

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

**Explorando o ciclo de transmissão do *Trypanosoma rangeli*:
Avaliação do papel das aves na circulação do parasito em triatomíneos,
e dos eventos que ocorrem na fase inicial da infecção em camundongos**

por

Luciana de Lima Ferreira

Belo Horizonte
2017

TESE

DCS-CPqRR

L.L.FERREIRA

2017

Luciana de Lima Ferreira

**Explorando o ciclo de transmissão do *Trypanosoma rangeli*:
Avaliação do papel das aves na circulação do parasito em triatomíneos,
e dos eventos que ocorrem na fase inicial da infecção em camundongos**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências - área de concentração Doenças Infecciosas e Parasitárias.

Orientação: Dra. Alessandra A. Guarneri
Coorientação: Dra. Juliana Alves Silva

Belo Horizonte
2017

Catálogo-na-fonte

Rede de Bibliotecas da FIOCRUZ

Biblioteca do CPqRR

Segemar Oliveira Magalhães CRB/6 1975

F383e

Ferreira, Luciana de Lima.

2017

Explorando o ciclo de transmissão do *Trypanosoma rangeli*: Avaliação do papel das aves na circulação do parasito em triatomíneos, e dos eventos que ocorrem na fase inicial da infecção em camundongos / Luciana de Lima Ferreira. – Belo Horizonte, 2017.

XVII, 70 f.: il.; 210 x 297mm.

Bibliografia: f.: 64 - 73

Tese (Doutorado) – Tese para obtenção do título de Doutor em Ciências pelo Programa de Pós - Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou. Área de concentração: Doenças Infecciosas e Parasitárias.

1. Doença de Chagas/transmissão 2. . *Trypanosoma cruzi* /parasitologia 3. *Trypanosoma rangeli*/parasitologia I. Título. II. Guarneri, Alessandra Aparecida (Orientação). III. Silva, Juliana Alves(Coorientação).

CDD – 22. ed. – 616.936 3

Luciana de Lima Ferreira

Explorando o ciclo de transmissão do *Trypanosoma rangeli*: Avaliação do papel das aves na circulação do parasito em triatomíneos, e dos eventos que ocorrem na fase inicial da infecção em camundongos

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências - área de concentração Doenças Infecciosas e Parasitárias.

Banca Examinadora:

Profa. Dra. Alessandra Aparecida Guarneri (CPqRR/FIOCRUZ) Presidente
Profa. Dra. Silvane Maria Fonseca Murta (CPqRR/FIOCRUZ) Titular
Prof. Dr. Rodrigo Pedro Pinto Soares (CPqRR/FIOCRUZ) Titular
Profa. Dra. Daniela Castanheira Bartholomeu (UFMG) Titular
Prof. Dr. Edmundo Carlos Grisard (UFSC) Titular
Prof. Dr. Policarpo Ademar Sales Júnior (CPqRR/FIOCRUZ) Suplente

Tese defendida e aprovada em Belo Horizonte, 20/04/2017

Dedico esse trabalho a duas pessoas que são muito importantes na minha vida e que amo muito: minha mãe Wilma e meu namorado Newmar!

Agradecimentos

Durante esses últimos quatro anos muitos conhecimentos foram passados a mim, muitos experimentos foram realizados, e essa tese não teria sido concluída se não fosse a ajuda de muitas pessoas. Por isso, há muitas pessoas a quem tenho que agradecer...

Em primeiro lugar, quero agradecer a Deus por ser tão maravilhoso em minha vida! Pela oportunidade de fazer um doutorado, pela força dada a mim para realizar todas as etapas necessárias para conclusão da tese. Se cheguei até aqui, foi por intermédio Dele.

À minha orientadora Alessandra Guarneri, por todos os ensinamentos e orientações a mim transmitidos durante esses 10 anos de trabalho em conjunto, por toda dedicação dada a mim e ao meu trabalho, pela valiosa contribuição indispensável para minha formação profissional.

À minha co-orientadora Juliana Alves-Silva, por ter aceitado o desafio de ser minha co-orientadora, por todo aprendizado, orientações indispensáveis para a conclusão dessa tese e para a minha formação profissional.

À professora Patrícia Martinelli, por ter aceitado me orientar nos ensaios de histologia, por todo conhecimento passados sobre essa área e por toda dedicação a esse trabalho.

Ao Marcelo Lorenzo, por todo aprendizado, orientações e auxílio a mim fornecidos durante esses 10 anos de trabalho no mesmo grupo.

Ao Dr. João Carlos e a Liléia, por todos os ensinamentos a mim transmitidos desde a minha iniciação científica.

Ao Carlos Henrique da Silva, por suas contribuições no desenvolvimento de técnicas histológicas.

À Fernanda Nogueira, da Plataforma de PCR em Tempo Real do CPqRR pelo auxílio nos experimentos de qPCR.

À Thaís, pela análise estatística do ensaio de avaliação do peso de órgãos de animais infectados.

À Talita e Marina Marlière por me ensinarem a técnica de dissecação de órgãos de camundongos.

Aos professores Marcos Horácio e Nélder Gontijo, por todos os ensinamentos a mim transmitidos, pela disponibilidade em solucionar minhas dúvidas, pelas sugestões dadas a mim para o aprimoramento desse trabalho.

Ao Gabriel Campolina e a Rafaela Paim, pela valiosa amizade e disponibilidade em solucionar minhas dúvidas e em sugerir alternativas para problemas que surgiram em alguns ensaios da tese.

A todos os membros da banca avaliadora, por aceitarem o convite, pelas excelentes sugestões que enriqueceram o trabalho.

Aos professores do curso de Pós-Graduação em Ciências da Saúde pelo conhecimento transmitido que foi fundamental para a minha formação.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde e ao Centro de Pesquisas René Rachou do CPqRR/FIOCRUZ, pela oportunidade de fazer o doutorado, e de aprender o que é ciência.

Aos bibliotecários, em especial a Núzia, pela disponibilidade de sempre em fornecer artigos raros e livros.

Aos colegas do CVIP, por serem excelentes companhias durante o doutorado, em especial a Maria Raquel e a Sheila, por terem me ajudado no que foi preciso.

Aos colegas e ex-colegas do LATEC, que sempre foram excelentes companhias nesses 10 anos e que sempre me ajudaram no que fosse preciso, em especial Ademilson, Grasielle, João Victor, João Paulo, Rita, Sílvia, por estarem comigo desde o começo da minha vida profissional há 10 anos.

À Raquel Ferreira pela amizade, carinho, incentivo de sempre, por todos conselhos valiosos, por todo apoio durante todos esses anos e em especial durante o doutorado.

Às amigas que se iniciaram no René Rachou e que levarei pra toda a vida: Valéria, Raíssa, Iago, Gabriel, Ivana, Carininha, Bárbara pela amizade, carinho e incentivo de sempre.

Às amigas, em especial Ju e Robertinha, pela amizade, carinho, incentivo de sempre!

À Fellet, por ser essa amiga tão especial e importante na minha vida, pela amizade, carinho, incentivo de sempre, pelo colo quando preciso, pela ajuda ao revisar o meu artigo.

