

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PARASITOLOGIA

**Hospedeiros vertebrados são eficientes
reservatórios para a transmissão do
Trypanosoma rangeli ao inseto vetor**

Luciana de Lima Ferreira

Belo Horizonte - MG

Fevereiro de 2013

Luciana de Lima Ferreira

**Hospedeiros vertebrados são eficientes
reservatórios para a transmissão do
Trypanosoma rangeli ao inseto vetor**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito à obtenção do título de Mestre em Parasitologia.

Área de concentração: Entomologia

Orientadora: Dra. Alessandra A. Guarneri
Co-orientador: Prof. Dr. Marcos Horácio Pereira

Belo Horizonte
Fevereiro de 2013

À minha mãe.

*“É preciso recordar sempre que por detrás
de cada tabela, de cada relatório, ou de cada
material de exame, existe vida, existe gente
em sofrimento à espera do nosso esforço
e da nossa solidariedade humana”*

Carlyle Macedo (WHO)

Agradecimentos

Este trabalho não é resultado apenas de um esforço individual, por isso há muitos a quem tenho que agradecer...

Agradeço a Deus, pois se cheguei até aqui, foi por intermédio Dele.

À minha orientadora Alessandra, por me iniciar na carreira científica desde 2007, por me orientar, ensinar, acreditar e apoiar o estudo do *Trypanosoma rangeli*, mesmo com todas as dificuldades.

Ao Marcos Horácio pela co-orientação, ensinamentos e disponibilidade em sempre solucionar minhas dúvidas.

Ao Marcelo Lorenzo, por todos os ensinamentos e por me ajudar desde a minha iniciação científica.

À Juliana Alves Silva, pela disponibilidade em solucionar minhas dúvidas, por revisar minha dissertação e pela ajuda na seleção do Doutorado.

À Liléia, por carinho e disponibilidade em solucionar minhas dúvidas.

Ao Dr João, pelo exemplo de humildade e profissionalismo.

Ao professor Nelder, por todo aprendizado dentro e fora da sala de aula, e pelas sugestões ao trabalho.

Ao professor Maurício Sant'Anna, pela disponibilidade em tirar as minhas dúvidas.

À Rafaela Paim, pelo grande auxílio no experimento de PCR em tempo real, e pela disponibilidade em sempre me ajudar.

À Adriana Soares, pelo auxílio no experimento de microscopia intravital.

Ao Edmundo Grisard e á Patrícia Stoco, pela disponibilidade em solucionar minhas dúvidas e por me fornecer as cepas de *T.rangeli*.

Aos membros da banca avaliadora, Ricardo T. Fujiwara, Luciano M. Andrade e Maurício R. V. Sant'Anna, por aceitarem o convite e pelas contribuições propostas.

Ao Programa de Pós Graduação em Parasitologia do ICB/UFMG e aos funcionários, pelo meu crescimento profissional.

A todos os professores do Departamento de Parasitologia, que contribuíram para a minha formação.

Aos amigos do LFIH por todo o carinho e disponibilidade em me ajudar, Ricardo Nascimento, César, Lu Ceres, Vaninha, Lu do Piauí, Camila, Analice, Alexandre, Cássio, Dimitri, Antônio, Vlad, Kolyvan, Bruno, Lucas, Ferndanda, Rafaello, Adrianinha, Kel, Kleber e Rafa.

Às amigas antigas que tornaram amigas da turma do pepino Thais, Bruninha e Ana Luiza, por estarem do meu lado me apoiando sempre e incentivando.

Aos amigos adquiridos na turma do pepino Aliani, Julinha, Érica e Kleber por mesmo à distância, nunca deixaram de me dar força durante essa caminhada.

A melhor turma do mestrado: A turma do PEPINO, Luciana Laranjo, Thaisa, Fred, João, Lívia, Bruna Torres, Júnior Fialho, Soraia, Fabiana, Carina, Aytube pela amizade, por estarem do meu lado durante todo o mestrado, vivenciando e aprendendo juntos.

Aos meus amigos do LATEC Ademilson, Carlota, Grasielle, Rita, Silvia, Daniela, João Victor, José Eloy, Cristiane, José Manuel, Marinelli, Letícia, Michelle, Emerson, Luiza, Natália, Gabriel, Raíssa, Aline, João de Deus, Kenia, Valéria, Anatiele, Guilherme que desde a iniciação científica em 2007 me ajudaram em muitas coisas e me ensinaram tantas outras!

Às amigas Robertinha, Fellet, Ju, Thessinha, Lelê por estarem ao meu lado, acalmando minhas angústias, me dando força e ajudando na confecção da dissertação. E por acreditarem sempre no meu trabalho. À Ivana por todo auxílio, apoio e incentivo para a confecção desse trabalho.

Aos ex Latequianos Angélica, Ana Vitta, D.Maria, Elisa, Raquel Ferreira, Gina, Ivan, Guilherme Magno, Gabriel, Fernando, Inês João Paulo pela ajuda e carinho de sempre.

À mamãe (Wilma), a quem dedico esse trabalho, por me amar, acreditar em mim e no meu trabalho quando eu mesma não acreditava, colocar seus sonhos em segundo plano em razão do meu e dos meus irmãos, nos ensinar a ter garra, força e determinação em todos os momentos da vida e nós ensinar que os estudos, são a base para qualquer futuro.

À minha irmã Niela (Daniela), pelo seu amor, apoio, ajuda mesmo que há distância, por não duvidar do meu trabalho, mesmo quando eu não acreditava que daria certo, e por alegrar a casa com sua vinda à Belo Horizonte.

À minha irmã Nanda (Fernanda), por me amar, dar força e por não duvidar do meu trabalho, capacidade e conselhos profissionais.

Ao irmão (Rodrigo), que mesmo estando longe nunca deixou de me colocar em suas orações.

Ao meu pai (Fernando), exemplo de como se deve ser um bom profissional.

Ao meu amor (Newmar), por saber em um olhar, tudo que se passa comigo, pelo auxílio dentro e fora do laboratório. Pelo amor e por estar ao meu lado até a conclusão de mais essa etapa. Aos seus familiares representados pelo Sr. Newton e D.Márcia por apoiar e acreditar sempre na minha capacidade.

Aos meus familiares representados pelo Tio Jairo, Tio Ademar, Tia Celinha, Tia Lena e Tia Tereza (*in memorian*), por todo amor e apoio, por entender minhas ausências, e por não duvidarem da minha capacidade.

À minha amiga de infância Fernandinha, e à recente amizade da Jordana que contribuíram com sua força e estímulo para que eu conseguisse finalizar mais esta etapa.

Às amigas da faculdade Cris, Ludmila, Lívia e Rennia, pela amizade desde 2005, auxílio, força e por compreenderem minhas ausências.

Às agências de fomento CNPQ, FAPEMIG, CPqRR e INCT Entomologia Molecular.

Muito obrigada!

Lista de figuras

- Figura 1. Ciclo evolutivo do *Rhodnius prolixus* caracterizado por desenvolvimento do tipo paurometábulo.....12
- Figura 2. Distribuição geográfica das espécies vetoras do *Trypanosoma rangeli* na América Central e do Sul.....13
- Figura 3. Mapa da América Central e do Sul, mostrando os registros de ocorrência comprovada de *Trypanosoma rangeli* em humanos, triatomíneos ou animais silvestres e a distribuição da doença de Chagas humana.....14
- Figura 4. Ciclo evolutivo do *Trypanosoma rangeli* no vetor.....15
- Figura 5. Taxas de infecção de ninfas de 5º estágio de *R. prolixus*, alimentadas em camundongos infectados pelo *T. rangeli* em diferentes dias após infecção (1º ensaio)..36
- Figura 6. Taxas de infecção de ninfas de 5º estágio de *R. prolixus*, alimentadas em camundongos infectados pelo *T. rangeli* em diferentes dias após infecção (2º ensaio)..37
- Figura 7. Número de epimastigotas encontrados no trato intestinal de ninfas de 5º estágio de *R. prolixus* alimentadas em camundongos infectados pelo *T. rangeli* em diferentes dias após infecção (2º ensaio).....37
- Figura 8. Taxas de infecção de ninfas de 5º estágio de *R. prolixus*, alimentadas em camundongos infectados pelo *T. rangeli* em diferentes dias após infecção (3º ensaio)..38
- Figura 9. Número de epimastigotas encontrados no trato intestinal de ninfas de 5º estágio de *R. prolixus* alimentadas em camundongos infectados pelo *T. rangeli* em diferentes dias após infecção (3º ensaio).....39

Lista de tabelas

Tabela 1. Número de parasitos presentes na glândula salivar (GS) de ninfas de 5º estágio de <i>R.prolixus</i> em jejum e alimentadas, após 45 dias de infecção por <i>T. rangeli</i>	34
--	----

Lista de abreviaturas e siglas

BOD – *Biochemical Oxygen Demand* (estufa)

CEUA – Conselho de Ética e Utilização Animal

C53 - cepa de *Trypanosoma rangeli* isolada na Colômbia

DNA – ácido desoxirribonucléico

E – escuridão

et al – e equipe

FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz

J774 – linhagem de macrófago de camundongo Swiss

HELA – *Henrietta Lacks* (linhagem celular humana isolada de câncer do colo do útero)

L - 058/08 – *licença* (número de registro 058/08)

LIT – *Liver Infusion Triptose* (meio de cultura celular tripanossomatídeos)

L – luz

µl - microlitro

mg - miligramas

ml - mililitros

mm - milímetros

M – molar

NaCl – cloreto de sódio

NaH₂PO₄ - fosfato de sódio

NMRI – linhagem pura de camundongo Swiss

NNN – *Neal, Novy, Nicolle* (meio de cultura para tripanossomatídeos)

n - número

n^o – número amostral

n.s. - não significativo

p – nível de significância

par - parasito

PBS – *Phosphate buffered saline* (solução de salina tamponada)

qPCR – PCR quantitativo (=PCR em tempo real)

seg – segundos

SC58 – cepa de *Trypanosoma rangeli* isolada em Santa Catarina

U937 – promonócito humano

VERO – *Verda Reno* (linhagem celular isolada de células epiteliais renais de macaco)

x - vezes

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

Resumo

Os triatomíneos são insetos primitivamente silvestres, onde vivem associados a ninhos de roedores, aves e marsupiais. Além da espoliação sanguínea que causam, os triatomíneos podem transmitir protozoários como o *Trypanosoma cruzi* e o *Trypanosma rangeli*. O *T. rangeli* não causa doença ao homem, mas pode produzir diversos efeitos patogênicos ao inseto vetor. Pouco se sabe sobre o desenvolvimento do *T. rangeli* no hospedeiro vertebrado, uma vez que a infectividade é baixa e os parasitos tendem a desaparecer da circulação. A transmissão do parasito ocorre durante a picada do inseto, mas ainda não são conhecidos os mecanismos pelos quais os insetos adquirem a infecção a partir de um número tão pequeno de parasitos circulantes no hospedeiro vertebrado. No presente trabalho, inicialmente foi avaliada a possibilidade de transmissão do *T. rangeli* entre insetos através do comportamento de hemolinfagia e durante a alimentação em hospedeiro vertebrado não infectado. Os resultados mostraram que não houve motivação para realização do comportamento de hemolinfagia durante os dez minutos avaliados e nem transmissão do parasito, mesmo quando insetos infectados e alimentados foram mantidos juntos com insetos controles e em jejum por um período de quinze dias. Entretanto, quando ninfas não infectadas foram colocadas para se alimentarem simultaneamente com ninfas infectadas num mesmo hospedeiro sadio, apresentaram taxas de infecção superiores a 60%. O número de parasitos liberados de ninfas de *R. prolixus* juntamente com a saliva durante a alimentação foi estimado a partir de contagem em câmara de Neubauer e por quantificação em qPCR. Apesar de variável entre os insetos, o número médio de parasitos nas glândulas salivares foi bastante reduzido após a realização do repasto sanguíneo. As taxas de infecção de camundongos que foram expostos à picada de uma ninfa infectada foram bastante elevadas, ficando em torno de 90%. A capacidade destes camundongos de transmitirem o parasito para ninfas não infectadas também foi elevada, mesmo quando as ninfas se alimentaram em animais infectados há mais de 30 dias. A manutenção da cepa Choachi por mais de trinta dias em meio LIT diminuiu a capacidade dos camundongos em transmitir o parasito para ninfas não infectadas, bem como a carga parasitária daquelas que se infectaram. O número de parasitos presentes na circulação sanguínea de camundongos bem como o número de parasitos presentes no intestino médio anterior de ninfas recém-alimentadas em camundongos infectados não foram suficientes para serem detectados através da contagem em câmara de Neubauer. Apesar do raro encontro de parasitos circulantes no roedor, as altas taxas de infecção encontradas nas ninfas que se alimentaram nesses animais, mesmo naqueles infectados há mais tempo, sugerem fortemente a existência de um ciclo de desenvolvimento do *T. rangeli* nesse hospedeiro mamífero.

Abstract

Triatomines are insects that live primitively in the wild in association with nests of rodents, birds and marsupials. Besides the blood spoliation they cause, triatomines can transmit protozoans such as *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli*. *T. rangeli* does not harm humans, although it might induce many pathogenic effects to the insect vector. Little is known about the development of *T. rangeli* inside their vertebrate host, since the infectivity is generally low and parasites tend to disappear from blood circulation. Transmission of the parasite occurs during the insect bite, but the mechanisms by which the insects acquire the infection from a very small number of circulating parasites in the vertebrate host are still unknown. In this work, we initially evaluated the possibility of *T. rangeli* transmission between insects via hemolymphagy behavior and during the blood feeding in an uninfected vertebrate host. Our results have shown, that during our experiments, the insects did not perform hemolymphagy behavior, without any detection of *T. rangeli* transmission even when infected insects were kept together with uninfected ones during a long period of fast. However, when uninfected nymphs were simultaneously fed together with infected nymphs in a same uninfected host, they presented infection rates higher than 60%. The number of parasites released from *R. prolixus*' nymphs saliva during feeding was estimated using Neubauer chamber counts and qPCR. Although variations were found between insects, the average number of parasites in the salivary glands was highly reduced after a blood meal. Transmission rates to mice via the bite of infected nymphs were very high, reaching around 90%. We also observed a high capacity of these mice in transmitting the parasite to other uninfected nymphs even 30 days after they were infected. A Choachi strain maintained in LIT culture for a longer period showed a decrease in its capacity of being transmitted from infected mice to uninfected nymphs. Furthermore, the parasite load of nymphs which did get infected in these experiments was also lower. The number of parasites in both the blood of infected mice and in the anterior midgut of recently fed nymphs in these animals were not high enough to be detected via Neubauer chamber counting. Despite the low parasite load in the blood circulation of mammal host, the high infection rates found in nymphs blood fed in these mice, even in those holding older infections, strongly suggest the existence of a development cycle of *T. rangeli* in it mammal host.

Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	12
1.1 Triatomíneos.....	12
1.2 <i>Trypanosoma rangeli</i>	14
1.3 Interações <i>Trypanosoma rangeli</i> - hospedeiro-vertebrado.....	16
1.4 Interações <i>Trypanosoma rangeli</i> - hospedeiro-invertebrado.....	20
2. JUSTIFICATIVA.....	23
3. OBJETIVOS.....	24
3.1 Objetivo geral.....	24
3.2 Objetivos específicos.....	24
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	25
4.1 Triatomíneos.....	25
4.2 Hospedeiros vertebrados.....	25
4.3 Parasitos.....	25
4.3.1 <i>Trypanosoma rangeli</i>	25
4.4 Infecção de <i>Rhodnius prolixus</i>	26
4.4.1 Infecção das ninfas.....	26
4.4.2 Verificação da positividade dos triatomíneos submetidos à infecção.....	26
4.5 Ensaio biológicos.....	27
4.5.1 Avaliação da transmissão do <i>T. rangeli</i> de insetos infectados para insetos não infectados durante o comportamento de hemolinfagia.....	27
4.5.2 Avaliação da transmissão do <i>T. rangeli</i> de insetos infectados para insetos não infectados durante o repasto sanguíneo em camundongos sadios.....	28
4.5.3 Estimativa do número de parasitos liberados por ninfas infectadas por <i>T. rangeli</i> durante o repasto sanguíneo em camundongos.....	28
4.5.4 Avaliação da capacidade de camundongos de transmitirem o <i>T. rangeli</i> para triatomíneos durante diferentes momentos da infecção.....	30

4.5.5	Quantificação do número de parasitos no trato intestinal de insetos alimentados em camundongos durante diferentes momentos da infecção.....	31
4.5.6	Avaliação da presença de parasitos na circulação sanguínea de camundongos durante diferentes momentos da infecção.....	31
4.5.7	Avaliação da presença de parasitos no conteúdo intestinal de ninfas recém alimentadas em camundongos infectados em diferentes momentos da infecção.....	31
4.6	Análise estatística.....	32
5.	RESULTADOS.....	33
5.1	Avaliação da transmissão do <i>T. rangeli</i> de insetos infectados para insetos não infectados durante o comportamento de hemolinfagia.....	33
5.2	Avaliação da transmissão do <i>T. rangeli</i> de insetos infectados para insetos não infectados durante o repasto sanguíneo em camundongos sadios.....	33
5.3	Estimativa do número de parasitos liberados por ninfas de <i>R. prolixus</i> infectadas por <i>T. rangeli</i> durante o repasto sanguíneo em camundongos.....	34
5.4	Avaliação da capacidade de camundongos de transmitirem o <i>T. rangeli</i> para triatomíneos durante diferentes momentos da infecção.....	35
5.4.1	Quantificação do número de parasitos no trato intestinal de insetos alimentados em camundongos durante diferentes momentos da infecção.....	35
5.5	Avaliação da presença de parasitos na circulação sanguínea de camundongos durante diferentes momentos da infecção.....	39
5.6	Avaliação da presença de parasitos no conteúdo intestinal de ninfas recém alimentadas em camundongos infectados.....	40
6.	DISCUSSÃO.....	41
7.	CONCLUSÃO.....	49
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	51

1. INTRODUÇÃO

1.1 Triatomíneos

Os triatomíneos são insetos pertencentes à família Reduviidae, subfamília Triatominae, que atualmente abriga 140 espécies reunidas em 15 gêneros (Schofield e Galvão, 2009). O desenvolvimento é caracterizado como paurometábulo, dividido nas fases de ovo, cinco fases ninfais e a fase adulta (Figura 1, Lent e Wygodzinsky, 1979).

