

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PARASITOLOGIA

INTERAÇÃO TRIATOMÍNEOS-*TRYPANOSOMA CRUZI*: DESENVOLVIMENTO
DE DIFERENTES DTUs, PAPEL DAS VESÍCULAS EXTRACELULARES E
TENTATIVA DE HIBRIDIZAÇÃO



Belo Horizonte – MG

2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PARASITOLOGIA

INTERAÇÃO TRIATOMÍNEOS-*TRYPANOSOMA CRUZI*: DESENVOLVIMENTO
DE DIFERENTES DTUs, PAPEL DAS VESÍCULAS EXTRACELULARES E
TENTATIVA DE HIBRIDIZAÇÃO

Larissa Ferreira Paranaíba

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Pedro Pinto Soares

Co-orientadora: Prof. Dra. Maria Norma Melo

Colaboradora: Prof. Dra. Alessandra Guarneri

Trabalho apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como parte do requisito para obtenção do título de doutora.

Belo Horizonte – MG

2019



ATA DE DEFESA DE TESE - DOUTORADO

Larissa Ferreira Paranaíba301/2019/15
entrada
2º/2015
2015747707

Às oito horas do dia 20 de novembro do ano de 2019, reuniu-se, no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, a Comissão Examinadora de Tese, indicada pelo Colegiado do Programa, para julgar, em exame final, o trabalho final intitulado: **“Interação triatomíneos-Trypanosoma cruzi: Desenvolvimento de diferentes DTUs, papel das vesículas extracelulares e tentativa de hibridização”**, área de concentração: **Entomologia**. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, **Dr. Rodrigo Pedro Pinto Soares**, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra ao (a) candidato (a), para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa do (a) candidato (a). Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença do (a) candidato (a) e do público, para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Prof./Pesq.	Instituição	Indicação
Dr. Rodrigo Pedro Pinto Soares	IRR/FIOCRUZ - BH	APROVADA
Dr. Sérgio Schenkman	UNIFESP	APROVADA
Dr. Álvaro Gil Araújo Ferreira	IRR/FIOCRUZ - BH	APROVADA
Dra. Luciana de Oliveira Andrade	UFMG	APROVADA
Dr. Marcos Horácio Pereira	UFMG	APROVADA
Dra. Maria Norma Melo	UFMG	APROVADA

Expedição do resultado final.

CONSIDERAÇÕES GERAIS – SOBRE TESE APRESENTADA PELO (A) O (A) CANDIDATO(A):

Exigências	REFAÇA A DISCUSSAO E INCLUA AS CORREÇÕES
Recomendações	
Sugestões	

Pelas indicações, o (a) candidato(a) foi considerado(a): _____

O resultado final foi comunicado publicamente ao(a) candidato(a) pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar o Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ATA, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora.

Belo Horizonte, 20 de novembro de 2019.

Dr. Rodrigo Pedro Pinto Soares
(Orientador)

Dr. Sérgio Schenkman

Dr. Álvaro Gil Araújo Ferreira

Dra. Luciana de Oliveira Andrade

Dr. Marcos Horácio Pereira

Dra. Maria Norma Melo
(Coorientadora)

Prof. Daniella Castanheira Bartholomeu
Coordenadora do Programa de
Pós-Graduação em Parasitologia
SIAPE: 1517341

Este documento não terá validade sem a assinatura e carimbo do Coordenador

043 Paranaíba, Larissa Ferreira.

Interação triatomíneos-*trypanosoma Cruzi*: desenvolvimento de diferentes DTUs, papel das vesículas extracelulares e tentativa de hibridização [manuscrito] / Larissa Ferreira Paranaíba. – 2019.

111of. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Pedro Pinto Soares. Co-Orientadora: Profa. Dra.

Maria Norma Melo. Colaboradora: Profa. Dra. Alessandra Guarneri.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Parasitologia.

1. Parasitologia - Teses. 2. Triatominae. 3. *Tripanossoma cruzi*. 4. *Triatoma*.
5. *Rhodnius prolixus*. 6. Vesículas extracelulares. I. Soares, Rodrigo Pedro Pinto.
II. Melo, Maria Norma. III. Guarneri, Alessandra Aparecida. IV. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. V. Título.

CDU: 576.88/.89

Ficha elaborada por Sônia M. S. Moraes CRB 6/1357 - ICB/UFMG

Agradecimentos

O símbolo do curso de Ciências Biológicas é representado por um óvulo sendo fecundado, determinando o princípio da vida. Bem como o símbolo do meu curso estou nesse momento começando/iniciando a minha vida profissional.

Nesse dia muito especial e tão esperado agradeço a Deus, pela saúde, paciência e sabedoria que me fez saber escolher o melhor caminho. Mesmo que em alguns momentos sua presença pareceu distante e até outras vezes ausente.

Agradeço profundamente meu orientador Rodrigo Soares, que inicialmente me convidou para uma simples colaboração, que se tornou um importantíssimo projeto e em paralelo iniciamos a busca pelo conhecimento sobre as interações *Trypanosoma cruzi* e triatomíneos. Obrigada por mesmo com minhas dificuldades, você soube me guiar e me orientar. Muito obrigada Alessandra G. minha co-orientadora por todas as reuniões que permitiram ótimos protocolos e discussões que criaram esse projeto de doutorado tão especial. A professora Norma, minha segunda co-orientadora, que permitiu que eu fosse sua última orientada e que me instruiu em vários ensinamentos.

Agora um obrigado mais do que especial às pessoas que fizeram ser quem eu sou e que mesmo estressada, não dando atenção e falando do mesmo assunto suportaram e me ajudaram. Obrigada mamãe, papai, feiosa, Rei, Fá, Ingrid e a todos meus familiares que estão tão longe e mesmo assim conseguiram me apoiar, amar e encorajar.

Agradeço aos meus mestres do departamento de parasitologia da UFMG, que me deram a oportunidade de trabalhar com a parasitologia e me ensinaram cada disciplina ou até mesmo em conversar aleatórias a admira-los e a amar cada vez mais ser professora.

Com muito carinho agradeço aos meus amigos de laboratório, BH, Lado B, Diamantina e Ipatinga, que tanto me ajudaram, escutaram e foram meus colaboradores.

Agradeço o Programa de pós-graduação em parasitologia da UFMG e, sobretudo a Sumara e Cibele, que sempre me atenderam tão bem e me deram suporte.

A população brasileira que mesmo não tendo conhecimento financiou os meus estudos e a minha pesquisa.

“História, nossas histórias ... Dias de luta, dias de glória”.

(Chorão e Thiago Castanho, 2006)

SUMÁRIO

1. Introdução	14
1. 1 Doença de Chagas	14
2. Capítulo 1: Interação entre <i>T. infestans</i> e <i>T. cruzi</i> : comportamentos distintos de formas evolutivas em diferentes microambientes.....	20
2.1. Resumo	20
2.2. Abstract.....	20
2.3. Introdução	22
2.4 Justificativa	24
2.5 Objetivos.....	25
2.5.1 Objetivo geral.....	25
2.5. 2 Objetivos específicos.....	25
2.6. Materiais e métodos	26
2.7 Análise estatística.....	29
2.8 Resultados.....	30
2.9 Discussão	37
2.10 Conclusão.....	42
3. Capítulo 2: O papel das vesículas extracelulares de <i>T. cruzi</i> na migração em <i>R. prolixus</i> e <i>T. infestans</i>	43
3.1. Resumo	43
3.2. Abstract.....	43
3.3. Introdução	44
3.4 Justificativa	46
3.5 Objetivos.....	47
3.5.1 Objetivo geral.....	47
3.5. 2 Objetivos específicos.....	47
3.6. Materiais e métodos	48

3.7 Análise estatística.....	49
3.8 Resultados.....	51
3.9 Discussão.....	55
3.10 Conclusão.....	56
4. Capítulo 3: Tentativa de hibridização em <i>Triatoma infestans</i>	57
4.1. Resumo.....	57
4.2. Abstract.....	57
4.3. Introdução.....	59
4.4 Justificativa.....	60
4.5 Objetivo geral.....	61
4.6. Materiais e métodos.....	63
4.7 Resultados.....	67
4.8 Discussão.....	71
4.9 Conclusão.....	72
5. Produções científicas paralelas.....	73
6. Referências bibliográficas.....	74
6. Anexo 1.....	89

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C – Graus Celsius

µg – Microgramas

µL – Microlitros

dpi – Dia pós-infecção

DTUs – Unidades discretas de tipagem “*Discreet typing units*”

GFP – Proteína verde fluorescente “*Green fluorescent protein*”

gp63 – Glicoproteína 63

IFN-γ – Interferon gama

IMA – Intestino médio anterior

IMP – Intestino médio posterior

iNOS – Óxido nítrico sintase induzível

IP – Intestino posterior ou reto

LIT – “*Liver Infusion Tryptose*”

mg – Miligrama

mL – Mililitro

n.s. – Não significativo

NK – Células “*natural killer*”

NO – Óxido nítrico

p – Nível de significância

pb – Pares de Bases

RFP – Proteína vermelha fluorescente “*Red fluorescent protein*”

SFB – Soro fetal bovino

TLR – Receptor do tipo Toll (“*Toll Like Receptor*”)

VEs – Vesículas extracelulares

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Distribuição dos DTUs de *T. cruzi* no continente Americano. A linha tracejada separa as regiões geográficas de acordo com a patologia prevalente: cardiomiopatia chagásica crônica (CCC) e forma digestiva (DIG). (Extraído de Zingales et al., 2018). 16
- Figura 2. Tubo digestivo de um triatomíneo e suas subdivisões. O tubo digestivo de um triatomíneo é dividido em três porções: intestino anterior, intestino médio e intestino posterior ou reto. O intestino médio é ainda subdividido em intestino médio anterior e intestino médio posterior. 18
- Figura 3. Curvas de crescimento das formas epimastigotas de *T. cruzi* (Dm28c, YuYu, Bug e CL-Brener) em meio LIT suplementado com 15% de soro fetal bovino. Os parasitos foram diluídos, em triplicata, em garrafas de cultivo na concentração de 1×10^5 parasitos/mL. O crescimento foi monitorado diariamente até a fase estacionária e posterior declínio através de contagem em câmara de Neubauer. 30
- Figura 4. Parasitos de diferentes clones de *T. cruzi* encontrados ao longo do tubo digestivo de *T. infestans* após 49-50 dias de infecção. Cada ponto representa a quantificação dos parasitos de um inseto e cada barra horizontal corresponde à mediana do grupo avaliado. Legenda: M: Intestino médio (anterior + posterior) e R: Reto. 31
- Figura 5. Tripomastigotas metacíclicos na urina de *T. infestans* infectados por diferentes linhagens/clones de *T. cruzi*. Cada ponto representa a quantificação dos parasitos de um inseto e cada barra horizontal corresponde à mediana do grupo avaliado. 32
- Figura 6. Perfil temporal da quantidade de parasitos/ μ L dos clones DM28c (A e B) e Bug (C e D) encontrados no intestino médio anterior e intestino médio posterior + reto de *T. infestans* após alimentação infectiva com epimastigotas de cultura. Cada ponto representa a quantificação dos parasitos de um inseto e cada barra horizontal corresponde à mediana do grupo avaliado. 33
- Figura 7. Número de parasitos encontrados no intestino médio anterior (A) e intestino médio posterior + reto (B) de ninfas de *T. infestans* após alimentação em camundongos infectados. Cada ponto representa a quantificação dos parasitos de um inseto e cada barra horizontal corresponde à mediana do grupo avaliado. 35

Figura 8. Avaliação temporal mostrando a diferenciação das formas de desenvolvimento da cepa DM28c em diferentes porções do intestino de ninfas de *T. infestans*. A porcentagem de parasitos para o intestino médio anterior (A) e intestino médio posterior + reto (B) foi calculada contando-se todos os campos das lâminas coradas (n=7 a 10 lâminas avaliadas para cada tempo). O número médio de parasitos encontrados em cada porção intestinal foi plotado no eixo direito para representar o total da carga parasitária (todas as formas evolutivas) em cada porção e período..... 36

Figura 9. Vesículas extracelulares de *T. cruzi*. Microscopia eletrônica de varredura (SEM) (barras: 1-5µm), Ampliação 32.657X (A) e Ampliação 80.000X (B); Quantificação do tamanho e concentração de VEs de *T. cruzi* Bug (C) e (D)..... 51

Figura 10. Parasitos encontrados ao longo do trato intestinal de *R. prolixus*. Dissecções aos 21-22 (A) e 49-50 (B) dias após a alimentação infectiva. Cada ponto representa a quantificação dos parasitos de um inseto e cada barra horizontal corresponde à mediana do grupo avaliado..... 52

Figura 11. Parasitos encontrados ao longo do trato intestinal de *T. infestans*. Dissecções aos 21-22 (A) e 49-50 (B) dias após a alimentação infectiva. Cada ponto representa a quantificação dos parasitos de um inseto e cada barra horizontal corresponde à mediana do grupo avaliado..... 53

Figura 12. Tripomastigotas metacíclicos encontrados na urina de *R. prolixus* (A) e *T. infestans* (B) aos 28 dias p.i. Cada ponto representa a quantificação dos parasitos de um inseto e cada barra horizontal corresponde à mediana do grupo avaliado. 54

Figura 13. Expressão transitória da proteína verde fluorescente (GFP) e da proteína vermelha fluorescente (RFP) em epimastigotas de *T. cruzi*. Epimastigotas de YuYu-GFP em microscópio de fluorescência sem filtro (A), filtro para comprimentos de ondas em verde (B) e filtro para comprimentos de ondas em vermelho (C). Epimastigotas de Bug2145c110-RFP em microscópio de fluorescência sem filtro (D), filtro para comprimentos de ondas em verde (E) e filtro para comprimentos de ondas em vermelho (F). Epimastigotas do isolado da urina (híbrido putativo) em microscópio de fluorescência sem filtro (G), filtro para comprimentos de ondas em verde (H) e filtro para comprimentos de ondas em vermelho (I). Imagens captadas utilizando-se o microscópio confocal (NIKON eclipse E200)..... 67

Figura 14. Leitura do comprimento de onda emitido pelos clones da linhagem Bug2145c110-RFP de <i>T. cruzi</i> realizados pelo citometro FACS Calibur e analisados pelo programa FlowJo.....	68
Figura 15. Leitura do comprimento de onda emitido pelos clones da linhagem YuYu-GFP de <i>T. cruzi</i> realizados pelo citometro FACS Calibur e analisados pelo programa FlowJo.....	69
Figura 16. Leitura do comprimento de onda emitido pelos clones do isolado originário da infecção mista de Bug2145c110-RFP e YuYu-GFP de <i>T. cruzi</i> realizados pelo citometro FACS Calibur e analisados pelo programa FlowJo.	69
Figura 17. Gel de poliacrilamida corada com nitrato de prata. As amostras analisadas de acordo com os primers COII (A) e rDNA 24S α (Figura B).....	70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Clones utilizados no estudo.....	26
Tabela 2. Primers e programas dos marcadores utilizados na genotipagem dos parasitos.	62
Tabela 3. Perfil de amplificação dos marcadores utilizados na genotipagem dos subgrupos de <i>T. cruzi</i> . A ocorrência de mais de um valor na célula da tabela indica a presença de mais de uma banda no gel de poliacrilamida. pb = pares de base.	66

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Paranaíba LF, Guarneri AA, Torrecilhas AC, Melo MN, Soares RP (2019). Extracellular vesicles from <i>Trypanosoma cruzi</i> affects parasite migration in the gut of <i>Rhodnius prolixus</i> but not in <i>Triatoma infestans</i> . Mem. Inst. Oswaldo Cruz (under review R2 26/10/2019).....	84
--	----

1. INTRODUÇÃO

1.1 DOENÇA DE CHAGAS

A doença de Chagas, também conhecida como tripanossomíase americana, é considerada uma doença negligenciada pela Organização Mundial da Saúde (OMS). Foi descoberta há mais de 100 anos pelo Dr. Carlos Chagas, que descreveu o agente etiológico, hospedeiro invertebrado e o modo de transmissão (Chagas 1909). Possui ampla distribuição nas Américas (Coura 2007), mas recentemente, devido às migrações, tem se expandindo a países não endêmicos na América do Norte, Europa e Ásia (Roellig et al. 2013, Bern 2015). A doença é considerada a infecção parasitária com maior carga socioeconômica na América Latina (Stanaway & Roth 2015).

Esta doença é causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae), que possui como hospedeiros invertebrados triatomíneos (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae), e hospedeiros vertebrados como o homem, gambá, tatus, roedores, raposas, tamanduás (Castro 2006), canídeos (Jansen et al. 2015), guaxinins (Roellig et al. 2013) e morcegos (Cavazzana et al. 2010, Jansen et al. 2018). Dentre os hospedeiros vertebrados, os gambás (*Didelphis* spp.) possuem grande importância, por apresentarem infecções duradouras com altas parasitemias. Os canídeos se comportam de maneira diferente exibindo parasitemias mais baixas (Jansen et al. 2015).

A classificação de diferentes linhagens/isolados de *T. cruzi* sempre foi um assunto de interesse sendo utilizados vários marcadores moleculares e bioquímicos. Mesmo assim, havia ainda uma necessidade de uma padronização mais definida. Neste contexto, no ano de 2009, um grupo de pesquisadores propôs uma nova classificação. Foi recomendado que *T. cruzi* fosse dividido em seis grupos denominados de Tc I-VI, sendo cada grupo chamado de DTU (“Discreet Typing Unit”) (Zingales et al. 2009). Nos últimos anos, um sétimo DTU (Tcbat) foi descrito para morcegos (Cominetti et al. 2014). A sigla DTU significa um conjunto de isolados geneticamente semelhantes e que podem ser identificados por marcadores moleculares (“tags”) ou imunológicos comuns. Ao longo do tempo a ocorrência de pequenas alterações genéticas em uma escala evolutiva poderia acontecer entre eles, sendo as unidades discretas de tipagens podem não ser totais, com algumas trocas genéticas ocorrendo de tempos em tempos em uma escala evolutiva entre eles. Nesse caso, o termo “cepas” não é o mais apropriado, ou

pelo menos, são muito instáveis para serem considerados como DTUs. Portanto, para o parasito *T. cruzi* o mais apropriado é nomeá-lo como isolado ou linhagem. A classificação em DTUs ajudou a entender algumas das diferenças entre as linhagens/isolados quanto à sua distribuição, patogenia, ecoepidemiologia sendo seu uso consagrado pela comunidade acadêmica. Nesta tese iremos abordar linhagens/isolados de diferentes DTUs na interação com triatomíneos.

Dentre os seis DTUs, TcI é o considerado o mais amplamente distribuído nas Américas. Pode ser encontrado em triatomíneos que possuem ciclos silvestres e domésticos. O TcII tem distribuição predominante nas regiões central e sul da América do Sul. Este DTU vem sendo associado ao ciclo doméstico de transmissão. O TcIII seria um híbrido, originado a partir de diferentes eventos de trocas genéticas. Assim como o TcIII, o TcIV apresenta uma distribuição similar pela América do Sul com exceção da região do Chaco, onde se encontra ausente. Ao contrário do TcIII, o TcIV ocorre com grande frequência no homem. O TcV e o TcVI são DTUs considerados híbridos sendo encontrados nas regiões sul e central da América do Sul (Zingales et al. 1998, 2012, Araújo et al. 2011, Zingales 2011, 2018, Lima et al. 2014) (Figura 1). O Tcbat apresentaria uma origem monofilética, tendo um ancestral comum com todos os outros DTUs (Lima et al. 2015).

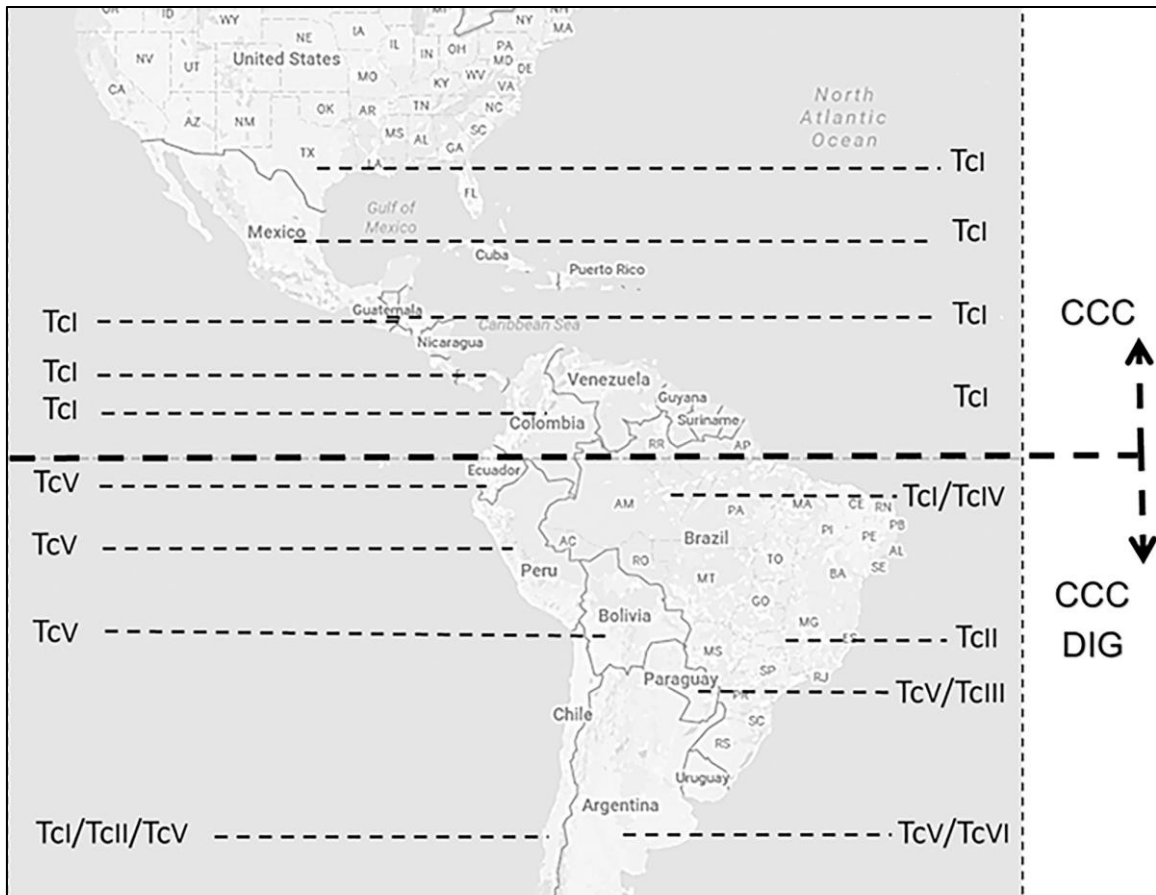


Figura 1. Distribuição dos DTUs de *T. cruzi* no continente Americano. A linha tracejada separa as regiões geográficas de acordo com a patologia prevalente: cardiomiopatia chagásica crônica (CCC) e forma digestiva (DIG). (Extraído de Zingales et al., 2018).

A transmissão da doença de Chagas pode ocorrer de modo vetorial, transfusional e congênito. Os últimos surtos no Brasil foram devido à transmissão oral, que pode ser considerada uma modalidade da transmissão vetorial, sendo a mais comum pela ingestão de açaí contaminado (Coura 2015, Pérez-Molina et al. 2015). No ambiente silvestre, foi demonstrado que entre animais a ingestão de insetos seria a via mais habitual de transmissão e manutenção do ciclo do *T. cruzi* (Roellig et al. 2009). Entretanto, ainda não sabemos onde poderiam ocorrer eventos de hibridização de diferentes isolados de *T. cruzi*. Nesta tese, investigamos se o intestino dos hospedeiros invertebrados poderiam ser o local deste fenômeno ainda não comprovado neste parasito embora já tenha sido visto em *Leishmania* (Akopyants et al. 2009).

Os triatomíneos são insetos paurometábolos indo de ovo até a fase adulta passando por cinco estádios ninfais. Todos os estádios alimentam-se de sangue e podem se infectar com *T. cruzi*. No ambiente silvestre, os triatomíneos podem ocupar diferentes nichos

incluindo: ninhos de aves, tocas de gambás, locas de tatu, troncos de árvores, cavernas e abrigos em pedras e palmeiras (Jansen et al. 2015, 2018). No ambiente doméstico e peridoméstico, os insetos podem estar associados às casas de pau a pique e anexos peridomiciliares (Schofield & Dias 1999). Como os triatomíneos alimentam-se de vários hospedeiros na natureza, a ingestão de diferentes linhagens poderia, em tese, favorecer a um possível encontro entre as mesmas em alguma parte do intestino. Isto poderia de acordo com as condições micro ambientais favorecer a um possível evento de troca genética levando até mesmo à uma hibridização. O fenômeno da hibridização ainda não foi comprovado no parasito *T. cruzi*, apesar do encontro de linhagens híbridas como Tc-III, Tc-V e Tc-VI. A hibridização é um evento de trocas genéticas entre dois seres vivos que favorece o surgimento da variabilidade genética, portanto é um mecanismo sexual evolutivo que favorece a permanência de variações no código genético, que conseqüentemente pode ajudar o ser vivo a possuir um maior sucesso evolutivo. Além disso, algumas linhagens poderiam não se adaptar a uma dada espécie de triatomíneo e este funcionar como um filtro restringindo o desenvolvimento do *T. cruzi* como já descrito em *Rhodnius prolixus* (Garcia et al. 2007). Pretendemos nesta tese avaliar o desenvolvimento de diferentes isolados no intestino de *Triatoma infestans* avaliando a dinâmica de ocupação do intestino, bem como, o seu crescimento e ocorrência de uma hibridização.

O *T. infestans* e o *R. prolixus* são os principais vetores da doença de Chagas na América Latina e alvos de programas de controle (Schofield & Dujardin 1997). O primeiro foi introduzido no Brasil durante os processos migratórios junto aos pertences dos viajantes, o que selecionou populações exclusivamente domiciliadas (Aragão 1971). O *R. prolixus* é encontrado na Colômbia, Venezuela e América Central sendo encontrado em palmeiras podendo invadir o ambiente artificial (Schofield & Dias 1999). No ano de 2006, o Brasil recebeu uma certificação internacional de interrupção da transmissão do ciclo doméstico pelo *T. infestans* concedida pela Organização Pan-americana da Saúde e pela OMS. Este sucesso no controle ocorreu devido principalmente ao uso de inseticidas, melhorias habitacionais, controle dos bancos de sangue e vigilância epidemiológica (Dias 2015). Estas espécies são amplamente estudadas e de fácil manutenção em laboratório. Devido a sua importância epidemiológica, nesta tese utilizaremos estas duas espécies em diferentes abordagens experimentais.

Em triatomíneos o ciclo do *T. cruzi* é do tipo heteroxênico. O ciclo biológico do *T. cruzi* no hospedeiro invertebrado inicia-se quando o triatomíneo ingere formas tripomastigotas sanguíneas durante um repasto em um hospedeiro vertebrado infectado. No intestino médio do barbeiro ocorrerá o processo chamado de epimastigogênese, onde o parasito se diferencia em epimastigotas. 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 do intestino posterior, a qual ocorre através de interações hidrofóbicas e é também favorecida pelas características da cutícula do intestino posterior, as epimastigotas sofreram a metaciclogênese e transformaram em tripomastigotas metacíclicos, que são formas não-replicativas, mas infectivas aos hospedeiros vertebrados que são encontradas no reto eliminadas nas fezes e urina (Brenner, Z.; Andrade, Z. & Barral-Netto 2000). Na Figura 2 é possível observar os diferentes compartimentos pelos quais o parasito migra durante o seu desenvolvimento no intestino do vetor. Nesta tese, abordaremos a dinâmica de colonização nestes microambientes por diferentes clones afim de observar se ocorrem variações neste fenômeno.

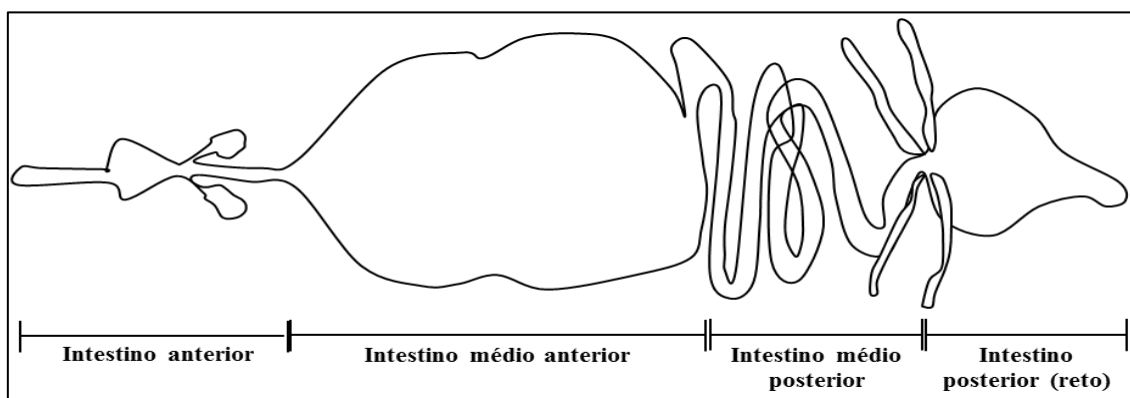


Figura 2. Tubo digestivo de um triatomíneo e suas subdivisões. O tubo digestivo de um triatomíneo é dividido em três porções: intestino anterior, intestino médio e intestino posterior ou reto. O intestino médio é ainda subdividido em intestino médio anterior e intestino médio posterior.

Finalmente, um último aspecto que iremos avaliar é o papel das vesículas extracelulares (VEs) liberadas pelo *T. cruzi* na interação com o triatomíneo. Estas estruturas foram inicialmente descritas para este parasito por Gonçalves et al. (1991) como sendo liberadas espontaneamente através da membrana plasmática. Recentemente, em outro tripanossomatídeo (*Leishmania*), as mesmas foram avaliadas durante a interação com

flebotomíneos. Neste caso, as VEs foram liberadas pela *Leishmania* e fizeram parte do inóculo durante a picada juntamente com os parasitos, microbiota e saliva. Em conjunto, todos estes componentes funcionam como agentes imunomoduladores para o estabelecimento da infecção no hospedeiro vertebrado (Atayde et al. 2015). Este assunto ainda é desconhecido para o triatomíneo uma vez que os trabalhos da literatura focaram na interação das VEs com o hospedeiro vertebrado, proteoma e microscopia (Gonçalves et al. 1991, Trocoli Torrecilhas et al. 2009, Torrecilhas et al. 2012, Nogueira et al. 2015, Ribeiro et al. 2018). Nesta tese, iremos avaliar se a ingestão prévia de VEs pelo triatomíneo tem a capacidade de afetar a ocupação no intestino e metaciclogênese após exposição a formas epimastigotas do parasito.

Em síntese, essa tese de doutorado avaliou a interação de diferentes clones do *T. cruzi* com dois vetores importantes: *T. infestans* e *R. prolixus*. Os seguintes fenômenos foram investigados: 1) o processo de colonização inicial e o desenvolvimento de diferentes linhagens/isolados no intestino de *T. infestans*; 2) o papel da exposição prévia às VEs na infecção/metaciclogênese em *T. infestans*/*R. prolixus* e, 3) a tentativa de hibridização de duas linhagens (Bug e YuYu) no intestino de *T. infestans*.