Aos meus queridos amigos Katherine (Katy Perry), Luís, Jorge, Marinely, pelo carinho, amizade, conhecimento trocado, pelos momentos maravilhosos que passamos juntos, por me ajudarem em tudo o que precisei, por sempre acreditarem no meu trabalho.

À minha eterna “Turma do Pepino”, que tornou esta caminhada muito mais agradável, divertida e cheia de boas lembranças!

Às amigas que se iniciaram na “Turma do Pepino” e que levarei pra toda a minha vida, Bruna Soares, Bruna Torres, Érica, Júlia, Kléber (saudades sempre amigo), Thaís, pela valiosa amizade, carinho, apoio, torcida, e por acreditarem em mim quando eu mesmo não acreditava. Vocês são muito importantes para mim!

Às amigas de toda vida: Fernandinha, Cris, Lívia, Ludmila e Rennote, pela valiosa amizade durante todos esses anos, carinho, apoio, pelo colo quando foi preciso, que foram imprescindíveis para que eu conseguisse chegar até aqui. A amizade de vocês é muito importante para mim!

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

À mamãe (Wilma), por ser o meu alicerce, pelo seu amor, por acreditar e me incentivar em todos os momentos, especialmente naqueles em que tudo parecia dar errado. Por ser o meu maior exemplo de força e amor em todas as circunstâncias da vida. Muito obrigada mãe! Eu não conseguiria chegar até aqui sem a ajuda da senhora!

À minha irmã Nanda, por todo o seu amor, carinho, incentivo, apoio em todos os momentos. Por ser esse exemplo de que podemos ser excelentes profissionais sem perder a doçura! Muito obrigada por tudo Nanda!

À minha irmã Niela, por todo o seu amor, apoio, incentivo, por mesmo estando longe sempre quis se manter perto, por alegrar a casa nas suas vindas a BH.

Ao meu irmão Rodrigo e minha cunhada Mônica, que mesmo estando longe nunca deixaram de me colocar em suas orações. E as minhas sobrinhas Raquel e Vitória por me trazerem momentos de alegria mesmo estando longe.

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

Ao meu amor Newmar, por me mostrar todos os dias o significado da palavra amor! Por todo carinho, incentivo, apoio, por acreditar em mim e no meu potencial nos momentos em que eu mesma não acreditava. Conhecer você foi a melhor coisa que me aconteceu nos últimos 8 anos!

Aos familiares do New, em especial, Sr. Newton, D. Márcia, Marininha, Sr. Zé, D. Martha, Sr. Robson, por todo carinho, apoio e incentivo de sempre.

Ao CPqRR e a FAPEMIG por tornar possível a realização do doutorado ao conceder a bolsa de doutorado.

A todas as pessoas que de forma direta ou indireta fizeram parte desses quatro anos, muito obrigada!

Resumo

O *Trypanosoma rangeli* é um parasito que possui triatomíneos e mamíferos, incluindo o homem, como hospedeiros. Os triatomíneos adquirem a infecção ao se alimentarem em mamíferos infectados. O parasito é transmitido ao mamífero durante a picada no ato da alimentação. Até o momento, não se conhece o ciclo de desenvolvimento do *T.rangeli* no hospedeiro vertebrado. Primeiramente, foi avaliado se aves também poderiam participar da disseminação do parasito entre insetos. Insetos infectados (doadores) e não infectados (receptores) foram alimentados simultaneamente em pombos não infectados (co-alimentação). Os insetos receptores que co-alimentaram em pombos com insetos doadores na proporção 1:1 apresentaram uma taxa de infecção de 16%, que foi reduzida para 9% quando a proporção foi alterada para 5:1 e a distância receptores/doador aumentada. Quando os receptores se alimentaram no pombo após o término da alimentação do doador, a infecção não foi observada. A susceptibilidade de tripomastigotas metacíclicos de *T.rangeli* ao sistema complemento de pombos e camundongos também foi analisada. Os resultados mostraram que os tripomastigotas foram resistentes ao sistema complemento de camundongos, mas suscetíveis aos de pombos. A transmissão do protozoário através da co-alimentação de triatomíneos em pombos indica que esse comportamento permite que parasitos cheguem ao intestino de um inseto saudável antes da ação do sistema complemento. Essa é a primeira vez em que se demonstra que aves podem participar do ciclo de transmissão de *T. rangeli*, ao permitirem a transferência de parasitos entre insetos durante a co-alimentação. O próximo objetivo foi avaliar a fase inicial da infecção por *T.rangeli* em camundongos. Inicialmente, a capacidade do parasito de estabelecer a infecção no camundongo foi avaliada a partir de parasitos liberados na pele. Observou-se uma taxa de infecção de 50% para camundongos expostos a picadas de triatomíneos infectados e 100% para camundongos expostos a parasitos liberados na pele após punção. A avaliação histológica da pele de camundongos expostos ao parasito mostrou a presença de parasitos extracelulares nas primeiras 24h após a exposição. Entretanto, infiltrados inflamatórios foram encontrados até o 7º dia pós-exposição (d.p.e), sendo eosinófilos e mastócitos as células mais comumente encontradas no sítio da infecção. Utilizando-se a técnica de qPCR foi possível detectar a presença do protozoário na pele de camundongos por até 7d.p.e. A quantificação dos parasitos presentes na pele mostrou não haver diferenças significativas no número de parasitos, quando comparados os

diferentes tempos de exposição. O sangue, os linfonodos mesentéricos e o baço foram também avaliados. O DNA do parasito foi detectado nas amostras de sangue em todos os períodos, com um discreto aumento no segundo dia após a infecção. Os linfonodos mesentéricos apresentaram DNA do parasito durante toda a avaliação, além de um aumento significativo no seu peso, em relação ao grupo controle. No baço, o DNA do protozoário foi detectado em amostras referentes aos dias 1, 7 e 15d.p.e . O peso do baço foi significativamente aumentado nos animais infectados. Os resultados do estudo sugerem que os linfonodos possam funcionar como locais de manutenção do *T. rangeli*. Estudos adicionais serão realizados para a confirmação desses resultados.

Palavras chaves: *Trypanosoma rangeli*, hospedeiro vertebrado, DNA do parasito, sítio de infecção, pele, inflamação, sangue, órgãos linfóides secundários.