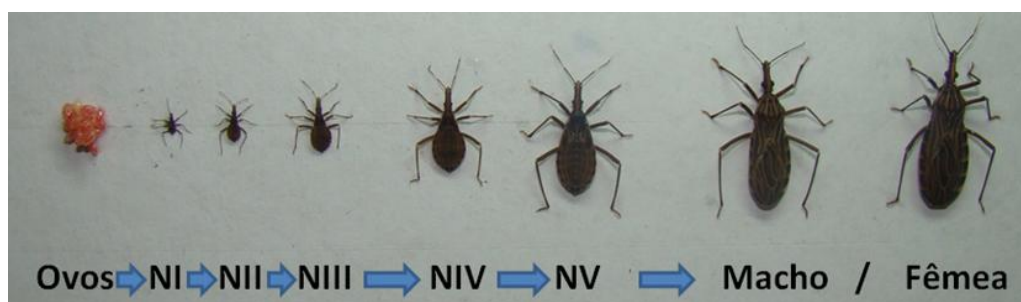


Figura 1. Ciclo evolutivo do *Rhodnius prolixus* caracterizado por desenvolvimento do tipo paurometábulo (Foto: Marlière NP).

Possuem hábito alimentar hematofágico, sendo necessário realizar repastos sanguíneos em vertebrados para completar o seu ciclo evolutivo. Normalmente essa alimentação é realizada em aves, pequenos mamíferos terrestres ou arborícolas, especialmente em didelfídeos, edentados e roedores (Lent e Wygodzinsky, 1979).

Além de provocarem espoliação sanguínea em seus hospedeiros, os triatomíneos são também vetores de patógenos, dentre eles o *Trypanosoma cruzi* e o *Trypanosoma rangeli*. Os triatomíneos assumiram importância epidemiológica em 1909, com a descoberta do seu papel como vetores do *T. cruzi*, agente etiológico da doença de Chagas (Chagas, 1909). Estima-se que existam por volta de 10 milhões de pessoas infectadas pelo *T. cruzi* e 18 milhões de pessoas expostas à infecção na América Latina (WHO, 2012). A capacidade de algumas espécies de triatomíneos de invadir e colonizar o peridomicílio e/ou intradomicílio, onde o homem passa a funcionar como fonte alimentar, além da circulação do *T. cruzi* entre o meio silvestre e o meio doméstico são decisivos para o estabelecimento da infecção (Coura *et al.*, 2010). Os triatomíneos que possuem alta capacidade de domiciliação, que colonizam permanentemente habitações

humanas e mantêm altos índices de infecções naturais pelo *T. cruzi*, são considerados como vetores de importância primária na transmissão da doença de Chagas. As principais espécies de importância primária na América Latina são o *Triatoma infestans*, o *Panstrongylus megistus* e o *Rhodnius prolixus* (Dias e Diotaiuti 1998; Noireau *et al.*, 2005).

Além de se infectarem com o *T. cruzi*, os triatomíneos, principalmente as espécies do gênero *Rhodnius* (figura 2), podem se infectar com o *T. rangeli* ou manter infecções mistas com os dois parasitos, que podem ser igualmente transmitidas ao homem e aos hospedeiros vertebrados (Hudson *et al.*, 1988).



Figura 2. Distribuição geográfica das espécies vetoras do *Trypanosoma rangeli* nas Américas Central e do Sul (Cuba Cuba, 1998).

O gênero *Rhodnius* é composto por 16 espécies distribuídas em uma ampla faixa territorial que se estende da América Central até a América do Sul. São encontrados principalmente em palmeiras, onde estão associados a aves e roedores (Abad-Franch e Monteiro, 2007). *R. prolixus* é uma espécie de grande importância dentro do gênero, por

ser um dos principais vetores da doença de Chagas na América Central e do Sul. Além disso, apresenta alta antropofilia, capacidade de invasão e domiciliação, elevada susceptibilidade ao *T. cruzi* e elevada capacidade reprodutiva, podendo chegar a três gerações em um ano (Peñalver, 1959; Gamboa, 1963; Dorn *et al.*, 2001). Sua distribuição geográfica é ampla, tendo sido encontrado na Bolívia, Colômbia, Costa Rica, El Salvador, Equador, Guatemala, Guiana, Guiana Francesa, Honduras, México, Nicarágua, Panamá, Suriname, Trinidad e Venezuela (Galvão *et al.*, 2003).

1.2 *Trypanosoma rangeli*

O *Trypanosoma rangeli* é um protozoário hemoflagelado pertencente à ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae e subgênero *Herpetosoma* (Levine, 1994). A classificação taxonômica do *T. rangeli* até o momento não está concluída, visto que estudos moleculares sugerem que a espécie seja classificada em outro subgênero, denominado Schizotrypanum (Stevens *et al.*, 1999).

O protozoário infecta hemípteros hematófagos e mamíferos em países da América Central e do Sul (Figura 3).



Figura 3. Mapa da América Central e do Sul, mostrando os registros de ocorrência comprovada de *Trypanosoma rangeli* em humanos, triatomíneos ou animais silvestres (●) e a distribuição da doença de Chagas humana (sombreado) até 1992, segundo a OMS (Grisard *et al.*, 2004).

O ciclo de vida do parasito no hospedeiro invertebrado se inicia com a ingestão de formas tripomastigotas sanguíneas durante o repasto em vertebrado infectado (Figura 4). Essas formas ao atingirem o trato intestinal do inseto se diferenciam para formas epimastigotas curtas e longas que iniciam a multiplicação e então atravessam o epitélio intestinal alcançando a cavidade celomática (D'Alessandro, 1976; Hecker *et al.*, 1990). Uma vez na hemocele, os parasitos continuam a se multiplicar e então migram para as glândulas salivares onde ocorre a metaciclo gênese e a diferenciação para a forma infectante tripomastigota metacíclica, que será transmitida para o vertebrado no momento da picada (D'Alessandro, 1976; D'Alessandro-Bacigalupo e Saravia, 1992).

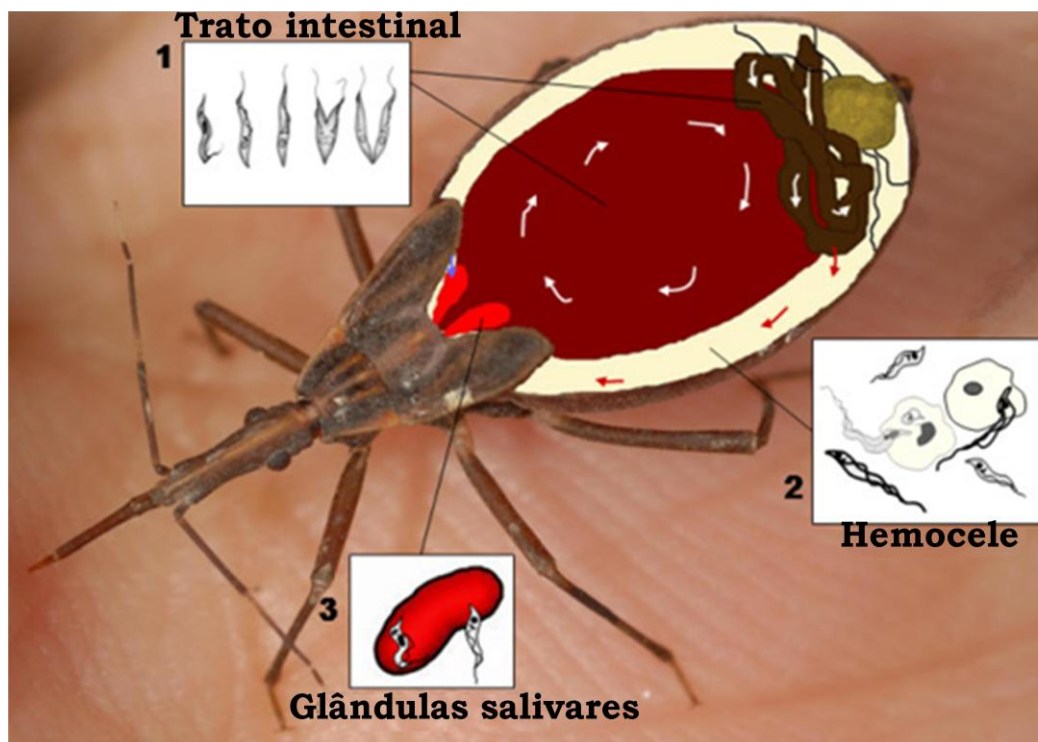


Figura 4. Ciclo evolutivo do *Trypanosoma rangeli* no inseto vetor, Garcia *et al.*, 2009. A primeira etapa do ciclo evolutivo do parasito ocorre no trato intestinal (quadro 1), onde as formas ingeridas se diferenciam para formas epimastigotas, que começam a se multiplicar e atravessam o epitélio intestinal e alcançam a cavidade celomática. Na

hemocele (quadro 2), os parasitos continuam a se dividir e migram para as glândulas salivares (quadro 3). Nas glândulas salivares ocorre a metaciclogênese e os parasitos serão transmitidos durante a realização do repasto sanguíneo.

Apesar de não ser patogênico ao homem, o parasito é capaz de promover uma resposta imune humoral com elevados títulos de anticorpos, os quais apresentam uma elevada reatividade cruzada com antígenos do *T. cruzi*, dificultando o diagnóstico sorológico da doença de Chagas, especialmente em sua fase crônica (Schotelius, 1987). Ao analisar formas epimastigotas de cultura do *T. rangeli*, Afchain e colaboradores (1979) verificaram que este compartilha cerca de 60% de sua constituição antigênica solúvel com o *T. cruzi*, o que explicaria a reatividade sorológica cruzada e os consequentes resultados falso-positivos que incorrem em um elevado custo sócio-econômico.

1.3 Interação *Trypanosoma rangeli* – hospedeiro vertebrado

A transmissão do *T. rangeli* ao hospedeiro mamífero aparentemente ocorre através da picada do inseto vetor (D'Alessandro *et al.*, 1992; 1999), uma vez que até o momento não existem trabalhos descrevendo a ocorrência de transmissão oral do parasito para o hospedeiro vertebrado. Além disso, a contaminação por fezes de triatomíneos infectados se mostrou ineficaz em estudos utilizando camundongos como hospedeiros mamíferos (Tobie, 1964; D'Alessandro, 1976; Hecker *et al.*, 1990). Pouco se sabe a respeito do curso da infecção no hospedeiro vertebrado que tem sido relatado em diferentes grupos de mamíferos.

A infecção humana pelo *T. rangeli* é caracterizada pela ausência de manifestações clínicas, parasitemia de baixos níveis e ausência de formas em divisão nos tecidos e no sangue (D'Alessandro *et al.*, 1992). Infecções humanas já foram relatadas em mais de sete países da América Central e do Sul compreendendo 1.144 casos ocorridos na Venezuela (Dias e Torrealba, 1943; Pífano, 1954; D'Alessandro, 1976), 1.117 na Guatemala (León, 1946; D'Alessandro e Saraiva, 1992), 181 no Panamá (Souza, 1966; Saldaña *et al.*, 2005), 121 na Colômbia (Rey e Ucrós, 1939), 61

em El Salvador (Zeledón, 1956), 4 na Costa Rica (Montero, 1958), 2 no Peru (Alaya, 1964) e 6 no Brasil (Lucena e Marques, 1954; Coura *et al.*, 1996; Souza *et al.*, 2008). Um estudo realizado com 80 pacientes da Venezuela demonstrou que 44% dos pacientes estavam infectados com o *T. rangeli*, 34% estavam infectados com o *T. cruzi* e 22% mantinham infecções mistas (Pífano, 1954). Uma pesquisa desenvolvida no Panamá teve por objetivo verificar a soro-prevalência de infecções ocasionadas pelo *T. rangeli* e pelo *T. cruzi* em 206 crianças de 3 a 14 anos. Através de diagnósticos parasitológicos, sorológicos e moleculares foi observado que 9,7% das crianças estavam infectadas com *T. rangeli* e 2,9% estavam infectadas com o *T. cruzi*, não tendo sido encontradas infecções mistas (Saldaña *et al.*, 2005).

No Brasil o primeiro caso de rangelirose humana foi descrito em 1954 por Lucena e Marques, que relataram um paciente chagásico cardiopata que mantinha infecção mista pelo *T. cruzi* e pelo *T. rangeli*. Após esse primeiro episódio, outros três casos foram relatados em 1996 por Coura e colaboradores em um estudo sobre a prevalência de infecções humanas por tripanosomatídeos realizado no estado do Amazonas. Souza e colaboradores (2008), estudando pacientes chagásicos crônicos no Instituto de Pesquisa e Clínica Evandro Chagas, relataram a presença de dois pacientes oriundos do estado da Bahia que apresentaram co-infecção *T. cruzi/T. rangeli*.

Com relação à infecção de animais domésticos, Pineda e colaboradores (2011) realizaram testes sorológicos e moleculares em 99 cães de duas regiões endêmicas para doença de Chagas no interior do Panamá. Os autores encontraram uma positividade de 16,2% para infecções por tripanosomatídeos, sendo que 5,1% dos cães estavam positivos para o *T. rangeli* e 11,1% para o *T. cruzi*, além de uma co-infecção *T. rangeli/T. cruzi*.

Várias espécies de animais foram descritas como sendo reservatórios silvestres do *T. rangeli* e estão distribuídas em cinco ordens: Edentada, Marsupialia, Carnivora, Rodentia e Primata (D'Alessandro, 1976; D'Alessandro-Bacigalupo e Gore-Saravia, 1992; 1999; Cuba, 1998). As principais espécies encontradas infectadas pelo parasito foram: *Didelphis marsupialis* (Deane, 1958; Montero-Gei *et al.*, 1961; Deane, 1964a, b; Woo *et al.*, 1970), *Metachirops opossum* (Deane, 1958), *Marmosa alstoni* (Montero-Gei *et al.*, 1961), *Philander juscogrisens* (Montero-Gei *et al.*, 1961), *Saimiri boliviensis* (Morales, 1964), *Cebus capucinus* (Marinkelle 1966; Ziccardi *et al.*, 2000), *Glossophago saorcina* (Marinkelle, 1966), *Artibeus lituratus* (Marinkelle, 1966) e *Tamandua tetradactyla* (Walton *et al.*, 1967).

Um levantamento parasitológico ocorrido no Panamá examinou 3.523 macacos selvagens e verificou uma maior prevalência de infecções provocadas pelo *T. rangeli* em *Saguinus geoffroyi* (55,8%) e em *Cebus capucinus* (12,5%) em comparação com as infecções causadas pelo *T. cruzi*, que apresentaram um percentual de 12,2% em *S.geoffroyi* e 5,0% em *C.capucinus* (Souza *et al.*, 1974). Outro estudo realizado com 46 símios provenientes da Amazônia Legal obteve, através de métodos parasitológicos e moleculares, 30,4% de animais infectados por *T. rangeli*, 26% infectados por *Trypanosoma devei*, 8,7% infectados por *T. cruzi* e 4,3% infectados por *Trypanosoma minasense* (Ziccardi *et al.*, 2000).

O estudo da infecção do *T. rangeli* no hospedeiro vertebrado vem sendo desenvolvido por diferentes autores. Em ensaios experimentais, o que se observa é uma pequena quantidade de parasitos presentes no sangue circulante mesmo durante o pico de parasitemia e uma fase aguda que ocorre normalmente por períodos curtos de tempo (Tobie, 1961; Molineaux, 1973; Urdaneta Morales e Tejero, 1985; Vallejo, 1986; Osório *et al.*, 1995; Zuniga *et al.*, 1997; Tanoura *et al.*, 1999; Eger-Mangrich *et al.*, 2001).

Pífano (1954) inoculou em camundongos parasitos de uma cepa de *T. rangeli* isolada de cão. Neste estudo, os parasitos puderam ser detectados por exames a fresco a partir da terceira semana pós-infecção, sendo que o número de parasitos foi decrescendo ao longo do tempo da infecção até os mesmos não serem mais detectados.

Em 1957, Sandreuter-Herbig avaliou se o *T. rangeli* desenvolvia formas teciduais no hospedeiro vertebrado, utilizando como modelos experimentais camundongos Swiss e macacos *Rhesus*, que foram infectados através do inóculo de formas epimastigotas. A presença do parasito no roedor foi perceptível através de esfregaços sanguíneos entre os dias 4 e 20 pós-infecção. Nos símios foi observada uma baixa parasitemia, sendo detectada por meio de esfregaço sanguíneo entre os dias 7 e 15 pós-infecção. Não foram observadas formas teciduais e nem alterações histopatológicas no cérebro, coração, pulmões, baço, rins, glândula supra-renal e diafragma nos animais testados.

Urdaneta-Morales e Tejero (1985) estudaram a parasitemia de roedores infectados e concluíram que camundongos imunossuprimidos apresentaram parasitemias significativamente mais elevadas do que camundongos imunocompetentes que foram infectados com a mesma cepa.

