, Burton P, Cadag E, Campbell DA, Carrington M, Crabtree J, Durban H, da Silveira JF, de Jong P, Edwards K, Englund PT, Fazelina G, Feldblyum T, Ferella M, Frasch AC, Gull K, Horn D,

Hou L, Huang Y, Kindlund E, Klingbeil M, Kluge S, Koo H, Lacerda D, Levin MJ, Lorenzi H, Louie T, Machado CR, McCulloch R, McKenna A, Mizuno Y, Mottram JC, Nelson S, Ochaya S, Osoegawa K, Pai G, Parsons M, Pentony M, Pettersson U, Pop M, Ramirez JL, Rinta J, Robertson L, Salzberg SL, Sanchez DO, Seyler A, Sharma R, Shetty J, Simpson AJ, Sisk E, Tammi MT, Tarleton R, Teixeira S, Van Aken S, Vogt C, Ward PN, Wickstead B, Wortman J, White O, Fraser CM, Stuart KD, Andersson B 2005a. The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. *Science* 309: 409-415.

Ennes-Vidal V, Menna-Barreto RF, Santos ALS, Branquinha MH, d'Avila-Levy CM 2011 MDL28170, a calpain inhibitor,affects *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis, ultrastructureand attachment to *Rhodnius prolixus* midgut. *PLoS One* 6:e18371.

Fellet MRB 2014 O efeito dos parasites Trypanosoma cruzi e Trypanosoma rangeli no fitness de Rhodnius prolixus. Centro de Pesquisas René Rachou (Fiocruz Minas). *Tese de Doutorado*. 130 p.

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

Folly E, Dutra PML, Lopes AHCS, Oliveira HM, Atella GC 1999 *Trypanosoma cruzi* incorporates phospholipids from *Rhodnius prolixus* midgut. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz,* 94, suppl. II, 55.

Forattini O 1980 Biogeografia, origem e distribuição da domiciliação de triatomíneos no Brasil. *Revista de Saúde Pública de São Paulo*, 14: 265-299.

Fraidenraich D, Peña C, Isola EL, Lammel EM, Coso O, *et al*. 1993 Stimulation of *Trypanosoma cruzi* adenylyl cyclase by an α^{D}-globin fragment from *Triatom*a hindgut: effect on differentiation of epimastigote o trypomastigote. *Proc Natl Acad Sci* U S A 90: 10140–10144.

Friend WG e Smith JJ 1971 Feeding in *Rhodnius prolixus*: mouthpart activity and salivation, and their correlation with changes of electrical resistance. *J Insect Physiol*, 17, 233-243.

Friend WG e Smith JJ 1985 La fisiología de los triatominos con especial referencia a la alimentación por sangre. Em: Factores Biológicos y Ecológicos en la Enfermedad de Chagas, *Organización Panamericana de Salud*, Buenos Aires, p. 59-72.

Garcia ES 1987 The digestion of Triatominae. Em: Brenner RR e Stoka A (Eds), Chagas' Disease Vector II. *Anatomic and Physiological Aspects*, Vol. II, CRC Press, Florida, p. 47–59.

Garcia ES 1987 The digestion of Triatominae. I n Chagas' Disease Vectors, ed. Brenner RR e Stoka AM, 2:47-58. *Cleveland: CRC Press*

Garcia ES e Azambuja P 1991 Development and interactions of *Trypanosoma cruzi* within the insect vector. *Parasitol. Today*, 7, 240-244.

Garcia ES e Dvorak JA 1982 Growth and development of two *Trypanosoma cruzi* clones in the arthropod *Dipetalogaster maximus*. *Am J Trop Med Hyg 31*: 259-262.

Garcia ES e Gilliam FC 1980 *Trypanosoma cruzi* Development is Independent of Protein Digestion in the Gut of *Rhodnius prolixus*. *The Journal of Parasitology*, 66(6):1052-1053.

Garcia ES e Gilliam FC 1980 *Trypanosoma cruzi* development is independent of protein digestion in the gut of *Rhodnius prolixus. J Parasitol* 66: 1052-1053.

Garcia ES, Azambuja P e Contreras VT 1984a Large-scale rearing of *Rhodnius prolixus* and preparation of metacyclic trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. Em: Morel, CM, ed., Genes e Antigenes of Parasites. A Laboratory Manual, pp 43-46, 2nd edition. Proceeding of an international course sponsored by UNDP/World Bank/WHO, FINEP, CNPq and FIOCRUZ. Fundação Oswaldo Cruz, RJ, Brasil, pp XX + 580.

Garcia ES, Castro DP, Figueiredo MB e Azambuja P 2012 Parasite-mediated interactions within the insectvector: *Trypanosoma rangeli* strategies. *Parasites & Vectors*, 5:105.

Garcia ES, Genta FA, Azambuja P, Schaub GA 2010 Interactions between intestinal compounds of triatomines and *Trypanosoma cruzi*. *Trends in Parasitology* 26, 499–505.

Garcia ES, Machado EMM, Azambuja P 2004 Inhibition of hemocyte microaggregation reactions in *Rhodnius prolixus* larvae orally infected with *Trypanosoma rangeli*. *Experimental Parasitology*, 107: 31-38.

Garcia ES, Mello CB, Azambuja P, Ribeiro JMC 1994. *Rhodnius prolixus* salivary anti-hemostatic components decrease with *Trypanosoma rangeli* infection. *Experimental Parasitology* 78: 287-293.

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

Gazzinelli RT, Oswald IP, Hieny S, James SL e Sher A 1992 The microbicidal activity of IFN-γ-treated macrophages against *Trypanosoma cruzi* involves an L-arginine-dependent, nitrogen oxide-mediated mechanism inhibitableby IL-10 and TGF-β. *European Journal of Immunology,* 22:2501-2506.

Golgher D e Gazzinelli RT 2004 Innate and acquired immunity in the pathogenesis of Chagas disease. *Autoimmunity,* 37, 399-409.

