

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

DANIELLA BARRETO SANTANA

***Trypanosoma rangeli*: Biologia do parasitismo em espécies do gênero  
*Rhodnius* e aspectos ultraestruturais na dinâmica da invasão e  
morfogênese em glândulas salivares.**

Tese apresentada como requisito parcial para a  
obtenção do Título de Doutor em Ciências da Saúde  
pelo programa de Pós-Graduação em Ciências da  
Saúde da Universidade de Brasília.

Orientador: Prof. Dr. Cesar Augusto Cuba Cuba  
Co-orientador: Prof. Dr. Rodrigo Gurgel Gonçalves

Brasília  
2011

DANIELLA BARRETO SANTANA

***Trypanosoma rangeli*: Biologia do parasitismo em espécies do gênero *Rhodnius* e aspectos ultraestruturais na dinâmica da invasão e morfogênese em glândulas salivares.**

Tese apresentada como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutor em Ciências da Saúde pelo programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

---

Dr. César A. Cuba Cuba  
(Presidente)

---

Dr. Gustavo Sierra Romero  
Universidade de Brasília

---

Dra. Nadjar Nitz Silva Lociks de Araújo  
Universidade de Brasília

---

Dr. Marco Túlio Antônio Garcia Zapata  
Universidade Federal de Goiás

---

Dra. Sônia Nair Bão  
Universidade de Brasília

---

Dr. Jose Roberto Pujol-Luz  
Universidade de Brasília

Brasília  
2011

*Ao meu filho,  
Túlio Barreto Agostini.*

## AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador César Augusto Cuba Cuba, um agradecimento especial pela orientação, confiança, paciência e inspiradora sabedoria. Pelo apoio e conselhos dados que ajudaram na elaboração do meu trabalho.

Ao meu co-orientador Rodrigo Gurgel Gonçalves, um agradecimento também muito especial pelo incentivo, oportunidade, apoio constante, pelas discussões sobre o trabalho, sugestões de artigos e conhecimentos compartilhados.

Aos membros da banca: Dr. Gustavo Sierra Romero, Dr. Jose Roberto Pujol-Luz, Dr. Marco Túlio Antônio Garcia Zapata, Dra. Sônia Nair Bão e Dra. Nadjar Nitz Silva Lociks de Araújo; agradeço por aceitar o convite contribuindo para o aprimoramento desse trabalho.

Aos membros da banca de qualificação: Dr. Gustavo Sierra Romero e Dra. Laila Salmen Espíndola; pela disponibilidade, análise e sugestões.

À Prof. Dra. Sônia Bão, pelo carinho e apoio em todo o processo para a utilização dos Microscópios Eletrônicos de Varredura e de Transmissão.

Ao Prof. Dr. José Raimundo Corrêa, pela ajuda com as análises das imagens do Microscópio Eletrônico de Transmissão.

À técnica e amiga Aline Fonseca, obrigada pelo carinho, coleguismo e apoio constante no desenvolvimento do projeto.

À estagiária e amiga Liliane Schuenker, pela ajuda nas diversas etapas do projeto.

Às estagiárias Jaqueline Carezoli e Tatiane Vasco, pela ajuda com o desenvolvimento da biologia dos triatomíneos.

Aos estagiários Bruno Lacerda e Igor Ribeiro, pelo apoio no trabalho laboratorial.

À Daniella de Souza, amiga, também doutoranda do Laboratório, pelo companheirismo e carinho durante esses quatro anos.

À Maria de Lourdes Souto (Lurdinha), técnica do Laboratório, pela atenção e pelo ensino.

Ao Tércio Rodrigues e à Viviane Medeiros, do Laboratório de Dermatologia, pela ajuda com materiais e manutenção da cepa criopreservada.

À Shirley Couto, técnica do Laboratório de Patologia, pelo ensino, atenção e empréstimo de materiais.

À Tércia Mendes, técnica do Laboratório de Histologia, pelo preparo das lâminas com cortes histológicos.

Ao Bruno, João Victor, Ingrid, Lauro e a todos os estudantes de graduação e pós-graduação do Laboratório de Microscopia Eletrônica, pela ajuda com o preparo das amostras e registros das infecções no MEV e no MET.

Ao Shigueru Ofugi e ao Walcymar Santiago, do Laboratório de Doença de Chagas, pelo apoio na utilização do aparelho de repasto artificial.

Ao Lindolfo Pereira e Valter Maia, pela presteza e fundamental ajuda nas análises estatísticas.

À funcionária D. Maria Fernanda (Mariazinha) pela ajuda na criação dos camundongos.

À Universidade de Brasília, em especial à Pós-graduação em Ciências da Saúde pela oportunidade.

Aos funcionários da Pós-graduação que sempre me atenderam com o maior carinho.

A todos os meus colegas que passaram esses quatro anos caminhando ao meu lado que, de forma direta ou indireta, contribuíram para uma melhor formação.

E, finalmente ao Marco, meu esposo, companheiro eterno em todos os momentos,

*meu muito obrigado.*

## Resumo Geral

*Trypanosoma rangeli* é um protozoário hemoflagelado parasita de triatomíneos e mamíferos, com a distribuição geográfica em vários países latino-americanos. Neste trabalho abordamos de três formas o estudo sobre o *T. rangeli* nas diferentes espécies de *Rhodnius*. Na primeira abordagem, estudamos a suscetibilidade e a competência vetorial das diferentes espécies de *Rhodnius* à cepa SC-58 de *T. rangeli* (genótipo KP1-), testando a hipótese de que essas espécies poderiam apresentar diferente susceptibilidade à cepa SC-58 devido a um mecanismo hipotético de co-evolução parasito-vetor; na segunda, analisamos o processo de penetração e adesão do *T. rangeli* nas glândulas salivares e morfogênese do *T. rangeli* em *R. robustus*; e na terceira, analisamos a influência da infecção por *T. rangeli* na biologia de algumas espécies de *Rhodnius*, testando a hipótese de que há diferença no ciclo biológico e comportamento alimentar dos espécimes infectados, quando comparados com os insetos não infectados. Na primeira abordagem, analisando-se a evolução da infecção por *T. rangeli* em 4 espécies de *Rhodnius* (*R. neglectus*, *R. pictipes*, *R. robustus*, *R. nasutus*), observou-se que a suscetibilidade (desenvolvimento no intestino, hemolinfa e glândula salivar) e o processo de transmissão deste protozoário foram maiores e mais eficientes em *R. pictipes*, reforçando a evidência relatada de que esses triatomíneos podem atuar como filtros biológicos na transmissão de populações geneticamente diferentes de *T. rangeli*. Na segunda abordagem, através das observações realizadas com Microscopia Eletrônica de Varredura e de Transmissão, observou-se que o fenômeno inicial de penetração e invasão nas glândulas salivares se daria por formas tripomastigotas e/ou epimastigotas. As micrografias mostraram várias formas de flagelados nas glândulas salivares – epimastigotas e tripomastigotas espalhadas na luz glandular. Finalmente, na terceira abordagem, comparando-se a duração do ciclo de vida, a taxa de mortalidade e o comportamento alimentar de *R. neglectus*, *R. pictipes* e *R. robustus*, observou-se que alguns parâmetros do comportamento alimentar como número de picadas, detecção do hospedeiro, número de interrupções e dejeções dos triatomíneos infectados foram modificados quando comparados com os espécimes não infectados.

Palavras-Chave: *Rhodnius pictipes*; *Rhodnius robustus*; *Rhodnius neglectus*; *Rhodnius nasutus*; *Trypanosoma rangeli*; suscetibilidade; relação parasito-vetor; competência vetorial.

## Abstract

*Trypanosoma rangeli* is a hemoflagellated protozoan, triatomine and mammals parasite, present in many Latin American countries. In this work we approach the study about *T. rangeli* and the different species of *Rhodnius* in three forms. On the first approach, we study the susceptibility and vector competence of different species of *Rhodnius* to the strain SC-58 of *T. rangeli* (KP1- genotype), testing the hypothesis that these species could present different susceptibility due to a hypothetical mechanism of co-evolution parasite-vector; on the second approach, we analyze the invasion process (attachment, adhesion) in salivary glands and morphogenesis of *T. rangeli* in *R. robustus*; and on the third, we analyze the influence of the infection by *T. rangeli* in biology of some species of *Rhodnius*, testing the hypothesis that there are differences on biological cycle and feeding behavior on the infected species, when compared to uninfected insects. On the first approach, analyzing the evolution of the infection by *T. rangeli* in species of *Rhodnius* (*R. neglectus*, *R. pictipes*, *R. robustus*, *R. nasutus*), we observed that susceptibility (thorough the intestine, haemolymph and salivary glands development) and the transmission process of this protozoan were larger and more efficient in *R. pictipes*, reinforcing the reported evidence that these triatomines may act as biological filters in transmission of genetically different populations of *T. rangeli*. On the second approach, from observations carry out with Transmission and Scanning Electronic Microscopy, it was observed that the initial phenomenon of attachment and invasion into salivary glands occurred by trypomastigote and/or epimastigote forms. The micrographics showed several forms of flagellated in salivary glands – epimastigotes and trypomastigotes spread on the gland lumen. Finally, on the third approach, comparing the duration of life cycle, mortality rate and feeding behavior of *R. neglectus*, *R. pictipes* and *R. robustus*, it was observed that some parameters of feeding behavior as number of bites, source host detection, number of interruptions and dejecting in the infected triatomines were modified when compared with those uninfected control individuals.

Keywords: *Rhodnius pictipes*; *Rhodnius robustus*; *Rhodnius neglectus*; *Rhodnius nasutus*; *Trypanosoma rangeli*; susceptibility; relation parasite-vector; vector competence.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.1</b> Formas epimastigotas e tripomastigotas de <i>T. rangeli</i> da cultura SC-58 (KP1-).....	2
<b>Figura 1.2</b> Espécies de triatomíneos do gênero <i>Rhodnius</i> estudadas.....	6
<b>Figura 1.3</b> Ciclo evolutivo de <i>T. rangeli</i> .....	7
<b>Figura 1.4</b> Distribuição das duas principais linhagens de <i>Trypanosoma rangeli</i> com base na organização de minicírculos de kDNA e sua associação com triatomíneos.....	11
<b>Figura 2.1</b> Aparelho de Repasto Artificial.....	33
<b>Figura 2.2</b> Taxa de sobrevivência dos espécimes de <i>Rhodnius</i> ( <i>R. nasutus</i> , <i>R. neglectus</i> , <i>R. robustus</i> e <i>R. pictipes</i> ) infectados com <i>Trypanosoma rangeli</i> (SC-58, KP1-) entre 7 e 42 dias após repasto infectante.....	35
<b>Figura 2.3</b> Relação entre a positividade acumulada de fezes e a taxa de sobrevivência (tracejado) dos espécimes de <i>Rhodnius</i> ( <i>R. nasutus</i> , <i>R. neglectus</i> , <i>R. robustus</i> e <i>R. pictipes</i> ) infectados com <i>Trypanosoma rangeli</i> (SC-58, KP1-) entre 7 e 42 dias após repasto infectante.....	36
<b>Figura 2.4</b> Relação entre a positividade acumulada da hemolinfa e a taxa de sobrevivência (tracejado) dos espécimes de <i>Rhodnius</i> ( <i>R. nasutus</i> , <i>R. neglectus</i> , <i>R. robustus</i> e <i>R. pictipes</i> ) infectados com <i>Trypanosoma rangeli</i> (SC-58, KP1-) entre 7 e 42 dias após repasto infectante.....	37
<b>Figura 2.5</b> Morfogênese de <i>Trypanosoma rangeli</i> (SC-58, KP1-) na hemolinfa e glândulas salivares de <i>Rhodnius</i> spp.....	38
<b>Figura 2.6</b> Relação entre a positividade acumulada das glândulas salivares e a taxa de sobrevivência (tracejado) dos espécimes de <i>Rhodnius</i> ( <i>R. nasutus</i> , <i>R. neglectus</i> , <i>R. robustus</i> e <i>R. pictipes</i> ) infectados com <i>Trypanosoma rangeli</i> (SC-58, KP1-) entre 7 e 42 dias após repasto infectante e por dissecação dos sobreviventes.....	39
<b>Figura 2.7</b> <i>Rhodnius pictipes</i> com deformações nas patas, probóscides e mortos durante a muda.....	40
<b>Figura 2.8</b> <i>Rhodnius robustus</i> encontrado morto após 30 dias do repasto infectante, com o abdômen ainda cheio de sangue, sem conseguir digerir o repasto infectante.....	41

<b>Figura 3.1</b> Protocolo utilizado para a infecção experimental " <i>in vitro</i> " das glândulas salivares.....	61
<b>Figura 3.2</b> MEV da glândula salivar não infectada de <i>R. robustus</i> .....	63
<b>Figura 3.3</b> Flagelados de <i>Trypanosoma rangeli</i> (SC-58) aderidos na membrana basal da glândula salivar de <i>Rhodnius robustus</i> com características de forma epimastigota.....	64
<b>Figura 3.4</b> Flagelados de <i>Trypanosoma rangeli</i> (SC-58) aderidos pelo flagelo na membrana basal da glândula salivar de <i>Rhodnius robustus</i> com características de forma tripomastigota.....	64
<b>Figura 3.5</b> Glândula salivar de <i>Rhodnius robustus</i> infectada via repasto artificial por <i>Trypanosoma rangeli</i> (SC-58).....	65
<b>Figura 3.6</b> Glândula salivar de <i>Rhodnius robustus</i> infectada por <i>Trypanosoma rangeli</i> (SC-58) via repasto artificial.....	66
<b>Figura 3.7</b> Glândula salivar de <i>Rhodnius robustus</i> infectada por <i>Trypanosoma rangeli</i> (SC-58) via repasto artificial.....	67
<b>Figura 3.8</b> Glândula salivar de <i>Rhodnius robustus</i> infectada por <i>Trypanosoma rangeli</i> (SC-58) via repasto artificial, com flagelados aderidos à membrana basal pelo flagelo.....	67
<b>Figura 3.9</b> Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) da glândula salivar não infectada de <i>Rhodnius robustus</i> .....	68
<b>Figura 3.10</b> MET da glândula salivar de <i>Rhodnius robustus</i> infectada por <i>Trypanosoma rangeli</i> (SC-58) após 30 minutos.....	69
<b>Figura 3.11</b> Micrografia de MET da glândula salivar de <i>Rhodnius robustus</i> infectada por <i>Trypanosoma rangeli</i> (SC-58), mostrando epimastigota encontrado após 30 minutos, aderido à célula glandular pelo flagelo.....	70
<b>Figura 3.12</b> MET da glândula salivar de <i>Rhodnius robustus</i> infectada por <i>Trypanosoma rangeli</i> (SC-58) via repasto artificial.....	71
<b>Figura 3.13</b> Corte histológico longitudinal da glândula salivar D1 de <i>Rhodnius robustus</i> infectada por <i>Trypanosoma rangeli</i> (SC-58) corado pelo H. E.....	72
<b>Figura 3.14</b> Detalhe da parte central da glândula salivar D1 de <i>Rhodnius robustus</i> infectada por <i>Trypanosoma rangeli</i> (SC-58).....	73
<b>Figura 3.15</b> Corte histológico longitudinal pela glândula salivar D1 de <i>Rhodnius robustus</i> corado pelo H. E.....	73

<b>Figura 4.1</b> Valor médio do tempo de aproximação dos insetos a fonte alimentar para os diferentes estádios de desenvolvimento de <i>Rhodnius</i> .....	97
<b>Figura 4.2</b> Valor médio do número de picadas na fonte alimentar.....	98
<b>Figura 4.3</b> Valor médio do tempo total do repasto sanguíneo.....	99
<b>Figura 4.4</b> Valor médio do número de interrupções durante a alimentação na fonte alimentar.....	100
<b>Figura 4.5.</b> Percentuais de defecações por estágio ninfal, somando-se as observações realizadas durante e após o repasto.....	101
<b>Figura 4.6.</b> Valores médios (em mg) da quantidade de sangue ingerido na fonte alimentar.....	102

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 4.1** – Comparação do período de desenvolvimento (em dias) e do percentual de mortalidade de ovos e estádios ninfais de *Rhodnius neglectus* (grupo controle e infectado por *Trypanosoma rangeli* SC-58/KP1-)..... 94
- Tabela 4.2** – Comparação do período de desenvolvimento (em dias) e do percentual de mortalidade de ovos e estádios ninfais de *Rhodnius pictipes* (grupo controle e infectado por *Trypanosoma rangeli* SC-58/KP1-)..... 95
- Tabela 4.3** – Comparação do período de desenvolvimento (em dias) e do percentual de mortalidade de ovos e estádios ninfais de *Rhodnius robustus* (grupo controle e infectado por *Trypanosoma rangeli* SC-58/KP1-)..... 96

## NOMENCLATURA DAS ESPÉCIES BIOLÓGICAS TRABALHADAS

- *Trypanosoma rangeli* (Tejera, 1920);
- *Rhodnius nasutus* (Stal, 1859);
- *Rhodnius pictipes* (Stal, 1872);
- *Rhodnius robustus* (Larrousse, 1927);
- *Rhodnius neglectus* (Lent, 1954);

## SUMÁRIO

<b>1. Capítulo I – Introdução Geral</b>	<b>1</b>
1.1 Taxonomia e variabilidade populacional do <i>Trypanosoma rangeli</i>	2
1.2 Os vetores	3
1.3 Interação <i>T. rangeli</i> – Vetor – Vertebrado	6
1.4 Distribuição geográfica e epidemiologia do <i>T. rangeli</i>	9
1.5 Aspectos ultraestruturais do <i>T. rangeli</i>	12
1.6 Objetivos	14
1.7 Referências Bibliográficas	15
<b>2. Capítulo II – Suscetibilidade de diferentes espécies de <i>Rhodnius</i> (<i>R. pictipes</i>, <i>R. robustus</i>, <i>R. neglectus</i> e <i>R. nasutus</i>) à cepa SC-58 de <i>Trypanosoma rangeli</i>.</b>	<b>24</b>
2.1 Resumo	25
2.2 Abstract	27
2.3 Introdução	29
2.4 Material e Métodos	31
2.5 Resultados	35
2.6 Discussão	41
2.7 Conclusões	44
2.8 Referências Bibliográficas	45
<b>3. Capítulo III – Invasão do <i>Trypanosoma rangeli</i> em glândulas salivares de <i>Rhodnius robustus</i>: um estudo morfológico e ultraestrutural.</b>	<b>50</b>
3.1 Resumo	51

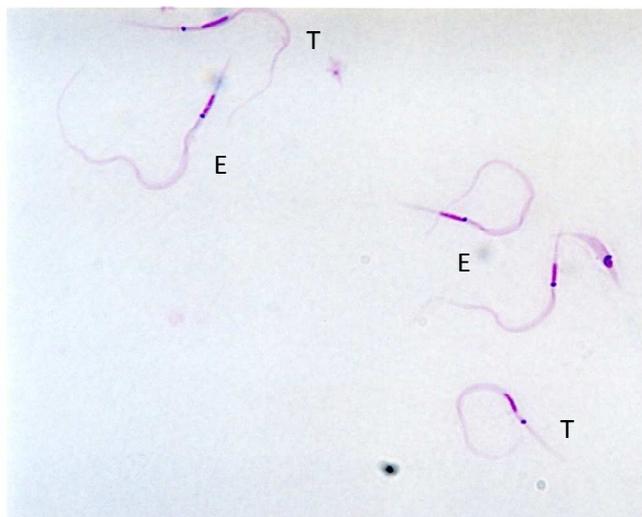
3.2 Abstract	53
3.3 Introdução	55
3.4 Material e Métodos	56
3.5 Resultados	62
3.6 Discussão	74
3.7 Conclusões	78
3.8 Referências Bibliográficas	78
<b>4. Capítulo IV – Estudo da influência da infecção por <i>Trypanosoma rangeli</i> (SC-58) na biologia de <i>Rhodnius robustus</i>, <i>R. pictipes</i> e <i>R. neglectus</i>.</b>	<b>83</b>
4.1 Resumo	84
4.2 Abstract	86
4.3 Introdução	88
4.4 Material e Métodos	90
4.5 Resultados	92
4.6 Discussão	102
4.7 Conclusões	107
4.8 Referências Bibliográficas	108
<b>5. Considerações finais</b>	<b>113</b>
<b>6. Glossário</b>	<b>114</b>
<b>7. Anexo A – Aprovação do Comitê de Ética e Pesquisa</b>	<b>116</b>
<b>8. Anexo B – Cópia do artigo publicado</b>	<b>118</b>

## **Capítulo I**

### **Introdução Geral**

### 1.1 Taxonomia e variabilidade populacional do *Trypanosoma rangeli*

A posição taxonômica do *Trypanosoma rangeli* (Tejera, 1920) (Figura 1.1) ainda continua em debate. Com **simpatria**<sup>1</sup> ao *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909), agente etiológico da Doença de Chagas, o *T. rangeli* infecta os seres humanos, uma grande variedade de outros mamíferos e é transmitido por triatomíneos. Contudo, o *T. rangeli* multiplica-se como tripomastigota na corrente sanguínea e não como amastigota no interior das células do hospedeiro mamífero, e as formas metacíclicas infecciosas desenvolvem-se tanto nas glândulas salivares como no intestino do inseto vetor. Apesar de ser aparentemente inofensivo a mamíferos, é considerado patogênico para seus insetos vetores, <sup>1</sup>sendo transmitido principalmente por insetos triatomíneos do gênero *Rhodnius* (D' Alessandro, 1976, Cuba Cuba, 1998, Santa-Izabel *et al*, 2004). Considerando critérios morfológicos e comportamentais, o *T. rangeli* é geralmente aceito como pertencente ao subgênero Herpetosoma.



**Figura 1.1** Formas epimastigotas (E) e tripomastigotas (T) de *T. rangeli* da cultura SC-58 (100x). Fonte: Barreto-Santana, 2006.

Segundo Levine (1994), o *T. rangeli*, está classificado como se segue: Sub-reino: Protozoa; Filo: Sarcomastigophora; Sub-Filo: Mastigophora; Classe: Zoomastigophorea; Ordem: Kinetoplastida; Família: Trypanosomatidae;

---

<sup>1</sup>Palavras destacadas no texto em negrito fazem parte do Glossário (página 114).

Gênero: *Trypanosoma*. Alguns autores como D'Alessandro & Saravia (1992) mantiveram o parasito no subgênero Herpetosoma, porém estudos moleculares colocaram o flagelado no subgênero Schizotrypanum (Stevens *et al*, 1999).

De acordo com Vallejo *et al*. (2007), a variabilidade das populações de *T. rangeli* tem se demonstrado nas últimas décadas, mediante estudos de **minisatélites de DNA**, os quais mostraram diferenças genéticas entre as cepas de Santa Catarina e as isoladas em Honduras, Colômbia e Venezuela. A análise de polimorfismos de DNA mitocondrial mostrou que o minicírculo de kDNA denominado KP1, se encontrou associado às cepas da Colômbia, Honduras e Venezuela, mas não às cepas isoladas em Santa Catarina. Utilizando-se amplificação do kDNA, na Colômbia e em outros países da América Latina, detectaram-se dois grupos de *T. rangeli* molecularmente diferentes. Um grupo de cepas isoladas de *Rhodnius prolixus* apresentou três classes de minicírculos de kDNA denominados KP1, KP2 e KP3 (*T. rangeli* KP1+), enquanto que as cepas isoladas de *R. colombiensis* apresentaram somente duas classes denominadas KP2 e KP3 (*T. rangeli* KP1-).

Tem se demonstrado que as cepas de *T. rangeli* isoladas das espécies de *Rhodnius* do grupo “pallenscens” ou linhagem “pictipes” (*R. pallenscens*, *R. pictipes*, *R. colombiensis* e *R. ecuadoriensis*) denominadas (KP1-) são geneticamente divergentes das cepas isoladas do grupo “prolixus” ou linhagem “robustus” (*R. prolixus*, *R. neglectus*, *R. robustus*, *R. nasutus*) denominadas (KP1+), o que indica uma possível associação evolutiva entre as subpopulações de *T. rangeli* e os grupos de espécies de *Rhodnius* (Vallejo *et al*, 2003, 2007).

## 1.2 Os vetores

As espécies do gênero *Rhodnius* possuem uma variedade de hábitos - domiciliares, peridomiciliares e silvestres - e assim, a presença de algumas espécies em habitações humanas é muito freqüente. Além disso, há relatos de *T. rangeli* em triatomíneos coletados em palmeiras de diferentes regiões do Brasil (Miles *et al*, 1983a, Gurgel-Gonçalves *et al*, 2004a, Maia da Silva *et al*, 2007, 2009, Dias *et al*, 2008, 2010) . As observações de colônias silvestres, em

palmeiras e outras plantas como as bromélias, de *R. neglectus* e *R. nasutus* perto de habitações humanas, como também as visitas freqüentes de adultos de *R. prolixus*, *R. pictipes* e *R. robustus* em habitações humanas, indicariam a formação de uma ligação entre *Rhodnius* infectados por *T. rangeli* e as infecções de humanas já descritas (Carcavallo *et al*, 1998, D'Alessandro & Saravia, 1999, Coura *et al*, 2002).

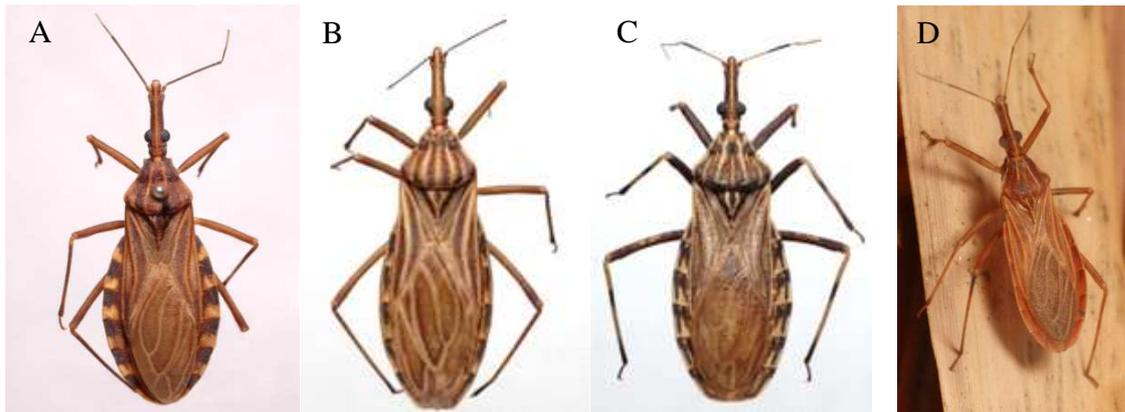
*R. neglectus* (Figura 1.2) é uma espécie considerada silvestre com capacidade de formar colônias em habitações humanas. Em estudos realizados nas regiões norte e nordeste do Estado de São Paulo, e no Estado de Minas Gerais, foram encontradas colônias de *R. neglectus* em domicílios e peridomicílios. No ambiente silvestre, esta espécie está associada a várias espécies de palmeiras como a *Attalea speciosa* (babaçu), *Mauritia flexuosa* (buriti) e a *Acrocomia aculeata* (macaúba) utilizando como fonte alimentar aves, marsupiais e roedores (Diotaiuti & Dias, 1984, Gurgel-Gonçalves *et al*, 2004b, Abad-Franch *et al*, 2009). No peridomicílio é encontrado principalmente em galinheiros (Barretto *et al*, 1979, Espínola, 1985, Rocha *et al*, 2001a). *R. neglectus* tem sido frequentemente encontrada infectada por *T. cruzi* em diferentes estados brasileiros (Barretto *et al*, 1979, Oliveira & Silva, 2007, Gurgel-Gonçalves, 2008). A infecção natural desta espécie por *T. rangeli* também já foi descrita no Distrito Federal (Gurgel-Gonçalves *et al*, 2004a).

*R. robustus* (Figura 1.2) teve sua descrição original baseada em um espécime coletado na Guiana Francesa. Esta espécie foi encontrada também na Bolívia, Colômbia, Equador, Peru, Venezuela e na região norte do Brasil. No ambiente silvestre, geralmente é encontrada nas palmeiras *Scheelea maracaibensis*, *Attalea speciosa* e *Acrocomia sclerocarpa* (Carcavallo *et al*, 1998, Rocha *et al*, 2001b). *R. robustus* (s.l., ver Abad-Franch *et al*, 2009) tem ampla distribuição na Amazônia, ocorrendo frequentemente em palmeiras (silvestres e periurbanas) em altas densidades e com relevantes taxas de infecção por tripanossomatídeos (Carcavallo *et al*, 1975, Miles *et al*, 1983b, Feliciangeli *et al*, 2002, Abad-Franch & Monteiro, 2007). Apesar de não existirem evidências de colonização de *R. robustus* em ambiente domiciliar no Brasil, espécimes adultos infectados por *T. cruzi* têm invadido casas na região amazônica, sendo potenciais vetores extradomiciliares ou ainda podendo contaminar equipamentos de processamento de alimentos, representando risco

de transmissão oral da doença de Chagas (Coura *et al*, 2002, Aguilar *et al*, 2007). A infecção de *R. robustus* por *T. rangeli* também já foi registrada na Amazônia (Miles *et al*, 1983a, Dias *et al*, 2010)

*R. pictipes* (Figura 1.2) apesar de apresentar hábitos silvestres, tem sido detectado em domicílios na região Amazônica (Miles *et al*, 1983b, Fé *et al*, 2009, Torres & Cabrera, 2010) . É uma espécie com ampla distribuição na América do Sul, sendo encontrada no Brasil, nos estados do Acre, Amazonas, Maranhão, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Pará, Piauí e Tocantins (Carcavallo *et al*, 1999). Miles *et al*. (1983a,b) encontraram *R. pictipes* naturalmente infectados por *T. cruzi* e *T. rangeli*, nas palmeiras *Maximiliana regia* (inajá), *Acrocomia sclerocarpa* (mucajá) e *Attalea speciosa* (babaçu) na Amazônia brasileira. Otero *et al*. (1976), citado por Rocha *et al*. (1994), encontraram *R. pictipes* naturalmente infectado pelo *T. cruzi*, pelo *T. rangeli* e com infecção mista.

*R. nasutus* (Figura 1.2) é um triatomíneo característico da caatinga, porém também ocorre em florestas de babaçus do Maranhão e áreas de transição cerrado-caatinga (Batista & Gurgel-Gonçalves, 2009). No Ceará, esta espécie tem sido encontrada freqüentemente no peridomicílio e intradomicílio (Sarquis *et al*, 2004). Dias (2008), encontrou esses triatomíneos, naturalmente infectados por *T. cruzi* e *T. rangeli*, em cinco espécies de palmeiras, no sul do estado do Ceará: *Attalea speciosa* (babaçu), *Mauritia flexuosa* (buriti), *Copernicia prunifera* (carnaúba), *Syagrus oleracea* (catolé) e *Acrocomia intumescens* (macaúba-barriguda).

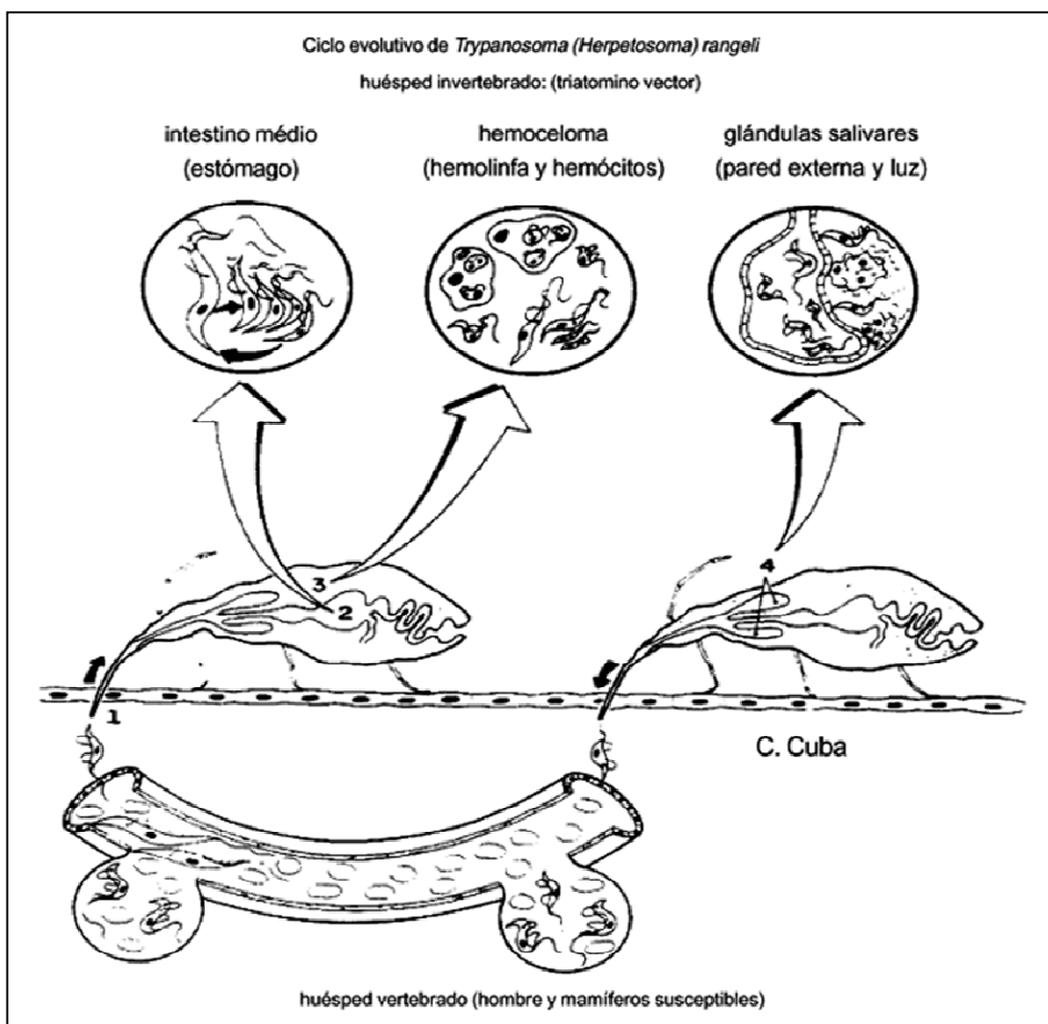


**Figura 1.2** Espécies de triatomíneos do gênero *Rhodnius* estudadas. A: *R. neglectus*; B: *R. robustus*; C: *R. pictipes*; D: *R. nasutus*. Fonte: C. Galvão e R. Gurgel-Gonçalves.

### 1.3 Interação *T. rangeli* – Vetor – Vertebrado

A interação do *T. rangeli* com o inseto vetor começa com a ingestão de tripomastigotas, durante o processo de alimentação do inseto (Figura 1.3). Após a ingestão, esse flagelado transforma-se em epimastigota, multiplica-se no intestino do inseto e invade a **hemolinfa**, onde ocorre uma fase extracelular e outra intracelular ou intra-hemocitária. Na fase extracelular, ocorre a presença de epimastigotas curtos, longos e tripomastigotas longos; já na fase intra-hemocitária, aparentemente existe um processo de diferenciação celular em que os parasitas intracelulares formam elementos arredondados parecidos com esferomastigotas. Não há relatos da reprodução desses elementos dentro dos hemócitos, mas já foi descrita a presença de formas aparentemente transformando-se em pequenos tripomastigotas, que ao romper-se das células hemocitárias, são morfológicamente semelhantes aos metacíclicos originados nas glândulas salivares do inseto (Cuba Cuba, 1975). Os tripomastigotas e/ou epimastigotas penetram as células glandulares criando um vacúolo até alcançar o lúmen da glândula, originando novamente os tripomastigotas metacíclicos (Cuba Cuba, 1975, Ellis *et al*, 1980, Hecker *et al*, 1990, Azambuja & Garcia, 2005). Por fim, terminando o seu ciclo biológico na natureza, o *T. rangeli* é transmitido ao hospedeiro vertebrado através da inoculação das

formas tripomastigotas metacíclicas infectantes pela picada do vetor (Garcia *et al*, 1994).



**Figura 1.3** Ciclo evolutivo de *T. rangeli*. Fonte: Cuba Cuba, 1998.

Embora o *T. rangeli* tenha sido encontrado em diversas espécies de animais silvestres e domésticos, o ciclo de vida deste parasito no hospedeiro vertebrado ainda não está esclarecido, sendo escassos e controversos os resultados da literatura a este respeito (D'Alessandro & Saravia, 1992, Grisard *et al*, 1999).

A literatura ainda mostra controvérsia quanto à possibilidade das formas intestinais de *T. rangeli* serem capazes de infectar hospedeiros vertebrados, e, portanto completar o ciclo biológico no hospedeiro invertebrado via tubo digestivo com formação de tripomastigotas metacíclicos, como ocorre com o *T. cruzi* (Vallejo *et al*, 1988). A mais notável característica biológica (relativo a *T.*

*rangeli* no vetor) é apresentada pela penetração do flagelado do intestino para a hemolinfa e invasão das glândulas salivares acompanhada pela formação de tripomastigotas metacíclicos na luz das glândulas e na saliva, ficando infeccioso para o hospedeiro vertebrado através da picada do inseto (Guhl & Vallejo, 2003).

Mas apesar de suas características não patogênicas para hospedeiros vertebrados, o *T. rangeli* induz resposta imune humoral que resulta em elevados níveis de anticorpos (Grisard *et al*, 1999) que originam reações sorológicas cruzadas com *T. cruzi*, complicando o diagnóstico do parasitismo e a epidemiologia da doença de Chagas. No campo da identificação dos parasitos no inseto vetor, ainda existem dificuldades na distinção de ambas as espécies em exames realizados nas fezes dos barbeiros infectados, por técnicos não familiarizados com a morfologia do *T. rangeli*.