2. CAPÍTULO 1: INTERAÇÃO ENTRE *T. INFESTANS* E *T. CRUZI*: COMPORTAMENTOS DISTINTOS DE FORMAS EVOLUTIVAS EM DIFERENTES MICROAMBIENTES

2.1. RESUMO

Vários trabalhos sugerem que o intestino dos triatomíneos possa atuar como barreira biológica e selecionar linhagens de *T. cruzi*. Além disso, a maioria dos trabalhos na literatura têm estudado os eventos finais da infecção em triatomíneos que atestam o sucesso da infecção e a ocorrência de metaciclogênese. Neste contexto, iremos investigar: 1) a susceptibilidade de *T. infestans* a quatro clones do *T. cruzi*; 2) os eventos iniciais do desenvolvimento do *T. cruzi* no trato intestinal de *T. infestans* utilizando diferentes formas evolutivas (epimastigotas e tripomastigotas). Todos os quatro clones foram capazes de infectar o vetor *T. infestans* e realizar a metaciclogênese. Porém houve diferenças na densidade de parasitos dependendo da linhagem estudada (DM28c, YuYu, Bug e CL-Brener). Ao se comparar a dinâmica de infecção com epimastigotas entre o clone Bug e o Dm28c, observou-se que o clone Bug apresentou uma transição mais rápida para as porções posteriores do intestino (intestino médio posterior + intestino posterior). Finalmente, ao se infectar somente com tripomastigotas da linhagem Dm28c, observou-se que esta forma evolutiva rapidamente desaparece do intestino médio anterior quando comparada com os dados de alimentação com as formas epimastigotas. Em conclusão, o *T. infestans* foi susceptível aos quatro clones de *T. cruzi*. Além disso, a dinâmica da infecção e ocupação variou de acordo com o clone e a forma evolutiva utilizada na infecção.

2.2. ABSTRACT

Several reports suggested that the gut of triatomines could select *T. cruzi* strains and that this phenomenon depended on the parasite, vector or both. Besides, most of the studies focused on the final events of *T. cruzi* development that ensure infection success based on detectable densities and the occurrence of metacyclogenesis. In this context, in this work it was assessed: 1) *T. infestans* susceptibility to four *T. cruzi* clones; 2) the initial events of *T. cruzi* development in the gut of *T. infestans* using different evolutive forms (epi and trypomastigotes). All four clones were able to infect and accomplish metacyclogenesis in the vector. However, differences in the parasite densities were

observed depending on the clone. While comparing the infection dynamics with epimastigotes between Bug and Dm28c clones, the former performed a quicker transition to the posterior parts of the gut. Finally, after infection with trypomastigotes from Dm28c clone, the transition to the posterior midgut was faster compared to epimastigote infection. In conclusion, *T. infestans* was susceptible to four clones of *T. cruzi*. Also, infection dynamics varied according to clones and evolutive forms used in the infection.

2.3. INTRODUÇÃO

Para se estabelecer no vetor, o *T. cruzi* enfrenta condições adversas ao longo do tubo digestivo. O *T. cruzi* passa por mudanças presentes nos microambientes intestinais, como a ação de enzimas digestivas, membrana perimicrovilar e temperatura (Kollien & Schaub 2000, Garcia et al. 2010). Além disso, deve sobreviver a fatores produzidos pelo próprio vetor, que afetam a sobrevivência do parasito, tais como as lectinas (Pereira et al. 1981), fatores hemolíticos (Mello et al. 1996) e adesão ao epitélio (Nogueira et al. 2007). Além dos fatores presentes no lúmen e tecidos intestinais, os parasitos ainda estão sujeitos a períodos de escassez nutricional, que pode levar a uma redução e até mesmo perda da infecção no inseto em situações extremas (Schaub & Böker 1986, Schaub 1989, Kollien et al. 1998b).

Os dados na literatura tentam correlacionar as altas taxas de infecção e desenvolvimento de determinadas linhagens do parasito com a sua distribuição geográfica, biomas e hospedeiros vertebrados (de Fuentes-Vicente et al. 2018, Jansen et al. 2018). Essa complexa interação vem sugerindo nos últimos anos que não só os mamíferos, mas também o trato intestinal dos triatomíneos poderia selecionar linhagens do protozoário possuindo um papel decisivo na interação (Araújo et al. 2009). Além disso, a dinâmica de colonização das diversas partes do intestino poderia sofrer variações em diferentes linhagens/isolados de *T. cruzi*. Em nosso trabalho, tentaremos padronizar o uso do termo clones de diferentes linhagens quando nos referirmos aos nossos experimentos. Entretanto o uso do termo cepa também poderá ser empregado ao se referir a outros trabalhos da literatura.

O desenvolvimento do *T. cruzi* no vetor parece estar relacionando a múltiplos fatores tanto do parasito quanto do inseto, dentre eles: a habilidade da cepa em se adaptar ao vetor, a susceptibilidade do vetor a uma dada cepa ou a uma combinação de ambos. As variações nas taxas de infecção em diferentes triatomíneos sempre foram objeto de interesse de diferentes pesquisadores em vários países. Isto refletia a necessidade do uso do xenodiagnóstico em áreas endêmicas da doença do Chagas e a busca de um “vetor ideal” (Dias 1940).

Os primeiros trabalhos começaram na década de 40 onde a mesma cepa de *T. cruzi* infectou 90,4% dos espécimes de *Panstrongylus megistus* e apenas 54,7% daqueles de

R. prolixus, quando estes insetos foram alimentados em animais infectados (Dias 1940). Posteriormente, outro estudo no México comparou a susceptibilidade de *T. infestans* e *T. barberi* à 5 cepas diferentes de *T. cruzi* (Little et al. 1966). Os resultados mostraram que *T. barberi* foi mais susceptível do que *T. infestans* para adquirir a infecção (95% versus 86%). Estes estudos mostraram que a susceptibilidade ao *T. cruzi* entre vetores pode variar, embora as taxas de infecção ainda tenham sido muito altas.

Outro estudo extremamente completo avaliou a susceptibilidade de nove vetores a cepa Y (Perlowagora-Szumlewicz & Müller 1982). Os triatomíneos foram alimentados em cobaias previamente infectadas. Foi observado que as taxas de infecção variaram entre as diferentes espécies de 1 a 100%. Entretanto o dado mais interessante neste trabalho foi mostrar que as espécies de triatomíneos domésticas (*T. infestans* e *R. prolixus*) se infectavam menos que as silvestres (*Rhodnius neglectus*, *P. megistus* e *Triatoma pseudomaculata*). Posteriormente, o mesmo grupo testou três cepas de *T. cruzi* (Y, Colombiana e “São Felipe”) afim de avaliar se este mesmo padrão se repetiria e obteve-se a mesma conclusão (Perlowagora-Szumlewicz et al. 1990).

Esses resultados refletem o interesse que se havia naquela época em se detectar a presença do parasito em pacientes em fase crônica onde as parasitemias eram mais baixas e os testes diagnósticos imunológicos não eram acessíveis em muitas áreas endêmicas. Mais recentemente, o xenodiagnóstico caiu em desuso, porém os estudos adquiriram um caráter mais de pesquisa básica para se entender aos mecanismos por trás das diferentes susceptibilidades dos vetores. Um dado interessante é que além dos fatores relacionados ao parasito e ao vetor, a microbiota residente no intestino também pode afetar o desenvolvimento da cepa Y. Foi demonstrado que a mesma não infecta *R. prolixus* na presença da bactéria *Serratia marcescens*, enquanto o clone Dm28c cresce normalmente (Azambuja et al. 2004, Vieira et al. 2016)

Entretanto, além de infectar o vetor, o parasito deve ser capaz de realizar a metaciclogênese para produzir formas metacíclicas infectantes que possam ser transmitidas a um novo hospedeiro. Neste contexto, em *T. infestans*, as cepas Y, CL e YuYu foram capazes de colonizar e realizar a metaciclogênese no tubo intestinal desse inseto. Porém a cepa Y mostrou não ser tão bem adaptada a esse vetor exibindo uma breve infecção com baixas densidades metacíclicas (Alvarenga & Bronfen 1997). Uma característica importante e bastante visível dos trabalhos descritos acima é que os

mesmos estão sempre voltados para as etapas finais que atestariam o estabelecimento da infecção. Entretanto, pouca atenção tem sido dada aos eventos iniciais após a infecção do vetor em sua ocupação do intestino.

Apenas um trabalho em *R. prolixus* infectado com o clone CL mostrou que houve uma redução de 20% no número de parasitos no intestino médio anterior nas três primeiras horas de infecção. Após 24 horas, essa redução foi ainda maior, alcançando valores próximos a 80%. Esses resultados sugerem a ocorrência de uma drástica diminuição no número de parasitos no intestino médio anterior antes da epimastigogênese (Ferreira et al. 2016).

Com base nesta lacuna, nesta tese exploraremos o papel do tubo intestinal de *T. infestans* na dinâmica de crescimento e ocupação por diferentes clones de *T. cruzi*. Estes incluem DM28c (Tc-I), YuYu (Tc-II), Bug2145cl10 (TcV) e CL Brener (TcVI). Pretendemos avaliar os eventos iniciais da infecção no vetor e também investigar como as formas evolutivas (epimastigotas ou tripomastigotas) usadas na infecção afetaria este fenômeno.

2.4. JUSTIFICATIVA

Nesta tese pretendemos fornecer maiores informações sobre o fenômeno da interação parasito-vetor entre *T. infestans* e diferentes clones de *T. cruzi*. Deste modo, avaliamos alguns parâmetros que incluem: a susceptibilidade a diferentes linhagens, a colonização inicial do trato intestinal de *T. infestans* por formas epimastigotas dos clones Bug e Dm28c e, finalmente, o desenvolvimento do clone DM28c em *T. infestans* em infecções iniciadas a partir da ingestão de formas tripomastigotas sanguíneas. Pretendemos com estas informações entender como o trato intestinal do vetor pode afetar a interação com *T. cruzi* e fornecer novas informações sobre este fenômeno.

2.5. OBJETIVOS

2.5.1. OBJETIVO GERAL:

- Avaliar os padrões de colonização e crescimento de diferentes clones de *T. cruzi* no tubo digestivo de *T. infestans*.

2.5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar os padrões de crescimento de quatro clones de *T. cruzi*: Dm28c-TcI, YuYu-TcII, Bug2145cl10-TcV e CL Brener-TcVI em cultura;
- Avaliar os perfis de susceptibilidade do *T. infestans* aos clones de *T. cruzi*;
- Avaliar o início do processo de colonização do intestino de *T. infestans* por epimastigotas dos clones Dm28c-TcI e Bug2145cl10-TcV;
- Avaliar a dinâmica de desenvolvimento do clone Dm28c-TcI em *T. infestans* a partir da infecção por tripomastigotas sanguíneas.

2.6. MATERIAIS E MÉTODOS

2.6.1 CLONES DE *T. CRUZI* E INSETOS.

Os clones de *T. cruzi* utilizados estão listados na Tabela 1. As formas epimastigotas foram cultivadas em meio LIT suplementado com 15% de soro fetal bovino (SFB), estreptomicina (100 µg/mL) e penicilina (100 unidades/mL) (27°C e pH 7,2). Os espécimes de *T. infestans* utilizados neste estudo foram obtidos de uma colônia de laboratório derivada de insetos coletados no Brasil. Os triatomíneos foram mantidos a $25 \pm 1^\circ\text{C}$, $60 \pm 10\%$ de umidade relativa e iluminação natural. Os insetos foram alimentados em camundongos anestesiados intraperitonealmente com quetamina (150 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg). As ninfas de quarto estágio, com 30 dias pós-muda, foram utilizadas nos experimentos (Ferreira et al. 2016).

Tabela 1. Clones utilizados no estudo.

Linhagem	Origem	Local	DTU	Denominação no texto	Referência
Dm28c	<i>Didelphis marsupialis</i>	Carabobo, Venezuela	TcI	Dm28c	(Contreras et al. 1988)
YUYU	<i>T. infestans</i>	Minas Gerais, Brasil	TcII	YuYu	(Filardi & Brener 1987)
Bug2145cl10	<i>T. infestans</i>	Rio Grande do Sul, Brasil	TcV	Bug	(Zingales et al. 2009)
CL-Brener	<i>T. infestans</i>	Rio Grande do Sul, Brasil	TcVI	CL-Brener	(Zingales et al. 1997)

2.6.2 CURVAS DE CRESCIMENTO DE PARASITOS EM CULTURA

Para conhecer o perfil de crescimento dos clones de *T. cruzi*, os parasitos foram obtidos de uma cultura em fase estacionária em LIT com 15% de soro fetal. Os mesmos foram diluídos, em triplicata, em garrafas de cultivo na concentração de 1×10^5 parasitos/mL. O crescimento foi monitorado diariamente até a fase estacionária e posterior declínio através de contagem em câmara de Neubauer.

2.6.3 ALIMENTAÇÃO ARTIFICIAL COM EPIMASTIGOTAS

Para alimentação artificial das ninfas de quarto ou quinto estágio dependendo do experimento de *T. infestans* com epimastigotas de cultura foram usados alimentadores de vidro conectados a um banho-maria com circulação interna e externa de água ($36 \pm$

1°C). As ninfas foram alimentadas com sangue de coelho citratado e inativado (30 min, 56 °C). O mesmo foi obtido do CECAL (Centro de Criação de Animais de Laboratório), Fiocruz, Rio de Janeiro. O sangue continha uma concentração final de 1×10^4 parasitos/ μL .

2.6.4 INFECÇÃO DE CAMUNDONGOS

Camundongos knockout para interferon gama (INF- γ) (B6.129S7) foram infectados por via intraperitoneal com tripomastigotas metacíclicas de *T. cruzi* (clone DM28c) em PBS 1x (PBS; 0.15M NaCl em 0.01M de fosfato de sódio, pH 7,2). Semanalmente a parasitemia dos camundongos foi monitorada por esfregaços sanguíneos e posterior quantificação utilizando-se microscópio óptico. Os ensaios foram realizados quando foram contados pelo menos três parasitos/por campo.

2.6.5 EXPERIMENTOS

2.6.5.1 AVALIAÇÃO DA SUSCEPTIBILIDADE DOS TRIATOMÍNEOS AOS DIFERENTES CLONES DE *T. CRUZI*.

Cada grupo experimental de ninfas de quarto estágio de *T. infestans* (n=50) foi alimentado com sangue contendo somente um clone de *T. cruzi*. Após 28 (n=15) e 49 dias (n=15) da alimentação infectiva os insetos foram alimentados novamente em sangue de coelho, para eliminação da urina. Para a coleta da urina, as ninfas foram transferidas para tubos de 1,5mL imediatamente após o término da alimentação onde permaneceram por aproximadamente 3 horas. Dez μL de cada amostra foram fixados em metanol a 10% e corados com Giemsa[®]. Após a secagem total das lâminas, foi realizada a quantificação dos parasitos presentes na urina em microscópio óptico contando todos os campos da lâmina.

Para a quantificação de parasitos no trato intestinal das ninfas, nos tempos de 49-50 dias da alimentação infectiva, ninfas de quinto estágio (n=20), as mesmas ninfas iniciais do experimento que mudaram de estágio, tiveram seus intestinos dissecados em duas porções: intestino médio (anterior e posterior) e intestino posterior (reto) (R), que foram transferidas para tubos de 1,5mL contendo 20 μL de PBS e maceradas com o auxílio de um pistilo. A quantificação dos parasitos obtidos nesta etapa foi realizada em câmara de Neubauer.

2.6.5.2 AVALIAÇÃO DA DINÂMICA DE COLONIZAÇÃO DO TRATO INTESTINAL DE *T. INFESTANS* POR *T. CRUZI*

2.6.5.2.1 INFEÇÃO UTILIZANDO-SE EPIMASTIGOTAS DE CULTURA

Para avaliar comparativamente o processo de colonização inicial do trato intestinal pelo parasito *T. cruzi* em *T. infestans* foram realizados ensaios utilizando-se a estratégia da alimentação artificial com sangue citratado e inativado contendo (1×10^4 epimastigotas/ μL) dos clones Dm28c e Bug de *T. cruzi*.

Para a quantificação dos parasitos no trato intestinal das ninfas, nos tempos de 3 (n=15) e 72h (n=15) após a alimentação infectiva, ninfas de quinto estágio (n=30) tiveram seus intestinos dissecados em duas porções: intestino médio anterior (IMA) e intestino médio posterior (IMP) + intestino posterior (reto) (R), que foram transferidas para tubos de 1,5mL contendo 20 μL de PBS e maceradas com o auxílio de um pistilo. A quantificação dos parasitos obtidos nesta etapa foi realizada através da contagem do número de parasitos em 5mm³ de sangue como previamente descrito por Brener (Brener 1962).

2.6.5.2.2 INFEÇÃO COM TRIPOMASTIGOTAS SANGUÍNEAS.

Para avaliar comparativamente o processo de colonização inicial do trato intestinal pelo parasito *T. cruzi* em *T. infestans* foi realizado outro ensaio utilizando-se agora a estratégia da alimentação dos triatomíneos em camundongo (B6.129S7) infectado com o clone Dm28c. Camundongos infectados foram usados na alimentação de ninfas de quarto estágio de *T. infestans* (n= 70).

Para quantificação dos parasitos no trato intestinal das ninfas, foram realizadas dissecações nos tempos de 3, 24 e 72h, 7 e 21 dias após a infecção (n= 14 para cada tempo). As ninfas tiveram seus intestinos dissecados em duas porções: IMA e IMP + R, que foram transferidas para tubos de 1,5mL contendo 20 μL de PBS e maceradas com o auxílio de um pistilo. Em cada tempo de dissecação, 5 μL de cada amostra (n=7 a 10) foram fixadas em metanol a 10% e coradas com Giemsa[®]. Após a secagem total das lâminas, foi realizada a quantificação dos parasitos presentes nas duas porções intestinais em microscópio óptico contando-se todos os campos da lâmina.

2.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A normalidade dos dados foi testada através do teste Kolmogorov-Smirnov. As análises dos dados paramétricos 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 $p < 0,05$. Para a análise da quantidade de parasitos presentes na urina de *T. infestans* que foi realizada em dois momentos diferentes da infecção, os dados foram inicialmente submetidos a um GLZ (“*Generalized linear/non linear model*”) que mostrou não haver diferenças no número de parasitos entre as duas avaliações. Sendo assim, os dados foram unidos e submetidos ao teste de Kruskal-Wallis com posterior teste de Dunn para comparações múltiplas, sendo as diferenças observadas consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$.

2.8. RESULTADOS

2.8.1 CURVA DE CRESCIMENTO

Para avaliar comparativamente o crescimento das linhagens de *T. cruzi* em meio de cultura foi realizada uma curva de crescimento. Estes experimentos nos permitiram identificar o melhor momento da curva para obter os parasitos viáveis (fase log tardia) para as infecções e os diferentes perfis de crescimento. As linhagens apresentaram diferentes padrões de crescimento, atingindo a fase estacionária após o 15º dia. A linhagem CL-Brener apresentou a maior densidade alcançando $7,8 \times 10^7$ parasitos/mL enquanto a YuYu alcançou apenas $1,8 \times 10^7$ parasitos/mL (Figura 3).

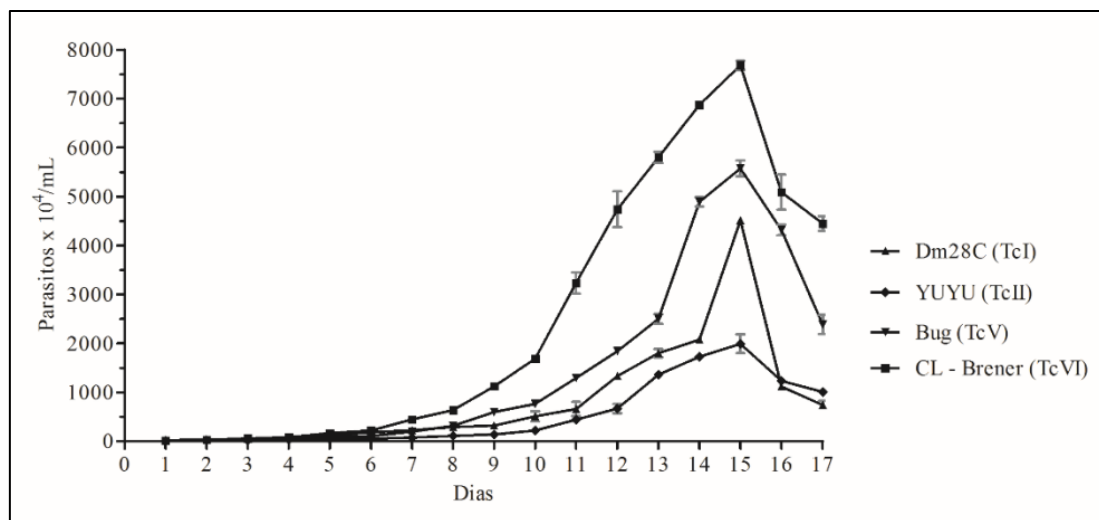


Figura 3. Curvas de crescimento das formas epimastigotas de *T. cruzi* (Dm28c, YuYu, Bug e CL-Brener) em meio LIT suplementado com 15% de soro fetal bovino. Os parasitos foram diluídos, em triplicata, em garrafas de cultivo na concentração de 1×10^5 parasitos/mL. O crescimento foi monitorado diariamente até a fase estacionária e posterior declínio através de contagem em câmara de Neubauer.

2.8.2 AVALIAÇÃO DO DESENVOLVIMENTO DE DIFERENTES CLONES DE *T. CRUZI* EM *T. INFESTANS* UTILIZANDO-SE EPIMASTIGOTAS DE CULTURA PARA A INFECÇÃO.

Para avaliar o desenvolvimento de diferentes clones de *T. cruzi* em *T. infestans*, os intestinos dos triatomíneos foram dissecados nos dias 49-50 dias após a alimentação infectiva. Todos os clones foram capazes de estabelecer e manter a infecção neste vetor. (Figura 4).

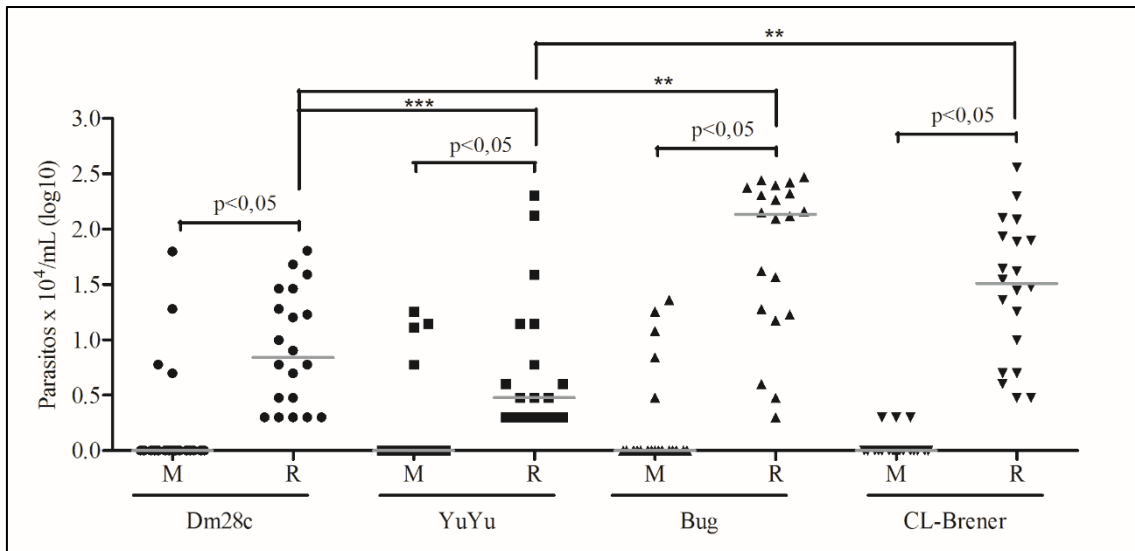


Figura 4. Parasitos de diferentes clones de *T. cruzi* encontrados ao longo do tubo digestivo de *T. infestans* após 49-50 dias de infecção. Cada ponto representa a quantificação dos parasitos de um inseto e cada barra horizontal corresponde à mediana do grupo avaliado. Legenda: M: Intestino médio (anterior + posterior) e R: Reto.

Após 49 dias de infecção ainda foram encontrados parasitos no intestino médio de todas as linhagens de *T. cruzi* investigadas não havendo diferenças estatísticas entre o número quantificado de parasitos (Figura 4, Kruskal-Wallis, n.s.). Já no reto a quantidade de parasitos variou dependendo da linhagem estudada (Figura 4, teste Kruskal-Wallis, $P < 0.0001$). Os clones CL-Brener e Bug apresentaram as maiores quantidades de parasitos (Figura 4; Dunn; YuYu vs Dm28c e CL-Brener, Bug vs CL-Brener, $P < 0,05$ para todas as comparações).

A comparação do número de parasitos entre as duas porções intestinais para cada um dos clones mostrou que o reto apresentou quantidades significativamente maiores de parasitos do que o intestino médio em todos os clones analisados (Figura 4, Mann Whitney, $p < 0,05$ para todas as comparações).

Para a avaliação dos parasitos liberados durante o processo de diurese, foram realizadas coletas de urina nos dias 28 e 49 pós-infecção. O exame de lâminas coradas mostrou que os tripomastigotas metacíclicos foram a forma evolutiva mais encontrada na urina. As percentagens de tripomastigotas metacíclicos/ μL foram em média de 100 ± 0 ; $98,5 \pm 6,2$; $97,9 \pm 6,1$ e 100 ± 0 para as linhagens Dm28c, YuYu, Bug e CL-Brener, respectivamente.

Os números de tripomastigotas metacíclicos encontrados nas lâminas foram inicialmente submetidos a um teste GLZ onde testamos os efeitos do tempo e dos diferentes clones no número total de parasitos. A análise mostrou que o número de parasitos somente foi afetado pelo tipo de clone utilizado (GLZ, $P < 0,0001$). Sendo assim, os dados de 28 e 49 dias foram combinados e submetidos ao teste de Kruskal-Wallis e ao teste de Dunn para as comparações par a par. A análise confirmou que o número de parasitos foi afetado pela linhagem de *T. cruzi* (Kruskal-Wallis, $p < 0,0001$) e mostrou que o clone Bug apresentou a maior densidade populacional quando comparado aos demais (Figura 5, Dunn, Bug vs Dm28c, YuYu e CL-Brener, $P < 0,05$ para todas as comparações).

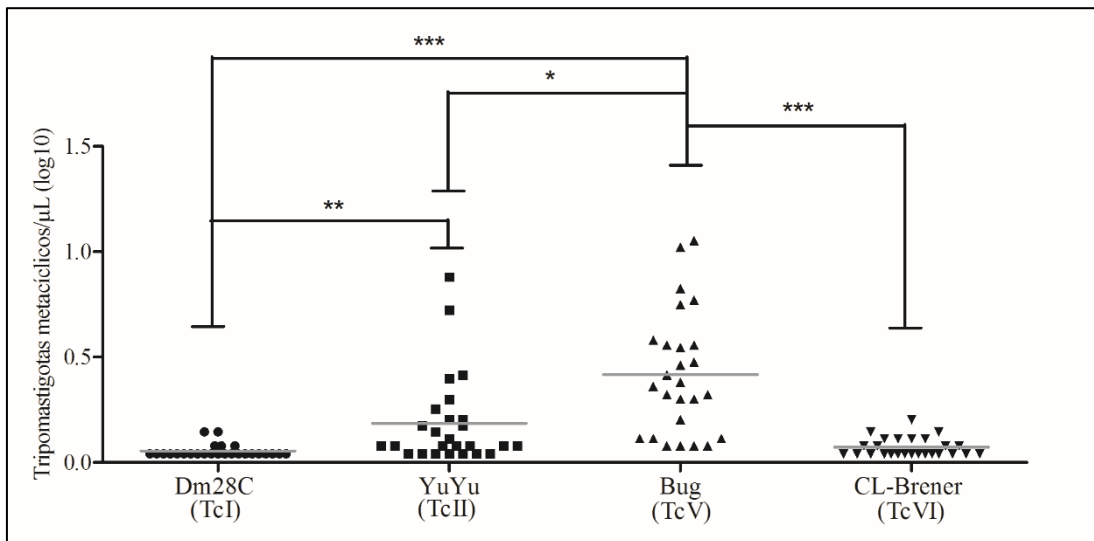


Figura 5. Tripomastigotas metacíclicos na urina de *T. infestans* infectados por diferentes linhagens/clones de *T. cruzi*. Cada ponto representa a quantificação dos parasitos de um inseto e cada barra horizontal corresponde à mediana do grupo avaliado.

2.8.3 COLONIZAÇÃO DO TRATO INTESTINAL DE *T. INFESTANS* PELAS LINHAGENS/CLONES DM28C E BUG UTILIZANDO-SE EPIMASTIGOTAS DE CULTURA PARA A INFECÇÃO.

Para avaliar o início do processo de colonização do *T. cruzi* no intestino médio do *T. infestans* foi utilizada a estratégia de alimentação artificial com sangue de coelho contendo formas epimastigotas dos clones Dm28c e Bug. As ninfas infectadas com Dm28c apresentaram uma redução de 44% no número de parasitos presentes no intestino médio anterior entre 3 e 72h após a alimentação infectiva (Figura 6A, Mann Whitney, $P < 0,05$). Nas três primeiras horas de infecção não foram visualizados

parasitos no intestino médio posterior + intestino posterior (Figura 6B). Em 72h após a alimentação infectiva o número de parasitos encontrados no intestino médio posterior + intestino posterior foi de 2,70 - 3,40 parasitos/ μ L (log 10) (Figura 6B).

No caso da linhagem Bug houve uma redução de 100% no número de parasitos encontrados no intestino médio anterior entre 3 e 72h após a alimentação infectiva (Figura 6C, Mann Whitney, $P < 0,05$). Da mesma forma que o observado para o clone Dm28c, não foram observados parasitos no intestino médio posterior + intestino posterior nas três primeiras horas pós-infecção (Figura 6D). O número de parasitos encontrados no intestino médio posterior + intestino posterior após 72h da alimentação infectiva foi de 1,92 - 3,15 parasitos/ μ L (log 10) (Figura 6D).

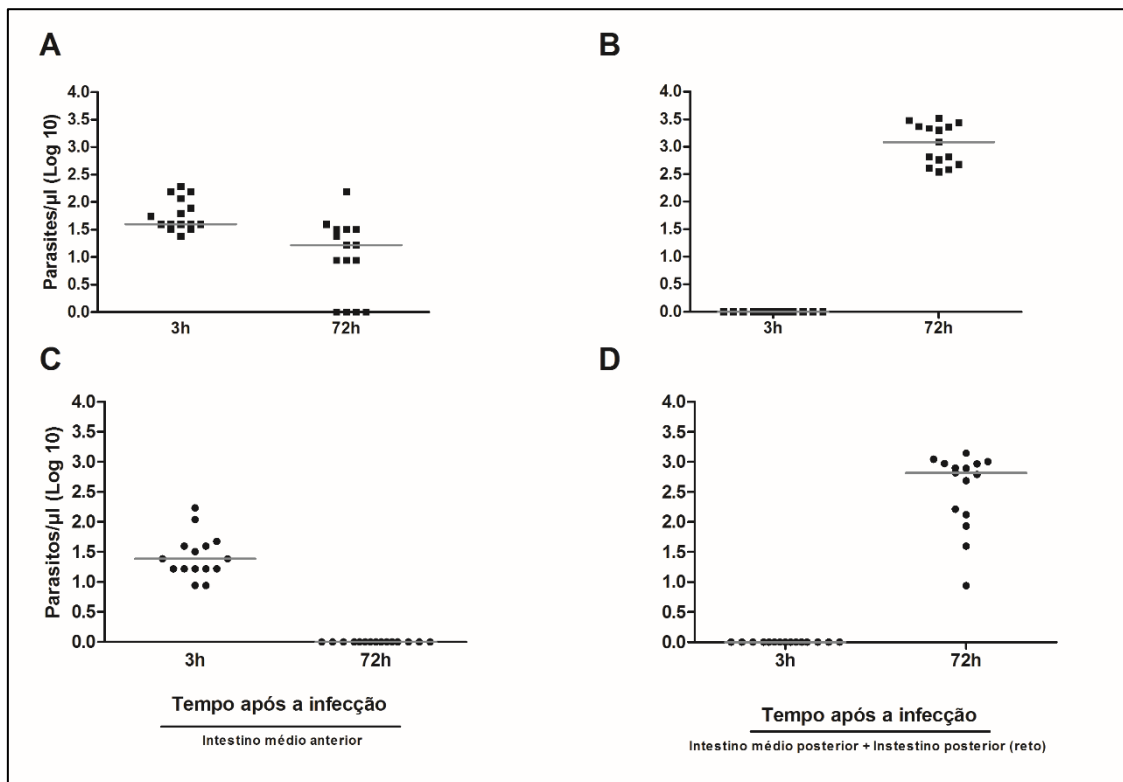


Figura 6. Perfil temporal da quantidade de parasitos/ μ L dos clones DM28c (A e B) e Bug (C e D) encontrados no intestino médio anterior e intestino médio posterior + reto de *T. infestans* após alimentação infectiva com epimastigotas de cultura. Cada ponto representa a quantificação dos parasitos de um inseto e cada barra horizontal corresponde à mediana do grupo avaliado.