Abstract

Trypanosoma rangeli is a parasite infective to triatomines and mammals, including humans. Triatomines become infected by feeding on infected mammals and the parasite is transmitted to mammals via insect bite. To date, the development of *T. rangeli* in the vertebrate host is not known. Initially the present study investigated whether birds could act as a temporary vehicle for insect-to-insect transmission. With this aim, infected (donors) and non-infected (receptors) insects were allowed to simultaneously feed on pigeons. When donor and receptor insects were subjected to co-feeding experiments in a 1:1 ratio, an infection rate of 16% was observed, which was reduced to 9% when the distance between donor and receptor insects was increased and the ratio was altered to 1 donor:5 receptors. When the receptor insects were allowed to feed on the pigeon after the feeding of the donor insect was finished, the infection was no longer observed. Since birds are refractory to several species of trypanosomes, the susceptibility of metacyclic trypomastigotes of *T. rangeli* to the complement system was evaluated in serum from pigeons and mice. Our results showed that trypomastigotes were resistant to the complement system of mice, but susceptible to the complement system of pigeons. The transmission of *T. rangeli* through triatomine co-feeding on pigeons indicates that parasites can reach the intestine of a healthy insect before being killed by the action of the bird's complement system. This is the first time that birds have been demonstrated to take part in the transmission cycle of *T. rangeli*, by allowing the transfer of parasites between insects during co-feeding behavior. Our next objective was to evaluate the initial phase of *T. rangeli* infection in mice. Initially, the parasite's ability to establish an infection in mice was evaluated in experiments where parasites were released in the mouse skin. Fifty percent of infection was observed in mice exposed to the bite of infected triatomines, and 100% of infection was observed in mice exposed to parasites released on the skin after superficial injury. Histological sections of the skin of exposed mice showed the presence of extracellular parasites from 0-24h after exposure to *T. rangeli*. Inflammatory infiltrates were found up to the 7th day post-exposure. Eosinophils and mast cells were the most common cells found at the site of infection. qPCR detected the presence of *T. rangeli* DNA in the skin of mice for up to 7d after exposure. Quantification of parasites in the skin samples showed no significant differences in the number of parasites among the times of exposure evaluated. Blood, mesenteric lymph nodes and spleen were also evaluated as potential sites of establishment of *T. rangeli* infection. Parasite DNA was detected in blood samples

collected at 30min, 2, 4, 7 e 15d post-exposure, with a slight increase in the second day after infection. Mesenteric lymph nodes also showed *T.rangeli* DNA in all evaluated times (30min, 12h, 1, 2, 4, 7 and 15d post-exposure), in addition to a significant increase in organ weight. In the spleen, *T. rangeli* DNA was detected in samples from days 1, 7 and 15 post-exposure. Spleen weight was also significantly increased in the infected animals. The results of the present study suggest that lymph nodes may function as a *T.rangeli* maintenance site. Further studies will be performed to confirm these results.

Keywords: *Trypanosoma rangeli*, vertebrate host, parasite DNA, infection site, skin, inflammation, blood, secondary lymphoid organs.

Lista de figuras

- Figura 1.** Distribuição de *Trypanosoma cruzi* e *Trypanosoma rangeli* na América Central e na América do Sul.....18
- Figura 2.** Desenvolvimento do *Trypanosoma rangeli* no hospedeiro invertebrado.....20
- Figura 3.** Taxas de infecção de ninfas de 5º estágio de *Rhodnius prolixus* que co-alimentaram com um co-específico infectado com *Trypanosoma rangeli*.....37
- Figura 4.** Lise de tripomastigotas metacíclicos de *Trypanosoma rangeli* mediada pelo sistema complemento de camundongos e pombos.....38
- Figura 5.** Taxas de infecção de camundongos que foram expostos ao *Trypanosoma rangeli*.....39
- Figura 6.** Fotomicrografias de secções histológicas coradas com HE de pele de camundongos imediatamente após a exposição (30min).....40
- Figura 7.** Fotomicrografias de secções histológicas coradas com HE de pele de camundongos submetidos à picada de insetos não infectados 1d após exposição.....41
- Figura 8.** Fotomicrografias de secções histológicas coradas com HE de pele de camundongos em 12h e 1d após a exposição.....43
- Figura 9.** Fotomicrografias de secções histológicas coradas com HE de pele de camundongos em 2 e 4d após exposição.....45
- Figura 10.** Fotomicrografias de secções histológicas coradas com HE de pele de camundongos em 7 e 15d após exposição.....46
- Figura 11.** Porcentagem de amostras que apresentaram DNA de *Trypanosoma rangeli* em diferentes períodos pós-exposição.....48
- Figura 12.** Quantificação de DNA de *Trypanosoma rangeli* em amostras de pele de camundongos infectados em diferentes períodos após a exposição.....48

Figura 13. Porcentagem de amostras de sangue, linfonodos mesentéricos e baço que apresentaram DNA de *Trypanosoma rangeli* durante diferentes períodos pós-infecção.....49

Figura 14. Quantificação do número de parasitos presentes em amostras de sangue (A), linfonodos mesentéricos (B) e baço (C) de camundongos infectados por *Trypanosoma rangeli* em diferentes períodos pós-infecção.....50

Figura 15. Abundância de parasitos presentes em amostras de sangue, linfonodos mesentéricos e baço de camundongos infectados por *Trypanosoma rangeli* em diferentes períodos pós-infecção.....51

Figura 16. Pesos proporcionais (g) dos linfonodos mesentéricos de camundongos infectados ou não por *Trypanosoma rangeli*.....52

Figura 17. Pesos proporcionais (g) dos baços de camundongos infectados ou não por *Trypanosoma rangeli*.....52

Figura 18. Pesos proporcionais do baços de camundongos infectados ou não por *Trypanosoma rangeli* em diferentes períodos após a exposição.....53

Lista de siglas e abreviaturas

CECAL – Centro de Criação de Animais de Laboratório

CEUA – Conselho de Ética e Utilização Animal

EDTA – ácido etilenodiamino tetra-acético

GLM – Modelo Linear Geral

GS – glândula salivar

HE – hematoxilina e eosina

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

HO (CH₂O)_nH – paraformaldeído

L:E –luz e escuridão

LIT – Meio Liver Infusion Tryptose

Na₃PO₄ – fosfato de sódio

NaCl – cloreto de sódio

NaOH – hidróxido de sódio

NNN – Meio MacNeal e Novy, Nicolle

PFA – paraformaldeído

Sumário

1 Introdução.....	18
2 Objetivos.....	27
2.1 Objetivo geral.....	27
2.2 Objetivos específicos.....	27
3 Materiais e métodos.....	28
3.1 Organismos utilizados nos experimentos.....	28
3.1.1 Triatomíneos.....	28
3.1.2 Hospedeiros vertebrados.....	28
3.1.3 <i>Trypanosoma rangeli</i>	28
3.2 Infecção de <i>Rhodnius prolixus</i>	29
3.3 O papel das aves na transmissão do <i>Trypanosoma rangeli</i>	29
3.3.1 Avaliação da transmissão do <i>Trypanosoma rangeli</i> entre insetos através do comportamento de co-alimentação em pombos.....	29
3.3.2 Avaliação da lise de formas tripomastigotas metacíclicas de <i>Trypanosoma rangeli</i> mediada pelo sistema complemento.....	30
3.4 A fase inicial da infecção de <i>Trypanosoma rangeli</i> em camundongos.....	31
3.4.1 Avaliação da pele como local de entrada de parasitos e de estabelecimento da infecção.....	31
3.4.1.1 Exposição da pele ao <i>Trypanosoma rangeli</i> através de picadas de ninfas infectadas.....	31
3.4.1.2 Exposição da pele ao <i>Trypanosoma rangeli</i> por deposição de parasitos.....	31
3.4.1.3 Avaliação do estabelecimento da infecção por <i>Trypanosoma rangeli</i> a partir de parasitos liberados na pele.....	32
3.4.1.4 Coleta de amostras de pele.....	32
3.4.1.5 Avaliação das alterações que ocorrem na pele de camundongos expostos ao <i>Trypanosoma rangeli</i>	32
3.4.1.6 Rastreamento do DNA de <i>Trypanosoma rangeli</i> no sítio da picada em diferentes períodos após a exposição.....	33
3.4.2 Avaliação do sangue, linfonodos e baço como locais de circulação de parasitos e de estabelecimento da infecção.....	34
3.4.2.1 Avaliação do efeito da infecção pelo <i>Trypanosoma rangeli</i> nos pesos dos linfonodos mesentéricos e do baço.....	34
3.4.2.2 Rastreamento do DNA de <i>Trypanosoma rangeli</i> no sangue, linfonodos mesentéricos e baço de animais infectados em diferentes períodos após a exposição.....	35
3.5 Análise estatística.....	36