Atualmente, sabe-se que a interação *T. rangeli* - vetor pode ser ainda mais complexa, considerando uma hipótese cada vez mais aceita: a co-evolução entre o parasito e as diferentes espécies de *Rhodnius*. Sabe-se, que na Colômbia, *R. colombiensis* podem ser infectados com *T. rangeli* KP1- e KP1+, mas só transmite KP1- através da picada e *R. prolixus* infectados com *T. rangeli* de ambas as subpopulações, só transmite pela picada KP1+. Estes resultados mostram que *R. prolixus* é suscetível à infecção de *T. rangeli* KP1+, mas tem uma resposta refratária à invasão de cepas de *T. rangeli* KP1- isoladas de *R. pallescens*, *R. colombiensis* e *R. ecuadoriensis*. O comportamento diferencial na transmissão dessas duas subpopulações está relacionado com a ativação da resposta imune do vetor, onde fatores intrínsecos, como a produção de enzimas, lectinas e resposta humoral e celular de fagocitoses dos diversos tipos de hemócitos e **fatores tripanolíticos**, limitam a infecção parasitária (Azambuja *et al*, 1991, Mello *et al*, 1999, Vallejo *et al*, 2002, 2003).

Os estudos a respeito da biologia e do ciclo de vida do parasito ainda têm alguns pontos que devem ser esclarecidos, pois não se sabe ainda, por exemplo: se as formas esferomastigotas encontradas intracelularmente na hemolinfa, se transformam diretamente em tripomastigotas ou passam por outra fase; quais formas realmente penetram na membrana basal da glândula salivar (epimastigotas/tripomastigotas); qual seria a sequência evolutiva do *T.*

*rangeli*, após a penetração da glândula salivar, embora se tenha documentado grande parte dessa dinâmica evolutiva em observações feitas com Microscopia Óptica e Microscopia Eletrônica de Transmissão (Cuba Cuba, 1975, Ellis *et al*, 1980, Kitajima *et al*, 1998).

#### 1.4 Distribuição geográfica e epidemiologia do *T. rangeli*

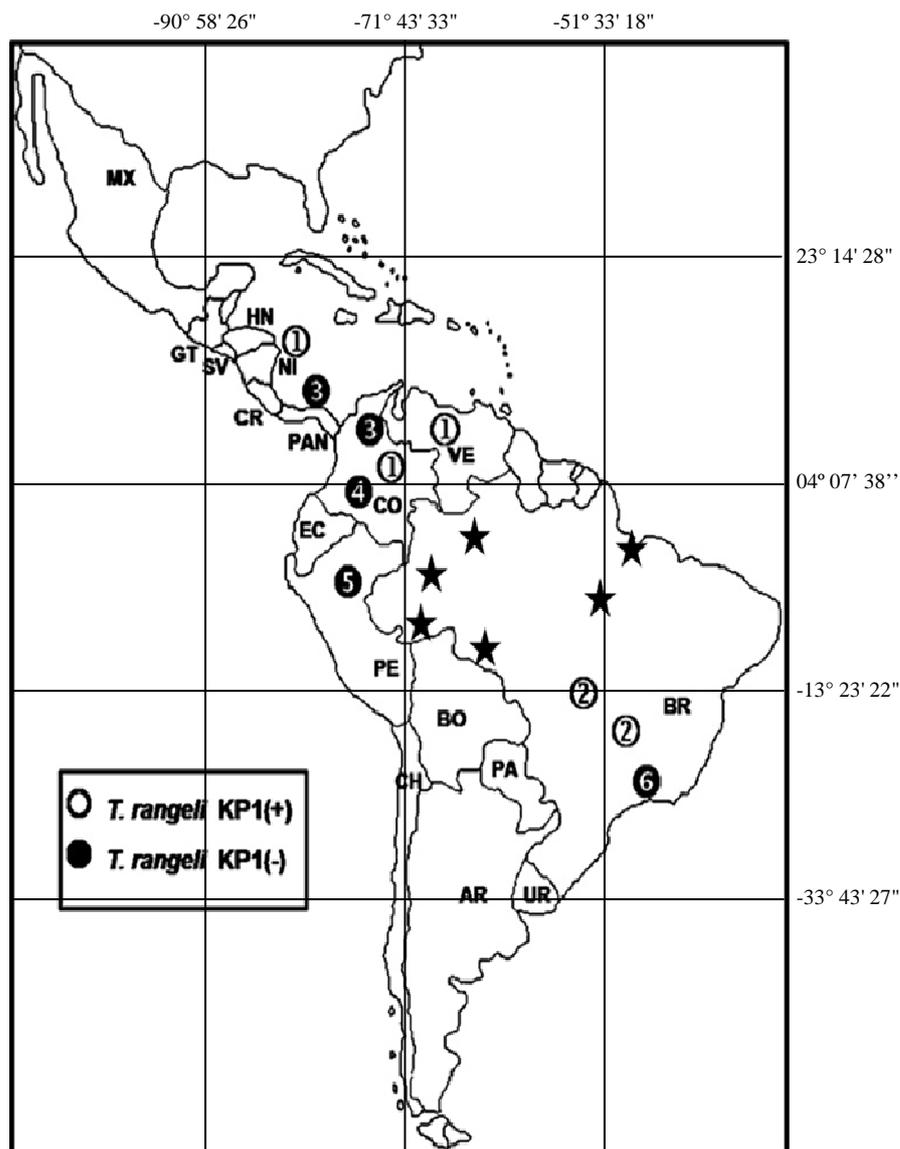
O *T. rangeli*, é um parasito **hemoflagelado** que infecta diversos mamíferos selvagens e domésticos com larga distribuição geográfica em diversos países latino americanos. Muitas vezes ocorre a sobreposição da sua ocorrência com outra espécie de tripanossomatídeo, o *Trypanosoma cruzi*, permitindo a ocorrência de única e/ou infecções mistas em ambos os hospedeiros vertebrados e invertebrados numa mesma região geográfica (Cuba Cuba, 1998, Grisard *et al*, 1999).

Embora a prevalência em humanos e outros animais pelo *T. rangeli* não estejam bem estabelecidas, considera-se ampla a sua distribuição geográfica nas Américas Central e do Sul (Ramirez *et al*, 1998). De acordo com Guhl & Vallejo (2003), várias publicações têm demonstrado a presença de *T. rangeli* em humanos por exame direto, hemocultura ou xenodiagnóstico indicando mais de 2.600 casos registrados de infecções em humanos: 1.144 casos na Venezuela; 1.117 na Guatemala; 181 no Panamá; 121 na Colômbia; 61 em El Salvador; 4 em Costa Rica; e 2 casos no Peru (D'Alessandro, 1976, D'Alessandro & Saravia, 1992, Grisard *et al*, 1999). Coura *et al*. (1996) informou os primeiros casos de infecção humana por *T. rangeli* no Brasil, na região Amazônica, sendo nesta região o *R. brethesi* considerado como o possível transmissor do parasito. Recentemente, dois casos de infecção humana por *T. rangeli* foram detectados na Bahia (Sousa *et al*, 2008).

Dentre os registros, chama a atenção o fato de que pelo menos vinte espécies de vertebrados silvestres, dentre os quais se incluem primatas, gambás, tamanduás e morcegos (*Didelphis marsupialis*, *Echimys dasythrix*, *Choloepus didactylus*, *Tamandua tetradactyla*, *Saimiri sciureus*, *Callicebus lugens*, *Alouatta stramineus*, *Cebuella pygmaea*, *Artibeus planirostris*, *Platyrrinus lineatus*, *Noctilio albiventris*, etc.) e três de insetos vetores do

gênero *Rhodnius* (*R. pictipes*, *R. robustus* e *R. brethesi*) foram encontrados naturalmente infectados na região Amazônica (Coura *et al*, 1996, D'Alessandro & Saravia, 1999, Maia da Silva *et al*, 2007, 2009, Dias *et al*, 2010). Miles *et al*. (1983a) já tinham indicado a presença do parasito na região Amazônica em amostras de tripanossomas isolados de diferentes espécies de mamíferos e triatomíneos naturalmente infectados. D'Alessandro & Hincapie (1986) observaram a presença do parasito no primata *Saguinus mistax* na mesma região.

Steindel *et al*. (1991) descreveram pela primeira vez a ocorrência do *T. rangeli* na Ilha de Santa Catarina, isolado do roedor *Echimys dasythrix*, a chamada cepa SC-58, citada por Vallejo *et al*. (2007) como cepa KP1-. Estudos com parasitos isolados de *Panstrongylus megistus* silvestres através do método de xenocultura, confirmaram os resultados anteriores e demonstraram a presença de infecções mistas por *T. rangeli* e *T. cruzi* em *P. megistus* naturalmente infectados na mesma região (Steindel *et al*, 1992). Posteriormente, a ocorrência de *T. rangeli* foi descrita em Minas Gerais (Ramirez *et al*, 2002) e no Distrito Federal (Gurgel-Gonçalves *et al*, 2004a), indicando a ampla distribuição geográfica desta espécie no Brasil (Figura 1.4).



**Figura 1.4** Distribuição das duas principais linhagens de *Trypanosoma rangeli* com base na organização de minicírculos de kDNA e sua associação com triatomíneos. Cepas KP1+ isoladas de *Rhodnius prolixus* ( ①), *R. neglectus* ( ②) e cepas KP1- isoladas de *R. pallescens* ( ③), *R. colombiensis* ( ④), *R. ecuadoriensis* ( ⑤) and *Panstrongylus megistus* ( ⑥). As estrelas indicam a distribuição de *T. rangeli* na Amazônia de acordo com Maia da Silva *et al.* (2007). Entretanto, neste estudo os isolados não foram caracterizados de acordo com a presença do minicírculo de kDNA. MX: México; GT: Guatemala; SV: El Salvador; HN: Honduras; NI: Nicaragua; CR: Costa Rica; PAN: Panamá; CO: Colômbia; VE: Venezuela; EC: Equador; PE: Peru; BO: Bolívia; CH: Chile; PA: Paraguai; BR: Brasil; AR: Argentina; UR: Uruguai. Adaptada de Vallejo *et al.* (2009).

### 1.5 Aspectos ultraestruturais do *T. rangeli*

De acordo com Kitajima *et al.* (1998), a invasão das glândulas salivares dos triatomíneos pelo *T. rangeli* foi estudado primeiro, em nível de microscópio óptico, por Groot (1952), seguido por outros autores (Herrer, 1964, Watkins, 1971, Cuba Cuba, 1975). Poucos trabalhos foram desenvolvidos utilizando a Microscopia Eletrônica, entre eles, Ellis *et al.* (1980) e Hecker *et al.* (1990) estudaram a infecção das glândulas salivares dos *R. prolixus*, Kitajima *et al.* (1998) sobre os *R. ecuadoriensis*, Meirelles *et al.* (2005) sobre *R. domesticus* e Barreto-Santana (2006) que trabalhou com glândulas de *R. robustus* infectadas *in vitro*.

Um primeiro estudo ultra-estrutural sobre os mecanismos de penetração do *T. rangeli* nas glândulas salivares de *R. prolixus*, mostrou que os parasitos são capazes de penetrar na lâmina basal e atravessar o citoplasma da célula glandular (Ellis *et al.*, 1980). Meirelles *et al.*, (2005) mostraram que as formas epimastigotas atravessam a lâmina basal por pequenos orifícios para alcançar o epitélio glandular. Dado verificado também por Barreto-Santana (2006), que encontrou tanto formas epimastigotas, como tripomastigotas, penetrando aparentemente por esses pequenos orifícios.

Meirelles *et al.* (2005), demonstraram em Microscopia Eletrônica de Transmissão, que após penetrar a camada exterior da lâmina basal, os parasitos poderiam ser encontrados no espaço entre a lâmina basal e o epitélio da glândula salivar. Os epimastigotas na lâmina basal, em seguida, iriam invadir as células da glândula salivar por um mecanismo ainda desconhecido. Depois de penetrar no citoplasma da célula glandular, eram encontradas dentro de vacúolos, formas alongadas ou dobradas com um pequeno flagelo. Depois de alcançar a luz da glândula, os parasitos apareciam sob a forma epimastigota, presos pelo flagelo nas microvilosidades das células da glândula salivar.

Ellis *et al.* (1980) e Kitajima *et al.* (1998), já tinham indicado que ao penetrar o citoplasma das células, os parasitos eram encontrados dentro de vacúolos. Kitajima *et al.* (1998), encontraram na luz da glândula, parasitos tanto sob a forma epimastigota, quanto sob a forma tripomastigota. Esses autores também conseguiram observar algumas evidências da invasão da

glândula, pelo rompimento ativo da lâmina basal pelo flagelo. Mas a passagem do corpo inteiro do flagelado para o epitélio da célula glandular não pôde ser observada. Talvez porque esse processo seja extremamente rápido e difícil de detectar.

Foi sugerido que o parasito atravessa o citoplasma das células intestinais, causando dano celular (Oliveira & Souza, 2001). No entanto, foi também proposto que o *T. rangeli* cruza a barreira intestinal através de uma via intracelular sem danificar as células (Hecker et al. 1990).

De acordo com Meireles *et al*, 2005, as formas epimastigotas podem produzir uma molécula lítica, que podem danificar a lâmina basal, permitindo a passagem dos parasitos através do epitélio glandular. Essa molécula lítica, nomeada rangelysin, parece estar presente em quantidades mais elevadas nas formas epimastigotas, embora a **análise FACS** demonstrou a presença também em formas tripomastigotas.

Observa-se que muitos aspectos do processo de infecção da glândula salivar dos triatomíneos por *T. rangeli* ainda são obscuros, como o processo inicial de penetração e a morfologia das formas intracelulares da glândula salivar, no conteúdo da luz.

Todas as espécies de triatomíneos apresentam três pares de glândulas salivares, com exceção do gênero *Rhodnius* que não apresenta a típica glândula D3. A nomenclatura usada para as glândulas salivares - D1, D2 e D3 - segue aquela mencionada por Barth (1954) durante seus estudos nas glândulas salivares de *Triatoma infestans*. O par D1 corresponde às glândulas principais, o D2 às glândulas suplementares e o par D3 apenas às glândulas acessórias. De um modo geral, o par de glândulas D1 é sempre reniforme em todos os triatomíneos. As glândulas salivares têm grande diversificação quanto ao número, tamanho, forma e situação nos diferentes triatomíneos. Em geral estão situadas no tórax, onde encontram espaço suficiente para seu desenvolvimento. O deslocamento para a região abdominal resulta dos eventuais movimentos peristálticos dos órgãos vizinhos (Lacombe, 1999).

No gênero *Rhodnius* as glândulas D1 e D2 são alongadas e de cor avermelhada, o que facilita a sua visualização e extração para estudos bioquímicos. As colorações das glândulas resultam da presença de secreção na sua luz. As glândulas D1 têm secreção **merócrina** e tem a função de

produzir várias proteínas anticoagulantes, que é excretada para o lúmen da glândula junto com parte do epitélio que, subseqüentemente, se refaz. Toda a secreção fica contida nos vacúolos dispersos no citoplasma. As glândulas D2 são mais curtas, arredondadas ou ovais, e a secreção é do tipo **apócrina**, isto é, feita através de contínuo fluxo de “gotículas” de secreção saídas do citoplasma para a luz da glândula (Lacombe, 1999).

## 1.6 Objetivos

Neste trabalho abordamos de três formas o estudo sobre o *Trypanosoma rangeli* e as diferentes espécies de *Rhodnius*. Na primeira abordagem (Capítulo II) estudamos a suscetibilidade das diferentes espécies de *Rhodnius* à cepa SC-58 de *T. rangeli*, testando a hipótese de que essas espécies poderiam apresentar diferente susceptibilidade à cepa SC-58 devido a um mecanismo hipotético de co-evolução parasito-vetor. A segunda abordagem (Capítulo III) consiste na análise do processo de invasão das glândulas salivares e morfogênese do *T. rangeli*, em *R. robustus*. Na terceira e última abordagem (Capítulo IV) analisamos a influência da infecção por *T. rangeli* na biologia de algumas espécies de *Rhodnius*, testando a hipótese de que há diferença no ciclo biológico e comportamento alimentar das espécies infectadas, quando comparados com as não infectadas. Dessa forma, abaixo estão descritos os objetivos gerais e específicos do estudo:

1. Estudar a suscetibilidade e o comportamento biológico de diferentes espécies de *Rhodnius* (*R. pictipes*, *R. robustus*, *R. neglectus* e *R. nasutus*) à cepa SC-58 de *T. rangeli* (KP1-) infectados via repasto artificial.
  - 1.1 Estabelecer os períodos aproximados de desenvolvimento intestinal, invasão hemolinfática e de glândulas salivares;
  - 1.2 Verificar a capacidade de transmissão por picada;
  - 1.3 Verificar se os *R. pictipes* são mais suscetíveis à cepa SC-58 de *T. rangeli* do que as espécies de *Rhodnius* da linhagem “robustus” (*R. neglectus*, *R. nasutus* e *R. robustus*).

2. Investigar a invasão do *Trypanosoma rangeli* em glândula salivares e sua morfogênese, em *Rhodnius robustus*.
  - 2.1 Analisar histologicamente os processos iniciais da invasão das glândulas salivares em insetos infectados;
  - 2.2 Estudar os eventos (adesão/penetração) que acontecem na invasão das glândulas salivares de *R. robustus*, pela Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV);
  - 2.3 Estudar a morfogênese do parasito ao longo dos eventos de invasão glandular (níveis de observação MEV e MET);
  - 2.4 Acompanhar o processo de morfogênese das formas epimastigotas e/ou tripomastigotas para esferomastigotas intracelularmente nas células glandulares;
3. Verificar a influência da infecção por *T. rangeli* (SC-58, KP1-) na biologia de *R. robustus*, *R. pictipes* e *R. neglectus*.
  - 3.1 Comprovar a ação patogênica do *T. rangeli* nas espécies infectadas experimentalmente (na ecdise, digestão do repasto sanguíneo, deformações anatômicas, mortalidade);
  - 3.2 Comparar a duração do ciclo evolutivo e comportamento alimentar de populações infectadas e não infectadas dessas espécies de vetores.

### 1.7 Referências Bibliográficas

Abad-Franch F, Monteiro FA. Biogeography and evolution of Amazonian triatomines (Heteroptera: Reduviidae): implications for Chagas disease surveillance in humid forest ecoregions. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2007; 102 Suppl 1:57-70.

Abad-Franch F, Monteiro FA, Jaramillo ON, Gurgel-Goncalves R, Dias FB, Diotaiuti L. Ecology, evolution, and the long-term surveillance of vector-borne Chagas disease: a multi-scale appraisal of the tribe Rhodniini (Triatominae). Acta Trop. 2009; 110:159-177.

Aguilar MM, Abad-Franch F, Dias JCP, Junqueira ACV, Coura JR. Chagas disease in the Amazon Region. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2007; 102 Suppl. 1:47-55.

Azambuja P, Garcia ES, Ratcliffe NA. Aspects of classification of Hemiptera hemocytes from six triatomine species. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1991; 86(1):1-10.

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

Barreto-Santana, D. Biologia comparativa de *Rhodnius neglectus* e *Rhodnius robustus* (Triatominae) sob condições de laboratório e infecção experimental pelo *Trypanosoma rangeli* com ênfase nos aspectos ultraestruturais das glândulas salivares infectadas. [Dissertação de Mestrado]. Brasília: Universidade de Brasília. 2006.

Barretto MP. Epidemiologia. In: Brener, Z. Andrade, Z. A. (eds). *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan Ed. 1979; p. 89-291.

Barth R. Estudos anatômicos e histológicos sobre a subfamília Triatominae (Heteroptera-Reduvidae). IV Parte: O complexo das glândulas salivares de *Triatoma infestans*. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1954; 53:517-585.

Batista TA, Gurgel-Gonçalves R. Ecological niche modelling and differentiation between *Rhodnius neglectus* Lent, 1954, and *R. nasutus* St I, 1859 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae), in Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2009; 104:1165-1170.

Carcavallo RU, Martinez-Silva R, Otero MAA, Tonn RJ. Infección natural de *Rhodnius robustus* Larrousse y *Rhodnius pictipes* Stal por *T. cruzi* y *T. rangeli* en Venezuela. Bol Dir Malariol San Amb. 1975; 15:117-120.

Carcavallo RU, Galíndez Girón I, Jurberg J, Lent H. Estádios Ninfais. In: Atlas dos Vetores da Doença de Chagas nas Américas. Vol. II. Ed. Fiocruz. Rio de Janeiro. 1998; 449-514.

Carcavallo RU, Curto de Casas SI, Sherlock I, Galíndez-Girón I, Jurberg J, Galvão C, et al. Geographical distribution and alti-latitudinal dispersion, in Atlas of Chagas Disease Vectors in the Americas (Carcavallo RU, Galíndez Girón I, Jurberg J and Lent H, eds.). 1999; 2:747-792.

Coura JR, Fernandes O, Arboleda M, Barret TV, Carrara N, Degrave W, et al. Human infection by *Trypanosoma rangeli* in the Brazilian Amazon. Trans Royal Soc Trop Med Hyg. 1996; 90:278-279.

Coura JR, Junqueira ACV, Fernandes O, Valente SAS, Miles MA. Emerging Chagas Disease in Amazonian Brazil. Trends in Parasitology. 2002; 18(4):171-176.

Cuba Cuba CA. Estudio de una cepa peruana de *Trypanosoma rangeli* IV. Observações sobre a evolução e morfogênese do *T. rangeli* na hemocele e nas glândulas salivares de *Rhodnius ecuadoriensis*. Rev Inst Med Trop. 1975; 17:283-297.

Cuba Cuba CA. Revisión de los aspectos biológicos y diagnósticos del *Trypanosoma* (Herpetosoma) *rangeli*. Rev Soc Bras Med Trop. 1998; 31(2):207-220.

D'Alessandro A. Biology of *Trypanosoma* (*Herpetosoma*) *rangeli* Tejera, 1920. In WHR Lumsden & DA Evans, Biology of Kinetoplastida, Vol. 1, Academic Press, London, New York and San Francisco. 1976; 327-493.

D'Alessandro A, Hincapie O. *Rhodnius neivai*: A new experimental vector of *Trypanosoma rangeli*. Am J Trop Med Hyg. 1986; 35(3):512-514.

D'Alessandro A, Saravia NG. *Trypanosoma rangeli*, In: Kreier J. Baker JR (eds) Parasitic Protozoa, 2ª Ed., Academic Press, New York. 1992; 2:1-54.

D'Alessandro A, Saravia NG. *Trypanosoma rangeli*. In: Protozoal Diseases. Edited by: Gilles HM., Ed. Arnold. 1999; 398- 412.

Dias FBS, Bezerra CM, Machado EMM, Casanova C, Diotaiuti L. Ecological aspects of *Rhodnius nasutus* Stal, 1859 (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) in palms of the Chapada do Araripe in Ceará, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2008; 103(8):824-830.

Dias FBS, Quartier M, Romaña CA, Diotaiuti L, Harry M. *Tamandua tetradactyla* Linnaeus, 1758 (Myrmecophagidae) and *Rhodnius robustus* Larrousse, 1927 (Triatominae) infection focus by *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920 (Trypanosomatidae) in *Attalea phalerata* Mart. ex Spreng (Arecaceae) palm tree in the Brazilian Amazon. Infect Genet Evol. 2010; 10(8):1278-81.

Diotaiuti L, Dias JC. Occurrence and biology of *Rhodnius neglectus* Lent, 1954 in palm trees of suburban areas of Belo Horizonte, Minas Gerais. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1984; 79(3):293-301.

Ellis DS, Evans DA, Stamford. The penetration of the salivary glands of *Rhodnius prolixus* by *Trypanosoma rangeli*. Parasitol Res.1980; 62:63-74.

Espínola HN. Brasil. In: Factores biológicos y ecológicos en la enfermedad de Chagas. ECO/OPS-SNCH/MSAS, Buenos Aires. 1985; 2:363-372.

Fé NF, Magalhães LK, Fé FA, Arakian SK, Monteiro WM, Barbosa MG. Occurrences of triatomines in wild and domestic environments in the municipality of Manaus, State of Amazonas. Rev Soc Bras Med Trop. 2009; 42(6):642-6.

Feliciangeli MD, Dujardin JP, Bastrenta B, Mazzarri M, Villegas J, Flores M, et al. Is *Rhodnius robustus* (Hemiptera: Reduviidae) responsible for Chagas disease transmission in Western Venezuela? Trop Med Internat Health. 2002; 7:280–287.

Garcia ES, Mello CB, Azambuja P, Ribeiro JM. *Rhodnius prolixus*: salivary antihemostatic components decrease with *Trypanosoma rangeli* infection. Exp Parasitology. 1994; 78:287-293.

Grisard EC, Steindel M, Guarneri AA. Characterization of *Trypanosoma rangeli* Strains Isolated in Central and South America: an Overview. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1999; 94(2):203-209.

Groot H. Further observations on *Trypanosoma ariarii* of Colombia South America. Am J Trop Med Hyg. 1952; 1:585-592.

Guhl F, Vallejo GA. *Trypanosoma* (Herpetosoma) *rangeli* Tejera, 1920: an updated review. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2003; 98(4):435-442.

Gurgel-Gonçalves R, Ramalho ED, Duarte MA, Palma ART, Abad-Franch F, Carranza JC, Cuba-Cuba CA. Enzootic transmission of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* in Federal District of Brazil. Rev Soc Bras Med Trop. 2004a; 46(6):323-330.

Gurgel-Gonçalves R, Duarte MA, Ramalho ED, Palma ART, Romana CA, Cuba-Cuba CA. Distribuição espacial de populações de triatomíneos (Hemiptera: Reduviidae) em palmeiras da espécie *Mauritia flexuosa* no Distrito Federal, Brasil. Rev Soc Bras Med Trop. 2004b; 37(3):241-247.

Gurgel-Gonçalves R. Filogeografia, morfometria e distribuição geográfica potencial de populações de *Rhodnius neglectus* (Hemiptera, Reduviidae) no Brasil. [Tese de Doutorado]. Brasília: Universidade de Brasília, Brasil. 2008.

Hecker H, Schwarzenbach M, Rudin W. Development and interactions of *Trypanosoma rangeli* in and with the reduviidae bug *Rhodnius prolixus*. Parasitol Res. 1990; 76:311-318.

Herrer A. Reproducción de un *Trypanosoma* tipo *rangeli* a nivel de la glándula salivar del *Rhodnius ecuadoriensis*. Arch Peruanos de Patol Clin. 1964; 18:251-254.

Kitajima EW, Cuba-Cuba CA, Brener Z. Ultrastructural observations on *Trypanosoma* (Herpetosoma) *rangeli* in the salivary glands of *Rhodnius ecuadoriensis* (Hemiptera: Reduviidae). Parasitol día. 1998; 22(3-4):65-71.

Lacombe D. Anatomia e Histologia das Glândulas Salivares nos Triatomíneos. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1999; 94(4):557-564.

Levine ND, Corliss JO, Cox EEG, Deroux G, Grain J, Honigberg BM, et al. A newly revised classification of the Protozoa. Journal of Protozoology. 1994; 27:37-58.

Maia da Silva F, Junqueira AC, Campaner M, Rodrigues AC, Crisante G, Ramirez LE, et al. Comparative phylogeography of *Trypanosoma rangeli* and *Rhodnius* (Hemiptera: Reduviidae) supports a long coexistence of parasite lineages and their sympatric vectors. Mol Ecol 2007; 16:3361–3373.

Maia da Silva F, Marcili A, Lima L, Cavazzana MJr, Ortiz PA, Campaner M, et al. *Trypanosoma rangeli* isolates of bats from Central Brazil: genotyping and phylogenetic analysis enable description of a new lineage using spliced-leader gene sequences. Acta Trop. 2009; 109(3):199-207.

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

Mello CB, Nigam Y, Garcia ES, Azambuja P, Newton RP, et al. Studies on a haemolymph lectin isolated from *Rhodnius prolixus* and its interaction with *Trypanosoma rangeli*. Exp Parasitol. 1999; 91(4):289-96.

Miles MA, Arias JR, Valente SA, Naiff RD, Souza AA, Povoá MM, Lima JA, Cedillos RA. Vertebrate hosts and vectors of *Trypanosoma rangeli* in the Amazon Basin of Brazil. Am J Trop Med Hyg. 1983a; 32(6):1251-9.

Miles MA, Arias JR, Souza AA. Chagas disease in the Amazon Basin. V. Periurban palms as habitats of *Rhodnius robustus* and *Rhodnius pictipes*, triatomíneos vectors of Chagas disease. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1983b; 78:391-398.

Oliveira AWS, Silva IG. Distribuição geográfica e indicadores entomológicos de triatomíneos sinantrópicos capturados no Estado de Goiás. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2007; 40:204-208.

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

Otero AMA, Carcavallo RU, Tonn RJ. Notas sobre la biología, ecología y distribución geográfica de *Rhodnius pictipes* Stal, 1872 (Hemiptera, Reduviidae). *Bol Dir Malariol y San Amb.* 1976; 16:163-168.

Ramirez LE, Machado MI, Maywald P G. First evidence of *Trypanosoma rangeli* in the southeast of Brazil, an endemic region to Chagas' disease. *Rev Soc Bras Med Trop.* 1998; 31(1):99-102.

Ramirez LE, Lages-Silva E, Alvarenga-Franco F, Matos A, Vargas N, Fernandes O, et al. Abstract 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.* 2002; 84:189-198.

Rocha DS, Jurberg J, Galvão C. Biología do *Rhodnius pictipes* Stal, 1872 em condições de laboratório (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1994; 89(2):265-270.

Rocha DS, Jurberg J, Carcavallo RU. Influence of the temperature and humidity on the biology of *Rhodnius neglectus* Lent, 1954 in laboratory conditions. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2001a; 34(4):357-363.

Rocha DS, Jurberg J, Carcavallo RU. Influence of temperature and humidity on the nymphal development of *Rhodnius robustus*. *Rev Saúde Pública.* 2001b; 35(4):400-406.

Santa-Izabel A, Vermelho AB, Branquinha MH. Proteolytic activities in *Trypanosoma rangeli* and stercorarian trypanosomes: taxonomic implications. *Parasitol Res.* 2004; 94:342-348.

Sarquis O, Borges-Pereira J, Mac Cord JR, Gomes TF, Cabello PH, Lima MM. Epidemiology of Chagas Disease in Jaguaruana, Ceará. I. Presence of triatomines and index of *Trypanosoma cruzi* infection in four localities of a rural area. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2004; 99(3):263-270.

Sousa MA, Silva Fonseca T, Santos BN, Santos Pereira SM, Carvalhal C, Hasslocher Moreno AM. *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920, in chronic Chagas' disease patients under ambulatory care at the Evandro Chagas Clinical Research Institute (IPEC-Fiocruz, Brazil). *Parasitol Res.* 2008; 103(3):697-703.

Steindel M, Carvalho-Pinto CJ, Toma HK, Mangia RHR, Ribeiro-Rodrigues R, Romanha AJ. *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920 isolated from a sylvatic rodent (*Echimyus dasythrix*) in Santa Catarina State: First report of this trypanosome in southern Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1991; 86:73-79.

Steindel M, Grisard E, Carvalho-Pinto CJ, Romanha, AJ. Presence of *Trypanosoma cruzi* - *Trypanosoma rangeli* mixedinfection in naturally infected *Panstrongylus megistus* from Florianópolis, State of Santa Catarina. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1992; 87 Suppl 2: 99.

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

Torres VDB, Cabrera R. Geographical distribution and intra-domiciliary capture of sylvatic triatomines in La Convención province, Cusco, Peru. *Rev Inst Med Trop.* 2010; 52(3):157-60.

Vallejo GA, Marinkelle CJ, Jul F, De Sánchez N. Comportamiento de la infección y diferenciación morfológica entre *T. cruzi* y *T. rangeli* en el intestino del vector *R. prolixus*. *Rev Bras Biol.* 1988; 48:577-587.

Vallejo GA, Guhl F, Carranza JC, Lozano LE, Sánchez JL, Jaramillo JC, et al. kDNA markers define two major *Trypanosoma rangeli* lineages in Latin America. *Acta Trop.* 2002; 81:77-82

Vallejo GA, Guhl F, Carranza JC, Moreno J, Triana O, Grisard EC. Parity between kinetoplast DNA and miniexon 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.* 2003; 3:39-45.

Vallejo GA, Guhl F, Carranza JC, Triana O, Pérez G, Ortiz PA, et al. Interacción tripanosoma-vector-vertebrado y su relación con la sistemática y la epidemiología de la tripanosomiasis americana. *Biomédica.* 2007; 27 Suppl 1:110-118.

Vallejo GA, Guhl F, Schaub GA. Triatominae–*Trypanosoma cruzi*/*T. rangeli*: Vector-parasite interactions. *Acta Trop.* 2009; 110:137-147.

Watkins R. Histology of *Rhodnius prolixus* infected with *Trypanosoma rangeli*. *J Invert Pathol.* 1971; 117:59-66

## Capítulo II

**Suscetibilidade de diferentes espécies de *Rhodnius*  
(*R. pictipes*, *R. robustus*, *R. neglectus* e *R. nasutus*) à cepa SC-58 (KP1-)  
de *Trypanosoma rangeli*.**

## 2.1 Resumo

O protozoário *Trypanosoma rangeli* está amplamente distribuído na América do Sul sendo transmitido por cerca de doze espécies de triatomíneos. Como característica biológica marcante tem-se a passagem dos flagelados do intestino do triatomíneo para a hemolinfa e glândulas salivares. Entretanto, esse processo parece ocorrer em interações parasito-hospedeiro específicas. O objetivo foi estudar a suscetibilidade de diferentes espécies de *Rhodnius* da linhagem “robustus” (*R. robustus*, *R. neglectus*, *R. nasutus*) e da linhagem “pictipes” (*R. pictipes*) à cepa SC-58 de *T. rangeli* (KP1-). A hipótese é que a infectividade (intestinal, hemolinfática e glandular) e a transmissão deste protozoário sejam maiores e mais eficientes em *R. pictipes*. Foram selecionadas trinta ninfas (IV e V estádios) de cada espécie para realização de repasto artificial com sangue contaminado por *T. rangeli*. As fezes foram analisadas sete dias após o repasto infectante. Após a comprovação da infecção intestinal, amostras hemolinfáticas foram coletadas. Triatomíneos com *T. rangeli* na hemolinfa foram alimentados em camundongos (Swiss 44) para verificar a transmissão por picada, confirmando a infecção glandular. Posteriormente, os triatomíneos foram dissecados para confirmar a infecção das glândulas. A mortalidade e as conseqüências do parasitismo também foram registradas. Os *R. pictipes* apresentaram um maior percentual de infecção intestinal em menor período de tempo quando comparados com as outras três espécies de *Rhodnius*. Todas as espécies estudadas apresentaram parasitos na hemolinfa (epimastigotas e tripomastigotas), entretanto o parasitismo foi menor nas espécies da linhagem “robustus”. Com relação à invasão glandular, *R. robustus* e *R. neglectus* não foram capazes de transmitir pela picada em camundongos e após a dissecação, as glândulas não estavam infectadas. Dos *R. nasutus*, apenas um inseto foi capaz de transmitir pela picada e dos *R. pictipes*, dois dos espécimes que apresentavam hemolinfa infectada transmitiram o parasito pela picada, confirmando a infecção glandular. Já os triatomíneos dessa espécie que não obtiveram sucesso nessa transmissão tiveram suas glândulas extraídas e todos apresentaram formas de *T. rangeli*. Observou-se que a infectividade (intestinal, hemolinfática e glandular) e a transmissão deste protozoário foram maiores e mais eficientes

em *R. pictipes*. Esses resultados reforçam a hipótese de que esses triatomíneos atuam como filtros biológicos na transmissão de populações geneticamente diferentes de *T. rangeli*.

Palavras-Chave: *Trypanosoma rangeli*; cepa SC-58; suscetibilidade; *Rhodnius pictipes*; *Rhodnius robustus*; *Rhodnius neglectus*; *Rhodnius nasutus*; repasto artificial.

## 2.2 Abstract

*Trypanosoma rangeli* is widely distributed in South America and transmitted by around twelve triatomine species. The passage of flagellates in the triatomine across the intestine to hemolymph and salivary glands is the main biological characteristic. However, this process seems to occur in specific parasite-host interactions. The aim was to study the susceptibility of different species of *Rhodnius* from “robustus” lineage (*R. robustus*, *R. neglectus*, *R. nasutus*) and from “pictipes” lineage (*R. pictipes*) to the *T. rangeli* (KP1-) strain SC-58. The hypothesis is that infectivity (in the intestine, hemolymph and glands) and the transmission of this protozoan are both higher and more successful in *R. pictipes*. Thirty nymphs (stages IV and V) from each species have been selected for artificial meal with blood mixed with *T. rangeli* cultural forms. Feces were analyzed for seven days after infecting meal. At the same time that intestinal infection was confirmed, hemolymphatic samples were collected. Triatomines with *T. rangeli* in the hemolymph were fed in mice (Swiss 44) to check transmission bites, so confirming gland infection. Later on, triatomines were dissected to confirm the infected glands. Mortality and consequences of parasitism were registered, as well. The *R. pictipes* presented a larger percentage of intestinal infection in a shorter period of time when compared to three other *Rhodnius* species. All the species studied presented parasites in the hemolymph (epimastigote and trypomastigote); however parasitism was smaller in species from “robustus” lineage. Related to gland invasion, *R. robustus* e *R. neglectus* weren't able to transmit by bites in mice and after dissecting, the glands weren't infected. About *R. nasutus*, only one insect was capable of transmitting by bites and related to *R. pictipes*, two of the specimens that had infected hemolymph transmitted the parasite by biting, confirming the gland infection. In the triatomine of this species, which weren't successful in transmission, had their glands extracted and all of them had forms of *T. rangeli*. It has been seen that infectivity (in intestine, hemolymph and gland) and the transmission of this protozoan were larger and more efficient in *R. pictipes*. These results reinforce the hypothesis that these triatomines act as biological filters in transmission of genetically different populations of *T. rangeli*.

Keywords: *Trypanosoma rangeli*; cepa SC-58; susceptibility; *Rhodnius pictipes*; *Rhodnius robustus*; *Rhodnius neglectus*; *Rhodnius nasutus*; artificial repast.

## 2.3 Introdução

*Trypanosoma rangeli* é um protozoário hemoflagelado encontrado em diferentes espécies de mamíferos e triatomíneos, amplamente distribuído nas Américas Central e do Sul, muitas vezes sobrepondo sua distribuição geográfica com o *T. cruzi*, agente etiológico da doença de Chagas. As características biológicas mais marcantes de *T. rangeli* no hospedeiro invertebrado são representadas pela passagem dos flagelados do intestino para a hemolinfa e glândulas salivares acompanhada pela formação de tripomastigotas metacíclicos, tornando-se infeccioso para o hospedeiro vertebrado através da picada do inseto vetor (Cuba Cuba, 1998, Machado *et al*, 2001, Gulh & Vallejo, 2003).