Golgher DB, Colli W, Souto-Padron T, Zingales B 1993 Galactofuranose-containing glycoconjugates of epimastigote and trypomastigote forms of *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasit.* 60, 249–264.

Gomes AS, Graciano G, Nogueira NFS, de Souza W, Garcia ES, Azambuja P 2002 Effects of gamma irradiation on the development of *Trypanosoma rangeli* in the vector *Rhodnius prolixus. J Invertebr Pathol*, 79:86–92.

Gomes M, Galvao L, Macedo A, Pena S e Chiari E 1999 Chagas' disease dignosis comparasite analysis of parasitologic, molecular and serologic methods. *Am J Trop Med Hyg,* 60(2):205-210.

Gomes SAO, Feder D, Garcia ES e Azambuja P 2003 Suppression of the prophenoloxidase system in *Rhodnius prolixus* orally infected with *Trypanosoma rangeli*. *Journal of Insect Physiology,* 49: 829-837.

Gomes SAO, Feder D, Thomas NES, Garcia ES e Azambuja P. 1999 *Rhodnius prolixus* infected with *Trypanosoma rangeli*: in vivo and in vitro experiments. *Journal of Invertebrate Pathology*, 73: 289-293..

Gonzalez M, Silva LCF, Albuquerque-Cunha LM, Nogueira NFS, Mattos DP, Castro DP, Azambuja P e Garcia ES 2011 Involvement of sulfated glycosaminoglycans on the development and attachment of *Trypanosoma cruzi* to theluminal midgut surface in the vector, *Rhodnius prolixus. Parasitology*, 138:1870-1877.

Gonzalez MS, Hamedi A, Albuquerque-Cunha JM, Nogueira NF,De Souza W, Ratcliffe NA, Azambuja P, Garcia ES e Mello CB 2006 Antiserum against perimicrovillar membranes and midguttissue reduces the development of *Trypanosoma cruzi* in the insectvector, *Rhodnius prolixus*. *Experimental parasitology*, 114:297–304.

Gonzalez MS, Silva LF, Albuquerque-Cunha JM, Nogueira NDS, Mattos DP, Castro DP, Azambuja P e Garcia EL 2011 Involvement of sulfated glycosaminoglycans on the development and attachment of *Trypanosoma cruzi* to the luminal midgut surface in the vector, *Rhodnius prolixus*.*Parasitology* , 138, 1870–1877.

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

Grewal MS 1956 *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920, in its vertebrate and invertebrate hosts *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg*., 50:301–302.

Grewal MS 1957 Pathogenicity of *Trypanosome rangeli* Tejera, 1920 in the invertebrate host. *Exp Parasitol*, 6: 123-130.

Grisard EC, Campbell DA, Romanha AJ 1999a Miniexon-gen sequence polymorphism among *Trypanosoma rangeli* strains isolated from distinct geographical regions. *Parasitol*., 118:375-382,

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

Groot H 1951 Nuevo foco de Trypanosomiasis humana em Colombia. *Ar. Soc. Biol. Bogotá*, 4(6):220-221

Groot H 1952 Further observations on *Trypanosoma ariarii* of Colombia, South America. *Amer. Jour. trop. Med. E Hyg.* 1(4):585-592.

Groot H 1953 Comportamiento del *Trypanosoma ariarii* em el *Rhodnius prolixus*. II. Localización en las glândulas salivares. *Mem. Iº Congr. Interamer. Hig. La Habana*, p 729-734.

Groot H 1953 Comportamiento del *Trypanosoma ariarii* en el *Rhodnius prolixus* IV. Su transmisión por médio de la picadura. *Mem. Iº Congr. Interamer. Hig. La Habana*, p. 746-756.

Groot H 1954 Estudios sobre los trypanosomas humanos clasificados como *T. rangeli*, com especial referencia a su evolución em *Rhodnius prolixus* y su comparación com *T. ariarii. Ann. Soc. Biol. Bogotá, 6:* 109–126.

Groot H e Sanmartin C 1953 Comportamiento del *Trypanosoma ariarii* en el *Rhodnius prolixus* III. Nota preliminar sobre su aspecto morfológico en la hemolinfa y en las glândulas salivares. Mem. Iº Congr. Interamer. Hig. La Habana, p. 734.745.

Groot H, Renjifo S, Uribe C 1951 *Trypanosoma ariarii*, n. sp., from man, found in Colombia. *Am J Trop Med, 31*: 673-691.

Guhl F e Marinkelle CJ 1982 Antibodies against *Trypanosoma cruzi* in mice infected with *T. rangeli*. *Ann Trop. Med. Parasitol*., 76(3): 361.

Guhl F e Vallejo GA 2003 *Trypansoma (Herpetosoma) rangeli* Tejera, 1920: na updated review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 98 (4):435-42.

Gurtler RE, Segura EL, Cohen JE 2003 Congenital transmission of *Trypanosoma cruzi* infection in Argentina. *Emerging Infectious Disease*, 9: 29-32.

Harington JS 1960 Studies in *Rhodnius prolixus*: growth and development of normal and sterile bugs, and the symbiotic relationship. *Parasitology,* 50, 279-286.

Hashimoto K e Schofield CJ 2012 Elimination of *Rhodnius prolixus* in Central America. *Parasites & Vectors*, 45: 1-17.

Hecker H, Schwarzenbach M e Rudin W 1990 Development and interations of *Trypanosoma rangeli* in and with the reduviid bug *Rhodnius prolixus. Parasitol. Res*., 76(4): 311-318.

Hellmann K e Hawkins RI 1964 Anticoagulant and Fibrinolytic Activities from *Rhodnius prolixus* Stal. *Nature,* 201, 1008-1009.

Henriques C, Castro DP, Gomes LHF, Garcia ES e Souza W 2012 Bioluminescent imaging of *Trypanosoma cruzi* infection in *Rhodnius prolixus*. *Parasites & Vectors*, 5:214.