Scorza (1986) infectou camundongos jovens da linhagem NMRI com parasitos da cepa Perro 82. No estudo foi verificada a presença de várias formas intracelulares em diversos órgãos dos animais. No mesmo ano, Urdaneta-Morales e Tejero também utilizaram a cepa Perro 82 e camundongos brancos como modelos experimentais e observaram amastigotas e formas tripomastigotas no coração, baço e fígado dos animais.

Quando a parasitemia não é mais observada em exame a fresco ainda pode ser possível a detecção de flagelados de *T. rangeli* através de hemocultura por um período de 2 a 18 meses (Paredes e Paredes, 1949; Groot *et al.*, 1950; Groot, 1954; Sandreuter-Herbig, 1957; Souza e Johson, 1971; Steindel, 1993) e de xenodiagnóstico por um período de até dois meses (Añez *et al.*, 1981; 1985). Avaliações *in vitro* utilizando diferentes cepas de *T. rangeli* frente a linhagens celulares distintas (fagocíticas e não fagocíticas) sugerem a ausência de multiplicação intracelular, especialmente observada em macrófagos (Molyneaux, 1973; Osório *et al.*, 1995; Tanoura *et al.*, 1999; Eger-Mangrich *et al.*, 2001). Molineaux (1973) estudou a infectividade de tripomastigotas de glândulas salivares da cepa Macias em células HELA e células de sarcoma de cão. Neste estudo os parasitos não infectaram as células testadas, entretanto, o autor observou a replicação de formas tripomastigotas no sobrenadante das culturas celulares. Epimastigotas de cultura e tripomastigotas metacíclicos de glândulas salivares da cepa SC-58 foram utilizados para avaliar a capacidade de multiplicação do parasito em células VERO e em macrófagos peritoneais extraídos de camundongos isogênicos. Não foram observados indícios de multiplicação do parasito nos ensaios realizados (Oliveira *et al.*, 1994; Eger *et al.*, 1996). Osório e colaboradores (1995) ao estudarem a infectividade do *T. rangeli* da cepa San Agustin em promonócitos humanos (U937) notaram formas amastigotas com o tamanho superior ao das amastigotas formadas pelo *T. cruzi*, que aparentemente foram mais infectivas para ninfas de *R. prolixus* a partir de alimentação artificial. A cepa C53 Colombiana também demonstrou formação de amastigotas ao ser desafiada com células não fagocíticas VERO e J774 (Zuñiga *et al.*, 1997a).

1.4 Interações *Trypanosoma rangeli* - hospedeiro invertebrado

O *T. rangeli* compartilha com o *T. cruzi* seus hospedeiros triatomíneos e mamíferos, e embora não seja patogênico para o homem, apresenta uma série de efeitos patogênicos para o inseto vetor (Brecher e Wigglesworth, 1944; Lake e Friend, 1967; D'Alessandro 1976; Eichler e Schaub, 1998). Aparentemente, o desenvolvimento completo do parasito no intestino, na hemolinfa e nas glândulas salivares ocorre principalmente em espécies do gênero *Rhodnius*. Nos outros gêneros, quando há infecção, esta parece ser limitada ao trato intestinal do triatomíneo. Por exemplo, Gregório e Ratcliffe (1991) não detectaram a presença do parasito em infecções experimentais de ninfas de *T. infestans* e relacionaram o resultado negativo com a presença de aglutininas no trato intestinal que impediriam o seu estabelecimento.

A principal forma de aquisição do *T. rangeli* pelo triatomíneo é através da alimentação em vertebrados infectados (D'Alessandro *et al.*, 1992; 1999). Segundo dados da literatura, em estudos experimentais, essa aquisição ocorreria durante alimentação principalmente em animais exibindo a fase aguda da infecção (Tobie, 1964; 1965; Añez, 1983; Zuñiga *et al.*, 1997).

Entretanto, algumas formas alternativas de transmissão do parasito para triatomíneos já foram relatadas, dentre elas, a transmissão através do comportamento de hemolinfagia, que consiste no ato de um inseto se alimentar da hemolinfa de um co-específico ou de um inseto de outra espécie (Añez, 1982), e a transmissão de insetos infectados para insetos não infectados, através de alimentação simultânea num mesmo hospedeiro vertebrado sadio (Tobie, 1968; Cuba Cuba, 1972).

Nas infecções naturais que ocorrem por meio do repasto sanguíneo em mamíferos infectados, cerca de 2-50% dos insetos que apresentam parasitos no trato intestinal, também são positivos na hemolinfa e nas glândulas salivares (Marinkelle, 1968, Tobie, 1965, 1970; Añez *et al.*, 1987; Hecker *et al.*, 1990). Ainda não são conhecidos os fatores que levam ao desenvolvimento de infecções completas. Pequenas modificações como alterações nos resíduos de açúcar em glicoproteínas de superfície poderiam contribuir para o aumento ou diminuição nas taxas de penetração do epitélio intestinal (Tobie, 1965). A dinâmica de estabelecimento desigual do parasito provavelmente leva aos diferentes níveis de patologia observados no hospedeiro invertebrado. Em infecções massivas, principalmente na hemolinfa, um grande número de insetos morre, e os que sobrevivem prolongam o período intermudas, além de

apresentarem diferentes alterações morfológicas (Grewal, 1957; Tobie, 1961; Añez, 1984). Uma característica da infecção observada em um número considerável de indivíduos infectados é a elevada taxa de mortalidade durante a ecdise, quando os insetos morrem ao não conseguirem sair da antiga cutícula (Añez, 1984).

A porcentagem de insetos infectados que apresentam parasitos nas fezes pode variar de 31 a 70%, sendo que a infecção intestinal pode permanecer por toda a vida inseto (Pífano *et al.*, 1948; D'Alessandro, 1976; Cuba Cuba, 1975; Hecker *et al.*, 1990).

A primeira etapa do ciclo evolutivo do protozoário ocorre no trato intestinal do inseto que é totalmente colonizado pelo parasito (Ferreira *et al.*, 2011). Foi verificado que ninfas de *R. prolixus* e de *T. infestans* infectadas pelo *T. rangeli* apresentaram uma diminuição nas populações de seus simbiossitos intestinais (Lake e Friend, 1967; Watkins, 1969; 1971; Eichler e Schaub, 2002). Esses microorganismos são fundamentais para o desenvolvimento dos triatomíneos, uma vez que sintetizam nutrientes ausentes na dieta exclusivamente sanguínea (Wigglesworth, 1936). Essa diminuição no número de simbiossitos pode gerar uma série de efeitos deletérios ao vetor, como aumento nas taxas de mortalidade (Harrington, 1960; Añez, 1984), retardo no desenvolvimento ninfal (Eichler e Schaub, 2002), distúrbios na excreção e digestão (Brecher e Wigglesworth, 1944; Eichler e Schaub, 1998) e reduções no sistema traqueal (Eichler e Schaub, 1998). As membranas perimicrovilares que se formam no trato intestinal dos triatomíneos após a alimentação parecem funcionar como barreiras físicas que dificultam a invasão da hemocele pelo *T. rangeli*. Gomes e colaboradores (2002) demonstraram que insetos submetidos à irradiação gama que desestrutura as membranas perimicrovilares, desenvolvem a infecção celomática mais rapidamente do que os não irradiados.

Ao invadir a hemocele, o *T. rangeli* inicia uma fase de intensa multiplicação na hemolinfa, o que pode promover uma infecção massiva e causar a morte do inseto. Os que sobrevivem à infecção normalmente têm um prolongamento do período inter-mudas e podem apresentar deformações morfológicas nas patas e asas comprometendo seu desenvolvimento (Grewal, 1957; Tobie, 1961; Añez, 1984; Ferreira *et al.*, 2010).

A presença do parasito desencadeia a resposta imune do vetor que é voltada principalmente para as formas epimastigotas curtas (Mello *et al.*, 1999; Gomes *et al.*, 1999; 2003). Dentre os mecanismos que são ativados durante a infecção estão a cascata da pró-fenoloxidase (Mello *et al.*, 1995), a fagocitose com formação de nódulos de hemócitos (Takle, 1988; Mello *et al.*, 1995), a aglutinação (Pereira *et al.*, 1981; Mello *et*

al., 1995; Ratcliffe *et al.*, 1996) e a produção de radicais livres (Whiten *et al.*, 2001) e eicosanoides (Garcia *et al.*, 2004). Nesse sentido, as formas epimastigotas longas conseguiriam escapar do sistema imune dando continuidade ao ciclo evolutivo do parasito, migrando para as glândulas salivares (Mello *et al.*, 1999; Gomes *et al.*, 1999; 2003).

Além de desencadear a resposta imune do inseto, a infecção pelo *T. rangeli* promove alterações em sua fisiologia. Watkins (1971) mostrou que *R. prolixus* infectados pelo parasito apresentavam um aumento no volume de hemolinfa e relacionou esse fato com uma redução nas taxas de excreção. Ferreira e colaboradores (2010) também encontraram um aumento no volume de hemolinfa em insetos infectados, mas o correlacionaram com um aumento significativo na quantidade de lipídeos e no corpo gorduroso desses insetos.

A última etapa do ciclo do *T. rangeli* acontece nas glândulas salivares onde ocorre a metaciclogênese. As formas epimastigotas longas do *T. rangeli* conseguem invadir a glândula e uma vez dentro dela, se diferenciam em formas tripomastigotas metacíclicas que permanecem livres até que ocorra um repasto sanguíneo e sejam liberadas juntamente com a saliva do inseto. As glândulas salivares produzem uma série de moléculas com propriedades anti-hemostáticas que são fundamentais para o sucesso da ingestão sanguínea (Ribeiro *et al.*, 2004). Durante o período em que permanecem na glândula, os parasitos promovem uma redução na quantidade total de proteínas estocadas, incluindo aquelas relacionadas às atividades anti-hemostáticas, como as nitroforinas (Paim *et al.*, 2013), o que provavelmente afeta o comportamento alimentar do inseto induzindo um aumento significativo no número de picadas e reduzindo a sua habilidade de ingerir sangue de um hospedeiro vertebrado e conseqüentemente aumentando as chances de transmissão pelo *T. rangeli* (Garcia *et al.*, 1994).

2. JUSTIFICATIVA

Embora os estudos sobre a interação do *Trypanosoma rangeli* e seus hospedeiros invertebrados e vertebrados tenham avançado de forma relevante nas áreas de fisiologia (Añez *et al.*, 1984; 1987; Grewal, 1957; Groot, 1954; Tobie, 1961; Hecker *et al.*, 1990; Marinkelle, 1968; Tobie, 1961; 1965; 1970; Eichler e Schaub, 2002; Ferreira *et al.*, 2010), bioquímica (Rudin *et al.*, 1989; Atella *et al.*, 1995; Coelho *et al.*, 1997; Folly *et al.*, 2003) imunologia (Tobie 1968, 1970; Pereira *et al.*, 1981; Takle, 1988; Mello *et al.*, 1995; Garcia *et al.*, 1994; Ratcliffe *et al.*, 1996; Gomes *et al.*, 1999; 2003 Whiten *et al.*, 2001), genômica, proteômica (Snoeijer *et al.*, 2004; Grisard *et al.*, 2010) e comportamento (Garcia *et al.*, 1994; Marlière *et al.*, 2010), ainda existem lacunas relevantes no entendimento do ciclo evolutivo do parasito.

O processo de aquisição do protozoário pelo triatomíneo, ainda não foi totalmente esclarecido, sendo que existem relatos da existência de transmissão do parasito entre insetos, através do comportamento de hemolinfagia (Añez, 1982). Além disso, também já foi relatada a transmissão entre insetos, no momento que estes compartilham um mesmo hospedeiro saudável (Tobie, 1968; Cuba Cuba, 1972). Entretanto, o papel que este tipo de transmissão tem na circulação do *T. rangeli* na natureza ainda não foi estabelecido. Sendo assim, no presente estudo foram desenvolvidos experimentos para avaliar a relevância destas formas alternativas de aquisição do parasito pelo inseto vetor.

Outro aspecto relevante e ainda desconhecido é a respeito do curso da infecção no vertebrado, uma vez que, até o momento, não foram encontradas formas multiplicativas do parasito no hospedeiro mamífero. O que surpreende nesse aspecto, é que o parasito pode ser recuperado através de xenodiagnóstico ou hemocultura vários meses após a primo infecção. Para melhor compreender esse processo, foi estabelecido um protocolo de infecção do hospedeiro vertebrado que busca mimetizar a transmissão do *T. rangeli* na natureza. A partir desse protocolo foram desenvolvidos ensaios que avaliaram diferentes etapas da transmissão hospedeiro mamífero – triatomíneo.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral:

Avaliar a transmissão do *Trypanosoma rangeli* entre hospedeiros vertebrados e invertebrados, utilizando como modelos camundongos da linhagem Swiss Webster (*Mus musculus*) e triatomíneos da espécie *Rhodnius prolixus*.

3.2 Objetivos específicos:

3.2.1 Avaliar a transmissão do *T. rangeli* de insetos infectados para insetos não infectados durante o comportamento de hemolinfagia;

3.2.2 Avaliar a transmissão do *T. rangeli* de insetos infectados para insetos não infectados durante o repasto sanguíneo em camundongos saudáveis;

3.2.3 Estimar o número de parasitos liberados por ninfas infectadas por *T. rangeli* durante o repasto sanguíneo em camundongos;

3.2.4 Avaliar a capacidade de camundongos transmitirem o *T. rangeli* para triatomíneos durante diferentes momentos da infecção;

3.2.5 Quantificar o número de parasitos no trato intestinal de insetos alimentados em camundongos durante diferentes momentos da infecção;

3.2.6 Avaliar a presença de parasitos na circulação sanguínea de camundongos durante diferentes momentos da infecção;

3.2.7 Avaliar a presença de parasitos no conteúdo intestinal de ninfas recém alimentadas em camundongos infectados durante diferentes momentos da infecção.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Triatomíneos

Os exemplares de *R. prolixus* utilizados neste trabalho são procedentes de uma colônia originada a partir de insetos coletados em Honduras e mantida no Laboratório de Triatomíneos e Epidemiologia da Doença de Chagas do Centro de Pesquisas René Rachou, FIOCRUZ-MINAS. Os insetos foram criados em frascos de acrílico cilíndricos com diâmetro de base de 15 cm e altura de 19 cm, forrados com papel filtro, contendo uma tira de cartolina dobrada em sanfona para aumentar a superfície interna e fechados com tecido de algodão.

Os insetos foram alimentados semanalmente em galinhas ou camundongos. A sala do insetário foi mantida em temperatura de $26 \pm 1^\circ\text{C}$, umidade relativa de $65 \pm 10\%$ com ciclo natural de iluminação.

Todos os protocolos que utilizaram animais seguiram as normas da FIOCRUZ para a experimentação e manutenção animal e foram aprovadas pelo Comitê de Ética na Utilização de Animais (CEUA-FIOCRUZ-MG) sob o número L-058/08.

4.2 Hospedeiros vertebrados

Foram utilizados camundongos machos, da espécie *Mus musculus* e linhagem Swiss Webster com peso de aproximadamente 30 gramas e com idade de cerca de 60 dias. Os animais foram anestesiados intraperitonealmente com uma mistura de ketamina 150 mg/kg (Cristalia – Brasil) e xilazina 10 mg/kg (Bayer – Brasil), num volume final de 150 μl por animal.

4.3 Parasitos

4.3.1 *Trypanosoma rangeli*

Para o estudo foi utilizada a cepa CHOACHI de *T. rangeli* isolada inicialmente de *R. prolixus* naturalmente infectados (Schottelius, 1987). Os parasitos foram mantidos em estufa BOD, a 27°C , através de passagens semanais em meio LIT (liver-infusion tryptose) ou ágar/sangue + LIT (NNN + LIT), ambos suplementados com 15% de soro bovino fetal, 100 μg de estreptomicina/ml e 100 unidades de penicilina/ml. Para a

manutenção da infectividade dos parasitos, a cada três meses a cepa foi submetida a uma passagem triatomíneo-camundongo e recuperada através de hemocultura.

4.4 Infecção de *Rhodnius prolixus*

4.4.1 Infecção das ninfas

Ninfas de terceiro estágio, com jejum de aproximadamente sete dias, foram alimentadas artificialmente com sangue de coelho citratado e inativado por calor (56°C/30min) contendo uma suspensão de epimastigotas de *T. rangeli*, numa concentração de 1×10^5 parasitos/ml. Para garantir a presença dos parasitos na hemolinfa e nas glândulas salivares, sete dias após a muda para o quarto estágio, as ninfas foram inoculadas intracelomicamente na região torácica com doses de 1µl de PBS estéril (0,15 M NaCl, 0,01M de NaH₂PO₄, pH = 7,4) contendo epimastigotas de *T. rangeli* na concentração de 1×10^5 par/ml. Um dia após a inoculação, as ninfas foram alimentadas em camundongos anestesiados.

Os insetos não infectados utilizados nos experimentos foram alimentados em camundongos anestesiados conforme descrito no item 4.2, até alcançarem o 5º estágio.

4.4.2 Verificação da positividade dos triatomíneos submetidos à infecção

Para cada grupo inoculado, uma amostra de 10% dos insetos foi utilizada para avaliação do percentual de positividade intestinal, da hemolinfa e das glândulas salivares, sete dias após a ecdise para o quinto estágio. Os exames foram feitos como descrito a seguir:

→Intestino: os insetos foram dissecados e seus intestinos transferidos para lâmina e lamínula (22x22mm) contendo PBS, onde foram examinados em microscópio óptico em aumento de 400x.

→Hemolinfa: amostras de hemolinfa foram coletadas através de um corte em um dos tarsos dos insetos, transferidas para lâminas e examinadas em microscópio óptico em aumento de 100x.

→Glândulas salivares: os insetos foram dissecados e tiveram suas glândulas salivares extraídas com auxílio de pinças e transferidas para lâmina e lamínula (22x22mm) contendo PBS, onde foram examinadas em microscópio óptico em aumento de 400x.