O gênero *Rhodnius* é particularmente suscetível à infecção por *T. rangeli* e a transmissão por inoculação salivar foi demonstrada em 12 das 16 espécies nominais de insetos naturalmente e experimentalmente infectados (Vallejo *et al*, 2002).

De acordo com Cuba Cuba (1975), estudos relativos ao desenvolvimento do *T. rangeli* em triatomíneos foram inicialmente efetuados por Groot (1952), com uma cepa colombiana do flagelado em *R. prolixus*. Mas até hoje, ainda são relativamente escassos os trabalhos que estudam o comportamento biológico do *T. rangeli* em triatomíneos infectados por via natural, isto é, não por inoculação na hemocele, mas sim por ingestão de flagelados em animais infectados (Machado *et al*, 2001) ou por repasto artificial (Marquez *et al*, 2006).

Parâmetros biológicos, bioquímicos e moleculares têm demonstrado polimorfismo entre cepas de *T. rangeli* isoladas de diferentes triatomíneos e hospedeiros vertebrados em distintas regiões geográficas (D'Alessandro, 1976, Steindel *et al*, 1994, Grisard *et al*, 1999, Maia da Silva *et al*, 2007).

De acordo com Vallejo *et al*. (2002), a primeira indicação da presença do minicírculo de kDNA, denominado KP1, em cepas de *T. rangeli* isoladas em ciclos domésticos de transmissão foi apontada por Macedo *et al*. (1993) e Vallejo *et al*. (1994), usando **técnicas de hibridização**. Os autores observaram que o sinal do minicírculo KP1 estava presente em várias linhagens da Colômbia, Venezuela e Honduras, mas ausente na cepa SC-58 (KP1-), isolada

de um roedor silvestre (*Echymys dasythrix*) de Santa Catarina no Sul do Brasil. Usando a mesma estratégia de hibridização, o minicírculo KP1 estava ausente nas cepas de *T. rangeli* isoladas de glândulas salivares de *R. colombiensis* na Colômbia, *R. ecuadoriensis* no Peru e em cepas isoladas do intestino de *Panstrongylus megistus* no Brasil.

Vallejo *et al.* (2002), examinaram adultos de *R. colombiensis*, e encontraram *T. rangeli* KP1+ e KP1- no intestino de vários espécimes e *T. rangeli* KP1- em glândulas salivares de alguns indivíduos, indicando que em infecções naturais, cepas KP1+ podem ser encontradas no intestino, mas estas não invadem hemolinfa e glândulas salivares dos *R. colombiensis*. Observou uma situação semelhante em indivíduos de *R. prolixus* onde foi possível encontrar *T. rangeli* KP1- e KP1+ no intestino de vários espécimes e apenas *T. rangeli* KP1+ nas glândulas salivares. Esses resultados mostram claramente associações parasito-hospedeiro específicas no sistema *T. rangeli* - *Rhodnius* spp. e sugerem a hipótese de que esses triatomíneos atuam como filtros biológicos na transmissão de populações geneticamente diferentes de *T. rangeli* (Vallejo *et al.*, 2009). Adicionalmente estudos recentes têm mostrado que populações de *T. rangeli* isoladas da mesma linhagem evolutiva de *Rhodnius* apresentam o mesmo genótipo, mesmo estando muito distantes geograficamente, sugerindo uma associação co-evolutiva entre *T. rangeli* e diferentes linhagens de *Rhodnius* (Urrea *et al.*, 2011).

Segundo Abad-Franch & Monteiro (2007) e Abad-Franch *et al.* (2009) existem duas grandes linhagens evolutivas no gênero *Rhodnius*: a linhagem “pictipes” formada por espécies andinas e amazônicas (*R. pallescens*, *R. pictipes*, *R. colombiensis* e *R. ecuadoriensis*) e a linhagem “robustus” formada por espécies amazônicas (*R. robustus sensu lato* e *R. prolixus*) e que ocorrem em outras ecorregiões como caatinga (*R. nasutus*), cerrado (*R. neglectus*) e floresta atlântica (*R. domesticus*). Tem se demonstrado que as cepas de *T. rangeli* isoladas das espécies de *Rhodnius* da linhagem “pictipes” (KP1-) são geneticamente divergentes das cepas isoladas da linhagem “robustus” (KP1+) indicando diferenças na suscetibilidade dos vetores a diferentes genótipos de *T. rangeli*. Entretanto, a suscetibilidade das espécies que dão nome a essas linhagens evolutivas (*R. pictipes* e *R. robustus*) a *T. rangeli* ainda não foi avaliada.

Assim, o objetivo deste estudo foi analisar a suscetibilidade de diferentes espécies de *Rhodnius* da linhagem “robustus” (*R. robustus*, *R. neglectus*, *R. nasutus*) e da linhagem “pictipes” (*R. pictipes*) à cepa SC-58 de *T. rangeli* (KP1-). A hipótese é que a infectividade (intestinal, hemolinfática e glandular) e a transmissão deste protozoário sejam maiores e mais eficientes em *R. pictipes*.

## 2.4 Material e Métodos

### 2.4.1 Material Biológico

Os insetos utilizados para esses experimentos foram provenientes das colônias mantidas no Laboratório de Parasitologia Médica e Biologia de Vetores (FM/UnB). Os *Rhodnius neglectus* foram coletados originalmente na área de Ituiutaba - MG (Gurgel-Gonçalves *et al*, 2008), os *R. nasutus* na área de Sobral – CE e os *R. robustus* na área de Benfica, Marabá – PA (Mejía, 2005). Os *R. pictipes* foram enviados pelo Dr. Cléber Galvão, do Laboratório de Referência Nacional em Taxonomia de Triatomíneos da Fiocruz – RJ, procedentes de Barcarena – PA.

Os parasitos utilizados para as infecções experimentais foram provenientes da cepa brasileira de *Trypanosoma rangeli* (SC-58, KP1-), que foi isolada por Steindel *et al.* (1991), de um roedor silvestre, *Echymys dasythrix* (Grisard *et al*, 1999) e mantida criopreservada no Laboratório de Dermatologia da UnB.

### 2.4.2 Métodos para a manutenção das colônias de insetos

Os casais de cada uma das espécies de *Rhodnius* (*R. robustus*, *R. nasutus*, *R. neglectus* e *R. pictipes*), foram mantidos em conjunto para a obtenção de ovos em recipientes de plástico (9,5 cm de altura x 5,5 cm de diâmetro), com tampas com uma abertura de 4,5 cm de diâmetro forrados com uma malha de arame. Foram feitos três grupos (4 ♀ e 3 ♂) para cada espécie.

Os recipientes de plástico tinham o fundo forrado com papel filtro e contendo tiras do mesmo papel, dobradas em sanfona, para aumentar a superfície de contato e para absorver a umidade (Rocha *et al*, 1997).

Após a postura, 50 ovos foram separados para facilitar o embrionamento. O insetário estava sob condições controladas de temperatura ( $24^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ) e umidade relativa ( $50\% \pm 8\%$ ).

Para a alimentação e desenvolvimento da colônia, foram utilizados camundongos albinos, da linhagem Swiss 44, de ambos os sexos, com 30 a 40 dias de idade, pesando aproximadamente 30 a 35g, provenientes do Biotério Central da Universidade de Brasília, que foram imobilizados com a ajuda de uma malha de arame (9cm de largura x 10cm de comprimento) (Rocha *et al*, 1997). Uma “arena experimental” foi preparada, consistente em uma cuba de vidro transparente de 30 cm de diâmetro, para o processo de alimentação.

As instalações, condições ambientais, o manejo e os cuidados com os animais seguiram os padrões recomendados pelo *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*, além dos princípios éticos na experimentação animal sugerido pelo Comitê de Ética no Uso Animal (CEUA) da Universidade de Brasília – Instituto de Ciências Biológicas (UnBDoC: 42003/2010).

### **2.4.3 Repastos Artificiais**

Repastos artificiais foram realizados com espécimes de *R. robustus*, *R. pictipes*, *R. nasutus* e *R. neglectus*. Para isso, foram selecionadas 30 ninfas de IV e V estádios, para cada repasto realizado.

Para o repasto artificial, 3 ml da cultura da cepa SC-58 ( $2,8 \times 10^7$ ) foram adicionados a 5 ml de sangue humano em tubos com heparina. O sangue infectante foi levado ao Laboratório de Doença de Chagas no Núcleo de Medicina Tropical, onde foi primeiramente colocado em banho-maria para atingir a temperatura corporal ( $\pm 36,5^{\circ}\text{C}$ ), e depois levado ao aparelho de Repasto Artificial (Figura 2.1), que é constituído por uma caixa metálica com reservatório de água, munido com interruptores para aquecê-la e fazê-la circular. O aparelho é provido de uma bomba acionada por motor elétrico, que impulsiona água aquecida a  $37^{\circ}\text{C}$  através de um circuito de mangueiras e artefatos de vidro. O artefato de vidro em forma de sino tem duas câmaras,

uma externa para a circulação da água e outra interna, completada na parte inferior por um preservativo sem lubrificante que serve como reservatório para o sangue e, simultaneamente, como membrana através da qual os triatomíneos sugam. Uma estante de madeira sustenta as mangueiras os artefatos de vidro e os frascos plásticos com os triatomíneos (Pineda *et al*, 1998).

No aparelho, 40 ninfas foram colocadas para a realização do repasto com sangue infectado por *T. rangeli*. Nem todas as ninfas aceitaram a alimentação. Ao término do procedimento, 30 ninfas que se apresentavam ingurgitadas de sangue foram selecionadas e colocadas individualmente em um recipiente apropriado e identificado.



**Figura 2.1** Aparelho de Repasto Artificial.

#### **2.4.4 Taxa de sobrevivência, verificação de infecções intestinais e hemolinfáticas**

Para análise da taxa de sobrevivência, os triatomíneos foram observados diariamente ao longo do experimento até 42 dias de infecção.

Depois de sete dias do repasto infectante, os conteúdos intestinais foram examinados microscopicamente. As dejeções foram obtidas por ligeira pressão

dos últimos segmentos abdominais, sendo o material diluído em solução fisiológica e examinado a fresco com aumento de 400x. Novas amostras foram coletadas em intervalos de 5 à 7 dias.

Após a comprovação da infecção intestinal, foram coletadas amostras hemolinfáticas para comprovar e determinar o período aproximado da invasão. Para esse exame, foi realizada a secção do tarso de uma única pata (Marquez *et al*, 2006) e o material coletado examinado a fresco.

#### **2.4.5 Determinação do período aproximado da invasão das glândulas salivares através de transmissão por picada**

Triatomíneos que apresentaram *T. rangeli* na hemolinfa foram colocados para sugar em camundongos albinos (Swiss 44), com 1, 3, 5, 7, 9 dias após essa comprovação (Cuba Cuba, 1974).

A transmissão foi considerada positiva, com visualização de formas tripomastigotas sanguíneas nos camundongos, através de exames de sangue a fresco e xenodiagnóstico.

Quarenta e dois dias após o repasto infectante, as glândulas salivares dos triatomíneos sobreviventes, foram extraídas e imediatamente examinadas para a identificação da presença de parasitos (Machado *et al*, 2001).

Para o estudo da morfogênese de *T. rangeli* no intestino, hemolinfa e glândulas salivares as amostras foram coradas e as formas mais representativas fotografadas no Zeiss Axiophot com aumentos de 400 - 1.000x.

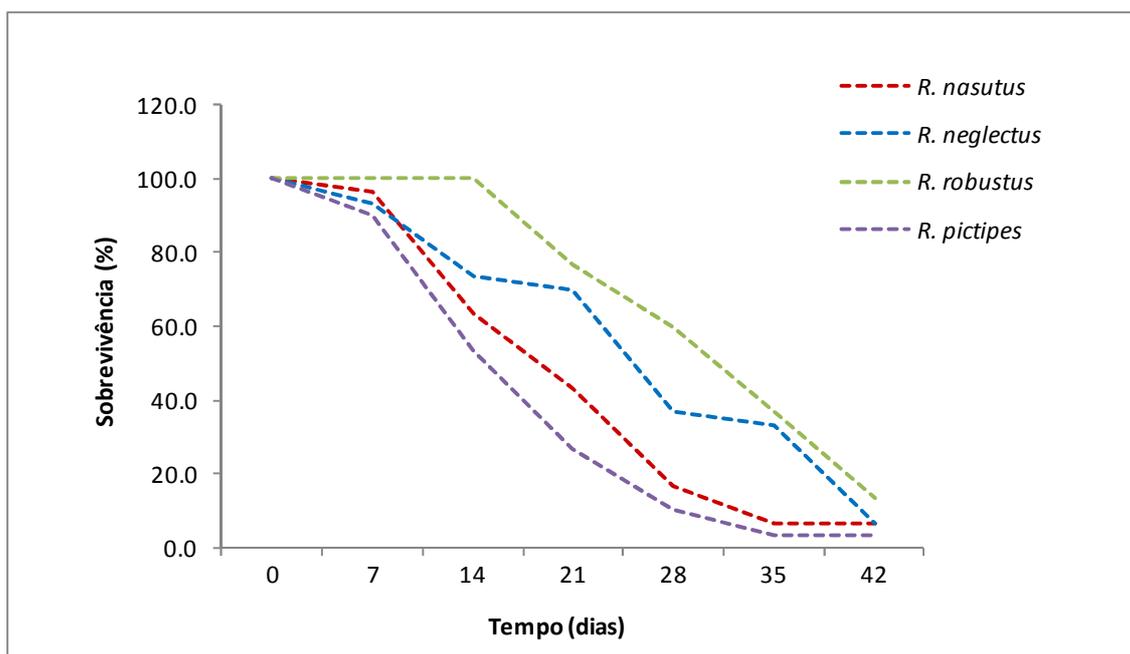
#### **2.4.6 Conseqüências do parasitismo**

Foram registradas e quantificadas as conseqüências do parasitismo (rejeição de alimentação, deformações durante a muda) diariamente, ao longo do experimento.

## 2.5 Resultados

### 2.5.1 Taxa de sobrevivência

As curvas de sobrevivência apresentaram uma queda ao longo do experimento (Figura 2.2). Os *R. pictipes* apresentaram uma menor taxa de sobrevivência em todas as análises realizadas, sendo que aos 28 dias, apresentavam apenas 10% de espécimes vivos, menor taxa entre as quatro espécies.



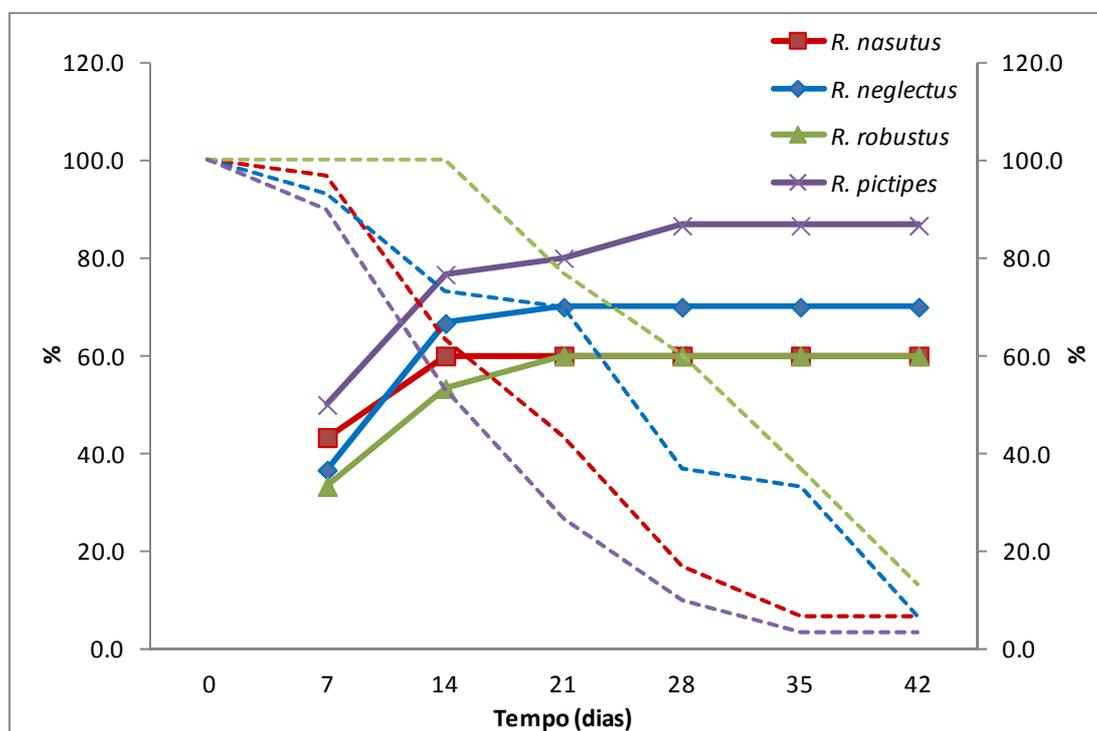
**Figura 2.2** Taxa de sobrevivência dos espécimes de *Rhodnius* (*R. nasutus*, *R. neglectus*, *R. robustus* e *R. pictipes*) infectados com *Trypanosoma rangeli* (SC-58, KP1-) entre 7 e 42 dias após repasto infectante.

### 2.5.2 Infecções intestinais

O exame do conteúdo intestinal dos triatomíneos, demonstrou que aos 7 dias, 15 espécimes (50%) de *R. pictipes* já apresentavam grande número de flagelados epimastigotas nas fezes, dados superiores aos das outras espécies (Figura 2.3).

De acordo com os resultados, os *R. pictipes* apresentaram um maior percentual de infectados em um menor período de tempo e também um

aumento gradual quando comparados com as outras três espécies de *Rhodnius*.



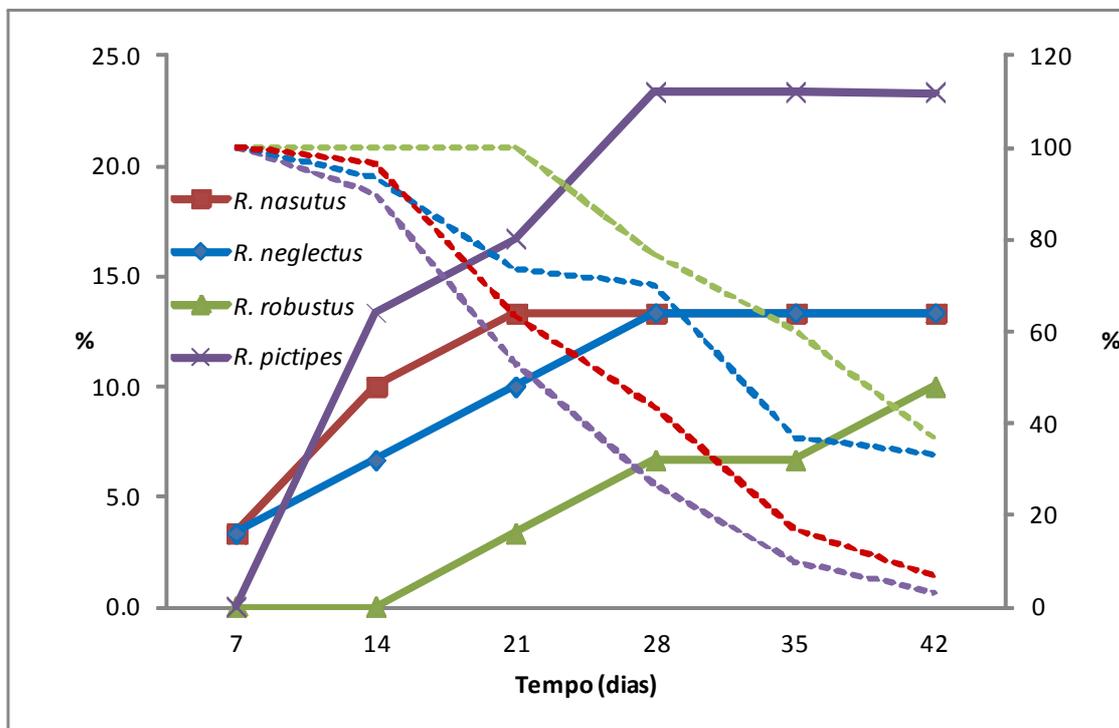
**Figura 2.3** Relação entre a positividade acumulada de fezes e a taxa de sobrevivência (tracejado) dos espécimes de *Rhodnius* (*R. nasutus*, *R. neglectus*, *R. robustus* e *R. pictipes*) infectados com *Trypanosoma rangeli* (SC-58, KP1-) entre 7 e 42 dias após repasto infectante.

### 2.5.3 Infecções hemolinfáticas

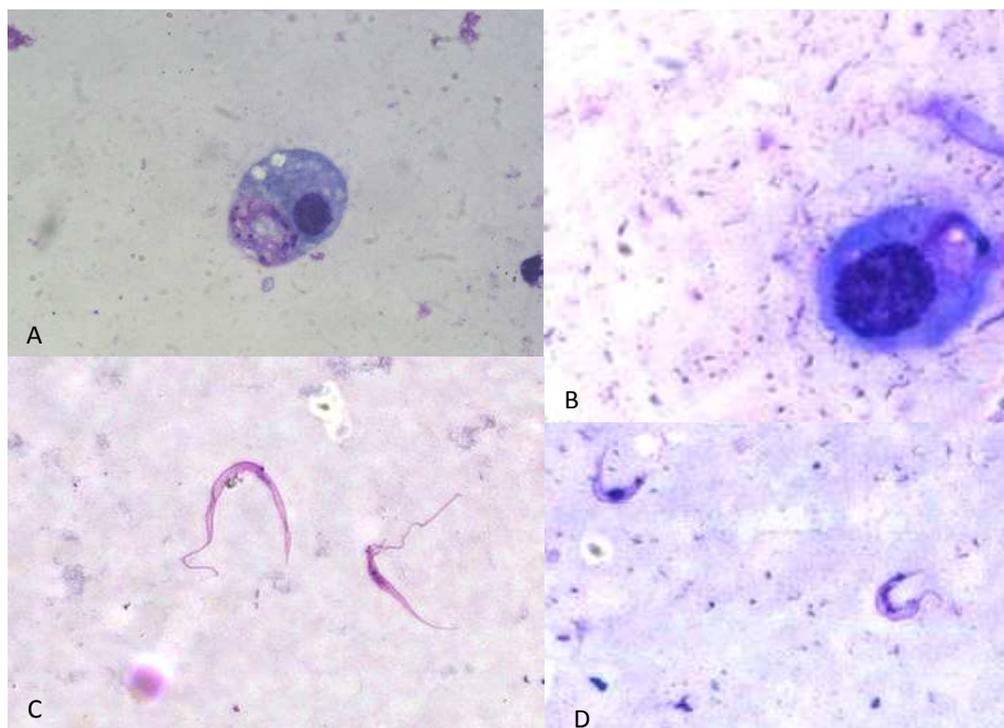
Todas as espécies de *Rhodnius* analisadas apresentaram parasitos na hemolinfa (epimastigotas e tripomastigotas), entretanto o parasitismo foi menor nas espécies da linhagem “robustus”. *R. nasutus* e *R. neglectus*, com 7 dias após a infecção, apresentaram apenas 1 espécime cada (3,3%) com formas flageladas na hemolinfa, sendo que ao final de 21 dias e 28 dias, respectivamente, eles apresentaram um total de 4 espécimes (13,3%) positivos (Figura 2.4).

Já *R. robustus* demonstrou o primeiro espécime infectado na hemolinfa (Figura 4) com 21 dias após a infecção, totalizando três (10%) positivos aos 40 dias.

*R. pictipes* demonstrou a maior taxa de infecção hemolinfática, com 4 espécimes (13,3%), já aos 14 dias após infecção, totalizando 7 exemplares (23,3%) com hemolinfa infectada ao final de 28 dias. Nesses espécimes foram detectadas formas flageladas (em divisão) no interior dos hemócitos, assim como formas tripomastigotas (Figura 2.5).



**Figura 2.4** Relação entre a positividade acumulada da hemolinfa e a taxa de sobrevivência (tracejado) dos espécimes de *Rhodnius* (*R. nasutus*, *R. neglectus*, *R. robustus* e *R. pictipes*) infectados com *Trypanosoma rangeli* (SC-58, KP1-) entre 7 e 42 dias após repasto infectante.



**Figura 2.5** Morfogênese de *Trypanosoma rangeli* (SC-58, KP1-) na hemolinfa e glândulas salivares de *Rhodnius* spp. A. Flagelados no interior de hemócito de *R. pictipes*. B. Tripomastigota intracelular em *R. pictipes*. C. Epimastigotas em amostras de hemolinfa de *R. robustus*. D. Tripomastigotas metacíclicos em amostras de glândulas salivares de *R. pictipes*.

#### **2.5.4 Determinação do período aproximado da invasão das glândulas salivares através de transmissão por picada**

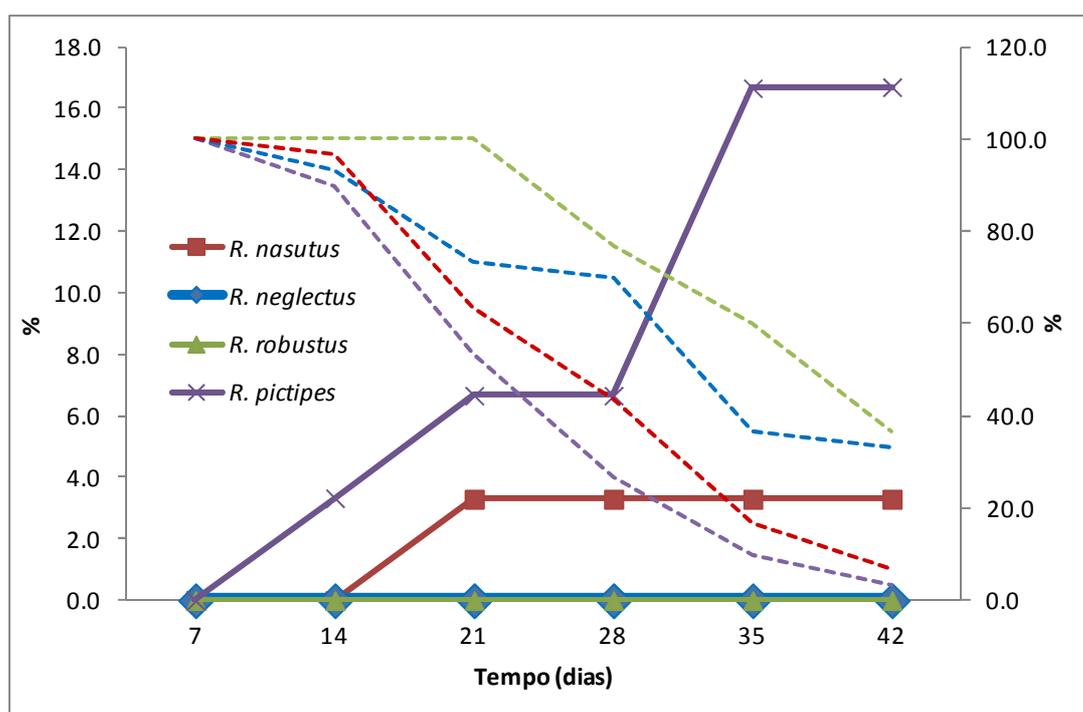
Foram realizadas 6 tentativas de transmissão por picada com os 4 espécimes (13,3%) de *R. nasutus* que apresentaram a hemolinfa infectada. Desses, apenas um exemplar (3,3%) transmitiu por picada em camundongos, comprovando a invasão glandular e essa transmissão ocorreu com três dias após a invasão hemolinfática, totalizando 16 dias após o repasto infectante (Figura 2.6). Os que não tiveram sucesso nessa transmissão tiveram suas glândulas extraídas e não apresentaram *T. rangeli*.

Para *R. neglectus* realizou-se 8 tentativas com os 4 espécimes positivos na hemolinfa, todos picaram o camundongo, mas não transmitiram o parasito. Ao final dos 42 dias, as glândulas salivares foram extraídas, e também não apresentaram positividade.

Dos três *R. robustus* que apresentaram invasão hemolinfática (10%), nenhum transmitiu por picada (nenhum picou) e após a extração também não observou-se infecção glandular.

Com os *R. pictipes*, foram realizadas 8 tentativas de transmissão por picada, com 4 exemplares. Desses, apenas 2 (6,7%) picaram, e tiveram sucesso na transmissão, o que ocorreu com 2 e 3 dias após a invasão hemolinfática, totalizando 15 e 17 dias após o repasto infectante. Não houve sucesso na extração de todas as glândulas, mas das três extraídas, todas apresentaram infecção glandular com presença de tripomastigotas (Figura 2.5).

Ao final dos 42 dias após a infecção, foi realizada a extração da glândula dos triatomíneos sobreviventes: um exemplar (3,3%) de *R. nasutus* e *R. pictipes* e dois (6,7%) de *R. neglectus* e *R. robustus*. Desses, apenas o de *R. pictipes* apresentou infecção glandular.



**Figura 2.6** Relação entre a positividade acumulada das glândulas salivares e a taxa de sobrevivência (tracejado) dos espécimes de *Rhodnius* (*R. nasutus*, *R. neglectus*, *R. robustus* e *R. pictipes*) infectados com *Trypanosoma rangeli* (SC-58, KP1-) entre 7 e 42 dias após repasto infectante e por dissecação dos sobreviventes.

A partir da análise dos três gráficos (Figuras 2.3, 2.4 e 2.6), observa-se que existe certo grau de associação entre o parasitismo hemolinfático e glandular, especialmente, com as taxas de sobrevivência das espécies estudadas experimentalmente, e o potencial patogênico do *T. rangeli* utilizado, afetando diferencialmente os triatomíneos.

### 2.5.5 Consequências do parasitismo

Durante os experimentos, observou-se que 100% dos triatomíneos com infecção hemolinfática rejeitaram o repasto quando colocados frente a um camundongo, pelo menos uma vez. Entre todas as espécies observou-se a presença de algumas deformações nas mudas, como patas e probóscides tortuosas e certa dificuldade na ecdise (Figura 2.7) e na digestão do repasto (Figura 2.8), sendo que para *R. pictipes* essas deformidades foram mais frequentes (67%) do que para *R. robustus* (16%), *R. neglectus* (14%) e *R. nasutus* (10%).



**Figura 2.7** *Rhodnius pictipes* com deformações nas patas, probóscides e mortos durante a muda.



**Figura 2.8** *Rhodnius robustus* encontrado morto após 30 dias do repasto infectante, com o abdômen ainda cheio de sangue, sem conseguir digerir o repasto infectante.

## 2.6 Discussão

As quatro espécies estudadas foram suscetíveis à infecção por *T. rangeli* a diferentes níveis, sendo que *R. pictipes* demonstrou um maior índice de infecção intestinal, hemolinfática e glandular. Nossos dados de infecção intestinal de *R. pictipes* (76,7% em 14 dias) podem ser comparados aos obtidos por Cuba Cuba (1974), que utilizando uma cepa peruana de *T. rangeli* (KP1-) obteve 83% de infecções intestinais em *R. ecuadoriensis* aos 15 dias após o repasto.

Já com relação à invasão hemolinfática, Machado *et al*, (2001) utilizando a mesma cepa do presente trabalho (SC-58, KP1-), observou infecção glandular em *R. nasutus* e *R. neglectus*, porém em proporção menor quando comparado à outra cepa (Choachi/KP1+) que se desenvolveu muito melhor nessas espécies da linhagem “robustus”. O mesmo foi observado por nós ao compararmos o desenvolvimento da cepa SC-58. As espécies da linhagem “robustus” apresentaram um percentual menor de infectados na hemolinfa que os *R. pictipes*.

A morfogênese estudada nesse trabalho seguiu o padrão esperado para as infecções de *Rhodnius spp.* por *T. rangeli* (Cuba Cuba, 1975), com presença de epimastigotas intestinais, divisão intracelular nos hemócitos e formas

extracelulares epimastigotas em divisão na hemolinfa e formação de tripomastigotas metacíclicos nas glândulas, no caso de *R. pictipes*.

Isolados de *T. rangeli* de diferentes origens geográficas apresentam um comportamento variável em diferentes espécies de *Rhodnius*, e a transmissão por picada é praticamente restrita ao vetor local (D'Alessandro & Saravia, 1999, Guhl & Vallejo, 2003, Vallejo *et al*, 2003). A diferença de suscetibilidade entre as espécies de *Rhodnius*, para as cepas de *T. rangeli*, reforça a existência de uma relação complexa entre vetor e parasito, e mostra que a capacidade de *T. rangeli* para alcançar a hemolinfa e glândulas salivares do inseto é dependente tanto da cepa utilizada como das espécies de triatomíneos (Machado *et al*, 2001). O presente trabalho mostra pela primeira vez que *R. pictipes* é suscetível à cepa *T. rangeli* (SC-58, KP1-), como esperado considerando hipóteses de co-evolução parasito-vetor (Vallejo *et al*, 2009, Urrea *et al*, 2011).

De acordo com Urrea *et al.* (2011) o fato de que genótipos idênticos de *T. rangeli* foram isolados em vetores de uma mesma linhagem evolutiva como *R. prolixus*, *R. robustus* e *R. neglectus* suporta uma associação co-evolutiva possível entre *T. rangeli* e seus vetores, o que significa que provavelmente esses genótipos apresentam as mesmas características biológicas, bioquímicas e moleculares determinando sua associação com a linhagem “robustus”.

Apesar da presença de *T. rangeli* na hemolinfa de todas as quatro espécies de triatomíneos desse estudo, apenas *R. pictipes* e *R. nasutus* apresentaram invasão glandular. Ambas as espécies tem sido reportadas infectadas naturalmente. Podemos considerar que, algumas espécies de triatomíneos dos gêneros *Triatoma* e *Panstrongylus* se infectam com *T. rangeli* atingindo a hemolinfa, porém nunca com invasão das glândulas salivares. Esses seriam então, insetos “permissivos” ao parasito, porém não vetores do mesmo. Nada se sabe do porque desse fato, é o que acontece, por exemplo, com *Panstrongylus herreri* (Cuba Cuba, 1973). A infecção glandular de *R. nasutus* por *T. rangeli* (SC-58, KP1-) já havia sido evidencia por Machado *et al.* (2001), porém com proporção menor comparando com a infecção com a cepa Choachi (KP1+).

Com relação ao estabelecimento do período aproximado em que a cepa SC-58 de *T. rangeli* levou para invadir as glândulas salivares dos triatomíneos,

nossas observações são bem semelhantes às descritas por Castaño *et al.* (2001), que estudando o desenvolvimento da cepa Choachi de *T. rangeli* em *R. prolixus*, observou flagelados nas glândulas salivares apenas depois do 10º dia após a infecção, dado também observado por Cuba Cuba (1974) em *Rhodnius ecuadoriensis*.

Embora o achado de *T. cruzi* no intestino de um triatomíneo indicar risco de transmissão, o achado de *T. rangeli* no intestino não pode ser tomado como indicação da capacidade vetorial do inseto. Prova definitiva é a presença de tripomastigotas metacíclicos de *T. rangeli* nas glândulas salivares, que poderá ser transmitido aos vertebrados durante o repasto sanguíneo (Vallejo *et al.*, 2009). No presente estudo, as espécies da linhagem “robustus” apresentaram um percentual menor de infecção glandular que os *R. pictipes*, comprovando que existe a possibilidade de espécimes de *Rhodnius* da linhagem “robustus” desenvolver infecção glandular e transmitir o *T. rangeli* (KP1-), mas numa probabilidade muito menor que a linhagem “pictipes”.

Pulido *et al.* (2008) com a incubação de uma cepa de *T. rangeli* em hemolinfa de *R. prolixus* indicaram a existência de uma **proteína tripanolítica** que age contra o *T. rangeli* (KP1-) isolado de *R. colombiensis* da Colômbia, mas não contra um *T. rangeli* (KP1+) isolado de *R. prolixus* da Colômbia. De acordo com Vallejo *et al.* (2009), o fator lítico da hemolinfa de *R. prolixus* parece agir como uma barreira biológica. A ocorrência dessa proteína proteolítica nas outras espécies do complexo “prolixus” ou linhagem “robustus” (*R. robustus*, *R. neglectus*, *R. nasutus*) poderia impedir o desenvolvimento glandular e a transmissão de *T. rangeli* (KP1-) pelas mesmas. Isso sugere que, no seu estado natural, algumas espécies *Rhodnius* são filtros biológicos para certas populações de parasitas, confirmando uma estreita associação co-evolutiva entre as duas subpopulações de *T. rangeli* e as duas principais linhas evolutivas do gênero *Rhodnius*.

Sabe-se que o *T. rangeli* pode ser patogênico para o hospedeiro invertebrado, e parece que essa patogenicidade está relacionada ao número de parasitos na hemolinfa, à intensidade de infecção e ao grau de invasão no inseto (Watkins, 1971, D’Alessandro & Saravia, 1992).

A rejeição do repasto quando colocado frente a um camundongo, para a possível transmissão por picada, provavelmente está relacionada com a

infecção por *T. rangeli*, já que foram observadas algumas deformações na probóscide após a ecdise. De acordo com Garcia *et al.* (1994) e com Schaub (2006), os tripanossomatídeos parecem mudar o comportamento do vetor. Os triatomíneos infectados tornam-se mais lentos na alimentação, na locomoção e apresentam uma concentração reduzida da enzima apirase salivar, responsável pela inibição da coagulação sanguínea, aumentando assim a possibilidade de inoculação intradérmica de parasitas no hospedeiro mamífero.

As deformações nas mudas, que foram mais freqüentes para *R. pictipes*, as dificuldades na ecdise e na digestão do repasto presentes nos triatomíneos desse estudo, também podem ser explicadas pela infecção por *T. rangeli*. De acordo com Guhl & Vallejo (2003), o efeito patológico do *T. rangeli* no *R. prolixus* foi detectado primeiramente por Grewal (1956), que observou uma quantidade aumentada de hemolinfa e de deformidades na muda que levaram a uma mortalidade elevada. Já Cuba Cuba (1973, 1975), observou interferência do *T. rangeli* na ecdise em *R. ecuadoriensis* e *Panstrongylus herreri*. Posteriormente, Añez (1984) apresentou dados de mortalidade de grupos experimentais de *R. prolixus* infectados por *T. rangeli* (39%) e não infectados (5%) e de *R. robustus* (46% e 12%), confirmando o potencial patogênico deste parasito, fato também demonstrado no presente estudo que apresentou uma alta mortalidade (87 a 97%) dos triatomíneos das quatro espécies estudadas durante o período de 40 dias após o repasto infectante, sendo que *R. pictipes* se destacou com o maior percentual em menor tempo após o repasto.