Herbig-Sandreuter A 1955 Experimentelle Untersuchungen über den Cyclus von *Trypanosoma rangeli* Tejera 1920 im Warmblüter und in *Rhodnius prolixus*. *Acta Tropica*, 12:261–264.

Hill P, Campbell JA, Petrie IA 1976 *Rhodnius prolixus* and its symbiotic actinomycete. A microbiological, physiological and behavioural study.*Proc. Roy Soc London Ser B* 194:501-525.

Hoare CA 1972 The trypanosomes of mammals. A zoological monograph. Oxford: Blackwell Scintific Publications. p. 1-723, Em: Yaeger RG 1973 The Trypanosomes of Mammals. A Zoological Monograph. *Am J Trop Med Hyg*; 22:683-684.

Isola EL, Lammel EM, Gonzalez Cappa SM 1986 *Trypanosoma cruzi:* differentiation after interaction of epimastigotes and *Triatoma infestans* intestinal homogenate. *Exp Parasito,l* 62: 329–335.

Jadin J 1967 Du role des bacteries dans le tube digestif des insects vecterus des plasmodidae et des trypanosomidade. *Ann. Soc. Belge Med. Trop*., 47, 331-42.

Junqueira AC, Chiari E e Wincker P 1996 Comparison of thepolymerase chain reaction with two classical parasitological methodsfor the diagnosis of Chagas disease in a endemic region of northeastern Brazil. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg*, 90 (2), 129–132.

Kagan IG, Normam L, Allain D 1966 Studies on *Trypanosoma cruzi* isolated in the United States: A Review, *Ver. Biol. Trop*.. 14:55-73.

Klotz SA, Dornc PL, Klotzd JH, Pinnasb JL, Weirauchd C, Kurtzc JR e Schmidte J 2009 Feeding behavior of triatomines from the southwestern United States:An update on potential risk for transmission of Chagas disease. *Acta Tropica* 11: 114–118.

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

Kollien AH e Schaub GA 1999 Development of *Trypanosoma cruzi* after Starvation and Feeding oh the Vector – A review. *Tokai J Exp Clin Med*., 23(6):335-340.

Kollien AH e Schaub GA 2000 The Development of *Trypanosoma cruzi* in Triatominae. *Parasitology Today, 16*(9), 381-387.

Kollien AH, Schmidt J e Schaub GA 1998 Modes of association of *Trypanosoma cruzi* with the intestinal tract of the vector *Triatoma infestans*. *Acta Tropica,* 70:127-141.

Kollien AH, Waniek PJ, Nisbet AJ, Billingsley PF, Schaub GA 2004 Activity and sequence characterization of two eysteine proteases in the digestive tract of the reduviid bug *Triatoma infestans*. *Insect Mol. Biol.,* 13, 569-579.

Kollin AH e Schaub GA 1997 *Trypansoma cruzi* in the rectum of the bug *Triatoma infestans*: effects of blood ingestion of the vector and artificial dieresis. *Parasitol. Res.* 83:781-788.

Krieger MA e Goldenberg S 1998 Representation of differential expression: a new approach to study differential gene expression in trypanosomatids. *Parasitol. Today,* 14, 163–166.

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

Lana M, Pinto AD, Barnabe C, Quesney V, Noel S, Tibayrenc M 1998 *Trypanosoma cruzi*: compared vectorial transmissibility of three major clonal genotypes by *Triatoma infestans*. *Experimental Parasitology,* 90, 20–25.

Lent H e Wygodzinsky P 1979 Revision of the Triatominae (Hemiptera, Reduviidae), and their significance as vectors of Chagas' disease. *Bull Am Nat Hist*, 163: 123-520.

Lombardo ME, Araujo LS, Batlle A 2003 5-Aminolevulinic acid synthesis in epimastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *Int. J. Biochem. Cell Biol*., 35, 1263–1271.

Lombardo ME, Araujo LS, Batlle A 2003 5-Aminolevulinic acid synthesis in epimastigotes of *Trypanosoma cruzi. Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 35, 1263–1271.

Lopez L, Morales G, Ursic R, Wolff M, Lowenberger C 2003 Isolation and characterization of a novel insect defensin from *Rhodnius prolixus*, a vector of Chagas disease. *Insect Biochem Mol Biol*; 33(4):439–47.

Lucena DT e Marques RJ 1954 Primeiro caso de infecção humana por *Trypanosoma rangeli* Tejera 1920, no Brasil. *Rev. Brasil. Med.*,2:535.

Luz E e Borba A M 1968-1969 *An. Fac. Med. Univ. Fed. Parana* 1 1-12:1 47-57.

Maia da Silva F, Junqueira AC, Campaner M, Rodrigues AC, Crisante G; Ramirez LE, Caballero ZC, Monteiro FA, Añez N, Teixeira MM 2007 Comparative phylogeography of *Trypanosoma rangeli* and *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae) supports a long coexistence of parasite lineages and their sympatric vector. *Mol. Ecol*., 16(16):3361-3373.

Maia da Silva F, Rodrigues AC, Campaner M, Takata CS, Brigido MC, Junqueira AC, Coura JR, Takeda GF, Shaw J., Teixeira MM 2004 Randomly amplified polymorphic DNA analysis of *Trypanosoma rangeli* and allied species from human, monkeys and other sylvatic mammals of the Brazilian Amazon disclosed a new group and a species-specific marker. *Parasitology*, 128, 283–294.

Maia da Silva FM, Naiff RD, Marcili A, Gordo M, Neto JAD, Naiff MF, Franco AMR, Campaner M, Valente V, Valente SA, Camargo EP, Teixeira MMG, Miles MA 2008 Infection rates and genotypes of *Trypanosoma rangeli* and *T. cruzi* infecting free-ranging *Saguinus* bicolor (Callitrichidae), a critically endangered primate of the Amazon Rainforest. *Acta Trop*., 107, 168–173.