4.5 Ensaios biológicos

4.5.1 Avaliação da transmissão do *T. rangeli* de insetos infectados para insetos não infectados durante o comportamento de hemolinfagia

A transmissão do *T. rangeli* através do comportamento de hemolinfagia foi avaliada utilizando-se a metodologia descrita por Alves e colaboradores (2011) e dividida em dois ensaios.

a) Avaliação da motivação dos insetos em realizar o comportamento de hemolinfagia:

O objetivo desse ensaio foi avaliar a porcentagem de ninfas que tentam picar um inseto alimentado e infectado dentro de um determinado período de tempo. Para realização do ensaio, uma ninfa de 5º estágio contendo parasitos na sua hemolinfa, serviu como fonte de alimentação. Três dias antes do ensaio, a ninfa foi alimentada em camundongos anestesiados e imediatamente antes do início do experimento foi mantida a 40°C por três minutos. A ninfa foi então imobilizada com fita adesiva no interior de um frasco cilíndrico forrado com papel filtro (base de 4cm e altura de 5,5cm). Dez ninfas de 2º estágio com 10 dias de jejum foram então liberadas e mantidas no interior do frasco por um período de 10 minutos juntamente com a ninfa infectada. Durante este período, foi registrado o número de ninfas que tentavam iniciar o processo de alimentação (estendiam a probóscide e tentavam picar a ninfa alimentada). O ensaio foi repetido duas vezes.

b) Avaliação da transmissão do *T. rangeli* através do comportamento de hemolinfagia:

Para avaliar a porcentagem de ninfas que se infectam com o *T. rangeli* através da alimentação em co-específicos infectados, um grupo de 10 ninfas de 2º estágio, com 20 dias de jejum foi mantido em um frasco cilíndrico forrado com papel filtro (base de 4cm e altura de 5,5cm) e coberto com tecido de algodão, juntamente com uma ninfa de 5º estágio, contendo parasitos na sua hemolinfa e com jejum de 10 dias, por um período de 15 dias. Decorrido esse período, a ninfa de 5º estágio foi retirada, as ninfas de 2º estágio foram alimentadas em camundongos anestesiados, transferidas para estufas BOD (27±1°C, 12:12 L:E) e mantidas nessas condições até a ocorrência da muda para o 3º estágio, quando tiveram seu trato intestinal, hemolinfa e glândulas salivares examinados

para a presença de parasitos, de acordo com o item 4.4.2. O ensaio foi repetido cinco vezes.

4.5.2 Avaliação da transmissão do *T. rangeli* de insetos infectados para insetos não infectados durante o repasto sanguíneo em camundongos sadios

Para avaliar se o vertebrado poderia funcionar como “hospedeiro paratênico” da infecção pelo *T. rangeli*, sendo paratênico definido como um hospedeiro de transporte no qual o parasito não passa por nenhum desenvolvimento até atingir o hospedeiro definitivo, foram utilizadas ninfas de 5º estágio infectadas e não infectadas, com aproximadamente 30 dias de jejum.

O ensaio consistiu na liberação de uma ninfa infectada (n=5) e outra não infectada (n=5) em um frasco cilíndrico (base de 4cm e altura de 5,5cm) coberto com tecido e dividido com uma tira de papel cartão em dois setores, impedindo o contato entre os insetos. Um camundongo anestesiado serviu como fonte alimentar, sendo mantido em cima do frasco por um período de 40 minutos. Ao término desse período, o hospedeiro mamífero e a ninfa infectada foram retirados do aparato permanecendo apenas a ninfa não infectada. As ninfas testadas foram então transferidas para uma estufa BOD (27±1°C, 12:12 L:E) e mantidas nessas condições por vinte e um dias, quando seu conteúdo intestinal, hemolinfa e glândulas salivares foram dissecados e examinados em microscópio óptico para a verificação da presença de parasitos, de acordo com o item 4.4.2.

O período de 21 dias de espera para a realização dos exames foi estabelecido a partir de ensaios pilotos que demonstraram ser este suficiente para a detecção de parasitos no trato intestinal, através de exames a fresco.

4.5.3 Estimativa do número de parasitos liberados por ninfas infectadas por *T. rangeli* durante o repasto sanguíneo em camundongos

A estimativa do número de parasitos liberados durante o repasto foi feita de acordo com a metodologia descrita por Paim *et al.* (2013).

Cinquenta ninfas de 3º estágio foram infectadas conforme descrito no item 4.4.1 e após a muda para 5º estágio e 45 dias após o inóculo intracelomático, um grupo de

ninfas (n=11) foi alimentado em camundongos anestesiados e imediatamente após o repasto, suas glândulas salivares foram dissecadas. Outras ninfas provenientes do mesmo grupo (n=11), mas que não se alimentaram, também tiveram suas glândulas dissecadas. Cada par de glândulas foi colocado em lâmina de vidro contendo PBS para lavagem e retirada dos parasitos presentes no exterior das glândulas. Após a lavagem, as glândulas foram transferidas para microtubos plásticos de 1,5ml contendo 100µl de PBS, rompidas com auxílio de pinças e o conteúdo homogeneizado. Uma amostra de 10µl do homogenato foi coletada e quantificada através de câmara de Neubauer. Durante a avaliação só foram quantificadas as formas tripomastigotas e formas epimastigotas que apresentavam tamanho inferior ao das formas epimastigotas encontradas na hemolinfa, indício de início do processo de metaciclogênese. A amostra restante (90µl) foi utilizada para extração de DNA com o Kit Nucleospin Tissue XS (Macherey-Nagel), conforme instruções do fabricante. O DNA purificado foi eluído em 22µl de água para posterior estimativa do número de parasitos através da técnica de PCR em tempo real (qPCR). Para a quantificação absoluta do número de parasitos presente nas glândulas salivares de insetos alimentados e em jejum foi construída uma curva padrão utilizando diluições seriadas do plasmídeo pGEM-T Easy (Promega) contendo uma sequência de 137pb, relacionada ao gene multicópias sno-RNA-C11 do *T. rangeli*, que foi utilizado para a detecção do parasito (GenBank: AY028385.2, forward: 5' gaaagcgcaagagagagat-3' e reverse: 5'-tgagatggctatcacgcaag-3') (Morales *et al.*, 2002; Paiva *et al.*, 2007). O DNA plasmidial foi gentilmente cedido pela doutoranda Rafaela M.M. Paim. O plasmídeo foi diluído de forma a se obter uma curva padrão variando entre 10^0 e 10^7 moléculas, e a curva obtida foi utilizada para a estimativa da quantidade de cópias presentes nas amostras. As reações de qPCR foram realizadas em um sistema ABIPRISM 7500 Sequence Detection System (Applied Biosystems). Cada reação foi realizada em triplicata e continha 2µl de DNA, 300nM de cada iniciador e 12,5µl de Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) num volume final de 25µl. O DNA foi amplificado a 95°C por 10 min, seguido por 40 ciclos de 95°C por 15 seg e 60°C por 1 min. Para verificar que um único produto foi amplificado, foram realizadas análises de “melting curve”. Um controle negativo sem a presença dos iniciadores foi incluído.

A estimativa do número de parasitos liberados pela glândula salivar no momento do repasto sanguíneo foi feita através da razão entre o número médio de parasitos presentes nas glândulas salivares antes e depois da alimentação. A estimativa foi feita

tanto para as contagens realizadas em câmara de Neubauer quanto para a quantificação obtida pela qPCR.

4.5.4 Avaliação da capacidade de camundongos transmitirem o *T. rangeli* para triatomíneos durante diferentes momentos da infecção

Para determinar por quanto tempo um camundongo que recebe uma carga de parasitos proveniente do repasto de um inseto infectado é capaz de infectar outros insetos, foram realizados três ensaios em períodos diferentes. Nos primeiros dois ensaios, as ninfas que serviram como fonte de infecção para o camundongo foram infectadas com a cepa recém recuperada de hemocultura (entre 7-15 dias após o procedimento). Já no terceiro ensaio, a cepa utilizada para infectar as ninfas estava sendo mantida no LIT há mais de 30 dias.

Camundongos (n dos três ensaios=31) com 60 dias de vida foram anestesiados e expostos a uma ninfa de 5º estágio infectada com 30 dias de jejum durante um período de 50 minutos. Efetuado esse período, as ninfas infectadas utilizadas para a infecção dos roedores foram retiradas e suas glândulas salivares dissecadas para confirmação da infecção. Somente os camundongos que serviram como fonte alimentar para ninfas positivas foram utilizados no ensaio.

No primeiro dia após a infecção e durante sete dias consecutivos, ninfas de 5º estágio não infectadas e com 30 dias de jejum foram individualmente expostas aos camundongos infectados por um período de 50 minutos para realização do repasto sanguíneo. Esse procedimento foi repetido no 15º e 30º dia pós-infecção. No segundo ensaio, o procedimento foi repetido também no 126º dia pós-infecção. Após o término da alimentação, as ninfas foram transferidas para estufas BOD (27±1°C, 12:12 L:E) e mantidas nessas condições por 21 dias, quando seu conteúdo intestinal, hemolinfa e glândulas salivares foram examinados para a procura de parasitos.

Após a verificação da positividade dos triatomíneos que se alimentaram nos camundongos infectados, os insetos que apresentaram resultados negativos foram identificados, para localização dos roedores utilizados. Os animais foram eutanasiados, dessangrados e o sangue transferido para tubos de cultura contendo meio NNN, onde foi adicionado 2ml de LIT. Após um período de 20 dias, a hemocultura foi examinada.

4.5.5 Quantificação do número de parasitos no trato intestinal de insetos alimentados em camundongos durante diferentes momentos da infecção

A quantificação dos parasitos presentes no trato intestinal das ninfas avaliadas foi realizada a partir da dissecção dos intestinos, que foram transferidos, rompidos e homogeneizados em microtubos contendo 10 μ l de PBS. Uma amostra de 10 μ l do homogenato foi coletada, diluída 100x e quantificada através de câmara de Neubauer.

4.5.6 Avaliação da presença de parasitos na circulação sanguínea de camundongos durante diferentes momentos da infecção

Para avaliação da presença de parasitos circulantes na corrente sanguínea de camundongos, foram utilizados vinte e quatro animais infectados através da alimentação de uma ninfa infectada conforme descrito no item 4.5.4. Os roedores foram avaliados logo após a realização do repasto infectivo durante sete dias consecutivos e no 15 $^{\circ}$ e 30 $^{\circ}$ dia pós-infecção. Para o exame, uma pequena incisão foi feita na extremidade da cauda dos animais e 5 μ l de sangue foram coletados com o auxílio de uma micropipeta (Thermo Scientific, volume de coleta de 2-20 μ l). A amostra coletada foi colocada entre lâmina e lamínula (22x22mm) e a contagem dos parasitos feita em 50 campos aleatórios em aumento de 400x em microscópio óptico, conforme descrito por Brener (1962).

4.5.7 Avaliação da presença de parasitos no conteúdo intestinal de ninfas recém alimentadas em camundongos infectados em diferentes momentos da infecção

A procura por parasitos foi também realizada no conteúdo intestinal de ninfas recém alimentadas em camundongos com diferentes tempos de infecção. Para isso, quatro camundongos foram infectados individualmente a partir da picada de uma ninfa infectada conforme descrito no item 4.5.4. No dia da infecção do roedor e nos dias 1, 7, 15 e 30 após a infecção, vinte ninfas de 5 $^{\circ}$ estágio não infectadas e com jejum de 30 dias foram individualmente colocadas para se alimentar nos animais infectados. Finalizado o repasto sanguíneo, os insetos foram imobilizados e o sangue ingerido foi coletado com o auxílio de uma seringa de 1ml contendo uma agulha com o diâmetro 13 x 0,45mm. Cinco microlitros da amostra coletada foram transferidos para lâmina e lamínula

(22x22mm), onde foram contados 50 campos aleatórios em aumento de 400x em microscópio óptico, conforme descrito por Brener (1962).

4.6 Análise estatística

O número de parasitos presentes nas glândulas salivares dos insetos alimentados e em jejum através da contagem em câmara de Neubauer e quantificação por qPCR foram comparados pelo Teste T. O nível de significância considerado foi de $p < 0,05$. A quantidade de parasitos no trato intestinal de ninfas alimentadas em camundongos com diferentes períodos de infecção foi comparada entre ensaios e entre dias de infecção. A normalidade dos dados foi avaliada pelo teste Shapiro-Wilk's W. As variáveis foram comparadas pelos testes não-paramétricos de Mann-Whitney e de Kruskal-Wallis, identificando-se no caso do Kruskal-Wallis, os grupos responsáveis pelas diferenças através do teste de Mann-Whitney com correção de Bonferroni. O nível de significância utilizado para os testes foi de $p < 0,05$. Quando da correção de Bonferroni, as diferenças significativas foram consideradas com $p < 0,005$. A correção de Bonferroni foi descrita de acordo com o Biostatistical Analysis, 4^o edição.

5. RESULTADOS

5.1 Avaliação da transmissão do *T. rangeli* de insetos infectados para insetos não infectados durante o comportamento de hemolinfagia

Para avaliar a importância da transmissão do *T. rangeli* entre insetos através do comportamento de hemolinfagia, foram desenvolvidos dois ensaios. Inicialmente, a motivação de ninfas controles para alimentarem-se em um co-específico alimentado e infectado foi avaliada. Das 20 ninfas avaliadas em dois diferentes ensaios, apenas uma (5%) tentou realizar o repasto na ninfa infectada dentro do período de 10 minutos de observação. Nesta ninfa, não foi observado um aumento visual do volume do abdome, indicativo de ingestão, tendo a ninfa permanecido com a probóscide em contato com a fonte alimentar por 2 minutos e 47 segundos.

A transmissão do *T. rangeli* entre os insetos foi avaliada em ensaios em que insetos controles eram mantidos com ninfas infectadas por um período de 15 dias. Entre todos os ensaios (cinco repetições), um total de 50 ninfas foram mantidas com insetos infectados. Os exames do trato intestinal foram realizados após a muda para o 3º estágio, sendo que nenhum dos insetos analisados se mostrou infectado pelo parasito.

5.2 Avaliação da transmissão do *T. rangeli* de insetos infectados para insetos não infectados durante o repasto sanguíneo em camundongos saudáveis

Para avaliar se o vertebrado poderia funcionar como um “hospedeiro paratênico” da infecção pelo *T. rangeli*, ninfas infectadas e não infectadas foram liberadas em um aparato dividido em dois setores (de modo que não houvesse contato entre os insetos) para se alimentarem em um camundongo saudável. Das cinco ninfas que realizaram repasto em conjunto com as ninfas infectadas, todas apresentaram parasitos no intestino, sendo detectados no máximo cinco parasitos por campo durante a realização dos exames. Ensaios pilotos onde duas ou cinco ninfas controles foram colocadas para alimentarem-se no camundongo juntamente com uma ninfa infectada mostraram taxas de infecção de 100% e de 60%, respectivamente (dados não mostrados).

5.3 Estimativa do número de parasitos liberados por ninfas de *R. prolixus* infectadas por *T. rangeli* durante o repasto sanguíneo em camundongos

O número médio de parasitos presentes nas glândulas salivares de ninfas de *R. prolixus* em jejum e alimentadas está mostrado na tabela 1. Da mesma forma que o observado nas avaliações do conteúdo intestinal, o número de parasitos nas glândulas salivares foi muito variável entre os insetos, o que foi confirmado através das duas metodologias utilizadas. Mesmo assim, foi possível observar uma redução significativa no número de parasitos presentes nas glândulas salivares de insetos que realizaram o repasto sanguíneo (Tabela 1, Teste t, $p=0,0012$ e $p=0,0011$ para câmara de Neubauer e qPCR, respectivamente). A redução observada através da contagem na câmara de Neubauer foi de 4,1 vezes enquanto a obtida através da qPCR foi de 3,1 vezes.

Tabela 1. Número de parasitos presentes na glândula salivar (GS) de ninfas de 5° estágio de *R. prolixus* em jejum e alimentadas, após 45 dias de infecção por *T. rangeli* (parasitos - Câmara de Neubauer e cópias de DNA/ μ l - qPCR). Os valores correspondem a média \pm desvio padrão.

Método de Quantificação	Ninfas em jejum (n=11)	Ninfas alimentadas (n=11)	Razão Ninfas em jejum/Ninfas alimentadas	p-value
Câmara de Neubauer (número de parasitos/ μ l)	$7,1 \times 10^4 \pm 4,0 \times 10^4$	$1,7 \times 10^4 \pm 1,4 \times 10^4$	4,1	Teste t $p=0,0012$
qPCR (número de cópias do gene sno-RNA-CL1/ μ l)	$11,4 \times 10^4 \pm 6,4 \times 10^4$	$3,6 \times 10^4 \pm 2,7 \times 10^4$	3,1	Teste t $p=0,0011$

5.4 Avaliação da capacidade de camundongos de transmitirem o *T. rangeli* para triatomíneos durante diferentes momentos da infecção

A avaliação da transmissão do parasito de camundongos infectados para ninfas controles em diferentes fases da infecção foi realizada em três ensaios distintos. No total, 31 roedores receberam a picada de uma ninfa infectada, e destes, 28 (90,3%) se infectaram pelo *T. rangeli*. A infecção foi confirmada através do exame do conteúdo intestinal de ninfas alimentadas nos animais e/ou após a realização de hemocultura.

Somando-se os três ensaios, dos 288 insetos que se alimentaram nos camundongos infectados, 207 (71,8%) apresentaram parasitos no trato intestinal. Dez insetos (4,8%) que foram positivos para infecção intestinal, também apresentaram parasitos na hemolinfa. Os triatomíneos que apresentaram hemolinfa positiva, não tiveram seus intestinos dissecados para verificação da positividade, a fim de aumentar o tempo da infecção dos mesmos e verificar após 40 dias se exibiriam parasitos nas glândulas salivares. Em nenhum dos insetos foi observada a presença de parasitos na glândula salivar.