## 2.7 Conclusões

- ✓ A infectividade da cepa SC-58 de *T. rangeli* (KP1-) foi mais elevada e mais eficiente (por completar o ciclo evolutivo do flagelado) em *R. pictipes*, que é pertencente à linhagem “pictipes”, do que nas espécies de *Rhodnius* da linhagem “robustus” (*R. robustus*, *R. neglectus* e *R. nasutus*), confirmando as teorias vigentes de co-evolução entre *T. rangeli* e *Rhodnius spp.* Podemos considerar que *R. pictipes* é um vetor biológico com competência comprovada através deste trabalho e dos achados feitos na natureza, já publicados.

- ✓ *R. pictipes* também apresentou uma menor taxa de sobrevivência e maior percentual de deformações nas mudas, como patas e probóscides tortuosas e certa dificuldade na ecdise quando comparado às espécies da linhagem “robustus”, fato que comprova um maior grau de patogenicidade da cepa SC-58 (KP1-) sobre essa espécie.

## 2.8 Referências Bibliográficas

Abad-Franch F, Monteiro FA. Biogeography and evolution of Amazonian triatomines (Heteroptera: Reduviidae): implications for Chagas disease surveillance in humid forest ecoregions. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2007; 102 Suppl 1:57-70.

Abad-Franch F, Monteiro FA, Jaramillo ON, Gurgel-Goncalves R, Dias FB, Diotaiuti L. Ecology, evolution, and the long-term surveillance of vector-borne Chagas disease: a multi-scale appraisal of the tribe Rhodniini (Triatominae). *Acta Trop*. 2009; 110:159-177.

Añez N. Studies on *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920. VII - Its effect on the survival of infected triatomine bugs. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1984; 79:249–255.

Castaño MTP, Moreno MM, Martí CAZ. Estudio del comportamiento de dos cepas de *Trypanosoma rangeli*. *MedUNAB* 2001; 4(12):166-172.

Cuba Cuba CA. Evolução de uma cepa peruana de *Trypanosoma rangeli* em *Rhodnius ecuadoriensis* e *Panstrongylus herreri*. [Dissertação de Mestrado]. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais. 1973.

Cuba Cuba CA. Estudo de uma cepa peruana de *Trypanosoma rangeli* II. Observações sobre a infecção experimental de *Rhodnius ecuadoriensis*. *Rev Inst Med Trop*. 1974; 16(1):19-27.

Cuba Cuba CA. Estudo de uma cepa peruana de *Trypanosoma rangeli* IV. Observações sobre a evolução e morfogênese do *T. rangeli* na hemocele e nas

glândulas salivares de *Rhodnius ecuadoriensis*. Rev Inst Med Trop. 1975; 17:284-297.

Cuba Cuba CA. Revisión de los aspectos biológicos y diagnósticos del *Trypanosoma (Herpetosoma) rangeli*. Rev Soc Bras Med Trop. 1998; 31:207-220.

D'Alessandro A. Biology of *Trypanosoma (Herpetosoma) rangeli* Tejera, 1920. In WHR Lumsden & DA Evans, Biology of Kinetoplastida, Vol. 1, Academic Press, London, New York and San Francisco. 1976; 327-493.

D'Alessandro A, Saravia NG. *Trypanosoma rangeli*, In: Kreier J. Baker JR (eds) Parasitic Protozoa, 2<sup>a</sup> Ed., Academic Press, New York. 1992; 2:1-54.

D'Alessandro A, Saravia NG. *Trypanosoma rangeli*. In: Protozoal Diseases. Edited by: Gilles HM., Ed. Arnold. 1999; 398- 412.

Garcia ES, Mello CB, Azambuja P, Ribeiro JM. *Rhodnius prolixus*: salivary antihemostatic components decrease with *Trypanosoma rangeli* infection. Exp Parasitology. 1994; 78:287-293.

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

Grisard EC, Steindel M, Guarneri AA. Characterization of *Trypanosoma rangeli* Strains Isolated in Central and South America: an Overview. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1999; 94(2):203-209.

Groot H. Further observations on *Trypanosoma ariarii* of Colombia South America. Am J Trop Med Hyg. 1952; 1:585-592.

Guhl F, Vallejo GA. *Trypanosoma (Herpetosoma) rangeli* Tejera, 1920: an updated review. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2003; 98(4):435-442.

Gurgel-Gonçalves R, Abad-Franch F, Ferreira JBC, Barreto-Santana D, Cuba-Cuba CA. Is *Rhodnius prolixus* (Triatominae) invading houses in central Brazil? Acta Tropica. 2008; 107:90-98.

Macedo AM, Vallejo GA, Chiari E, Pena SDJ. DNA fingerprinting reveals relationships between strains of *Trypanosoma rangeli* and *Trypanosoma cruzi*. In: Pena SDJ, Chakraborty R, Epplen JT, Jeffreys AJ. (Eds.), DNA Fingerprinting: State of the Science. Birkhauser Verlag, Basel, Switzerland. 1993; 321–329.

Machado PE, Eger-Mangrich I, Rosa G, Koerich LB, Grisard EC, Steindel M. Differential susceptibility of triatomines of the genus *Rhodnius* to *Trypanosoma rangeli* strains from different geographical origins. Int J Parasitol. 2001; 31:632-634.

Maia da Silva F, Junqueira AC, Campaner M, Rodrigues AC, Crisante G, Ramirez LE, et al. Comparative phylogeography of *Trypanosoma rangeli* and *Rhodnius* (Hemiptera: Reduviidae) supports a long coexistence of parasite lineages and their sympatric vectors. Mol Ecol. 2007; 16:3361–3373.

Marquez AS, Rodrigues-Ottaiano C, Oliveira RM, Pedrosa AL, Cabrine-Santos M, Lages-Silva E, et al. Susceptibility of different triatomine species to *Trypanosoma rangeli* experimental infection. Vector Borne Zoonotic Dis. 2006; 6(1):50-56.

Mejía GD. Aspectos ecológicos de populações silvestres de *Triatominae* (Hemiptera: Reduviidae) em palmeiras *Attalea speciosa* (Arecaceae) e estimativa do risco ambiental para a transmissão de *Trypanosomatidae* (Kinetoplastida) em uma frente pioneira de desmatamento (Pará-Brasil). [Dissertação de Mestrado]. Brasília: Universidade de Brasília. 2005.

Pineda JP, Luquetti A, Castro C. Comparação entre o xenodiagnóstico clássico e artificial na fase crônica da doença de Chagas. Rev Soc Bras Med Trop. 1998; 31(5):473-480.

Pulido XC, Perez G, Vallejo GA. Preliminary characterization of a *Rhodnius prolixus* hemolymph trypanolytic protein, this being a determinant of *Trypanosoma rangeli* KP1(+) and KP1(-) subpopulations' vectorial ability. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2008; 103(2):172-179.

Rocha DS, Fonseca AH, Costa FA, Jurberg J, Galvão C. Desenvolvimento de *Rhodnius pictipes* Stal, 1872 alimentado através de membrana de silicone e em camundongos (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). Mem Inst Oswaldo Cruz. 1997; 92(4):553-558.

Schaub GA. Parasitogenic alterations of vector behaviour. Int J Med Microbiol. 2006; 296 Suppl 1:37–40.

Steindel M, Carvalho-Pinto CJ, Toma HK, Mangia RHR, Ribeiro-Rodrigues R, Romanha AJ. *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920 isolated from a sylvatic rodent (*Echimyus dasythrix*) in Santa Catarina State: First report of this trypanosome in southern Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1991; 86:73-79.

Steindel M, Dias-Neto E, Carvalho-Pinto CJ, Grisard E, Menezes C, Murta SMF, et al. Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) and isoenzyme analysis of *Trypanosoma rangeli* strains. J Euk Microbiol. 1994; 41:261–267.

Urrea DA, Guhl F, Herrera CP, Fallab A, Carranza JC, Cuba Cuba CA, et al. Sequence analysis of the spliced-leader intergenic region (SL-IR) and random amplified polymorphic DNA (RAPD) of *Trypanosoma rangeli* strains isolated from *Rhodnius ecuadoriensis*, *R. colombiensis*, *R. pallescens* and *R. prolixus* suggests a degree of co-evolution between parasites and vectors. Acta Trop. 2011; 120:59-66.

Vallejo GA, Macedo AM, Chiari E, Pena SDJ. Kinetoplast DNA from *Trypanosoma rangeli* contains two distinct classes of minicircle with different size and molecular organization. Mol. Biochem. Parasitol. 1994. 67:245–253.

Vallejo GA, Guhl F, Carranza JC, Lozano LE, Sánchez JL, Jaramillo JC, et al. kDNA markers define two major *Trypanosoma rangeli* lineages in Latin America. Acta Tropica. 2002; 81:77-82.

Vallejo GA, Guhl F, Carranza JC, Moreno J, Triana O, Grisard EC. Parity between kinetoplast DNA and miniexon 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. 2003; 3:39-45.

Vallejo GA, Guhl F, Schaub GA. Triatominae-*Trypanosoma cruzi*/*T. rangeli*: Vector-parasite interactions. *Acta Tropica*. 2009; 110:137-147.

Watkins R. Histology of *Rhodnius prolixus* infected with *Trypanosoma rangeli*. *J Invert Pathol*. 1971; 117:59-66.

### Capítulo III

**Invasão do *Trypanosoma rangeli* em glândulas salivares de *Rhodnius robustus*: um estudo morfológico e ultraestrutural.**

### 3.1 Resumo

*Trypanosoma rangeli* é um protozoário que infecta diversas espécies de triatomíneos e mamíferos, incluindo o homem. Espécimes de *Rhodnius* são vetores biológicos de *T. rangeli*, sendo capazes de desenvolver tripomastigotas metacíclicos em suas glândulas salivares em circunstâncias naturais e experimentais. O objetivo deste trabalho foi investigar a penetração e a invasão do *T. rangeli* em glândulas salivares e sua morfogênese, em *R. robustus*. Foram analisadas glândulas salivares obtidas a partir de infecção experimental de *R. robustus* com a cepa SC-58 de *T. rangeli* e a partir da incubação *in vitro* de glândulas desses insetos com culturas do parasito. As glândulas foram preparadas e analisadas usando Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) e Microscópio Eletrônico de Transmissão (MET). Cortes histológicos de glândulas também foram analisados em Microscópio Óptico. As imagens do MEV demonstraram que as glândulas salivares dos espécimes do grupo controle apresentaram a maior parte da lâmina basal lisa, com pequenos enrugamentos e fissuras. As glândulas dos insetos infectados apresentaram na área próxima ao ducto salivar, um aglomerado de parasitos aderidos pelo flagelo. Verificou-se também a presença de flagelados soltos pela membrana basal com características de epimastigotas e tripomastigotas longos, estes últimos com uma membrana ondulante bem nítida, partindo da parte posterior. No MET, pôde-se identificar, nas glândulas do grupo controle, a membrana basal, células secretoras com núcleo proeminente, citoplasma rico em ribossomos, pequenas mitocôndrias e lúmen preenchido. Nas glândulas que passaram pelo processo de infecção *in vitro*, com 30 minutos de infecção, observou-se a presença de vários cortes transversais e longitudinais de tripanossomas com características de epimastigotas, espalhados pelo lúmen da glândula. Com 1 hora e com 3 horas de infecção, não se observou tripanossomas espalhados pelas glândulas. As glândulas infectadas via repasto artificial, apresentaram parasitos com características de epimastigotas e tripomastigotas. Observou-se a presença de vários parasitos juntos, alguns aderidos às microvilosidades e outros dispersos no lúmen. Os cortes histológicos, não demonstraram a presença de flagelados. Esses resultados mostram que o fenômeno inicial de penetração nas glândulas salivares se daria

por formas tripomastigotas e/ou epimastigotas, penetrando pela extremidade posterior e pelo flagelo, e mostram várias formas de flagelados nas glândulas salivares – epimastigotas e tripomastigotas espalhadas na luz glandular.

Palavras-Chave: *Rhodnius robustus*; *Trypanosoma rangeli*; infecção experimental; suscetibilidade; glândulas salivares; Microscopia Eletrônica de Varredura; Microscopia Eletrônica de Transmissão; Microscopia Óptica.

### 3.2 Abstract

*Trypanosoma rangeli* is a protozoan that infects several species of triatomines and mammals, including the men. *Rhodnius* species are biological vectors of *T. rangeli*, capable of developing metacyclic trypomastigote in their salivary glands, under natural and experimental conditions. The main aim of this study was investigate the attachment and invasion of *T. rangeli* in the salivary glands and its morphogenesis in *R. robustus*. Salivary glands obtained from experimental infection of *R. robustus* with the *T. rangeli* strain SC-58 and from in vitro incubation of glands of these insects with parasite cultures were analyzed. The glands were prepared and analyzed using scanning electron microscopy (SEM) and transmission electron microscopy (TEM). Histological sections of glands were also analyzed under optical microscopy. The SEM images demonstrated that the salivary gland control specimens showed the largest part of smooth basal lamina, with little and small wrinkled and cracks surface. The infected ones insects showed in the area, near salivary duct, an clumps of parasites adhered by the flagellate. It was also checked the presence of loosed sparse flagellates along the basal membrane with characteristics of long epimastigote and trypomastigote, the last ones with a very clear wavy membrane coming from posterior part. On TEM analysis of the control glands were identified the basal membrane, secreting cells with a prominent core, cytoplasm rich in ribosomes, small mitochondrias and full lumen. In the glands that passed for in vitro infection process, with 30 minutes of infection, it was observed the presence of many transversal and longitudinal sections of trypanosomes with epimastigote characteristics, spread on the gland lumen. No spread trypanosomes were observed in the glands with 1 or 3 hours of infection. The infected glands by artificial repast showed parasites with epimastigote and trypomastigote characteristics. Several parasites were present, some adhered to microvili and some other ones loosed in the lumen. The histological sections didn't demonstrate any flagellate presence. These results show that the initial phenomenon of penetration in salivary glands occurs for trypomastigote and/or epimastigote posterior ends and flagella. They show many forms of flagellates in salivary glands – epimastigotes e trypomastigotes spread in gland lumen.

Keywords: *Rhodnius robustus*; *Trypanosoma rangeli*; experimental infection; susceptibility; salivary glands; Scanning Electron Microscopy; Transmission Electron Microscopy; Optical Microscopy.

### 3.3 Introdução

O ciclo de vida do *Trypanosoma rangeli* (Tejera, 1920) no hospedeiro invertebrado se inicia com a ingestão de formas tripomastigotas sanguíneas dos hospedeiros vertebrados. Os parasitos, em seguida, colonizam o tubo digestivo dos insetos, se aderem na parede intestinal e diferenciam-se em formas epimastigotas, que são capazes de se multiplicar e atravessar o epitélio intestinal. Depois de alcançar a hemolinfa, os parasitos invadem os hemócitos, se multiplicam na hemolinfa e migram infectando as glândulas salivares, mas as fases de desenvolvimento responsáveis pela penetração da glândula e os mecanismos envolvidos neste processo ainda permanecem pouco conhecidos (Meirelles *et al*, 2005).

A travessia do *T. rangeli*, do lúmen intestinal para a hemocele, e deste compartimento à luz da glândula salivar, são etapas críticas do ciclo de vida do *T. rangeli* no hospedeiro invertebrado. Os estudos ultraestruturais sobre a penetração do *T. rangeli* em células do intestino médio (Hecker *et al*, 1990, Oliveira & Souza, 2001) e glândulas salivares (Ellis *et al*, 1980) de *R. prolixus* foram realizados, mas existe controvérsia sobre os mecanismos utilizados pelos tripanossomas para penetrar e atravessar esse epitélio. Watkins (1971) relatou a presença de áreas danificadas no epitélio intestinal de *R. prolixus* infectados com *T. rangeli*. Oliveira & Souza (2001) sugeriram que o parasito atravessa o citoplasma das células intestinais, causando dano celular. No entanto, foi também proposto que o *T. rangeli* cruza a barreira intestinal através de uma via intracelular sem danificar as células (Hecker *et al*, 1990).

Recentemente, Meirelles *et al.* (2005) relataram aspectos do processo de invasão das glândulas salivares em *R. domesticus* e Barreto-Santana (2006) em glândulas de *R. robustus* utilizando experimentos *in vitro*. Entretanto ainda permanecem obscuros alguns aspectos sobre a morfologia das formas intracelulares (presente nas células glandulares), quais formas realmente penetram na membrana basal da glândula salivar e especialmente o processo de metaciclogênese, que aparentemente, se inicia no citoplasma das células glandulares.

Nesse sentido, o objetivo deste estudo foi investigar a invasão do *Trypanosoma rangeli* em glândulas salivares e sua morfogênese, em *Rhodnius*

*robustus*. Para isso foram realizados experimentos de infecção experimental *in vivo* e *in vitro* e as glândulas salivares (infectadas e não infectadas) foram analisadas histologicamente em Microscopia Óptica e ultraestuturalmente usando Microscópio Eletrônico de Varredura e Transmissão.

### **3.4 Material e Métodos**

#### **3.4.1 Material Biológico**

Os *Rhodnius robustus* utilizados para esses experimentos foram provenientes das colônias mantidas no Laboratório de Parasitologia Médica e Biologia de Vetores (FM/UnB), e foram coletados originalmente na área de Benfica, Marabá – PA (Mejía, 2005).

Os parasitos utilizados para as infecções experimentais foram provenientes da cepa brasileira de *Trypanosoma rangeli* (SC-58), que foi isolada por Steindel *et al.* (1991), de um roedor selvagem, *Echymys dasythrix* (Grisard *et al.*, 1999) e mantida criopreservada no Laboratório de Dermatologia da UnB.

#### **3.4.2 Métodos para a manutenção das colônias de insetos**

Os métodos foram os mesmos descritos no capítulo 2, páginas 31 e 32.

#### **3.4.3 Infecção dos triatomíneos por *T. rangeli***

Foram utilizadas três estratégias para a infecção dos triatomíneos por *T. rangeli*:

##### *3.4.3.1 Inoculação intraperitoneal*

Primeiramente, a infecção dos *R. robustus* por *T. rangeli* foi realizada utilizando-se camundongos (Swiss 44), que foram inoculados por via

intraperitoneal com altas concentrações ( $5 \times 10^7$  flagelados/ml) da cepa SC-58 de *T. rangeli*. Foram realizados 3 ensaios, cada um com cinco camundongos.

Vinte e quatro horas após a inoculação, uma amostra de sangue foi retirada a partir de um corte na cauda do camundongo, diluída com solução salina e analisada para verificar a positividade da infecção. Como houve negatividade, novas amostras foram coletadas a cada 48 horas após a inoculação.

Também para confirmação da infecção por *T. rangeli*, os camundongos foram utilizados como fonte de alimentação na tentativa de infectar os insetos saudáveis.

#### 3.4.3.2 Inoculação intracelômica

Também foi realizada uma inoculação intracelômica nos insetos, onde 5 µl (100.000 flagelados/ml) do pellet da cultura da cepa SC-58 (Machado *et al*, 2001), foi injetada diretamente na parte torácica dorsal abaixo da asa dos insetos (D'Alessandro & Saravia, 1992). Para confecção do pellet, 500µl da cultura foram colocados em um eppendorf e centrifugados por 10 minutos a 2.000 rpm. Foram realizados três ensaios, cada um com dez insetos.

Quarenta e oito horas após a inoculação, amostras hemolinfáticas foram coletadas por secção de uma das patas, para comprovar a invasão da hemolinfa. Como houve negatividade, novas amostras foram coletadas em intervalos que variavam entre 5 e 7 dias. À medida que os insetos morriam, fazia-se a dissecação das glândulas salivares e estas eram observadas a fresco, na tentativa de identificar a presença de flagelados.

#### 3.4.3.3 Repastos Artificiais

Repastos artificiais foram realizados com espécimes *R. robustus*. Para isso, foram selecionadas 25 ninfas de IV e V estádios.

Para o repasto artificial, 3 ml da cultura da cepa SC-58 ( $2,8 \times 10^7$ ) foram adicionados a 5 ml de sangue humano em tubos com heparina. O sangue infectante foi levado ao Laboratório de Doença de Chagas no Núcleo de Medicina Tropical, onde foi primeiramente colocado em banho-maria para

atingir a temperatura corporal ( $\pm 36,5^{\circ}\text{C}$ ), e depois levado ao aparelho de Repasto Artificial, onde as ninfas foram colocadas para a realização do repasto sanguíneo infectante. Ao término do procedimento, cada inseto foi colocado individualmente em um recipiente apropriado e identificado.

Depois de quatorze dias do repasto infectante, os conteúdos intestinais foram examinados microscopicamente. As dejeções foram obtidas por ligeira pressão dos últimos segmentos abdominais. Após a comprovação da infecção intestinal, amostras hemolinfáticas foram coletadas para comprovar a invasão da hemolinfa. Na negatividade, novas amostras foram coletadas em intervalos que variavam entre 5 e 7 dias.

Com 1, 3, 5, 7 e 9 dias após a comprovação da infecção hemolinfática, foram realizadas tentativas de transmissão do *T. rangeli* através da picada, durante o repasto sanguíneo em camundongos.

Como não houve sucesso na transmissão via picada, as glândulas dos insetos que apresentaram hemolinfa positiva, foram extraídas cortando-se a musculatura torácica dorsal e os corpos gordurosos do inseto, e puxando-se cuidadosamente a cabeça junto com as glândulas aderidas (Cuba Cuba, 1975). Após a extração, confirmou-se a presença de formas vivas de *T. rangeli*, levando as glândulas ao Microscópio Óptico.

Os insetos utilizados estavam em jejum prolongado (aproximadamente 30 dias), para não dificultar o encontro das glândulas pela presença do repasto sanguíneo.

#### **3.4.4 Estudo da invasão das glândulas salivares**

Após a extração, as glândulas salivares de *R. robustus* foram levadas ao Laboratório de Microscopia Eletrônica, do Instituto de Biologia – UnB e processadas para a análise em Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET).

No processamento para a análise em MEV:

1. Cada glândula foi colocada individualmente em um eppendorf com 150  $\mu\text{l}$  do fixador (2% glutaraldeído, 2% paraformaldeído, 3% de sacarose);

2. O fixador foi retirado e foram feitas 4 lavagens de 15 minutos com o tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,2;
3. O tampão foi retirado e colocou-se 2 gotas de ferricianeto de potássio e 2 gotas de tetróxido de ósmio;
4. Após a incubação por 1 hora, lavou-se as amostras 3 vezes com água destilada;
5. Iniciou-se o processo de desidratação com acetona 30%, 50%, 70% e 90% por 15 minutos cada uma, e 3 lavagens com acetona 100% por 10 minutos cada uma;
6. As amostras foram colocadas num suporte e levadas ao aparelho de secagem ao ponto crítico da Balzers CPD 30;
7. Após a secagem, as amostras foram presas em stubs e levadas ao aparelho Sputter Coater, Balzers SCD 050, para metalização;
8. Foram feitas duas amostragens de glândulas. Ao término do processamento, a primeira amostragem foi levada ao MEV JEOL JEM 840A e a segunda, ao MEV JEOL JSM 7001F para o registro das infecções.

E no processamento para a análise em MET:

1. Cada glândula foi colocada individualmente em um eppendorf e foi colocado 150 µl do fixador (2% glutaraldeído, 2% paraformaldeído, 3% de sacarose);
2. O fixador foi retirado e foram feitas 4 lavagens de 15 minutos com o tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,2;
3. O tampão foi retirado e colocou-se 2 gotas de ferricianeto de potássio e 2 gotas de tetróxido de ósmio;
4. Após a incubação por 1 hora, lavou-se as amostras 3 vezes com água destilada;
5. Iniciou-se o processo de desidratação com acetona 30%, 50%, 70% e 90% por 15 minutos cada uma, e 3 lavagens com acetona 100% por 10 minutos cada uma;
6. Foram feitos banhos de Resina Spurr, com o descanso de no mínimo 6 horas para cada um, na proporção Acetona : Resina – 2:1; 1:1; 1:2, e por fim Resina 100%;

7. Após o emblocamento, fez-se os cortes semifinos e os cortes ultrafinos utilizando-se o Micrótomo;
8. Os cortes ultrafinos de cada amostra foram colocados em telinhas individuais e após a secagem, estas foram levadas ao Microscópio Eletrônico de Transmissão JEOL 1011 para o registro das infecções.

#### **3.4.5 Infecção *in vitro* das glândulas salivares**

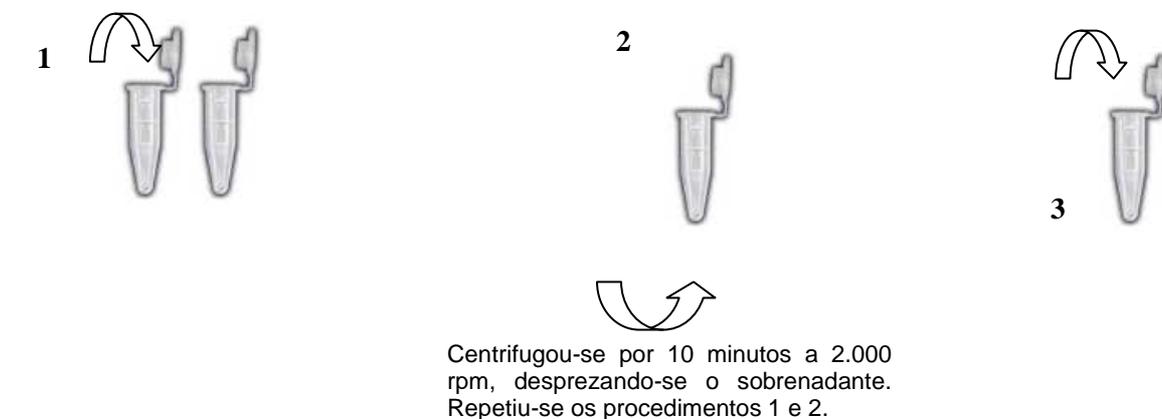
Baseando-se em Oliveira & Souza (2001) que aplicaram o modelo de estudo para intestino de *R. prolixus*, utilizamos um método modificado para o estudo da infecção *in vitro* das glândulas salivares através da Microscopia Eletrônica de Transmissão.

Primeiramente 20 adultos de *R. robustus* foram mantidos em jejum por um período de um mês, para a remoção das glândulas salivares. Para o controle, uma glândula salivar de um inseto não infectado, foi extraída e colocada diretamente no fixador para o processamento.

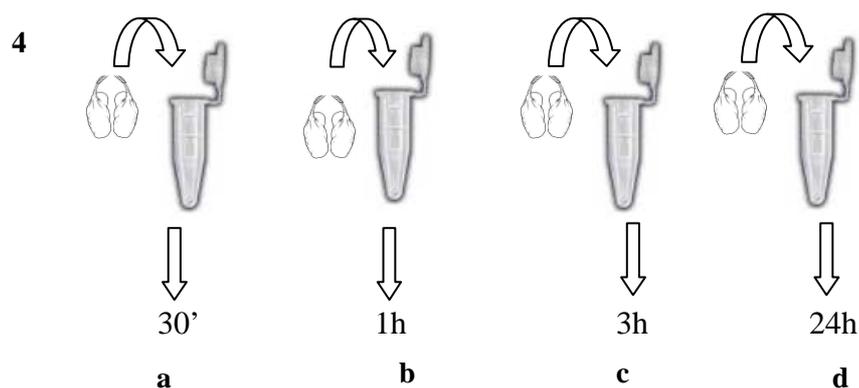
Uma cultura da cepa SC-58 foi incubada por 14 dias em ágar sangue, até apresentar altas concentrações de tripomastigotas/epimastigotas ( $2,8 \times 10^7$ ). O protocolo usado para a infecção experimental das glândulas salivares está ilustrado na Figura 3.1.

Colocou-se em 8 eppendorfs 500 µl da cultura + 1.000 µl de PBS

Acrescentou-se 500 µl de tampão (200 mM NaCl, 5,4 mM KCl, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 2 mM NaHCO<sub>3</sub>, pH 6.8) no sedimento e agitou-se.



Após a agitação, colocou-se uma glândula salivar em cada eppendorf e a partir daí foram utilizados os 4 tempos.



**Figura 3.1** Protocolo utilizado para a infecção experimental "*in vitro*" das glândulas salivares.

Após o término dos 4 tempos (a, b, c e d), as glândulas salivares foram processadas para a Microscopia Eletrônica de Transmissão.

### 3.4.6 Estudo histológico das glândulas salivares de *R. robustus* infectadas *in vitro*

Para este estudo utilizou-se oito *R. robustus* infectados por *T. rangeli*, adultos e de ambos os sexos e foi utilizada somente a glândula D1, pelo fato da glândula D2 ser mais frágil, dificultando assim a sua extração (Lacombe, 1999).

As glândulas foram extraídas e infectadas pelo mesmo método utilizado para a MET (Figura 3.1). Após o término dos 4 tempos, as glândulas foram colocadas em formol a 10% e levadas ao Laboratório de Patologia da Faculdade de Medicina da UnB para o processamento, onde foram feitos cortes histológicos de 5 µm, com coloração H.E. (Hematoxilina – Eosina).

Em um experimento piloto, utilizou-se os mesmos procedimentos, mas com glândulas de *R. robustus* de quinto estágio.

### 3.5 Resultados

#### 3.5.1 Infecção por *T. rangeli*

Das três estratégias utilizadas para a infecção, obteve-se sucesso somente nas infecções realizadas através do repasto artificial.

Três repastos artificiais foram realizados com a cepa SC-58 e *R. robustus*, que foram examinados 14 dias após o processo de infecção e observou-se infecção intestinal em 64% dos insetos. Após a confirmação da positividade, amostras da hemolinfa foram recolhidas e examinadas, e apenas 4% dos insetos estavam com infecção hemolinfática com 15 dias após o repasto infectante.

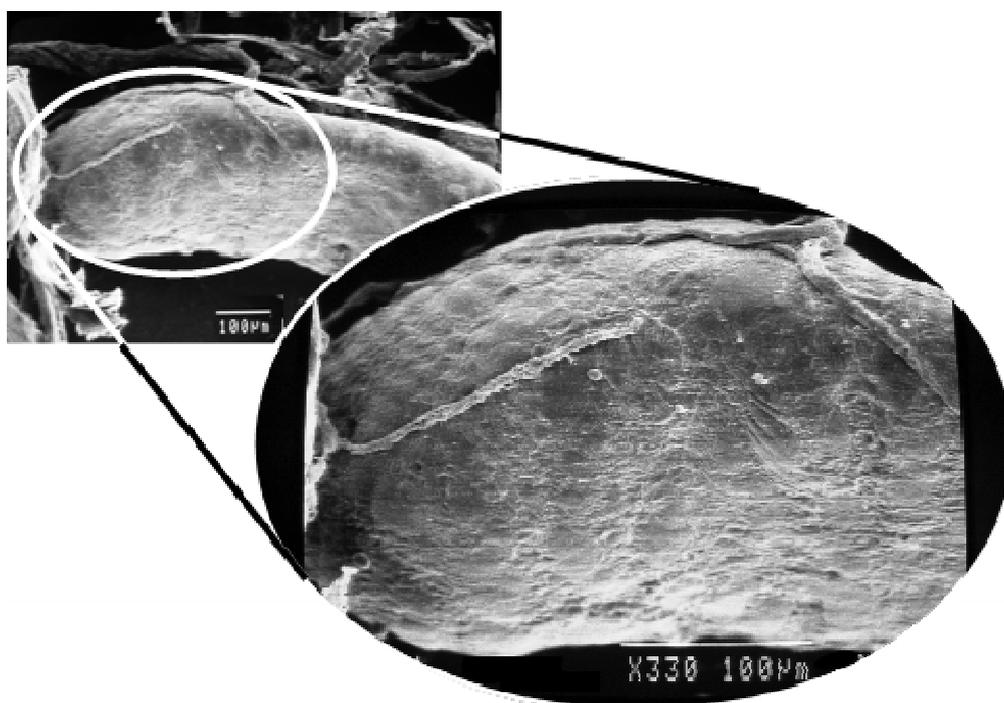
Com 28 dias, aproximadamente 20% dos insetos apresentaram infecção hemolinfática. Como não houve sucesso na transmissão via picada, para confirmação da infecção glandular, as glândulas dos insetos que apresentaram hemolinfa positiva, foram extraídas 50 dias após o repasto infectante. Após a extração levou-se as glândulas ao Microscópio Óptico para a identificação de possíveis formas de *T. rangeli* presentes, mas em todas as amostras apenas observou-se a presença de formas vivas do flagelado no líquido liberado durante a extração.

Essas glândulas infectadas foram utilizadas para análise em Microscopia Eletrônica de Varredura e Microscopia Eletrônica de Transmissão.

### 3.5.2 Estudo da invasão das glândulas salivares de *Rhodnius robustus* em Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

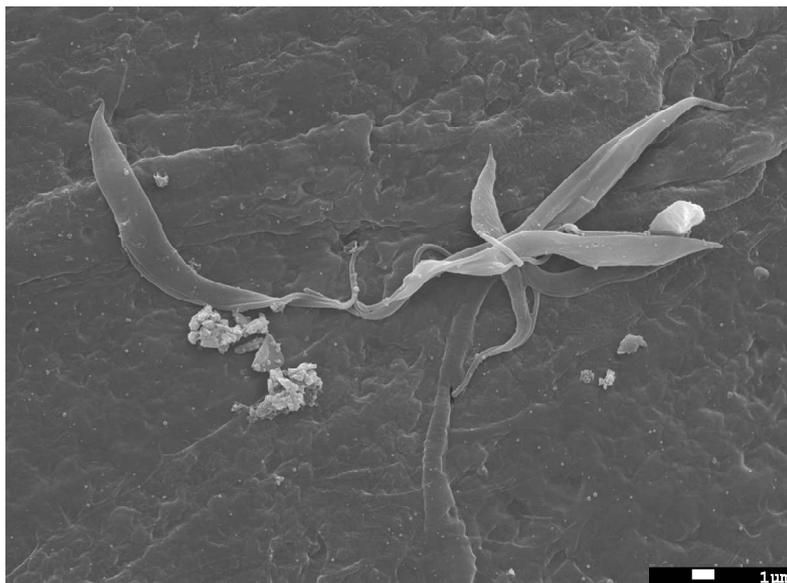
As glândulas infectadas via repasto artificial, foram preparadas, levadas ao MEV, e imagens foram obtidas para verificar o processo inicial de penetração do *T. rangeli* em glândulas salivares e ao mesmo tempo comparar com as imagens obtidas por Barreto-Santana (2006), com infecção *in vitro*.

A glândula salivar utilizada como controle, apresentou a maior parte da lâmina basal lisa, com pequenas fissuras espalhadas pelo corpo (Figura 3.2).

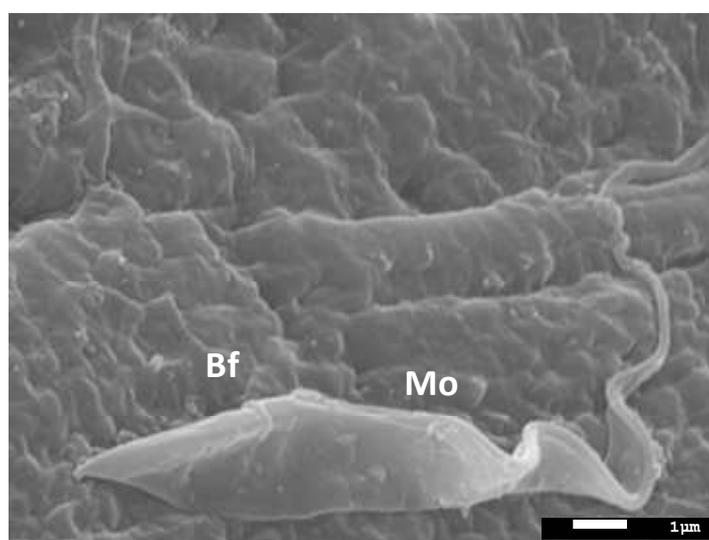


**Figura 3.2** MEV da glândula salivar de *Rhodnius robustus* não infectada (x170). Em destaque, pequenas fissuras na lâmina basal (x330).

Através das imagens adquiridas no MEV, verificou-se a presença de flagelados aparentemente em início de aderência pelo flagelo ou soltos pela membrana basal com características de epimastigotas e tripomastigotas longos, estes últimos com uma membrana ondulante partindo da parte posterior (Figuras 3.3 e 3.4).

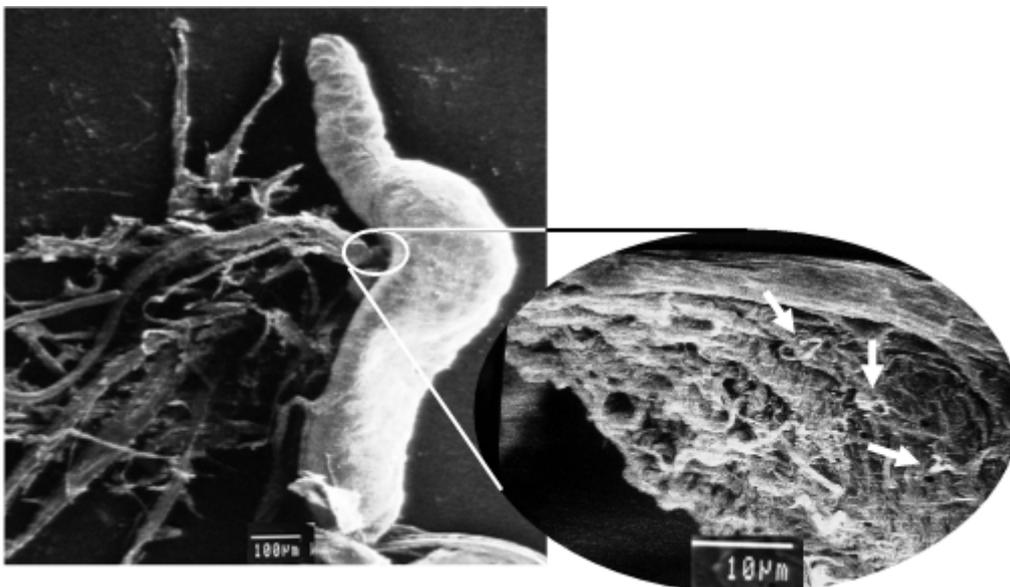


**Figura 3.3** Flagelados de *Trypanosoma rangeli* (SC-58) aderidos na membrana basal da glândula salivar de *Rhodnius robustus* com características de forma epimastigota. (x3.300).