2.8.4 AVALIAÇÃO DO DESENVOLVIMENTO DO CLONE DM28c EM *T. INFESTANS* UTILIZANDO-SE TRIPOMASTIGOTAS SANGUÍNEAS PARA A INFECÇÃO.

Uma vez que a maioria dos trabalhos publicados utiliza formas epimastigotas de cultura para a infecção dos triatomíneos, o quarto objetivo do presente estudo foi avaliar se a forma de desenvolvimento do parasito utilizada na infecção poderia modificar a dinâmica de colonização do intestino de *T. infestans*. Para isso, ninfas de *T. infestans* foram alimentadas em camundongos (B6.129S7) infectados previamente com formas tripomastigotas metacíclicas do clone Dm28c. Em diferentes períodos pós-infecção, as ninfas tiveram seus intestinos dissecados e separados em duas porções: intestino médio anterior e intestino médio posterior + reto. O número de parasitos foi quantificado através de contagem a fresco (Brenner 1962) e a porcentagem de formas presentes, estimada a partir do exame de lâminas coradas.

Diferentemente do observado quando os insetos foram alimentados com formas epimastigotas, em que se observou no intestino médio anterior a presença de parasitos em até 72h pós-infecção (Figura 7A), no exame a fresco desse ensaio somente foram encontrados parasitos nessa porção intestinal em 3 e 24h após a alimentação infectiva (Figura 7A). Entre esses intervalos houve uma redução de 77,11% na quantidade total dos parasitos (Figura 7A, Mann Whitney, $P < 0,0001$). O número de parasitos quantificados no IMP + R aumentou durante o período avaliado (Figura 7B, Kruskal-Wallis, $p < 0,0001$) sendo que o crescimento máximo foi observado no sétimo dia pós-infecção com um número médio de 2.773 parasitos/ μ L (Figura 7B). As menores quantidades de parasitos foram encontradas no período de 24h (Figura 7B, Dunn, 24 horas vs 7 dias e 21 dias, $P < 0,05$ para todas as comparações).

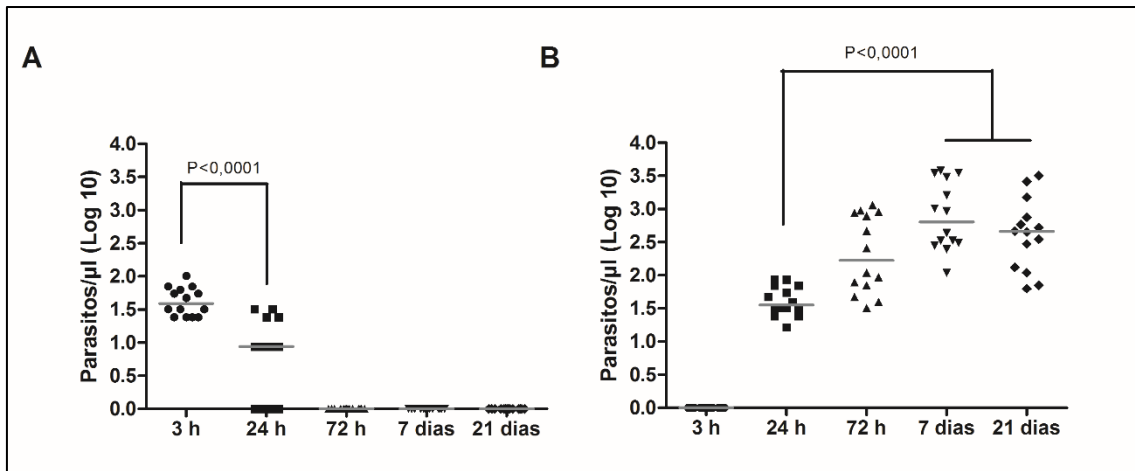


Figura 7. Número de parasitos encontrados no intestino médio anterior (A) e intestino médio posterior + reto (B) de ninfas de *T. infestans* após alimentação em camundongos infectados. Cada ponto representa a quantificação dos parasitos de um inseto e cada barra horizontal corresponde à mediana do grupo avaliado.

Após análise das lâminas coradas foi possível caracterizar as formas evolutivas do clone Dm28c nas várias porções intestinais e nos diferentes períodos avaliados (Figura 8). Nas primeiras 3 e 24h pós-infecção todos os parasitos encontrados no intestino médio anterior foram tripomastigotas sanguíneos (Figura 8A). Ao contrário do observado no intestino médio anterior nas contagens a fresco onde não foram encontrados parasitos no período de 72h pós-infecção (Figura 7A), uma pequena quantidade de formas intermediárias (n=8) foi observada nas lâminas coradas desse período (Figura 8A). Já no intestino médio posterior + reto foram observadas formas intermediárias e epimastigotas a partir das 72h pós-infecção. A partir do sétimo dia, formas tripomastigotas metacíclicas também foram encontradas nessas porções intestinais (Figura 8B).

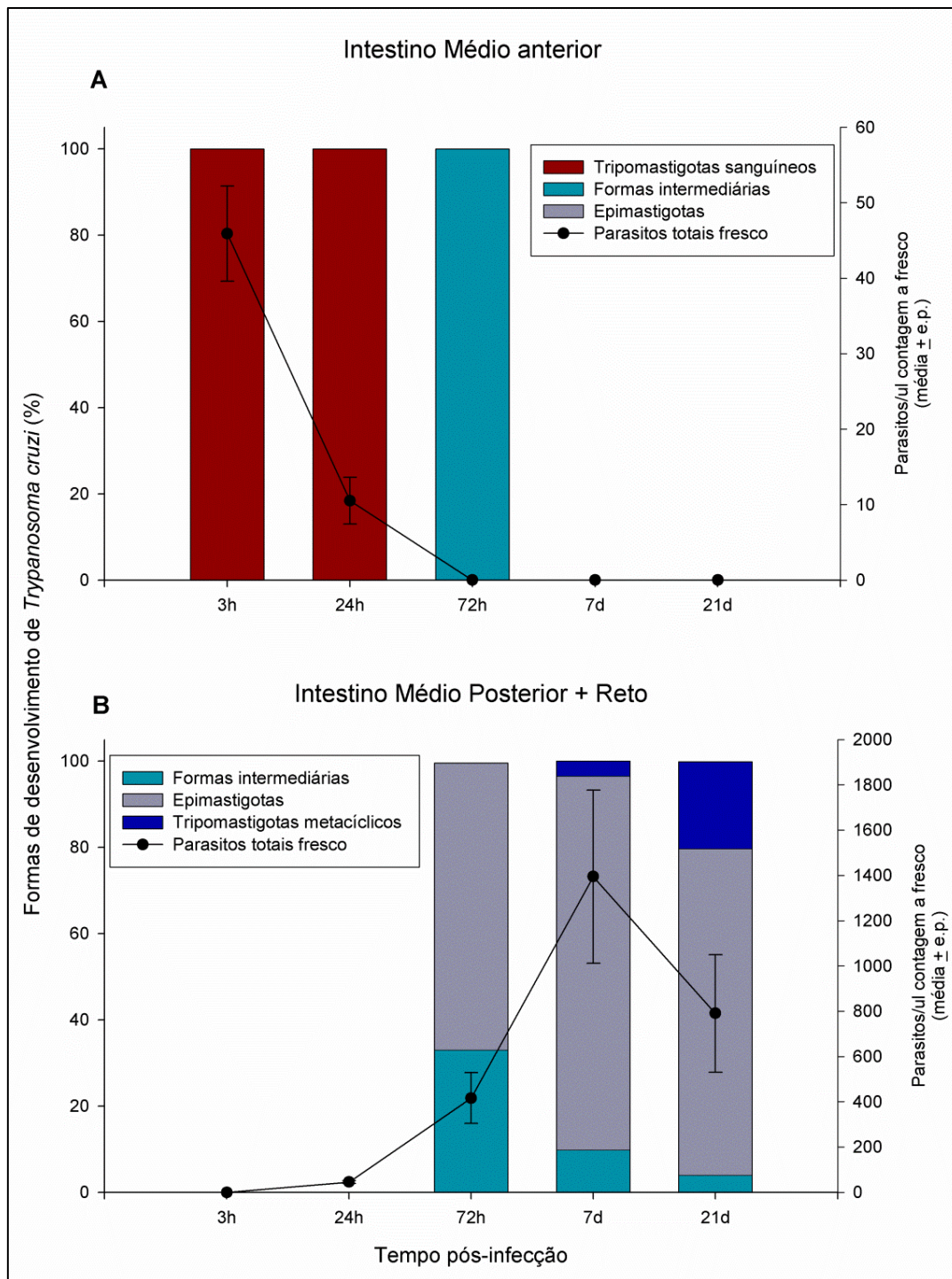


Figura 8. Avaliação temporal mostrando a diferenciação das formas de desenvolvimento da cepa DM28c em diferentes porções do intestino de ninfas de *T. infestans*. A porcentagem de parasitos para o intestino médio anterior (A) e intestino médio posterior + reto (B) foi calculada contando-se todos os campos das lâminas coradas (n=7 a 10 lâminas avaliadas para cada tempo). O número médio de parasitos encontrados em cada porção intestinal foi plotado no eixo direito para representar o total da carga parasitária (todas as formas evolutivas) em cada porção e período.

2.9. DISCUSSÃO

Sabe-se que as formas epimastigotas de diferentes DTUs de *T. cruzi* podem exibir distintos padrões de crescimento em meio de cultura. Para compreender os padrões de crescimento das formas epimastigotas do *T. cruzi*, vários trabalhos buscaram investigar esses perfis por meio de estudos envolvendo curvas de crescimento (Yabsley & Noblet 2002, Ribeiro et al. 2016, Silva et al. 2018). Alguns parasitos podem atingir o pico de crescimento em períodos curtos, como por exemplo, as linhagens 17665B e 17665F de *Trypanossoma janseni*, isolado de *Didelphis aurita* no estado do Rio de Janeiro, Brasil, que já com três dias teve um pico de crescimento variando de 9×10^6 – 1×10^7 parasitos/mL, respectivamente (Lopes et al. 2018) e outras formas epimastigotas podem atingir em períodos mais longos, que podem chegar a 17 (Yabsley & Noblet 2002) ou 33 dias de cultura (Silva et al. 2018). Ainda há exemplos de parasitos que podem atingir mais de um pico de crescimento durante a curva de crescimento (Silva et al. 2018).

Em um estudo realizado na cidade de Vila Alegre, município de Maria Madalena, Rio de Janeiro, procurou-se avaliar parâmetros morfológicos e ultraestruturais de três linhagens de *T. cruzi*, que foram isolados do hospedeiro invertebrado *Triatoma vitticeps* em diferentes lugares: local desmatado (SMM98), mata com vegetação conservada (SMM36) e dentro da cidade de Vista Alegre (SMM1). As linhagens SMM98 e SMM36 exibiram dois picos de crescimento, o primeiro 20° e o segundo no 33° dia, atingindo um crescimento máximo de 2.1×10^5 e 9×10^4 parasitos/mL, respectivamente (Silva et al. 2018).

Em nosso trabalho ao contrário de (Silva et al. 2018), todos os DTUs estudados (TcI, TcII, TcV e TcVI), apresentaram um único pico de crescimento. Todos os *T. cruzi* atingiram o pico de crescimento no 15° de cultura. Diferente do trabalho de (Ribeiro et al. 2016), que investigou o crescimento de dois parasitos *T. cruzi*, um pertencente ao TcI e o outro TcII, concluindo que a linhagem Y (TcII) exibiu a maior capacidade de multiplicação. Em nosso trabalho, o DTU que teve a menor densidade populacional na curva de crescimento foi o TcII (YuYu). O número máximo de parasitos foi de 1.8×10^7 parasitos/mL, contagem igual ao que foi encontrado na linhagem Y de *T. cruzi* no 9° dia de cultura por (Ribeiro et al. 2016). Os dados de curva de experimento obtidos nas quatro linhagens investigadas (Dm28c, YuYu, Bug e CL-Brener) neste estudo foram

muito importantes pois oferecem informações para estudos futuros que busquem utilizar o modelo epimastigotas em meio LIT.

Na natureza, os triatomíneos podem se alimentar em diferentes hospedeiros em vários biótopos. Isto confere uma alta complexidade nas relações parasito-hospedeiro quando se leva em consideração o grande número de espécies de vetores bem como as diferentes linhagens de *T. cruzi*. Neste contexto, desde o descobrimento da doença de Chagas, pesquisadores de vários países sempre estiveram interessados em entender e avaliar o potencial de diferentes espécies de triatomíneos em se infectar e tornarem potenciais vetores.

Estudos pioneiros já mostravam o triatomíneo como um inseto extremamente útil para o xenodiagnóstico (Dias 1939, 1940). Nesta época, a doença de Chagas se encontrava em franca expansão no Brasil e outros países da América Latina e a ausência de um teste sorológico sensível na prática exigia o uso do xenodiagnóstico como uma alternativa mais rápida para a detecção da doença. Em outros países, como o México, isto também foi buscado não só utilizando espécies endêmicas como não endêmicas para se avaliar se isso afetaria a especificidade de determinados vetores pelas cepas locais do parasito (Little et al. 1966).

Historicamente, essa necessidade perdurou até as décadas de 80 e 90, onde o trabalho basilar de Perlowagora-Szumlewics & Muller (1982) testou a susceptibilidade de nove espécies de triatomíneos (silvestres e domiciliados) à infecção pela cepa Y. De modo interessante estes autores observaram que os triatomíneos com hábitos mais silvestres se infectavam melhor que os domiciliados como *T. infestans* e *R. prolixus*. Estes experimentos foram realizados em cobaias infectadas mostrando a necessidade em se realizar o xenodiagnóstico numa condição de baixa parasitemia que refletiria o cenário de pacientes em sua maioria crônicos no campo.

Em nosso trabalho, nós utilizamos o triatomíneo da espécie *T. infestans*, pois em relação aos dados anteriores do grupo foram os insetos mais susceptíveis as quatro linhagens de *T. cruzi* utilizados (Dm28c, YuYu, Bug e CL-Brener). Diferente do trabalho anterior (Perlowagora-Szumlewics et al. 1990), foi utilizada aqui a infecção artificial em alimentadores de vidro com formas epimastigotas de cultura onde a concentração de parasitos é muito maior do que em um animal infectado o que justificaria a alta

susceptibilidade deste vetor sob as nossas condições experimentais. A alimentação infectiva artificial utilizando formas epimastigotas de cultura é um método mais simples e de fácil uso em laboratório. A densidade das diferentes linhagens variou sendo que as linhagens Bug (Tc-V) e CL-Brener (Tc-VI) apresentaram altas densidades de parasitos. É importante ressaltar que nas quatro linhagens a quantidade de parasitos encontrados após 49 dias foi muita baixa no intestino médio (anterior + posterior) confirmando a necessidade do parasito de se alcançar porções posteriores para continuar o ciclo.

Neste ínterim, avaliamos também a presença de formas metacíclicas que foram coletadas na urina e todas as linhagens foram capazes de desenvolver estas formas em *T. infestans*. Nossos resultados com diferentes linhagens confirmam os previamente descritos com outras linhagens de *T. cruzi* em *T. infestans* (de Lana et al. 1998). No referido trabalho, foram utilizadas 20 cepas de *T. cruzi* pertencentes a três genótipos clonais (19/20, 39 e 32). Vale ressaltar que essa classificação foi anterior à das DTUs e utilizou outros marcadores como isoenzimas e RAPD. Neste trabalho, a clone Bug também foi utilizado sendo classificado com o genótipo 39 que apresentou a segunda maior densidade de parasitos dentro do *T. infestans*. No nosso trabalho, os clones Bug e YuYu foram os que melhor cresceram comparado aos outros. Em síntese, os resultados aqui apresentados e os de outros autores mostram claramente que as diferentes linhagens de *T. cruzi* possuem variações na sua capacidade de crescer dentro do triatomíneo.

Trabalhos (Araújo et al. 2009, de Fuentes-Vicente et al. 2018) têm discutido o papel dos triatomíneos na seleção de linhagens de *T. cruzi*. Um trabalho bastante interessante mostrou que ao se infectar *R. prolixus* com duas cepas de *T. cruzi* que apenas uma delas foi capaz de sobreviver dentro do vetor (Gonzalez & Garcia 1992, Garcia et al. 2007). Isto sugere que na natureza onde o triatomíneo seja capaz de se alimentar várias vezes que a possibilidade do mesmo em se infectar com mais de uma cepa poderia resultar em uma competição interna dentro do vetor. Isto poderia em última análise favorecer o estabelecimento de uma linhagem em detrimento da outra.

Embora não tenhamos realizado infecções mistas em nosso trabalho, nossos dados mostram que alguns clones foram capazes de crescer mais do que outros. Isso reforça a ideia de que na natureza, onde o triatomíneo tem acesso limitado ao sangue, à ausência de nutrientes possa afetar a competição entre linhagens no intestino e favorecer a

seleção de uma delas. Embora muitos dos fatores que levam ao sucesso da infecção ainda sejam desconhecidos tudo indica que este processo é multifatorial e depende das linhagens/isolados, da espécie do vetor, das condições do intestino (microbiota, enzimas, temperatura, tipo de sangue ingerido e jejum), condições ambientais (temperatura e altitude), imunidade do vetor ou de uma combinação entre os mesmos (de Fuentes-Vicente et al., 2018).

Do que foi exposto acima, fica evidente que a maioria dos trabalhos da literatura exploraram aspectos finais da infecção como o seu estabelecimento e metaciclogênese. Entretanto, os trabalhos que observam os eventos iniciais pós-ingestão de sangue infectado ainda são escassos. Neste contexto, usamos como referência o trabalho que explorou este fenômeno em *R. prolixus* infectado com a cepa CL (Tc-VI) (Ferreira et al. 2016). Este trabalho avaliou os eventos iniciais da infecção após uma alimentação sanguínea contendo formas epimastigotas e tripomastigotas. Os autores observaram que após 72 horas ocorria um desaparecimento de parasitos do intestino médio anterior (IMA) que poderia ter sido devido à mortalidade dos parasitos. De forma interessante, este fenômeno ocorreu mais rápido nos insetos alimentados com formas tripomastigotas, que seriam as formas naturalmente ingeridas pelo triatomíneo. Estes dados são interessantes, pois sugerem uma transitoriedade muito rápida dos parasitos pelo IMA que seria provavelmente um ambiente mais inóspito pela presença de enzimas digestivas. Assim, os parasitos remanescentes progrediram para o intestino médio posterior onde se iniciam a epimastigogênese e, finalmente, a metaciclogênese no intestino posterior ou reto.

Deste modo, em nosso trabalho, investigamos este fenômeno primeiramente comparando a infecção com epimastigotas das linhagens Bug e Dm28c em *T. infestans*. Nas primeiras 72 horas de infecção observamos que ambas os clones se comportam de maneira diferente ao longo do intestino. Parasitos do clone Dm28c ainda eram encontrados no IMA, enquanto os do clone Bug já haviam desaparecido desta porção. Após 72h, os parasitos de ambas os clones já eram detectados igualmente no intestino médio posterior + intestino posterior. Esses resultados mostram que os diferentes clones podem exibir uma dinâmica de desenvolvimento variável nos compartimentos do intestino do vetor. Esses resultados conjuntamente com os observados para *R. prolixus* (Ferreira et al., 2016) reforçam a transitoriedade dos parasitos no IMA independente da espécie de triatomíneo. Entretanto, estas variações observadas com diferentes clones

foram decorrentes de uma alimentação artificial contendo epimastigotas. Nosso próximo passo foi então investigar o papel das tripomastigotas originárias de camundongos knock-out para IFN- γ .

Nesse próximo experimento, observamos que os parasitos do clone Dm28c desapareceram do IMA em algum momento entre 24 e 72h. Estes resultados confirmam aqueles observados para *R. prolixus*, e indicam que o *T. cruzi* não se desenvolve no intestino médio anterior de triatomíneos. Ferreira et al. (2016) incubaram tripomastigotas sanguíneos da cepa CL com extratos de intestinos médio anterior de *R. prolixus* e observaram uma lise significativa dos parasitos quando incubados com o extrato do intestino médio anterior de ninfas recém alimentadas. Os autores sugeriram que algum fator presente nessa porção intestinal estaria eliminando as formas tripomastigotas. Em adição, a redução de mais de 80% dos parasitos ingeridos pelos insetos fez com que só fosse possível a detecção de quantidades relevantes de parasitos no intestino médio posterior em quinze dias pós-infecção (Ferreira et al., 2016).

No presente estudo não foram realizados testes para avaliar a capacidade lítica do intestino de *T. infestans*, mas o encontro de quantidades similares às ingeridas no intestino médio posterior em 24 horas pós-ingestão sugere que os parasitos conseguiram chegar rapidamente nessa porção intestinal. Estudos adicionais serão necessários para mostrar se o intestino de *T. infestans* não apresenta atividade lítica contra *T. cruzi*, ou se, alternativamente, os tripomastigotas sanguíneos da linhagem Dm28c conseguem alcançar o intestino médio posterior do inseto antes de sofrerem lise.

A caracterização das formas do parasito presente em cada porção intestinal em diferentes períodos pós-infecção mostrou a presença de tripomastigotas sanguíneos e formas intermediárias no intestino médio anterior. Esse resultado é similar ao observado em *R. prolixus* infectados pela cepa CL (Ferreira et al., 2016) e fortalece a ideia de que a epimastigogênese de *T. cruzi* ocorre no intestino médio posterior dos triatomíneos. Nesse contexto, o intestino médio anterior seria um ambiente inóspito para o parasito que, concomitantemente ao início do processo de epimastigogênese, precisaria migrar rapidamente para o intestino médio posterior. Os ensaios iniciados com formas epimastigotas reforçam a ideia de que essa porção intestinal não permite o desenvolvimento do parasito (Ferreira et al., 2016).

Interessantemente, o *Trypanosoma rangeli*, que compartilha com os mesmos hospedeiros do *T. cruzi*, consegue se diferenciar e coloniza tanto no intestino médio anterior, quanto no intestino médio posterior de *R. prolixus* (Ferreira et al., 2016). O encontro de tripomastigotas metacíclicos no intestino médio posterior + intestino posterior de insetos com sete dias de infecção é bastante relevante porque indica que o inseto rapidamente se tornaria um transmissor do parasito. Este fato se torna importante especialmente no ambiente silvestre, onde a transmissão oral é provavelmente a principal maneira do *T. cruzi* seja transmitido para os mamíferos insetívoros (Roelling et al., 2009).

2.10. CONCLUSÕES

- Todos os clones utilizados foram capazes de infectar com sucesso o *T. infestans* e realizar metaciclogênese;
- O clone Bug apresentou uma transitoriedade mais rápida no IMA do que o clone Dm28c quanto a infecção foi realizada com as formas epimastigotas;
- A infecção realizada com formas tripomastigotas resultou em uma redução no número de parasitos muito mais rápidos do que aquela realizada com epimastigotas do clone Dm28c;
- Quando a infecção é realizada com tripomastigotas e acompanhada por períodos mais longos observou-se uma dinâmica de desenvolvimento bem característica com uma redução concomitante das formas tripomastigotas com o aparecimento das epimastigotas.

3. CAPÍTULO 2: O PAPEL DAS VESÍCULAS EXTRACELULARES DE *T. CRUZI* NA MIGRAÇÃO EM *R. PROLIXUS* E *T. INFESTANS*

3.1. RESUMO

O *T. cruzi* tem a capacidade de liberar espontaneamente vesículas extracelulares (VEs). Neste trabalho, as VEs do *T. cruzi* foram avaliadas durante a interação com os triatomíneos das espécies *R. prolixus* e *T. infestans*. As VEs da linhagem Bug foram extraídas, purificadas e oferecidas artificialmente aos insetos antes da infecção com formas epimastigotas. A pré-alimentação com VEs teve um papel em retardar temporariamente a migração do parasito do intestino médio para o reto em *R. prolixus* mas não em *T. infestans*. Esses dados reforçam o papel das VEs do *T. cruzi* não apenas no vertebrado, mas também no hospedeiro invertebrado, afetando temporariamente a migração ao longo do trato intestinal de *R. prolixus*.

3.2. ABSTRACT

The protozoan *T. cruzi* has the ability to spontaneously secrete extracellular vesicles (EVs). In this work, *T. cruzi* EVs were evaluated during interaction with triatomine bugs *R. prolixus* and *T. infestans*. Bug strain EVs were extracted, purified and artificially offered to the insects prior to infection with epimastigote forms. Pre-feeding with EVs have a role in delaying the temporarily migration of the parasite from the midgut to the rectum in *R. prolixus* but not in *T. infestans*. Those data reinforce the role of *T. cruzi* EVs not only in the vertebrate but also in the invertebrate host temporarily affecting migration along the digestive tract of *R. prolixus*.

3.3. INTRODUÇÃO

Para se desenvolver e estabelecer uma infecção dentro do ambiente hostil encontrado no tubo digestivo dos triatomíneos e nas diversas células (macrófagos, epiteliais, neurais e musculares) do hospedeiro vertebrado, o parasito *T. cruzi* possui uma grande variedade de moléculas e estratégias para alcançar o sucesso na infecção (Ferguson 1999).

Desde que o genoma da linhagem CL-Brener foi publicado (El-Sayed et al. 2005), ficou evidente com os mais de 50% do genoma e com a descoberta das MASP, que as moléculas de superfície do parasita desempenham um papel chave durante o ciclo do *T. cruzi* em seus hospedeiros. Várias moléculas e mediadores foram descritos incluindo: gp85 (Alves & Colli 2007, Mattos et al. 2014), lectinas (Pereira et al. 1981), glicoinositolfosfolipídeos (GIPLs) (Ferguson 1999, Nogueira et al. 2007), GPI-mucinas (Soares et al. 2012, Gonzalez et al. 2013) e cruzipaina (Benítez-Hernández et al. 2010, Uehara et al. 2012). Além disso, a microbiota do intestino (Gumiel et al. 2015, Vieira et al. 2016, Díaz et al. 2016) e condições fisiológicas como o jejum podem afetar o desenvolvimento do *T. cruzi* nos vetores (Schaub & Böker 1987, Schaub 1989).

Vale ressaltar, que dos trabalhos acima citados, o que realmente demonstrou que existe um receptor para GIPL de *T. cruzi* no epitélio do intestino de *R. prolixus* foi o de (Nogueira et al. 2007). Estes autores identificaram que resíduos de galactose presentes os GIPLs do *T. cruzi* foram cruciais para a adesão ao intestino médio posterior. Isso é extremamente interessante, pois em *Leishmania major/Phlebotomus papatasi*, resíduos de galactose também são importantes para a adesão do parasito ao receptor PpGalec, presente nas microvilosidades do intestino médio do vetor (Kamhawi et al. 2004). Vale lembrar que estes trabalhos utilizaram estas moléculas purificadas dos parasitos, quando na verdade o que ocorre na natureza é a interação direta dos mesmos com as células do epitélio intestinal. Entretanto, *Leishmania* e *T. cruzi* também podem eliminar estas moléculas associadas a vesículas extracelulares (VEs) (Atayde et al. 2015, Ribeiro et al. 2018). Porém, a interação de VEs de *T. cruzi* com o epitélio intestinal de triatomíneos ainda é desconhecida.

Vários trabalhos descreveram a liberação das VEs em diversos organismos incluindo: vírus, bactérias (Hong et al. 2011), *Toxoplasma gondii* (Pope & Lässer 2013), *Acanthamoeba* (Gonçalves et al. 2018), *Leishmania* spp. (Atayde et al. 2015), *Trichomonas vaginalis* (Szempruch et al. 2016), *Plasmodium* spp. (Szempruch et al.

2016), *Trypanosoma vixax* (Boada-Sucre et al. 2016) e *Trypanosoma brucei* (Okenu et al. 1999). A importância que as VEs adquiriram nos últimos anos é resultado de seus papéis na comunicação extracelular não só em eventos fisiológicos, mas também em processo imunopatológicos (Campos et al., 2015). Apesar de serem chamadas genericamente de vesículas extracelulares, existem vários tipos destas estruturas de acordo com seu tamanho e origem conforme descreveremos a seguir.

Existem três tipos principais de VEs: os corpos apoptóticos (1-5 μm), que são liberados por células danificadas ou em apoptose, as microvesículas (100nm a 1 μm), que são liberadas a partir da membrana plasmática e os exossomos (30-150 nanômetros), que são liberados após a fusão de corpos multivesiculares com a membrana celular (revisado por (Marcilla et al. 2014). Recentemente, utilizando-se de uma metodologia mais sensível (AF4), foi possível subdividir os exossomos em três subpopulações: grandes exossomos (Exo-L – 90-120 nm), pequenos exossomos (Exo-S – 60-80 nm) e exômeros (~ 35 nm) (Zhang et al. 2018). Além da variação de tamanho, densidade e origem, as VEs apresentam uma ampla variação em sua constituição. Elas são compostas por uma bicamada de fosfolípidios contendo lipídios, proteínas, glicoconjugados e no seu interior enzimas e ácidos nucleicos (Colombo et al. 2014).

A primeira demonstração na literatura da capacidade do *T. cruzi* em liberar espontaneamente VEs foi realizada por Gonçalves et al. (1991). Após esta descrição, houve um grande hiato entre a descoberta e novos estudos. Apenas em 2012, foi demonstrado que células de mamíferos previamente expostas a VEs foram mais susceptíveis à invasão por formas tripomastigotas de *T. cruzi* (Torrecilhas et al. 2012). Além disso, um resultado bastante interessante é que a inoculação de VEs das linhagens Y e Silvio de *T. cruzi* em camundongos e posterior desafio com estes parasitos gerou um aumento no infiltrado pró-inflamatório no miocárdio, nos ninhos de amastigotas e na mortalidade em camundongos (Trocoli Torrecilhas et al. 2009, Cestari et al. 2012).

Mais recentemente, um trabalho demonstrou-se que as VEs de *T. cruzi* induziram a produção de NO e citocinas (TNF- α e IL-6) via TLR2. Além disso, foram também capazes de ativar Map quinases (p38, JNK e ERK 1/2) (Nogueira et al. 2015). Estes trabalhos demonstram o papel das VEs em fenômenos de interação tanto no compartimento inato quando na infecção crônica. Porém, ainda não existem trabalhos que avaliaram o papel das VEs de *T. cruzi* na interação com triatomíneos.

3.4. JUSTIFICATIVA

Neste estudo pretendemos obter mais informações sobre o fenômeno da interação entre *T. infestans/R. prolixus* e as VEs do clone Bug2145c110-TcV. Os trabalhos publicados na literatura com *T. cruzi* averiguaram o papel das VEs *in vivo* e *in vitro* em células ou em hospedeiros vertebrados. Por outro lado, em *Leishmania*, existe apenas um único trabalho na interação com flebotomíneos. Este foi o primeiro trabalho que explorou o papel das VEs em *T. cruzi*-triatomíneos.

3.5. OBJETIVOS

3.5.1. OBJETIVO GERAL

- Investigar o papel das vesículas extracelulares (VEs) de *T. cruzi* na interação com *R. prolixus* e *T. infestans*.

3.5.2. OBJETIVO ESPECÍFICO

- Avaliar se a exposição prévia a VEs afeta a migração e a metaciclogênese de *T. cruzi* em *R. prolixus* e *T. infestans*.