O objetivo inicial do estudo era unicamente determinar a presença do parasito no conteúdo intestinal dos insetos. Sendo assim, no primeiro ensaio realizado o número de parasitos não foi quantificado, mas estimado de acordo com cruces. Nesse ensaio foram avaliados 12 camundongos e 108 ninfas. As taxas de infecção das ninfas variaram de 70 a 90% nos diferentes períodos pós-infecção avaliados (Figura 5). Interessantemente, o número de parasitos presentes no conteúdo intestinal por campo avaliado, foi gradualmente aumentando naqueles insetos que se alimentaram nos camundongos com infecções mais antigas (Figura 5, cruces acima das barras).

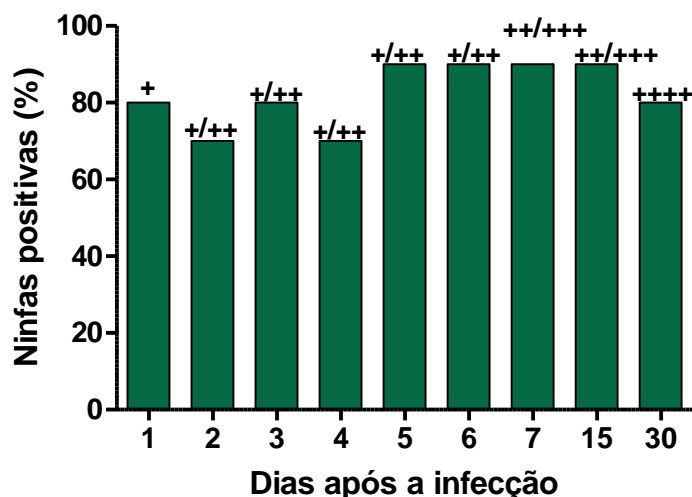


Figura 5. Taxas de infecção de ninfas de 5º estágio de *R. prolixus* alimentadas em camundongos infectados pelo *T. rangeli* em diferentes dias após infecção. As cruces acima das barras representam a quantidade estimada de epimastigotas encontrados no trato intestinal dos insetos, onde + = 1 a 5 parasitos / campo; ++ = 6 a 10 parasitos / campo; +++ = 11 a 50 parasitos / campo; ++++ = > 100 parasitos / campo (1º ensaio).

Ao determinar a positividade intestinal das ninfas (n=108) que se alimentaram em camundongos infectados, verificou-se que 34 (31,4%) apresentaram resultados negativos. Destas, 27 (79,4%) se alimentaram em três dos 12 camundongos utilizados. Estes animais foram submetidos à realização de hemocultura para verificação da positividade. Foi observado que apenas um (33%) roedor apresentou resultado positivo através da técnica utilizada.

Uma vez que aparentemente a carga parasitária dos insetos aumentou de acordo com o tempo de infecção em que se encontrava o camundongo no dia do repasto, o ensaio foi repetido para que o número de epimastigotas presentes no trato intestinal dos insetos pudesse ser quantificado.

O segundo ensaio foi realizado com 9 camundongos e 90 ninfas. Todos os camundongos utilizados foram capazes de transmitir o parasito em algum momento da infecção. Do total de ninfas avaliadas, nove morreram antes do exame e foram excluídas da amostragem. Das ninfas vivas, 72 (88,8%) estavam positivas. As taxas de infecção das ninfas ficaram semelhantes às obtidas no ensaio anterior, variando entre 77,7 e 100% nos diferentes dias de avaliação, inclusive naqueles camundongos avaliados 126 dias após a infecção (Figura 6).

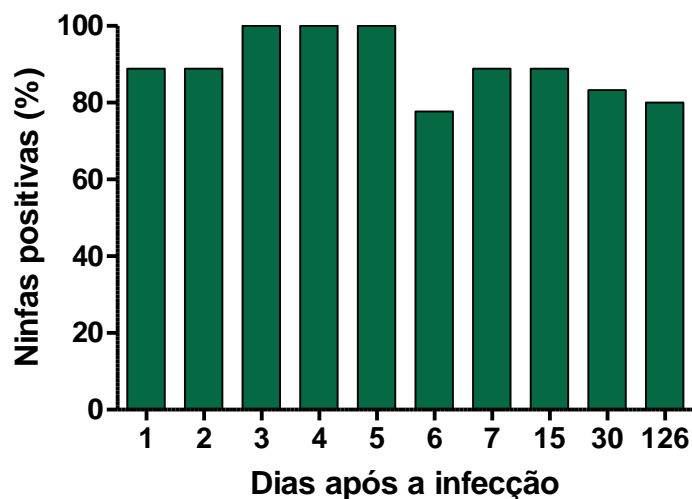


Figura 6. Taxas de infecção de ninfas de 5º estágio de *R. prolixus*, alimentadas em camundongos infectados pelo *T. rangeli* em diferentes dias após infecção (2º ensaio).

O número de parasitos encontrados no trato intestinal dos insetos positivos foi bastante variável e não foi estatisticamente diferente entre os diferentes dias de infecção dos camundongos (Figura 7, Kruskal-Wallis, n.s.).

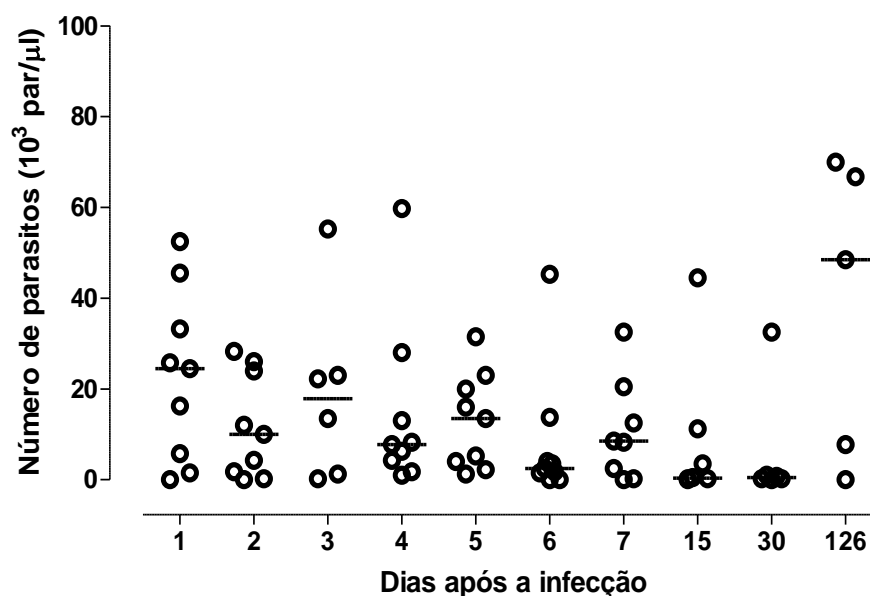


Figura 7. Número de epimastigotas encontrados no trato intestinal de ninfas de 5º estágio de *R. prolixus* alimentadas em camundongos infectados pelo *T. rangeli* em diferentes dias após infecção dos camundongos, por meio de contagem em câmara de Neubauer. Os traços horizontais representam o valor da mediana obtido para cada grupo avaliado (2º ensaio).

Uma vez que não foi verificado o aumento no número de parasitos no intestino dos insetos como observado no primeiro ensaio, uma terceira repetição foi realizada para a confirmação dos resultados. Entretanto, a cepa utilizada para o início da infecção foi mantida em LIT por pelo menos 30 dias. Nesse ensaio foram utilizados 10 camundongos e 90 ninfas. Da mesma forma que o observado para o ensaio anterior, todos os camundongos transmitiram o *T. rangeli* em algum dos períodos avaliados. Nove ninfas morreram e foram excluídas da amostra. Das ninfas que permaneceram vivas até o final do experimento, 61 (75%) se infectaram com o parasito. As ninfas que não adquiriram a infecção foram mais encontradas nos grupos que se alimentaram em camundongos com 1 e 30 dias após infecção, particularmente no último, onde nenhuma ninfa foi positiva (Figura 8). No restante dos dias avaliados, as taxas de infecção foram semelhantes às observadas nos outros ensaios (Figura 9).

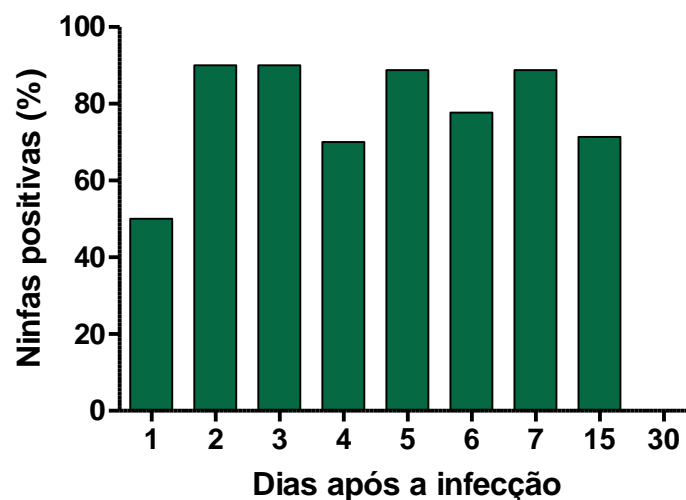


Figura 8. Taxas de infecção de ninfas de 5º estágio de *R. prolixus*, alimentadas em camundongos infectados pelo *T. rangeli* em diferentes dias após infecção (3º ensaio).

Apesar da grande variabilidade encontrada na quantidade de parasitos entre os insetos avaliados, o número de epimastigotas no trato intestinal das ninfas foi significativamente diferente entre os diferentes dias de infecção dos camundongos (Figura 9, Kruskal Wallis, $p < 0,0001$). Os insetos que se alimentaram nos camundongos

com 1, 15 e 30 dias após infecção apresentaram um número menor de parasitos no seu trato intestinal (Figura 9, Mann-Whitney com correção de Bonferroni, $p < 0,0001$ para todas as comparações).

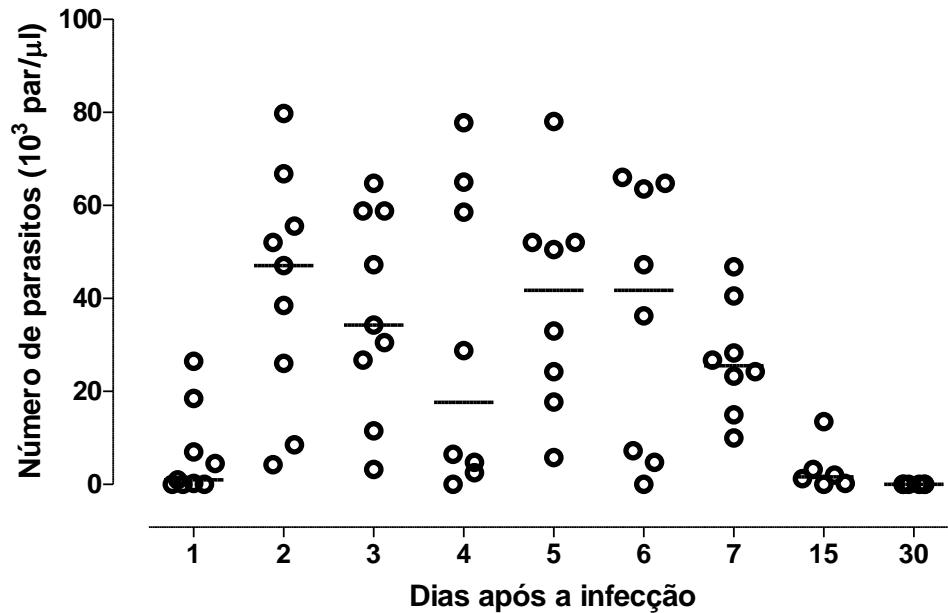


Figura 9. Número de epimastigotas encontrados no trato intestinal de ninfas de 5º estágio de *R. prolixus* alimentadas em camundongos infectados pelo *T. rangeli* em diferentes dias após infecção dos camundongos, por meio de contagem em câmara de Neubauer. Os traços horizontais representam o valor da mediana obtido para cada grupo avaliado (3º ensaio).

5.5 Avaliação da presença de parasitos na circulação sanguínea de camundongos durante diferentes momentos da infecção

O número de parasitos circulantes nos camundongos infectados através da alimentação de uma ninfa infectada foi avaliado nos dias 1-7, 15 e 30 após a infecção. Foram avaliados 24 camundongos e destes, apenas dois (8%) apresentaram parasitos no sangue periférico. Além disso, foram detectados no máximo três parasitos por campo dentre os cinquenta campos examinados sendo todos os flagelados detectados nos primeiros sete dias de infecção.

5.6 Avaliação da presença de parasitos no conteúdo intestinal de ninfas recém alimentadas em camundongos infectados

O número de parasitos presentes no conteúdo intestinal de ninfas recém-alimentadas em camundongos infectados foi avaliado em ninfas que se alimentaram em animais com 1, 7, 15 e 30 dias de infecção. Dos 20 insetos examinados, somente um (5%) apresentou parasitos no conteúdo recém-ingerido durante o repasto sanguíneo. O número de parasitos encontrados nesse inseto foi de 1 parasito dentre os 50 campos examinados.

6. DISCUSSÃO

A infecção pelo *T. rangeli* foi inicialmente descrita por Tejera em 1920 e desde então uma série de trabalhos vem estudando as interações do parasito com seus hospedeiros. Apesar de muitos trabalhos terem sido desenvolvidos tanto através de pesquisa em modelos naturalmente infectados quanto em experimentos em laboratório, ainda existem várias lacunas no conhecimento do ciclo do parasito em ambos hospedeiros vertebrados e invertebrados.

A questão mais relevante e ainda sem compreensão está relacionada ao desenvolvimento do *T. rangeli* no hospedeiro vertebrado. Até o presente momento, não se sabe como o parasito se mantém nestes hospedeiros uma vez que não se encontram formas multiplicativas do parasito nem na circulação sanguínea como ocorre para *T. brucei* (Welburn *et al.*, 1989) e *T. conorhini* (Donovan, 1909), nem formas replicativas intracelulares como as observadas em *T. cruzi* (Chagas, 1909) e *Leishmania* spp. (Cunha e Chagas, 1937). Apesar disso, o *T. rangeli* é amplamente encontrado na natureza (Miles *et al.*, 1983; Maia da Silva *et al.*, 2004a, b), infectando diversas espécies de triatomíneos e uma ampla gama de mamíferos (Steindel *et al.*, 1991; Ramirez *et al.*, 2002; Gurgel-Goncalves *et al.*, 2004; Maia da Silva *et al.*, 2007).

A infecção natural pelo *T. rangeli* no hospedeiro invertebrado normalmente apresenta o seu desenvolvimento completo (intestino, hemolinfa e glândulas salivares) nas espécies do gênero *Rhodnius*, sendo que nos outros gêneros parece estar restrita ao trato intestinal dos insetos. Isolados de *T. rangeli* de diferentes origens geográficas mostram comportamentos variáveis em diferentes espécies de *Rhodnius*, sendo que a transmissão pela picada parece ser restrita às espécies vetoras locais, sugerindo uma relação evolutiva muito próxima entre isolados de *T. rangeli* e seus vetores simpátricos (D'Alessandro e Saravia 1999; Guhl e Vallejo 2003; Vallejo *et al.*, 2003; De Stefani Marquez *et al.*, 2006). Análises filogeográficas e moleculares demonstraram haver uma congruência entre as linhagens de *T. rangeli* e os complexos das espécies de *Rhodnius*. Esses estudos corroboraram com a ideia de uma longa coexistência dos parasitos e seus vetores, com divergências de linhagem associadas com espécies simpátricas de *Rhodnius* sem associação particular com espécies de hospedeiros vertebrados (Maia da Silva *et al.*, 2007). Esta possível relação evolutiva entre o *T. rangeli* e seus hospedeiros invertebrados associados com uma possível ausência de multiplicação do parasito no

hospedeiro vertebrado, sugeriria a existência de formas alternativas de transmissão, além da conhecida ingestão de parasitos durante o repasto sanguíneo no vertebrado.