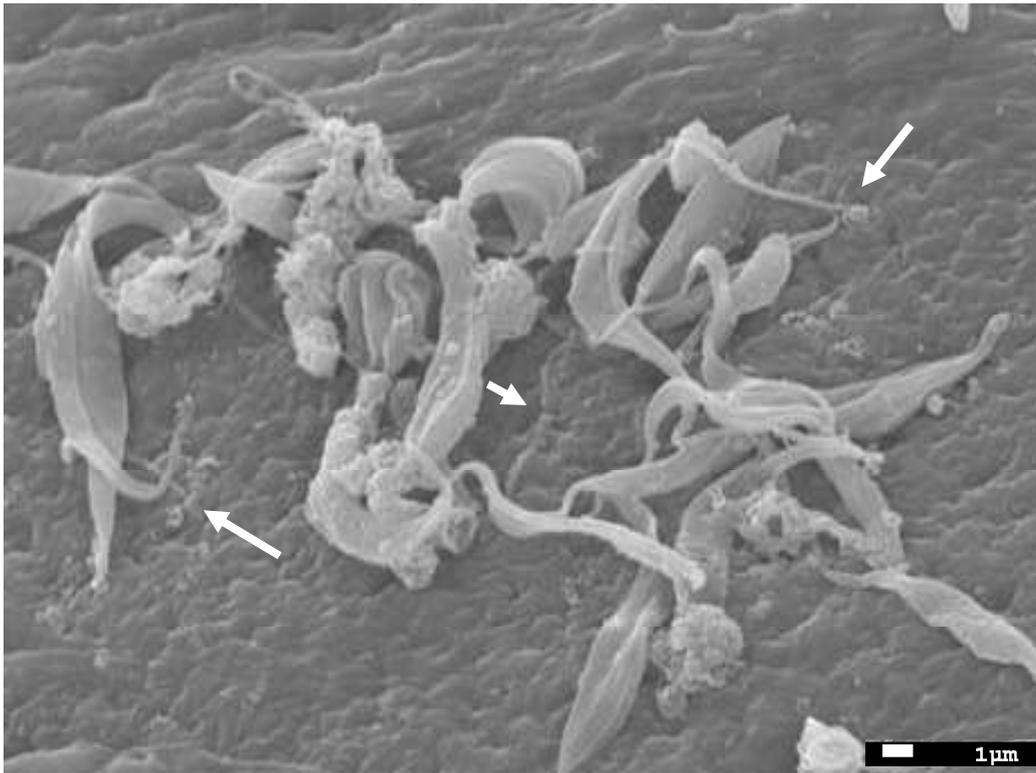
**Figura 3.4** Flagelado de *Trypanosoma rangeli* (SC-58) aderidos pelo flagelo na membrana basal da glândula salivar de *Rhodnius robustus* com características de forma tripomastigota. Em destaque: Bolsa flagelar (Bf) e membrana ondulante (Mo). (x8.500).

A Figura 3.5 mostra que a glândula apresentou na área próxima ao ducto, um aglomerado de flagelados.



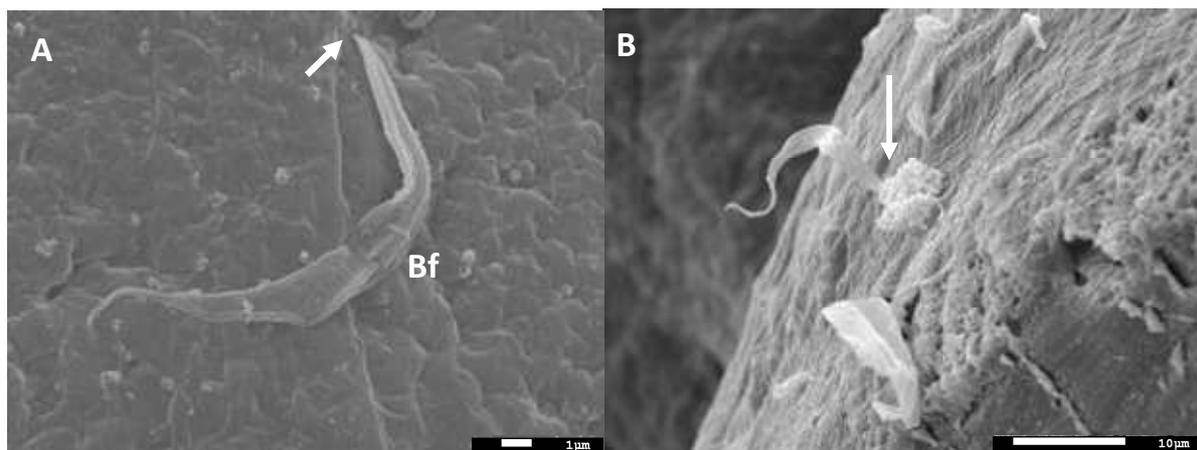
**Figura 3.5** Glândula salivar de *Rhodnius robustus* infectada via repasto artificial (x60) por *Trypanosoma rangeli* (SC-58). Em destaque, acúmulo de flagelados próximo ao ducto salivar (x2.200).

Também foram encontrados vários flagelados reunidos numa região da glândula salivar, penetrando pelo flagelo (Figura 3.6).

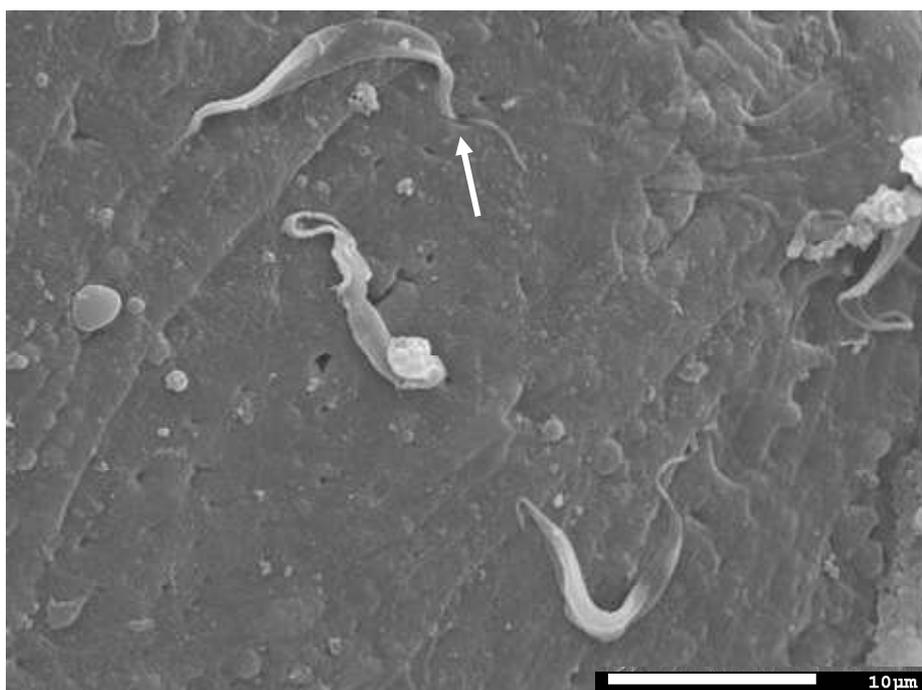


**Figura 3.6** Glândula salivar de *Rhodnius robustus* infectada por *Trypanosoma rangeli* (SC-58) via repasto artificial. Em destaque, flagelos penetrando na membrana (x3.300).

As Figuras 3.7 (A e B) e 3.8 mostram que foi possível encontrar flagelados penetrando na membrana basal pela parte posterior e pelo flagelo, respectivamente.



**Figura 3.7** Glândula salivar de *Rhodnius robustus* infectada por *Trypanosoma rangeli* (SC-58) via repasto artificial. Em destaque, flagelados aderidos à membrana basal pela parte posterior. A (x6.000) e B (x2.300). Bf: Bolsa flagelar.

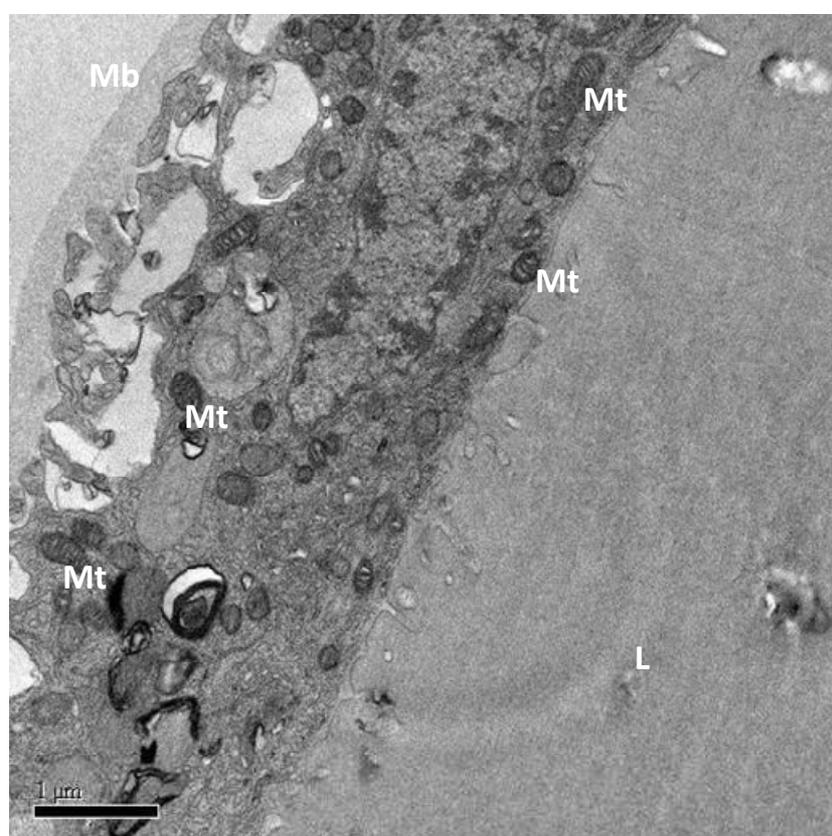


**Figura 3.8** Glândula salivar de *Rhodnius robustus* infectada por *Trypanosoma rangeli* (SC-58) via repasto artificial, com flagelados aderidos à membrana basal pelo flagelo (x2.700).

### 3.5.3 Estudo da invasão das glândulas salivares de *Rhodnius robustus* em Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

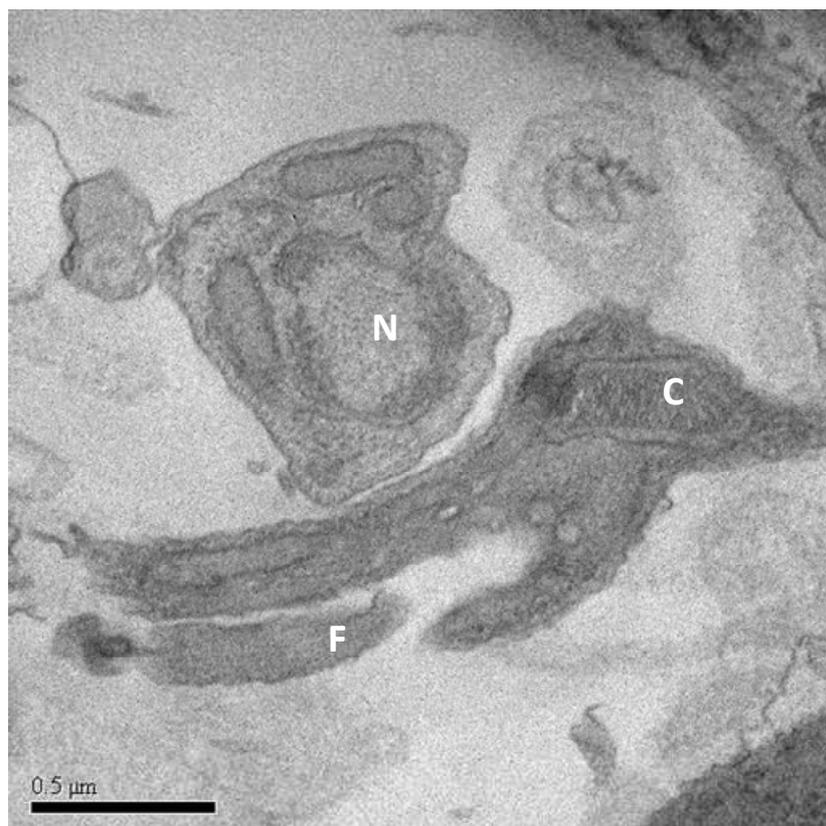
Após a infecção *in vitro*, com o término dos 4 tempos estabelecidos no protocolo, as glândulas foram preparadas e levadas ao MET para a análise do processo de invasão do *T. rangeli*.

Na glândula controle, pôde-se observar a membrana basal, células secretoras com núcleo proeminente, citoplasma rico em ribossomos, pequenas mitocôndrias e lúmen preenchido (Figura 3.9).

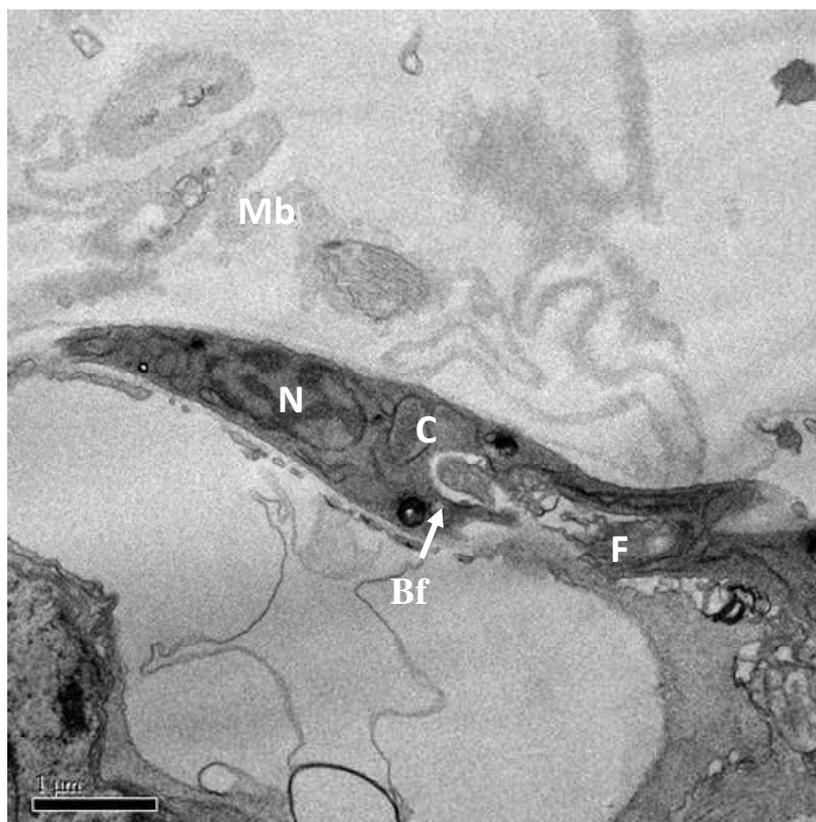


**Figura 3.9** Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) da glândula salivar não infectada de *Rhodnius robustus* (x24.400). Em destaque: Membrana basal (Mb), mitocôndrias (Mt) e lúmen (L).

Com 30 minutos de infecção, observou-se a presença de vários cortes transversais e longitudinais de tripanossomas, espalhados pelo lúmen da glândula (Figura 3.10). Pôde-se identificar algumas formas encontradas e todas apresentavam características de epimastigotas (Figura 3.11).



**Figura 3.10** MET da glândula salivar de *Rhodnius robustus* infectada por *Trypanosoma rangeli* (SC-58) após 30 minutos (x72.900). Primeiramente observa-se um corte transversal, onde se identifica o núcleo (N) do parasito. Logo abaixo, uma parte do flagelado em corte longitudinal, observando-se o cinetoplasto (C) e o flagelo (F).



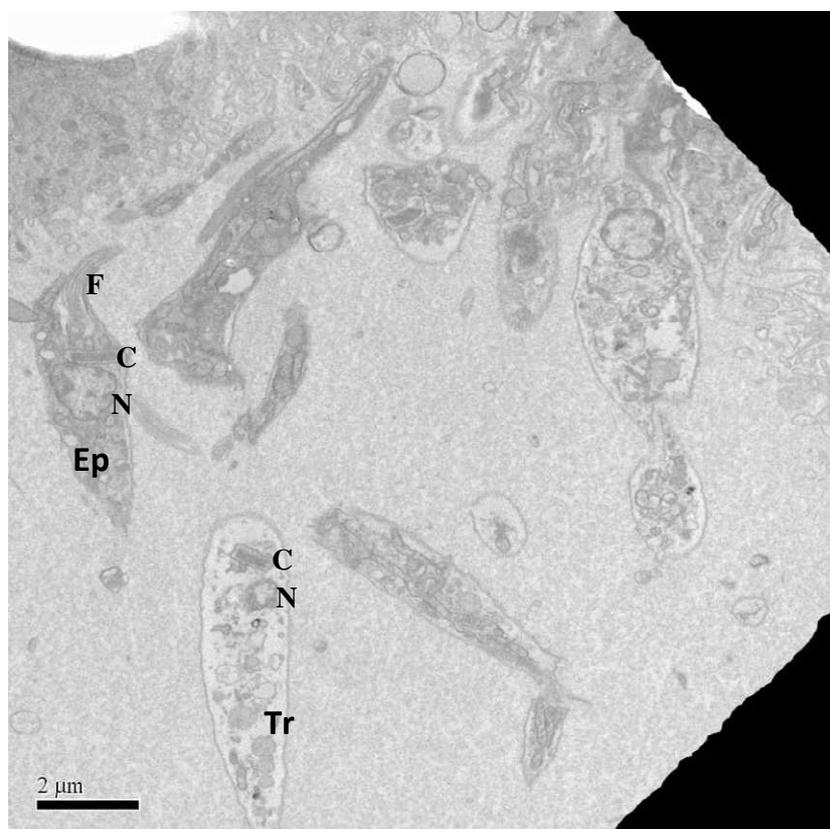
**Figura 3.11** Micrografia de MET da glândula salivar de *Rhodnius robustus* infectada por *Trypanosoma rangeli* (SC-58), mostrando epimastigota encontrado após 30 minutos, aderido à célula glandular pelo flagelo (x24.400). Núcleo (N), cinetoplasto (C), flagelo (F), membrana basal (Mb), bolsa flagelar (Bf).

Com 1 hora e com 3 horas de infecção, não se observou formas de tripanossomas espalhadas pelas glândulas. As imagens mostraram apenas as estruturas celulares presentes nas glândulas sadias. Vários cortes semifinos e ultrafinos foram realizados em busca de amostras com presença de parasitos, mas não se obteve sucesso.

A glândula com 24 horas de infecção, não pôde ser processada, pois seu formato original foi comprometido por permanecer num período muito longo de infecção.

As glândulas que passaram pelo processo de infecção *in vivo*, via repasto artificial, apresentaram formas com características de epimastigotas e tripomastigotas.

Em algumas regiões observou-se a presença de vários parasitos juntos, alguns aderidos às microvilosidades e outros dispersos no lúmen (Figura 3.12).



**Figura 3.12** MET da glândula salivar de *Rhodnius robustus* infectada por *Trypanosoma rangeli* (SC-58) via repasto artificial (x10.100). Observa-se vários parasitos dispersos e aderidos à membrana, dentre eles, um epimastigota (Ep) e um tripomastigota (Tr). Núcleo (N), cinetoplasto (C), flagelo (F)

#### **3.5.4 Estudo histológico das glândulas salivares de *Rhodnius robustus* infectadas via processamento *in vitro***

Os cortes histológicos realizados com as glândulas salivares de *R. robustus* infectadas, não demonstraram a presença de flagelados, nem diferenças características, comparando-se a infecção nos quatro tempos. Apenas mostraram características existentes em glândulas sadias.

A glândula com 24 horas de infecção, não pôde ser processada, pois seu formato original foi comprometido.

As glândulas mostraram células colunares com núcleo ovóide e cromatina finamente granular e o lúmen preenchido parcialmente com material granular, indicando vestígios de saliva (Figura 3.13). Observou-se também a presença de uma pequena zona com lúmen virtual, onde algumas células apresentaram certa balonização (Figura 3.14).

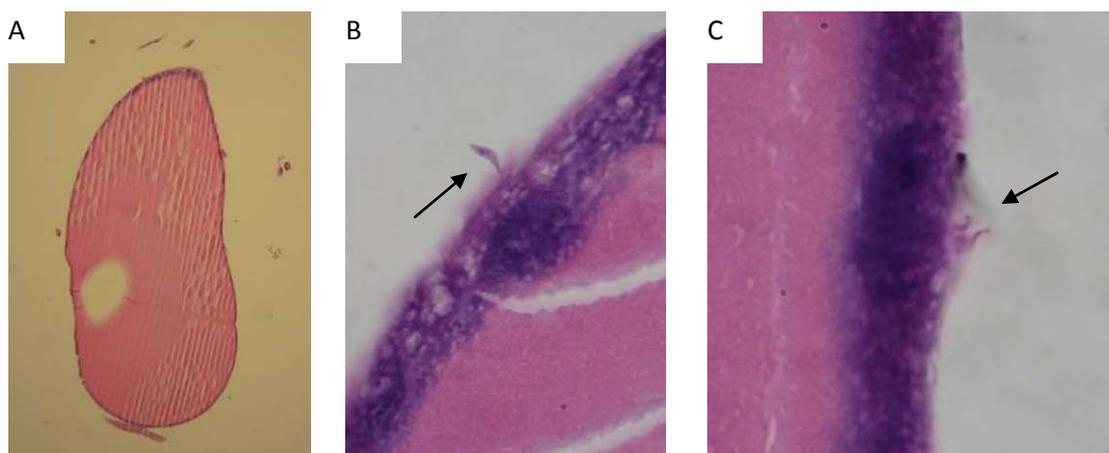


**Figura 3.13** Corte histológico longitudinal da glândula salivar D1 de *Rhodnius robustus* infectada por *Trypanosoma rangeli* (SC-58) corado pelo H. E. (x400)



**Figura 3.14** Detalhe da parte central da glândula salivar D1 de *Rhodnius robustus* infectada por *Trypanosoma rangeli* (SC-58). Cc: células colunares; Cb: células balonizadas. (x1000)

Em experimentos pilotos realizados com glândulas salivares de *R. robustus* (ninfas V), pôde-se observar alguns flagelados “aparentemente penetrando” na lâmina basal da glândula salivar com 3 horas de infecção (Figura 3.15). Os outros tempos (30 minutos e 1 hora) não apresentaram flagelados.



**Figura 3.15** Corte histológico longitudinal pela glândula salivar D1 de *Rhodnius robustus* corado pelo H. E. Em A, glândula inteira mostrando o corte como um todo (x200). Em B e C, flagelados de *Trypanosoma rangeli* (SC-58) “aparentemente penetrando” ou aderindo na membrana basal (x1.000).

### 3.6 Discussão

#### 3.6.1 Infecção por *T. rangeli*

Não houve positividade nas inoculações intraperitoneais realizadas nos camundongos de laboratório, com a cepa SC-58. Guhl & Vallejo (2003) relataram que a reprodução do *T. rangeli* em um hospedeiro vertebrado, poderia depender das características da cepa que está sendo utilizada ou poderia estar relacionada à perda de infectividade dos tripanossomas, quando são mantidos *in vitro* por muito tempo. A cepa SC-58, estava sendo mantida isolada em camundongos até chegar ao Laboratório de Parasitologia, onde estava criopreservada por três anos e começou a ser repicada a cada 15 dias, em meio Ágar Sangue, por aproximadamente dois meses.

Também não houve positividade nas inoculações intracelômicas realizadas nos insetos triatomíneos, e isso pode ter ocorrido devido ao *stress* ou traumatismo causado pela inoculação, pois 80% dos insetos morreram entre a primeira e segunda semana após o inóculo. Os triatomíneos que conseguiram sobreviver por um tempo maior, também tiveram um ciclo de vida curto, morrendo com menos de um mês após o inóculo.

De acordo com Vallejo *et al.* (2003, 2007), as cepas KP1-, como a SC-58 utilizada no presente trabalho, se desenvolvem melhor em *Rhodnius* da linhagem “pictipes” do que da linhagem “robustus”, o que explicaria essa falta de positividade pela diferença de suscetibilidade entre as espécies de *Rhodnius*, para a cepa de *T. rangeli*, reforçando a existência de uma relação complexa entre vetor e parasito.

Segundo Martins *et al.* (2000), vários autores compararam a eficácia do xenodiagnóstico natural e artificial e concluíram que o xenodiagnóstico artificial pode substituir o natural em efetividade.

Nos repastos artificiais realizados, quase 70% dos insetos infectados morreram por não conseguirem emergir da exúvia ou por terem emergido com alguma deformação, e isso provavelmente aconteceu por causa da infecção por *T. rangeli*, que geralmente causa a morte dos insetos (Añez, 1984, D'Alessandro & Saravia, 1999). De acordo com Gulh & Vallejo (2003), o efeito patológico do *T. rangeli* no *R. prolixus* foi observado primeiramente por Grewal

(1956), que observou uma quantidade aumentada de hemolinfa e de deformidades na muda que levaram a uma mortalidade elevada.

### **3.6.2 Estudo da invasão das glândulas salivares de *Rhodnius robustus* em Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)**

Comparando os nossos resultados, com os realizados por Barreto-Santana (2006), que utilizou a mesma cepa e a mesma espécie de triatomíneo, só que a infecção foi realizada por experimentos *in vitro*, observou-se que, diferentemente, em nosso sistema *in vivo*, os flagelados não apareceram aglomerados, aparentemente tentando atravessar a membrana basal por um único orifício, e sim isolados, parecendo atravessar individualmente, na membrana basal da glândula salivar, penetrando por pequenos orifícios, como demonstrou Meirelles *et al.* (2005).

Kitajima *et al.* (1998), encontraram evidências da invasão da glândula salivar por *T. rangeli*, através do rompimento ativo da lâmina basal pelo flagelo, mas não conseguiram observar a passagem inteira do corpo do flagelo, o que também aconteceu em nossos experimentos, talvez por ser um processo extremamente rápido e difícil de detectar. Eles observaram também, que a penetração do *T. rangeli* ocorreu de forma ativa, envolvendo a ruptura da lâmina basal, expondo o citoplasma e facilitando a penetração do flagelo. Em nossos registros, encontramos algumas rupturas da membrana basal, onde na maioria das vezes estavam com algum flagelado penetrando individualmente (Figura 3.3).

Igualmente à Barreto-Santana (2006), encontramos um aglomerado de flagelados tentando penetrar na membrana basal da região próxima ao ducto, e a maioria com característica de formas epimastigotas. De acordo com Basseri *et al.* (2002), num estudo de identificação e distribuição de porções de carboidratos em glândulas salivares de *R. prolixus* com lectinas FITC-marcadas, eles observaram que a superfície da glândula salivar apresenta resíduos de carboidratos diferentes que podem servir como receptores aos quais os flagelados se ligam antes da invasão. Isto poderia sugerir então, que os flagelados reconhecem essa região e lesam essa membrana basal de forma mais fácil, com a finalidade de atravessá-la e atingir as células do epitélio

glandular, provavelmente utilizando a ponta do flagelo como elemento de agressão. Ao que parece, as formas epimastigotas apresentariam uma maior quantidade de uma molécula lítica, constituída por uma proteína formadora de poros (a “rangelysin”), permitindo a passagem dos parasitos pelas barreiras epiteliais (Meireles *et al*, 2005). Estudos posteriores com a Microscopia Confocal talvez possam demonstrar o motivo desses parasitos irem ao ducto.

Oliveira & Souza (2001), em estudos *in vitro* para verificar a potencialidade de invasão do *T. rangeli*, no epitélio intestinal, utilizou fragmentos de intestino de *R. prolixus*, mostrando poucos flagelados presos nas células epiteliais. Mas também registraram agregações de flagelados numa mesma célula, geralmente provocando danos a essas células. Esse estudo mostrou que os flagelados atacaram somente algumas células epiteliais e eles sugerem que provavelmente isso ocorreu porque determinadas células são reconhecidas pelos flagelados para posterior ataque e invasão.

Pensamos que todos esses eventos iniciais, são de suma importância para a infecção ou não das glândulas pelas diversas cepas/genótipos de *T. rangeli* atualmente conhecidos (Vallejo *et al*, 1988).

### **3.6.3 Estudo da invasão das glândulas salivares de *Rhodnius robustus* em Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)**

Meireles *et al.* (2005), em seu experimento com *R. domesticus*, descreveu que após penetrar a camada exterior da lâmina basal, os parasitos poderiam ser encontrados no espaço entre a lâmina basal e o epitélio da glândula salivar. Formas epimastigotas encontradas na lâmina basal, em seguida, invadiriam as células da glândula salivar por um mecanismo ainda desconhecido. Depois de alcançar a luz da glândula, os parasitos aparecem sob a forma epimastigota e continuam a ser atraídos pelo flagelo para as microvilosidades das células da glândula salivar. Semelhantemente, em nosso estudo, observamos flagelados com características epimastigotas, tanto no espaço entre a lâmina basal e o epitélio da glândula salivar, quanto na luz da glândula, aderidos às microvilosidades das células.

Ellis *et al.* (1980), estudando a invasão das glândulas salivares de *R. prolixus* por *T. rangeli*, sugeriu que os flagelados penetram nas células da

glândula salivar, por um processo de endocitose, e ficam fechados dentro de vacúolos, até penetrarem no lúmen da glândula, onde a maioria dos parasitos parecem perder os seus vacúolos antes de deixar as células. De fato, encontramos os parasitos livres no lúmen da célula hospedeira, sem os vacúolos.

De acordo com Kitajima *et al.* (1998), que trabalharam com glândulas salivares de *R. ecuadoriensis*, as formas de *T. rangeli* encontradas em micrografias de MET, eram vistas enroladas e por isso era difícil determinar o estágio de desenvolvimento, mas em seu experimento, elas estavam com características mais próximas das formas esferomastigotas, com flagelo livre envolvendo parcialmente a forma arredondada do parasita, dispostas intracelularmente. Cuba Cuba (1975) analisando glândulas salivares de *R. ecuadoriensis* em Microscopia Óptica, descreveu a presença de parasitos que o autor interpreta serem esferomastigotas, providos de flagelo, dentro do citoplasma das células glandulares. No presente trabalho, não foi possível identificar essas formas com características que indicam serem formas esferomastigotas.

#### **3.6.4 Estudo histológico das glândulas salivares de *Rhodnius robustus* infectadas**

O estudo do par de glândulas D1 é importante, porque de acordo com Lacombe (1999) sua função é produzir uma substância anticoagulante, que é excretada para o lúmen da glândula junto com parte do epitélio. Toda a secreção fica contida nos vacúolos dispersos no citoplasma das células glandulares.

A maioria de suas células é binucleada, o que indica um acréscimo de massa nuclear em relação ao citoplasma.

Para ajudar na hematofagia, *Rhodnius prolixus* produz várias **moléculas bioativas** em sua saliva que injeta na pele do hospedeiro (Araujo *et al.*, 2009). Côrte-Real *et al.* (2011) investigando a atividade do fator ativador de plaquetas acetil-hidrolase (PAF-AH) em homogeneizados de glândulas salivares e saliva de *R. prolixus* identificaram que o PAF-AH facilita a sucção de um elevado volume de sangue em um curto período de tempo. Dessa forma, sabe-se que a

saliva altera o sítio da picada, favorecendo a localização dos vasos e aumentando o fluxo sanguíneo na área da pele a ser picada. Os triatomíneos desenvolveram nas suas glândulas salivares, uma grande variedade de anti-hemostáticos altamente eficientes, como anticoagulantes e vasodilatadores, que são introduzidos nos hospedeiros (Francischetti *et al*, 2000, Barros *et al*, 2009, Schwarz *et al*, 2009, Singh *et al*, 2010, Costa *et al*, 2011).

### 3.7 Conclusões

- ✓ Através das observações feitas com Microscopia Eletrônica de Varredura, interpretamos que, o fenômeno inicial de aderência e penetração nas glândulas salivares, se daria por formas tripomastigotas e/ou epimastigotas;
- ✓ Com os experimentos realizados em Microscopia Eletrônica de Transmissão, observou-se formas epimastigotas presentes entre a lâmina basal e o epitélio glandular; além de epimastigotas e tripomastigotas na luz da glândula, com algumas formas aderidas às microvilosidades das células;
- ✓ Os aspectos morfológicos nos cortes histológicos das glândulas salivares de *R. robustus* infectadas por *T. rangeli* mostraram elementos estruturais similares às glândulas salivares sadias, descritos na literatura. Observou-se apenas, o processo inicial de aderência e potencial de penetração dos flagelados na membrana basal da glândula;

### 3.8 Referências Bibliográficas

Añez N. Studies on *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920. VII - Its effect on the survival of infected triatomine bugs. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1984; 79:249–255.

Araujo RN, Soares AC, Paim RM, Gontijo NF, Gontijo AF, Lehane MJ, et al. The role of salivary nitrophorins in the ingestion of blood by the triatomine bug *Rhodnius prolixus* (Reduviidae: Triatominae). *Insect Biochem Mol Biol*. 2009; 39(2):83-9.

Barreto-Santana, D. Biologia comparativa de *Rhodnius neglectus* e *Rhodnius robustus* (Triatominae) sob condições de laboratório e infecção experimental pelo *Trypanosoma rangeli* com ênfase nos aspectos ultraestruturais das glândulas salivares infectadas. [Dissertação de Mestrado]. Brasília: Universidade de Brasília. 2006.

Barros VC, Assumpção JG, Cadete AM, Santos VC, Cavalcante RR, Araújo RN, et al. The role of salivary and intestinal complement system inhibitors in the midgut protection of triatomines and mosquitoes. *PLoS One*. 2009; 4(6):e6047.

Basseri HR, Tew IF, Ratcliffe NA. Identification and distribution of carbohydrate moieties on the salivary glands of *Rhodnius prolixus* and their possible involvement in attachment/invasion by *Trypanosoma rangeli*. *Exp Parasitol*. 2002; 100:226–234.

Côrte-Real R, Gomes RN, Castro-Faria-Neto HC, Azambuja P, Garcia ES. The activity of platelet activating factor-acetyl hydrolase (PAF-AH) in the salivary glands of *Rhodnius prolixus*. *J Insect Physiol*. 2011; 57(6):825-9.

Costa CM, Sousa MV, Ricart CAO, Santana JM, Teixeira ARL, Roepstorff P, et al. 2-DE-based proteomic investigation of the saliva of the Amazonian triatomine vectors of Chagas disease: *Rhodnius brethesi* and *Rhodnius robustus*. *J Proteomics*. 2011; 74:1652-1663.

Cuba Cuba CA. Estudo de uma cepa peruana de *Trypanosoma rangeli* IV. Observações sobre a evolução e morfogênese do *T. rangeli* na hemocele e nas glândulas salivares de *Rhodnius ecuadoriensis*. *Rev Inst Med Trop*. 1975; 17:284-297.

D'Alessandro A, Saravia NG. *Trypanosoma rangeli*, In: Kreier J. Baker JR (eds) *Parasitic Protozoa*, 2ª Ed., Academic Press, New York. 1992; 2:1-54.

D'Alessandro A, Saravia NG. *Trypanosoma rangeli*. In: Protozoal Diseases. Edited by: Gilles HM., Ed. Arnold. 1999; 398- 412.

Ellis DS, Evans DA, Stamford. The penetration of the salivary glands of *Rhodnius prolixus* by *Trypanosoma rangeli*. Z Parasit. 1980; 62:63-74.

Francischetti IM, Ribeiro JM, Champagne D, Andersen J. Purification cloning expression and mechanism of action of a novel platelet aggregation inhibitor from the salivary gland of the blood-sucking bug *Rhodnius prolixus*. J Biol Chem 2000; 275(17):12.639-50.

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

Grisard EC, Steindel M, Guarneri AA. Characterization of *Trypanosoma rangeli* Strains Isolated in Central and South America: an Overview. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1999; 94(2):203-209.

Guhl F, Vallejo GA. *Trypanosoma* (Herpetosoma) *rangeli* Tejera, 1920: an updated review. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2003; 98(4):435-442.

Hecker H, Schwarzenbach M, Rudin W. Development and interactions of *Trypanosoma rangeli* in and with the reduviidae bug *Rhodnius prolixus*. Parasitol Res. 1990; 76:311-318.

Kitajima EW, Cuba Cuba CA, Brener Z. Ultrastructural observations on *Trypanosoma* (Herpetosoma) *rangeli* in the salivary glands of *Rhodnius ecuadoriensis* (Hemiptera, Reduviidae). Parasitol día. 1998; 22(3-4):65-71.

Lacombe D. Anatomia e Histologia das Glândulas Salivares nos Triatomíneos. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1999; 94(4):557-564.

Machado PE, Eger-Mangrich I, Rosa G, Koerich LB, Grisard EC, Steindel M. Differential susceptibility of triatomines of the genus *Rhodnius* to *Trypanosoma rangeli* strains from different geographical origins. Inter J Parasitol. 2001; 31:632-634.

Martins LPA, Rosa JA, Castanho REP, Sauniti GL, Júnior HM. Susceptibilidade de *Rhodnius neglectus*, *Rhodnius robustus* e *Triatoma infestans* (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) à infecção por duas cepas de *Trypanosoma cruzi* (Kinetoplastidae, Trypanosomatidae) utilizando xenodiagnóstico artificial. Rev Soc Bras Med Trop. 2000; 33(6):559-563.

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

Mejía GD. Aspectos ecológicos de populações silvestres de *Triatominae* (Hemiptera: Reduviidae) em palmeiras *Attalea speciosa* (Arecaceae) e estimativa do risco ambiental para a transmissão de *Trypanosomatidae* (Kinetoplastida) em uma frente pioneira de desmatamento (Pará-Brasil). [Dissertação de Mestrado]. Brasília: Universidade de Brasília. 2005.