3.6. MATERIAIS E MÉTODOS

3.6.1 PARASITOS E INSETOS

Utilizou-se a linhagem Bug2145cl10 (TcV) de *T. cruzi* (Palace-Berl et al. 2015), um parasito originalmente isolado de *T. infestans* naturalmente infectado (Rio Grande do Sul – Brasil, 2015). As formas epimastigotas de cultura foram cultivadas em LIT como já descrito no capítulo 1. Os *T. infestans* e *R. prolixus* utilizados neste estudo foram obtidos de uma colônia de laboratório derivada de insetos coletados no Brasil e em Honduras, respectivamente. Os triatomíneos foram criados conforme descrito no Capítulo 1. Ninfas de quarto estágio, com 30 dias pós-muda, foram utilizadas nos ensaios biológicos.

3.6.2 PURIFICAÇÃO, DISTRIBUIÇÃO E CONCENTRAÇÃO DAS VES

Os parasitos foram cultivados em meio LIT, lavados com HBSS 1X (KCl 400.000 mg/mL (KH₂PO₄ 60.000 mg/mL, NaHCO₃ 350.000 mg/mL, NaCl 8000.000 mg/mL e H₁₅Na₂O₁₁P 90.000 mg/mL), centrifugados (1000 g/10min, 10°C) e contados. Para liberação das VEs, os parasitos *T. cruzi* com uma concentração de 1x10⁵ parasitos/μL foram ressuspensos em meio LIT sem SFB e incubado a 28°C por 2h. Os parasitos foram fixados em lamínulas e foram preparados para Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), conforme relatado anteriormente (Nogueira et al. 2015). Após a vesiculação, os sobrenadantes foram coletados, filtrados (0,22μm) e ultra-centrifugados (100.000 g/2h, 4 °C).

A Análise de Rastreamento de Nanopartículas (NTA) foi realizada para determinar o tamanho, a distribuição e a concentração das VEs em partículas/mL (Nogueira et al. 2015). As aquisições foram medidas em um instrumento Nanosight NS300 (Malvern Instruments Ltd, Malvern, Reino Unido) equipado com um laser de 405nm e acoplado a uma câmera CCD (o laser emitindo um feixe de 60mW no comprimento de onda de 405nm). Os dados foram analisados usando o software NTA (versão 2.3 build 0017). O limiar de detecção foi definido como 10. Para realizar as medições, as amostras foram diluídas 1:100 em PBS. As leituras foram feitas em triplicatas durante 30s a 20 quadros por segundo (3 vezes para cada amostra), no nível da câmera ajustado em 14 e monitoração manual da temperatura (19°C).

3.6.3 INFECÇÃO E DISSECÇÃO DE INSETOS

Os insetos foram alimentados artificialmente com VEs e parasitos em dois momentos consecutivos. No primeiro dia as ninfas foram alimentadas artificialmente com sangue de coelho citratado e inativado (56°C, 30 min), contendo VEs. Foi permitido que cada inseto ingerisse uma quantidade de sangue igual a 20 a 30µL (alimentando cada inseto com uma concentração igual a $6,4 \times 10^2 - 9,6 \times 10^2$ VEs partículas/µL). Um dia depois as mesmas ninfas foram alimentadas artificialmente com sangue de coelho citratado e inativado contendo epimastigotas de cultura (2×10^5 epimastigotas cultivadas em meio LIT/µL). O grupo controle foi alimentado somente com sangue e sangue + parasitos, com quantidade semelhante ao grupo tratado nos respectivos dias.

Os intestinos foram dissecados aos 21-22 dias pós-infecção (pi) em duas porções: intestino médio (IM) e intestino posterior (reto) (R) de um grupo de ninfas (n = 20) e homogeneizados em 30µL de PBS. A quantificação dos parasitos foi realizada utilizando-se câmara de Neubauer. Aos 28 dias p.i., uma nova alimentação com sangue de coelho citratado e inativado foi realizada para as ninfas restantes (n=15). Imediatamente após a alimentação, as ninfas foram transferidas para tubos de plástico de 1,5mL e a urina produzida foi coletada para avaliar a porcentagem de formas metacíclicas. Dez µL de cada amostra foram fixados em 10% de metanol e corados com Giemsa[®]. O número de parasitos foi quantificado através da leitura de todos os campos da lâmina em microscopia óptica. As mesmas ninfas alimentadas no período de 28 dias após a alimentação infectiva foram dissecadas como descrito acima agora no tempo de 49-50 dias p.i.

3.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todas as análises estatísticas foram realizadas no GraphPad Prism 5. A normalidade dos dados foi testada através do teste Kolmogorov-Smirnov. 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 $p < 0,05$.

3.8. RESULTADOS

3.8.1 PRODUÇÃO DE VESÍCULAS EXTRACELULARES

As epimastigotas de *T. cruzi* Bug foram capazes de liberar as VEs (Figura 9A e B). Com base nos dados do NTA, os VEs exibiram um tamanho médio de 223,1nm (D10 = 143,6; D50 = 245,5 e D90 = 264,7) (Figura 9C) e uma concentração média de $6,84 \times 10^7$ partículas/mL (Figuras 9D).

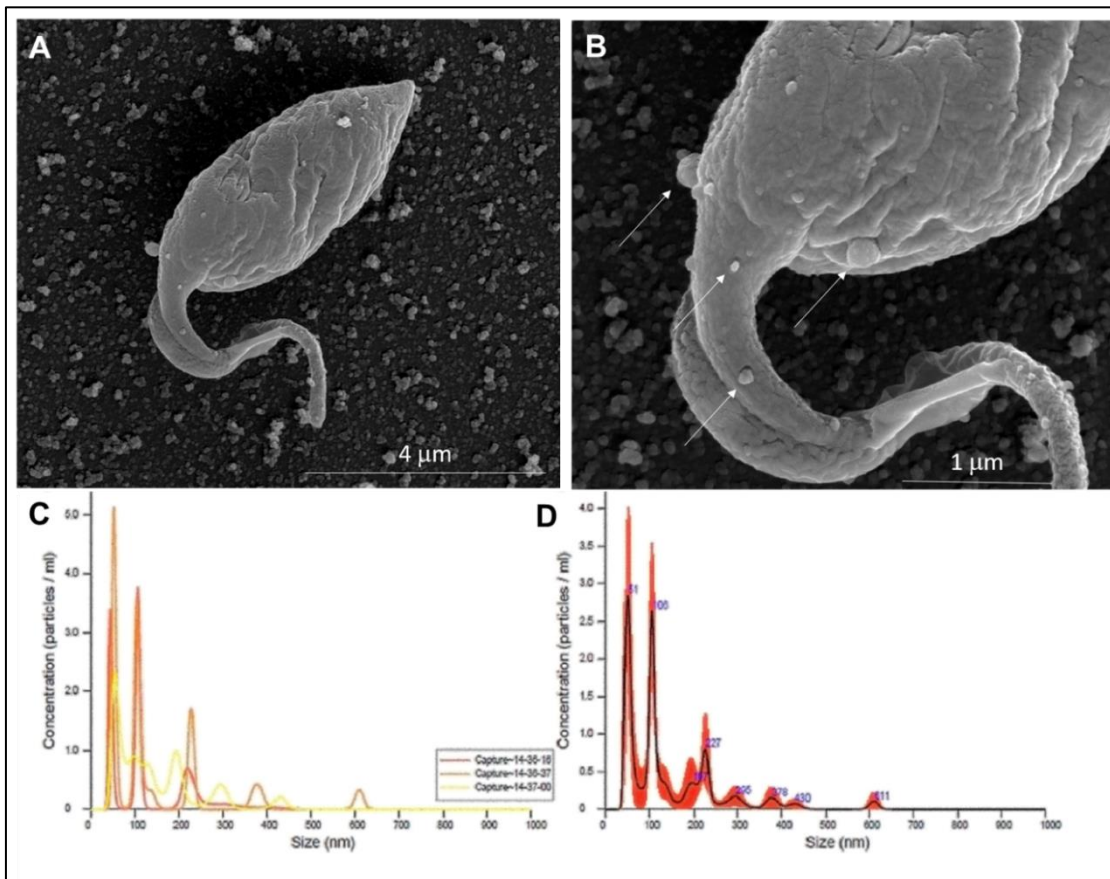


Figura 9. Vesículas extracelulares de *T. cruzi*. Microscopia eletrônica de varredura (SEM) (barras: 1-5µm), Ampliação 32.657X (A) e Ampliação 80.000X (B); Quantificação do tamanho e concentração de VEs de *T. cruzi* Bug (C) e (D).

3.8.2 DESENVOLVIMENTO E DADOS DA DISSECAÇÃO

Após a exposição e infecção, a migração do *T. cruzi* em diferentes partes do trato intestinal foi comparada em dois períodos de infecção (21-22 e 49-50 dias p.i.).

Em *R. prolixus*, houve um aumento no número de parasitos presentes no intestino médio quando comparado ao grupo controle aos 21-22 dias p.i. (Figura 10A, Mann Whitney, P

<0,0001). No intestino posterior, no entanto, o número de parasitos foi reduzido nas ninfas tratadas com VEs (Figura 10A, t Test, $P < 0,05$). Após 49-50 dias p.i. o número de parasitos no intestino médio teve uma grande redução nos dois tratamentos, sem diferenças entre os grupos (Figura 10B, t Test, n.s.).

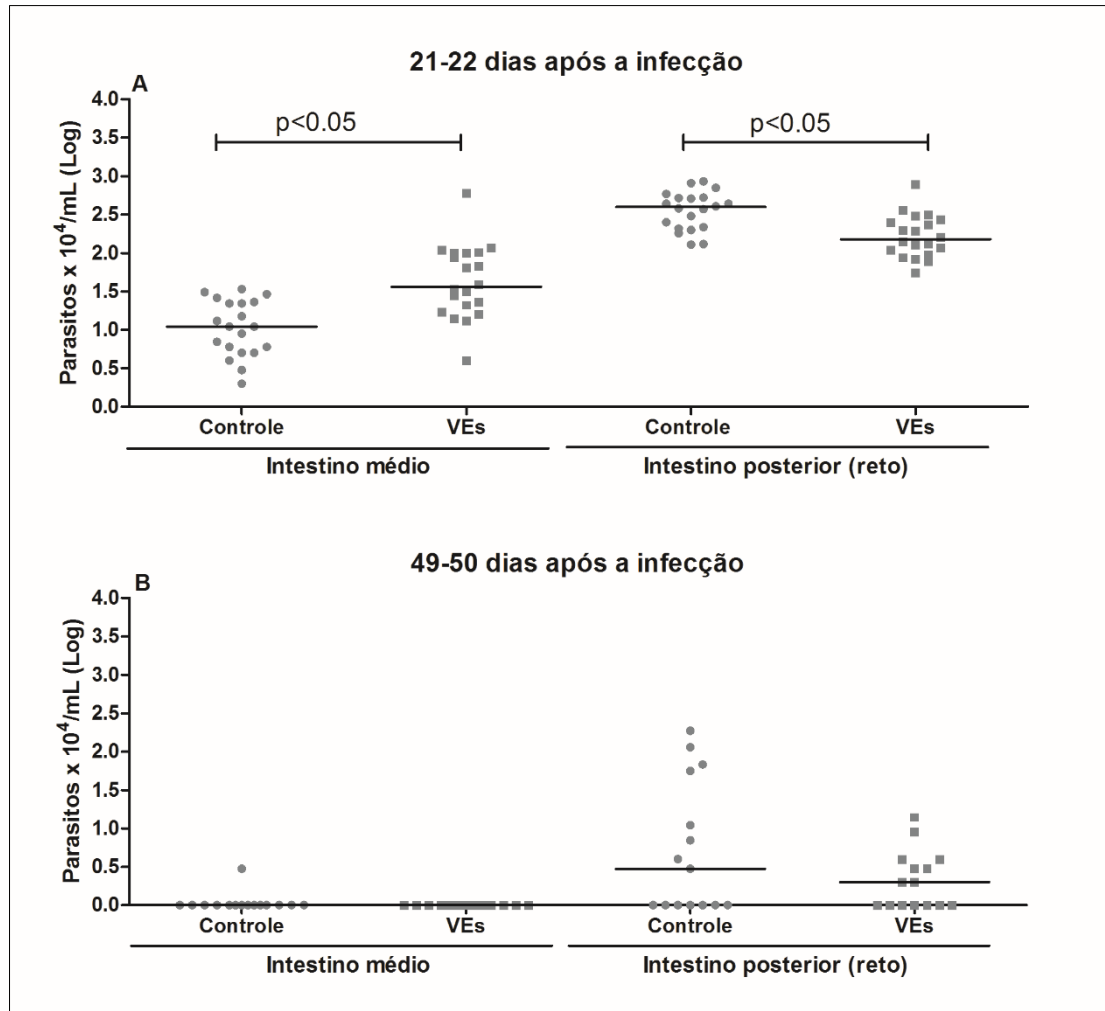


Figura 10. Parasitos encontrados ao longo do trato intestinal de *R. prolixus*. Dissecções aos 21-22 (A) e 49-50 (B) dias após a alimentação infectiva. Cada ponto representa a quantificação dos parasitos de um inseto e cada barra horizontal corresponde à mediana do grupo avaliado.

Para *T. infestans*, não foram observadas diferenças estatísticas no número de parasitos entre ninfas e controles expostos as VEs (Figura 11A e B, Mann Whitney, n.s.).

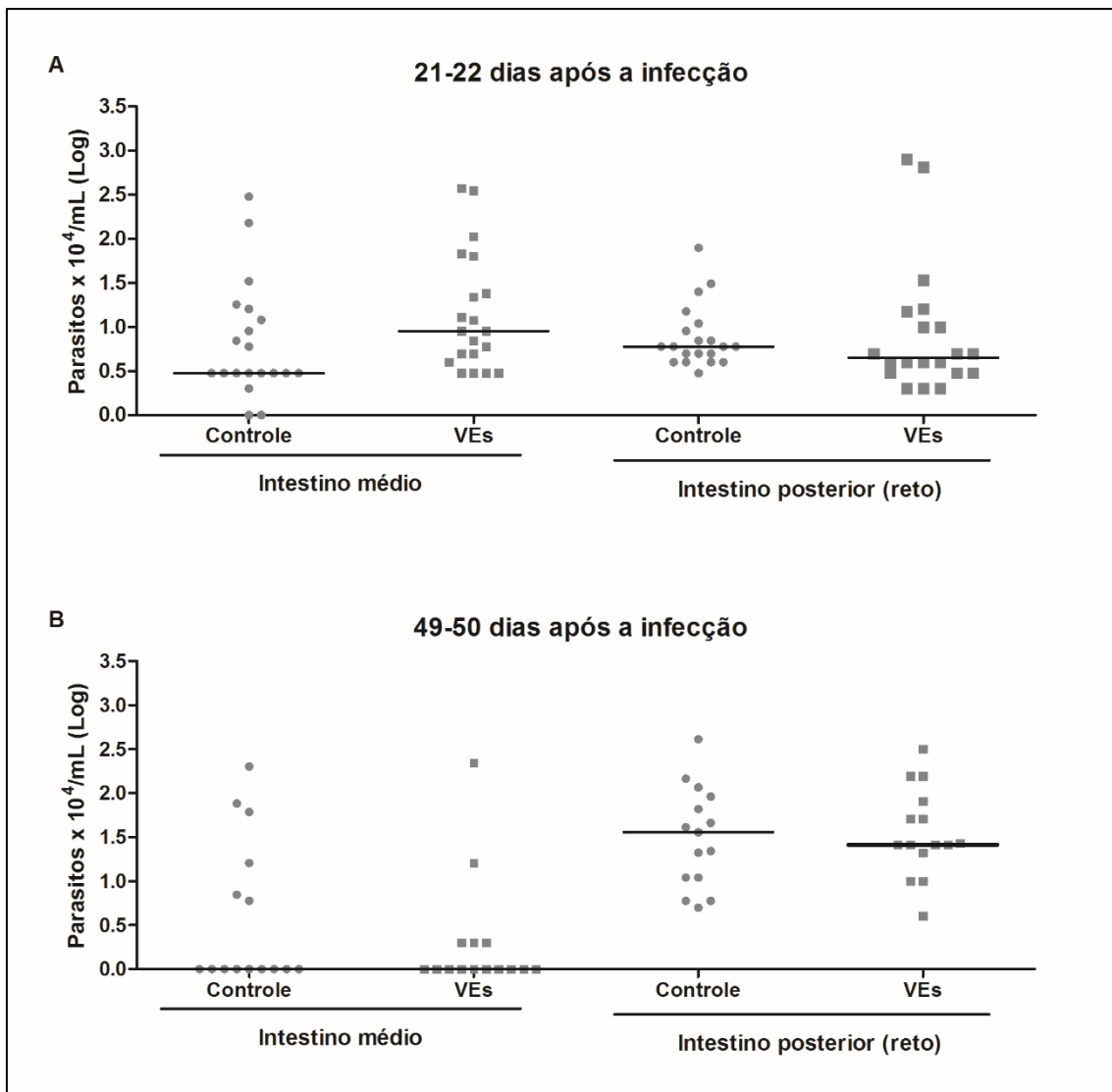


Figura 11. Parasitos encontrados ao longo do trato intestinal de *T. infestans*. Dissecções aos 21-22 (A) e 49-50 (B) dias após a alimentação infectiva. Cada ponto representa a quantificação dos parasitos de um inseto e cada barra horizontal corresponde à mediana do grupo avaliado.

3.8.3 DESENVOLVIMENTO E DADOS DA DIURESE

Um terço das ninfas de *R. prolixus* não apresentou parasitos na urina, independentemente do tratamento. Nas amostras positivas, foi encontrada uma mediana de $2,5 \pm 3$ parasitos/ μL no grupo controle, sendo 96,03% destes, formas metacíclicas. No grupo experimental, o número médio de parasitos na urina foi de $2,7 \pm 2$ parasitos/ μL , sendo 92,69% de tripomastigotas metacíclicos. Diferentemente do que foi encontrado em *R. prolixus*, todas as ninfas de *T. infestans* liberaram parasitos na urina, mas em uma quantidade 10 vezes menor do que os encontrados em *R. prolixus*. A

mediana encontrada foi de $0,3 \pm 0,2$ e $0,2 \pm 0,1$ parasitos/ μL para os grupos controle e experimental, respectivamente. Nos dois grupos, todos os parasitos encontrados eram formas tripomastigotas metacíclicas. A pré-incubação com VEs não afetou a metaciclogênese em nenhum dos dois vetores estudados, pois não houve diferença estatística. (Figura 12A e B Mann Whitney, n.s.).

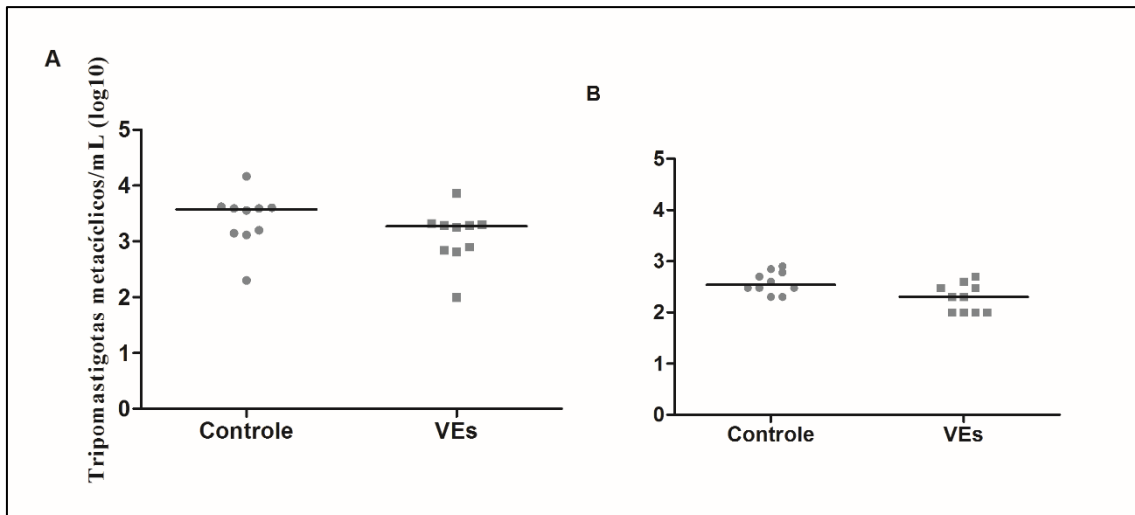


Figura 12. Tripomastigotas metacíclicos encontrados na urina de *R. prolixus* (A) e *T. infestans* (B) aos 28 dias p.i. Cada ponto representa a quantificação dos parasitos de um inseto e cada barra horizontal corresponde à mediana do grupo avaliado.

3.9. DISCUSSÃO

Os parasitos *T. cruzi* são conhecidos por liberarem VEs que funcionam como importantes mediadores da sinalização célula-célula durante a interação parasito-hospedeiro vertebrado (Trocoli Torrecilhas et al. 2009, Torrecilhas et al. 2012, Nogueira et al. 2015, Hottz et al. 2018). Um dos estudos iniciais mostrou que ao se desafiar camundongos BALB/c com VEs de *T. cruzi* houve um grande aumento na carga parasitária, inflamação no coração e mortalidade (Trocoli Torrecilhas et al. 2009). Posteriormente, foi demonstrado que o parasito *T. cruzi* tem a capacidade de modular não apenas os eventos relacionados à imunidade adquirida mas principalmente aos imunes inatos, mas ativando o receptor TLR2, desencadeando a produção de citocinas e a ativação de MAPKs (Nogueira et al. 2015). No entanto, relatos sobre o papel das VEs em relação aos hospedeiros invertebrados ainda eram desconhecidos.

R. prolixus e *T. infestans* são as espécies de triatomíneos mais utilizadas em estudos de infecção, devido à existência de colônias em laboratório e fácil manejo. Ambas as espécies foram utilizadas com sucesso em nossos procedimentos e produziram padrões de infecção esperados, conforme trabalhos anteriores (Castro et al. 2012, Ferreira et al. 2016). Um ponto que merece destaque foi em relação à dificuldade de alimentar com alimentadores artificiais os triatomíneos da espécie *T. infestans*. Para obter a mesma média de sangue ingerida pelo *R. prolixus*, os *T. infestans* levaram em média o dobro do tempo que a outra espécie de triatomíneo (dados não mostrados).

A pré-alimentação com VEs atrasou a migração do parasito Bug *T. cruzi* para o reto (21-22 dias p.i.) em *R. prolixus*. Curiosamente, após 49-50 dias p.i., esse efeito já havia desaparecido, não havendo diferenças estatísticas entre o grupo experimental e o grupo controle. No entanto, esse efeito não foi detectado em *T. infestans*. É interessante notar que o número de tripomastigotas metacíclicos produzido em *R. prolixus* foi 10 vezes maior ao que foi encontrado em *T. infestans*. Considerando as metodologias utilizadas e que as quantidades de sangue ingeridas pelos dois vetores, um fato a ser considerado é que o *R. prolixus* possui um tamanho menor em relação ao triatomíneo da espécie *T. infestans*. A concentração de VEs oferecidas ao *R. prolixus* pode ter facilitado a interação do clone Bug com o epitélio intestinal gerando a retenção transitória de parasitos na porção inicial do intestino.

Embora em nosso modelo, dependendo do vetor, a pré-alimentação com VEs tenha afetado a migração do parasita, seu papel na transmissão não foi avaliado. Um estudo anterior mostrou que o parasito *Leishmania* possui a capacidade de secretar VEs e que essas partículas poderiam ter um papel no ciclo de transmissão durante a picada do flebotomíneo (Atayde et al. 2015). Nossos resultados sugerem que as VEs do parasito *T. cruzi* Bug podem estar se fundindo no intestino médio e de alguma forma promovendo a retenção temporária de parasitos em *R. prolixus*. Porém, este mecanismo precisa ser mais explorado como uma nova perspectiva do trabalho.

3.10. CONCLUSÃO E PESPECTIVAS

- A pré-alimentação com VEs afetou os eventos iniciais da interação parasitária retardando a migração de *T. cruzi* do intestino médio para o intestino posterior em *R. prolixus*;
- A pré-alimentação com VEs não afetou a metaciclologênese do *T. cruzi* em ambos os vetores.

Publicação:

Os resultados apresentados neste capítulo estão em fase final de aceite no Periódico *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* (**Anexo I**):

Paranaíba LF, Guarneri AA, Torrecilhas AC, Melo MN, Soares RP (2019). Extracellular vesicles from *Trypanosoma cruzi* affects parasite migration in the gut of *Rhodnius prolixus* but not in *Triatoma infestans*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* (under review R2 26/10/2019)

4. CAPÍTULO 3: TENTATIVA DE HIBRIDIZAÇÃO EM *TRIATOMA INFESTANS*

4.1. RESUMO

Alguns aspectos envolvidos na biologia celular em *T. cruzi* ainda são desconhecidos, inclusive a ocorrência de hibridização. Alguns autores explicam que a alta variabilidade genética do *T. cruzi* deve-se a eventos aleatórios naturais de intercâmbio genético e a dois ou mais eventos de hibridização que possam ter ocorrido entre diferentes grupos. Entretanto, este fenômeno ainda não foi demonstrado *in vivo* em *T. infestans*. No primeiro capítulo, observamos que dois clones (Bug e YuYu) infectaram esta espécie em altas densidades e, portanto, foram escolhidos para estes experimentos além de pertencerem a DTUs distintos (Tc-V e Tc-II), respectivamente. Para tanto, foram produzidos linhagens fluorescentes expressando as proteínas verde (GFP) e vermelha (RFP) para os clones YuYu e Bug, respectivamente. Posteriormente, uma alimentação mista foi oferecida ao vetor. Após 28 dias, uma nova alimentação foi realizada e as urinas coletadas e semeadas em meio LIT contendo os dois antibióticos de seleção (G418[®] e Higromicina B[®]). Somente uma amostra de urina apresentou parasitos após a seleção. Este isolado foi submetido a várias técnicas para confirmação da hibridização. Entretanto, estes parasitos foram idênticos ao parental RFP (Bug). Nossos resultados não confirmaram a ocorrência de hibridização ao longo do tubo digestivo de *T. infestans* sob nossas condições experimentais.

4.2. ABSTRACT

Some aspects involved in the cell biology in *T. cruzi* are still unknown, including the occurrence of hybridization. A few authors explain that the high genetic variability of *T. cruzi* is due to random natural events of genetic exchange and two or more hybridization events may have occurred between different groups. However, this phenomenon *in vivo* in the vector has not yet been demonstrated. Transfections with the RFP and GFP fluorescent proteins in two clones of *T. cruzi*, Bug (TcV) and YuYu (TcII) were performed, respectively. After the selection of the fluorescent clones, a mixed epimastigote culture was artificially offered to *T. infestans*. After 28 days, a new feeding was performed only with blood and the urine collected and cultivated in LIT medium containing the two selection antibiotics. (G418[®] and Hygromycin B[®]). Only one urine contained parasites after antibiotic selection. Parasites were checked by

several techniques to evaluate hybridization. After those analysis, the selected parasites were shown to be undistinguishable from the parental RFP (Bug). Those data did not confirm the occurrence of hybridization along the digestive tract of *T. infestans* under our experimental conditions.

4.3. INTRODUÇÃO

Alguns aspectos envolvidos na divisão celular em *T. cruzi* ainda são desconhecidos, inclusive a ocorrência de reprodução sexuada (Ferreira & Briones 2012, Izeta-Alberdi et al. 2016). Apesar do *T. cruzi* ser um organismo diplóide com reprodução clonal, alguns autores sugerem que a alta variabilidade genética seja devido a eventos aleatórios de intercâmbio genético e mais recentemente devido à troca parasexual (Alves et al. 2018). Entretanto, um aspecto ainda desconhecido neste possível fenômeno de recombinação seria em que tipo de hospedeiro, vertebrado ou invertebrado.

No primeiro capítulo desta tese, foi discutido como os triatomíneos poderiam restringir o desenvolvimento de determinadas linhagens de *T. cruzi* afetando inclusive a sua distribuição geográfica. Embora híbridos já tenham sido encontrados na natureza como TcV e Tc-VI, alguns autores acreditam que estes eventos seriam relativamente raros (de Freitas et al. 2006, Alves et al. 2018). Neste contexto, decidimos explorar a ocorrência de hibridização com dois clones que mostraram um ótimo desenvolvimento em *T. infestans*: Bug e YuYu. Estes dois clones pertencem a diferentes DTUs que poderiam ser distinguidos por PCR utilizando marcadores moleculares. Além disso, esses clones foram originalmente isolados de *T. infestans* no Rio Grande do Sul e em Minas Gerais, sendo em tese, bem adaptados a este vetor.

O processo de hibridização em *T. cruzi* ainda é pouco conhecido. Vários estudos sugerem que possa ter existido dois ou mais eventos de hibridização entre diferentes grupos de *T. cruzi* (Ienne et al. 2010, Sturm & Campbell 2010, Ferreira & Briones 2012). As evidências a favor da hibridização são factíveis uma vez que as infecções mistas são encontradas na natureza. Na região do Chaco, exemplares de *T. infestans* foram encontrados infectados com TcV + TcVI (Maffey et al. 2012). No hospedeiro vertebrado, ocorrências de infecções mistas no campo foram identificadas na região do Chaco Argentino existindo uma prevalência maior de TcV/TcVI em humanos (32,6%) e TcI/TcVI em cães (14,3%) (Monje-Rumi et al. 2015). Recentemente, foi realizado um estudo nos cinco biomas brasileiros, que demonstrou que os quirópteros e os marsupiais foram os mamíferos que apresentaram maior diversidade de DTUs e taxas de infecção de *T. cruzi* (Jansen et al. 2018). Porém, neste estudo embora muito completo, não foram identificados híbridos.

A presença de infecções mistas em humanos é rara na literatura. Sugere-se que alguns clones poderiam ser eliminados devido a sua incapacidade de competir ou de se propagar no hospedeiro humano ou pela ação dos mecanismos de defesa do hospedeiro (Macedo & Pena 1998). Embora não tenha sido demonstrada a hibridização de *T. cruzi* em humanos e outros hospedeiros vertebrados, recentemente, foi observado este fenômeno *in vitro*. A fim de se investigar o papel da proteína Rad51 no processo de reparação do DNA de *T. cruzi* exposto a agentes genotóxicos, foi demonstrado *in vitro* um fenômeno de hibridização (Alves et al. 2018). Entretanto, a demonstração deste fenômeno *in vivo* tanto no vetor quanto no hospedeiro vertebrado ainda não foi descrita.

Ao contrário de *T. cruzi*, a demonstração da hibridização em *Leishmania* já é muito bem compreendida (Akopyants et al. 2009). Assim como em *T. cruzi*, existem isolados de híbridos naturais no Novo Mundo como, por exemplo, *Leishmania braziliensis/Leishmania peruviana* (Dujardin et al. 1995, Nolder et al. 2007). No Velho Mundo, híbridos também foram descritos em isolados de campo incluindo *Leishmania major/Leishmania arabica* (Kelly et al. 1991), *Leishmania donovani/Leishmania aethyopica* (Odiwuor et al. 2011), *Leishmania infantum/L. major* (Ravel et al. 2006) e *L. infantum* (MON-24) / *L. infantum* (MON-80) (Chargui et al. 2009). Posteriormente, o grupo do Dr. David Sacks demonstrou em laboratório o fenômeno da hibridização entre diferentes cepas de *L. major* (FV1/Seidman) em *Phlebotomus duboscqi* (Akopyants et al. 2009). Em seguida, outros pesquisadores também obtiveram híbridos de *Leishmania* dentro de flebotomíneos com espécies do Velho Mundo (Rogers et al. 2014, Romano et al. 2014). Entretanto, a comprovação da hibridização em *T. cruzi* dentro dos triatomíneos ainda não foi elucidada.

Em nosso trabalho, realizamos uma tentativa de demonstrar o processo de hibridização ao longo do trato intestinal de *T. infestans*. Para tanto, utilizamos uma metodologia semelhante à utilizada para *Leishmania* (Akopyants et al. 2009) que envolveu o oferecimento ao vetor de uma alimentação mista com consequente isolamento e seleção por antibióticos.