O comportamento de hemolinfagia tem sido descrito para diferentes espécies de triatomíneos, dentre elas, *P. megistus* (Machado, 1914; Brumpt, 1914; Dias, 1936), *T. infestans* (Brumpt, 1914; Phillips, 1960; Alves *et al.*, 2011), *Triatoma chagasi* (Brumpt, 1914), *R. prolixus* (Brumpt, 1914; Pifano *et al.*, 1948; Añez, 1982), *Triatoma phyllosoma*, *Triatoma pallidipennis*, *Triatoma longipes*, *Triatoma quasayana* (Ryckman, 1951), *Triatoma proctata* e *Triatoma maculata* (Phillips, 1960). Embora haja evidências da ocorrência do comportamento em situações naturais, a hemolinfagia ocorre principalmente nos primeiros estádios ninfais quando os insetos estão sob estresse nutricional e com isso, realizariam o comportamento de modo a garantir sua sobrevivência até conseguirem realizar a alimentação convencional. Além disso, acredita-se que os insetos que realizam esse comportamento podem ter conservado ao longo de sua evolução alguns de seus hábitos entomófagos (Brumpt, 1914). Alguns trabalhos mostraram a transmissão do *T. cruzi* de ninfas infectadas para ninfas controle (Brumpt, 1914; Dias, 1936; Marinkelle, 1965; Schaub, 1988). A transmissão do *T. rangeli* através do comportamento de hemolinfagia foi relatada por Añez (1982) utilizando como fonte alimentar ninfas de 5º estágio de *R. prolixus* e *R. robustus* infectadas e como ninfas testes, ninfas de 1º estágio de *R. prolixus*. Com base nestes trabalhos, o primeiro objetivo do presente estudo foi avaliar as taxas de transmissão da cepa Choachi de *T. rangeli* entre ninfas de *R. prolixus* através do comportamento de hemolinfagia. Foram avaliadas a motivação dos insetos para realizarem o comportamento, bem como a porcentagem de insetos infectados pelo parasito em decorrência da hemolinfagia. Apenas uma ninfa, dentre 20 testadas, tentou picar a ninfa alimentada e infectada, não tendo sido observado o alargamento do abdome, o que indicaria ingestão. Esses dados corroboram com o trabalho de Pifano (1948) que também não observou realização de repasto entre ninfas de *R. prolixus*. O hábito de se alimentar de hemolinfa de outros insetos provavelmente foi herdado dos ancestrais predadores dos triatomíneos, sendo que vários autores já demonstraram a ocorrência da hemolinfagia ocorrendo entre triatomíneos e outros artrópodes, como *T. rubrovaria* e larvas de abelhas ou aranhas (Abalos e Wygodzinsky 1951), *E. mucronatus* e aranhas (Miles *et al.*, 1981), *B. herreri* e baratas (Sandoval *et al.*, 2004) e *T. pseudomaculata* e baratas (Pontes *et al.*, 2011). Na natureza onde a oferta de sangue é ocasional, é bastante provável que os triatomíneos utilizem-se do comportamento de hemolinfagia como uma

maneira de sobreviver nos períodos de escassez nutricional. A baixa motivação em realizar a hemolinfagia observada no presente estudo poderia ser decorrente de um tempo de jejum insuficiente, uma vez que o *R. prolixus* é capaz de sobreviver até três meses sem se alimentar (Friend e Smith, 1985). Por essa razão, para avaliar a transmissão do *T. rangeli* entre ninfas de *R. prolixus*, ninfas controles (com jejum de 20 dias) e infectadas (alimentadas) foram mantidas juntas por 15 dias. Entretanto, nem um estresse nutricional prolongado promoveu a transmissão do parasito, já que nenhuma ninfa apresentou parasitos no conteúdo intestinal no final do experimento. Esses dados corroboram com os resultados de Marinkelle (1965) que não observou transmissão do parasito ao expor 1.000 ninfas de *R. prolixus* a 15 triatomíneos infectados por um período de 15 dias. Sendo assim, a transmissão do *T. rangeli* entre ninfas, através do comportamento de hemolinfagia, não parece ter um papel relevante na circulação do parasito na natureza, uma vez que, mesmo quando relatada a ocorrência de transmissão, as taxas observadas são relativamente baixas (Añez, 1982).

Outra forma alternativa de transmissão do *T. rangeli* seria a transferência de parasitos de um inseto infectado para outro saudável no momento em que ambos realizam o repasto sanguíneo em um hospedeiro vertebrado sadio. Esse tipo de transmissão já foi relatada por Tobie (1961) e Cuba Cuba (1972), apesar das condições experimentais não terem sido claramente descritas. Sendo assim, no presente estudo foram realizados cinco ensaios diferentes em que uma ninfa não infectada e outra infectada eram simultaneamente alimentadas em um camundongo anestesiado não infectado. Nos ensaios, as ninfas foram separadas fisicamente para que não houvesse a possibilidade de ocorrência de cleptohematofagia (alimentação do sangue ingerido), comportamento frequentemente observado na rotina de alimentação do laboratório. Nessas condições, todas as ninfas apresentaram parasitos no conteúdo intestinal depois de um período de 21 dias. As taxas de infecção se mantiveram altas mesmo quando duas ou cinco ninfas saudáveis foram colocadas juntas com uma ninfa infectada. Esses dados sugerem fortemente que esta forma de transmissão deve ter um papel relevante na manutenção do *T. rangeli* na natureza. Os triatomíneos são insetos oportunistas, adaptados a alimentações ocasionais. Os ninhos de mamíferos e aves, refúgios normalmente utilizados por triatomíneos, são locais de ocupação temporária, dependendo geralmente da oferta de alimentos na redondeza, e se mantendo pelo tempo de criação dos filhotes (Figueira *et al.*, 2006). A presença de um vertebrado mesmo que transitória, garantiria a transmissão do parasito entre os insetos de uma colônia, em

situações em que não haja hospedeiros habitando permanentemente os refúgios. É importante ressaltar que a transmissão só foi avaliada em camundongos, sendo necessário um estudo mais detalhado utilizando-se outros vertebrados como modelo (ex. aves e répteis) para uma melhor compreensão da dinâmica deste tipo de transmissão.

De acordo com os resultados obtidos no presente estudo, uma vez que um hospedeiro mamífero funcione como fonte alimentar para um triatomíneo com glândulas salivares contendo formas infectantes do *T. rangeli*, a probabilidade de o mesmo adquirir a infecção é bastante alta. Sabe-se que a salivação de *R. prolixus* ocorre durante todas as fases do processo alimentar (Soares *et al.*, 2006) e que cerca de 40% da saliva que foi previamente produzida e estocada é liberada durante a alimentação (Paim R., comunicação pessoal). Entretanto, ainda não se sabe a quantidade de tripomastigotas de *T. rangeli* que são liberados durante a alimentação. A quantificação exata do número de parasitos liberados durante a alimentação é difícil de ser obtida e necessita de técnicas de microscopia e de biologia molecular cujo período de padronização não seria compatível com uma dissertação de mestrado. Sendo assim, no presente estudo foi realizado um ensaio para avaliar estimativamente a quantidade de parasitos que são inoculados durante um repasto sanguíneo. Como tanto a quantidade de tripomastigotas existentes nas glândulas salivares, quanto o tempo de alimentação (que vai interferir na quantidade de saliva liberada) são variáveis entre os insetos, o desvio padrão obtido nas duas metodologias utilizadas foi bastante elevado. Mesmo assim, foi possível demonstrar uma redução significativa no número de parasitos naqueles insetos que realizaram o repasto sanguíneo. A contagem na câmara de Neubauer mostrou que pelo menos 50.000 tripomastigotas metacíclicos são liberados por cada microlitro de saliva durante o processo alimentar de uma ninfa infectada.

A transmissão destes parasitos adquiridos pelos camundongos para insetos saudáveis também se mostrou bastante relevante, uma vez que mais de 70% das ninfas que se alimentaram nos camundongos infectados apresentaram parasitos no trato intestinal 21 dias após a alimentação. Dentro deste período, 4,8% das ninfas também apresentaram parasitos na hemolinfa. Mesmo com o breve período de infecção, as porcentagens de insetos infectados com parasitos também na hemolinfa estão de acordo com o descrito na literatura, onde podem variar de 2 a 50% (Marinkelle, 1968, Tobie, 1965, 1970; Añez *et al.*, 1987; Hecker *et al.*, 1990). A invasão da hemolinfa pelos parasitos presentes no trato intestinal parece ocorrer ao acaso, não tendo sido estabelecido, até o momento, um período mínimo para que ocorra. Estudos mostram que

a invasão pode acontecer em algumas semanas após o início da infecção (Groot, 1954; Grewal, 1957; D'Alessandro, 1972), embora a mesma já tenha sido observada em apenas 24 horas após a realização da alimentação infectiva (Añez, 1980). Apesar de suficiente para a invasão da hemolinfa, o período de 21 dias provavelmente foi demasiado curto para que os flagelados alcançassem e invadissem as glândulas salivares, o que explicaria a ausência de tripomastigotas nas glândulas durante o exame dos insetos. Paim e colaboradores (2013) demonstraram que a colonização das glândulas salivares por parasitos inoculados diretamente na hemolinfa se inicia a partir do nono dia, sendo que somente 25 dias após a infecção, as taxas de infecção chegam próximas aos 100%.

Uma vez que, até o momento, os dados da literatura não suportam a existência de um ciclo de multiplicação do parasito no vertebrado (Molyneaux, 1973; Osório *et al.*, 1995; Tanoura *et al.*, 1999; Eger-Mangrich *et al.*, 2001), seria esperado que um mamífero que recebesse um único inóculo de parasitos, que de acordo com os presentes dados tende a ser bastante concentrado, fosse gradualmente perdendo a capacidade de infectar novas ninfas a medida que estes parasitos fossem sendo eliminados da circulação. Surpreendentemente, foram observadas taxas elevadas de infecção das ninfas, inclusive naquelas que se alimentaram em camundongos infectados há mais tempo. Em adição, uma avaliação estimativa apontou um provável aumento da carga parasitária nos insetos que se alimentaram em camundongos infectados há mais tempo. Esses resultados nos levaram a repetir o ensaio, incluindo a quantificação dos parasitos através da contagem em câmara de Neubauer. Foram feitas duas repetições subsequentes, a primeira com camundongos infectados nas mesmas condições que o ensaio inicial, ou seja, as ninfas que infectaram os animais foram previamente infectadas com parasitos recém isolados da passagem triatomíneo-camundongo. As taxas de infecção dos insetos no final da segunda repetição foram bastante semelhantes ao primeiro ensaio. Entretanto, a contagem dos parasitos no trato intestinal das ninfas positivas não confirmou o aumento observado no primeiro ensaio, o que pode ser decorrente dos diferentes métodos utilizados para a quantificação. A terceira repetição foi iniciada com ninfas previamente infectadas com parasitos que estavam sendo mantidos em meio de cultura há mais tempo. Aparentemente, esse fato teve um efeito relevante no desenvolvimento da infecção no camundongo, uma vez que as taxas de infecção, bem como a carga parasitária dos insetos que se alimentaram nesses animais foram reduzidas naqueles insetos que se alimentaram em camundongos com um dia de

infecção. Redução semelhante na carga parasitária foi observada para as ninfas que se alimentaram em camundongos com 15 dias de infecção. Entretanto, o que mais chamou a atenção, foi a ausência de infecção observada nos insetos que se alimentaram em camundongos com 30 dias de infecção. Já tem sido relatado na literatura que o *T. rangeli* necessita de passagens constantes pelos seus hospedeiros para que a sua infectividade seja mantida (Tobie, 1964; Vallejo *et al.*, 1986). Além disso, nosso grupo tem demonstrado que parasitos mantidos por mais do que dois meses em meio de cultura promovem infecções mais virulentas nos insetos, levando a aumentos relevantes nas taxas de mortalidade, atrasos no período intermuda, além da ocorrência de ecdises defeituosas que impedem o desenvolvimento dos insetos (Rodrigues *et al.*, 2011).

Entretanto, essa é a primeira vez em que foi possível demonstrar um efeito da manutenção do *T. rangeli* em meio de cultura no desenvolvimento da infecção no hospedeiro vertebrado, que aparentemente diminui sua capacidade de transmitir a infecção. A manutenção da cepa Choachi, multiclonal, em meio de cultura por longos períodos, provavelmente seleciona populações adaptadas ao crescimento no meio artificial, mas que não se desenvolvem eficientemente em hospedeiros vivos.

Muitos dos trabalhos que estudam o *T. rangeli* no hospedeiro vertebrado têm por objetivo localizar o parasito no vertebrado, através de testes diagnósticos (Paredes e Paredes, 1949; Groot *et al.*, 1950; Groot, 1954; Sandreuter-Herbig, 1957; Souza e Johson, 1971; Añez *et al.*, 1981; 1985; Steindel, 1993). Nesses estudos, entretanto, não existe o controle de como e quando a infecção teve início, nem quantas vezes o animal em estudo esteve exposto ao parasito. Nos estudos de laboratório que avaliam o desenvolvimento do parasito no mamífero, o início da infecção é normalmente feito através do inóculo de formas de cultura (Pífano, 1952; Sandreuter-Herbig, 1957) ou ainda, quando iniciado através da alimentação de insetos infectados, faltam informações precisas acerca da metodologia utilizada (Urdaneta-Morales e Tejero, 1985; Scorza; 1986; Osório *et al.*, 1995). Os resultados do presente estudo mostraram que quando a cepa Choachi é mantida circulando em seus hospedeiros, as taxas de infecção dos insetos alimentados em camundongos infectados há mais tempo (até 126 dias após a infecção) permaneceram altas. Uma possível explicação para esse encontro poderia ser uma maior quantidade de parasitos circulantes no vertebrado, obtida através das condições de infecção utilizadas, o que poderia ter levado a uma maior resistência dos parasitos, ou ainda, da possibilidade dessas formas se multiplicarem na corrente sanguínea, como ocorre com o *T. brucei* (Welburn *et al.*, 1989). Sendo assim, 24

camundongos tiveram amostras de sangue coletadas em diferentes dias pós infecção para a busca e quantificação de parasitos, mas em apenas 8% deles foram encontrados tripomastigotas sanguíneos. Nem mesmo as curvas de parasitemia tão bem descritas na literatura, com picos entre o terceiro e quinto dias (Sandreuter-Herbig, 1957; Tobie, 1961; Molineaux, 1973; Urdaneta Morales e Tejero, 1985) foram observadas. Análises posteriores de lâminas contendo amostras coradas por Giemsa também não mostraram, nos poucos parasitos visualizados, a presença de formas em divisão (dados não mostrados). Esses resultados sugerem fortemente que a aquisição dos parasitos pelos insetos não acontece em decorrência de uma elevada concentração de parasitos presentes na corrente sanguínea dos camundongos, nem mesmo no dia seguinte ao inóculo, onde esse número deveria estar ainda bastante elevado. Gordon e Lumsden (1939) já haviam demonstrado, avaliando a transmissão de microfilárias para mosquitos (*Culex molestus*, *Aedes aegypti* e *Anopheles maculipennis*), que a contagem de parasitos que se obtém de amostras a fresco normalmente não reflete a quantidade dos mesmos que é encontrada no trato intestinal dos insetos após a realização do repasto. No caso das filárias, o fato se deve a uma preferência de localização das mesmas nos vasos periféricos, que faz com que aqueles mosquitos que se alimentam desses locais apresentem um número maior de parasitos no conteúdo intestinal (Gordon e Lumsden, 1939). Outra hipótese para essa diferença poderia estar na existência de quimiotaxia pela saliva, como demonstrado por Strong (1934) para *Simulium* infectados por *Onchocerca volvulus*. Neste caso, mesmo com parasitemias sanguíneas escassas, a presença da saliva liberada pelo inseto durante a alimentação garantiria a ingestão de um número elevado de parasitos. Este fenômeno aparentemente não parece ter ocorrido no caso do *T. rangeli*, uma vez que a avaliação do intestino médio anterior de ninfas imediatamente após a ingestão do sangue contaminado não mostrou a ocorrência de parasitos em quantidade possível de ser detectada pela contagem de câmara de Neubauer. Entretanto, uma vez que a saliva dos triatomíneos, assim como a dos demais insetos hematófagos, possui um arsenal de moléculas com funções múltiplas (Ribeiro *et al.*, 2004) e já tem sido envolvida como facilitadora da transmissão de parasitos do inseto para o vertebrado, como para *Leishmania* (Cunha e Chagas, 1937) e para *T. cruzi*. (Cunha e Chagas, 1937), a existência de processos quimiotáticos no sentido inverso (vertebrado-inseto) não deve ser descartada e necessita ser melhor avaliada.

Apesar de não ter sido possível encontrar o *T. rangeli* em quantidades suficientes na corrente sanguínea do hospedeiro mamífero, mesmo sabendo-se da alta carga de

parasitos que é inoculada pelo inseto durante o repasto sanguíneo, os resultados do presente estudo demonstraram claramente que o parasito se mantém presente no hospedeiro vertebrado por longos períodos, sendo capaz de ser transmitido para insetos saudáveis. Esses dados sugerem fortemente a existência de um ciclo de desenvolvimento no vertebrado, ainda não descrito, o que inclusive, será um dos prosseguimentos do presente estudo. Além das promissoras perspectivas, o presente estudo adicionou relevantes informações ao ciclo de desenvolvimento do *T. rangeli*, buscando também contribuir para uma melhor compreensão dos processos de interação entre os parasitos e seus hospedeiros naturais.