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

Schwarz A, Helling S, Collin N, Teixeira CR, Medrano-Mercado N, Hume JC, et al. Immunogenic salivary proteins of *Triatoma infestans*: development of a recombinant antigen for the detection of low-level infestation of triatomines. PLoS Negl Trop Dis. 2009; 3(10):e532.

Singh R, Berry RE, Yang F, Zhang H, Walker FA, Ivancich A. Unprecedented peroxidase-like activity of *Rhodnius prolixus* nitrophorin 2: identification of the [FeIV=O Por•]<sup>+</sup> and [FeIV=O Por](Tyr38•) intermediates and their role(s) in substrate oxidation. Biochemistry. 2010; 49(41):8857-72.

Steindel M, Carvalho-Pinto CJ, Toma HK, Mangia RHR, Ribeiro-Rodrigues R, Romanha AJ. *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920 isolated from a sylvatic rodent (*Echymys dasythrix*) in Santa Catarina State: First report of this trypanosome in southern Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1991; 86:73-79.

Vallejo GA, Marinkelle CJ, Jul F, De Sánchez N. Comportamiento de la infección y diferenciación morfológica entre *T. cruzi* y *T. rangeli* en el intestino del vector *R. prolixus*. Rev Bras Biol. 1988; 48:577-587.

Vallejo GA, Guhl F, Carranza JC, Moreno J, Triana O, Grisard EC. Parity between kinetoplast DNA and miniexon 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. 2003; 3:39-45.

Vallejo GA, Guhl F, Carranza JC, Triana O, Pérez G, Ortiz PA, et al. Interacción tripanosoma-vector-vertebrado y su relación con la sistemática y la epidemiología de la tripanosomiasis americana. Biomédica. 2007; 27 Suppl 1:110-118.

Watkins R. Histology of *Rhodnius prolixus* infected with *Trypanosoma rangeli*. J Invert Pathol. 1971; 117:59-66.

## Capítulo IV

**Estudo da influência da infecção por *Trypanosoma rangeli* (SC-58, KP1-) na biologia de *Rhodnius robustus*, *R. pictipes* e *R. neglectus*.**

## 4.1 Resumo

Métodos bioquímicos e moleculares têm sido utilizados para demonstrar polimorfismo entre as linhagens de *T. rangeli* isoladas de mamíferos e triatomíneos de diferentes áreas geográficas. Algumas populações de espécies do gênero *Rhodnius* poderiam se comportar de maneira diferente quanto a susceptibilidade ou não de infecção por genótipos de *T. rangeli* estabelecendo as linhagens ou subpopulações do parasita. Atualmente, uma forte evidência sugere uma co-evolução parasita-vetor. O objetivo foi verificar a influência da infecção por *T. rangeli* (geneticamente caracterizada como KP1-) na biologia de *R. robustus*, *R. neglectus* e *R. pictipes*. Nossas hipóteses são: a) o parasito modifica o comportamento alimentar, a duração do ciclo de vida e a taxa de mortalidade dessas espécies e b) que, essas alterações poderiam ser diferentes entre as espécies de *Rhodnius* da linhagem “robustus” (*R. robustus*, *R. neglectus*) e da linhagem “pictipes” (*R. pictipes*). Via repasto artificial, cerca de 50 ninfas dessas espécies foram alimentadas com sangue com cultura de *T. rangeli* em suspensão. Outras 50 ninfas foram alimentadas em camundongos não infectados (grupo controle). Os insetos foram observados diariamente para determinar a mortalidade e os parâmetros do período de desenvolvimento. A alimentação dos insetos foi feita a cada sete dias após ecdise em camundongos. Foram registrados: tempo decorrido para a aproximação, número de picadas, tempo do repasto, número de interrupções, de defecações e quantidade de sangue ingerido. Embora o grupo controle tenha mostrado uma tendência em direção a um desenvolvimento ninfal mais rápido, não houve diferença significativa quando comparado ao grupo infectado. *R. pictipes* infectados apresentaram uma média de dias em sua evolução maior que o grupo controle, e ainda apresentou um maior período ninfal total quando comparado com as outras duas espécies. Os *R. pictipes* infectados demoraram mais para detectar e iniciar as picadas nos camundongos e defecaram mais frequentemente que os controles. No caso de *R. robustus* os infectados picaram mais vezes os camundongos e defecaram menos frequentemente que os controles. Fato similar aconteceu com *R. neglectus* infectados que picaram mais vezes, porém defecaram mais frequentemente que os controles. Para as três espécies a maioria dos insetos infectados ingeriu uma menor quantidade

de sangue mesmo apresentando um tempo de alimentação similar aos controles. A mortalidade do grupo de infectados por *T. rangeli* foi maior que a observada no grupo controle para as três espécies estudadas, sendo que apenas *R. neglectus* apresentou diferença significativa. Os resultados mostraram que alguns parâmetros do comportamento alimentar dos triatomíneos foram modificados após infecção por *T. rangeli*.

Palavras-Chave: *Rhodnius pictipes*; *Rhodnius robustus*; *Rhodnius neglectus*; *Trypanosoma rangeli*; infecção experimental; relação parasito-vetor; competência vetorial.

## 4.2 Abstract

Biochemical and molecular methods have been used to show extensive populations polymorphism between *T. rangeli* strains isolated from mammals and triatomines in different geographical areas. Some populations of species of the genus *Rhodnius* could have difference in their susceptibility or not to *T. rangeli* genotypes infection with well established lineages or subpopulations of the parasite. At present, a strong evidence suggests a co-evolution parasite-vector. The aim was to verify the influence of infection by *T. rangeli* (genetically characterized as KP1-) in biology of *R. robustus*, *R. neglectus* and *R. pictipes*. Our hypothesis are: a) the parasite modifies the feeding behavior, the duration of life cycle and mortality rate of these species and b) that, these alterations could be different between the species *Rhodnius* of lineage "robustus" (*R. robustus*, *R. neglectus*) and of lineage "pictipes" (*R. pictipes*). By artificial feeding, about 50 nymphs of these species were fed with blood mixed with *T. rangeli* culture suspension. Other 50 nymphs were fed in mice uninfected (control group). The insects were diary observed to determine mortality and parameters of the development period. The feeding of insects was done at every seven days. It was recorded: time elapsed for of approximation, number of bites attempts, repast time, number of interruptions, of defecations and the amount of ingested blood. Although the control group has shown a tendency to a faster nymph development, there was no statistical difference between the two groups. Infected *R. pictipes* showed a larger average of days in their time evolution than the control group, and showed a larger total nymph period compared to the other two species. It took longer for the infected *R. pictipes* to detect and start the biting on the mice and they defecated more frequently than the control ones. Related to *R. robustus*, the infected ones bit more times and defecated less frequently than the control ones. The infected *R. neglectus* bit more times and defecated less frequently than the control ones. Concerning the three species, most of infected insects ingested a less quantity of blood, even showing similar feeding time as the control group. The mortality of infected *T. rangeli* group was larger than mortality observed in control group for the three studied species, with only *R. neglectus* showed a significant difference. Results

showed that some feeding behavior parameters of triatomines were modified after infection by *T. rangeli*.

Keywords: *Rhodnius pictipes*; *Rhodnius robustus*; *Rhodnius neglectus*; *Trypanosoma rangeli*; experimental infection; relation parasite-vector; vector competence

### 4.3 Introdução

Alterações parasitogênicas na biologia do hospedeiro são epidemiologicamente importantes se afetam a capacidade de transmissão dos parasitos (Schaub, 2006). Em insetos hematófagos existem efeitos como a redução da locomoção ou o tempo de vida dos adultos e o aumento da sensibilidade a outros fatores de estresse (Schaub, 1994), efeitos esses que alteram a taxa de transmissão. Muitos tripanosomatídeos parecem mudar o comportamento dos insetos hospedeiros aumentando sua competência vetorial. Os movimentos lentos dos insetos infectados por *T. rangeli*, por exemplo, podem aumentar a taxa de predação por mamíferos insetívoros, mas também a taxa de transmissão entre os triatomíneos através do canibalismo. Outro exemplo é a interferência no processo de ingestão, o que provoca um maior número de picadas e baixas taxas de ingestão que estão relacionadas com distúrbios do trato digestivo (Schaub, 2006).

Considerando-se triatomíneos infectados com o *T. cruzi*, estes apresentam apenas efeitos leves, já o *T. rangeli* afeta fortemente, por exemplo, o comportamento alimentar (Añez & East, 1984, Schaub, 1989). Oliveira *et al.* (2010) estudando os padrões de desenvolvimento e reprodução de *Triatoma brasiliensis* infectados por *T. cruzi*, observaram que ambos os grupos (controle e infectados) apresentaram taxas semelhantes de mortalidade ninfal e o desempenho reprodutivo não foi significativamente afetado pela infecção em nenhum dos tratamentos. De acordo com Añez (1984), quando as ninfas de primeiro estágio de *R. robustus* e *R. prolixus* são infectadas com *T. rangeli*, as taxas de sobrevivência nos diferentes estádios diminuí significativamente em relação aos controles, comprovando a patogenicidade do *T. rangeli*.

Estudos têm demonstrado as características do ciclo biológico de várias espécies de triatomíneos, incluindo pelos menos seis espécies de *Rhodnius* (Silva 1985, Rocha *et al*, 1994, Canale *et al*, 1999, Guarneri *et al*, 2000, Rocha *et al*, 2001a,b, Carcavallo, 2002, Rocha *et al*, 2004,). Outros autores têm demonstrado características de seus hábitos alimentares e dos padrões de defecação durante e após o repasto sanguíneo (Crocco & Catalã, 1996, Nogueira-Torres *et al*, 2000, Nattero *et al*, 2002, Martínez-Ibarra *et al*, 2003a, Barreto-Santana *et al*, 2011). Mas os experimentos realizados por estes últimos

pesquisadores objetivaram correlacionar comparativamente o potencial vetorial das espécies pesquisadas e, inferir sua potencialidade na transmissão de *T. cruzi* e *T. rangeli* utilizando triatomíneos não infectados.

Do ponto de vista epidemiológico, é importante conhecer as características biológicas dos triatomíneos infectados, e uma das maneiras para esse estudo é o estabelecimento das estatísticas vitais obtidas em observações das colônias de laboratório. Em se tratando de um modelo de um tripanossoma como *T. rangeli*, cujo mecanismo de transmissão é do tipo inoculativo (transmissão pela picada) o estudo do comportamento dos *Rhodnius* é de importância na caracterização de seu potencial vetorial. Adicionalmente, vários estudos têm mostrado evidências de co-adaptação entre espécies de *Rhodnius* e *T. rangeli*. Populações de *T. rangeli* isoladas de espécies de *Rhodnius* da linhagem “pictipes” (*T. rangeli*/KP1-) são geneticamente divergentes das isoladas da linhagem “robustus” (*T. rangeli*/KP1+) o que sugere co-evolução entre as subpopulações de *T. rangeli* e as espécies de *Rhodnius* (Vallejo *et al*, 2003, 2007, Urrea *et al*, 2011). Dessa forma a influência de *T. rangeli* na biologia de seus vetores pode estar relacionada também com a linhagem do parasito e seus vetores.

Visando compreender ainda mais se os hábitos alimentares e comportamentais do vetor serão alterados por estarem infectados, utilizamos experimentos laboratoriais de comportamento que permitiram estabelecer: (i) detecção do hospedeiro (tempo de aproximação dos triatomíneos ao hospedeiro vertebrado experimental); (ii) número de tentativas de picadas dos insetos no hospedeiro; (iii) tempo total do repasto sanguíneo; (iv) número de interrupções do repasto. Todas essas observações de comportamento dos insetos foram realizadas utilizando-se vetores naturais do *T. rangeli*, da linhagem “robustus” (*R. neglectus*, *R. robustus*) e da linhagem “pictipes” (*R. pictipes*), infectados via repasto artificial. Para análise da interferência da infecção por *T. rangeli* (KP1-) na biologia dessas espécies, os experimentos foram realizados e comparados com a biologia dos insetos não infectados (grupo controle). A hipótese é que o parasito modifica o comportamento alimentar, a duração do ciclo de vida e a taxa de mortalidade dessas espécies de *Rhodnius* e que essas alterações estão relacionadas com a linhagem evolutiva de *Rhodnius*. Essas alterações provavelmente têm relação direta com

a transmissão de *T. rangeli* na natureza e poderiam estar vinculadas com a linhagem evolutiva de *Rhodnius*.

#### **4.4 Material e Métodos**

##### **4.4.1 Material Biológico**

Os insetos utilizados para esses experimentos foram provenientes das colônias mantidas no Laboratório de Parasitologia Médica e Biologia de Vetores (FM/UnB). Os *Rhodnius neglectus* (MG) foram coletados originalmente na área de Ituiutaba - MG (Gurgel-Gonçalves *et al*, 2008) e os *R. robustus* na área de Benfica, Marabá – PA (Mejía, 2005). Os *R. pictipes* foram enviados pelo Dr. Cléber Galvão, do Laboratório de Referência Nacional em Taxonomia de Triatomíneos da Fiocruz – RJ, procedentes de Barcarena – PA, de uma colônia mantida no laboratório nacional e internacional de taxonomia de triatomíneos da Fiocruz-RJ desde 1989.

A origem da cepa de *T. rangeli* (SC-58, KP1-), os métodos de manutenção dos insetos foram descritos no Capítulo 2, páginas 31 e 32.

A fim de documentar o comportamento dos insetos, no interior de cada “arena experimental” foi colocado, individualmente um camundongo albino imobilizado, e frente a esse hospedeiro foi colocado um espécime, para o registro dos padrões de alimentação e defecação. Todas as observações foram acompanhadas e cronometradas.

##### **4.4.2 Estabelecimento das estatísticas vitais dos grupos experimentais**

Para este trabalho utilizamos 50 ninfas infectadas via repasto sanguíneo artificial (ver procedimento no Capítulo 2, páginas 32 e 33) para possível infecção por *T. rangeli* e outras 50 foram alimentadas com camundongos não infectados para controle de cada espécie. Cada ninfa foi colocada separadamente em recipientes plásticos com tampas com uma tela na parte superior o que propiciou a entrada de oxigênio, e tiveram o fundo forrado com

papel filtro e contendo tiras do mesmo papel, dobradas em sanfona, para aumentar a superfície de absorção de umidade (Rocha *et al*, 1997).

Os potes ficaram no insetário onde a temperatura e a umidade foram monitoradas.

A partir daí, os insetos foram observados diariamente a fim de determinar os percentuais de mortalidade e o período total de desenvolvimento das espécies em condições de laboratório. O tempo em dias de desenvolvimento de cada um dos cinco estágios ninfais e tempo em dias até o desenvolvimento dos adultos foi contabilizado e comparado entre os grupos experimentais.

A alimentação foi oferecida, aproximadamente, sete dias após cada ecdise e o tempo de oferecimento da fonte sanguínea foi de, no máximo, 30 minutos. Somente aqueles exemplares que se recusaram a sugar ou sugaram pouca quantidade de sangue foram submetidos à nova tentativa de alimentação.

#### **4.4.3 Análise do comportamento alimentar dos grupos experimentais**

Sabendo-se que os triatomíneos retiram o sangue diretamente dos vasos sanguíneos (vênulas e arteríolas), os eventos que ocorrem no processo de alimentação incluiriam: detecção do hospedeiro, aproximação até ele, movimento exploratório ativo da probóscide pela superfície da pele do hospedeiro, picada ou penetração, localização do sangue (em um vaso sanguíneo), ingestão do sangue e término da alimentação (Guarneri *et al*, 2000).

Para ambas as espécies foram estudadas as seguintes variáveis, a partir da observação direta e registro do tempo: a) Tempo de aproximação: Tempo (em minutos) desde que o inseto foi colocado no recipiente até o momento de introdução da probóscide na pele do camundongo; b) Número de picadas: foi registrado o número de vezes que o inseto encostou e introduziu a probóscide na tentativa de encontrar vênulas/arteríolas na pele do camundongo, antes do início evidente do seu repasto; c) Tempo do repasto: Tempo em minutos entre a primeira picada e o fim da ingestão de sangue; d) Número de interrupções:

Foi contabilizado o número de interrupções espontâneas do inseto, após a verificação do início do repasto; e) Defecação: Número de defecações por inseto durante e até 10 minutos após o repasto por observação direta do inseto; f) Quantidade de sangue ingerido em cada estágio ninfal: Todos os insetos foram pesados antes e imediatamente após o repasto em balança analítica AND HR-200, graduada em mg para designar a quantidade de sangue ingerido.

Para a comparação das médias das variáveis de cada estágio de desenvolvimento, das três espécies entre os dois tratamentos, foi utilizado o teste de Tukey ( $\alpha = 0,05$ ). Os dados que não apresentaram distribuição normal, foram transformados em  $\sqrt{x}$ . Para comparação das taxas de mortalidade entre os dois grupos foi utilizado o teste qui-quadrado. Os testes foram realizados no programa SAS.

## 4.5 Resultados

### 4.5.1 Estabelecimento das estatísticas vitais dos triatomíneos

Comparando-se o desenvolvimento dos espécimes não infectados e infectados, observou-se que *R. neglectus* infectados (Tabela 4.1) apresentaram o período ninfal total maior que os do grupo controle (170 e 154 dias, respectivamente). Resultados similares foram observados com os *R. pictipes* (173 e 150 dias) (Tabela 4.2) e *R. robustus* (185 e 162 dias) (Tabela 4.3). Nas três espécies estudadas houve diferença significativa no tempo gasto até a primeira muda após o repasto (Ninfas I – II) comparando-se o grupo controle com os infectados. Embora o grupo controle tenha mostrado uma tendência em direção a um desenvolvimento mais rápido, não houve diferença significativa entre os dois grupos nos outros estágios ninfais. *R. pictipes* infectados apresentaram uma média de dias maior que o grupo controle para a muda em todos os estágios, mas não houve diferença significativa.

Para *R. neglectus*, a mortalidade considerando todo o período ninfal do grupo infectado foi diferente ( $X^2=3,9$ ;  $P=0,04$ ) e maior que no grupo controle.

Os maiores percentuais de mortalidade foram registrados para as Ninfas II e IV do grupo infectado, sendo que na última muda nenhum espécime de *R. neglectus* do grupo controle morreu (Tabela 4.1).

Tanto para *R. pictipes*, como para *R. robustus*, não houve diferença significativa, comparando-se os dois tratamentos (controle e infectados). Os maiores percentuais de mortalidade para *R. pictipes*, foram registrados para as Ninfas II do grupo infectado e Ninfas IV do grupo controle (Tabela 4.2). Já para *R. robustus*, isso ocorreu para as Ninfas II e V do grupo infectado (Tabela 4.3).

**Tabela 4.1** – Comparação do período de desenvolvimento (em dias) e do percentual de mortalidade de ovos e estádios ninfais de *Rhodnius neglectus* (grupo controle e infectado por *Trypanosoma rangeli* SC-58, KP1-).

Estádio	Número de insetos*		Duração ( $X \pm S$ dias) (min – máx)		Mortalidade (%)	
	Controle	Infectados	Controle	Infectados	Controle	Infectados
Repasto - NII	52	49	13,9 $\pm$ 5,27 (9 – 45)	27,4 $\pm$ 10,46 (16 – 57)	3,7	9,3
NII - NIII	45	40	34,7 $\pm$ 12,55 (22 – 73)	37,1 $\pm$ 8,34 (27 – 58)	13,0	16,7
NIII - NIV	42	34	40,4 $\pm$ 7,65 (26 – 56)	36,7 $\pm$ 6,95 (29 – 57)	5,6	11,1
NIV - NV	36	25	30,9 $\pm$ 7,27 (24 – 55)	31,9 $\pm$ 15,45 (21 – 79)	11,1	16,7
NV - AD	36	19	37,4 $\pm$ 9,49 (22 – 76)	40,0 $\pm$ 23,39 (24 – 114)	0,0	11,1
Período Ninfal	---	---	154,4 $\pm$ 10,74 (133 – 194)	169,8 $\pm$ 31,96 (141 – 250)	33,3	64,8

**X:** média; **SD:** desvio padrão; **NII – NV:** segundo a quinto estágio ninfal; **AD:** adultos. \* Foram utilizados no experimento, 54 insetos de cada grupo.

**Tabela 4.2** – Comparação do período de desenvolvimento (em dias) e do percentual de mortalidade de ovos e estádios ninfais de *Rhodnius pictipes* (grupo controle e infectado por *Trypanosoma rangeli* SC-58, KP1-).

Estádio	Número de insetos*		Duração ( $X \pm S$ dias) (min – máx)		Mortalidade (%)	
	Controle	Infectados	Controle	Infectados	Controle	Infectados
Repasto - NII	41	40	14,8 ± 7,31 (5 – 39)	28,3 ± 12,85 (11 – 60)	12,8	14,9
NII - NIII	34	25	33,1 ± 8,93 (21 – 52)	34,3 ± 12,31 (22 – 82)	14,9	31,9
NIII - NIV	34	22	32,2 ± 7,43 (14 – 41)	35,6 ± 6,73 (28 – 46)	0,0	6,4
NIV - NV	25	18	33,5 ± 8,44 (26 – 48)	33,9 ± 13,49 (21 – 79)	19,1	8,5
NV - AD	21	15	36,0 ± 5,66 (29 – 49)	39,1 ± 10,80 (26 – 55)	8,5	6,4
Período Ninfal	---	---	150,3 ± 10,07 (133 – 167)	173,1 ± 15,05 (148 – 193)	55,3	68,1

**X:** média; **SD:** desvio padrão; **NII – NV:** segundo a quinto estágio ninfal; **AD:** adultos. \* Foram utilizados no experimento, 47 insetos de cada grupo.

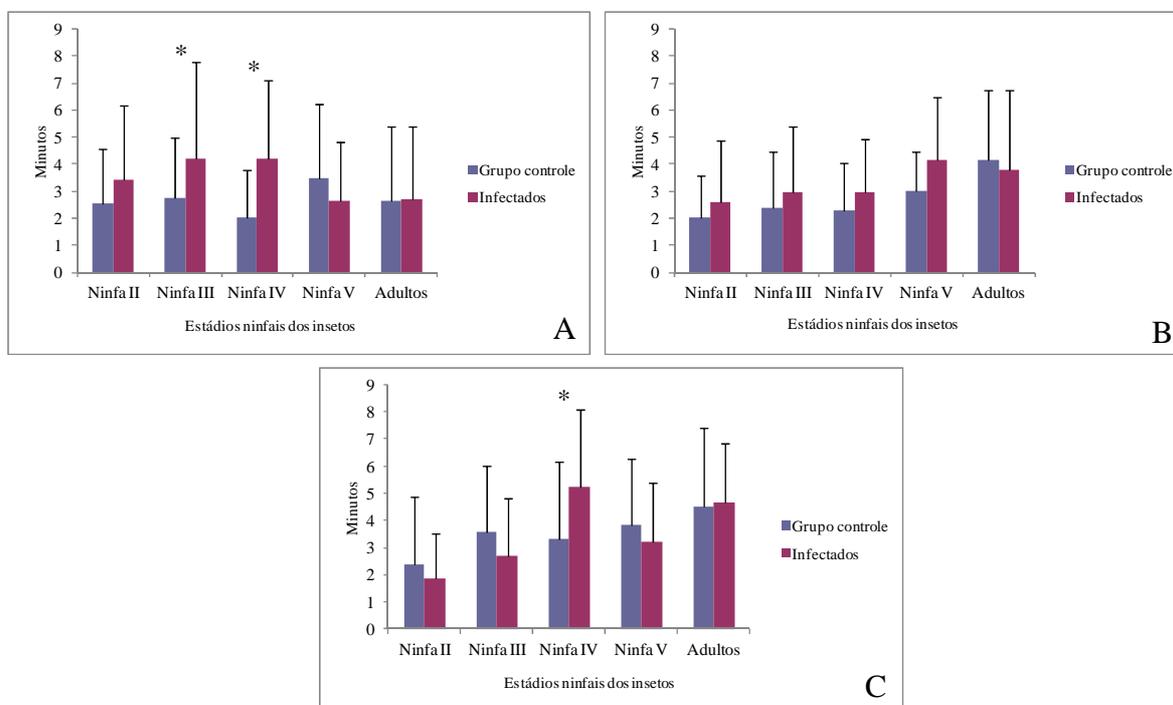
**Tabela 4.3** – Comparação do período de desenvolvimento (em dias) e do percentual de mortalidade de ovos e estádios ninfais de *Rhodnius robustus* (grupo controle e infectado por *Trypanosoma rangeli* SC-58, KP1-).

Estádio	Número de insetos*		Duração ( $X \pm S$ dias) (min – máx)		Mortalidade (%)	
	Controle	Infectados	Controle	Infectados	Controle	Infectados
Repasto - NII	48	44	17,0 $\pm$ 3,33 (11 – 26)	29,7 $\pm$ 9,91 (21 – 65)	4,0	12,0
NII - NIII	43	37	40,1 $\pm$ 8,29 (22 – 50)	36,9 $\pm$ 7,66 (27 – 61)	10,0	14,0
NIII - NIV	37	35	29,0 $\pm$ 5,53 (24 – 49)	30,3 $\pm$ 4,57 (21 – 36)	12,0	4,0
NIV - NV	33	29	28,6 $\pm$ 9,86 (20 – 75)	41,4 $\pm$ 8,56 (19 – 63)	8,0	12,0
NV - AD	27	21	50,9 $\pm$ 9,53 (37 – 79)	52,4 $\pm$ 23,33 (39 – 62)	12,0	16,0
Período Ninfal	---	---	161,5 $\pm$ 15,55 (142 – 196)	185,4 $\pm$ 25,12 (153 – 272)	46,0	58,0

**X**: média; **SD**: desvio padrão; **NII – NV**: segundo a quinto estágio ninfal; **AD**: adultos. \* Foram utilizados no experimento, 50 insetos de cada grupo.

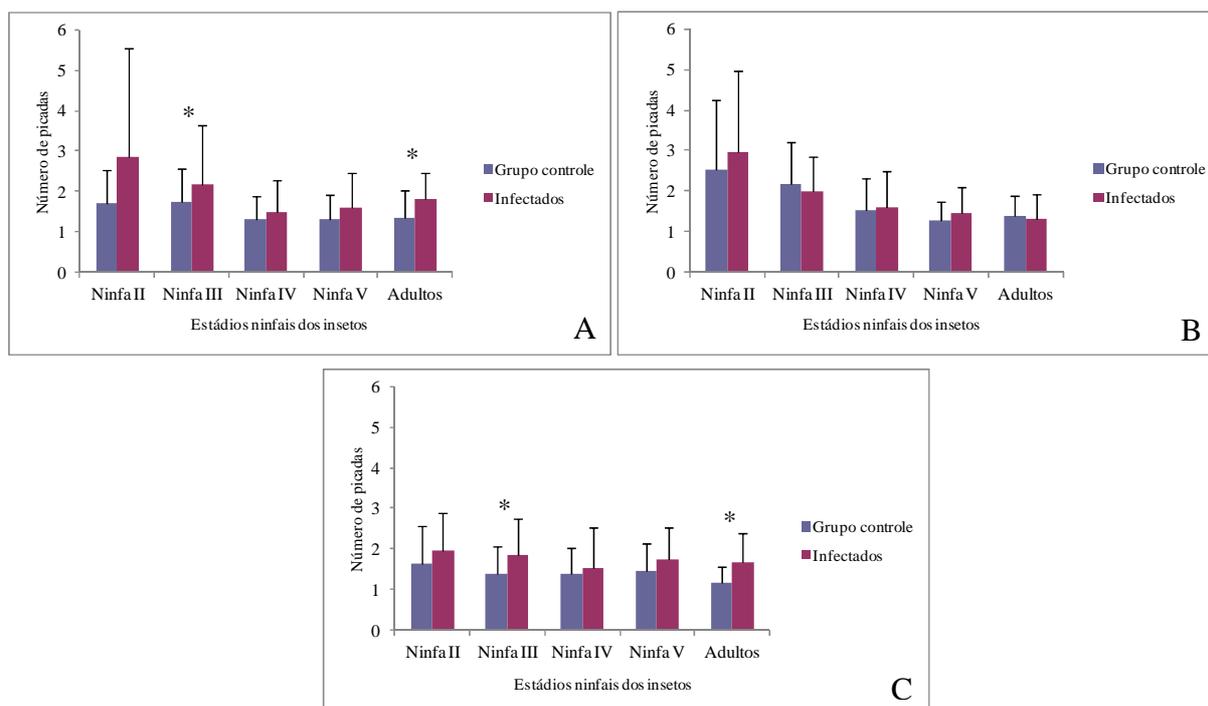
#### 4.5.2 Análise de alguns aspectos do comportamento alimentar de *R. neglectus*, *R. pictipes* e *R. robustus* infectados por *T. rangeli*

a) **Tempo de aproximação** – Para *R. neglectus*, as Ninfas III e IV dos espécimes infectados foram as que apresentaram um maior tempo de aproximação, com diferença significativa ao grupo controle (Figura 4.1). Para *R. pictipes*, observou-se que em média, os infectados demoraram mais para detectar a fonte alimentar que os do grupo controle. Dentre os *R. robustus*, as Ninfas IV infectadas, se destacaram com o maior tempo de aproximação (5,21 minutos), apresentando diferença significativa para o grupo controle (Figura 4.1).



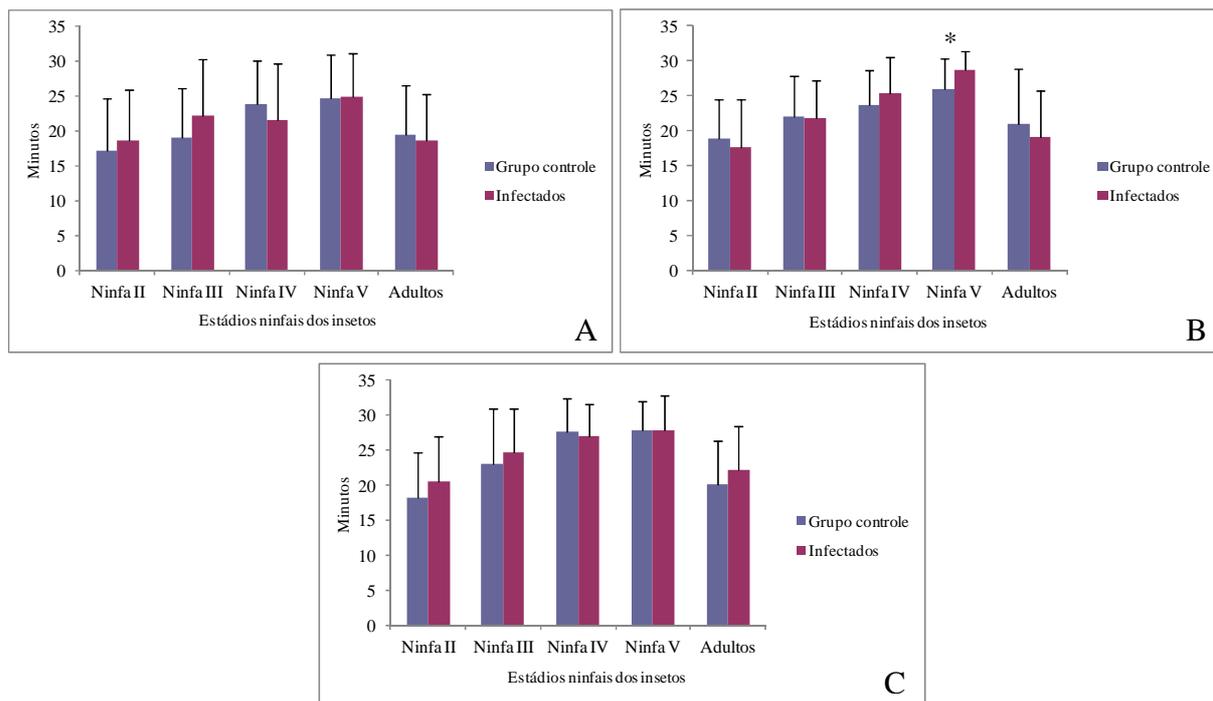
**Figura 4.1** Valor médio do tempo de aproximação dos insetos a fonte alimentar para os diferentes estádios de desenvolvimento de *Rhodnius*. A: *R. neglectus*; B: *R. pictipes*; C: *R. robustus*. As barras representam o desvio padrão da média. \*Diferença significativa comparando as médias entre os grupos ( $p < 0,05$ ).

**b) Número de picadas** - Em geral, as Ninfas II dos espécimes do grupo controle e do grupo infectados das três espécies estudadas, foram as que apresentaram o maior número de picadas, exceto para os *R. neglectus* do grupo controle (Figura 4.2). Observou-se que os insetos infectados apresentaram um maior número de picadas até o início do repasto que os insetos não infectados.



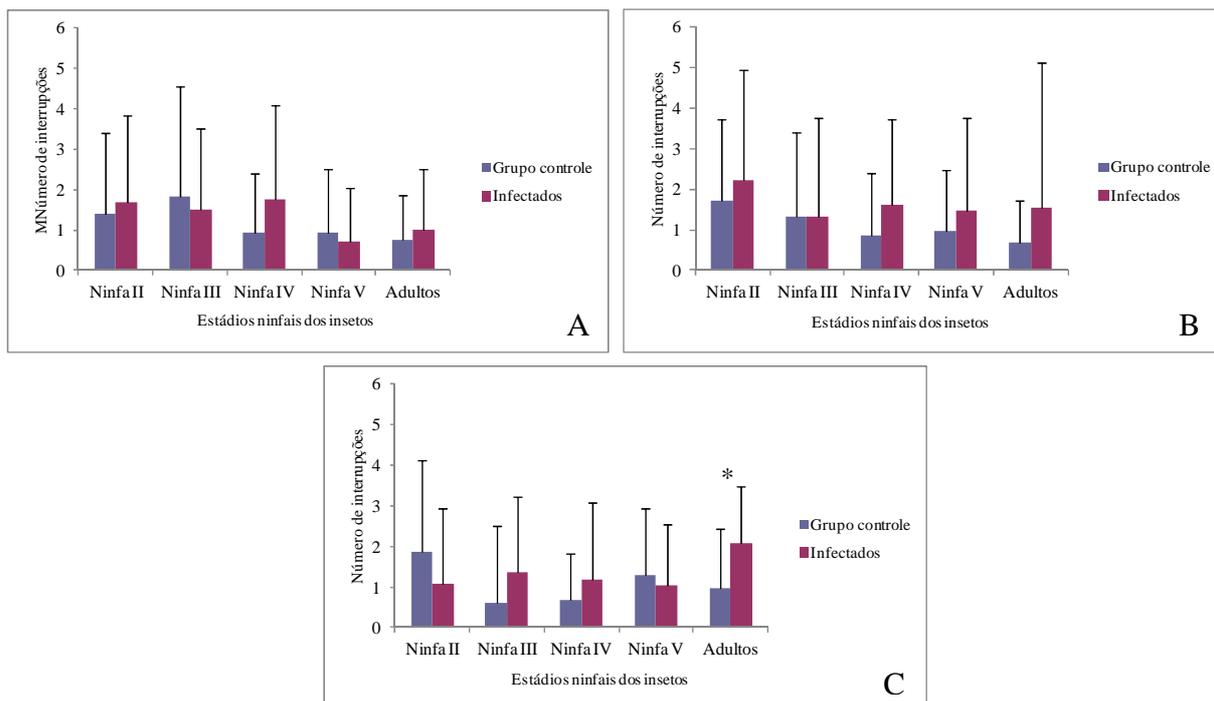
**Figura 4.2** Valor médio do número de picadas dos insetos *Rhodnius* na fonte alimentar. A: *R. neglectus*; B: *R. pictipes*; C: *R. robustus*. As barras representam o desvio padrão da média. \*Diferença significativa comparando as médias entre os grupos ( $p < 0,05$ ).

**c) Tempo do repasto sanguíneo** – O valor médio foi similar para as três espécies estudadas. A duração do repasto aumentou com a aproximação da fase adulta, mas as Ninfas V foram as que apresentaram a maior média. Na fase adulta ocorreu uma redução no período de repasto (Figura 4.3).



**Figura 4.3** Valor médio do tempo total do repasto sanguíneo dos insetos *Rhodnius* na fonte alimentar. A: *R. neglectus*; B: *R. pictipes*; C: *R. robustus*. As barras representam o desvio padrão da média. \*Diferença significativa comparando as médias entre os grupos ( $p < 0,05$ ).

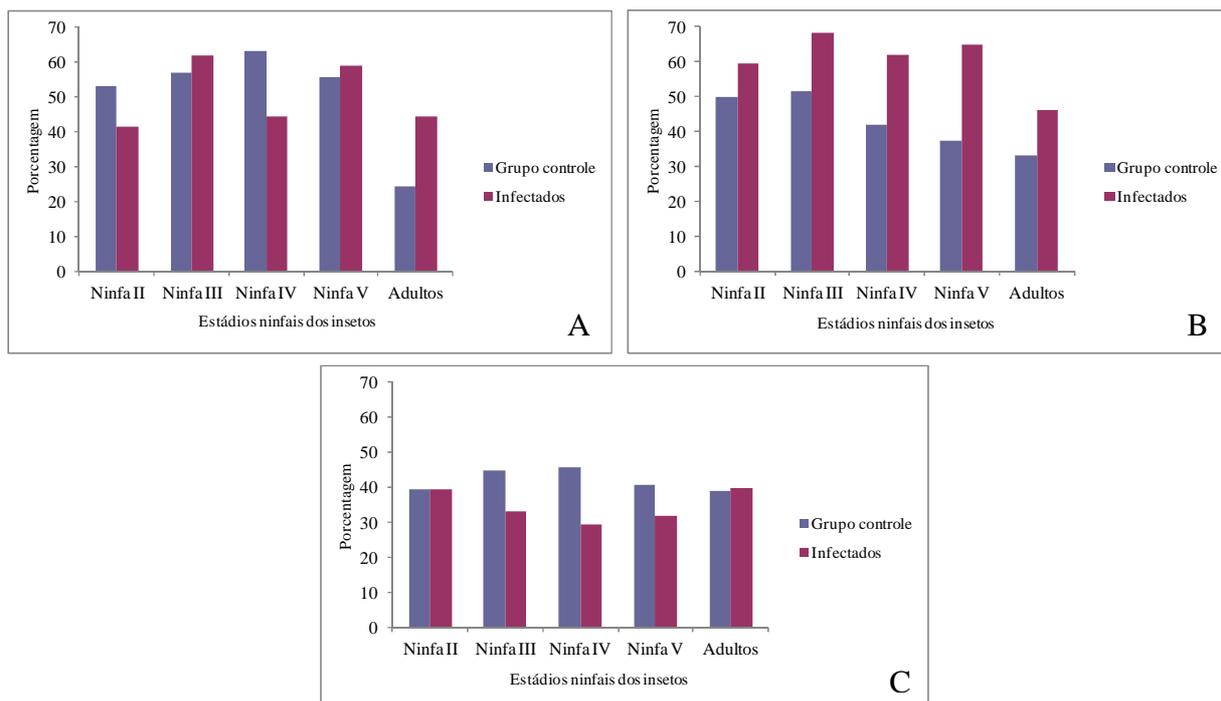
**d) Número de interrupções** – Os *R. pictipes* infectados apresentaram uma maior média de interrupções, que os insetos do grupo controle em todos os estádios ninfais, exceto para as Ninfas III que apresentaram quase a mesma média (1,32 e 1,33) (Figura 4.4). As Ninfas II de *R. pictipes* e *R. robustus* do grupo controle e *R. pictipes* infectados foram as que apresentaram o maior número de interrupções por repasto. Os adultos infectados das três espécies foram os que apresentaram uma maior elevação no número de interrupções, quando comparados ao grupo controle.