4.4. JUSTIFICATIVA

A existência de isolados/linhagens híbridas de *T. cruzi* já foi observada na natureza. Embora o fenômeno de hibridização já tenha sido descrito em *Leishmania*, o mesmo ainda não foi demonstrado em *T. cruzi*. Além disso, uma lacuna ainda existente se refere

ao fato de onde essa hibridização teria ocorrido, se no vetor ou em algum hospedeiro vertebrado. Neste capítulo descreveremos uma tentativa de obter um híbrido utilizando duas linhagens de DTUs diferentes em condições aparentemente favoráveis em um vetor susceptível, o *T. infestans*.

4.5. OBJETIVO GERAL

- Avaliar a ocorrência do processo de hibridização entre dois clones do *T. cruzi* (Bug e YuYu) no intestino de *T. infestans*.

4.6. MATERIAIS E MÉTODOS

4.6.1 PARASITOS E INSETOS

Com base nos resultados dos experimentos de susceptibilidade foram escolhidos os dois clones que melhor infectaram o *T. infestans* (Bug2145cl10-TcV e YuYu-TcII). As formas epimastigotas de cultura foram cultivadas em LIT conforme descrito anteriormente. Os *T. infestans* utilizados neste estudo foram criados conforme descrito no capítulo 1. Foram utilizados nesse ensaio insetos de vários estádios evolutivos de ninfas até adultos, em jejum por 30 dias.

4.6.2 TRANSFECCÃO E CLONAGEM

Para os ensaios de hibridização, as epimastigotas do clone Bug2145cl10-TcV foram transfectadas com o plasmídeo pROCK_neo (RFP) (Pires et al. 2008) contendo o gene da proteína vermelha fluorescente. A linhagem YuYu-TcII foi transfectada com o plasmídeo pROCK_hygroB contendo o gene da proteína verde fluorescente (GFP) (DaRocha et al. 2004). As epimastigotas após a transfecção foram clonadas pelo método de diluição limitante (Pires et al. 2008).

4.6.3 ALIMENTAÇÃO INFECTIVA E CULTIVO DOS ISOLADOS

Foram utilizados neste ensaio trinta e cinco exemplares de *T. infestans* de vários estádios evolutivos. Os insetos foram alimentados artificialmente conforme descrito no capítulo 1 com uma concentração de 5×10^6 epimastigotas/mL de cada linhagem de *T. cruzi* por um tempo necessário até repleção. Após 28 dias (n=35) da alimentação infectiva foram realizadas novas alimentações, contendo somente sangue de coelho, para obtenção da urina. Para a coleta da urina, os insetos foram transferidos para tubos de 1,5mL imediatamente após o término da alimentação onde permaneciam por cerca de 3h. Toda urina foi coletada dentro de uma capela de fluxo laminar, examinadas em microscópio óptico e aquelas que apresentavam parasitos seu conteúdo foi cultivado em meio de cultura LIT acrescido com dois antibióticos G418[®] e Higromicina B[®], para seleção de uma população híbrida de *T. cruzi*.

4.6.4 PARÂMETROS DE TAMANHO E GRANULOSIDADE CELULAR - CITOMETRIA DE FLUXO - FACS

Para comparar a fluorescência dos parasitos isolados após a seleção com os antibióticos G418[®] e Higromicina B[®]. Parasitos selecionados (1×10^6 epimastigotas/mL) bem como seus clones parentais foram lavados em PBS e levados ao citômetro de fluxo FACS Calibur (Beckton Dickinson, Mountain View, CA, EUA) e ao microscópio confocal (NIKON eclipse E200). No citômetro, o número de eventos durante a contagem de células foi de 10.000, a medida da fluorescência foi determinada em unidades de fluorescência (FU) e gerados os índices médios de fluorescência (IFM) (Sean Ha et al. 1996), que foram comparados com os controles parentais, transfectados com RFP e GFP (Bug2145c110-RFP-TcV e YuYu-GFP-TcII). A análise dos dados foi realizada utilizando o programa FlowJo software 7.6.4 (Tree Star Inc., Ashland, OR, EUA).

4.6.5 EXTRAÇÃO DE DNA

Os parasitos selecionados com os antibióticos G418[®] e Higromicina B[®], Bug2145c110-RFP e YuYu-GFP foram expandidos e submetidos às extrações dos DNAs genômicos utilizando o Kit de Extração de tecido e células Genra Puregene[®] da QIAGEN, seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante.

As massas de culturas foram homogeneizadas ao vórtex por 20 segundos, adicionado 300 μ L de solução de lise e 1,5 μ L de proteinase K, homogeneizando por 20 segundos e incubando a 55°C por 1h. Após o período de incubação foi adicionado 100 μ L de solução de precipitação de proteínas à solução, que foi homogeneizada por 20 segundos e incubada por cinco minutos ao gelo. Posteriormente os tubos foram vortexados por 20 segundos a alta velocidade seguido de centrifugação por cinco minutos a 12000 x g (14000 rpm), e a fase aquosa sobrenadante transferida para um tubo novo. Foram adicionados 300 μ L de isopropanol vertendo cuidadosamente por inversão à amostra remanescente, seguida de outra centrifugação por cinco minutos a 12000 x g (14000 rpm). Após este passo, o sobrenadante foi descartado e o tubo secado invertido contra um papel absorvente. Foi adicionado etanol 70% ao tubo já seco e invertido várias vezes seguido de outra centrifugação a 12000 x g (14000 rpm) por cinco minutos. Por fim o sobrenadante foi descartado e o tubo permaneceu invertido contra um papel absorvente para secar até não sobrar nenhum resquício de álcool. Ao final, foram adicionados 200 μ L de solução de hidratação de DNA ou água DNase e RNase free. As amostras foram incubadas a 65°C por uma hora e estocadas ao final à temperatura de -20°C.

Após a extração foi realizada a dosagem do DNA na cultura do isolado, verificando a presença, concentração e qualidade do material extraído. Para este procedimento foi utilizado o espectrofotômetro de microvolume Nanodrop[®]-1000. As amostras de DNA foram diluídas para a concentração de 20ng/ μ L utilizada em todas as reações. Conforme recomendações do fabricante o espectro de luz foi ajustado para 260 e 280 nanômetros, faixa em que os ácidos nucleicos são detectados. A razão da absorbância de 260nm/280nm foi utilizada para avaliar a pureza do material extraído, sendo considerados aceitáveis valores entre 1,4 de 1,8. Valores menores que a margem podem indicar a presença de proteínas, fenol ou outros contaminantes provenientes do processo de extração.

4.6.6 PCR E ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA

O parasito isolado após a seleção com os antibióticos G418[®] e Higromicina B[®], Bug2145c110-RFP e YuYu-GFP foram genotipados através de PCR utilizando os marcadores COII (de Freitas et al. 2006) e rDNA 24S α (Souto et al. 1996). Para as reações de PCR foram utilizados Tampão GoTaq 1X, 1,5 mM MgSO₄, 40 μ M dNTPs, 0,75 U Taq, 10 pM de cada primer e 100ng do DNA genômico dos parasitos. Cada um destes marcadores apresenta um programa de PCR diferente, conforme indicado na Tabela 2.

Tabela 2. Primers e programas dos marcadores utilizados na genotipagem dos parasitos.

	COII	rDNA 24 S α
Primer forward	CCATATATTGTTGCATTATT	AAGGTGCGTCGACAGTGTGG
Primer reverse	TTGTAATAGGAGTCATGTTT	TTTTCAGAATGGCCGAACAGT
Desnaturação inicial	94 °C por 5 min	94 °C por 10 min
Desnaturação	94 °C por 45s	94 °C por 30 s
Anelamento	45 °C por 45s	60 °C por 30 s
Extensão	72 °C por 1 min	72 °C por 30 s
Número total de ciclos	40	30
Extensão final	72 °C por 1 min	72 °C por 30 s

O amplicon do marcador COII foi posteriormente digerido com a enzima de restrição AluI, na proporção de 1U para cada 20 μ L de reação de PCR, a 37°C por 12-16 horas. Para a análise dos resultados, as amostras resultantes das ampliações e das digestões foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida 7,5% e coradas pela adição de nitrato de prata. Para a correta genotipagem dos parasitos, os padrões de bandas obtidos

nos géis foram comparados com aqueles específicos para cada linhagem do parasito (Tabela 3).

Tabela 3. Perfil de amplificação dos marcadores utilizados na genotipagem dos subgrupos de *T. cruzi*. A ocorrência de mais de um valor na célula da tabela indica a presença de mais de uma banda no gel de poliacrilamida. pb = pares de base.

Linhagem	COII	rDNA 24Sα
Tc I	30, 81 e 264pb	110pb
Tc II	81, 82 e 212pb	125pb
Tc III	81 e 294pb	110pb
Tc IV	81 e 294pb	125pb
Tc V	81 e 294pb	110 e 125pb
Tc VI	81 e 294pb	125pb

4.7. RESULTADOS

4.7.1 CULTIVO E VISUALIZAÇÃO DO ISOLADO EM MICROSCÓPIO DE FLUORESCENCIA

Aos 28 dias após a alimentação infectiva mista (Bug2145cl10-RFP e YuYu-GFP) foi realizada uma nova alimentação para coleta da urina de *T. infestans*. Os parasitos eliminados foram cultivados em meio LIT e selecionados com os dois antibióticos citados anteriormente. Do total de 35 triatomíneos, 14 eliminaram urina com parasitos e somente em um deles foi possível recuperar parasitos viáveis que foram visualizados em microscópio de fluorescência (Figura 13).

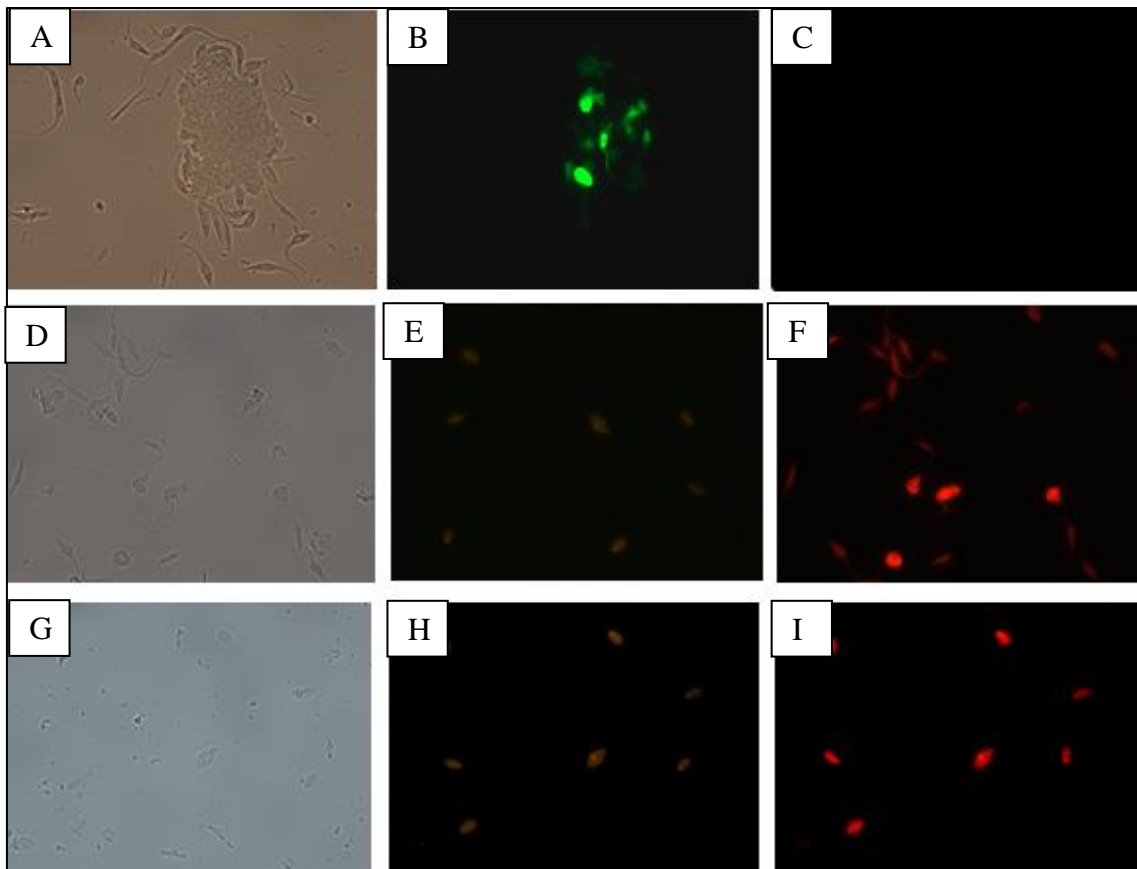


Figura 13. Expressão transitória da proteína verde fluorescente (GFP) e da proteína vermelha fluorescente (RFP) em epimastigotas de *T. cruzi*. Epimastigotas de YuYu-GFP em microscópio de fluorescência sem filtro (A), filtro para comprimentos de ondas em verde (B) e filtro para comprimentos de ondas em vermelho (C). Epimastigotas de Bug2145cl10-RFP em microscópio de fluorescência sem filtro (D), filtro para comprimentos de ondas em verde (E) e filtro para comprimentos de ondas em vermelho (F). Epimastigotas do isolado da urina (híbrido putativo) em microscópio de fluorescência sem filtro (G), filtro para comprimentos de ondas em verde (H) e filtro

para comprimentos de ondas em vermelho (I). Imagens captadas utilizando-se o microscópio confocal (NIKON eclipse E200).

4.7.2 VIZUALIZAÇÃO DO ISOLADO NO CITÔMETRO

As amostras Bug2145c110-RFP, YuYu-GFP parentais e o isolado da urina (híbrido putativo) foram submetidos à leitura no citômetro de fluxo. Sendo esperado para a amostra Bug2145c110-RFP uma fluorescência vermelha, uma fluorescência verde para a YuYu-GFP e para o isolado um expecto misto tendendo para a cor amarela. Mais de 97,9% dos clones Bug2145c110-RFP possuem um comprimento de onda correspondendo ao vermelho (Figura 14).

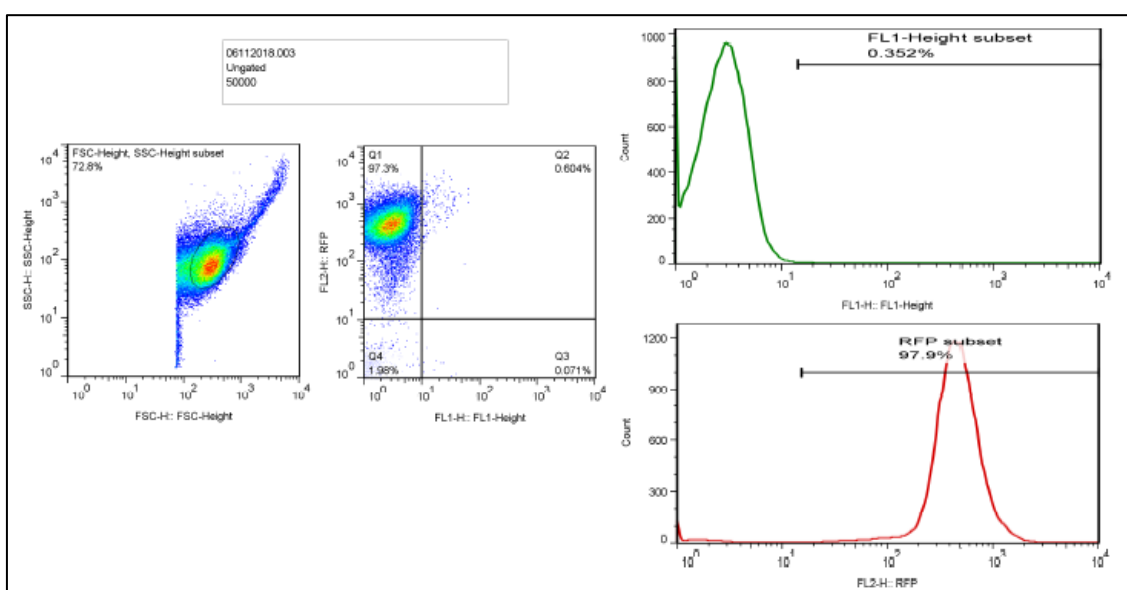


Figura 14. Leitura do comprimento de onda emitido pelos clones da linhagem Bug2145c110-RFP de *T. cruzi* realizados pelo citometro FACS Calibur e analisados pelo programa FlowJo.

Diferentemente do que foi encontrado nos clones de Bug2145c110-RFP, a população do clone YuYu-GFP teve somente 42,7% do total de parasitos caracterizada com a fluorescência verde. No entanto pode-se considerar que a cultura é de parasitos transfectados GFP (Figura 15).

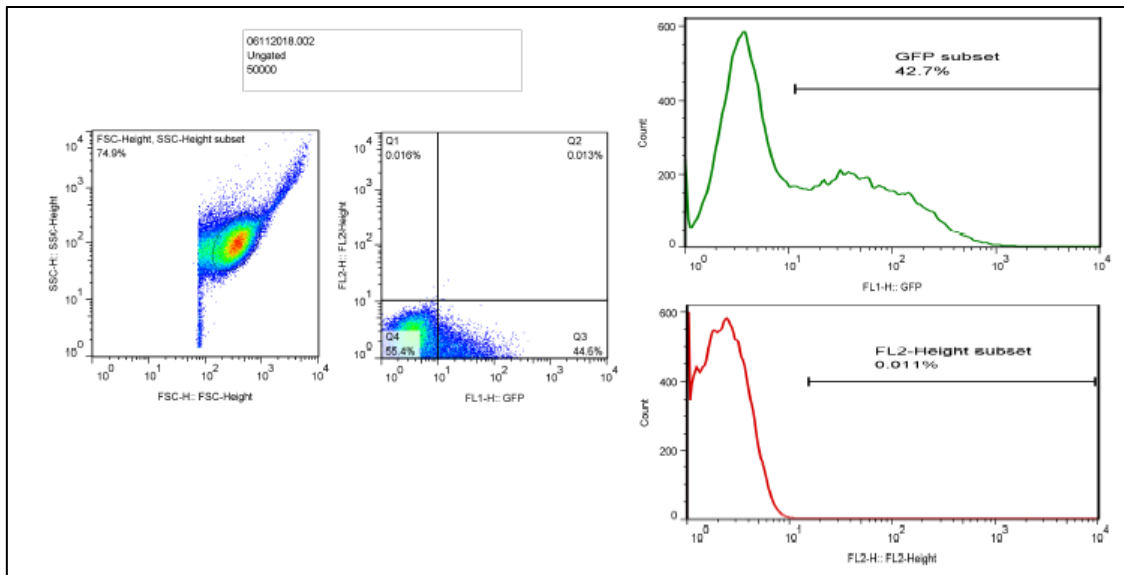


Figura 15. Leitura do comprimento de onda emitido pelos clones da linhagem YuYu-GFP de *T. cruzi* realizados pelo citometro FACS Calibur e analisados pelo programa FlowJo.

O isolado selecionado pelos dois antibióticos G418[®] e Higromicina B[®] de uma urina de *T. infestans*, exibiu 58,6% de sua população uma fluorescência do tipo vermelha (Figura 16).

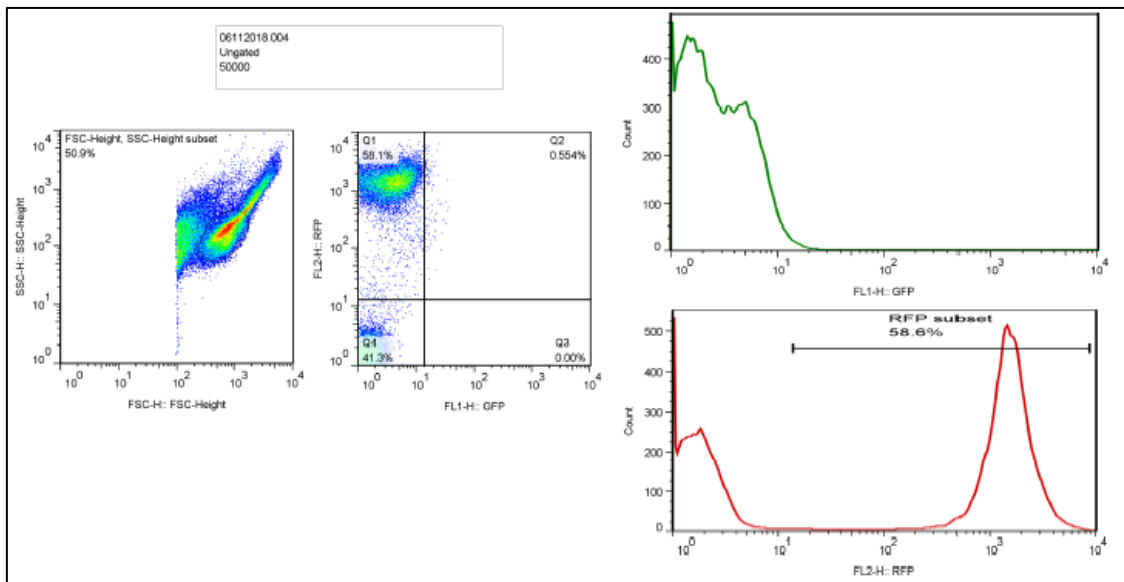


Figura 16. Leitura do comprimento de onda emitido pelos clones do isolado originário da infecção mista de Bug2145c110-RFP e YuYu-GFP de *T. cruzi* realizados pelo citometro FACS Calibur e analisados pelo programa FlowJo.

4.7.3 PCR

As amostras Bug2145c110-RFP, YuYu-GFP e o isolado selecionado pelos dois antibióticos tiveram seus DNAs extraídos e dosados e com esse produto foi realizado as PCRs com os dois primers escolhidos COII (Figura 17A) e rDNA 24S α (Figura 17B) e foram visualizados em gel de poliacrilamida 7,5% corados com nitrato de prata.

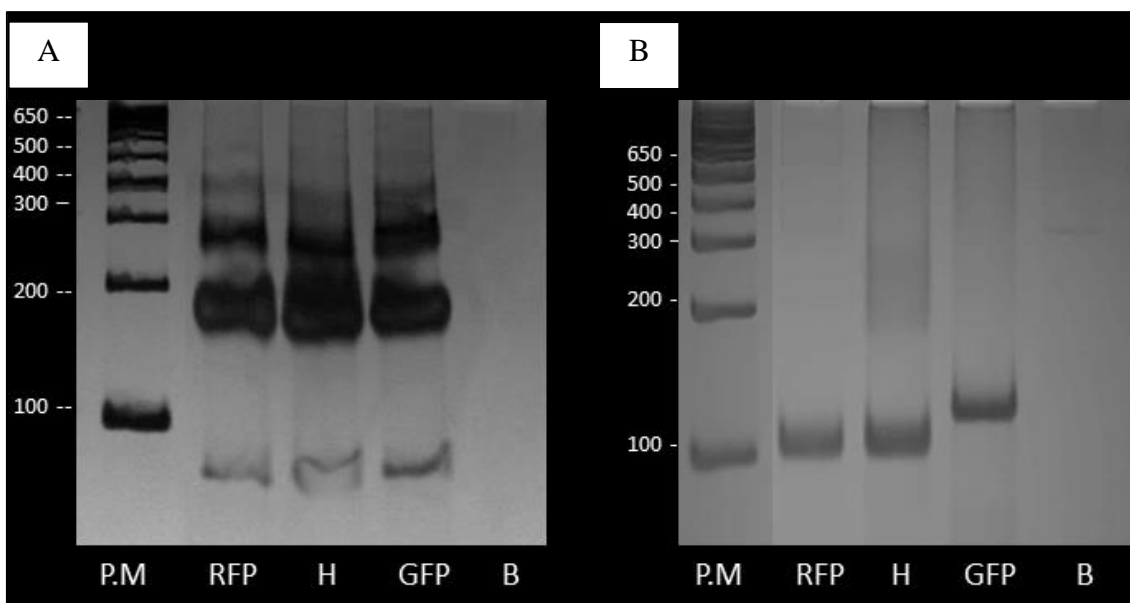


Figura 17. Gel de poliacrilamida corada com nitrato de prata. As amostras analisadas de acordo com os primers COII (A) e rDNA 24S α (Figura B).

O produto da linhagem Bug2145c110-RFP com os primers específicos para COII apresentou fragmentos de 82 e 212pb (Figura 17A), enquanto para os primers do rDNA 24S α teve um fragmento 110pb (Figura 17B). A linhagem YuYu-GFP teve 81 e 234pb para o primer COII (Figura 17A) e 125pb para o primer rDNA 24S α (Figura 17B). Através desses dois alvos conseguimos comprovar os perfis típicos de Bug2145c110-RFP (TcV) e para a YuYu-GFP (TcII).

O padrão das bandas visualizadas pelos produtos do isolado apresentou um perfil semelhante ao encontrado na amostra de Bug2145c110-RFP, sugerindo que o isolado tenha um perfil típico para TcV (Figura 17A e B).

4.8. DISCUSSÃO

O parasito *T. cruzi* inicialmente era considerado um organismo clonal que se reproduzia por divisão binária com a existência de pequenas variações genéticas ao longo do tempo (Tibayrenc 1998). Através desses conceitos surgiram as recomendações do uso linhagens, e não cepas, e da divisão em DTUs, que originou o tradicional paradigma da evolução clonal em *T. cruzi*. No entanto, atualmente já existem provas convincentes que a recombinação natural em *T. cruzi* seja bastante frequente.

De acordo (Pedroso et al. 2003), ao menos dois eventos de hibridização entre o TcII e TcIII, devem ter ocorrido. Em ambos os eventos, o receptor mitocondrial foi originário do TcII e o doador mitocondrial foi *T. cruzi* III. Em uma recente publicação (Zingales 2018), devido à grande frequência do encontro de híbridos em isolamentos naturais, recomendou o desenvolvimento de novos estudos que buscassem investigar o processo de hibridização em triatomíneos. Esse questionamento que ocorreu no evento TryTax no Rio de Janeiro em 2013 inspirou o desenvolvimento do nosso trabalho, que buscou investigar o fenômeno de hibridização em *T. cruzi in vivo*. Outros tripanossomatídeos como *Trypanosoma brucei* (Jenni et al. 1986, Bingle et al. 2001, Gibson et al. 2008) e *Leishmania major* (Akopyants et al. 2009) já tiveram esse fenômeno experimentalmente comprovado.

Em nosso estudo, objetivamos com sucesso os dois clones transfectados que poderiam demonstrar visualmente a hibridização caso a mesma tivesse ocorrido fornecendo um híbrido putativo de cor amarelada/alaranjada. Entretanto, selecionamos um parasito avermelhado resistente aos dois antibióticos que após análise por microscopia de fluorescência e citometria não mostrava indicações de que a hibridização pudesse ter ocorrido. Afim de se confirmar este fenótipo, realizamos ensaios moleculares avaliando genes importantes para a categorização de DTUs. Novamente os ensaios moleculares confirmaram os ensaios anteriores não indicando a ocorrência de hibridização. Provavelmente, este isolado se mostrou naturalmente resistente ao outro antibiótico e este fenômeno poderia ter ocasionado o seu crescimento o que deverá ser posteriormente confirmado.

O primeiro estudo que comprovou o processo de hibridização *in vitro* em *T. cruzi* utilizou células de mamíferos (Vero) e clones de *T. cruzi* transfectados (P1-hig e P2-neo). Os autores conseguiram com sucesso isolar seis linhagens/clones de *T. cruzi*

resistentes aos dois antibióticos de seleção e a hibridização foi gerada devido a uma fusão nuclear (Gaunt et al. 2003). Logo em seguida (Pires et al. 2008), utilizando-se a metodologia da transfecção realizaram com sucesso transfecções em formas tripomastigotas de *T. cruzi* em modelo *in vitro*. Mesmo não conseguido a comprovação da hibridização em *T. cruzi*, os autores recomendaram o seu uso das transfecções em estudos de infecção, invasão celular, distribuição do parasito em tecidos de modelos animais da doença de Chagas e para o estudo reprodutivo (Pires et al. 2008).

Mais recentemente, usando-se o clone CL-Brener (TcVI), um híbrido de ocorrência natural (El-Sayed et al. 2005), foi demonstrado mais uma vez a hibridização *in vitro* em *T. cruzi* (Alves et al. 2018). Os híbridos tiveram níveis de Rad51 super expressados, o que o conferiu uma maior eficiência na estabilidade e variabilidade genética em comparação aos selvagens. Os autores sugeririam que o processo reprodutivo de *T. cruzi* ocorra devido ao fenômeno natural eficiente dependente da recombinação homóloga (Alves et al. 2018). Resultado esse que corrobora com os estudos anteriores em *T. brucei* e tsé-tsé (Gibson et al. 2008). Sugerindo que mecanismo responsável pela hibridização possa ser comum aos dois tripanossomatídeos.

Utilizando-se dos mesmos plasmídeos de (Pires et al. 2008) e metodologias de (Alves et al. 2018), nosso trabalho buscou pela primeira vez comprovar o processo de hibridização em *T. cruzi in vivo* no modelo *T. infestans* utilizando-se duas linhagens de *T. cruzi* transfectadas com (RFP e GFP). O fenômeno seria comprovado através da visualização de um isolado com fenótipo amarelo em microscópio de fluorescência, parâmetros de fluorescência em citometria de fluxo e pelo padrão misto das bandas em um gel de poliacrilamida. Nenhuma das três metodologias escolhidas demonstrou efetivamente o perfil misto de um híbrido. A citometria de fluxo e a PCR sugeriu que o isolado tenha um perfil TcV igual a um dos parasitos parentais utilizados. Em conclusão, não foi observado hibridização nas condições dos nossos experimentos.

4.9. CONCLUSÃO

- Não houve ocorrência de hibridização sob nossas condições experimentais.

5. PRODUÇÕES CIENTÍFICAS PARALELAS:

- Paranaíba LF, Pinheiro LJ, Torrecilhas AC, Macedo DH, Menezes-Neto A, Tafuri WL, et al. (2017) *Leishmania enriettii* (Muniz & Medina, 1948): A highly diverse parasite is here to stay. PLoS Pathog 13(5): e1006303. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006303>.
 - Paranaíba, L., Pinheiro, L., Macedo, D., Menezes-Neto, A., Torrecilhas, A., Tafuri, W., & Soares, R. (2017). An overview on *Leishmania (Mundinia) enriettii*: Biology, immunopathology, LRV and extracellular vesicles during the host–parasite interaction. Parasitology, 1-9. <https://doi:10.1017/S0031182017001810>.
 - Pinheiro*, Lucélia J. Paranaíba*, Larissa F. Alves, Adriano F. Parreiras, Patrícia M. Gontijo, Nelder F. Soares, Rodrigo P. and Tafuri, Wagner L. 2018. Salivary Gland Extract Modulates the Infection of Two *Leishmania enriettii* Strains by Interfering With Macrophage Differentiation in the Model of *Cavia porcellus*. Frontiers in Microbiology, Vol. 9, Issue.969. <https://doi:10.3389/fmicb.2018.00969>.
- *Coautoria compartilhada.
- Capítulo de livro. Paranaíba LF e Soares RP (2018). In: Neves DP. Parasitologia Básica. O Sub-gênero *Mundinia* e *Leishmania enriettii*. Atheneu, pp.