7. CONCLUSÃO

- Ninfas saudáveis e em jejum de *R. prolixus* expostas a co-específicos alimentados e infectados, não apresentaram motivação significativa para realização do comportamento de hemolinfagia. Mesmo quando mantidos juntos por períodos prolongados, nenhum dos insetos saudáveis se infectou pelo *T. rangeli*;

- Ninfas saudáveis que foram colocadas para se alimentarem simultaneamente com ninfas infectadas num mesmo hospedeiro sadio, apresentaram taxas de infecção superiores a 60%;

- O número médio de parasitos presentes nas glândulas salivares foi bastante variável entre insetos infectados. Entretanto, foi possível demonstrar que ocorre uma elevada redução no número de tripomastigotas metacíclicos nas glândulas após o repasto sanguíneo. O número de parasitos liberados pode chegar a 50.000 por microlitro de saliva;

- As taxas de infecção de camundongos que foram expostos a uma única alimentação por uma ninfa de *R. prolixus* infectada foram bastante elevadas, ficando em torno de 90%;

- A transmissão do *T. rangeli* de camundongos infectados pela cepa Choachi, recém passada por triatomíneo-camundongo, para insetos saudáveis foi bastante elevada, independentemente do período pós infecção em que o animal se encontrava no momento da alimentação das ninfas;

- A transmissão do *T. rangeli* de camundongos infectados pela cepa Choachi mantida em meio de cultura para insetos saudáveis foi reduzida, como também foram reduzidas as cargas parasitárias nos insetos que se infectaram;

- O número de parasitos presentes na circulação sanguínea de camundongos infectados, bem como o número de parasitos presentes no intestino médio anterior de ninfas recém

alimentadas em camundongos infectados não foram suficientes para serem detectados através da contagem em câmara de Neubauer;

- Apesar do raro encontro de parasitos circulantes no hospedeiro mamífero, as altas taxas de infecção encontradas nas ninfas que se alimentaram nesses animais, mesmo naqueles infectados há mais tempo, sugerem fortemente a existência de um ciclo de desenvolvimento do *T. rangeli* em seu hospedeiro mamífero.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abad-Franch F, Monteiro FA 2007. Biogeography and evolution of Amazonian triatomines (Heteroptera: Reduviidae): implications for Chagas disease surveillance in humid forest ecoregions. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 10: 2-21.
- Abalos JW, Wygodzinsky P 1951. Las Triatominae Argentinas (Reduviidae, Hemiptera). San Miguel de Tucumán 178 p.
- Afchain DL, Fruit DJ, Capron A 1979. Antigenic make-up of *Trypanosoma cruzi* culture forms: Identification of a specific component. *J Parasitol* 65: 507-514.
- Ayala FM 1964. Presencia de un hemoflagelado semejante al *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920 en el mono *Saimiri boliviensis*, en la region amazonica, Peru. *Rev Inst Med Trop* 6: 47-50.
- Alves CL, Gontijo NF, Araújo RN, Pereira MP 2011. Caracterização de atividades salivares e intestinais relacionadas ao processo alimentar de *Triatoma infestans* Klug, 1834 (Hemiptera: Reduviidae) sobre hospedeiros invertebrados e vertebrados Universidade Federal de Minas Gerais. *Tese de Doutorado*. 164p.
- Añez N 1980. Early invasion of *Trypanosoma rangeli* into the haemolymph of *Rhodnius prolixus*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 74: 422 - 423.
- Añez N 1981c. Studies on *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920.II. Effect of *T.rangeli* on feeding behavior of Triatomine bugs. *Acta Trop* (in press).
- Añez N 1982. Studies on *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920. III. Direct transmission of *T. rangeli* between triatomine-bugs. *Ann Trop Med Parasitol* 76: 641-647.
- Añez N 1983. Studies on *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920. VI. Developmental pattern in the haemolymph of *Rhodnius prolixus*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 78: 413-419.

- Añez N 1985. Estudios sobre *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920: VIII. Respuesta a las reinfecciones en dos mamíferos. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 80: 149-153.
- Añez N 1984. Studies on *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920. VII – Its effect on the survival of infected triatomine bugs. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 79: 249-255.
- Añez N, Nieves E, Cazorla D 1987. Studies on *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920. IX. Course of infection in different stages of *Rhodnius prolixus*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 82: 1-6.
- Atella GC, Gondim KC, Masuda H 1995. Loading of lipophorin particles with phospholipids at the midgut of *Rhodnius prolixus*. *Arch Insect Biochem Physiol* 30: 337–350.
- Brener Z 1962. Therapeutic activity and criterion of cure in mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. *Rev Inst Med Trop* 4: 389-96.
- Brecher G, Wigglesworth VB 1944. The transmission of *Actinomyces rhodnii* Erikson in *Rhodnius prolixus* Stal (Hemiptera) and its influence on the growth of the host. *Parasitology* 35: 220-224.
- Brumpt E 1914. Importance du cannibalisme et de la coprophagie chez les Réduvidés hématophages (*Rhodnius*, *Triatoma*) pour la conservation des trypanosomes pathogènes en dehors de l'hôte vertébré. *Bull Soc Pathol Exot* 7: 702-705.
- Chagas C 1909. Nova tripanossomíase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanun cruzi* n. gen., m. sp., agente etiológico de nova entidade mórbida do homem. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1: 159-218.
- Coelho HSL, Atella GC, Moreira MF, Gondim KC, Masuda H 1997. Lipophorin density variation during oogenesis on *Rhodnius prolixus*. *Arch Insect Biochem Physiol* 35: 301–313.

- Coura JR, Fernandes O, Arboleda M, Barrett TV, Carrara N, Degrave W, Campbell DA 1996. Human infection by *Trypanosoma rangeli* in Brazilian Amazon. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 90: 278-279.
- Coura JR, Pereira JB 2010. Chagas disease: 100 years after its Discovery. A systemic review. *Acta Trop* 115: 5-13.
- Cuba CA, Morales N, Fernandez E, Fernandez W 1972. Hallazgo de *Rhodnius ecuadoriensis* naturalmente infectado por tripanosomas semejantes *Trypanosoma rangeli* em Cascas, Contumazá, Cajamarca. Livro de Resúmenes Del III Congreso Peruano de Microbiología y Parasitología, 1970.
- Cuba CA 1975. Estudo de uma cepa peruana de *Trypanosoma rangeli*.VI – Observações sobre sua evolução e morfogênese na hemocele e nas glândulas salivares de *Rhodnius ecuadoriensis*. *Rev Inst Med Trop* 17: 283-297.
- Cuba CA 1998. Revisión de los aspectos biológicos y diagnósticos del *Trypanosoma* (Herpetosoma) *rangeli*. *Rev Soc Bras Med Trop* 31: 207-220.
- Cunha AM, Chagas E 1937. Nova espécie de protozoário do gênero *Leishmania* patogênico para o homem. *Leishmania chagasi*, n.sp. Nota prévia. *Hospital* 11: 48-152.
- D'Alessandro A 1972. New experimental vectors of Colombian *Trypanosoma rangeli*. *J Med Entomol* 9: 187-195.
- D'Alessandro A 1976. Biology of *Trypanosoma* (Herpetosoma) *rangeli* Tejera, 1920, in: Lumsden, WHR e Evans DA (eds.), *Bio Kinetoplastid* 1: 328-403.
- D'Alessandro-Bacigalupo A, Saraiva NG 1992. *Trypanosoma rangeli*, in: Kleir JP e Baker J (eds.) *Parasitic Protozoa* 2: 1-54.

- D'Alessandro A, Saraiva NG 1999. *Trypanosoma rangeli*, in: Gilles HM (Ed), *Protozool Diseases*, 398-412.
- Deane LM 1958. Occurrence of *Trypanosoma rangeli* in opossums in the state of Para. *Ver Brasil Malariol* 10: 451-458. Deane LM 1964. Animal reservoirs of *Trypanosoma cruzi* in Brazil II. *Ver Brasil Malariol* 16: 27-48.
- Deane LM 1964. Mammalian Trypanosomidae from the Amazon Region of Brazil. III Direct blood examination and xenodiagnosis of wild animals from forests around Belem, Pará. *Ver Inst Med Trop* 6: 225-232.
- De Stefani Marquez D, Rodrigues-Ottaiano C, Monica Oliveira R, Pedrosa AL, Cabrine-Santos M, Lages-Silva E, Ramirez LE 2006. Susceptibility of different triatomine species to *Trypanosoma rangeli* experimental infection. *Vector-Borne Zoonot* 6: 50-56.
- Dias E 1936. IX Reunião da Soc Argentina Pat regional (M.E.P.R.A.), 1: 10-88.
- Dias E, Torrealba JF 1943. Verificação de flagelados semelhantes ao *Trypanosma rangeli*, Tejera 1920, em *Rhodnius prolixus* alimentados em caso de doença de Chagas na Venezuela. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 39: 266-278.
- Dias JCP, Diotaiuti L 1998. Vetores secundários de la enfermedad de Chagas en el Brasil y perspectivas para su control. In: *Control de Tripanosomiasis Americana y Leishmaniosis: Aspectos Biológicos, Genéticos y Moleculares* (F. Guhl & C. A. Jaramillo, eds.), pp. 154-159.
- Dorn PL, Flores J, Brahney B, Gutierrez A, Rosales R, Rodas A, Monroy C 2001. Comparison of Polymerase Chain Reaction on Fresh Tissue Samples and Fecal Drops on Filter Paper for Detection of *Trypanosoma cruzi* in *Rhodnius prolixus*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 96: 503-505.

- Donovan 1909 citado por: Morishita, K 1935. An experimental study on the life history and biology of *Trypanosoma conorhini* (Donovan), occurring in the alimentary tract of *Triatoma rubrofasciata* (de Geer) in Formosa gap j. *Zool* 6: 459-465.
- Eger-Mangrich I, Grisard EC, Steindel M 1996. In vitro interaction of *Trypanosoma rangeli* with macrophages and Vero cells. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 91: 104.
- Eger-Mangrich I, Oliveira MA, Grisard EC, Souza W, Steindel M 2001. Interaction of *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920 with different cell lines in vitro. *Parasitol Res* 87: 505-509.
- Eichler Schaub GA 1998. The effects of aposymbiosis and of an infection with *Blastocrithidia triatomae* (Trypanosomatidae) on the tracheal system of the reduviid bugs *Rhodnius prolixus* and *Triatoma infestans*. *J Insect Physiol* 44: 131-140.
- Eichler S, Schaub GA 2002. Development of symbionts in triatomine bugs and the effects of infections with trypanosomatids. *Exp Parasitol* 100: 17-27.
- Ferreira LL, Lorenzo MG, Elliot SL, Guarneri AA 2010. A standardizable protocol for infection of *Rhodnius prolixus* with *Trypanosoma rangeli*, which mimics natural infections and reveals physiological effects on infection upon the insect. *J Invert Pathol* 105: 91-97.
- Ferreira RC, Ferreira AM, Guarneri AA 2011. Triatomine-trypanosoma interaction: Do *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* colonize the *Rhodnius prolixus* anterior midgut? In: XXVII Annual Meeting of the Brazilian Society of Protozoology; XXXVIII Annual Meeting on Basic Research on Chagas Disease p. 211.
- Figueira JEC, Cintra R, Viana LR, Yamashita C 2006. Spatial and temporal patterns of bird species diversity in the Pantanal of Mato Grosso, Brazil: implications for conservation. *Braz J Bio* 66: n^o. 2.

- Folly E, Cunha e Silva N, Lopes ACS, Silva-Neto M, Atella GC 2003. *Trypanosoma rangeli* uptakes the main lipoprotein from the hemolymph of its invertebrate host. *Biochem Biophys Res Commun* 310: 555–561.
- Friend WG, Smith JJB, 1985. Factores biológicos y ecológicos en la enfermedad de Chagas, in: R.U. Carcavallo, J.E. Rabinovich, R.J. (eds.), *Epidemiologia. Vetores*. Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud pp. 55-72.
- Galvão C, Carcavallo R, Rocha DS, Jurberg J 2003. A checklist of the current valid species of the subfamily Triatominae Jeannel, 1919 (Hemiptera, Reduviidae) and their geographical distribution, with nomenclatural and taxonomic notes. *Zoot* 202:1-36.
- Gamboa JC 1963. Comprobación de *Rhodnius prolixus* extradomiciliário em Venezuela. De La División de Endemias Rurales, Dirección de Malariología y Saneamiento Ambiental, Ministerio de Sanidad y Asistencia p.18-25.
- Garcia ES, Mello CB, Azambuja P, Ribeiro JM 1994. *Rhodnius prolixus*: Salivary antihemostatic components decrease with *Trypanosoma rangeli* infection. *Exp Parasitol* 78: 287-293.
- Garcia ES, Machado EMM, Azambuja P 2004. Inhibition of hemocyte microaggregation reactions in *Rhodnius prolixus* larvae orally infected with *Trypanosoma rangeli*. *Exp Parasitol* 107: 31-38.
- Garcia ES, Castro DP, Figueiredo MB, Genta FA, Azambuja P 2009. *Trypanosoma rangeli*: a new perspective for studying the modulation of immune reactions of *Rhodnius prolixus*. *Parasit Vectors* 2: 33.
- Gomes SAO, Feder D, Thomas NES, Garcia ES, Azambuja P 1999. *Rhodnius prolixus* infected with *Trypanosoma rangeli*: *in vivo* and *in vitro* experiments. *J Invert Pathol* 73: 289-293.

- Gomes SAO, Graciano GL, Nogueira NFS, Souza W, Garcia ES, Azambuja P 2002. Effects of gamma irradiation on the development of *Trypanosoma rangeli* in the vector *Rhodnius prolixus*. *J Invertebr Pathol* 79: 86-92.
- Gomes SAO, Feder D, Azambuja P 2003. Suppression of the prophenoloxidase system in *Rhodnius prolixus* orally infected with *Trypanosoma rangeli*. *J Insect Physiol* 49: 829-837.
- Gordon RM, Lumsden WH 1939. A study of the behavior of the mouth-parts of mosquitoes when taking up blood from living tissue; together with some observations on the ingestion of microfilariae. *Trop Med S Parasitol* 33: 3-4.
- Gregório N, Ratcliffe NA 1991. The distribution of agglutinins and lytic activity against *Trypanosoma rangeli* and erythrocytes in *Rhodnius prolixus* and *Triatoma infestans* tissue extracts and haemolymph. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 86: 181-186.
- Grewal MS 1957. Pathogenicity of *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920 in the invertebrate host. *Exp Parasitol* 6: 123-130.
- Grisard EC, Campbell DA, Romanha AJ 1999. Mini-exon gene sequence polymorphism among *Trypanosoma rangeli* Strain isolated from distinct geographical regions. *Parasitology* 118: 375-382.
- Grisard EC, Stoco PH, Wagner G 2010. Transcriptomic analyses of the avirulent protozoan parasite *Trypanosoma rangeli*. *Mol Biochem Parasitol* 174: 18-25.
- Groot H, Renjifo S, Uribe C 1950. Nota preliminar sobre inoculación a un voluntario humano con *Trypanosoma* sp. (*ariari*). *Ann Soc Biol Bog* 4: 99-103.
- Groot H 1954. Estudios sobre los trypanosomas humanos (*T. rangeli* y *T. ariarii*). *Ann Soc Biol* 6: 109-126.
- Guhl F, Vallejo GA 2003. *Trypanosoma (Herpetosoma) rangeli* Tejera, 1920 – An Updated Review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 98: 435-442.

- Gurgel-Gonçalves R, Duarte MA, Ramalho ED, Romaña CA, Cuba CAC 2004. Distribuição espacial de populações de triatomíneos (Hemiptera, Reduviidae) em palmeiras da espécie *Mauritia flexuosa* no Distrito Federal, Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop* 37: 241-7.
- Harrington JS 1960. Studies in *Rhodnius prolixus*: growth and development of normal and sterile bugs, and the symbiotic relationship. *Parasitology* 50: 279-286.
- Hecker H, Schwarzenbach M, Rudin H 1990. Development and interactions of *Trypanosoma rangeli* in and with the reduviid bug *Rhodnius prolixus*. *Parasitology* 76: 311-318.
- Hudson L, Guhl F, Sanchez N, Bridge D, Jaramillo CA, Young A 1988. Longitudinal studies of the immune response of Colombian patients infected with *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli*. *Parasitology* 96: 449-460.
- Lake P, Friend WG 1967. A monoxenic relationship, *Nocardia rhodnii* Erikson in the gut of *Rhodnius prolixus* Stal (Hemiptera: Reduviidae). *P Entomol Soc* 98: 53-57.
- Lent H, Wygodzinsky P 1979. Revision of the Triatominae (Hemiptera, Reduviidae), and their significance as vectors of Chagas' disease. *Bull Am Mus Nat Hist* 163: 127-520.
- León JR 1946. Contribución al estudio de La Enfermedad de Chagas en Guatemala. Trab presentado I Congreso Inter Med. Poligrafiado 10.
- Levine ND, Corlissa JO, Cox EEG, Deroux G, Grain J, Honigberg BM 1994. A newly revised classification of the Protozoa. *J Protozoology* 27: 37-58.
- Lucena DT, Marques RJ 1954. Primeiro caso de infecção humana por *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920, no Brasil. *Rev Bras Med* 11: 535-540.

- Macedo AM, Vallejo GA, Chiari E, Pena SD 1993. DNA fingerprinting reveals relationships between strains of *Trypanosoma rangeli* and *Trypanosoma cruzi*. Em: Pena SD, Chakraborty R, Eppelen JT, Jeffreys AJ, editors. *DNA fingerprinting: state of the Science*. Basel, Switzerland: Birkhauser Verlag p.321-329.
- Machado PE, Eger-Mangrich I, Rosa G, Koerich LB, Grisard, EC, Steindel M 2001. Differential susceptibility of triatomines of the genus *Rhodnius* to *Trypanosoma rangeli* strains from different geographical origins. *Inter J Parasitol* 31: 632-634.
- Maia da Silva FM, Rodrigues AC, Campaner M, Takata CS, Brigido MC, Junqueira AC, Coura JR, Takeda GF, Shaw JJ, Teixeira MM 2004. Randomly amplified polymorphic DNA analysis of *Trypanosoma rangeli* and allied species from human, monkeys and other sylvatic mammals of the Brazilian Amazon disclosed a new group and a species-specific marker. *Parasitol* 128: 283–294.
- Maia da Silva FM, Junqueira F, Campaner AC, Rodrigues AC, Crisante G, Ramirez LE, Caballero ZC, Monteiro FA, Añez N, Teixeira MM 2007. Comparative phylogeography of *Trypanosoma rangeli* and *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae) supports a long coexistence of parasite lineages and their sympatric vector. *Mol Ecol* 16: 3361-3373.
- Marinkelle CJ 1965. Direct transmission of *Trypanosoma cruzi* between individuals of *Rhodnius prolixus* Stal. *Rev Biol Trop* 13: 55-58.
- Marinkelle CJ 1966. Observations on human, monkey and bat trypanosomes and their vectors in Colômbia. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 60: 109-116.
- Marinkelle CJ 1968. Pathogenicity of *Trypanosoma rangeli* for *Rhodnius prolixus* Stal in nature (Hemiptera: Reduviidae) (Kinetoplastida: Trypanosomatidae). *J Med Entomol* 5: 497-499.
- Marlière NP, Lorenzo MG, Guarneri AA 2010. The infection by *Trypanosoma rangeli* changes the shelter use behavior of *Rhodnius prolixus*. XXVI Annual Meeting of the

- Brazilian Society of Protozoology. XXXVII Annual Meeting on basic research in Chagas' Disease. p 259.
- Mello CB, Garcia ES, Ratcliffe NA, Azambuja P 1995. *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli*: Interplay with hemolymph components of *Rhodnius prolixus*. *J Invert Pathol* 65: 261-268.
- Mello CB, Nigam Garcia ES, Azambuja P, Newton RP, Ratcliffe NA 1999. Studies on a Haemolymph Lectin Isolated from *Rhodnius prolixus* and Its Interaction with *Trypanosoma rangeli*. *Exp Parasitol* 91: 289–296.
- Miles MA, Souza AA, Pova M 1981. Chagas' disease in the Amazon basin III. Ecotopes of ten triatomine bug species (Hemiptera: Reduviidae) from the vicinity of Belem, Pará State, Brazil. *J Med Entomol* 18: 266-278.
- Miles MA, Arias JR, Valente SAS, NAIF, Sousa AA, Pouda MM, Lima JAN, Cedillos RA 1983. Vertebrate hosts and vectors of *Trypanosoma rangeli* in the Amazon basin of Brazil. *Am J Trop Med Hyg* 32: 1251-1259.
- Molyneaux D 1973. Division of the human trypanosome, *Trypanosoma* (Herpetosoma) *rangeli*. *Am Trop Med Parasitol* 67: 371-372.
- Montero-Gei F, Alvarado-Cerdas E, Chinchila CM, Vargas RA 1961. Hallazgos de tripanosomas de tipo rangeli em marsupialis de Costa Rica. Prog Gen y Resum. Congreso Latinoamericano. Congreso Nacional de Microbiologia, p. 129.
- Morales AF 1964. Presence of a hemoflagellate similar to *Trypanosoma rangeli* in *Saimiri boliviensis* monkey on the Amazon Region, Peru. *Rev Inst Med Trop* 6: 47-50.
- Montero GF 1958. Trypanosomiasis *rangeli* em Costa Rica. In: Congreso Latinoamericano. Congreso Nacional de Microbiologia, p. 87.