Marinho CRF, Lima MRD, Grisotto MG e Alvarez JM 1999 Influence of Acute-Phase Parasite Load on Pathology, Parasitism, and Activation of the Immune System at the Late Chronic Phase of Chagas' Disease. *Infect. Immun*., 67(1):308-318.

Marinkelle CJ 1965 Direct transmission of *Trypanosoma cruzi* between individuals of *Rhodnius prolixus.Revista de Biologia Tropical*, 13 (1), 55-58.

McGuire EJ, Habowsky JEJ, Lumb G e Iglesia IA 1973 An experimental approach to the study of drugs in invertebrate systems. I. Mass feeding of *Rhodnius prolixus* Stal (Hemmiptera, Reduviidae). *Can. J. Zool*., 51:315-318.

Medrano-Mercado N, Ugarte-Fernandez R, Butrón V, Uber-Busek S, Guerra HL, Araújo-Jorge TC, Correa-Oliveira R 2008 Urban transmission of Chagas disease in Cochabamba, Bolivia. *Mem Inst Oswaldo Cruz,* 103: 423-430.

Meirelles RM, Henriques-Pons A, Soares MJ e Steindel M 2005 Penetration of the salivary glands of *Rhodnius domesticus* Neiva & Pinto,1923 (Hemiptera: Reduviidae) by *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920(Protozoa: Kinetoplastida). *Parasitol Res*, 97:259-269.

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

Mello CB, Garcia ES, Ratcliffe NA, Azambuja P 1995 *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli*: Interplay with hemolymph components of *Rhodnius prolixus. Jounal of Invertebrate Pathology*65: 261-268.

Mello CB, Gonzalez MS, Ratcliffe NA, Garcia ES, Azambuja P 1995 Development and interactions of *Trypanosoma cruzi* within the insect vector, *Rhodnius prolixus*: involvement of gut molecules. *Mem Inst Oswaldo Cruz,* 90: 27-28.

Mello CB, Nigam Y, Garcia ES, Azambuja P, Newtin RP, Ratcliffe NA 1999 Studies of a hemolymph lectin isolated from *Rhodnius prolixus* and its interaction with *Trypanosoma rangeli*. *Exp Parasitol,* 91: 289-296.

Menezes H 1968 Protective effect of an avirulent (cultived) strain of *Trypanosoma cruzi* against experimental infection in mice. *Rev. Inst. Med. trop.* S. Paulo, 10(1):1-4.

Menezes H 1968 Protective effect of an avirulent (cultived) strain of *Trypanosoma cruzi* against experimental infection in mice. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo,* 10(1):1-4.

Michailowsky V, Silva NM, Rocha CD, Vieira LQ, Lannes-Vieira J, Gazzinelli RT 2001 Pivotal role of interleukin-12 and interferon-gamma axis in controlling tissue parasitism and inflammation in the heart and central nervous system during *Trypanosoma cruzi* infection. *American Journal of Pathology,* 159, 1723-1733.

Miles MA, Arias JR, Valente SAS, de Sousa AA, Pouda MM, Lima JAN e Cedillos, R.A 1983 Vertebrate hosts and vectors of *Trypanosoma rangeli* in the Amazon basin of Brazil. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 32: 1251-1259.

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

Miles MA, Patterson JW, Marsen PD e Minter DM 1975 A comparison or *Rhodnius prolixus*, *Triatoma infestans*, and *Panstrongylus megistus* in the xenodiagnosis of a chronic *Trypanosoma cruzi* infection in a *Rhesus* monkey (*Macaca mulatta*). *Trans. Rpy. Soc. Trop. Med. Hyg*., 69:377-382.

Minning TA, Weatherly DB, Atwood J 3rd, Orlando R, Tarleton RL 2009 The steady-state transcriptome of the four major life-cycle stages of *Trypanosoma cruzi*. *BMC Genomics*, 10: 370.

Minter-Goedbloed E e Oliveira MLS 1975 Growth characteristics of *Trypanosoma rangeli* p89.

Molyneaux D 1973 Division of the human trypanosome, *Trypanosoma* (Herpetosoma) *rangeli*. *Am Trop Med Parasitol*, 67*:* 371-372.

Montero GF 1958 Trypanosomiasis *rangeli* em Costa Rica. In: C*ongresso LatinoAmericano. Congresso Nacional de Microbiologia*, p. 87.

Montero-Gei F, Alvarado-Cerdas E, Chinchila CM, Vargas RA 1961. Hallazgos de tripanosomas de tipo rangeli em marsupialis de Costa Rica. *Prog Gen y Resum. Congresso Latinoamericano. Congresso Nacional de Microbiologia*, p. 129.

Morales L, Tomero I, Diez H, Portillo PD, Montilla M, Nicholls S, Puerta C 2002 Characterization of a candidate *Trypanosoma rangeli* small nucleolar RNA gene and its application in a PCR-based parasite detection. *Experimental Parasitology*, 102: 72–80.

Muhlpfordt H 1959 Vergleichende Untersuchung ueber die Wirkung des Trypaflavins auf den Blepharoplast verschiedener Trypanosomenarten Zscht. *Tropenmed. Parasitol.*, 10:314-27.

Nogueira N e Cohn Z 1978 *Trypanosoma cruzi: In vitro* induction of macrophage microbicidal activity. *Journal of Experimental Medicine*, 148: 288–300.

Nogueira NFS, Gonzalez MS, Gomes JE, *et al.* 2007 *Trypanosoma cruzi*: involvement of glycoinositolphospholipids in the attachment to the luminal midgut surface of *Rhodnius prolixus*. *Experimental Parasitology,* 116 (2), 120– 128.

Nuñes JA e Segura FL 1987 Rearing of Tritominae p. 31-40. Em R. R. Brener e A. M. Stoka (eds) *Chagas' Disease Vetor's: Anatomc and Physiological Aspects.* CRC Press, Boca Raton, Florida, USA.