6. REFERÊNCIAS

- Akopyants NS, Kimblin N, Secundino N, Patrick R, Peters N, Lawyer P, Dobson DE, Beverley SM, Sacks DL 2009. Demonstration of genetic exchange during cyclical development of *Leishmania* in the sand fly vector. *Science* 324: 265–268.
- Alonso-Padilla J, Gallego M, Schijman AG, et al 2017. Molecular diagnostics for Chagas disease: up to date and novel methodologies. *Expert Rev Mol Diagn.* 17:699–710
- Alvarenga NJ, Bronfen E 1997. Metaciclologênese do *Trypanosoma cruzi* como parâmetro de interação do parasita com o triatomíneo vetor. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 30: 247–250.
- Alves MJM, Colli W 2007. *Trypanosoma cruzi*: Adhesion to the Host Cell and Intracellular Survival. *IUBMB Life* 59: 274–279.
- Alves CL, Repolês BM, Silva MS da, Mendes IC, Marin PA, Aguiar PHN, Santos S da S, Franco GR, Macedo AM, Pena SDJ, Andrade L de O, Guarneri AA, Tahara EB, Elias MC, Machado CR 2018. The recombinase Rad51 plays a key role in events of genetic exchange in *Trypanosoma cruzi*. *Sci. Rep.* 8: 13335.
- Aragão MB 1971. Sobre a dispersão do *Triatoma infestans*. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 5: 183–191.
- Araújo CAC, Waniek PJ, Jansen AM 2009. An overview of Chagas disease and the role of triatomines on its distribution in Brazil. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 9: 227–234.
- Araújo CAC, Waniek PJ, Xavier SCC, Jansen AM 2011. Genotype variation of *Trypanosoma cruzi* isolates from different Brazilian biomes. *Exp. Parasitol.* 127: 308–312.
- Atayde VD, Suau HA, Townsend S, Hassani K, Kamhawi S, Olivier M 2015. Exosome secretion by the parasitic protozoan *Leishmania* within the sand fly midgut. *HHS Public Access* 13: 957–967.
- Azambuja P, Feder D, Garcia ES 2004. Isolation of *Serratia marcescens* in the midgut of *Rhodnius prolixus*: impact on the establishment of the parasite *Trypanosoma*

- cruzi* in the vector. *Exp. Parasitol.* 107: 89–96.
- Benítez-Hernández I, Méndez-Enríquez E, Ostoa P, Fortoul T, Ramírez JA, Stempin C, Cerbán F, Soldevila G, García-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.
- Bern C 2015. Chagas' Disease (DL Longo, Ed.). *N. Engl. J. Med.* 373: 456–466.
- Bingle LE, Eastlake JL, Bailey M, Gibson WC 2001. A novel GFP approach for the analysis of genetic exchange in trypanosomes allowing the in situ detection of mating events. *Microbiology* 147: 3231–3240.
- Boada-Sucre AA, Rossi Spadafora MS, Tavares-Marques LM, Finol HJ, Reyna-Bello A 2016. *Trypanosoma vivax* Adhesion to Red Blood Cells in Experimentally Infected Sheep. *Patholog. Res. Int.* 2016: 4503214.
- Brener, Z.; Andrade, Z. & Barral-Netto M 2000. *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. Rio de Janeiro.
- Brener Z 1962. Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* 4: 389–396.
- Campos JH, Soares RP, Ribeiro K, Andrade AC, Batista WL, Torrecilhas AC 2015. Extracellular Vesicles: Role in Inflammatory Responses and Potential Uses in Vaccination in Cancer and Infectious Diseases. *J. Immunol. Res.* 2015: 832057.
- Carvalho-Moreira CJ, Spata MCD, Coura JR, Garcia ES, Azambuja P, Gonzalez MS, 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. *Exp. Parasitol.* 103: 102–111.
- Castro 2006. Hospedeiros naturais da doença de Chagas em populações de mamíferos silvestres na área de influência da usina hidrelétrica Corumbá IV (Goiás): uma avaliação preliminar.
- 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. (K Michel, Ed.). *PLoS One* 7: e36591.

Cavazzana M, Marcili A, Lima L, Silva FM da, Junqueira AC V, Veludo HH, Viola LB, Campaner M, Nunes VLB, Paiva F, Coura JR, Camargo EP, Teixeira MMG 2010. Phylogeographical, ecological and biological patterns shown by nuclear (ssrRNA and gGAPDH) and mitochondrial (Cyt b) genes of trypanosomes of the subgenus *Schizotrypanum* parasitic in Brazilian bats. *Int. J. Parasitol.* 40: 345–355.

Cestari I, Ansa-Addo E, Deolindo P, Inal JM, Ramirez MI 2012. *Trypanosoma cruzi* immune evasion mediated by host cell-derived microvesicles. *J. Immunol.* 188: 1942–1952.

Chagas C 1909. New human trypanosomiasis: studies on morphology and evolutionary cycle of *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 1: 1–62.

Chargui N, Amro A, Haouas N, Schönian G, Babba H, Schmidt S, Ravel C, Lefebvre M, Bastien P, Chaker E, Aoun K, Zribi M, Kuhls K 2009. Population structure of Tunisian *Leishmania infantum* and evidence for the existence of hybrids and gene flow between genetically different populations. *Int. J. Parasitol.* 39: 801–811.

Colombo M, Raposo G, Théry C 2014. Biogenesis, Secretion, and Intercellular Interactions of Exosomes and Other Extracellular Vesicles. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 30: 255–289.

Cominetti MC, Csordas BG, Cunha RC, Andreotti R 2014. Geographical distribution of *Trypanosoma cruzi* in triatomine vectors in the State of Mato Grosso do Sul, Brazil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 47: 747–755.

Contreras VT, Araújo-Jorge TC de, Bonaldo MC, Thomaz N, Barbosa HS, Meirelles M de NSL de, Goldenberg S, Contreras VT, Araújo-Jorge TC de, Bonaldo MC, Thomaz N, Barbosa HS, Meirelles M de NSL de, Goldenberg S 1988. Biological aspects of the DM28C clone of *Trypanosoma cruzi* after metacylogenesis in chemically defined media. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 83: 123–133.

Coura JR 2007. Chagas disease: what is known and what is needed--a background article. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 102 Suppl 1: 113–122.

- Coura JR 2015. The main sceneries of Chagas disease transmission. The vectors, blood and oral transmissions--a comprehensive review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 110: 277–282.
- DaRocha WD, Silva RA, Bartholomeu DC, Pires SF, Freitas JM, Macedo AM, Vazquez MP, Levin MJ, Teixeira SMR 2004. Expression of exogenous genes in *Trypanosoma cruzi*: improving vectors and electroporation protocols. *Parasitol. Res.* 92: 113–120.
- Dias E 1939. Chagas Disease: A comparative study of the susceptibility of four natural vectors to the experimental development of *Schizotrypanum cruzi*. Third International Congress for Microbiology, New York, Abstracts of communications: 164.
- Dias E 1940. Técnica do xenodiagnostico na molestia de Chagas. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 35: 335–342.
- Dias JC 2015. Evolution of Chagas disease screening programs and control programs: historical perspective. *Glob Heart.* 10:193-202.
- Díaz S, Villavicencio B, Correia N, Costa J, Haag KL 2016. Triatomine bugs, their microbiota and *Trypanosoma cruzi*: asymmetric responses of bacteria to an infected blood meal. *Parasit. Vectors* 9: 636.
- Dujardin JC, Bañuls AL, Llanos-Cuentas A, Alvarez E, DeDoncker S, Jacquet D, Ray D Le, Arevalo J, Tibayrenc M 1995. Putative *Leishmania* hybrids in the Eastern Andean valley of Huanuco, Peru. *Acta Trop.* 59: 293–307.
- El-Sayed NM, Myler PJ, Bartholomeu DC, Nilsson D, Aggarwal G, Tran A-N, Ghedin E, Worthey EA, Delcher AL, Blandin G, Westenberger 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, Darban H, Silveira JF da, Jong P de, 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, Aken S Van, Vogt C, Ward PN, Wickstead B, Wortman J, White O, Fraser CM, Stuart KD, Andersson B 2005. The Genome Sequence of *Trypanosoma cruzi*, Etiologic Agent of Chagas Disease. *Science* (80-.). 309: 409–415.
- Ferguson MA 1999. The structure, biosynthesis and functions of glycosylphosphatidylinositol anchors, and the contributions of trypanosome research. *J. Cell Sci.* 112 (Pt 17): 2799–2809.
- Ferreira RC, Briones MRS 2012. Phylogenetic evidence based on *Trypanosoma cruzi* nuclear gene sequences and information entropy suggest that inter-strain intragenic recombination is a basic mechanism underlying the allele diversity of hybrid strains. *Infect. Genet. Evol.* 12: 1064–1071.
- Ferreira RC, Kessler RL, Lorenzo MG, Paim RMM, Ferreira LDL, Probst CM, Alves-Silva J, Guarneri AA 2016. Colonization of *Rhodnius prolixus* gut by *Trypanosoma cruzi* involves an extensive parasite killing. *Parasitology* 143: 434–443.
- Ferreira RC, Teixeira CF, de Sousa VFA, Guarneri AA 2018. Effect of temperature and vector nutrition on the development and multiplication of *Trypanosoma rangeli* in *Rhodnius prolixus*. *Parasitol Res.* 117:1737-1744.
- Filardi LS, Brener Z 1987. Susceptibility and natural resistance of *Trypanosoma cruzi* strains to drugs used clinically in Chagas disease. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 81: 755–759.
- De Freitas JM, Augusto-Pinto L, Pimenta JR, Bastos-Rodrigues L, Gonçalves VF, Teixeira SMR, Chiari E, Junqueira AC V, Fernandes O, Macedo AM, Machado CR, Pena SDJ 2006. Ancestral genomes, sex, and the population structure of *Trypanosoma cruzi*. *PLoS Pathog.* 2: e24.
- De Fuentes-Vicente JA de, Gutiérrez-Cabrera AE, Flores-Villegas AL, Lowenberger C, Benelli G, Salazar-Schettino PM, Córdoba-Aguilar A 2018. What makes an effective Chagas disease vector? Factors underlying *Trypanosoma cruzi* - triatomine interactions. *Acta Trop.* 183: 23–31.

- Garcia ES, Genta FA, Azambuja P de, Schaub GA 2010. Interactions between intestinal compounds of triatomines and *Trypanosoma cruzi*. *Trends Parasitol.* 26: 499–505.
- 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. *J. Insect Physiol.* 53: 11–21.
- Garcia ES, Vieira E, Gomes JEPL, Gonçalves AM, Garcia ES, Vieira E, Gomes JEPL, Gonçalves AM 1984. Molecular biology of the interaction *Trypanosoma cruzi* invertebrate host. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 79: 33–37.
- Gaunt MW, Yeo M, Frame IA, Stothard JR, Carrasco HJ, Taylor MC, Mena SS, Veazey P, Miles GAJ, Acosta N, Arias AR de, Miles MA 2003. Mechanism of genetic exchange in American trypanosomes. *Nature* 421: 936–939.
- Gibson W, Peacock L, Ferris V, Williams K, Bailey M 2008. The use of yellow fluorescent hybrids to indicate mating in *Trypanosoma brucei*. *Parasit. Vectors* 1: 4.
- Gonçalves D de S, Ferreira M da S, Liedke SC, Gomes KX, Oliveira GA de, Leão PEL, Cesar GV, Seabra SH, Cortines JR, Casadevall A, Nimrichter L, Domont GB, Junqueira MR, Peralta JM, Guimaraes AJ 2018. Extracellular vesicles and vesicle-free secretome of the protozoa *Acanthamoeba castellanii* under homeostasis and nutritional stress and their damaging potential to host cells. *Virulence* 9: 818–836.
- Gonçalves MF, Umezawa ES, Katzin AM, Souza W de, Alves MJ, Zingales B, Colli W 1991. *Trypanosoma cruzi*: shedding of surface antigens as membrane vesicles. *Exp. Parasitol.* 72: 43–53.
- Gonzalez MS, Garcia ES 1992. Effect of azadirachtin on the development of *Trypanosoma cruzi* in different species of triatomine insect vectors: Long-term and comparative studies. *J. Invertebr. Pathol.* 60: 201–205.
- Gonzalez MS, Souza MS, Garcia ES, Nogueira NFS, Mello CB, Cánepa GE, Bertotti S, Durante IM, Azambuja P, Buscaglia CA 2013. *Trypanosoma cruzi* TcSMUG L-surface mucins promote development and infectivity in the triatomine vector *Rhodnius prolixus*. (S Kamhawi, Ed.). *PLoS Negl. Trop. Dis.* 7: e2552.

- Gumiel M, Mota FF da, Rizzo V de S, Sarquis O, Castro DP de, Lima MM, Garcia E de S, Carels N, Azambuja P 2015. Characterization of the microbiota in the guts of *Triatoma brasiliensis* and *Triatoma pseudomaculata* infected by *Trypanosoma cruzi* in natural conditions using culture independent methods. *Parasit. Vectors* 8: 245.
- Hong S-W, Kim M-R, Lee E-Y, Kim JH, Kim Y-S, Jeon SG, Yang J-M, Lee B-J, Pyun B-Y, Gho YS, Kim Y-K 2011. Extracellular vesicles derived from *Staphylococcus aureus* induce atopic dermatitis-like skin inflammation. *Allergy* 66: 351–359.
- Hottz ED, Poncini CV, Cribb P, De LM, Torró P, Moreira LR, Pablos Torró LM De, Retana Moreira L, Osuna A 2018. Extracellular Vesicles in Chagas Disease: A New Passenger for an Old Disease.
- Ienne S, Pedroso A, Carmona E Ferreira R, Briones MRS, Zingales B 2010. Network genealogy of 195-bp satellite DNA supports the superimposed hybridization hypothesis of *Trypanosoma cruzi* evolutionary pattern. *Infect. Genet. Evol.* 10: 601–606.
- Izeta-Alberdi A, Ibarra-Cerdeña CN, Moo-Llanes DA, Ramsey JM 2016. Geographical, landscape and host associations of *Trypanosoma cruzi* DTUs and lineages. *Parasit. Vectors* 9: 631.
- Jansen AM, Xavier SCC, Roque ALR 2015. The multiple and complex and changeable scenarios of the *Trypanosoma cruzi* transmission cycle in the sylvatic environment. *Acta Trop.* 151: 1–15.
- Jansen AM, Xavier SC das C, Roque ALR 2018. *Trypanosoma cruzi* transmission in the wild and its most important reservoir hosts in Brazil. *Parasit. Vectors* 11: 502.
- Jenni L, Marti S, Schweizer J, Betschart B, Page RWF Le, Wells JM, Tait A, Paindavoine P, Pays E, Steinert M 1986. Hybrid formation between African trypanosomes during cyclical transmission. *Nature* 322: 173–175.
- Kamhawi S, Ramalho-Ortigao M, Pham VM, Kumar S, Lawyer PG, Turco SJ, Barillas-Mury C, Sacks DL, Valenzuela JG 2004. A role for insect galectins in parasite survival. *Cell* 119: 329–341.

- Kelly JM, Law JM, Chapman CJ, Eys GJ Van, Evans DA 1991. Evidence of genetic recombination in *Leishmania*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 46: 253–263.
- Kessler RL, Contreras VT, Marlière NP, Aparecida Guarneri A, Villamizar Silva LH, Mazzarotto GACA, Batista M, Soccol VT, Krieger MA, Probst CM 2017. Recently differentiated epimastigotes from *Trypanosoma cruzi* are infective to the mammalian host. *Mol Microbiol.* 104:712-736.
- Kollien AH, Schaub GA 1998a. The development of *Trypanosoma cruzi* (Trypanosomatidae) in the reduviid bug *Triatoma infestans* (Insecta): influence of starvation. *J. Eukaryot. Microbiol.* 45: 59–63.
- Kollien A., Schmidt J, Schaub G. 1998a. Modes of association of *Trypanosoma cruzi* with the intestinal tract of the vector *Triatoma infestans*. *Acta Trop.* 70: 127–141.
- Kollien AH, Schaub GA 1998b. Development of *Trypanosoma cruzi* after starvation and feeding of the vector - a review. *Tokai J. Exp. Clin. Med.* 23: 335–340.
- Kollien AH, Schaub GA 2000. The development of *Trypanosoma cruzi* in triatominae. *Parasitol. Today* 16: 381–387.
- De Lana M de, Pinto A da S, Barnabé C, Quesney V, Noël S, Tibayrenc M 1998. *Trypanosoma cruzi*: Compared Vectorial Transmissibility of Three Major Clonal Genotypes by *Triatoma infestans*. *Exp. Parasitol.* 90: 20–25.
- Lent H, Wygodzinsky PW 1979. Revision of the Triatominae (Hemiptera, Reduviidae), and their significance as vectors of Chagas' disease. *Bulletin of the AMNH* ; v. 163, article 3.
- Lima L, Espinosa-Álvarez O, Ortiz PA, Trejo-Varón JA, Carranza JC, Pinto CM, Serrano MG, Buck GA, Camargo EP, Teixeira MMG 2015. Genetic diversity of *Trypanosoma cruzi* in bats, and multilocus phylogenetic and phylogeographical analyses supporting Tcbat as an independent DTU (discrete typing unit). *Acta Trop.* 151: 166–177.
- Lima VDS, Xavier SC das C, Maldonado IFR, Roque ALR, Vicente ACP, Jansen AM 2014. Expanding the knowledge of the geographic distribution of *Trypanosoma cruzi* TcII and TcV/TcVI genotypes in the Brazilian Amazon. (LH Carvalho, Ed.).

- Little JW, Tay J, Biagi F 1966. A study on the susceptibility of triatomid bugs to some Mexican strains of *Trypanosoma cruzi*. *J Med Entomol.* 3:252-5
- Lopes CMT, Menna-Barreto RFS, Pavan MG, Pereira MCDS, Roque ALR 2018. *Trypanosoma janseni* n. sp. (Trypanosomatida: Trypanosomatidae) isolated from *Didelphis aurita* (Mammalia: Didelphidae) in the Atlantic Rainforest of Rio de Janeiro, Brazil: integrative taxonomy and phylogeography within the *Trypanosoma cruzi* clade. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 113: 45–55.
- Macedo AM, Pena SD 1998. Genetic Variability of *Trypanosoma cruzi*: Implications for the Pathogenesis of Chagas Disease. *Parasitol. Today* 14: 119–124.
- Maffey L, Cardinal M V, Ordóñez-Krasnowski PC, Lanati LA, Lauricella MA, Schijman AG, Gürtler RE 2012. Direct molecular identification of *Trypanosoma cruzi* discrete typing units in domestic and peridomestic *Triatoma infestans* and *Triatoma sordida* from the Argentine Chaco. *Parasitology* 139: 1570–1579.
- Marcilla A, Martin-jaular L, Trelis M, Menezes-neto A De, Osuna A, Bernal D, Fernandez-becerra C, Almeida IC, Portillo HA 2014. Extracellular vesicles in parasitic diseases. *J Extracell Vesicles* 1: 1–15.
- Mattos EC, Tonelli RR, Colli W, Alves MJM 2014. The Gp85 Surface Glycoproteins from *Trypanosoma cruzi*. In: *Subcell. Biochem.*, pp. 151–180.
- 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.
- Monje-Rumi MM, Brandán CP, Ragone PG, Tomasini N, Lauthier JJ, Alberti D'Amato AM, Cimino RO, Orellana V, Basombrío MA, Diosque P 2015. *Trypanosoma cruzi* diversity in the Gran Chaco: mixed infections and differential host distribution of TcV and TcVI. *Infect. Genet. Evol.* 29: 53–59.
- Nogueira NFS, Gonzalez MS, Gomes JE, Souza W de, Garcia ES, Azambuja P, Nohara LL, Almeida IC, Zingales B, Colli W 2007. *Trypanosoma cruzi*: involvement of glycoinositolphospholipids in the attachment to the luminal midgut surface of

Rhodnius prolixus. *Exp. Parasitol.* 116: 120–128.

Nogueira PM, Ribeiro K, Silveira ACO, Campos JH, Martins-Filho OA, Bela SR, Campos MA, Pessoa NL, Colli W, Alves MJM, Soares RP, Torrecilhas AC 2015. Vesicles from different *Trypanosoma cruzi* strains trigger differential innate and chronic immune responses. *J. Extracell. Vesicles* 4: 28734.

Nolder D, Roncal N, Davies CR, Llanos-Cuentas A, Miles MA 2007. Multiple hybrid genotypes of *Leishmania* (viannia) in a focus of mucocutaneous Leishmaniasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 76: 573–578.

Odiwuor S, Doncker S De, Maes I, Dujardin J-C, Auwera G Van der 2011. Natural *Leishmania donovani/Leishmania aethiopica* hybrids identified from Ethiopia. *Infect. Genet. Evol.* 11: 2113–2118.

Okenu DM, Opara KN, Nwuba RI, Nwagwu M 1999. Purification and characterisation of an extracellularly released protease of *Trypanosoma brucei*. *Parasitol. Res.* 85: 424–428.

Palace-Berl F, Pasqualoto KFM, Jorge SD, Zingales B, Zorzi RR, Silva MN, Ferreira AK, Azevedo RA de, Teixeira SF, Tavares LC 2015. Designing and exploring active N'-[(5-nitrofuranyl) methylene] substituted hydrazides against three *Trypanosoma cruzi* strains more prevalent in Chagas disease patients. *Eur. J. Med. Chem.* 96: 330–339.

Pedroso A, Cupolillo E, Zingales B 2003. Evaluation of *Trypanosoma cruzi* hybrid stocks based on chromosomal size variation. *Mol. Biochem. Parasitol.* 129: 79–90.

Pereira ME, Andrade AF, Ribeiro JM 1981. Lectins of distinct specificity in *Rhodnius prolixus* interact selectively with *Trypanosoma cruzi*. *Science* 211: 597–600.

Pérez-Molina JA, Perez AM, Norman FF, Monge-Maillo B, López-Vélez R 2015. Old and new challenges in Chagas disease. *Lancet Infect. Dis.* 15: 1347–1356.

Perlowagora-Szumlewicz A, Müller CA 1982. Studies in search of a suitable experimental insect model for xenodiagnosis of hosts with Chagas' disease. 1- Comparative xenodiagnosis with nine Triatomine species of animals with acute infections by *Trypanosoma cruzi*. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1982 Jan-

Mar;77(1):37-53.

Perlowagora-Szumlewicz A1, Muller CA, Moreira CJ 1990. Studies in search of a suitable experimental insect model for xenodiagnosis of hosts with Chagas' disease. 4-The reflection of parasite stock in the responsiveness of different vector species to chronic infection with different *Trypanosoma cruzi* stocks. *Rev Saude Publica*. 1990 Jun;24(3):165-77.

Pires SF, DaRocha WD, Freitas JM, Oliveira LA, Kitten GT, Machado CR, Pena SDJ, Chiari E, Macedo AM, Teixeira SMR 2008. Cell culture and animal infection with distinct *Trypanosoma cruzi* strains expressing red and green fluorescent proteins. *Int. J. Parasitol.* 38: 289–297.

Pope SM, Lässer C 2013. *Toxoplasma gondii* infection of fibroblasts causes the production of exosome-like vesicles containing a unique array of mRNA and miRNA transcripts compared to serum starvation. *J. Extracell. vesicles* 2: 22484.

Ravel C, Cortes S, Pratlong F, Morio F, Dedet J-P, Campino L 2006. First report of genetic hybrids between two very divergent *Leishmania* species: *Leishmania infantum* and *Leishmania major*. *Int. J. Parasitol.* 36: 1383–1388.

Ribeiro AR, Oliveira RC de, Ceretti Junior W, Lima L, Almeida LA de, Nascimento JD, Teixeira MMG, Rosa JA da 2016. *Trypanosoma cruzi* isolated from a triatomine found in one of the biggest metropolitan areas of Latin America. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 49: 183–189.

Ribeiro KS, Vasconcellos CI, Soares RP, Mendes MT, Ellis CC, Aguilera-Flores M, Almeida IC de, Schenkman S, Iwai LK, Torrecilhas AC 2018. Proteomic analysis reveals different composition of extracellular vesicles released by two *Trypanosoma cruzi* strains associated with their distinct interaction with host cells. *J. Extracell. vesicles* 7: 1463779.

Roellig DM, Ellis AE, Yabsley MJ 2009. Oral transmission of *Trypanosoma cruzi* with opposing evidence for the theory of carnivory. *J. Parasitol.* 95: 360–364.

Roellig DM, Savage MY, Fujita AW, Barnabé C, Tibayrenc M, Steurer FJ, Yabsley MJ 2013. Genetic Variation and Exchange in *Trypanosoma cruzi* Isolates from the United States (MM Rodrigues, Ed.). *PLoS One* 8: e56198.

- Rogers MB, Downing T, Smith BA, Imamura H, Sanders M, Svobodova M, Volf P, Berriman M, Cotton JA, Smith DF 2014. Genomic Confirmation of Hybridisation and Recent Inbreeding in a Vector-Isolated *Leishmania* Population (X Didelot, Ed.). *PLoS Genet.* 10: e1004092.
- Romano A, Inbar E, Debrabant A, Charmoy M, Lawyer P, Ribeiro-Gomes F, Barhoumi M, Grigg M, Shaik J, Dobson D, Beverley SM, Sacks DL 2014. Cross-species genetic exchange between visceral and cutaneous strains of *Leishmania* in the sand fly vector. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111: 16808–16813.
- Schaub GA 1989. Does *Trypanosoma cruzi* stress its vectors? *Parasitol. Today* 5: 185–188.
- Schaub GA, Böker CA 1986. Colonization of the rectum of *Triatoma infestans* by *Trypanosoma cruzi*: influence of starvation studied by scanning electron microscopy. *Acta Trop.* 43: 349–354.
- Schaub GA, Böker CA 1987. Colonization of the rectum of *Triatoma infestans* by *Trypanosoma cruzi* studied by scanning electron microscopy: influence of blood uptake by the bug. *Parasitol. Res.* 73: 417–420.
- Schofield CJ, Dias JC 1999. The Southern Cone Initiative against Chagas disease. *Adv. Parasitol.* 42: 1–27.
- Schofield CJ, Dujardin JP 1997. Chagas disease vector control in Central America. *Parasitol. Today* 13: 141–144.
- Sean Ha D, Schwarz JK, Turco SJ, Beverley SM 1996. Use of the green fluorescent protein as a marker in transfected *Leishmania*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 77: 57–64.
- Silva CS da, Carbajal-de-la-Fuente AL, Almeida CE, Gonçalves TCM, Santos-Mallet JR dos, Silva CS da, Carbajal-de-la-Fuente AL, Almeida CE, Gonçalves TCM, Santos-Mallet JR dos 2018. Morphobiological, morphometric and ultrastructural characterization of sylvatic *Trypanosoma cruzi* isolates from Rio de Janeiro state, Brazil. *Brazilian J. Biol.* 79: 294–303.
- Soares RP, Torrecilhas AC, Assis RR, Rocha MN, Moura e Castro FA, Freitas GF, Murta SM, Santos SL, Marques AF, Almeida IC, Romanha AJ 2012. Intraspecies

- variation in *Trypanosoma cruzi* GPI-mucins: biological activities and differential expression of α -galactosyl residues. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 87: 87–96.
- Souto RP, Fernandes O, Macedo AM, Campbell DA, Zingales B 1996. DNA markers define two major phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 83: 141–152.
- Stanaway JD, Roth G 2015. The Burden of Chagas Disease: Estimates and Challenges. *Glob. Heart* 10: 139–144.
- Sturm NR, Campbell DA 2010. Alternative lifestyles: the population structure of *Trypanosoma cruzi*. *Acta Trop.* 115: 35–43.
- Szempruch AJ, Dennison L, Kieft R, Harrington JM, Hajduk SL 2016. Sending a message: extracellular vesicles of pathogenic protozoan parasites. *Nat. Rev. Microbiol.* 14: 669–675.
- Tibayrenc M 1998. Genetic epidemiology of parasitic protozoa and other infectious agents: the need for an integrated approach. *Int. J. Parasitol.* 28: 85–104.
- Torrecilhas AC, Schumacher RI, Alves MJM, Colli W 2012. Vesicles as carriers of virulence factors in parasitic protozoan diseases. *Microbes Infect.* 14: 1465–1474.
- Trocoli Torrecilhas AC, Tonelli RR, Pavanelli WR, Silva JS da, Schumacher RI, Souza W de, E Silva NC, Almeida Abrahamsohn I de, Colli W, Manso Alves MJ 2009. *Trypanosoma cruzi*: parasite shed vesicles increase heart parasitism and generate an intense inflammatory response. *Microbes Infect.* 11: 29–39.
- Uehara LA, Moreira OC, Oliveira AC, Azambuja P, Lima APCA, Britto C, Santos ALS dos, Branquinha MH, d'Avila-Levy CM 2012. Cruzipain promotes *Trypanosoma cruzi* adhesion to *Rhodnius prolixus* midgut. (S Kamhawi, Ed.). *PLoS Negl. Trop. Dis.* 6: e1958.
- Vieira CS, Waniek PJ, Castro DP, Mattos DP, Moreira OC, Azambuja P 2016. Impact of *Trypanosoma cruzi* on antimicrobial peptide gene expression and activity in the fat body and midgut of *Rhodnius prolixus*. *Parasit. Vectors* 9: 119.
- WHO 2018. PAHO/WHO | Paraguay interrupts vector transmission of Chagas in the home.

- Yabsley MJ, Noblet GP 2002. Biological and molecular characterization of a raccoon isolate of *Trypanosoma cruzi* from South Carolina. *J. Parasitol.* 88: 1273–1276.
- Zhang H, Freitas D, Kim HS, Fabijanic K, Li Z, Chen H, Mark MT, Molina H, Martin AB, Bojmar L, Fang J, Rampersaud S, Hoshino A, Matei I, Kenific CM, Nakajima M, Mutvei AP, Sansone P, Buehring W, Wang H, Jimenez JP, Cohen-Gould L, Paknejad N, Brendel M, Manova-Todorova K, Magalhães A, Ferreira JA, Osório H, Silva AM, Massey A, Cubillos-Ruiz JR, Galletti G, Giannakakou P, Cuervo AM, Blenis J, Schwartz R, Brady MS, Peinado H, Bromberg J, Matsui H, Reis CA, Lyden D 2018. Identification of distinct nanoparticles and subsets of extracellular vesicles by asymmetric flow field-flow fractionation. *Nat. Cell Biol.* 20: 332–343.
- Zingales B 2011. *Trypanosoma cruzi*: um parasita, dois parasitas ou vários parasitas da doença de chagas? *Rev. da Biol.* 6b: 44–48.
- Zingales B 2018. *Trypanosoma cruzi* genetic diversity: Something new for something known about Chagas disease manifestations, serodiagnosis and drug sensitivity. *Acta Trop.* 184: 38–52.
- Zingales B, Andrade S, Briones M, Campbell D, Chiari E, Fernandes O, Guhl F, Lages-Silva E, Macedo A, Machado C, Miles M, Romanha A, Sturm N, Tibayrenc M, Schijman A 2009. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 104: 1051–1054.
- Zingales B, Miles MA, Campbell DA, Tibayrenc M, Macedo AM, Teixeira MMG, Schijman AG, Llewellyn MS, Lages-Silva E, Machado CR, Andrade SG, Sturm NR 2012. The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: rationale, epidemiological relevance and research applications. *Infect. Genet. Evol.* 12: 240–253.
- Zingales B, Pereira ME, Almeida KA, Umezawa ES, Nehme NS, Oliveira RP, Macedo A, Souto RP 1997. Biological parameters and molecular markers of clone CL Brener—the reference organism of the *Trypanosoma cruzi* genome project. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 92: 811–814.
- Zingales B, Souto RP, Mangia RH, Lisboa CV, Campbell DA, Coura JR, Jansen A,

Fernandes O 1998. Molecular epidemiology of American trypanosomiasis in Brazil based on dimorphisms of rRNA and mini-exon gene sequences. *Int. J. Parasitol.* 28: 105–112.

ANEXO I.

01/11/2019

REVISED - Memórias do Instituto Oswaldo Cruz - Manuscript ID MIOC-2019-0217.R2

 Responder a todos |  Excluir Lixo eletrônico | 



REVISED - Memórias do Instituto Oswaldo Cruz - Manuscript ID MIOC-2019-0217.R2



Memórias MIOC <onbehalf@manuscriptcentral.com>

 Responder a todos | 

sáb 26/10, 16:00

Rodrigo Pedro Pinto Soares; Memórias Artigo 

Caixa de Entrada

26-Oct-2019

Dear Dr.(a) Soares:

Your manuscript entitled "Extracellular vesicles isolated from *Trypanosoma cruzi* affects early parasite migration in the gut of *Rhodnius prolixus* but not in *Triatoma infestans*" has been successfully submitted online and is presently being given full consideration for publication in the Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.