- Montero-Gei F, Alvarado-Cerdas E, Chinchilla CM, Vargas RA 1961. Hallazgos de tripanosomas de tipo *rangeli* em marsupialis de Costa Rica. Prog Gen y Resum Trab 2 Congreso Latinoamericano. Congreso Nacional Microbiologia, p: 132.
- Morales AF 1964. Presence of a haemoflagellate similar to *Trypanosoma rangeli* in *Saimiri boliviensis* monkey of the Amazon Region, Peru. *Ver Inst Med Trop.* 6: 47-50.
- Morrone JJ 2006. Biogeographic areas and transition zones of Latin America and the Caribbean islands based on panbiogeographic and cladistic analyses of the entomofauna. *Ann Rev Entomol* 51: 467-494.
- Monroy C, Rodas A, Mejía M, Rosales R, Tabaru Y 2003. Epidemiology of Chagas Disease in Guatemala: Infection Rate of *Triatoma dimidiata*, *Triatoma nitida* and *Rhodnius prolixus* (Hemiptera, Reduviidae) with *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* (Kinetoplastida, Trypanosomatidae). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 98: 305-310.
- Noireau F, Fuente ALC, Lopes CM, Diotaiuti L 2005. Some considerations about the ecology of Triatominae. *Ann Ac Bras Ciências* 77: 3-9.
- Osório Y, Travi BL, Palma G, Saravia NG 1995. Infectivity of *Trypanosoma rangeli* in a promonocytic mammalian cell line. *J Parasitol* 81: 687-693.
- Paim RMM, Pereira MH, Araújo RN, Gontijo NF, Guarneri AA 2013. The interaction between *Trypanosoma rangeli* and the nitrophorins in the salivary glands of the triatomine *Rhodnius prolixus* (Hemiptera; Reduviidae). *Insect Biochem Mol Bio* 43: 229–236.
- Paredes CH, Paredes R 1949. Un caso de infección humana por *Trypanosoma rangeli*. *Rev Fac Med Bog* 18: 343-375.

- Peñalver LM 1959. Estado actual de la enfermedad de Chagas en Guatemala. In F Aguilar, *Homenaje al Cincuentenario del Descubrimiento de la Enfermedad de Chagas*, Ministerio de Salud, Guatemala, p: 32-52.
- Pereira MEA, Andrade AFB, Ribeiro JMC 1981. Lectins of distinct specificity in *Rhodnius prolixus* interact selectively with *Trypanosoma cruzi*. *Science* 211: 597-600.
- Phillips NR 1960. Experimental studies on the quantitative transmission of *Trypanosoma cruzi*: Considerations regarding the standardization of materials. *Ann Trop Med Parasitol* 54: 60-90.
- Pífano F, Mayer M, Medina R 1948. Primera comprobación de *Trypanosoma rangeli* en el organismo humano por cultivo de sangre periférica. *Arch Venez Pathol Trop Parasitol Med* 1: 135-152.
- Pífano CF 1954. Nueva trypanosomiasis humana de la región neotrópica producida por el *Trypanosoma rangeli*, com especial referência a Venezuela. *Arch Venezol Pathol Trop Parasitol Med* 2: 89-120.
- Pífano CF 1954. Parasitological diagnosis of Chagas Disease in the chronic phase. Comparative study of thick film, xenodiagnosis, blood culture and inoculation of susceptible animals. *Arch Venez Pathol Trop Med* 2: 121-156.
- Pineda V, Saldaña A, Monfante I, Santamaría A, Gottdenker NL, Yabsley MJ, Rapoport G, Calzada JE 2011. Prevalence of trypanosome infections in dogs from Chagas disease endemic regions in Panamá, Central América. *Vet Parasitol* 178: 360-363.
- Piñero DF, Torrealba JW 1977. Observaciones sobre *Rhodnius prolixus* (Hemiptera, Reduviidae) em su biótopo silvestre Copernicia tectorum. Boletín de La Dirección de Malariología y Saneamiento Ambiental. Vol.XVII, n°3.
- Pontes GB, Noireau F, Lorenzo MG 2011. Behavioral evidence of an ectoparasitic interaction between *Triatoma pseudomaculata* Corrêa e Espínola (Heteroptera:

- Reduviidae) and *Periplaneta Americana* (L.) (Blattodea: Blattidae). *Neo Entomol* 40: 6-10.
- Ramirez LE, Machado MI, Maywald PG, Matos A, Chiari E, Silva EL 1998. Primeira evidência de *Trypanosoma rangeli* no sudeste do Brasil, região endêmica para doença de Chagas. *Rev Soc Bras Med Trop* 31: 99-102.
- Ramirez LE, Lages-Silva E, Alvarenga-Franco F, Matos A, Vargas N, Fernandes O, Zingales B 2002. High prevalence of *Trypanosoma rangeli* and *Trypanosoma cruzi* in opossums and triatomids in a formerly-endemic area of Chagas disease in Southeast Brazil. *Acta Trop* 84: 89-98.
- Ratcliffe NA, Nigam Y, Mello CB, Garcia E, Azambuja P 1996. *Trypanosoma cruzi* and erythrocyte agglutinins: A comparative study of occurrence and properties in the gut and hemolymph of *Rhodnius prolixus*. *Exp Parasitol* 83: 83-93.
- Rey MH, Ucrós GH 1939. Nota preliminar sobre el hallazgo de *Trypanosoma Schizotrypanum cruzi* y del *Trypanosoma rangeli* en el *Rhodnius prolixus* en algunas regiones del oriente de Cundinamarca. *Ver Facultad Med* 8: 76-78.
- Ribeiro JMC, Andersen J, Silva-Neto MAC, Phama VM, Garfield MK, Valenzuela JG 2004. Exploring the sialome of the blood-sucking bug *Rhodnius prolixus*. *Insect Biochem Mol Bio* 34: 61-79.
- Rodrigues JO, Elliot SL, Filho OAM, Guarneri AA 2011. Temperature effects on growth of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* *in vitro*.? In: XXVII Annual Meeting of the Brazilian Society of Protozoology; XXXVIII Annual Meeting on Basic Research on Chagas Disease, p.58.
- Rudin W, Schwarzenbach M, Hecker H 1989. Binding of lectins to culture and vectors forms of *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920 (Protozoa, Kinetoplastida) and to structures of the vector gut. *J Protozool* 36: 532-538.
- Ryckman RE 1951. Recent observations of cannibalism in *Triatoma* (Hemiptera:

- Reduviidae). *J Parasitol* 37: 433-434.
- Saldaña A, Samudio F, Miranda A, Herrera LM, Savedra SP, Cáceres L, Bayard V, Calzada JE 2005. Predominance of *Trypanosoma rangeli* infection in children from a Chagas disease endemic area in the West-shore of the Panama Canal. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 100: 729-731.
- Sandoval CM, Duarte R, Gutierrez R, Rocha DS, Angulo VM, Esteban L, Reyes M, Jurberg J, Galvão C 2004. Feeding sources and natural infection of *Belminus herreri* (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 99: 137-140.
- Sandreuter-Herbig A 1957. Further Studies on *Trypanosoma rangeli* Tejera 1920. *Acta Trop* 14: 195-207.
- Schaub GA, Losh P 1988. *Trypanosoma cruzi*: origin of metacyclic trypomastigotes in the urine of the vector *Triatoma infestans*. *Exp Parasitol* 65: 174-186.
- Schofield CJ, Galvão C 2009. Classification, evolution, and species groups within the Triatominae. *Acta Trop* 110: 88–100.
- Schottelius J 1987. Neuraminidase fluorescent test for differentiation of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli*. *Trop Med Parasitol* 38: 323-327.
- Scorza C, Urdaneta-Morales S, Tejero F 1986. *Trypanosoma (Herpetosoma) rangeli* Tejera, 1920. Preliminary report hitopathology in experimentally infected mice. *Rev Inst Med Trop* 28: 371-378.
- Silva FA, Junqueira ACV, Campaner M, Rodrigues AC, Crisante G, Ramirez LE, Caballero ZCE, Monteiro FA, Coura JR, Añez N, Teixeira MMG 2007. Comparative phylogeography of *Trypanosoma rangeli* and *Rhodnius* (Hemiptera: Reduviidae) supports a long coexistence of parasite lineages and theirs sympatric vectors. *Mol Ecol* 16: 3361-3373.

- Snoeijer CQ, Picchin GF, Dambrós BP, Steindel M, Goldenberg S, Fragoso SP, Lorenzini DM, Grisard EC 2004. *Trypanosoma rangeli* Transcriptome Project: Generation and analysis of expressed sequence tags. *Kinetoplastid Biol Diseases* 3: 1-7.
- Soares AC, Carvalho-Tavares J, Gontijo NF, Santos VC, Teixeira MM, Pereira MH, 2006, Salivation pattern of *Rhodnius prolixus* (Reduviidae; Triatominae) in mouse skin. *J Insect Physiol* 52: 468-472.
- Souza OE 1966. *Trypanosoma rangeli* in Panamá. *Ann Rept Gorgas Men Lab.*, p. 16.
- Souza O E, Johson C M 1971. Frequency and distribution of *Trypanosoma rangeli* and *Trypanosoma cruzi* in the Republic of Panamá. *Am J Trop Med Hyg* 20: 405-410.
- Souza DE, Johnson CM 1974. Frequency and distribution of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* the Republic of Panamá. *Am J Trop Med Hyg* 20: 405-410.
- Souza MA, Fonseca TS, Santos BN, Pereira SPS, Carvalhal C, Moreno AMH 2008. *Trypanosma rangeli* Tejera, 1920, in cronic Chagas' disease patients under ambulatory care at the Evandro Chagas Clinical Research Institute (IPEC-FIOCRUZ, Brazil). *Parasitol Res* 103: 697-703.
- Steindel M, Carvalho Pinto CJ, Toma HK, Mangia RHR, Ribeiro-Rodrigues R, Romanha AJ 1991. *Trypanosoma rangeli* (Tejera, 1920) isolated from a sylvatic rodent (*Echymys dasythrix*) in Santa Catarina Island, Santa Catarina State: first report of this trypanosome in Southern Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 86: 73-79.
- Steindel M 1993. Caracterização de cepas de *Trypanosoma rangeli* e *Trypanosoma cruzi* isoladas de reservatórios e vetores silvestres em Santa Catarina. Universidade Federal de Minas Gerais. *Tese de Doutorado*. 164p.
- Strong R 1934. Onchocerciasis with special reference to the Central America form of the disease. Onchocerciasis in Central America. Contributions from the Department

of Tropical Medicine and the Institute for Tropical Biology and Medicine, VI, Cambridge, Harvard University press, p. 234.

Stevens JR, Teixeira MMG, Bingle LE, Gibson W 1999. The taxonomic position and evolutionary relationships of *Trypanosoma rangeli*. *Int J Parasitol* 29: 749-757.

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

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

Tejera E 1920, Un nouveau flagella de *Rhodnius prolixus*. *Trypanosoma* (ou *Crithidia*) *rangeli* n.s. *Bull Soc Path Exot* 13: 527-530.

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

Tobie EJ 1964. Increased infectivity of a cyclically maintained strain of *Trypanosoma rangeli* to *Rhodnius prolixus* and mode of transmission by invertebrate host. *J Parasitol* 50: 593-598.

Tobie EJ 1965. Biological factors influencing transmission of *Trypanosoma rangeli* by *Rhodnius prolixus*. *J Parasitol* 51: 837-841.

Tobie EJ 1968. The fate of some culture flagellates in the hemocoel of *Rhodnius prolixus*. *J Parasitol* 54: 1040-1046.

Tobie EJ 1970. Observations on the development of *Trypanosoma rangeli* in the hemocel of *Rhodnius prolixus*. *J Invert Pathol* 15: 118-125.

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

- Urdaneta-Morales S, Tejero F 1986. *Trypanosoma (Herpetosoma) rangeli* Tejera, 1920. Intracellular amastigote stages of reproduction in white mice. *Rev Inst Med Trop* 28: 166-169.
- Vallejo GA, Marinkelle CJ, Guhl F, Sánchez N 1986. Mantenimiento en el laboratorio de *Trypanosoma (Herpetosoma) rangeli* Tejera, 1920. *Rev Biol Trop* 34: 75-81.
- Vallejo GA, Marinkelle CJ, Guhl F, De Sánchez N 1988. Comportamiento de la infección y diferenciación morfológica entre *Trypanosoma cruzi* y *T rangeli* en el intestino del vector *Rhodnius prolixus*. *Rev Bras Biol* 48: 577-587.
- Vallejo GA, Guhl F, Carranza JC, Lozano LE, Sánchez JL, Jaramillo JC, Gualtero D, Castañeda N, Silva JC, Steindel M 2003. Parity between kinetoplast DNA and mini-exon gene sequences supports either clonal evolution or speciation in *Trypanosoma rangeli* strains isolated from *Rhodnius colombiensis*, *R. pallescens* and *R. prolixus* in Colombia. *Infect Genet Evol* 3: 39-45.
- Vallejo GA, Guhl F, Carranza JC, Triana O, Pérez G, Ortiz PA, Marín DH, Villa LM, Suárez J, Sánchez IP, Pulido X, Rodríguez IB, Lozano LE, Urrea DA, Rivera FA, Cuba CC, Clavijo JA 2007. Interacción tripanosoma-vector-vertebrado y su relación con la sistemática y la epidemiología de la tripanosomiasis americana. *Biomédica* 27: 110-118.
- Watkins R 1969. "Host-parasite interaction between *Trypanosoma* species and *Rhodnius prolixus* Stal (Hemiptera, Reduviidae). *Tese de PhD*. Universidade da Califórnia, Berkeley.
- Watkins R 1971. *Trypanosoma rangeli*: Effect on excretion in *Rhodnius prolixus*. *J Invert Pathol* 17: 67-71.
- Walton BC, Sonsa OE 1967. Trypanosomes of the lesser ante *Tamandúá tetradactyla* from Panamá. *J Parasitol.* 53: 956-961.

- Welburn SC, Maudlin I, Ellis DS 1989. Rate of trypanosome killing by lectins in midguts of different species and strains of Glossina. *Med Vet Entomol* 3: 77–82.
- Whiten MMA, Mello CB, Gomes SAO, Nigam Y, Azambuja P, Garcia ES, Ratcliffe NA 2001. Role of superoxide and reactive nitrogen intermediates in *Rhodnius prolixus* (Reduviidae) *Trypanosoma rangeli* interactions. *Exp Parasitol* 98: 44-57.
- WHO, World Health Organization. Chagas disease (American trypanosomiasis) [online] Ago2012 [capturado10.Novembro2012]. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/index.html>.
- Wigglesworth VB 1936. The functions of corpus allatum in the growth and reproduction of *Rhodnius prolixus* (Hemiptera). Quarterly J Microscop, *Science* 79: 91-121.
- Woo PTK, Soltys MA 1970. Animals as Reservoir Hosts of Human Trypanosomes. *J Wildlife Diseases*, vol. 6.
- Zar HJ 1999. Biostatistical Analysis. 4° Edition. Prentice Hall.
- Zeledón R 1956. Hallazgo de formas evolutivas de *Trypanosoma rangeli*, Tejera 1920, en glândulas salivares de *Rhodnius prolixus*, Stal 1859, salvadoreños. *Rev Biol Trop* 4: 1-8.
- Ziccardi M, Oliveira LR, Lainson R, Brígido MCO, Muniz JAPC 2000. Trypanosomes of Non- human Primates from the National Centre of Primates, Ananindeua, State of Pará, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 95: 157-159.
- Zuñiga C, Palau MT, Penin P, Gamallo C, Diego JA 1997. *Trypanosoma rangeli*: increase in virulence with inocula of different origins in the experimental infection in mice. *Parasitol Res* 83: 797-800.