Oliveira MA de, Souza W de 2003 Further morphological studies on the behavior of *Trypanosoma rangeli* in the hemocytes of *Rhodnius prolixus*. *Parasitol Int*, 52: 299-307.

Oliveira MA, Souza W 2001 An electron microscopic study of penetration by *Trypanosoma rangeli* into midgut cells of *Rhodnius prolixus*. *J. Invertebrate Pathol.* 77, 22-26.

Oliveira TG, Carvalho-Costa FA, Gomes TF, Sarquis O, Sponisa R, Lima MM 2010 Developmental and reproductive patterns of *Triatoma brasiliensis* infected with *Trypanosoma cruzi* under laboratory conditions. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, Vol. 105(8): 1057-1060.

Ormerod WE 1967 The effect of *Trypanosoma rangeli* on the concentration of amino acids in the hemolinph of *Rhodnius prolixus. J. Invertebrate. Pathol.*, 9:247-255.

Osório Y, Travi BL, Palma G, Saravia NG 1995 Infectivity of *Trypanosoma rangeli* in a promonocytic mammalian cell line. *J Parasitol 81*: 687-693.

Osório Y, Travi BL, Palma G, Saravia NG 1995 Infectivity of *Trypanosoma rangeli* in a promonocytic mammalian cell line. *J Parasitol,* 81: 687-693.

Paim RM, Araujo RN, Soares,AC, Lemos LC, Tanaka AS, Gontijo NF, Lehane MJ, Pereira MH 2011 Influence of the intestinal anticoagulant in the feeding performance of triatomine bugs (Hemiptera; Reduviidae). *Int J Parasitol,* 41, 765-773.

Paim RMM, Pereira MH, Araújo RN, Gontijo NF, Guarneri AA 2013 The interaction between *Trypanosoma rangeli* and the nitrophorins in the salivary glands of the triatomine *Rhodnius prolixus* (Hemiptera; Reduviidae). *Insect Biochemistry and Molecular Biology,* 43: 229-236.

Pereira MEA, Andrade AFB e Ribeiro JMC 1981 Lectins of distinct specificity in *Rhodnius prolixus* interact selectively with *Trypanosoma cruzi. Science,* 211: 597-600.

Pereira-Chioccola VL, Acosta-Serrano A, Correia de Almeida I, Ferguson MA, Souto-Padron T, Rodrigues MM, Travassos LR, Schenkman S 2000 Mucin-like molecules form a negatively charged coat that protects *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes from killing by human anti-alpha-galactosyl antibodies. *J. Cell Sci*., 113 (Pt 7), 1299–1307.

Perlowagora-Szumlewics A e Muller AC 1979 Experiments in a search for an insect model for xenodiagnosis of chronic Chagas' diasease. Proceeding of the *Congresso Internacional sobre Doença de Chagas.*E11-E16, Rio de Janeiro, Brasil.

Perlowagora-Szumlewicz A e Moreira CJ 1994 *In vivo* differentiation of *Trypanosoma cruzi*. 1. Experimental evidence of the influence of vector species on metacyclogenesis. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz,* 89, 603–618.

Pessoa S B 1963 *Parasitologia Médica*. Rio de Janeiro, RJ: Guanabara Koogan.

Phillips NR, Bertram DS 1967 Laboratory studies of *Trypanosoma cruzi* infections in Rhodnius prolixus - larvae and adults in *Triatoma infestans, T. protracta* and *T. maculata* - adults. *J. Med. Entomol*., 4, 68-74.

Pifano F 1954 Nueva tripanosomiasis humana de La región neotropical producida por El *Trypanosoma* rangeli com especial referencia a Venezuela. *Arch. Venez. Med. Trop. Parasitol. Med*. ,2:89-120.

Pifano F e Mayer M 1949 Hallazgo de formas evolutivas Del *Trypansosoma rangeli* en El jugo de La trompa de *Rhodnius prolixus* de Venezuela. *Arch. Venezolanos. Patol. Trop. Parasitol. Méd*,1: 153-158.

Pifano F, Mayer M, Romer M, Domingues E, Medina R e Pinto EB 1949 Estado actual de lãs investiganciones en Venezuela sobre uma nueva tripanosomiasis humana de la región neotrópica producida por el *Trypanosoma rangeli*. *Arch. venez. Patol. trop*., 1(2):135-152.

Pifano F, Penalver R, Medina e Dominguez E 1948 La infeccion natural del perro por el *Trypanosoma rangeli*. Primera comprobación de um reservorio vertebrado extra-humano del protozoário de La naturakeza. Gac. med. Caracas, 56(7-12):5pp (separata).

Pineda V, Montalvo E; Alvarez D, Santamaría AM, Calzada JE, Saldaña A 2008 Feeding sources and trypanosome infection índex of *Rhodnius pallescens* in a Chagas disease endemic área of Amador County, Panama. *Rev. Inst. Med. Trop*. São Paulo, 50(2):113-116.

Pizzi T, Prager R S 1952 Imunidade a la sobre infection inducida mediante cultivo de *Trypanosoma cruzi* de virulencia atenuada. *Bol. Inf. Paras. Chilenas*, 7(2):20-21.

Rangel-Aldao R, Allende O, Triana F, Piras R, Henriquez D, *et al*. 1987 Possible role of cAMP in the differentiation of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol* ,22: 39–43.

Rangel-Aldao R, Triana F, Fernandez V, Comach G, Abate T, Montoreano R 1987 cAMP as an inducer of the cell differentiationin *Trypanosoma cruzi*. *Biochemistry International* ,17, 337–344.

Ratcliffe NA, Nigam Y, Mello CB, Garcia ES, Azambuja P 1996 *Trypanosoma cruzi* and erythrocyte agglutinins: a comparative study of occurrence and properties in the gut and hemolymph of *Rhodnius prolixus*. *Exp Parasitol*, 83: 83–93.