Your manuscript ID is MIOC-2019-0217.R2.

Please mention the above manuscript ID in all future correspondence or when calling the office for questions. If there are any changes in your street address or e-mail address, please log in to ScholarOne Manuscripts at <https://mc04.manuscriptcentral.com/mioc-scielo> and edit your user information as appropriate.

You can also view the status of your manuscript at any time by checking your Author Center after logging in to <https://mc04.manuscriptcentral.com/mioc-scielo>.

Thank you for submitting your manuscript to the Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.

Sincerely,
Dr. Adelson Brandão
Memórias do Instituto Oswaldo Cruz
memorias@fiocruz.br

1. Running title: EVs during interaction with triatomines.

Short communication

Extracellular vesicles isolated from *Trypanosoma cruzi* affect early parasite migration in the gut of *Rhodnius prolixus* but not in *Triatoma infestans*

Larissa F. Paranaíba ^{1,2}, Alessandra A. Guarneri ², Ana C. Torrecilhas ³, Maria Norma Melo ¹, Rodrigo P. Soares ^{2*}

1 Departamento de Parasitologia, Universidade Federal de Minas Gerais. Av. Antônio Carlos, 6627, 31270-901, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

2 Instituto René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz. Av. Augusto de Lima, 1715, 30.190-009, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

3 Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de São Paulo. Av. São Nicolau, 210, 09913-030, Diadema, São Paulo, Brazil.

*Correspondence to: Rodrigo P. Soares, Instituto René Rachou/Fundação Oswaldo Cruz. Av. Augusto de Lima, 1715, 30190-009, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. Email: rodrigo.pedro@fiocruz.br

Sponsorship: CNPq, FAPEMIG and FAPESP.

2. Keywords: *Trypanosoma cruzi*; Triatomines; Extracellular vesicles; Interaction.

3. Abstract

The protozoan *Trypanosoma cruzi* has the ability to spontaneously secrete extracellular vesicles (EVs). In this paper, *T. cruzi* EVs derived from epimastigote forms were evaluated during interaction with triatomine bugs *Rhodnius prolixus* and *Triatoma infestans*. *Trypanosoma cruzi* EVs were purified and artificially offered to the insects prior to infection with epimastigote forms. No effect of EVs was detected in the parasite counts in the guts of both vectors after 49-50 days. On the other hand, pre-feeding with EVs delayed parasite migration to rectum only in the gut in *R. prolixus* after 21-22 days. Those data suggest a possible role of *T. cruzi* EVs during the earlier events of infection in the invertebrate host.

4. Introduction

Chagas disease is caused by the protozoan *Trypanosoma cruzi* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae). It is estimated that more than eight million people are infected and 25 million are at risk of acquiring the disease. More than 10 thousand people die per year due to complications of clinical manifestations of the disease. Chagas disease was originally found in the Americas, but recently, due to human migration, has expanded to non-endemic countries in North America, Europe and Asia. *Trypanosoma cruzi* is transmitted by triatomines (Reduviidae: Triatominae) including *Triatoma infestans* and *Rhodnius prolixus*, the most important vectors in Latin America. ⁽¹⁻³⁾

To develop and establish infection within the hostile environments in the digestive tract of the vector and vertebrate hosts, *T. cruzi* developed a variety of strategies implicating a wide number of molecules. ⁽⁴⁾ Those are important for attachment and internalization including Tc-85, ⁽⁵⁾ glycoinositolphospholipids ⁽⁶⁾ and GPI-mucins. ⁽⁷⁾ Some of those molecules can be either shed or expressed in the surface of extracellular vesicles (EVs).

Extracellular vesicles are spontaneously released by any cells including prokaryotic and eukaryotic. ⁽⁸⁾ Depending on the origin, size and function they can be classified as microvesicles, nanoparticles, apoptotic bodies and exosomes. In general, EVs are composed of a phospholipid bilayer containing lipids, proteins, glycoconjugates and nucleic acids. ⁽⁹⁾ The role of EVs during interaction with vectors is poorly understood. However, it is already known that in another Trypanosomatid, *Leishmania major*, EVs are released by promastigotes in the midgut of the sand fly vector and further inoculated together with the parasite in the vertebrate host. ⁽¹⁰⁾ Altogether, this inoculum will be important for cell attraction and parasite establishment in the vertebrate host. In this context, *T. cruzi* EVs have already demonstrated their pro-inflammatory activity during host innate and chronic immune responses. ⁽¹¹⁻¹²⁾ However, no study on the role during the interaction with triatomine vector was performed.

Here, we provide evidence that in the digestive tract of triatomine vectors, *T. cruzi* EVs were able to functionally affect early parasite migration in *R. prolixus* and had no effect on the number of metacyclics in both vector species.

5. Materials and Methods

5.1 Parasites and insects

Bug2149 cl10 *T. cruzi* strain (Bug), originally isolated from naturally infected *T. infestans* (Cochabamba, Bolivia) was used. ⁽¹³⁾ Epimastigote forms were cultured in liver-infusion tryptose (LIT) supplemented with 15% fetal bovine serum (FBS), 100 µg/mL streptomycin, 100 units/mL penicillin (27 °C and pH 7.2). *Triatoma infestans* and *R. prolixus* used in this study were obtained from a laboratory colony derived from insects collected in Brazil and Honduras, respectively. Triatomines were reared at 25 ±

1°C, 60 ± 10% relative humidity and natural illumination as previously reported. ⁽¹⁴⁾
Fourth instar nymphs, starved for 30 days after ecdysis, were used in the assays.

5.2 Purification, distribution and concentration of EVs

Parasites were grown in LIT medium, washed in HBSS, centrifuged (1000g/10min, 10°C) and counted. For EVs release, *T. cruzi* in early log phase (1×10^5 parasites/mL) were resuspended in LIT medium without FBS and incubated at 28°C for 2 h. Parasites were fixed and cover slips were prepared for Scanning Electron Microscopy (SEM) and Transmission Electron Microscopy (TEM) as previously reported. ⁽¹¹⁻¹²⁾ After vesiculation, supernatants were collected, filtered (0.22 µm) and ultra-centrifuged (100,000g/2h, 4°C). Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) was performed to determine size, distribution and concentration of EVs as reported elsewhere. ⁽¹²⁾ Acquisitions were measured in a Nanosight NS300 instrument (Malvern Instruments Ltd, Malvern, UK) equipped with a 405-nm laser and coupled to a CCD camera (the laser emitting a 60-mW beam at 405-nm wavelength). Data were analyzed using NTA software (version 2.3 build 0017). The detection threshold was set to 10. Blur, Min track Length and Min Expected Particle Size were set to auto. To perform the measurements, samples were diluted 1:100 in PBS. Readings were taken in triplicates during 30 s at 20 frames per second (3 times for each sample), at camera level set to 14 and manual monitoring of temperature (19°C).

5.3 Insect infection and dissection

Citrated rabbit blood was obtained from Centro de Criação de Animais de Laboratório, Fiocruz, RJ. Insects were artificially exposed to EVs and parasites in two consecutive moments: (i) first day, nymphs were artificially fed on citrated heat-inactivated (56 °C, 30 min) rabbit blood containing EVs. Each insect was allowed to ingest 20–30 µL of

blood (approximately $6.4-9.6 \times 10^4$ particles/ μL): (ii) second day, the same nymphs were artificially fed to repletion on citrated heat-inactivated rabbit blood containing epimastigotes. Those parasites were obtained from LIT cultures, washed in PBS and resuspended in the rabbit blood at a final concentration of 1×10^7 parasites/mL. Since each insect could ingest 20-30 μL of blood, the number of epimastigotes would range from $2-3 \times 10^5$. Control group was fed on blood and blood + parasites with similar amounts of the treated group in the respective days. The midgut and rectum of a group of nymphs ($n=20$) were individually dissected (**Figure 1**) and homogenized in 30 μL of phosphate buffered saline (PBS; 0.15 M NaCl at 0.01 M sodium phosphate, pH 7.4) at 21-22 days post infection (p.i.). Quantification of parasites was made in Neubauer chamber. At 28 days p.i., a new feeding with citrated heat-inactivated rabbit blood was offered for the remaining nymphs ($n=15$). Immediately after feeding, the nymphs were transferred to 1.5 ml plastic tubes and the urine produced during diuresis was collected to evaluate the percentage of metacyclic forms. 10 μL of each sample were fixed in 10% methanol and stained with Giemsa®. The numbers of parasites were quantified by analysing the whole slide in optical microscopy. The same nymphs were dissected as described above at 49-50 days p.i. Sample size was calculated as reported elsewhere. ⁽¹⁴⁾

5.4 Statistical analysis

To test whether or not the data follow a normal distribution, the test Kolmogorov-Smirnov was performed. Data showing a normal distribution were analysed by t test or analysis of variance (ANOVA). In the case of ANOVA, pairwise comparisons were performed by means of Tukey post hoc tests. Non-parametric data were analysed by Mann-Whitney test. $P < 0.05$ was considered significant.

6. Results

Trypanosoma cruzi epimastigotes were able to release EVs (**Figure 2A and B**). Based on the data of the NTA, EVs exhibited an average size of 223.1 nm (D10=143.6; D50=245.5 and D90= 264.7) (**Figures 2C**) and a mean concentration between 6.84×10^7 particles/mL (**Figures 2D**). Released EVs were also subjected to TEM in order to confirm integrity and their sizes were within the range detected in NTA (**Figure 3A-D**). For functional studies, those vesicles were mixed to rabbit blood and offered to the triatomines. After EVs exposure and infection, *T. cruzi* migration in different parts of the digestive tract was compared in two periods of infection (21-22 and 49-50 days p.i.). In *R. prolixus*, there was an increase in the number of parasites present in the midgut when compared to the control group at 21-22 days p.i. (Mann Whitney, $P < 0.0001$; **Figure 4A**). In the rectum, however, the number of parasites was reduced in the nymphs treated with EVs (Mann Whitney, $P < 0.0001$; **Figure 4A**). After 49-50 days p.i. the number of parasites in the midgut was reduced in both treatments, with no differences between the groups (Mann Whitney, n.s.; **Figure 4B**). For *T. infestans*, no differences in the number of parasites between EVs-exposed nymphs and controls were observed (Mann Whitney, n.s.; **Figures 5A and B**). At 28 days p.i. the number of metacyclis in the urine did not vary among controls and EV exposed insects for both triatomine species (t test, $P > 0.05$, **Figure 6A and B**). All *T. infestans* nymphs released parasites in urine, but in numbers ~10 fold smaller than those found in *R. prolixus* ones.

7. Discussion

Parasites are known release exosome-like EVs that function as cell-to-cell effectors during the host-parasite interaction. ^(11, 12, 15-17) One of the initial studies showed that challenge of BALB/c mice with *T. cruzi* EVs exacerbated parasite load, heart

inflammation and mortality. ⁽¹¹⁾ Later, it was demonstrated that *T. cruzi* could modulated not only the innate but also the acquired immune events by activating TLR2, triggering cytokine production, MAPKs activation and invasion. ^(12,18) It is important to mention that the concentration of vesicles used in those studies ranged from 1-10 µg/mL. Here, pre-feeding with EVs was approximately 5 µg/mL. Although it may be not physiological, this concentration is within a range know to functionally activate vertebrate cells. However, reports regarding the role of EVs with respect to their invertebrate hosts are unknown.

Rhodnius prolixus and *T. infestans* are the most used as triatomine models due to due to existence of laboratory colonies. Both models were successfully used in our procedures and produced the expected infection pattern as previoul reported. ⁽¹⁴⁻¹⁹⁾ However, the ability of *T. infestans* to take a blood meal in the artificial system was much lower than that of *R. prolixus*. Pre-feeding with EVs delayed the early migration of *T. cruzi* parasites to the rectum (21-22 days p.i.) in *R. prolixus*. This effect was not observed after 49-50 days p.i., suggesting a transient effect of the EVs during the initial days of infection. However, this effect was not detected in *T. infestans* in both periods. The number of metacyclics in EV exposed and controls did not vary for both vectors reinforcing their role only in the initial events of infection. Interestingly, the number of metacyclic trypomastigotes recovered in the urine of *R. prolixus* was 10-fold higher than in *T. infestans*. This result was very surprising since Bug strain was originally isolated from *T. infestans* in Bolívia, whereas the population of *R. prolixus* used in this study was from Honduras. *Rhodnius prolixus* belongs to the tribe Rhodniini, whereas *T. infestans* is from the Triatomini tribe. ⁽²⁰⁾ We thus believe that such differences may be attributed to the species rather than the amount of ingested blood. Although in our model, pre-feeding with EVs affected early parasite migration only in *R. prolixus*, their

role in transmission was not assessed. Since the number of total parasites and metacyclics in later days of infection did not vary, it is not likely that EVs will affect transmission in triatomines. This is different from *L. major*, where EVs were important for parasite transmission during the sand fly bite. ⁽¹⁰⁾ Despite the presence of EVs, we showed that both vectors were able to develop metacyclics. However, in nature those parasites are released in the feces and urine and are not inoculated as in *Leishmania*.

In vertebrate cells, it is already known that fusion of EVs is an important mechanism that promotes parasite internalization. ^(11, 18) Our results suggest that *T. cruzi* EVs could be fusing to the epithelium of the midgut and somehow promoting early parasite retainment in *R. prolixus*. This effect was transient and did not affect the number of metacyclics in both vectors.

Acknowledgements: RPS, AAG and MNM are supported by Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento (CNPq) and Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) (PPM-00102-16). LFP is supported by FAPEMIG. ACT is supported by Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP 2016-01917-3).

8. Author's contributions: RPS, AAG, ACT and MNM conceived and planned the experiments. LFP, AAG and ACT performed experiments and analyzed data. All authors wrote and corrected the manuscript.

9. References:

1. Pérez-Molina JA, Molina I. Chagas disease. Lancet. 2018; 391(10115): 82-94.
2. Antinori S, Galimberti L, Bianco R, Grande R, Galli M, Corbellino M. Chagas disease in Europe: A review for the internist in the globalized world. Eur J Intern Med. 2017; 43: 6-15.
3. Schofield CJ, Dias JC. The Southern Cone Initiative against Chagas disease. Adv. Parasitol. 1999; 42: 1-27.

4. Ferguson MA. The structure, biosynthesis and functions of glycosylphosphatidylinositol anchors, and the contributions of trypanosome research. *J. Cell Sci.* 1999; 112 (Pt 17): 2799–2809.
5. Alves MJ, Colli W. *Trypanosoma cruzi*: adhesion to the host cell and intracellular survival. *IUBMB Life.* 2007; 59:274-79.
6. Nogueira NF, Gonzalez MS, Gomes JE, de Souza W, Garcia ES, Azambuja P et al. *Trypanosoma cruzi*: involvement of glycoinositolphospholipids in the attachment to the luminal midgut surface of *Rhodnius prolixus*. *Exp Parasitol.* 2007; 116(2): 120-28.
7. Soares RP, Torrecilhas AC, Assis RR, Rocha MN, Moura e Castro FA, Freitas GF et al. Intraspecies variation in *Trypanosoma cruzi* GPI-mucins: biological activities and differential expression of α -galactosyl residues. *Am J Trop Med Hyg.* 2012; 87(1): 87-96.
8. Szempruch AJ, Dennison L, Kieft R, Harrington JM, Hajduk SL. Sending a message: extracellular vesicles of pathogenic protozoan parasites. *Nat. Rev. Microbiol.* 2016. 14(11): 669–75.
9. Campos JH, Soares RP, Ribeiro K, Andrade AC, Batista WL, Torrecilhas AC. Extracellular Vesicles: Role in Inflammatory Responses and Potential Uses in Vaccination in Cancer and Infectious Diseases. *J. Immunol. Res.* 2015; 2015: 832057.
10. Akopyants NS, Kimblin N, Secundino N, Patrick R, Peters N, Lawyer P, Dobson DE, Beverley SM, Sacks DL 2009. Demonstration of genetic exchange during cyclical development of *Leishmania* in the sand fly vector. *Science* 324: 265–268.
11. Alonso-Padilla J, Gallego M, Schijman AG, Gascon J 2017. Molecular diagnostics for Chagas disease: up to date and novel methodologies. *Expert Rev. Mol. Diagn.* 17: 699–710.
12. Alvarenga NJ, Bronfen E 1997. Metaciclologênese do *Trypanosoma cruzi* como parâmetro de interação do parasita com o triatomíneo vetor. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 30: 247–250.
13. Alves MJM, Colli W 2007. *Trypanosoma cruzi*: Adhesion to the Host Cell and Intracellular Survival. *IUBMB Life* 59: 274–279.
14. Alves CL, Repolês BM, Silva MS da, Mendes IC, Marin PA, Aguiar PHN, Santos S da S, Franco GR, Macedo AM, Pena SDJ, Andrade L de O, Guarneri AA, Tahara EB, Elias MC, Machado CR 2018. The recombinase Rad51 plays a key role in events of genetic exchange in *Trypanosoma cruzi*. *Sci. Rep.* 8: 13335.
15. Aragão MB 1971. Sobre a dispersão do *Triatoma infestans*. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 5: 183–191.
16. Araújo CAC, Waniek PJ, Jansen AM 2009. An overview of Chagas disease and the role of triatomines on its distribution in Brazil. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 9: 227–234.
17. Araújo CAC, Waniek PJ, Xavier SCC, Jansen AM 2011. Genotype variation of *Trypanosoma cruzi* isolates from different Brazilian biomes. *Exp. Parasitol.* 127: 308–312.
18. Atayde VD, Aslan H, Townsend S, Hassani K, Kamhawi S, Olivier M 2015a.

- Exosome Secretion by the Parasitic Protozoan *Leishmania* within the Sand Fly Midgut. *Cell Rep.* 13: 957–967.
19. Atayde VD, Suau HA, Townsend S, Hassani K, Kamhawi S, Olivier M 2015b. Exosome secretion by the parasitic protozoan *Leishmania* within the sand fly midgut. *HHS Public Access* 13: 957–967.
 20. Azambuja P, Feder D, Garcia ES 2004. Isolation of *Serratia marcescens* in the midgut of *Rhodnius prolixus*: impact on the establishment of the parasite *Trypanosoma cruzi* in the vector. *Exp. Parasitol.* 107: 89–96.
 21. Benítez-Hernández I, Méndez-Enríquez E, Ostoa P, Fortoul T, Ramírez JA, Stempin C, Cerbán F, Soldevila G, García-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.
 22. Bern C 2015. Chagas' Disease (DL Longo, Ed.). *N. Engl. J. Med.* 373: 456–466.
 23. Bingle LE, Eastlake JL, Bailey M, Gibson WC 2001. A novel GFP approach for the analysis of genetic exchange in trypanosomes allowing the in situ detection of mating events. *Microbiology* 147: 3231–3240.
 24. Boada-Sucre AA, Rossi Spadafora MS, Tavares-Marques LM, Finol HJ, Reyna-Bello A 2016. *Trypanosoma vivax* Adhesion to Red Blood Cells in Experimentally Infected Sheep. *Patholog. Res. Int.* 2016: 4503214.
 25. Brener, Z.; Andrade, Z. & Barral-Netto M 2000. *Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas*. Rio de Janeiro.
 26. Brener Z 1962. Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* 4: 389–396.
 27. Carvalho-Moreira CJ, Spata MCD, Coura JR, Garcia ES, Azambuja P, Gonzalez MS, 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. *Exp. Parasitol.* 103: 102–111.
 28. Castro 2006. Hospedeiros naturais da doença de chagas em populações de mamíferos silvestres na área de influência da usina hidrelétrica corumbá iv (goiás): uma avaliação preliminar.
 29. 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. (K Michel, Ed.). *PLoS One* 7: e36591.
 30. Cavazzana M, Marcili A, Lima L, Silva FM da, Junqueira AC V, Veludo HH, Viola LB, Campaner M, Nunes VLB, Paiva F, Coura JR, Camargo EP, Teixeira MMG 2010. Phylogeographical, ecological and biological patterns shown by nuclear (ssrRNA and gGAPDH) and mitochondrial (Cyt b) genes of trypanosomes of the subgenus *Schizotrypanum* parasitic in Brazilian bats. *Int. J. Parasitol.* 40: 345–355.
 31. Cestari I, Ansa-Addo E, Deolindo P, Inal JM, Ramirez MI 2012. *Trypanosoma cruzi* immune evasion mediated by host cell-derived microvesicles. *J. Immunol.* 188: 1942–1952.
 32. Chagas C 1909. New human trypanosomiasis: studies on morphology and

- evolutionary cycle of *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 1: 1–62.
33. Chargui N, Amro A, Haouas N, Schönian G, Babba H, Schmidt S, Ravel C, Lefebvre M, Bastien P, Chaker E, Aoun K, Zribi M, Kuhls K 2009. Population structure of Tunisian *Leishmania infantum* and evidence for the existence of hybrids and gene flow between genetically different populations. *Int. J. Parasitol.* 39: 801–811.
 34. Colombo M, Raposo G, Théry C 2014. Biogenesis, Secretion, and Intercellular Interactions of Exosomes and Other Extracellular Vesicles. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 30: 255–289.
 35. Cominetti MC, Csordas BG, Cunha RC, Andreotti R 2014. Geographical distribution of *Trypanosoma cruzi* in triatomine vectors in the State of Mato Grosso do Sul, Brazil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 47: 747–755.
 36. Contreras VT, Araújo-Jorge TC de, Bonaldo MC, Thomaz N, Barbosa HS, Meirelles M de NSL de, Goldenberg S, Contreras VT, Araújo-Jorge TC de, Bonaldo MC, Thomaz N, Barbosa HS, Meirelles M de NSL de, Goldenberg S 1988. Biological aspects of the DM28C clone of *Trypanosoma cruzi* after metacylogenesis in chemically defined media. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 83: 123–133.
 37. Coura JR 2007. Chagas disease: what is known and what is needed--a background article. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 102 Suppl 1: 113–122.
 38. Coura JR 2015. The main sceneries of Chagas disease transmission. The vectors, blood and oral transmissions--a comprehensive review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 110: 277–282.
 39. DaRocha WD, Silva RA, Bartholomeu DC, Pires SF, Freitas JM, Macedo AM, Vazquez MP, Levin MJ, Teixeira SMR 2004. Expression of exogenous genes in *Trypanosoma cruzi*: improving vectors and electroporation protocols. *Parasitol. Res.* 92: 113–120.
 40. Dias E 1940. Técnica do xenodiagnostico na molestia de Chagas. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 35: 335–342.
 41. Dias JCP 2015. Evolution of Chagas Disease Screening Programs and Control Programs Historical Perspective. *Glob. Heart* 10: 193–202.
 42. Díaz S, Villavicencio B, Correia N, Costa J, Haag KL 2016. Triatomine bugs, their microbiota and *Trypanosoma cruzi*: asymmetric responses of bacteria to an infected blood meal. *Parasit. Vectors* 9: 636.
 43. Dujardin JC, Bañuls AL, Llanos-Cuentas A, Alvarez E, DeDoncker S, Jacquet D, Ray D Le, Arevalo J, Tibayrenc M 1995. Putative *Leishmania* hybrids in the Eastern Andean valley of Huanuco, Peru. *Acta Trop.* 59: 293–307.
 44. El-Sayed NM, Myler PJ, Bartholomeu DC, Nilsson D, Aggarwal G, Tran A-N, Ghedin E, Worthey EA, Delcher AL, Blandin G, Westenberger 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, Darban H, Silveira JF da, Jong P de, 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, Aken S Van, Vogt C, Ward PN, Wickstead B, Wortman J, White O, Fraser CM, Stuart KD, Andersson B 2005. The Genome Sequence of *Trypanosoma cruzi*, Etiologic Agent of Chagas Disease. *Science* (80-.). 309: 409–415.
45. Ferguson MA 1999. The structure, biosynthesis and functions of glycosylphosphatidylinositol anchors, and the contributions of trypanosome research. *J. Cell Sci.* 112 (Pt 17): 2799–2809.
 46. Ferreira RC, Briones MRS 2012. Phylogenetic evidence based on *Trypanosoma cruzi* nuclear gene sequences and information entropy suggest that inter-strain intragenic recombination is a basic mechanism underlying the allele diversity of hybrid strains. *Infect. Genet. Evol.* 12: 1064–1071.
 47. Ferreira RC, Kessler RL, Lorenzo MG, Paim RMM, Ferreira LDL, Probst CM, Alves-Silva J, Guarneri AA 2016. Colonization of *Rhodnius prolixus* gut by *Trypanosoma cruzi* involves an extensive parasite killing. *Parasitology* 143: 434–443.
 48. Filardi LS, Brener Z 1987. Susceptibility and natural resistance of *Trypanosoma cruzi* strains to drugs used clinically in Chagas disease. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 81: 755–759.
 49. Freitas JM de, Augusto-Pinto L, Pimenta JR, Bastos-Rodrigues L, Gonçalves VF, Teixeira SMR, Chiari E, Junqueira AC V, Fernandes O, Macedo AM, Machado CR, Pena SDJ 2006. Ancestral genomes, sex, and the population structure of *Trypanosoma cruzi*. *PLoS Pathog.* 2: e24.
 50. Fuentes-Vicente JA de, Gutiérrez-Cabrera AE, Flores-Villegas AL, Lowenberger C, Benelli G, Salazar-Schettino PM, Córdoba-Aguilar A 2018. What makes an effective Chagas disease vector? Factors underlying *Trypanosoma cruzi* -triatomine interactions. *Acta Trop.* 183: 23–31.
 51. Garcia ES, Genta FA, Azambuja P de, Schaub GA 2010. Interactions between intestinal compounds of triatomines and *Trypanosoma cruzi*. *Trends Parasitol.* 26: 499–505.
 52. 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. *J. Insect Physiol.* 53: 11–21.
 53. Garcia ES, Vieira E, Gomes JEPL, Gonçalves AM, Garcia ES, Vieira E, Gomes JEPL, Gonçalves AM 1984. Molecular biology of the interaction *Trypanosoma cruzi* invertebrate host. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 79: 33–37.
 54. Gaunt MW, Yeo M, Frame IA, Stothard JR, Carrasco HJ, Taylor MC, Mena SS, Veazey P, Miles GAJ, Acosta N, Arias AR de, Miles MA 2003. Mechanism of genetic exchange in American trypanosomes. *Nature* 421: 936–939.
 55. Gibson W, Peacock L, Ferris V, Williams K, Bailey M 2008. The use of yellow fluorescent hybrids to indicate mating in *Trypanosoma brucei*. *Parasit. Vectors* 1: 4.
 56. Gonçalves D de S, Ferreira M da S, Liedke SC, Gomes KX, Oliveira GA de, Leão

- PEL, Cesar GV, Seabra SH, Cortines JR, Casadevall A, Nimrichter L, Domont GB, Junqueira MR, Peralta JM, Guimaraes AJ 2018. Extracellular vesicles and vesicle-free secretome of the protozoa *Acanthamoeba castellanii* under homeostasis and nutritional stress and their damaging potential to host cells. *Virulence* 9: 818–836.
57. Gonçalves MF, Umezawa ES, Katzin AM, Souza W de, Alves MJ, Zingales B, Colli W 1991. Trypanosoma cruzi: shedding of surface antigens as membrane vesicles. *Exp. Parasitol.* 72: 43–53.
58. Gonzalez MS, Garcia ES 1992. Effect of azadirachtin on the development of Trypanosoma cruzi in different species of triatomine insect vectors: Long-term and comparative studies. *J. Invertebr. Pathol.* 60: 201–205.
59. Gonzalez MS, Souza MS, Garcia ES, Nogueira NFS, Mello CB, Cánepa GE, Bertotti S, Durante IM, Azambuja P, Buscaglia CA 2013. Trypanosoma cruzi TcSMUG L-surface mucins promote development and infectivity in the triatomine vector Rhodnius prolixus. (S Kamhawi, Ed.). *PLoS Negl. Trop. Dis.* 7: e2552.
60. Gumiel M, Mota FF da, Rizzo V de S, Sarquis O, Castro DP de, Lima MM, Garcia E de S, Carels N, Azambuja P 2015. Characterization of the microbiota in the guts of Triatoma brasiliensis and Triatoma pseudomaculata infected by Trypanosoma cruzi in natural conditions using culture independent methods. *Parasit. Vectors* 8: 245.
61. Hong S-W, Kim M-R, Lee E-Y, Kim JH, Kim Y-S, Jeon SG, Yang J-M, Lee B-J, Pyun B-Y, Gho YS, Kim Y-K 2011. Extracellular vesicles derived from Staphylococcus aureus induce atopic dermatitis-like skin inflammation. *Allergy* 66: 351–359.
62. Hottz ED, Poncini CV, Cribb P, De LM, Torr  P, Moreira LR, Pablos Torr  LM De, Retana Moreira L, Osuna A 2018. Extracellular Vesicles in Chagas Disease: A New Passenger for an Old Disease.
63. Ienne S, Pedroso A, Carmona E, Ferreira R, Briones MRS, Zingales B 2010. Network genealogy of 195-bp satellite DNA supports the superimposed hybridization hypothesis of Trypanosoma cruzi evolutionary pattern. *Infect. Genet. Evol.* 10: 601–606.
64. Izeta-Alberdi A, Ibarra-Cerdeña CN, Moo-Llanes DA, Ramsey JM 2016. Geographical, landscape and host associations of Trypanosoma cruzi DTUs and lineages. *Parasit. Vectors* 9: 631.
65. Jansen AM, Xavier SCC, Roque ALR 2015. The multiple and complex and changeable scenarios of the Trypanosoma cruzi transmission cycle in the sylvatic environment. *Acta Trop.* 151: 1–15.
66. Jansen AM, Xavier SC das C, Roque ALR 2018. Trypanosoma cruzi transmission in the wild and its most important reservoir hosts in Brazil. *Parasit. Vectors* 11: 502.
67. Jenni L, Marti S, Schweizer J, Betschart B, Page RWF Le, Wells JM, Tait A, Paindavoine P, Pays E, Steinert M 1986. Hybrid formation between African trypanosomes during cyclical transmission. *Nature* 322: 173–175.
68. Kamhawi S, Ramalho-Ortigao M, Pham VM, Kumar S, Lawyer PG, Turco SJ, Barillas-Mury C, Sacks DL, Valenzuela JG 2004. A role for insect galectins in parasite survival. *Cell* 119: 329–341.