4 Resultados.....	37
4.1 Avaliação da transmissão do <i>Trypanosoma rangeli</i> entre insetos através do comportamento de co-alimentação em pombos.....	37
4.2 Avaliação da lise de formas tripomastigotas metacíclicas de <i>Trypanosoma rangeli</i> mediada pela ação do sistema complemento de pombos e camundongos.....	37
4.3 Avaliação do estabelecimento da infecção por <i>Trypanosoma rangeli</i> a partir de parasitos liberados na pele de camundongos.....	38
4.4 Avaliação das alterações que ocorrem na pele de camundongos expostos ao <i>Trypanosoma rangeli</i>	39
4.5 Rastreamento do DNA de <i>Trypanosoma rangeli</i> no sítio da picada em diferentes períodos após sua liberação.....	47
4.6 Rastreamento do DNA de <i>Trypanosoma rangeli</i> no sangue, baço e linfonodos mesentéricos de camundongos em diferentes períodos após a infecção.....	49
4.7 Avaliação do efeito da infecção pelo <i>Trypanosoma rangeli</i> nos pesos proporcionais dos linfonodos mesentéricos e dos baços em relação aos pesos dos camundongos.....	51
5 Discussão.....	54
6 Conclusões.....	63
Referências bibliográficas.....	64
Anexo.....	74

1 Introdução

Trypanosoma rangeli (Tejero, 1920) é um parasito protozoário hemoflagelado pertencente à ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae e subgênero Herpetosoma (Levine, 1980). Apesar de ser transmitido através da picada do inseto vetor, o parasito está incluído na classe Stercoraria, que inclui também o *Trypanosoma cruzi* (agente etiológico da doença de Chagas) e outros tripanosomas que são transmitidos pelas fezes de hospedeiros invertebrados (Hoare, 1972). A classificação se mantém porque a comparação de dados filogenéticos baseados em sequências que codificam o RNA presente na subunidade menor do ribossomo (SSU rRNA) do *T. rangeli* coloca o parasito próximo ao *T. cruzi* e distante de espécies do grupo Salivaria como, por exemplo, o *Trypanosoma brucei* (Stevens et al., 1999; 2001). O parasito possui triatomíneos como hospedeiros invertebrados e diversas espécies de mamíferos, incluindo o homem, como hospedeiros vertebrados (Hoare, 1972; D'Alessandro, 1976). Apresenta uma ampla distribuição, tendo sido encontrado infectando seres humanos, triatomíneos e animais silvestres desde a América Central até a América do Sul (Fig. 1; Rey e Ucrós, 1939; Deane, 1958; Cuba Cuba, 1998; Guhl et al., 2003; Marquez et al., 2006). Sua distribuição se sobrepõe à distribuição do *T. cruzi* em diversos países onde é possível encontrar infecções mistas em várias espécies de triatomíneos e mamíferos (Fig.1; Vallejo et al., 1988; Grisard et al., 1999).



Figura 1. Distribuição de *T. cruzi* e *T. rangeli* na América Central e na América do Sul. Regiões que apresentam casos da doença de Chagas em humanos estão sombreadas e a presença do *Trypanosoma rangeli* em triatomíneos, animais silvestres e humanos está representada por círculos (Grisard et al, 1999).

Trypanosoma rangeli e suas interações com os hospedeiros invertebrados

Os triatomíneos, hospedeiros invertebrados do *T. rangeli*, possuem um ciclo de vida dividido em cinco estádios ninfais e a fase adulta e alimentam-se de sangue durante todo o seu desenvolvimento (Lent e Wygodzinsky, 1979; Schofield, 1981). São insetos solenofágicos, ou seja, retiram o sangue diretamente de vênulas ou arteríolas e para se alimentarem possuem um sofisticado aparelho bucal formado por um par de mandíbulas e um par de maxilas justapostas que formam o canal alimentar e o canal salivar (Lavoipierre et al., 1959). A alimentação desses insetos se inicia com a inserção das mandíbulas, estruturas rígidas que servem de âncora para o restante das peças bucais. As maxilas formam um feixe, delgado e flexível, que penetra profundamente nos tecidos e movimenta-se à procura de sinais da presença de vasos sanguíneos na derme; esse período é denominado de sondagem (Lavoipierre et al., 1959). Uma vez encontrado o vaso sanguíneo, a ingestão é iniciada e termina após o ingurgitamento do inseto, com a retirada das peças bucais (Lavoipierre et al., 1959). Todo o processo de alimentação pode durar de 10 a 40 minutos, dependendo do estágio ninfal, da espécie e do estado nutricional do inseto (Guarneri et al., 2000; Sant'Anna et al., 2001). Para que ocorra a alimentação e eles não sejam percebidos e predados pelo hospedeiro, os triatomíneos adquiriram ao longo da evolução uma saliva rica em moléculas anestésicas, anticoagulantes e antiplaquetárias (Ribeiro, 1987; 1998). A liberação de saliva ocorre durante todo o processo de alimentação, incluindo a sondagem, na derme, e a fase de ingurgitamento, na circulação sanguínea (Soares et al., 2006).

O ciclo de vida do *T. rangeli* no hospedeiro invertebrado se inicia quando triatomíneos ingerem formas tripomastigotas sanguíneas ao se alimentarem em um mamífero infectado (Fig. 2). Ao atingirem o trato intestinal do inseto, os tripomastigotas sanguíneos se diferenciam para formas epimastigotas que iniciam um processo de multiplicação e podem atravessar o epitélio intestinal alcançando a cavidade celomática (D'Alessandro et al., 1976; Hecker et al., 1990). Uma vez na hemocele, os parasitos continuam a se multiplicar e então migram para as glândulas salivares, onde ocorrerá a metaciclogênese e a sua diferenciação para as formas infectivas, denominadas tripomastigotas metacíclicos. Os tripomastigotas metacíclicos serão inoculados no hospedeiro vertebrado, juntamente com a saliva, durante a alimentação do inseto vetor (D'Alessandro et al., 1976; D'Alessandro e Saravia, 1992).