Reed SG 1988 *In vivo* administration of recombinant IFN-γ induces macrophage activation, and prevents acute disease, immune suppression, and death in experimental *Trypanosoma cruzi* infections. *Journal of Immunology,* 140: 4342-4347.

Rey MH e Ucrós GH 1939 Nota preliminar sobre el hallazgo de *Trypanosoma Schizotrypanum cruzi* y del *Trypanosoma rangeli* en el *Rhodnius prolixus* en algunas regiones

del oriente de Cundinamarca. *Ver Facultad Med 8*: 76-78. Em: Zeledón R, 1954 Tripanosomiasis *rangeli*. *Rev. Biol. Trop,* 2: 231-268.

Rey-Matiz H 1941 Observaciones sobre trypanosomas em Colombia. *Ver. Fac. Med. Bogotá*, 10: 25-49. Em: Zeledón R 1954 Tripanosomiasis *rangeli*. *Rev. Biol. Trop.*, 2:231-268.

Ribeiro 1MC 1987 Role of saliva in blood-feeding by arthropods. *Annu. Rev. Entomal*., 32:463-78.

Ribeiro JMC e Francischetti MB 2003 Role of Arthropod Saliva in Blood Feeding: Sialome and Post-Sialome Perspectives – *Annual Reviwe of Entomology* ,48:73-88.

Rodrigues JO 2013 Efeito da temperatura na infecção de *Rhodnius prolixus* por *Trypanosoma cruzi* e *Trypanosoma rangeli*. Centro de Pesquisas René Rachou (Fiocruz Minas). *Dissertação de Mestrado*. 99 p.

Rodriguez-Bonfante C, Amaro A, Garcia M, Wohlert LEM; Guillen P, Garcia RA, Alvarez N, Diaz M, Cardenas E, Castillo S, Bonfante-Garrido R, Bonfante-Cabarcas R 2007 Epidemiología de la enfermedad de Chagas en el municipio Andrés Eloy Blanco, Lara, Venezuela: infestación triatomínica y seroprevalencia en humanos. *Cad. Saude Publica*; 23:1133-1140.

Roffê E, Rothfuchs AG, Santiago HC, Marino APM, Ribeiro-Gomes FL, Eckhaus M, Antonelli RLV e Murphy PM,. 2012 IL-10 Limits Parasite Burden and Protects against Fatal Myocarditis in a Mouse Model of *Trypanosoma cruzi* Infection. *The Journal of Immunology,* 15. 188(2) 2:649-660.Ryckman RE, Folkes DL, Olsen LE, Robb PL, Ryckman AE 1965 Epizootiology of *Trypanosoma cruzi* in southwestern noth America. *Journal of Medical Entomology*, 2(22):87-108.

Salzman TA, Stella AM, Wilder de Xifra EA, Battle AM, Docampo R, Stoppani AO, 1982 Porphyrin biosynthesis in parasitic haemoflagellates: functional and defective enzymes in *Trypanosoma cruzi*. *Comp. Biochem. Physiol*., B 72, 663– 667.

Sant'Anna MRV, Diotaiuti L, Gontijo AF, Gontijo NF, Pereira MH 2001 Feeding behaviour of morphologically similar *Rhodnius* species: influence of mechanical characteristics and salivary function. *J Insect Physiol*, 47, 1459-1465.

Santos ALS, Branquinha MH, D'Avila-Levy CM 2006 The ubiquitous gp63-like metalloprotease from lower trypanosomatids: in the search for a function.*An Acad Bras Cienc*, 78: 687–714.

Schaub GA 1988 Development of isolated and group-reared first instars of *Triatoma infestans* infected with *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol. Res.,* 74:593-594.

Schaub GA 1989a Does *Trypanosoma cruzi* stress its vectors? *Parasitol Today,* 5: 185-188.

Schaub GA 1989b *Trypanosoma cruzi*: quantitative studies of development of two strains in small intestine and rectum of the vector *Triatoma infestans*. *Exp Parasitol,* 68: 260-273.

Schaub GA 1999 Chapter 4, Interactions of Trypanosomatids and Triatomines. Advances in *Insect Physiology*, 37, 177–242.

Schaub GA 2009 Interactions of trypanosomatids and triatomines. *Adv.Insect Physiol*., 37, 177–242.

Schaub GA e Böker CA 1986 Colonization of the rectum of *Triatoma infestans* by *Trypanosoma cruzi*: influence of starvation studied by scanning electron microscopy. *Acta Tropica,* 43: 349-354.

Schaub GA e Losh P 1988 *Trypanosoma cruzi*: origin of metacyclic trypomastigotes in the urine of the vector *Triatoma infestans*. *Experimental Parasitology*, 65: 174-186.

Schaub GA, Grünfelder CG, Zimmermmann D, Peters W 1989 Binding of lectin-gold conjugates by two *Trypanosoma cruzi* strains in ampullae and rectum of *Triatoma infestans*. *Acta trop*., 46, 291-301.

Schenone H 1999 Xenodiagnosis. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 94 (Suppl.1), 289–294.

Schofield CJ 1994 Triatominae: Biology and Control. *Eurocommunica Publications (Ed.).* West Sussex, United Kingdom. 76p.

Schottelius J 1982 Differentiantion between *Trypanosoma cruzi* and *T. rangeli* by their different complement sensitivity. *Tropen ned. Parasitenkd*., 33; 147-150.

Schottelius J 1987 Neurominidase fluorescent test for differentiation of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli. Trop Med Parasitol,* 38:323–327.

Schottelius J e Muller V 1984 Interspecific differentiation of *Tripanosoma cruzi*, *Tripanosoma conorhini* and *Tripanosoma rangeli* by lectins in combination with complement lysis. *Acta Trop,* 41:29–38.

Schuster JP e Schaub GA 2000 *Trypanosoma cruzi*: skin-penetration kinetics of vector-derived metacyclic trypomastigotes. *Int. J. Parasitol*., 30, 1475-1479.