69. Kelly JM, Law JM, Chapman CJ, Eys GJ Van, Evans DA 1991. Evidence of genetic recombination in *Leishmania*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 46: 253–263.
70. Kessler RL, Contreras VT, Marlière NP, Aparecida Guarneri A, Villamizar Silva LH, Mazzarotto GACA, Batista M, Soccol VT, Krieger MA, Probst CM 2017. Recently differentiated epimastigotes from *Trypanosoma cruzi* are infective to the mammalian host. *Mol. Microbiol.* 104: 712–736.
71. Kollien AH, Schaub GA 2000. The development of *Trypanosoma cruzi* in triatominae. *Parasitol. Today* 16: 381–387.
72. Kollien A., Schmidt J, Schaub G. 1998. Modes of association of *Trypanosoma cruzi* with the intestinal tract of the vector *Triatoma infestans*. *Acta Trop.* 70: 127–141.
73. Lana M de, Pinto A da S, Barnabé C, Quesney V, Noël S, Tibayrenc M 1998. *Trypanosoma cruzi*: Compared Vectorial Transmissibility of Three Major Clonal Genotypes by *Triatoma infestans*. *Exp. Parasitol.* 90: 20–25.
74. Lent H, Wygodzinsky PW 1979. Revision of the Triatominae (Hemiptera, Reduviidae), and their significance as vectors of Chagas' disease. Bulletin of the AMNH ; v. 163, article 3.
75. Lima L, Espinosa-Álvarez O, Ortiz PA, Trejo-Varón JA, Carranza JC, Pinto CM, Serrano MG, Buck GA, Camargo EP, Teixeira MMG 2015. Genetic diversity of *Trypanosoma cruzi* in bats, and multilocus phylogenetic and phylogeographical analyses supporting Tcbat as an independent DTU (discrete typing unit). *Acta Trop.* 151: 166–177.
76. Lima VDS, Xavier SC das C, Maldonado IFR, Roque ALR, Vicente ACP, Jansen AM 2014. Expanding the knowledge of the geographic distribution of *Trypanosoma cruzi* TcII and TcV/TcVI genotypes in the Brazilian Amazon. (LH Carvalho, Ed.). *PLoS One* 9: e116137.
77. Little JW, Tay J, Biagi F 1966. A study on the susceptibility of triatomid bugs to some Mexican strains of *Trypanosoma cruzi*. *J. Med. Entomol.* 3: 252–255.
78. Lopes CMT, Menna-Barreto RFS, Pavan MG, Pereira MCDS, Roque ALR 2018. *Trypanosoma janseni* n. sp. (Trypanosomatida: Trypanosomatidae) isolated from *Didelphis aurita* (Mammalia: Didelphidae) in the Atlantic Rainforest of Rio de Janeiro, Brazil: integrative taxonomy and phylogeography within the *Trypanosoma cruzi* clade. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 113: 45–55.
79. Macedo AM, Pena SD 1998. Genetic Variability of *Trypanosoma cruzi*: Implications for the Pathogenesis of Chagas Disease. *Parasitol. Today* 14: 119–124.
80. Maffey L, Cardinal M V, Ordóñez-Krasnowski PC, Lanati LA, Lauricella MA, Schijman AG, Gürtler RE 2012. Direct molecular identification of *Trypanosoma cruzi* discrete typing units in domestic and peridomestic *Triatoma infestans* and *Triatoma sordida* from the Argentine Chaco. *Parasitology* 139: 1570–1579.
81. Marcilla A, Martin-jaular L, Trelis M, Menezes-neto A De, Osuna A, Bernal D, Fernandez-becerra C, Almeida IC, Portillo HA 2014. Extracellular vesicles in parasitic diseases. *J Extracell Vesicles* 1: 1–15.
82. Mattos EC, Tonelli RR, Colli W, Alves MJM 2014. The Gp85 Surface Glycoproteins from *Trypanosoma cruzi*. In: *Subcell. Biochem.*, pp. 151–180.
83. 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.
84. Monje-Rumi MM, Brandán CP, Ragone PG, Tomasini N, Lauthier JJ, Alberti D'Amato AM, Cimino RO, Orellana V, Basombrío MA, Diosque P 2015. *Trypanosoma cruzi* diversity in the Gran Chaco: mixed infections and differential host distribution of TcV and TcVI. *Infect. Genet. Evol.* 29: 53–59.
 85. Nogueira NFS, Gonzalez MS, Gomes JE, Souza W de, Garcia ES, Azambuja P, Nohara LL, Almeida IC, Zingales B, Colli W 2007. *Trypanosoma cruzi*: involvement of glycoinositolphospholipids in the attachment to the luminal midgut surface of *Rhodnius prolixus*. *Exp. Parasitol.* 116: 120–128.
 86. Nogueira PM, Ribeiro K, Silveira ACO, Campos JH, Martins-Filho OA, Bela SR, Campos MA, Pessoa NL, Colli W, Alves MJM, Soares RP, Torrecilhas AC 2015. Vesicles from different *Trypanosoma cruzi* strains trigger differential innate and chronic immune responses. *J. Extracell. Vesicles* 4: 28734.
 87. Nolder D, Roncal N, Davies CR, Llanos-Cuentas A, Miles MA 2007. Multiple hybrid genotypes of *Leishmania* (viannia) in a focus of mucocutaneous Leishmaniasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 76: 573–578.
 88. Odiwuor S, Doncker S De, Maes I, Dujardin J-C, Auwera G Van der 2011. Natural *Leishmania donovani/Leishmania aethiopica* hybrids identified from Ethiopia. *Infect. Genet. Evol.* 11: 2113–2118.
 89. Okenu DM, Opara KN, Nwuba RI, Nwagwu M 1999. Purification and characterisation of an extracellularly released protease of *Trypanosoma brucei*. *Parasitol. Res.* 85: 424–428.
 90. Palace-Berl F, Pasqualoto KFM, Jorge SD, Zingales B, Zorzi RR, Silva MN, Ferreira AK, Azevedo RA de, Teixeira SF, Tavares LC 2015. Designing and exploring active N'-[(5-nitrofurán-2-yl) methylene] substituted hydrazides against three *Trypanosoma cruzi* strains more prevalent in Chagas disease patients. *Eur. J. Med. Chem.* 96: 330–339.
 91. Pedroso A, Cupolillo E, Zingales B 2003. Evaluation of *Trypanosoma cruzi* hybrid stocks based on chromosomal size variation. *Mol. Biochem. Parasitol.* 129: 79–90.
 92. Pereira ME, Andrade AF, Ribeiro JM 1981. Lectins of distinct specificity in *Rhodnius prolixus* interact selectively with *Trypanosoma cruzi*. *Science* 211: 597–600.
 93. Pérez-Molina JA, Perez AM, Norman FF, Monge-Maillo B, López-Vélez R 2015. Old and new challenges in Chagas disease. *Lancet Infect. Dis.* 15: 1347–1356.
 94. Perlowagora-Szumlewicz A, Müller CA 1982. Studies in search of a suitable experimental insect model for xenodiagnosis of hosts with Chagas' disease. 1--Comparative xenodiagnosis with nine Triatomine species of animals with acute infections by *Trypanosoma cruzi*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 77: 37–53.
 95. Perlowagora-Szumlewicz A, Muller CA, Moreira CJ 1990. Studies in search of a suitable experimental insect model for xenodiagnosis of hosts with Chagas' disease. 4--The reflection of parasite stock in the responsiveness of different vector species to chronic infection with different *Trypanosoma cruzi* stocks. *Rev. Saude Publica* 24: 165–177.

96. Pires SF, DaRocha WD, Freitas JM, Oliveira LA, Kitten GT, Machado CR, Pena SDJ, Chiari E, Macedo AM, Teixeira SMR 2008. Cell culture and animal infection with distinct *Trypanosoma cruzi* strains expressing red and green fluorescent proteins. *Int. J. Parasitol.* 38: 289–297.
97. Pope SM, Lässer C 2013. *Toxoplasma gondii* infection of fibroblasts causes the production of exosome-like vesicles containing a unique array of mRNA and miRNA transcripts compared to serum starvation. *J. Extracell. vesicles* 2: 22484.
98. Ravel C, Cortes S, Pratlong F, Morio F, Dedet J-P, Campino L 2006. First report of genetic hybrids between two very divergent *Leishmania* species: *Leishmania infantum* and *Leishmania major*. *Int. J. Parasitol.* 36: 1383–1388.
99. Ribeiro AR, Oliveira RC de, Ceretti Junior W, Lima L, Almeida LA de, Nascimento JD, Teixeira MMG, Rosa JA da 2016. *Trypanosoma cruzi* isolated from a triatomine found in one of the biggest metropolitan areas of Latin America. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 49: 183–189.
100. Ribeiro KS, Vasconcellos CI, Soares RP, Mendes MT, Ellis CC, Aguilera-Flores M, Almeida IC de, Schenkman S, Iwai LK, Torrecilhas AC 2018. Proteomic analysis reveals different composition of extracellular vesicles released by two *Trypanosoma cruzi* strains associated with their distinct interaction with host cells. *J. Extracell. vesicles* 7: 1463779.
101. Roellig DM, Ellis AE, Yabsley MJ 2009. Oral transmission of *Trypanosoma cruzi* with opposing evidence for the theory of carnivory. *J. Parasitol.* 95: 360–364.
102. Roellig DM, Savage MY, Fujita AW, Barnabé C, Tibayrenc M, Steurer FJ, Yabsley MJ 2013. Genetic Variation and Exchange in *Trypanosoma cruzi* Isolates from the United States (MM Rodrigues, Ed.). *PLoS One* 8: e56198.
103. Rogers MB, Downing T, Smith BA, Imamura H, Sanders M, Svobodova M, Volf P, Berriman M, Cotton JA, Smith DF 2014. Genomic Confirmation of Hybridisation and Recent Inbreeding in a Vector-Isolated *Leishmania* Population (X Didelot, Ed.). *PLoS Genet.* 10: e1004092.
104. Romano A, Inbar E, Debrabant A, Charmoy M, Lawyer P, Ribeiro-Gomes F, Barhoumi M, Grigg M, Shaik J, Dobson D, Beverley SM, Sacks DL 2014. Cross-species genetic exchange between visceral and cutaneous strains of *Leishmania* in the sand fly vector. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111: 16808–16813.
105. Schaub GA 1989. Does *Trypanosoma cruzi* stress its vectors? *Parasitol. Today* 5: 185–188.
106. Schaub GA, Böker CA 1986. Colonization of the rectum of *Triatoma infestans* by *Trypanosoma cruzi*: influence of starvation studied by scanning electron microscopy. *Acta Trop.* 43: 349–354.
107. Schaub GA, Böker CA 1987. Colonization of the rectum of *Triatoma infestans* by *Trypanosoma cruzi* studied by scanning electron microscopy: influence of blood uptake by the bug. *Parasitol. Res.* 73: 417–420.
108. Schofield CJ, Dias JC 1999a. The Southern Cone Initiative against Chagas disease. *Adv. Parasitol.* 42: 1–27.
109. Schofield CJ, Dias JC 1999b. The Southern Cone Initiative against Chagas disease. *Adv. Parasitol.* 42: 1–27.

110. Schofield CJ, Dujardin JP 1997. Chagas disease vector control in Central America. *Parasitol. Today* 13: 141–144.
111. Sean Ha D, Schwarz JK, Turco SJ, Beverley SM 1996. Use of the green fluorescent protein as a marker in transfected *Leishmania*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 77: 57–64.
112. Silva CS da, Carbajal-de-la-Fuente AL, Almeida CE, Gonçalves TCM, Santos-Mallet JR dos, Silva CS da, Carbajal-de-la-Fuente AL, Almeida CE, Gonçalves TCM, Santos-Mallet JR dos 2018. Morphobiological, morphometric and ultrastructural characterization of sylvatic *Trypanosoma cruzi* isolates from Rio de Janeiro state, Brazil. *Brazilian J. Biol.* 79: 294–303.
113. Soares RP, Torrecilhas AC, Assis RR, Rocha MN, Moura e Castro FA, Freitas GF, Murta SM, Santos SL, Marques AF, Almeida IC, Romanha AJ 2012. Intraspecies variation in *Trypanosoma cruzi* GPI-mucins: biological activities and differential expression of α -galactosyl residues. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 87: 87–96.
114. Souto RP, Fernandes O, Macedo AM, Campbell DA, Zingales B 1996. DNA markers define two major phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 83: 141–152.
115. Stanaway JD, Roth G 2015. The Burden of Chagas Disease: Estimates and Challenges. *Glob. Heart* 10: 139–144.
116. Sturm NR, Campbell DA 2010. Alternative lifestyles: the population structure of *Trypanosoma cruzi*. *Acta Trop.* 115: 35–43.
117. Szempruch AJ, Dennison L, Kieft R, Harrington JM, Hajduk SL 2016. Sending a message: extracellular vesicles of pathogenic protozoan parasites. *Nat. Rev. Microbiol.* 14: 669–675.
118. Tibayrenc M 1998. Genetic epidemiology of parasitic protozoa and other infectious agents: the need for an integrated approach. *Int. J. Parasitol.* 28: 85–104.
119. Torrecilhas AC, Schumacher RI, Alves MJM, Colli W 2012a. Vesicles as carriers of virulence factors in parasitic protozoan diseases. *Microbes Infect.* 14: 1465–1474.
120. Torrecilhas AC, Schumacher RI, Alves MJM, Colli W 2012b. Vesicles as carriers of virulence factors in parasitic protozoan diseases. *Microbes Infect.* 14: 1465–1474.
121. Trocoli Torrecilhas AC, Tonelli RR, Pavanelli WR, Silva JS da, Schumacher RI, Souza W de, E Silva NC, Almeida Abrahamsohn I de, Colli W, Manso Alves MJ 2009. *Trypanosoma cruzi*: parasite shed vesicles increase heart parasitism and generate an intense inflammatory response. *Microbes Infect.* 11: 29–39.
122. Uehara LA, Moreira OC, Oliveira AC, Azambuja P, Lima APCA, Britto C, Santos ALS dos, Branquinha MH, d’Avila-Levy CM 2012. Cruzipain promotes *Trypanosoma cruzi* adhesion to *Rhodnius prolixus* midgut. (S Kamhawi, Ed.). *PLoS Negl. Trop. Dis.* 6: e1958.
123. Vieira CS, Waniek PJ, Castro DP, Mattos DP, Moreira OC, Azambuja P 2016. Impact of *Trypanosoma cruzi* on antimicrobial peptide gene expression and activity in the fat body and midgut of *Rhodnius prolixus*. *Parasit. Vectors* 9: 119.
124. Yabsley MJ, Noblet GP 2002. Biological and molecular characterization of a

- raccoon isolate of *Trypanosoma cruzi* from South Carolina. *J. Parasitol.* 88: 1273–1276.
125. Zhang H, Freitas D, Kim HS, Fabijanic K, Li Z, Chen H, Mark MT, Molina H, Martin AB, Bojmar L, Fang J, Rampersaud S, Hoshino A, Matei I, Kenific CM, Nakajima M, Mutvei AP, Sansone P, Buehring W, Wang H, Jimenez JP, Cohen-Gould L, Paknejad N, Brendel M, Manova-Todorova K, Magalhães A, Ferreira JA, Osório H, Silva AM, Massey A, Cubillos-Ruiz JR, Galletti G, Giannakakou P, Cuervo AM, Blenis J, Schwartz R, Brady MS, Peinado H, Bromberg J, Matsui H, Reis CA, Lyden D 2018. Identification of distinct nanoparticles and subsets of extracellular vesicles by asymmetric flow field-flow fractionation. *Nat. Cell Biol.* 20: 332–343.
 126. Zingales B 2011. *Trypanosoma cruzi*: um parasita, dois parasitas ou vários parasitas da doença de chagas? *Rev. da Biol.* 6b: 44–48.
 127. Zingales B 2018. *Trypanosoma cruzi* genetic diversity: Something new for something known about Chagas disease manifestations, serodiagnosis and drug sensitivity. *Acta Trop.* 184: 38–52.
 128. Zingales B, Andrade S, Briones M, Campbell D, Chiari E, Fernandes O, Guhl F, Lages-Silva E, Macedo A, Machado C, Miles M, Romanha A, Sturm N, Tibayrenc M, Schijman A 2009. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 104: 1051–1054.
 129. Zingales B, Miles MA, Campbell DA, Tibayrenc M, Macedo AM, Teixeira MMG, Schijman AG, Llewellyn MS, Lages-Silva E, Machado CR, Andrade SG, Sturm NR 2012. The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: rationale, epidemiological relevance and research applications. *Infect. Genet. Evol.* 12: 240–253.
 130. Zingales B, Pereira ME, Almeida KA, Umezawa ES, Nehme NS, Oliveira RP, Macedo A, Souto RP 1997. Biological parameters and molecular markers of clone CL Brener--the reference organism of the *Trypanosoma cruzi* genome project. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 92: 811–814.
 131. Zingales B, Souto RP, Mangia RH, Lisboa CV, Campbell DA, Coura JR, Jansen A, Fernandes O 1998. Molecular epidemiology of American trypanosomiasis in Brazil based on dimorphisms of rRNA and mini-exon gene sequences. *Int. J. Parasitol.* 28: 105–112.

10. FIGURES

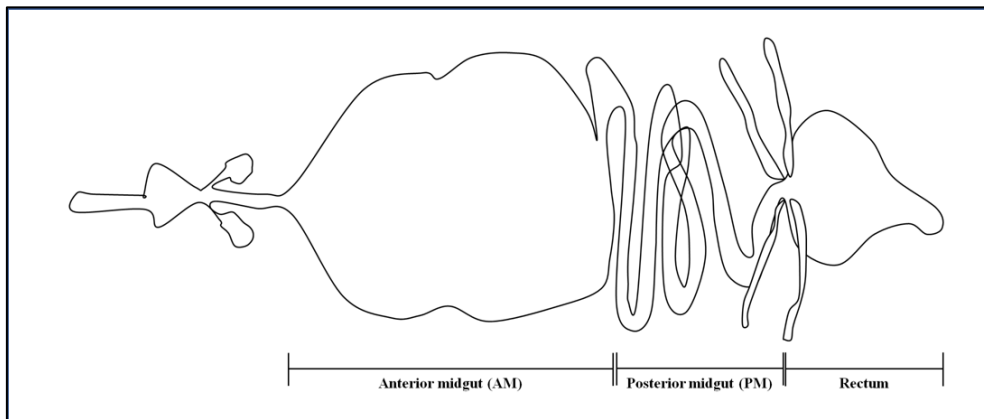


Figure 1. Basic diagrammatic representation of a digestive tract from a triatomine bug.

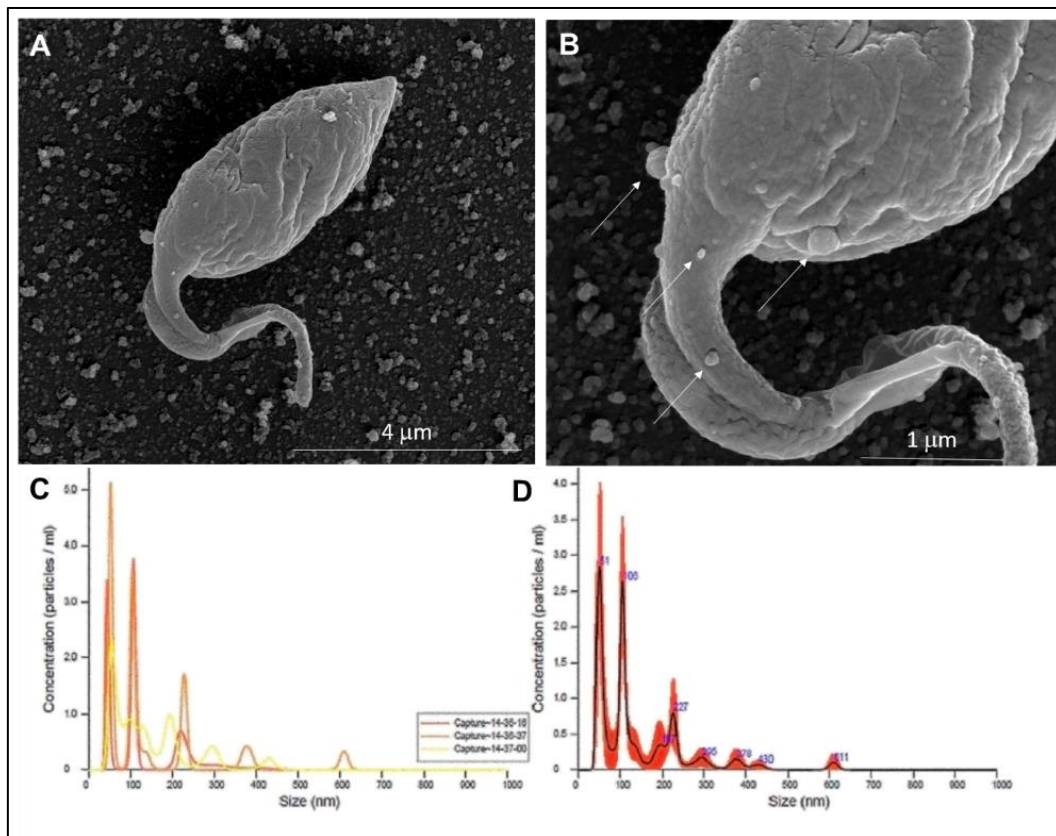


Figure 2. Extracellular vesicles of *T. cruzi* EVs. (A) Scanning electron microscopy (SEM) of *T. cruzi* membrane shedding (bars: 1-5 μm), Magnification 32,657 x and (B) Scanning electron microscopy (SEM) of *T. cruzi* membrane shedding (bars: 1-5 μm)

Magnification 80,000 x. Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) (C) and (D) of *T. cruzi* extracellular vesicles (EVs).

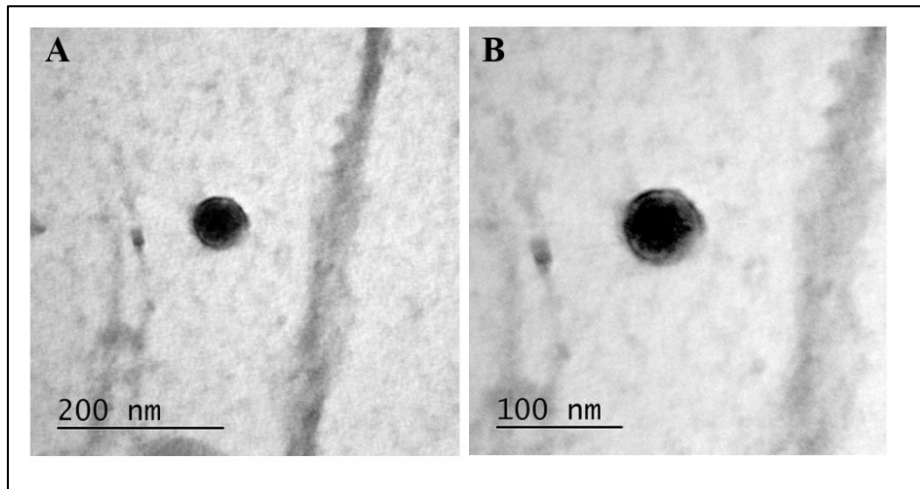


Figure 3. Extracellular vesicles of *T. cruzi* EVs. Transmission electron microscopy (TEM) of *T. cruzi* membrane shedding (A) (lower magnification, bar: 100 nm) and (B) (higher magnification, bar: 200 nm).

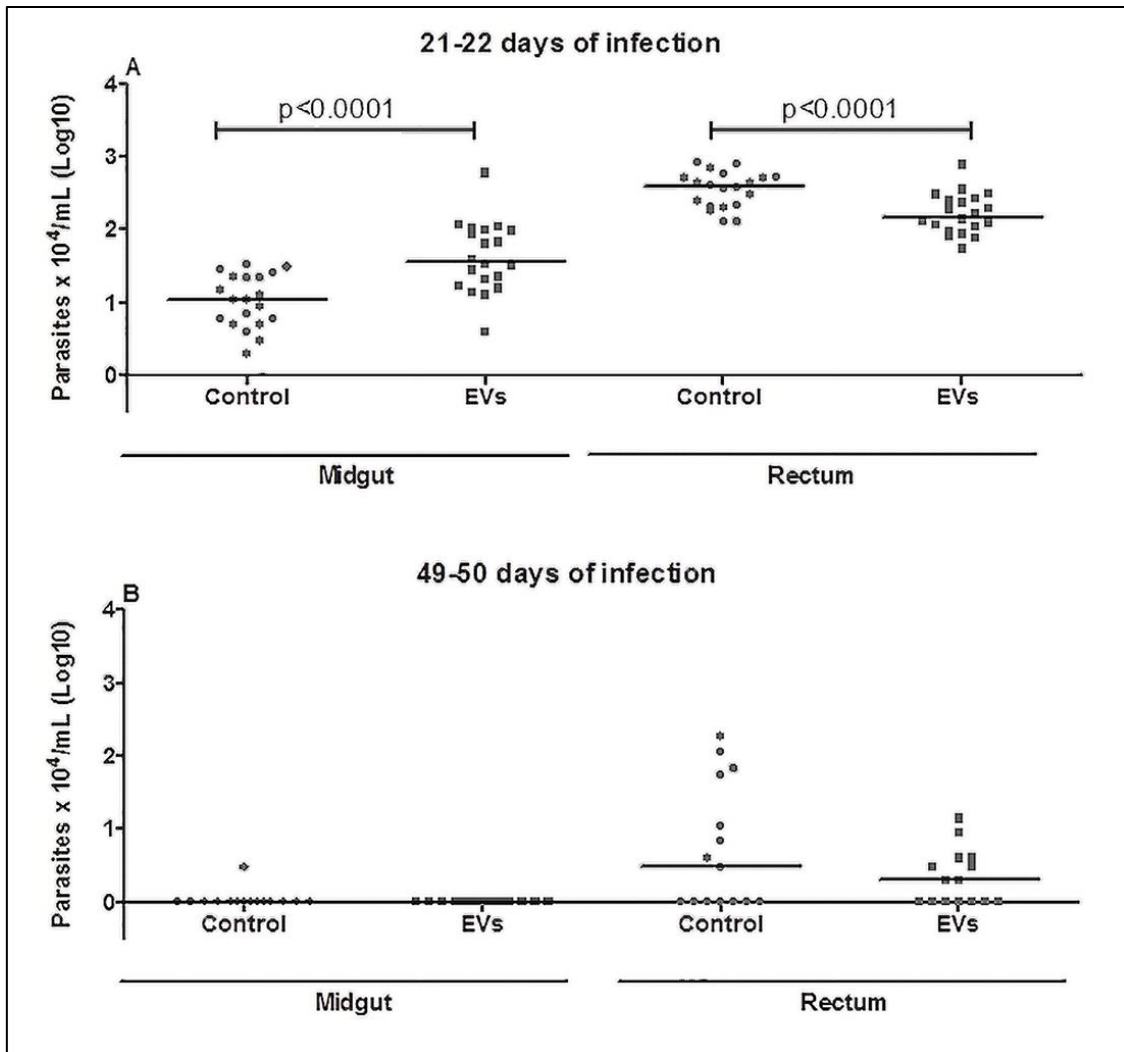


Figure 4. Parasites found throughout the digestive tract of *R. prolixus*. Dissections at 21-22 (A) and 49-50 (B) days after the infective feeding. Each dot represents the quantification of parasites from one individual nymph and each horizontal bar corresponds to the median of the group evaluated.

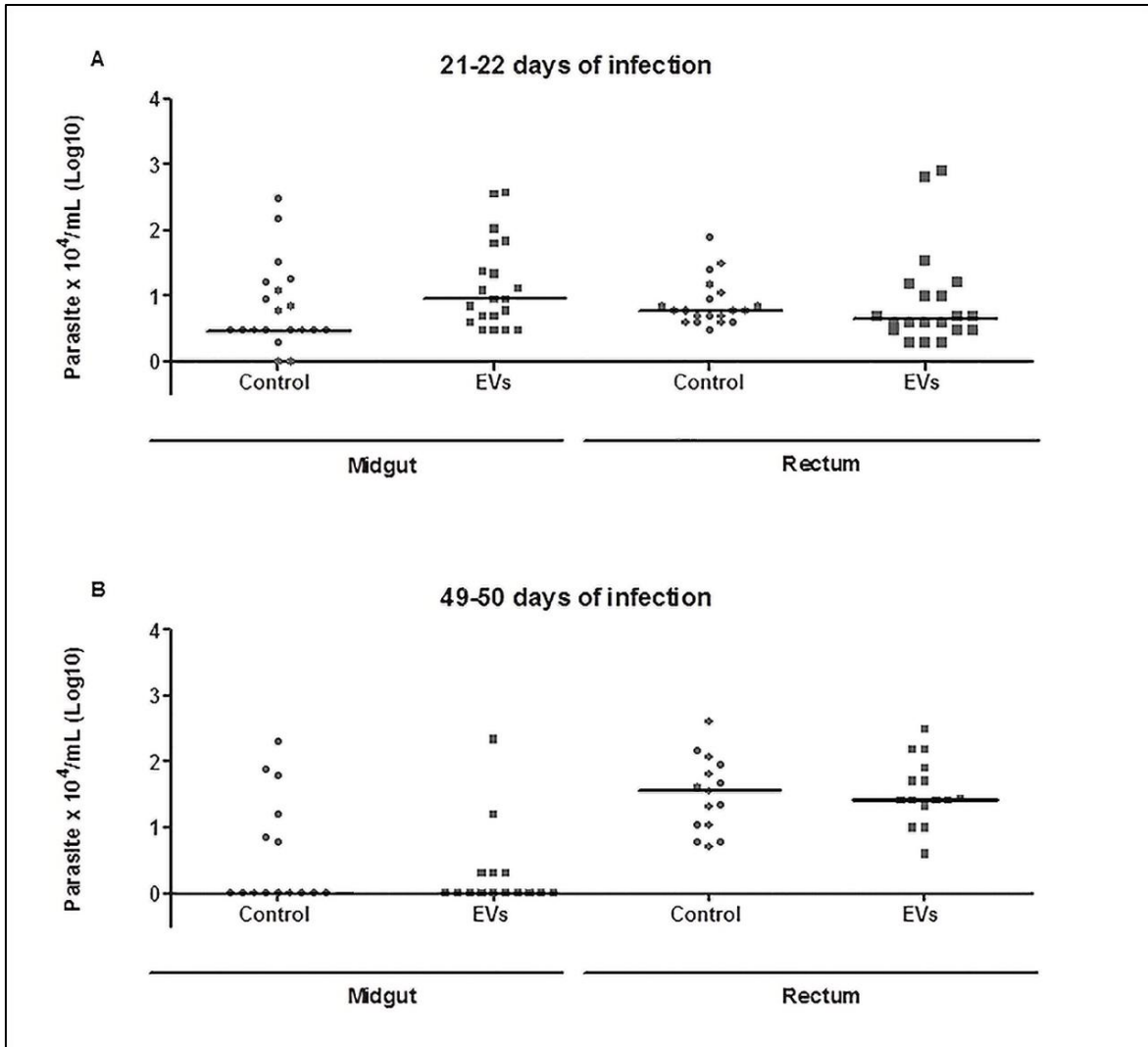


Figure 5. Parasites found throughout the digestive tract of *T. infestans*. Dissections at 21-22 (A) e 49-50 (B) days after the infective feeding. Each dot represents the quantification of parasites from one individual nymph and each horizontal bar corresponds to the median of the group evaluated.

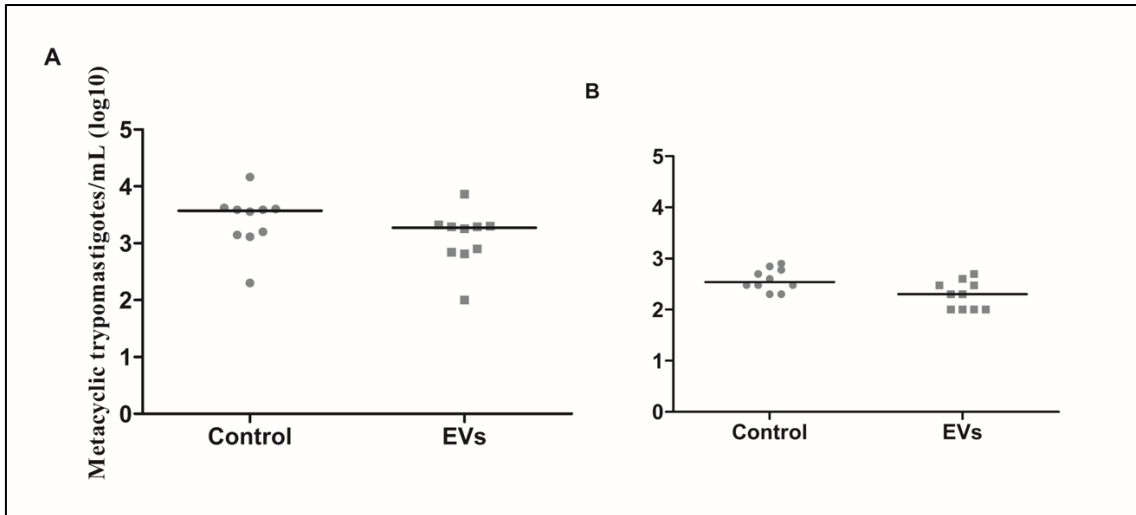


Figure 6. Metacyclic trypomastigotes found in the urine of *R. prolixus* (A) and *T. infestans* (B) at 28 days p.i. Each dot represents the quantification of parasites in the urine sample of one nymph and each horizontal bar corresponds to the mean of the group evaluated.