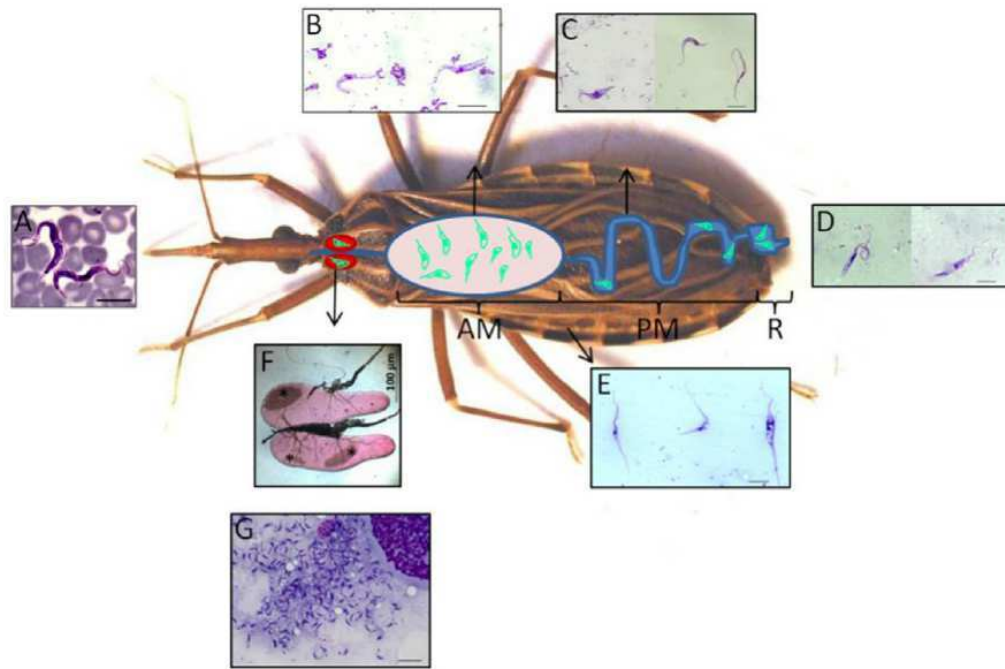


Figura 2. Desenvolvimento do *Trypanosoma rangeli* no hospedeiro invertebrado. O ciclo do parasito no triatomíneo inicia com a ingestão das formas tripomastigotas sanguíneas (A). No trato intestinal do inseto essas formas se diferenciam para formas multiplicativas, epimastigotas (B, C e D). Quando invadem a hemocele, os epimastigotas continuam a multiplicação na hemolinfa (E) e migram para as glândulas salivares onde ocorrerá a diferenciação para as formas infectantes, tripomastigotas metacíclicas (F e G) (Guarneri e Lorenzo, 2016).

Vários são os efeitos patogênicos observados no inseto vetor em consequência da infecção por *T. rangeli*. Dentre eles, diminuição no número de simbiossiontes intestinais (Lake e Friend, 1967; Watkins, 1971; Eichler e Schaub, 2002), distúrbios na digestão e excreção (Brecher e Wigglesworth, 1944; Eichler e Schaub, 1998), prolongamento do período intermudas e deformações morfológicas durante o processo de muda (Grewal, 1957; Tobie, 1961; Añez, 1984; Ferreira et al., 2010), aumento do volume de hemolinfa (Watkins, 1971; Ferreira et al., 2010) e da quantidade de lipídeos e corpos gordurosos (Ferreira et al., 2010), além do aumento nas taxas de mortalidade (Harrington, 1960; Añez, 1984). Quando presente nas glândulas salivares, o protozoário promove uma redução na quantidade total de proteínas estocadas (Paim et al., 2013) que pode alterar o comportamento alimentar dos insetos, fazendo com que eles aumentem o número de picadas devido à dificuldade em ingerir o sangue durante a alimentação (Garcia et al., 1994).

T. rangeli pode ser encontrado infectando espécies de triatomíneos de diferentes gêneros. Entretanto, somente completa o seu desenvolvimento produzindo formas

infectivas em espécies pertencentes ao gênero *Rhodnius* (Cuba Cuba, 1998; Marquez et al., 2006; Maia da Silva et al., 2007). Insetos dos gêneros *Triatoma* e *Panstrongylus* são capazes de se infectar com *T. rangeli* (Steindel et al., 1991; Ramirez et al., 2002; Marquez et al., 2006), mas mesmo que em alguns casos o parasito consiga se multiplicar na hemolinfa, as glândulas salivares não são colonizadas e as formas infectivas não são produzidas (Cuba Cuba, 1998; Marquez et al., 2006).

Os triatomíneos vivem no ambiente silvestre em pequenas colônias associados a ninhos de animais de sangue quente que são usualmente ocupados por períodos transitórios (durante o acasalamento e crescimento da prole) e que dependem da presença de nutrientes nas proximidades. São insetos oportunistas e adaptados a repastos ocasionais e de grande volume. A motivação para alimentação, assim como vários outros comportamentos expressos pelos triatomíneos, é temporalmente modulada, sendo os indivíduos mais propensos a se alimentarem durante as primeiras horas da noite (revisado por Barrozo et al., 2004). Nesse sentido, é de se esperar que a alimentação simultânea de co-específicos em um hospedeiro, também conhecida por co-alimentação, seja um comportamento normalmente encontrado nos ambientes naturais desses insetos.

O gênero *Rhodnius* é composto por 18 espécies (Abad-Franch e Monteiro, 2007; Rosa et al., 2012; Abbad-Franch et al., 2013) e possui importância epidemiológica pelo fato de várias espécies pertencentes a este grupo transmitirem o *T. cruzi* e o *T. rangeli* (Cuba Cuba, 1998; Marquez et al., 2006; Maia da Silva et al., 2007). Esses insetos, no ambiente silvestre, são normalmente encontrados em palmeiras de diferentes espécies como, por exemplo, *Attalea humboldtiana* Spruce, *Acrocomia sclerocarpa* Mart., *Copernicia tectorum* e *Leopoldina piassaba* (Lent e Wygodzinsky, 1979; Abad-Franch et al., 2015), que servem de abrigo para aves (Teixeira et al., 2001; Dias et al., 2008) e pequenos mamíferos arborícolas, como por exemplo as preguiças (Abad-Franch et al., 2015). As taxas de infecção por *T. rangeli* em triatomíneos capturados no ambiente silvestre variam entre 30 a 70% (Marinkelly, 1968; D'Alessandro et al., 1969; Cuba Cuba et al., 1972). Estas altas taxas de infecção somadas à forte associação que existe entre as espécies do gênero *Rhodnius* com aves, podem ser sugestivas de que as aves poderiam desempenhar um papel na circulação de *T. rangeli* na natureza, mesmo sabendo-se que esse grupo é refratário a tripanosomas do clado a que pertence *T. rangeli* (Dias, 1944; Kierszenbaum et al. 1976; Mintergoedbloed et al., 1981).

A transmissão de parasitos a partir da co-alimentação de insetos em hospedeiros mamíferos não infectados foi inicialmente descrita por Tobie (1961). Entretanto, o estudo não estabeleceu a importância dessa forma de transmissão na manutenção de *T. rangeli* na natureza. Recentemente, demonstramos a eficiência da transmissão do parasito através do comportamento de co-alimentação em camundongos, com taxas de infecção superiores a 80% (Ferreira et al., 2015). Sendo assim, e de acordo com o acima mencionado, o presente estudo avaliou a participação de aves na transmissão de *T. rangeli* entre insetos através do comportamento de co-alimentação.