Silva JS, Twardzik DR e Reed SG 1991 Regulation of *Trypanosoma cruzi* infections in vitro and in vivo by TGF-β. *Journal of Experimental Medicine*, 174: 539-545.

Simpson AG e Roger AJ 2004a Protrein phylogenies robustly resolve the deep-level relationships within Euglenozoa. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 30(1):201-212.

Simpson AG, Stevens JR, Lukes J 2006 The evolution and diversity of kinetoplastid flagellates. *Trends Parasitol*., 22(4):168-174.

Smith JJ 1979 Effect of diet viscosity on the operation of the pharyngeal pump in the blood-feeding bug *Rhodnius prolixus*. *J Exp Biol,* 82, 93-104.

Soares AC, Carvalho-Tavares J, Gontijo NF, Santos VC, Teixeira MM, Pereira MH 2006 Salivation pattern of *Rhodnius prolixus* (Reduviidae; Triatominae) in mouse skin. *Journal of Insect Physiology,* 52(5): 468-472.

Soares RPP, Evangelista LG, Laranja LS e Diotaiuti L 2000 Population Dynamics and Feeding Behavior of *Triatoma brasiliensis* and *Triatoma pseudomaculata*, Main Vectors of Chagas Disease in Northeastern Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz,* 95(2):151-155.

Sousa OE 1966 *Trypanosoma rangeli* in Panama. *Ann. Rept. Gorgas Mem. Lab*., p. 16.

Sousa OE, Dawson GA 1976 Trypanosome infections in the marmoset (*Saguinus geoffroyi*) from the Panama Canal Zone. *Am. J. Trop. Med. Hyg*., 25(3):407-409.

Steindel M, Carvalho Pinto CJ, Toma HK, Mangia RHR, Ribeiro-Rodrigues R, Romanha AJ 1991 *Trypanosoma rangeli* (Tejera, 1920) isolated from a sylvatic rodent (*Echimys dasythrix*)

in Santa Catarina Island, Santa Catarina State: first report of this trypanosome in Southern Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz,* 86: 73-79.

Stevens J R, Noyes HA, Schofield CJ, Gibson W 2001 The molecular evolution of Tripanosomatidae. *Adv. Parasitol*., 48:1-56.

Stryer L 1996 Bioquímica. 4.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 1000p.

Takle GB 1988 Studies on the cellular immune response of insects toward the insect pathogen *Trypanosoma rangeli*. *J Invertebr Pathol*, 51: 64-72.

Tanoura K 1999 *Trypanosoma rangeli* in vitro metacyclogenisis and fate of metacyclic trypomastigotes after infection to mice and fibroblast cultures. *J Eukaryot Microbiol*, 46: 43-48.

Tanowitz HB, Kirchhoff LV, Simon D, Morris SA, Weiss LM, Wittner M 1992 Chagas' disease. *Clin Microbiol Rev*, 5(4):400-419.

TDR diseases. 2005 Report of the Scientific Working Group on Chagas disease Buenos Aires, Argentina 17-20.

Tejera E 1920 Un nouveau flagellé de *Rhodnius prolixus*. *Trypanosoma* (ou *Crithidia*) *Rangeli* n. sp., *Bull. Path. Exot*., 13:527-530.

Terra WR 1990 Evolution of digestive systems of insects. *Annual review of entomology*, *35*(1), 181-200.

Terra WR e Ferreira C 2004 Biochemistry of digestion. *In Comprehensive Molecular Insect Science* (Vol. 4) (Gilbert, L.I. *et al*., eds), pp. 171–224, Elsevier

Thompson MW, McInnes RR, Willard HF 1993 Thompson & Thompson Genética Médica. 5.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 339p.

Tobie EJ 1961 Experimental transmission and biological comparison of strains of *Trypanosoma rangeli. Exp Parasitol*, 11: 1-9.

Tobie EJ 1964 Increased Infectivity of a Cyclically Maintainned Strain of *Trypanosoma rangeli* to *Rhodnius prolixus* and Mode of Transmissin by Invertebrate Host. *The Journal of Parasitology*, 50:593-598.

Tobie EJ 1965 Biological Factor Influencing Transmission of *Trypanosoma rangeli* by *Rhodnius prolixus*. *The Journal of Parasitology*, 51: 837-841.

Tobie EJ 1968 The relation of *Trypanosoma rangeli* to its vector. Em: A Anselmi, *Medicina Tropical*, Talleres gráficos de Editorial Fuornier, México, p. 291-395.

Tobie EJ 1970 Observartions on the Development of *Trypanosoma rangeli* in the Hemocoel of *Rhodnius prolixus*. *Journal of Invertebrate Pathology*,15:118-125.

Turner CMR, Barry JD e Vickerman K 1988 Loss of variable antigen during transformation of *Trypansoma brucei rhodesiense* from bloodstream to procyclic forms in tsetse fly. *Parasitology Research*; 74(6): 507-511.

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

Urdaneta-Morales S 1983 Pleomorphism in trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi* from blood and cell culture. *Tropenmed Parasit*, 34: 225-228.

Urdaneta-Morales S e Rueda IG 1977 A comparative study of the behavior of Venezuelan and Brazilian strains of *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* in the Venezuelan invertebrate host (*Rhodnius prolixus)*. *Revista de Znstituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, 19: 241-250.

Urdaneta-Morales S e Tejero F 1985 *Trypanosoma (Herpetosoma) rangeli*, Tejera 1920, Mouse model for high, sustained parasitemia. *J Parasitol*, 71: 409-413.

Urganeta-Morales S 1973 *Trypanosoma cruzi* infections in *Rhodnius prolixus* refed on different hosts. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 13:218-221.