**Figura 4.4** Valor médio do número de interrupções dos insetos *Rhodnius*, durante a alimentação na fonte alimentar. A: *R. neglectus*; B: *R. pictipes*; C: *R. robustus*. As barras representam o desvio padrão da média. \*Diferença significativa comparando as médias entre os grupos ( $p < 0,05$ ).

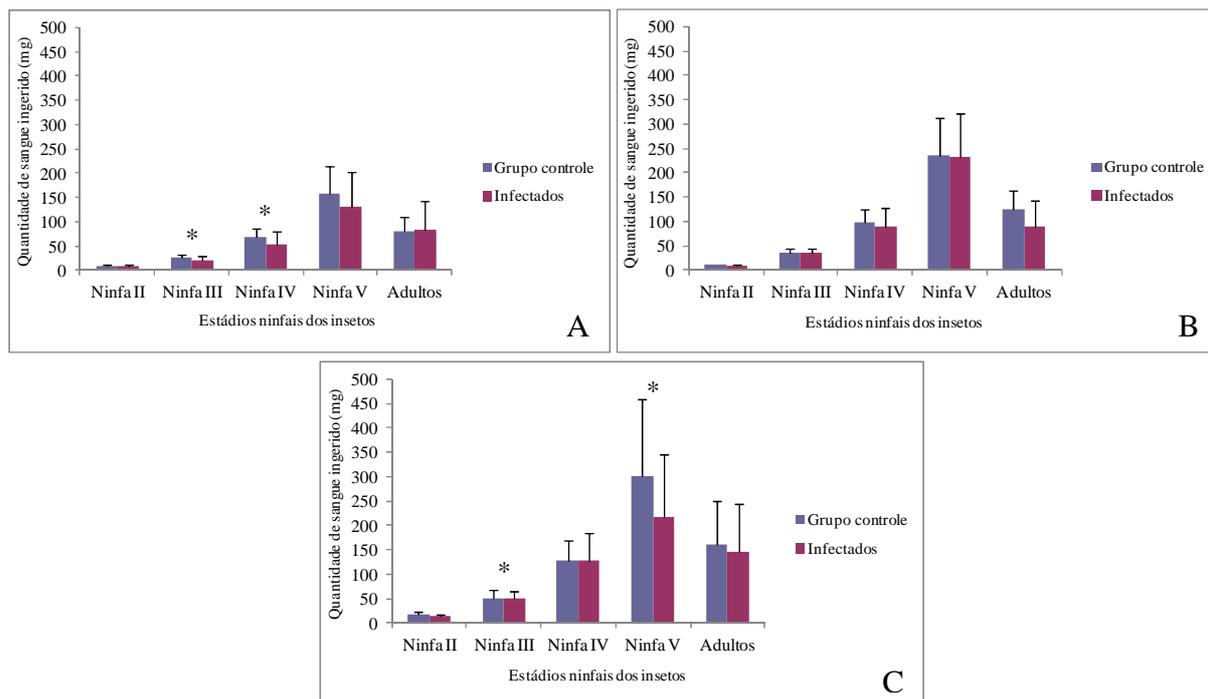
**e) Defecação** – Os *R. pictipes* infectados apresentaram um maior percentual de defecações em todos os estádios, quando comparados ao grupo controle e aos *R. neglectus* e *R. robustus* infectados (Figura 4.5).

Para *R. neglectus* e *R. pictipes* infectados, o maior percentual de defecações observadas, ocorreu com as Ninfas III, com uma média de 62 e 68%, respectivamente. Já para *R. robustus*, ocorreu com os adultos, com a média de 40%. No geral, os *R. robustus* foram os que apresentaram o menor percentual de defecações em todos os estádios.



**Figura 4.5** Percentuais de defecações dos insetos *Rhodnius*, somando-se as observações realizadas durante e após o repasto sanguíneo. A: *R. neglectus*; B: *R. pictipes*; C: *R. robustus*.

**f) Quantidade de sangue ingerido em cada estágio ninfal** - Para as três espécies, nos dois grupos, a quantidade de sangue ingerido foi crescente com o decorrer do desenvolvimento dos insetos, alcançando o pico pelas Ninfas V, com um decréscimo de aproximadamente 50% do volume na fase adulta (Figura 4.6).



**Figura 4.6** Valores médios (em mg) da quantidade de sangue ingerido pelos insetos *Rhodnius*, na fonte alimentar. A: *R. neglectus*; B: *R. pictipes*; C: *R. robustus*. As barras representam o desvio padrão da média. \*Diferença significativa comparando as médias entre os grupos ( $p < 0,05$ ).

## 4.6 Discussão

### 4.6.1 Estabelecimento das estatísticas vitais dos triatomíneos

Nas condições de laboratório empregadas neste trabalho, os dados sobre o desenvolvimento ninfal mostram que o período de tempo entre as mudas ou ecdises não variou muito, nem entre os estádios, nem entre o grupo controle e infectados, embora o grupo controle tenha mostrado uma tendência em direção a um desenvolvimento mais rápido. Já com relação à taxa de mortalidade durante o período ninfal, observou-se uma maior porcentagem no grupo dos infectados quando comparados com o grupo controle das três espécies estudadas, sendo que *R. neglectus* foi a única espécie que apresentou diferença significativa entre os dois tratamentos, demonstrando a influência do *T. rangeli* na biologia desses triatomíneos.

Geralmente o período de desenvolvimento ninfal dos triatomíneos está relacionado às condições de alimentação, temperatura e umidade a que são submetidos. Da ninfa II ao estágio adulto, os *R. neglectus* e os *R. pictipes* do grupo controle e infectados necessitaram, em média, de 30 a 40 dias para alcançarem o estágio seguinte, o que foi também observado para *R. robustus* por Braga *et al.* (1999) e para *R. ecuadoriensis* por Villacís *et al.* (2008), ao utilizarem triatomíneos não infectados. Rocha *et al.* (1994), por exemplo, registraram a duração do ciclo de *R. pictipes* (de ovo a adulto) em um tempo médio de 278 dias, resultado bastante superior ao nosso, que mostrou uma média de 150,3 e 173,1 dias para controle e infectados da mesma espécie. De acordo com Silva (1985), que estudou a influência da temperatura na biologia de dezoito espécies de triatomíneos, tais como *R. ecuadoriensis*, *R. nasutus*, *R. neglectus*, *R. pictipes* e *R. robustus*, as condições ambientais interferem na biologia dos triatomíneos.

Comparando-se o período de desenvolvimento desde o primeiro repasto até a muda imaginal das três espécies, os dois grupos experimentais (controle e infectados) apresentaram diferenças significativas. Oliveira *et al.* (2010) analisando a influência de *T. cruzi* em *T. brasiliensis*, também observaram atraso no desenvolvimento do primeiro para o segundo estágio ninfal do grupo infectados.

Muitos exemplares, principalmente do grupo infectados, emergiram da exúvia com defeitos nas patas, asas e probóscide, o que geralmente dificultava o repasto, levando à morte. A interrupção das ecdises, onde o inseto não conseguia se desprender totalmente da exúvia, também foi um fator importante para a mortalidade dos insetos.

Os estádios críticos de mortalidade para as três espécies do grupo controle, foram o 2° (*R. neglectus*), 4° (*R. pictipes*), e 3° e 5° estádios (*R. robustus*), o que não é considerado comum por vários autores que geralmente apresentam taxas elevadas de mortalidade no 1° e 5° estádios de desenvolvimento, como ocorreu para *R. robustus* (Braga *et al.*, 1999, Martínez-Ibarra *et al.*, 2003b, Aldana *et al.*, 2005). Já para os triatomíneos infectados, *R. neglectus* e *R. pictipes* apresentaram maior mortalidade no 2° estágio, fato que pode ter ocorrido pela dificuldade de adaptação após o repasto infectante ou pela dificuldade na realização do segundo repasto, com a fragilidade do

aparelho bucal, e dificuldade para alcançar o hospedeiro e atingir um capilar, já *R. robustus* continuou com maior mortalidade no estágio V.

Comparando-se o percentual de mortalidade durante o período ninfal total, os triatomíneos infectados apresentaram uma maior porcentagem que os espécimes não infectados, fato também demonstrado por Añez *et al.* (1987), utilizando *R. prolixus* infectados por *T. rangeli*, confirmando que o parasito foi responsável pelo maior número de mortes. Añez (1984), avaliando a interferência da infecção na sobrevivência de triatomíneos, observou que a mortalidade do grupo controle de *R. prolixus* foi bem mais baixa (5%) que a do grupo infectado (39%), o que também aconteceu para *R. robustus*: controle (12%) e infectado (46%). No presente estudo, *R. robustus* também apresentou diferença entre controle (46%) e infectado (58%), mas com uma taxa bastante elevada de mortalidade no grupo controle, o que pode ter ocorrido por ser uma espécie amazônica e as condições secas do Distrito Federal não foram favoráveis ao seu desenvolvimento.

Os únicos que apresentaram diferença significativa no percentual de mortalidade, foram os *R. neglectus*. Possivelmente, os *R. pictipes* dos dois grupos não se diferenciaram estatisticamente, porque os insetos enviados da Fiocruz-RJ, também tiveram certa dificuldade de adaptação ao clima do DF.

#### **4.6.2 Análise de alguns aspectos do comportamento alimentar de *R. neglectus*, *R. pictipes* e *R. robustus* infectados por *T. rangeli***

As três espécies demonstraram uma avidez precoce na procura da fonte alimentar, sendo que os espécimes infectados apresentaram um maior tempo para aproximação da fonte alimentar, com diferença significativa para as Ninfas III e IV de *R. neglectus* e Ninfas IV de *R. robustus*. *R. pictipes* se destacaram por apresentarem um maior tempo de aproximação em todas as ninfas do grupo infectados quando comparados ao grupo controle, exceto para os adultos. Apesar dessa diferença entre os dois grupos experimentais, a média do intervalo entre o oferecimento da alimentação e a picada foi inferior a 5 minutos para quase todas as ninfas, o que mostra que até os espécimes infectados foram rápidos na detecção da fonte alimentar. Esse tempo médio de aproximação foi similar para *R. pictipes* (Rocha *et al.*, 1994), para *R. nevai*, *R.*

*prolixus* e *R. robustus* (Aldana *et al*, 2001), para *R. nasutus* (Oliveira *et al*, 2009), e para *R. robustus* e *R. neglectus* (Barreto-Santana *et al*, 2011).

As Ninfas I de ambas as espécies, apresentaram o maior número de picadas se comparado aos outros estádios, mas isso provavelmente ocorreu devido ao menor tamanho da probóscide e à consequente dificuldade na detecção do vaso sanguíneo. Os insetos infectados podem ser considerados mais eficientes para a transmissão de *T. rangeli*, já que apresentaram um maior número de picadas até o início do repasto que os insetos do grupo controle.

Sabe-se que ao introduzir a probóscide e tentar encontrar o respectivo vaso sanguíneo, o triatomíneo previamente inocula saliva. Este mecanismo é de grande importância no mecanismo de transmissão (tipo “Salivaria”) via inoculativa pela picada do inseto vetor. Diversos autores enfatizam sobre o papel que os elementos da saliva dos triatomíneos exercem em fenômenos de vasodilatação, coagulação, anestesia e atividade anti-histamínica (Ribeiro & Garcia, 1981, Ribeiro *et al*, 1990, Guimarães & Ribeiro, 1995).

Foi mostrado que a saliva de *R. prolixus* infectados com *T. rangeli* possui menos substâncias anti-hemostáticas, o que provoca um aumento no tempo de procura por sangue na pele do hospedeiro pelo inseto, aumentando assim a possibilidade de inoculação intradérmica de parasitos no hospedeiro mamífero (Garcia *et al*, 1994). Añez & East (1984), observaram que *R. prolixus* e *R. robustus* infectados com *T. rangeli* apresentaram-se mais vorazes durante a alimentação e apresentaram um maior número de picadas.

De acordo com Guarneri *et al*. (2000), quanto mais eficiente é a espécie durante o processo de alimentação, mais curto será o seu tempo de contato com o hospedeiro e maior será sua chance de sobrevivência. Dessa forma, as três espécies estudadas podem ser consideradas eficientes no processo de alimentação, já que mostraram similar comportamento para o período de repasto.

No presente trabalho destaca-se o fato das Ninfas V (NV) de todas as espécies, nos dois tratamentos, apresentarem o maior tempo para repleção total, como foi observado para as NV de *T. dimidata* e *R. prolixus* (Zeledón *et al*, 1977), NV de *R. neivai*, *R. prolixus* e *R. robustus* (Aldana *et al*, 2001), de *R. colombiensis* e *R. prolixus* (Arévalo *et al*, 2007) e de *R. nasutus* (Oliveira *et al*, 2009). Arévalo *et al*. (2007) explicam que esse comportamento estaria

relacionado à necessidade de maior quantidade de sangue que as Ninfas V requerem para a aquisição de novas estruturas anatômicas durante a muda para o estado adulto. Observou-se também que na fase adulta houve uma redução no período de alimentação, fato também observado para *T. dimidata*, *T. infestans* e *R. prolixus* (Zeledón *et al*, 1977), *R. nasutus* (Oliveira *et al*, 2009) e *R. robustus* e *R. neglectus* (Barreto-Santana *et al*, 2011).

O número de interrupções foi maior entre os espécimes infectados, o que os torna mais eficientes na transmissão do *T. rangeli*, pois a cada interrupção, o vetor buscará um novo vaso sanguíneo, inoculando saliva mais vezes no hospedeiro. Observou-se também que alguns espécimes interrompiam a alimentação e defecavam sobre o hospedeiro, o que acontecia até duas vezes por repasto. Arévalo *et al.* (2007), também mencionaram a relação entre as interrupções e as defecações durante o repasto dos *R. prolixus*.

As espécies de triatomíneos que defecam durante os primeiros 5 – 10 minutos após a alimentação poderiam ser consideradas transmissoras eficazes de *T. cruzi* (Zeledón *et al*, 1977). Embora saibamos que a transmissão para *T. rangeli* seja predominantemente inoculativa, os *R. pictipes* do grupo infectados poderiam ser considerados eficazes para a transmissão de *T. cruzi*, pois apresentaram um maior percentual de defecações em todos os estádios, quando comparados ao grupo controle e aos *R. neglectus* e *R. robustus* infectados.

A quantidade de sangue ingerido apresenta variações inter e intra específicas, inclusive utilizando-se a mesma fonte alimentar, em repastos distintos (Rocha *et al*, 1997).

Como as Ninfas V precisam obter reservas energéticas suficientes para efetuar a muda para o estágio adulto, apresentaram a maior média da quantidade de sangue ingerido, com um decréscimo de aproximadamente 50% do volume na fase adulta, o que também foi observado para *R. pictipes* (Rocha *et al*, 1994), para *T. rubrovaria* (Bar *et al*, 2003), para *R. brethesi* (Rocha *et al*, 2004), para *R. ecuadoriensis* (Villacís *et al*, 2008) e para *R. robustus* e *R. neglectus* (Barreto-Santana *et al*, 2011).

Dentre os espécimes infectados observou-se que alguns rejeitaram a alimentação várias vezes; outros picavam em várias partes do hospedeiro, mas

não alteravam o peso; alguns ficavam os 30 minutos do repasto com a probóscide penetrada no hospedeiro vertebrado, mas não ingurgitava; e outros simplesmente nem encostavam no camundongo durante o período de observação do repasto. *R. pictipes* foram os espécimes que mais apresentaram essas características, fato que evidencia a patogenicidade do *T. rangeli* sobre os triatomíneos.

As diferenças apresentadas em alguns parâmetros do comportamento alimentar, na mortalidade, e na duração do período ninfal total entre os espécimes de *R. pictipes*, *R. robustus* e *R. neglectus*, confirmam a hipótese de que essas alterações estariam relacionadas com a linhagem evolutiva de *Rhodnius*.

Futuros estudos de infecção experimental com *T. rangeli* (KP1+) poderão fornecer mais evidências para testar a segunda hipótese e esclarecer se as alterações biológicas desses triatomíneos estão relacionadas com a linhagem de *T. rangeli*.

#### 4.7 Conclusões

- ✓ A infecção por *T. rangeli* não alterou significativamente a duração do período ninfal das espécies estudadas, mas entre as três espécies observou-se uma tendência em direção a um desenvolvimento mais rápido do grupo controle em relação aos infectados. *R. pictipes* ainda apresentou um maior período ninfal total quando comparado com as outras duas espécies.
- ✓ A mortalidade do grupo de espécimes infectados por *T. rangeli* foi maior que a observada no grupo controle, mas com diferença significativa apenas para os *R. neglectus*. Como o *T. rangeli* é tradicionalmente considerado patogênico para o hospedeiro invertebrado, os insetos infectados apresentaram deformações anatômicas e impedimento das ecdises, levando a uma elevada mortalidade, características quase não observadas no grupo controle.

- ✓ O número de picadas e o número de interrupções foram maiores nos triatomíneos infectados, com destaque para *R. pictipes*, confirmando que a infecção das glândulas salivares por *T. rangeli* prejudica a capacidade do vetor em localizar os vasos sanguíneos.
- ✓ Os *R. pictipes* infectados podem ser considerados eficazes para a transmissão de *T. cruzi*, pois apresentaram um maior percentual de defecações em todos os estádios, quando comparados ao grupo controle e aos *R. neglectus* e *R. robustus* infectados.

#### 4.8 Referências Bibliográficas

Aldana E, Lizano E, Valderrama A. Alimentación y defecación em triatominos del género *Rhodnius* (Hemiptera, Reduviidae) alimentados com sangre humana. Rev Biol Trop 2001; 49(2):693-696.

Aldana E, Zamora E, Lizano E. Biological cycle of *Rhodnius robustus* Larrousse 1927 feeding with human blood in laboratory conditions. Entomol Vectores, 2005; 12(1):53-60.

Añez N. Studies on *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920. VII. Its effect on the survival of infected triatomine bugs. Mem do Inst Oswaldo Cruz. 1984; 79(2):249-255.

Añez N, East JS. Studies on *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920. II. Its effects on feeding behaviour of triatomine bugs. Acta Trop. 1984; 41:93-95.

Añez N, Nieves E, Cazorla D. Studies on *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920. IX. Course of infection in different stages of *Rhodnius prolixus*. Mem do Inst Oswaldo Cruz. 1987; 82(1):1-6.

Arévalo A, Carranza JC, Guhl F, Clavijo JA, Vallejo GA. Comparación de los patrones de alimentación y defecación de *Rhodnius colombiensis* *Rhodnius colombiensis* y *Rhodnius prolixus* (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) en condiciones de laboratorio. Biomedica. 2007; 27 Suppl 1:101-109.

Bar ME, Milano AMF, Damborsky MP, Oscherov EB, Avalos G. Patrones de alimentación y de defecación de *Triatoma rubrovaria* Blanchard, 1843 (Heteroptera: Reduviidae) bajo condiciones de laboratorio. Comunicaciones Científicas y Tecnológicas. 2003; Resumen: B-006.

Barreto-Santana D, Starling J, Gurgel-Gonçalves R, Cuba Cuba CA. Biología comparativa e comportamento alimentar de *Rhodnius neglectus* e *Rhodnius robustus* (Triatominae) sob condições de laboratório. Rev Soc Bras Med Trop. 2011; 44(4):490-495.

Braga MV, Prata KC, Brazil RP. Biology of nymphs of *Rhodnius robustus* Larrousse, 1927 (Hemiptera, Reduviidae), fed on pigeon or on swiss mouse blood in laboratory conditions. Rev Bras Biol. 1999; 59(1):91-94.

Canale MD, Jurberg J, Carcavallo RU, Galvao C, Galindez Giron I, Mena Segura CA, et al. Bionomics of some species. In: Carcavallo RU, Galindez Giron I, Jurberg J, Lent H, editores. Atlas of Chagas Disease Vectors in the America. Vol. III. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz ; 1999; p. 839-890.

Carcavallo RU. *Rhodnius pallescens*: Barber, 1932. In: Taller Técnico de Estudio sobre *Rhodnius pallescens*, su Vigilancia y Control. Fiocruz. 2002.

Crocco LB, Catalã SS. Feeding and Defecation Patterns in *Triatoma sordida*. Mem do Inst Oswaldo Cruz. 1996; 91(4):409-413.

Garcia ES, Mello CB, Azambuja P, Ribeiro JM. *Rhodnius prolixus*: salivary antihemostatic components decrease with *Trypanosoma rangeli* infection. Exp Parasitology. 1994; 78:287-293.

Guarneri AA, Carvalho MG, Pereira MH. Potencial biológico do *Triatoma brasiliensis*. Cad Saúde Pública. 2000; 16 Suppl 2:101-104.

Guimarães JA, Ribeiro JMC. Salivary gland anti-haemostatic compounds: a tool to define speciation and evolution of blood-sucking triatomines. Mem do Inst Oswaldo Cruz. 1995; 90 Suppl 1:55-57

Gurgel-Gonçalves R, Abad-Franch F, Ferreira JBC, Barreto-Santana D, Cuba Cuba CA. Is *Rhodnius prolixus* (Triatominae) invading houses in central Brazil? *Acta Trop.* 2008; 107:90-98.

Martinez-Ibarra JA, Grant-Guillen Y, Martinez-Grant DM. Feeding, defecation, and development times of *Meccus longipennis* Usinger, 1939 (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) under laboratory conditions. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2003a; 98(7):899-903.

Martinez-Ibarra JA, Grant-Guillen Y, Noguera-Torres B, Trujillo-Contreras F. Influence of the blood meal source on the biology of *Meccus picturatus* Usinger 1939 (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) under laboratory conditions. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2003b; 98(2):227-232.

Mejía GD. Aspectos ecológicos de populações silvestres de *Triatominae* (Hemiptera: Reduviidae) em palmeiras *Attalea speciosa* (Arecaceae) e estimativa do risco ambiental para a transmissão de *Trypanosomatidae* (Kinetoplastida) em uma frente pioneira de desmatamento (Pará-Brasil). [Dissertação de Mestrado]. Brasília: Universidade de Brasília. 2005.

Nattero J, Crocco LB, Rodriguez CS. Feeding and defaecation behaviour of *Triatoma patagonica* (Del Ponte, 1929) (Hemiptera: Reduviidae). *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2002; 97(7):1063-1065.

Noguera-Torres B, Alejandre-Aguilar R, Isita-Tornell L, Camacho AD. Defecation Pattern in Seven Species of Triatomines (Insecta, Reduviidae) Present in México. *Rev Latin Microbiol.* 2000; 42:145-148.

Oliveira TG, Carvalho-Costa FA, Sarquis O, Lima MM. Feeding and defecation patterns of *Rhodnius nasutus* (Hemiptera: Reduviidae), a triatomine native to an area endemic for Chagas Disease in the state of Ceará, Brazil. *Am J Trop Med Hyg.* 2009; 81(4):651-655.

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

Ribeiro JMC, Garcia ES. Platelet antiaggregating activity in the salivary secretion of *Rhodnius prolixus*. *Experientia*. 1981; 37:384-386.

Ribeiro JMC, Marinotti O, Gonzales R. A salivary vasodilatador in the blood-sucking bug *Rhodnius prolixus*. *Brit J Pharmacol*. 1990; 101:932-936.

Rocha DS, Jurberg J, Galvão C. Biologia do *Rhodnius pictipes* Stal, 1872 em condições de laboratório (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1994; 89(2):265-270.

Rocha DS, Fonseca AH, Costa FA, Jurberg J, Galvão C. Desenvolvimento de *Rhodnius pictipes* Stal, 1872 alimentado através de membrana de silicone e em camundongos (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1997; 92(4):553-558.

Rocha DS, Jurberg J, Carcavallo RU. Influence of the temperature and humidity on the biology of *Rhodnius neglectus* Lent, 1954 in laboratory conditions. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2001a; 34(4):357-363.

Rocha DS, Jurberg J, Carcavallo RU. Influence of temperature and humidity on the nymphal development of *Rhodnius robustus*. *Rev Saúde Pública*. 2001b; 35(4):400-406.

Rocha DS, Santos CM, Cunha V, Jurberg J, Galvão C. Ciclo biológico em laboratório de *Rhodnius brethesi* Matta, 1919 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae), potencial vetor silvestre da Doença de Chagas na Amazônia. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2004; 99(6):591-595.

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

Schaub GA. Pathogenicity of trypanosomatids on insects. *Parasitol Today*. 1994; 10:463-468.

Schaub GA. Parasitogenic alterations of vector behaviour. *Int J Med Microbiol*. 2006; 296 Suppl 1:37-40.

Silva IG. Influência da temperatura na biologia de 18 espécies de triatomíneos (Hemiptera, Reduviidae) e no xenodiagnóstico. [Dissertação de Mestrado]. Curitiba: Universidade Federal do Paraná. 1985.

Urrea DA, Guhl F, Herrera CP, Fallab A, Carranza JC, Cuba Cuba CA, et al. Sequence analysis of the spliced-leader intergenic region (SL-IR) and random amplified polymorphic DNA (RAPD) of *Trypanosoma rangeli* strains isolated from *Rhodnius ecuadoriensis*, *R. colombiensis*, *R. pallescens* and *R. prolixus* suggests a degree of co-evolution between parasites and vectors. *Acta Trop.* 2011; 120:59-66.

Vallejo GA, Guhl F, Carranza JC, Moreno J, Triana O, Grisard EC. Parity between kinetoplast DNA and miniexon 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.* 2003; 3:39-45.

Vallejo GA, Guhl F, Carranza JC, Triana O, Pérez G, Ortiz PA, et al. Interacción tripanosoma-vector-vertebrado y su relación con la sistemática y la epidemiología de la tripanosomiasis americana. *Biomédica.* 2007; 27 Suppl 1:110-8.

Villacís AG, Arcos-Terán L, Grijalva MJ. Life cycle, feeding and defecation patterns of *Rhodnius ecuadoriensis* (Lent & León 1958) (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) under laboratory conditions. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2008; 103(7):690-695.

Zeledón R, Alvarado R, Jirón JF. Observations on the feeding and defecation patterns of three triatomine species (Hemiptera: Reduviidae). *Acta Trop.* 1977; 34:65-77.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Podemos considerar que a infectividade demonstrada pela capacidade do *Trypanosoma rangeli* (SC-58, KP1-) de completar todo o ciclo evolutivo no triatomíneo e ser transmitido pela picada ao hospedeiro vertebrado, foi mais elevada e mais eficiente em *Rhodnius pictipes*, espécie pertencente à linhagem “pictipes”, do que nas espécies de *Rhodnius* da linhagem “robustus”. Isso adiciona evidências a favor da teoria vigente de co-evolução entre as linhagens de *T. rangeli* e *Rhodnius spp.* Experimentos futuros utilizando-se uma cepa KP1+, nas mesmas espécies utilizadas, poderão esclarecer se os fenômenos biológicos que acompanham a suscetibilidade ou refratariedade desses triatomíneos estão relacionadas com a linhagem de *T. rangeli*.

Os aspectos iniciais de adesão e penetração nas glândulas salivares de *R. robustus* foram identificados, mostrando que se dá por formas epimastigotas e/ou tripomastigotas. Observou-se também a distribuição dessas duas formas na luz da glândula, algumas aderidas às microvilosidades das células e de formas epimastigotas entre a lâmina basal e o epitélio glandular. Ainda seria necessário estudar melhor a interação flagelado e células glandulares, e contribuir ao melhor conhecimento do fenômeno de metaciclogênese do *T. rangeli* nos diversos compartimentos que constitui as estruturas histológicas celulares das glândulas salivares do gênero *Rhodnius*.

Durante o desenvolvimento do trabalho existiram algumas limitações como a ausência de um insetário com condições de temperatura e umidade controladas que favoreceriam o desenvolvimento adequado dos espécimes estudados.

## GLOSSÁRIO<sup>1</sup>

**Simpatria:** existência de duas ou mais populações em uma mesma área geográfica.

**Minissatélites de DNA:** seqüências repetidas de nucleotídeos distribuídas ao longo do DNA de um organismo.

**Hemolinfa:** sangue do inseto, que preenche os espaços da cavidade geral do corpo – ou hemocele – banhando todos os órgãos e penetrando em todos os apêndices.

**Fatores tripanolíticos:** substâncias não identificadas que acredita-se serem responsáveis pela destruição dos flagelados.

**Hemoflagelado:** protozoário flagelado parasita do sangue.

**Análise FACS:** Fluorescence Activated Cell Sorting. Análise computadorizada de células e separação das mesmas com uso de marcação de proteínas específicas através de fluorescência.

**Glândula merócrina:** glândulas que eliminam somente as secreções ficando suas células intactas.

**Glândula apócrina:** glândulas que eliminam parte (pedaço) das células junto com secreção.

**Técnica de hibridização:** técnica usada para detecção e quantificação de seqüências específicas de ácidos nucléicos alvos. Usada para determinar (1) se certa seqüência ocorre no DNA de um organismo em particular, (2) parentesco genético ou evolutivo entre diferentes organismos, (3) o número de genes transcritos em um mRNA em particular, e (4) a localização de uma dada seqüência de DNA.

**Moléculas bioativas:** moléculas (peptídeos, por exemplo) com atividade demonstrada de estímulo ou inibição de expressão de uma função biológica ou fisiológica.

<sup>1</sup>O glossário foi baseado nas seguintes publicações:

Devlin TM, Michelacci YM. Manual de bioquímica com correlações clínicas. Blucher: São Paulo; 2007.

Junqueira LC, Carneiro J. Histologia Básica. 8ª ed. Guanabara: Rio de Janeiro; 1995.

Murray RK, Granner DK, Mayes PA, Rodwell VW. Harper: Bioquímica ilustrada. 26ª ed. Ateneu: São Paulo; 2006.

Odum EP. Ecologia. Guanabara: Rio de Janeiro; 1983.

Rey L. Parasitologia. 3ª ed. Guanabara: Rio de Janeiro; 2001.

Voet D, Voet JG, Pratt CW. Fundamentos de bioquímica. Artmed: São Paulo; 2002.

**ANEXO A – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA E PESQUISA**



**Universidade de Brasília**

Instituto de Ciências Biológicas  
Comitê de Ética no Uso Animal

Brasília, 30 de junho de 2010.

### **DECLARAÇÃO**

Declaramos que o projeto intitulado "**Trypanosoma Rangeli: Biologia do Parasitismo em Espécies do Gênero Rhodnius (Hemiptera, Reduviidae)**", UnBDOC nº. 42003/2010, sob responsabilidade do Prof. Dr. Rodrigo Gurgel Gonçalves, foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética no Uso Animal (CEUA) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília.

Prof. Antonio Sebben  
Coordenador do CEUA



**ANEXO B – CÓPIA DO ARTIGO PUBLICADO**



## Artigo/Article

# Biologia comparativa e comportamento alimentar de *Rhodnius neglectus* e *Rhodnius robustus* (Triatominae) sob condições de laboratório

Comparative biology and feeding behavior of *Rhodnius neglectus* and *Rhodnius robustus* (Triatominae) under laboratory conditions

Daniella Barreto-Santana<sup>1</sup>, Jacqueline Starling<sup>1</sup>, Rodrigo Gurgel-Gonçalves<sup>1</sup> e César Augusto Cuba Cuba<sup>1</sup>

### RESUMO

**Introdução:** A competência vetorial de triatomíneos é determinada a partir de estudos sobre biologia e comportamento alimentar em condições de campo e/ou laboratório. Fatores como número de picadas, quantidade de sangue ingerido e tempo de defecação têm implicações na transmissão de tripanosomatídeos. Parâmetros biológicos e comportamentais de *Rhodnius neglectus* e *R. robustus* foram comparados experimentalmente para estimar diferenças no potencial de transmissão de tripanosomatídeos. **Métodos:** Os triatomíneos foram observados diariamente para determinar o período de desenvolvimento ninfal, mortalidade, detecção da fonte alimentar, número de picadas, tempo do repasto sanguíneo, quantidade de sangue ingerido, tempo entre o final do repasto e a primeira defecação e frequência de defecação. **Resultados:** Apesar do período ninfal de *R. neglectus* ( $156,4 \pm 25,05d$ ) ter sido menor que o de *R. robustus* ( $204,7 \pm 13,22d$ ), a mortalidade foi similar entre as espécies (63,8 e 65%, respectivamente). *R. robustus* e *R. neglectus* detectaram rapidamente a fonte alimentar, especialmente no primeiro estágio (2,5 e 1,6min, respectivamente). Apesar do tempo de repasto sanguíneo ter sido similar entre as espécies, *R. robustus* ingeriu em média uma maior quantidade de sangue em todos os estágios, com maiores valores para as ninfas V. As ninfas de *R. neglectus* picaram mais vezes as fontes alimentares, defecaram mais rápido e mais frequentemente que as de *R. robustus*. **Conclusões:** Sob as condições de laboratório usadas, *R. neglectus* possui um maior potencial para transmissão de *Trypanosoma cruzi* e *T. rangeli* que *R. robustus*, atributo que deve ser avaliado em infecções experimentais.

**Palavras-chaves:** Triatominae. *Rhodnius*. Biologia. Competência vetorial. Tripanosomatídeos.

### ABSTRACT

**Introduction:** The vector competence of triatomine insects is determined by studying their biology and feeding behavior under field and/or laboratory conditions. Factors including the number of bites, the amount of blood ingested and defecation time have implications for trypanosome transmission. The biological and behavioral parameters of *Rhodnius neglectus* and *R. robustus* were compared under experimental conditions to estimate differences in the potential transmission of trypanosomes. **Methods:** The insects were observed daily to determine the period of nymphal development, mortality, detection of food source, number of bites, time of blood meal intake, amount of blood ingested, time elapsed between the end of the meal and the first defecation and the frequency of defecation. **Results:** Although the nymphal development of *R. neglectus* ( $156.4 \pm 25.05d$ ) was lower than that of *R. robustus* ( $204.7 \pm 13.22d$ ), the mortality between species was similar (63.8 and 65% respectively). *R. robustus* and *R. neglectus* quickly located the food source, especially in the first instar (2.5 and 1.6 min, respectively). Although the time of blood meal intake was similar between the species, *R. robustus* ingested a larger amount of blood on average at all stages and exhibited higher values for the fifth instar. Nymphs of *R. neglectus* bit more frequently, and they defecated faster and more often than those of *R. robustus*. **Conclusions:** Under laboratory conditions, *R. neglectus* has a greater potential for transmission of *Trypanosoma cruzi* and *T. rangeli* than does *R. robustus*, an attribute that should be further evaluated in experimental infections.

**Keywords:** Triatominae. *Rhodnius*. Biology. Vectorial competence. Trypanosomatids.

1. Laboratório de Parasitologia Médica e Biologia de Vetores, Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília, Brasília, DF.

**Endereço para correspondência:** Dra Daniella Barreto-Santana. Lab. Parasitologia Médica e Biologia de Vetores/FM/UnB. Campus Universitário Darcy Ribeiro, Asa Norte, 70910-900 Brasília, DF.

Tel: 51 61 3107-1786

e-mail: daniellabaag@hotmail.com

**Recebido para publicação em** 02/09/2010

**Aceito em** 28/04/2011

### INTRODUÇÃO

*Rhodnius neglectus* Lent, 1954 e *Rhodnius robustus* Larrousse, 1927 são espécies de triatomíneos predominantemente silvestres, habitando diferentes espécies de palmeiras no Brasil<sup>1-5</sup>. *R. neglectus* é uma espécie característica do cerrado no Brasil central com um papel importante na transmissão enzoótica de *Trypanosoma cruzi* e *T. rangeli*<sup>6</sup>. Além da invasão de adultos nos domicílios<sup>7</sup>, existem evidências de formação de colônias domiciliares de *R. neglectus* nos Estados de Minas Gerais, São Paulo e Goiás<sup>8-10</sup>, sendo considerado como um vetor secundário na transmissão da doença de Chagas. *R. robustus* (s.l., ver Abad-Franch cols<sup>4</sup>) tem ampla distribuição na Amazônia, ocorrendo frequentemente em palmeiras (silvestres e periurbanas) em altas densidades e com relevantes taxas de infecção por tripanosomatídeos<sup>1,3,11,12</sup>. Apesar de não existirem evidências de colonização de *R. robustus* em ambiente domiciliar no Brasil, espécimes adultos infectados por *T. cruzi* têm invadido casas na região amazônica, sendo potenciais vetores extradomiciliares ou ainda podendo contaminar equipamentos de processamento de alimentos, representando risco de transmissão oral da doença de Chagas<sup>13,14</sup>.