O *Trypanosoma rangeli* e suas interações com o hospedeiro vertebrado

T. rangeli não é considerado patogênico ao homem (D'Alessandro et al., 1992). Entretanto, o parasito apresenta importância epidemiológica ao promover uma resposta imune humoral com elevados títulos de anticorpos em indivíduos infectados (Schotelius, 1987) que apresenta reatividade cruzada com antígenos do *T. cruzi* em diferentes testes imunossorológicos (ELISA, imunoblotting, imunoeletroforese, imunofluorescência), especialmente na fase crônica da doença de Chagas (Afchain et al., 1979; Schotelius, 1987, Vallejo et al., 1988; O'Daly et al., 1994; Saldaña e Souza, 1996, Moraes et al., 2008). Essa reatividade está aparentemente relacionada ao fato do parasito compartilhar cerca de 60% de sua constituição antigênica solúvel com antígenos de *T. cruzi*, o que poderia implicar em resultados falso-positivos no diagnóstico da doença de Chagas, aumentando os custos socioeconômicos (Afchain et al., 1979; Antony et al., 1979; Grogl and Kuhn, 1984; Schotelius, 1987). Infecções humanas são descritas na literatura desde 1939 (Rey e Ucrós, 1939) com casos relatados em mais de sete países distribuídos desde a América Central até a América do Sul (Rey e Ucrós, 1939; Dias e Torrealba, 1943; Pifano, 1954; Coura et al., 1996; Souza et al., 2008). A infecção humana é caracterizada por uma baixa parasitemia que decresce ao longo do tempo, com ausência de sintomatologia clínica, mas que induz a formação de uma resposta imune humoral com elevados títulos de anticorpos (Pifano, 1948; 1954; Schotelius, 1987). Até o momento, não foram descritas formas do parasito em divisão nos órgãos e nem no sangue de indivíduos infectados. No ambiente silvestre, o parasito já foi encontrado infectando mamíferos de diferentes ordens, dentre elas, Marsupialia, Carnivora, Edentada, Primata e Rodentia (Deane, 1958; Marinkelle, 1966; Ziccardi et al., 2000; Pineda et al., 2011).

Poucos estudos foram desenvolvidos a fim de se descrever o ciclo do *T. rangeli* no hospedeiro vertebrado (Herbig-Sandreuter, 1957; Scorza et al., 1986; Urdaneta-Morales e Tejero, 1985; 1986; Zuñiga et al, 1997; Ferreira et al., 2015). Durante a fase aguda, normalmente o que se observa em animais infectados experimentalmente é um pequeno número de parasitos no sangue circulante dos animais, mesmo durante o pico de parasitemia que ocorre entre o 3º e o 5º dia de infecção (Herbig-Sandreuter, 1957; Urdaneta-Morales e Tejero, 1985; 1986; Scorza et al., 1986; Vallejo, 1986; Zuñiga et al, 1997). A parasitemia então decresce no decorrer da infecção e os parasitos deixam de ser detectados no sangue circulante dos animais em exames a fresco (Herbig-

Sandreuter, 1957; Añez, 1981a e 1982; Urdaneta-Morales e Tejero, 1985; 1986; Scorza et al., 1986; Vallejo, 1986; Zuñiga et al, 1997). Durante a fase crônica, o parasito pode ser detectado por meio de técnicas como a hemocultura, durante um período de dois a 18 meses pós-infecção (Paredes e Paredes, 1949; Groot et al., 1950; 1954; Souza e Johnson, 1971; Steindel et al., 1993), e o xenodiagnóstico, por um período de pelo menos quatro meses pós-infecção (Añez, 1985; Ferreira et al., 2015).

A possibilidade de existência de um ciclo de multiplicação tecidual do *T. rangeli* no hospedeiro vertebrado foi avaliada por meio de estudos *in vivo* e *in vitro*. Herbig-Sandreuter (1957) avaliou o curso da infecção em 230 camundongos recém-nascidos através de inoculação subcutânea de metacíclicos de cultura e em dois macacos do gênero *Rhesus* (um macho e uma fêmea) de dois anos de vida através de inoculação intramuscular. Foram realizados exames a fresco (diariamente durante três semanas), xenodiagnóstico (mensalmente durante três meses) e hemocultura. Os camundongos foram submetidos a análises histológicas de diferentes órgãos (cérebro, pulmões, coração, baço, fígado e rins) em diferentes períodos pós-infecção. Não foram encontrados parasitos no sítio da infecção nas primeiras horas pós-exposição. Setenta e duas horas após, o sítio da infecção se apresentava semelhante às áreas não infectadas. Houve um pico na parasitemia entre o 3º e o 5º dia pós-infecção e foram encontradas formas semelhantes ao parasito no coração e na veia porta. Não foram encontrados parasitos no sangue e nem nos tecidos a partir do sétimo dia de infecção. Os macacos desenvolveram baixas parasitemias que somente foram demonstradas por hemocultura. O macaco macho foi submetido à autópsia, e secções histológicas do tronco cerebral, córtex, cerebelo, coração, pulmões, baço, fígado, rins, glândulas supra-renal e diafragma não apresentaram parasitos. Como conclusão desse estudo, não foi verificada nenhuma forma tecidual e/ou alteração histopatológica nos órgãos dos animais avaliados (camundongos e macacos) após o período inicial da infecção (Herbig-Sandreuter, 1957). Añez (1981a, 1982) estudando o ciclo do *T. rangeli* em camundongos sugeriu que os parasitos são liberados pela picada dos insetos vetores no hospedeiro e migram do sítio da infecção até a circulação sanguínea. No sangue, os parasitos aparentemente crescem até 72 horas e depois desaparecem, não sendo mais encontrados na circulação (Añez 1981a, 1982). Scorza e colaboradores (1986) inocularam tripomastigotas de cultura da cepa Perro 82 em camundongos recém-nascidos, não isogênicos, e verificaram que a parasitemia aumentou progressivamente até o 4º dia, diminuindo então até o 17º dia pós-inoculação quando parasitos não foram mais observados. A análise de secções

histológicas do coração, fígado, baço, pulmões, rins, estômago, intestinos, cérebro, esterno e vértebras em diferentes períodos pós-inoculação mostrou formas semelhantes a amastigotas no coração, fígado, baço e pulmões até o 4º dia, não sendo mais detectadas após esse período (Scorza et al., 1986). Urdaneta-Morales e Tejero (1986), utilizando camundongos infectados com parasitos de cultura, avaliaram secções histológicas do coração, fígado, baço, pulmões, fêmur, medula, músculos, cartilagem, esterno e rins em diferentes períodos pós-infecção. Foram observados parasitos na circulação sanguínea a partir de 24 horas pós-infecção até o 3º dia. Formas semelhantes a amastigotas foram identificadas no fígado, baço e principalmente no coração até o 4º dia quando os parasitos não foram mais detectados nos tecidos.