Ursic-Bedoya RJ, Nazzari H, Cooper D, Triana O, Wolff M e Lowenberger C 2008 Identification and characterization of two novel lysozymes from *Rhodnius prolixus*, a vector of Chagas disease. *Journal of Insect Physiology*, 54(3):593-603.

Valle D, Gomes FEPL, Goldenberg S e Garcia ES 1987 *Rhodnius prolixus* vitellogenesis: dependence upon the blood source. *J. Insect Physiol*., 33:249-254.

Vallejo GA, Marinkelle CJ, De Sánchez N 1988 Behaviour of the infection and morphologic differentiation of *Trypanosoma cruzi* and *T. rangeli* in the intestine of the vector *Rhodnius prolixus*. *Rev. Bras. Biol*, 48(3):577-58.

Vallejo GA, Marinkelle CJ, Guhl F, de Sánchez N 1988 Comportamiento de la infección y diferenciación morfológica entre *Trypanosoma cruzi* y *T. rangeli* en el intesitino del vector *Rhodnius prolixus*. *Rev Brasil Biol,* 48: 577-587.

Vallejo GA, Marinkelle CJ, Guhl F,Sánchez N 1986. Mantenimiento en el laboratorio de *Trypanosoma (Herpetosoma) rangeli* Tejera, 1920. *Rev Biol Trop,* 34: 75-81.
Watkins R 1969 Host-parasite Interaction between *Trypanosoma* species and *Rhodnius prolixus* Stal (Hemiptera, Reduviidae). PhD thesis, University of California, Berkeley.

Watkins R 1971 *Trypanosoma rangeli*: Effect on excretion *in Rhodnius prolixus. J. Inverteb. Pathol*., 17: 67-71.

Whitten M, Sun F, Tew I, Schaub G, Soukou C, Nappi A, Ratcliffe N 2007 Differential modulation of *Rhodnius prolixus* nitric oxide activities following challenge with *Trypanosoma rangeli, Trypanosoma cruzi* and bacterial cell wall components. *Insect Biochem Mol Biol,* 37: 440-452.

Whitten MMA, Mello CB, Gomes SAO, Nigam Y, Azambuja P, Garcia ES e Ratcliffe NA 2001 Role of Superoxide and Reactive Nitrogen Intermediates in *Rhodnius prolixus* (Reduviidae) / *Trypanosoma rangeli* Interactions**.** *Experim. Parasitol***,** 98 (1): 44–57.

WHO - World Health Organization 2013 Chagas disease (American trypanosomiasis). *Fact sheet* 340. World Health Organization, March 2013.

WHO - World Health Organization 2007 Reporte del grupo de trabajo científico sobre la enfermedad de Chagas. 96 p. TDR/GTC/06 World Health Organization.

Wigglesworth VB 1934 The physiology of ecdysis in *Rhodnius prolixus* (Hemiptera). II. Factors controlling moulting and "metamorphosis". *Quarterly Journal of Microscopical Science* 77: 191-222.

Wigglesworth VB 1936 The functions of corpus allatum in the growth and reproduction of *Rhodnius prolixus* (Hemiptera). *Quarterly Journal of Microscopical Science*, 79: 91-121.

Wigglesworth VB 1939 *The principles of insect physiology*. Methuen, London.

Wigglesworth VB 1948 The functions of the corpus allatum in *Rhodnius prolixus* (Hemiptera) *Journal of Experimental Biology* 25: 1-&.

Wigglesworth VB 1950 *The principles of insect physiology*. 4th Edition. Methuen, London.

Wigglesworth VB 1962 Histology of the malprghian tubules in *Rhodnius prolixus* Stal (Hemiptera). *Journal of Insect Physiology* 8: 299-307.

Wigglesworth VB 1964 The hormonal regulation of growth and reproduction in insects. *Advances in Insect Physiology* 2: 247-336.

Wigglesworth VB 1969 Chemical structure and juvenile hormone activity: comparative tests on *Rhodnius prolixus. Journal of Insect Physiology* 15: 73-94.

Wrightsman R, Krassner S e Watson J, 1982 Genetic Control of Responses to *Trypanosoma cruzi* in Mice: Multiple Genes Influencing Parasitemia and Survival. *Infect. Immun.*,36(2): 637-644.

Young C, Losikoff P, Chawla A, Glasser L, Forman E 2007 Transfusion-acquired *Trypanosoma cruzi* infection. *Transfusion*., 47: 540-544.

Zeledón R 1954 Tripanosomiasis *rangeli*. *Rev. Biol. Trop*, 2: 231-268.

Zeledón R 1956 Hallazgos de formas evolutivas de *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920, en glândulas salivares de *Rhodnius prolixus* Stal, 1859. Salvadoreños – *Rev. Biol. Trop*., 4:1-7.

Zeledón R 1975 Effects of triatomine behavior on trypanosome transmission. *PAHO Sc Pub.* 318: 326-329.

Zeledón R 1976 Host-parasite relationships in the vector. Em: *New Approacher in American Trypanosomiasis Research*, Belo Horizonte, Brazil. *Pan. Am. Hlth. Org. Sc.* Publ. 318.

Zeledón R 1987 Life cycle of *Trypanosoma cruzi* in the insect vector. Em: Brenner RR e Stoka AM (eds.) *Chagas Disease Vectors* (Anatomical and Physiological Aspects). vol. 2, Miami, CRC Press, 59-75.

Zeledón R, Alvarado R, Jiron LF 1977 Observation of the feeding and defecation of three Triatominae species (Hemiptera, Reduviidae). *Acta Trop,* 34: 65-77.

Zingales B, Martin NF, de Lederkremer RM, Colli W 1982 Endogenous and surface labeling of glycoconjugates from the three differentiation stages of *Trypanosoma cruzi*. FEBS Letters 142, 238–242.

Zuñiga C, Palau MT, Penin P, Gamallo C, Diego JA 1997 *Trypanosoma rangeli*: increase in virulence with inocula of different origins in the experimental infection in mice. *Parasitol Res,* 83: 797-800.