Devido à invasão dessas espécies de *Rhodnius* ao domicílio, o estudo de parâmetros biológicos que influenciam a capacidade de transmissão de tripanosomatídeos pode contribuir para melhorar a compreensão da importância epidemiológica desses vetores, orientando ações de vigilância das tripanossomíases. Além da suscetibilidade aos parasitos, outras características dos triatomíneos como o comportamento alimentar (detecção da fonte alimentar, número de picadas, tempo de repasto, quantidade de sangue ingerido), e a frequência de dejeções também podem determinar a eficiência na transmissão do *T. cruzi*<sup>15-28</sup>. Em se tratando de *T. rangeli*, cujo mecanismo de transmissão é do tipo inoculativo, o número de picadas e o número de interrupções realizadas durante o processo de alimentação também devem ser determinantes da competência vetorial. Parâmetros como duração

do ciclo de vida e mortalidade também podem ser considerados, pois são variáveis diretamente relacionadas com o tamanho das populações dos vetores. No presente trabalho, parâmetros biológicos e comportamentais de *R. neglectus* e *R. robustus* foram comparados sob condições de laboratório para estimar diferenças no potencial de transmissão de tripanosomatídeos.

## MÉTODOS

### Material biológico

Foram utilizados insetos provenientes das colônias mantidas no Laboratório de Parasitologia Médica e Biologia de Vetores (Faculdade de Medicina, UnB). Os *Rhodnius neglectus* foram coletados na Reserva Ecológica do IBGE, Brasília, DF<sup>29</sup> e os *R. robustus* em Benfica, Marabá, PA<sup>30</sup>.

### Desenvolvimento de ovos e estádios ninfais

Inicialmente foram obtidas aleatoriamente 30 ninfas de quinto estágio das colônias da quarta geração de *R. neglectus* e *R. robustus*, para obtenção de adultos. Após a muda, foram formados três grupos compostos de quatro fêmeas e três machos, para cada espécie.

Os casais de cada espécie foram mantidos em conjunto para a obtenção de ovos em recipientes de plástico (9,5cm de altura x 5,5cm de diâmetro), com tampas com uma abertura de 4,5cm de diâmetro forradas com uma malha de arame. Estes tinham o fundo forrado com papel filtro e contendo tiras do mesmo papel, dobradas em sanfona<sup>16</sup>.

O número de ovos produzidos está diretamente relacionado à quantidade de sangue ingerido<sup>31</sup>. Por isso, na fase inicial, os insetos adultos dos seis grupos compostos formados foram alimentados duas vezes por semana, em camundongos albinos (*Swiss 44*, pesando aproximadamente 30 a 35g), provenientes do Biotério Central da Universidade de Brasília, anestesiados com ketamina 80mg/kg + xilazina 10mg/kg (via intraperitoneal).

Após a postura, 80 ovos de cada espécie foram agrupados pela data de oviposição para determinar o período de eclosão (embrionamento). Após a eclosão, as ninfas de primeiro estágio foram separadas individualmente em outros recipientes para as posteriores ecdises. Os insetos foram mantidos sob condições controladas de temperatura (28°C ± 2°C) e umidade relativa (75% ± 10%).

Os insetos foram observados diariamente a fim de determinar os percentuais de mortalidade, o período de embrionamento dos ovos e o período total de desenvolvimento ninfal das espécies em condições de laboratório.

### Comportamento alimentar

Uma *arena experimental* foi preparada em uma cuba de vidro transparente de 30cm de diâmetro. No interior de cada arena foi colocado um camundongo albino imobilizado em uma malha de arame e um espécime de *Rhodnius*, para o registro dos padrões de alimentação e defecação. A alimentação foi oferecida, aproximadamente, sete dias após cada ecdise e o tempo de oferecimento da fonte alimentar foi de no máximo 30min. A observação foi contínua durante o processo de alimentação e foi realizada a uma temperatura média de 25°C. Somente aqueles espécimes que se recusavam a sugar ou sugavam pouca quantidade de sangue eram submetidos à nova tentativa de alimentação. Para ambas as espécies foram estudadas as seguintes variáveis: A) tempo de aproximação: tempo (em minutos) desde que o inseto foi colocado na arena até o momento de introdução da probóscide na

pele do camundongo; B) número de picadas: número de vezes que o inseto encostou e introduziu a probóscide na tentativa de encontrar vênulas/arteríolas na pele do camundongo, antes do início evidente do seu repasto; C) número de interrupções do repasto: contabilizou-se o número de interrupções espontâneas do inseto durante o repasto; D) tempo do repasto: tempo (em minutos) entre a primeira picada e o fim da ingestão de sangue; E) quantidade de sangue ingerido: todos os insetos foram pesados antes e imediatamente após o repasto em balança analítica AND HR-200, graduada em mg para determinar a quantidade de sangue ingerido; F) tempo entre o final do repasto e a primeira defecação (em minutos); G) frequência de defecação: proporção de indivíduos que defecaram durante e até 10min após o repasto.

### Análises estatísticas

Foi utilizado inicialmente o teste de Kolmogorov-Smirnov, para verificar a normalidade das variáveis. Para a comparação das médias das variáveis de cada estágio de desenvolvimento, entre as duas espécies, foi utilizado o teste T de Student ou teste de Mann-Whitney. Para comparação das taxas de mortalidade entre as duas espécies foi utilizado o teste qui-quadrado. Para analisar a variação dos parâmetros entre os estádios de desenvolvimento de uma mesma espécie, foram aplicadas análises de variância (ANOVA ou Kruskal-Wallis). Os testes foram realizados no programa Statistica®.

### Considerações éticas

O manejo e os cuidados com os animais seguiram os princípios éticos na experimentação animal sugeridos pelo Comitê de Ética no Uso Animal (CEUA) da Universidade de Brasília, Instituto de Ciências Biológicas.

## RESULTADOS

### Desenvolvimento de ovos e estádios ninfais

Dos 80 espécimes de *R. neglectus*, 29 (36,2%) atingiram a fase adulta. Da ninfa I à ninfa III, os insetos necessitaram, em média, de menos de um mês para alcançarem o estágio seguinte. Dos 80 espécimes de *R. robustus*, 28 (35%) chegaram à fase adulta. Se comparado com *R. neglectus*, o período de desenvolvimento de *R. robustus* foi significativamente maior em todos os estádios ( $p < 0,01$ ), exceto para ninfas V (**Tabela 1**).

Os percentuais de mortalidade de *R. neglectus* variaram em relação aos estádios de desenvolvimento. Os maiores foram registrados para as ninfas I e II. As ninfas IV e V apresentaram um percentual similar. Apesar dos percentuais de mortalidade de *R. robustus* terem sido maiores nas ninfas I e V (**Tabela 1**) não foi detectada diferença significativa entre a taxa de mortalidade do período ninfal de *R. neglectus* e *R. robustus* ( $\chi^2 = 0,02$ ;  $p = 0,90$ ).

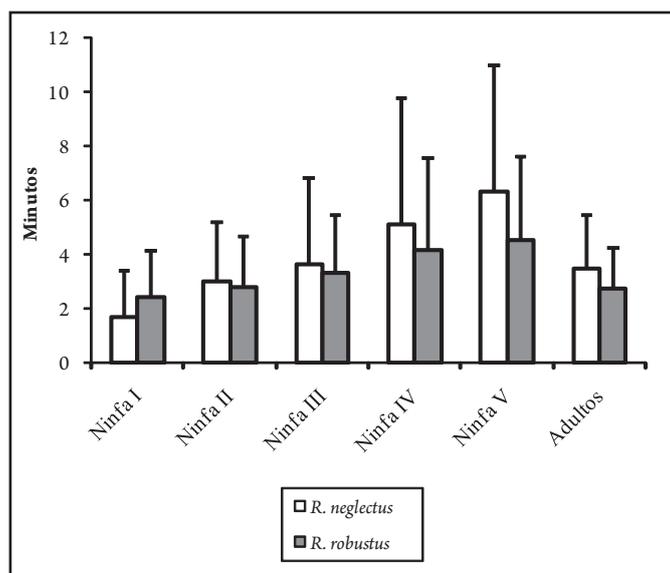
### Tempo de aproximação dos insetos à fonte alimentar

*Rhodnius robustus* e *R. neglectus* detectaram rapidamente a fonte alimentar (**Figura 1**), principalmente no primeiro estágio (em média 2,5 e 1,6min, respectivamente). Não foram detectadas diferenças significativas comparando o valor médio deste parâmetro entre os estádios de ambas as espécies. Entretanto, ao comparar o tempo de aproximação entre os estádios de uma mesma espécie, foram observadas diferenças estatisticamente significativas para *R. robustus* ( $H_{5,236} = 14,7$ ;  $p < 0,01$ ) e *R. neglectus* ( $H_{5,215} = 54,6$ ;  $p < 0,01$ ); o tempo de aproximação dos insetos à fonte alimentar aumentou de acordo com o desenvolvimento dos estádios ninfais, sendo que na fase adulta o tempo diminuiu em quase 50% quando comparado com a ninfa V, para ambas as espécies (**Figura 1**).

**TABELA 1 - Comparação do período de desenvolvimento (em dias) e do percentual de mortalidade de ovos e estádios ninfais de *Rhodnius neglectus* e *Rhodnius robustus*.**

Estádio	Número de insetos		Duração (X ± S dias)		Mortalidade (%)	
	<i>Rhodnius neglectus</i>	<i>Rhodnius robustus</i>	(min - máx)		<i>Rhodnius neglectus</i>	<i>Rhodnius robustus</i>
			<i>Rhodnius neglectus</i>	<i>Rhodnius robustus</i>	<i>Rhodnius neglectus</i>	<i>Rhodnius robustus</i>
Ovo - NI	80	80	12,9±1,70 (7-15)	17,5±1,57 (14-23)	—*	—*
NI - NII	54	53	18,6±6,75 (11-38)	23,4±4,92 (18-48)	32,5	33,8
NII - NIII	40	49	22,5±5,90 (14-41)	28,5±4,83 (23-45)	25,9	7,5
NIII - NIV	33	42	24,4±9,11 (16-47)	40,7±5,85 (32-53)	17,5	14,3
NIV - NV	31	38	30,8 ± 8,59 (18-47)	46,3±11,06 (30-63)	6,1	9,5
NV - AD	29	28	45,4±18,24 (22-88)	47,2±8,92 (32-59)	6,5	26,3
Período ninfal	—	—	156,4 ± 25,05 (86-199)	204,7±13,22 (182-228)	63,8	65,0

X: média, S: desvio padrão, NI-NV: primeiro a quinto estágio ninfal, AD: adultos. \*Os ovos não embrionados foram descartados e substituídos.

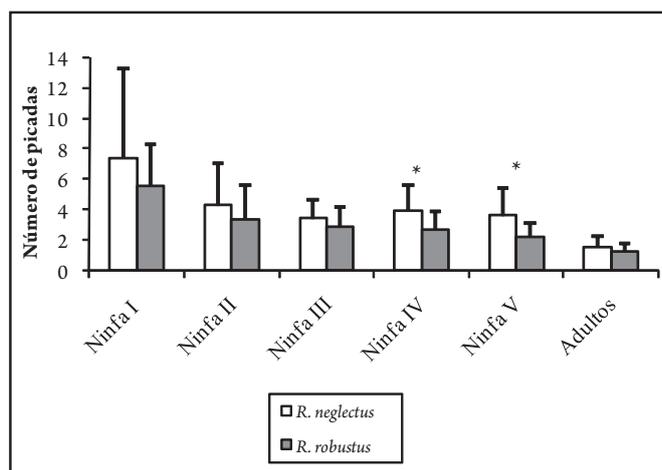


**FIGURA 1 - Valor médio do tempo de aproximação dos insetos a fonte alimentar para os estádios de desenvolvimento de *Rhodnius neglectus* e *Rhodnius robustus*. As barras representam o desvio padrão da média.**

### Número de picadas

Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas comparando o número médio de picadas das ninfas I, II, III e adultos de *R. neglectus* e *R. robustus*. Entretanto as ninfas IV e V de *R. neglectus* apresentaram um número médio de picadas significativamente maior que as de *R. robustus* (Figura 2).

O número de picadas foi diferente entre os estádios de *R. robustus* ( $H_{5,236} = 82,7; p < 0,01$ ) e *R. neglectus* ( $H_{5,215} = 40,6; p < 0,01$ ). Para ambas as espécies, as ninfas I foram as que apresentaram o maior número de picadas, sendo este reduzido durante o desenvolvimento dos estádios ninfaís até a fase adulta, que apresentou o menor número de picadas (Figura 2).



**FIGURA 2 - Valor médio do número de picadas de *Rhodnius neglectus* e *Rhodnius robustus* realizadas na fonte alimentar.**

As barras representam o desvio padrão das médias. \*Diferença significativa comparando as médias de *R. neglectus* e *R. robustus* ( $p < 0,01$ ).

### Número de interrupções

Não foram detectadas diferenças estatisticamente significativas do número médio de interrupções dos estádios entre *R. neglectus* e *R. robustus* nem entre os estádios de desenvolvimento de cada espécie. Considerando todos os insetos observados, o número médio foi de 1,5 interrupções por repasto.

### Tempo de repasto e quantidade de sangue ingerido em cada estágio ninfal

Apesar do tempo de repasto sanguíneo ter sido similar entre as espécies, *R. robustus* ingeriu em média uma maior quantidade de sangue em todos os estádios, com maiores valores para a ninfa V (Figura 3). O tempo total de repasto variou significativamente entre os estádios de desenvolvimento para *R. neglectus* ( $F_{5,208} = 5,6; p < 0,01$ ) e *R. robustus* ( $F_{5,228} = 5,6; p < 0,01$ ), aumentando ao longo do

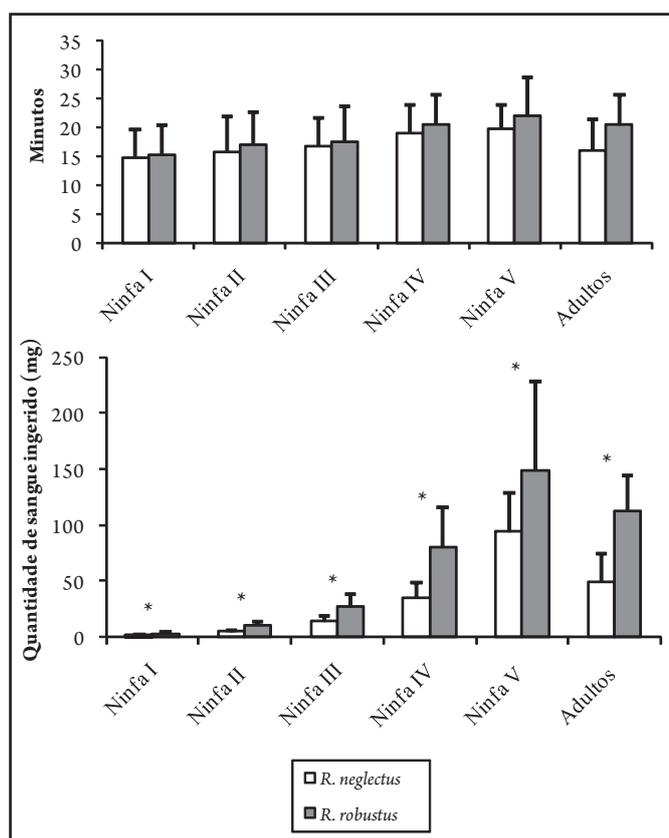


FIGURA 3 - Valor médio do tempo total do repasto sanguíneo (em minutos, acima) e da quantidade de sangue ingerido (em mg, abaixo) para *Rhodnius neglectus* e *Rhodnius robustus*.

As barras representam o desvio padrão das médias. \*Diferença significativa comparando as médias de *R. neglectus* e *R. robustus* ( $p < 0,01$ ).

desenvolvimento e diminuindo na fase adulta. Também houve diferença significativa na quantidade de sangue ingerido entre os estádios ninfais para *R. neglectus* ( $H_{5,213} = 188,3$ ;  $p < 0,01$ ) e *R. robustus* ( $H_{5,207} = 163,7$ ;  $p < 0,01$ ). Para ambas as espécies, a quantidade de sangue ingerido foi crescente com o decorrer do desenvolvimento dos insetos, alcançando o pico na ninfa V (Figura 3).

#### Tempo entre o final do repasto e a primeira defecação e frequência de defecação

Em média, as ninfas de *R. neglectus* defecaram mais rápido e mais frequentemente que as de *R. robustus*, principalmente a ninfa III (Figura 4). Para *R. neglectus* as ninfas I não defecaram durante o período de 10min estabelecido para avaliar esse experimento. Comparando o tempo entre o final do repasto e a primeira defecação dos outros quatro estádios e adultos de *R. neglectus*, não foi detectada diferença significativa ( $H_{4,65} = 4,2$ ;  $p = 0,37$ ). No caso de *R. robustus*, essa diferença foi significativa, a ninfa I demorou mais tempo para defecar em relação aos outros estádios de desenvolvimento ( $H_{5,64} = 19,4$ ;  $p < 0,01$ ). Em ambas as espécies o maior percentual de indivíduos que defecaram em até 10min ocorreu no estágio V (Figura 4).

## DISCUSSÃO

Os resultados do presente trabalho mostram diferenças biológicas e comportamentais entre *R. neglectus* e *R. robustus* que podem influenciar o mecanismo de transmissão de *T. rangeli* e *T. cruzi*, determinando a competência vetorial dessas espécies de

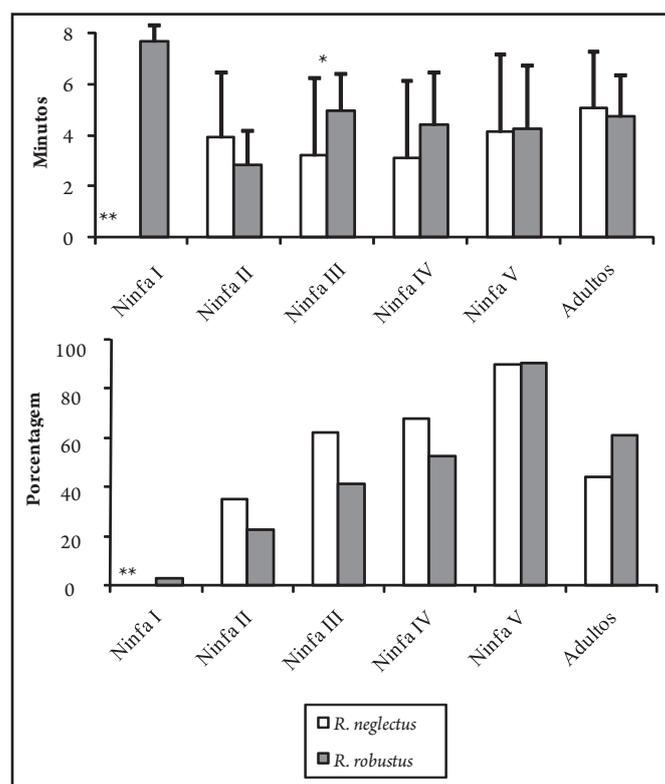


FIGURA 4 - Valor médio do tempo entre o final do repasto até a primeira defecação (em minutos, acima) e frequência de defecações (em porcentagem, abaixo) para *Rhodnius neglectus* e *Rhodnius robustus* de acordo com o estágio de desenvolvimento.

As barras representam o desvio padrão das médias. \*Diferença significativa comparando as médias de *R. neglectus* e *R. robustus* ( $p < 0,01$ ). \*\*Não foi possível comparar pois nenhuma ninfa I de *R. neglectus* defecou antes do tempo estabelecido (10min).

triatomíneos. Apesar do período ninfal de *R. neglectus* ter sido menor que o de *R. robustus*, a mortalidade foi similar entre as espécies. *R. robustus* e *R. neglectus* detectaram rapidamente a fonte alimentar, principalmente no primeiro estágio. Apesar do tempo de repasto sanguíneo ter sido similar entre as espécies, *R. robustus* ingeriu em média uma maior quantidade de sangue em todos os estádios. As ninfas de *R. neglectus* picaram mais vezes as fontes alimentares, defecaram mais rápido e mais frequentemente que as de *R. robustus*. Em conjunto essas evidências sugerem que, em comparação a *R. robustus*, *R. neglectus* possui um maior potencial para transmissão de *T. rangeli* e *T. cruzi*.

Os períodos de desenvolvimento ninfal encontrados no presente trabalho estão dentro dos limites já descritos para *R. neglectus* (75 a 301 dias)<sup>32-34</sup> e *R. robustus* (72 a 364 dias)<sup>33,35-37</sup>. Essa grande variação geralmente tem sido associada às condições experimentais de alimentação, temperatura e umidade em que os triatomíneos são submetidos. Porém, pelo menos para *R. robustus*, atualmente considerado como um conjunto de espécies crípticas<sup>4</sup>, as diferenças nos períodos de desenvolvimento ninfal também poderiam ser explicadas por diferenças genéticas e, conseqüentemente, fisiológicas entre as linhagens de *R. robustus* descritas. Futuros estudos comparando, sob as mesmas condições experimentais, os ciclos de vida dessas diferentes linhagens poderiam esclarecer essa questão e ainda auxiliar a delimitação dessas linhagens a partir de critérios biológicos. Parâmetros biológicos como período de desenvolvimento ninfal e mortalidade influenciam diretamente o tamanho das

populações; quanto menor o período de desenvolvimento e taxa de mortalidade, maior o tamanho das populações de triatomíneos nos ambientes silvestres e domésticos. A partir dos resultados do presente trabalho seria esperado um maior tamanho populacional para *R. neglectus*.

O maior percentual de mortalidade foi observado no primeiro estágio para ambas as espécies. Isso pode ter ocorrido pela dificuldade na realização do primeiro repasto devido à fragilidade do aparelho bucal. Problemas durante a última muda podem explicar a mortalidade dos insetos no estágio V, o que também foi observado para *R. prolixus* por Lent & Valderrama<sup>38</sup>.

*Rhodnius robustus* e *R. neglectus* detectaram rapidamente a fonte alimentar, geralmente em menos de 5min. Esse tempo médio de aproximação foi similar ao observado para *R. pictipes*<sup>16</sup>, *Meccus longipennis*<sup>22</sup>, *Triatoma infestans* e *R. prolixus*<sup>15</sup>. De acordo com Guarneri cols<sup>39</sup>, quanto mais eficiente é a espécie durante o processo de alimentação, mais curto será o seu tempo de contato com o hospedeiro e maior será sua chance de sobrevivência. Dessa forma, ambas as espécies estudadas podem ser consideradas eficientes no processo de alimentação, já que mostraram similar comportamento para detecção da fonte alimentar. O menor tempo de aproximação à fonte alimentar observado no primeiro estágio evidencia um comportamento alimentar inato de ambas as espécies na detecção de camundongos. Futuros estudos apresentando diferentes espécies de vertebrados como fontes alimentares para as ninfas I, podem esclarecer a influência da fonte alimentar no comportamento de aproximação.

No presente trabalho, *R. neglectus* apresentou um maior número de picadas em todos os estádios, se comparado a *R. robustus*, o que aumentaria a probabilidade de transmissão de *T. rangeli*. Considerando que antes de iniciar a hematofagia os triatomíneos injetam saliva no hospedeiro, quanto maior o número de tentativas de picadas, maior a quantidade inoculada de tripomastigotas metacíclicos de *T. rangeli*, provenientes das glândulas salivares de insetos infectados. Em ambas as espécies observou-se uma diminuição do número de picadas com a aproximação da fase adulta, e isso poderia estar relacionado a uma maior eficiência na detecção do vaso sanguíneo ao longo do desenvolvimento ninfal até a fase adulta. Futuros experimentos comparando a infecção experimental por *T. rangeli* em ambas as espécies poderão confirmar o maior potencial de *R. neglectus* na transmissão desse parasito. Já o número de interrupções não variou significativamente entre as espécies e entre os estádios. A maioria das interrupções ocorreu pela irritabilidade do hospedeiro, como já observado por Bar cols<sup>20</sup>. No caso de infecções experimentais com *T. rangeli*, as interrupções podem ainda estar relacionadas com a ação patogênica deste parasito, que dificultaria a capacidade hematofágica dos triatomíneos<sup>24</sup>.

Já a duração do repasto e a quantidade de sangue ingerido aumentaram ao longo do desenvolvimento ninfal e diminuíram na fase adulta. Silva<sup>40</sup> estudando seis espécies de *Rhodnius* e Arévalo cols<sup>25</sup> comparando os padrões de alimentação e defecação de *R. colombiensis* e *R. prolixus*, também registraram uma maior quantidade de sangue ingerido no estágio V e o decréscimo na fase adulta. A maior necessidade de sangue ingerido nas ninfas V deve estar relacionada à aquisição de novas estruturas anatômicas e mudanças fisiológicas durante a passagem para a fase adulta.

De acordo com Zeledón cols<sup>15</sup>, as espécies de triatomíneos que defecam durante os primeiros 5 a 10min após a alimentação podem ser consideradas transmissoras eficazes de *T. cruzi*. Dessa forma,

todas as ninfas observadas no presente trabalho (com exceção das ninfas I de *R. neglectus*) poderiam ser consideradas eficazes para a transmissão de *T. cruzi*, pois apresentaram o tempo médio menor ou igual a 5min. Segundo Nattero cols<sup>41</sup>, a defecação depende da quantidade de sangue ingerido. Quanto maior a quantidade de sangue ingerido, menor será o tempo entre o final do repasto e a primeira defecação e maior será a possibilidade de infecção do hospedeiro por *T. cruzi*. Adicionalmente, Sant'Anna cols<sup>42</sup> mostraram que *R. robustus* apresenta maiores taxas de ingestão de sangue quando comparado a *R. neglectus*. Analisando esse parâmetro, *R. robustus* seria um vetor mais eficiente que *R. neglectus* na transmissão deste parasito. Entretanto, no presente trabalho, *R. neglectus* defecou mais rápido (principalmente o estágio III) e mais frequentemente quando comparado ao *R. robustus*, mesmo ingerindo uma quantidade de sangue significativamente menor. Uma maior frequência de defecação no terceiro estágio também foi observada por Aldana cols<sup>19</sup> comparando estádios de desenvolvimento de quatro espécies de *Rhodnius*.

Outros fatores devem influenciar os padrões de defecação e a competência dessas espécies de *Rhodnius* na transmissão de tripanosomatídeos, entre eles a afinidade parasito-vetor e a variabilidade genética das linhagens de parasitos que podem determinar a infecção no vetor<sup>24,43</sup>. Nesse sentido, Martins cols<sup>18</sup> mostraram que *R. neglectus* era mais suscetível a *T. cruzi* que *R. robustus* e Carvalho-Moreira cols<sup>21</sup> chegaram a mesma conclusão comparando *R. neglectus* e *T. pseudomaculata*. Futuros estudos comparativos de infecção experimental dessas espécies de *Rhodnius* frente a diferentes linhagens de *T. cruzi* e *T. rangeli* poderão esclarecer o papel da biologia do vetor, do parasito e da interação entre ambos na determinação da transmissão desses tripanosomatídeos ao homem.

## AGRADECIMENTOS

Ao estagiário Jonatas C.B. Ferreira pela colaboração na manutenção da colônia de triatomíneos; aos técnicos Shiguero Ofugi e Walcymar P. Santiago, do Laboratório de Doença de Chagas (NMT-UnB) pelo apoio técnico; e aos revisores anônimos pelas críticas e sugestões.

## CONFLITO DE INTERESSE

Os autores declaram não haver nenhum tipo de conflito de interesse no desenvolvimento do estudo.

## REFERÊNCIAS

1. Miles MA, Arias JR, Souza AA. Chagas disease in the Amazon basin: V. Periurban palms as habitats of *Rhodnius robustus* and *Rhodnius pictipes* - triatomine vectors of Chagas disease. Mem Inst Oswaldo Cruz 1983; 78: 391-398.
2. Diotaiuti L, Dias JC. Occurrence and biology of *Rhodnius neglectus* Lent, 1954 in palm trees of suburban areas of Belo Horizonte, Minas Gerais. Mem Inst Oswaldo Cruz 1984; 79: 293-301.
3. Abad-Franch F, Monteiro FA. Biogeography and evolution of Amazonian triatomines (Heteroptera: Reduviidae): implications for Chagas disease surveillance in humid forest ecoregions. Mem Inst Oswaldo Cruz 2007; 102 (supl I): 57-70.
4. Abad-Franch F, Monteiro FA, Jaramillo NO, Gurgel-Gonçalves R, Dias FBS, Diotaiuti L. Ecology, evolution and the long-term surveillance of vector-borne Chagas disease: A multi-scale appraisal of the tribe Rhodniini (Triatominae). Acta Trop 2009; 112:159-177.

5. Gurgel-Gonçalves R, Cuba CAC. Predicting the potential geographical distribution of *Rhodnius neglectus* (Hemiptera, Reduviidae) based on ecological niche modeling. *J Med Entomol* 2009; 46:952-960.
6. Gurgel-Gonçalves R, Ramalho ED, Duarte MA, Palma ART, Abad-Franch F, Carranza JC, et al. Enzootic transmission of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* in Federal District of Brazil. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 2004; 46:323-330.
7. Gurgel-Gonçalves R, Abad-Franch F, Ferreira JBC, Santana DB, Cuba CAC. Is *Rhodnius prolixus* (Triatominae) invading houses in central Brazil? *Acta Trop* 2008; 107: 90-98.
8. Barreto MP, Siqueira AF, Ferrioli FF, Carvalheiro JR. Estudos sobre reservatórios e vetores do *Trypanosoma cruzi*. XXIII. Observações sobre criadouros do *Rhodnius neglectus* Lent, 1954 em biótopos artificiais (Hemiptera, Reduviidae). *Rev Inst Med Trop São Paulo* 1968; 10:163-170.
9. Silva RA, Bonifácio PR, Wanderley DMV. Doença de Chagas no estado de São Paulo: comparação entre pesquisa ativa de triatomíneos em domicílios e notificação de sua presença pela população em área sob vigilância entomológica. *Rev Soc Bras Med Trop* 1999; 32:653-659.
10. Oliveira AWS, Silva IG. Distribuição geográfica e indicadores entomológicos de triatomíneos sinantrópicos capturados no Estado de Goiás. *Rev Soc Bras Med Trop* 2007; 40:204-208.
11. Carcavallo RU, Martínez-Silva R, Otero MAA, Tonn RJ. Infección natural de *Rhodnius robustus* Larrousse y *Rhodnius pictipes* Stal por *T. cruzi* y *T. rangeli* en Venezuela. *Bol Dir Malarial San Amb* 1975; 15:117-120.
12. Feliciangeli MD, Dujardin JP, Bastrenta B, Mazzarri M, Villegas J, Flores M, et al. Is *Rhodnius robustus* (Hemiptera: Reduviidae) responsible for Chagas disease transmission in Western Venezuela? *Trop Med Int Health* 2002; 7: 280-287.
13. Coura JR, Junqueira ACV, Fernandes O, Valente SAS, Miles MA. Emerging Chagas Disease in Amazonian Brazil. *Trends Parasitol* 2002; 18:171-176.
14. Aguilar HM, Abad-Franch F, Dias JCP, Junqueira ACV, Coura JR. Chagas disease in the Amazon Region. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2007; 102:47-55.
15. Zeledón R, Alvarado R, Jirón JF. Observations on the feeding and defecation patterns of three triatomine species (Hemiptera, Reduviidae). *Acta Trop* 1977; 34:65-77.
16. Rocha DS, Jurberg J, Galvão C. Biología do *Rhodnius pictipes* Stal, 1872 em condições de laboratório (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1994; vol. 89: 265-270.
17. Diotaiuti L, Penido CM, Pires HHR, Dias JCP. Dinâmica de alimentação e dejeção do *Triatoma sordida*. *Rev Soc Bras Med Trop* 1995; 28:195-198.
18. Martins LPA, Rosa JA, Castanho REP, Sauniti GL, Medeiros Jr H. Susceptibilidade de *Rhodnius neglectus*, *Rhodnius robustus* e *Triatoma infestans* (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) à infecção por duas cepas de *Trypanosoma cruzi* (Kinetoplastidae, Trypanosomatidae) utilizando xenodiagnóstico artificial. *Rev Soc Bras Med Trop* 2000; 33:559-563.
19. Aldana E, Lizano E, Rodriguez M, Valderrama A. Alimentación y defecación en triatomíneos del género *Rhodnius* (Hemiptera, Reduviidae) alimentados con sangre humana. *Rev Biol Trop* 2001; 49:693-696.
20. Bar ME, Milano AMF, Damborsky MP, Oscherov EB, Avalos G. Patrones de alimentación y de defecación de *Triatoma rubrovaria* (Heteroptera: Reduviidae) bajo condiciones de laboratorio. *Rev Soc Entomol Argent* 2003; 62:107-113.
21. Carvalho-Moreira CJ, Spata MCD, Coura JR, Garcia ES, Azambuja P, Gonzalez MS, et al. *In vivo* and *in vitro* metacyclogenesis tests of two strains of *Trypanosoma cruzi* in the triatomine vectors *Triatoma pseudomaculata* and *Rhodnius neglectus*: short/long-term and comparative study. *Exp Parasitol* 2003; 103:102-111.
22. Martínez-Ibarra JA, Grant-Guillen Y, Martínez-Grant DM. Feeding, defecation, and development times of *Meccus longipennis* Usinger, 1939 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) under laboratory conditions. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2003; 98: 899-903.
23. Rocha DS, Santos CM, Cunha V, Jurberg J, Galvão G. Ciclo biológico em laboratório de *Rhodnius brethesi* Matta 1919 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae), potencial vetor silvestre da doença de Chagas na Amazônia. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2004; 99:591-595.
24. Azambuja P, Garcia ES. *Trypanosoma rangeli* interactions within the vector *Rhodnius prolixus*: a mini review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2005; 100:567-572.
25. Arévalo A, Carranza JC, Guhl F, Clavijo JA, Vallejo GA. Comparación de los patrones de alimentación y defecación de *Rhodnius colombiensis* y *Rhodnius prolixus* (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) en condiciones de laboratorio. *Biomedica* 2007; 27 (supl.1):101-109.
26. Rodríguez CS, Carrizo AS, Crocco LB. Comparison of feeding and defecation patterns between fifth-instar nymphs of *Triatoma patagonica* (Del Ponte, 1929) and *Triatoma infestans* (Klug, 1934) under laboratory conditions. *Rev Soc Bras Med Trop* 2008; 41:330-333.
27. Oliveira TG, Carvalho-Costa FA, Sarquis O, Lima MM. Feeding and defecation patterns of *Rhodnius nasutus* (Hemiptera, Reduviidae), a triatomine native to an area endemic for Chagas disease in the state of Ceará, Brazil. *Am J Trop Med Hyg* 2009; 81:651-655.
28. Pérez AGR, Moreno JE, Colina L. Estudio comparativo de la susceptibilidad de cuatro especies del género *Rhodnius* a la infección experimental con *Trypanosoma cruzi*. *Bol Mal Salud Amb* 2009; 49:135-142.
29. Gurgel-Gonçalves R, Duarte MA, Ramalho ED, Palma ART, Romana CA, Cuba-Cuba CA. Distribuição espacial de populações de triatomíneos (Hemiptera: Reduviidae) em palmeiras da espécie *Mauritia flexuosa* no Distrito Federal, Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop* 2004; 37: 241-247.
30. Mejía GD. Aspectos ecológicos de populações silvestres de *Triatominae* (Hemiptera: Reduviidae) em palmeiras *Attalea speciosa* (Arecaceae) e estimativa do risco ambiental para a transmissão de *Trypanosomatidae* (Kinetoplastida) em uma frente pioneira de desmatamento (Pará-Brasil). [Dissertação de Mestrado]. [Brasília]: Universidade de Brasília; 2005. 124p.
31. Friend WG, Choy CTH, Cartwright E. The effect of nutrient intake on the development and the egg production of *Rhodnius prolixus*, Stal (Hemiptera: Reduviidae). *Can J Zool* 1965; 43: 891-904.
32. Diotaiuti L, Dias JC. Estudo comparativo do ciclo evolutivo de *Rhodnius neglectus* alimentados em pombos e camundongos. *Rev Soc Bras Med Trop* 1987; 20:95-100.
33. Canale MD, Jurberg J, Carcavallo RU, Galvão C, Galindez Giron I, Mena Segura CA, et al. Bionomics of some species. In: Carcavallo RU, Galindez Giron I, Jurberg J, Lent H, editores. Atlas of Chagas Disease Vectors in the America. Vol. III. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ; 1999. p. 839-890.
34. Rocha DS, Jurberg J, Carcavallo RU. Influence of the temperature and humidity on the biology of *Rhodnius neglectus* Lent, 1954 in laboratory conditions. *Rev Soc Bras Med Trop* 2001; 34:357-363.
35. Tonn R, Carcavallo R, Ortega R. Notas sobre la biología, ecología y distribución geográfica de *Rhodnius robustus* Larrousse, 1927 (Hemiptera: Reduviidae). *Bol Dir Malarial San Amb* 1976; 26:158-171.
36. Jurberg J, Rangel EF. Observações sobre *Rhodnius robustus* Larrousse, 1927 e *Rhodnius pallescens* Barber, 1932 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). *Rev Bras Biol* 1980; 40:569-577.
37. Rocha DS, Jurberg J, Carcavallo RU. Influence of temperature and humidity on the nymphal development of *Rhodnius robustus*. *Rev Saude Publica* 2001; 35:400-406.
38. Lent H, Valderrama A. Observações, em laboratório, sobre o ciclo evolutivo de *Rhodnius prolixus* Stal, 1959, *R. pictipes* Stal, 1872 e *R. neivai* Lent, 1953. *Rev Bras Biol* 1977; 37:325-344.
39. Guarneri AA, Carvalho MG, Pereira MH, Diotaiuti L. Potencial biológico do *Triatoma brasiliensis*. *Cad Saude Publica* 2000; 16 (supl. 2):101-104.
40. Silva IG. Influência da temperatura na biologia de 18 espécies de triatomíneos (Hemiptera, Reduviidae) e no xenodiagnóstico [Dissertação de Mestrado]. [Curitiba]: Universidade Federal do Paraná; 1985. 169p.
41. Nattero J, Crocco LB, Rodriguez CS. Feeding and defaecation behaviour of *Triatoma patagonica* (Del Ponte, 1929) (Hemiptera: Reduviidae). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2002; 97: 1063-1065.
42. Sant'Anna MRV, Diotaiuti L, Gontijo AF, Gontijo NF, Pereira MH. Feeding behaviour of morphologically similar *Rhodnius* species: influence of mechanical characteristics and salivary function. *J Insect Physiol* 2001; 47:1459-1465.
43. Vallejo GA, Guhl F, Schaub. Triatominae-*Trypanosoma cruzi*/*T. rangeli*: Vector-parasite interactions. *Acta Trop* 2009; 110:137-147.