Ensaio *in vitro* foram realizados a fim de se avaliar se o *T. rangeli* seria capaz de infectar e se multiplicar intracelularmente em diferentes tipos celulares provenientes de hospedeiros vertebrados (Molyneux, 1973; Osorio et al., 1995; Zuñiga et al., 1997; Tanoura, 1999; Eger-Mangrich et al., 2001). Nesses estudos, diferentes linhagens celulares (HELA, VERO, U937, J774, células de sarcoma de cão, macrófagos peritoneais de camundongos isogênicos), provenientes de hospedeiros vertebrados, foram desafiadas com várias cepas de *T. rangeli* (Macias, SC-58, San Agustín, C53 Colombiana, Choachí) (Molyneux, 1973; Osorio et al., 1995; Zuñiga et al., 1997; Tanoura, 1999; Eger-Mangrich et al., 2001). De maneira geral, os estudos mostraram uma baixa infectividade dos parasitos, ausência de formas amastigotas e ausência de multiplicação intracelular (Molyneux, 1973; Osorio et al., 1995; Zuñiga et al., 1997; Tanoura, 1999; Eger-Mangrich et al., 2001).

Recentemente, reavaliamos o processo de transmissão do *T. rangeli* para hospedeiros mamíferos e demonstramos que uma ninfa de 5º estágio de *R. prolixus* pode liberar cerca de 50.000 tripomastigotas metacíclicos durante a alimentação em camundongo (Ferreira et al., 2015). A transmissão é bastante eficiente, uma vez que 90% dos camundongos se infectaram ao serem expostos a uma alimentação realizada por uma única ninfa infectada. Mais ainda, mostramos que os camundongos infectados são capazes de transmitir a infecção a outros triatomíneos por um período de até quatro meses após terem sido infectados (Ferreira et al., 2015) o que reforça a ideia de que o parasito é capaz de estabelecer uma infecção e se multiplicar no hospedeiro vertebrado. Apesar de amplamente estudado, o desenvolvimento do *T. rangeli* no hospedeiro vertebrado ainda é alvo de discussões e especulações, principalmente no que se refere a sua multiplicação. Sendo assim, a avaliação dos eventos que ocorrem imediatamente

após a entrada do parasito no hospedeiro vertebrado pode fornecer novas informações para que seja possível entender como o *T. rangeli* estabelece a infecção, fato ainda não compreendido. Dessa forma, no presente estudo também avaliamos alguns aspectos da interação do parasito com o hospedeiro mamífero, buscando compreender os eventos iniciais do estabelecimento da infecção.

2 Objetivos

2.1 Objetivo geral

Avaliar o papel das aves na transmissão de *Trypanosoma rangeli* entre insetos, bem como descrever a fase inicial da infecção do *T. rangeli* em camundongos.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a transmissão de *Trypanosoma rangeli* entre insetos através do comportamento de co-alimentação em pombos;
- Avaliar a lise de formas tripomastigotas metacíclicas de *Trypanosoma rangeli* mediada pela ação do sistema complemento de pombos e camundongos;
- Avaliar o estabelecimento da infecção por *Trypanosoma rangeli* em camundongos a partir de parasitos liberados na pele;
- Avaliar alterações que ocorrem na pele de camundongos expostos ao *Trypanosoma rangeli*;
- Rastrear o DNA de *Trypanosoma rangeli* no sítio de infecção na pele de camundongos em diferentes períodos após sua liberação;
- Rastrear o DNA de *Trypanosoma rangeli* no sangue, linfonodos mesentéricos e baço de camundongos em diferentes períodos após a infecção;
- Avaliar o efeito da infecção pelo *Trypanosoma rangeli* no peso de linfonodos mesentéricos e baço de camundongos infectados.

3 Materiais e métodos

3.1 Organismos utilizados nos experimentos

3.1.1 Triatomíneos

Os exemplares de *Rhodnius prolixus* utilizados neste estudo foram obtidos de uma colônia originalmente estabelecida a partir de insetos coletados em Honduras, na década de 1990, que é mantida pelo Grupo de Comportamento de Vetores e Interação com Patógenos no Centro de Pesquisas René Rachou. Os insetos são criados a $26 \pm 1^\circ\text{C}$, $65 \pm 10\%$ UR, com ciclo natural de iluminação. A colônia foi alimentada em galinhas anestesiadas com injeções intraperitoneais de cetamina (20 mg.kg⁻¹, Cristália, Brasil) e detomidina (0,3 mg.kg⁻¹, Syntec, Brasil) e camundongos anestesiados com injeções intraperitoneais de cetamina (150 mg. Kg⁻¹, Cristália, Brasil) e xilazina (10 mg.kg⁻¹, Bayer, Brasil). Todos os protocolos utilizados com animais seguiram as normas estabelecidas pela Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) quanto à manutenção e experimentação de animais e foram aprovados pelo Comitê de Ética em Uso Animal (CEUA-FIOCRUZ) sob o número de licença LW 61/12.

3.1.2 Hospedeiros vertebrados

Foram utilizados camundongos machos, da linhagem Swiss Webster com peso de aproximadamente 40g e 60 dias de idade, obtidos do biotério do Centro de Pesquisas René Rachou. Os pombos de ambos os sexos, com peso de aproximadamente 450g, foram também obtidos do biotério do Centro de Pesquisas René Rachou.

3.1.3 *Trypanosoma rangeli*

Foi utilizada a cepa Choachí de *T. rangeli* isolada de *R. prolixus* naturalmente infectados e coletados na Colômbia (Schottelius, 1987). Os parasitos são mantidos em 27°C , através de duas passagens semanais em meio LIT (liver-infusion tryptose) ou ágar/sangue + LIT (NNN + LIT), ambos suplementados com 15% de soro bovino fetal (FBS), 100µg de estreptomicina/ml e 100 unidades de penicilina/ml. Para garantir a infectividade da cepa, os parasitos são submetidos a passagens por camundongos através do repasto sanguíneo realizado por ninfas infectadas a cada três meses. Após três dias da realização do repasto infectivo, os parasitos são recuperados por hemocultura (Vallejo et al., 1986; Rodrigues et al., 2016).

3.2 Infecção de *Rhodnius prolixus*

Ninfas de 3º estágio (sete dias pós-muda) foram alimentadas em um dispositivo de alimentação artificial contendo sangue de coelho citratado (obtido do CECAL, Centro de Criação de Animais de Laboratório, Fiocruz, RJ) inativado por calor (56°C/30 min) e uma suspensão de epimastigotas de cultura de *T. rangeli* na concentração de 1×10^5 parasitos/ml a 37°C. Os epimastigotas foram recuperados de uma cultura de 10 dias, lavados e ressuspensos em solução estéril de salina tamponada com fosfato (PBS, NaCl 0,15 M em Na_3PO_4 0,01 M, pH 7,4). Para garantir a presença de parasitos na hemolinfa e nas glândulas salivares, 10 dias após a muda para o 4º estágio, as ninfas foram inoculadas na pleura torácica com 1 µl de uma suspensão de epimastigotas (1×10^5 parasitos/ml) em PBS estéril (Ferreira et al., 2010). Vinte e quatro horas após a inoculação, as ninfas foram alimentadas *ad libitum* em camundongos anestesiados. As ninfas utilizadas para a infecção de camundongos ou alimentação em pombos foram dissecadas imediatamente após a alimentação e suas glândulas salivares foram examinadas para confirmação da infecção. Apenas animais expostos a insetos positivos foram considerados.

3.3 O papel das aves na transmissão do *Trypanosoma rangeli*

3.3.1 Avaliação da transmissão do *T. rangeli* entre *Rhodnius prolixus* através do comportamento de co-alimentação em pombos

Os experimentos de co-alimentação foram realizados utilizando-se uma ninfa de 5º estágio infectada (doadora) e uma ninfa de 5º estágio não infectada (receptora) que foram colocadas em um frasco (5,5cm de diâmetro e 8,0cm de altura) coberto com tecido de algodão e dividido em dois setores de forma que impedisse o contato entre as ninfas. Um pombo anestesiado (conforme protocolo usado para galinha, item 3.1.1) foi colocado sobre o aparato na posição dorso ventral durante 40min. Finalizada a alimentação o pombo foi retirado do aparato, a ninfa doadora foi dissecada e examinada para a confirmação da infecção e a ninfa receptora foi transferida para uma estufa BOD ($27 \pm 1^\circ\text{C}$, 12:12 L:D). Os insetos foram mantidos nestas condições durante 21 dias, e depois dissecados para a procura de parasitos no trato intestinal, hemolinfa e glândulas salivares. Modificações desse ensaio foram realizadas utilizando-se cinco ninfas receptoras e uma ninfa doadora, nas seguintes condições: a) alimentação simultânea dos

insetos receptores com o inseto doador, mas com uma distância de 6cm entre doador e receptores; b) alimentação dos insetos receptores 30min após o término da alimentação do inseto doador; c) alimentação dos insetos receptores 24h após o término da alimentação do inseto doador. Cinco repetições foram realizadas para cada ensaio.

3.3.2 Avaliação da lise de formas tripomastigotas metacíclicas de *T. rangeli* mediada pelo sistema complemento

O ensaio para avaliar a lise de *T. rangeli* mediada pelo sistema complemento de camundongos e de pombos foi realizado de acordo com a metodologia descrita por Mendes-Sousa e colaboradores (2013). Para a obtenção do soro foram coletadas amostras de sangue de camundongos e de pombos (n=2 para cada hospedeiro). Após a coleta, as amostras de sangue foram incubadas por 1h a 37°C e centrifugadas a 5000g durante 5min a 4°C para a obtenção do soro. O soro de cada hospedeiro foi dividido em alíquotas, sendo metade delas incubada por 30min a 56°C para inativação do sistema complemento. As alíquotas, inativadas ou não, foram mantidas em -70°C até o uso. Cada alíquota foi utilizada uma única vez. Os tripomastigotas metacíclicos foram obtidos de ninfas de 5º estágio infectadas por pelo menos 45 dias quando a proporção de formas tripomastigotas presentes nas glândulas salivares é superior a 95% (Paim et al., 2013). Para a obtenção dos parasitos, os triatomíneos foram dissecados, suas glândulas salivares coletadas e lavadas em PBS para retirada de parasitos presentes no exterior das mesmas. As glândulas foram então transferidas para um microtubo contendo 50µl de meio de cultura de células M199 (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA), onde foram rompidas e o conteúdo homogeneizado. Para cada ensaio, 40µl de soro (inativado ou não) e 10µl da suspensão de parasitos (tripomastigotas metacíclicos na concentração de $2-3,4 \times 10^6$ par/ml) foram incubados a 37 °C e 41°C (para soro de camundongo e pombo, respectivamente) por 30min. O número de parasitos foi quantificado em uma câmara de Neubauer nos tempos 0 e 30min após a incubação. A porcentagem de lise observada no soro não inativado por calor após 30min de incubação foi normalizada em relação aos valores correspondentes obtidos quando o soro inativado por calor foi utilizado. Foram realizadas três repetições para cada tratamento.

3.4 A fase inicial da infecção de *Trypanosoma rangeli* em camundongos

3.4.1 Avaliação da pele como local de entrada de parasitos e de estabelecimento da infecção

3.4.1.1 Exposição da pele ao *T. rangeli* através de picadas de ninfas infectadas

Camundongos foram anestesiados e uma área de aproximadamente 3mm² da região central do abdômen foi delimitada. Após tricotomia, a área delimitada foi exposta à picada de três ninfas de 5º estágio infectadas com *T. rangeli*, com jejum de aproximadamente 30 dias. O processo de sondagem foi interrompido a cada 10s para evitar a canulação de vasos sanguíneos. A cada minuto os insetos foram substituídos por outros três, com o objetivo de aumentar o número de parasitos liberados na pele. Esse procedimento foi repetido durante 10min.

3.4.1.2 Exposição da pele ao *T. rangeli* por deposição de parasitos

As glândulas salivares (GS) de cinco ninfas de 5º estágio foram dissecadas, lavadas em PBS para a retirada de parasitos presentes no seu exterior, e transferidas para um microtubo de 0,2ml contendo 20µl de meio de cultura celular M199. As GS foram então rompidas e o seu conteúdo homogeneizado, a fim de se obter uma suspensão com tripomastigotas metacíclicos livres. Em seguida, o camundongo foi anestesiado e submetido à tricotomia de uma área de 5mm² como descrito anteriormente. Para permitir a entrada dos parasitos na pele, a área foi superficialmente puncionada com uma agulha (0,3x13 mm; BD Precision Glide, Brasil). No total, 10 punções foram feitas com uma distância de aproximadamente 1mm entre elas. Imediatamente após a punção, a suspensão de parasitos foi colocada sobre a área puncionada. Os camundongos foram monitorados durante 10min a fim de impedir possíveis movimentos, tais como agitação por recuperação da anestesia. O grupo controle foi submetido aos mesmos procedimentos; entretanto, na área puncionada somente foi colocado meio de cultura celular M199.

3.4.1.3 Avaliação do estabelecimento da infecção por *T. rangeli* a partir de parasitos liberados na pele

O estabelecimento da infecção por *T. rangeli* a partir de parasitos liberados na pele de camundongos foi avaliado através de duas metodologias. A primeira, a partir da exposição de camundongos (n=12) à picada de ninfas infectadas (como descrito no item 3.4.1.1); e a segunda, a partir da exposição de camundongos (n=10) a uma suspensão de parasitos depositados na pele (como descrito no item 3.4.1.2). No sétimo dia após a exposição, cada camundongo foi anestesiado e oferecido como fonte alimentar por 30min para três ninfas não infectadas (n=36 para o primeiro grupo e n=30 para o segundo grupo). Imediatamente após a alimentação, as ninfas foram transferidas para uma estufa BOD (27±1°C, 12:12 L:E) e mantidas por um período de 21 dias quando foram dissecadas e tiveram o conteúdo intestinal, hemolinfa e glândulas salivares examinadas para a verificação da presença de parasitos.

3.4.1.4 Coleta de amostras de pele

As amostras do sítio de infecção na pele foram coletadas através de uma microbiópsia na região delimitada, com o auxílio de um punch dermatológico com diâmetro de 3 ou 5mm² (Kolplast LTDA, São Paulo, Brasil), dependendo do ensaio. Os animais foram eutanasiados após o procedimento. As amostras coletadas foram mantidas congeladas a -70°C até processamento.

3.4.1.5 Avaliação das alterações que ocorrem na pele de camundongos expostos ao *T. rangeli*

A avaliação das alterações da pele promovidas pela presença do parasito foi feita a partir da análise de secções histológicas de amostras de pele (5mm²) de animais expostos ou não ao *T. rangeli*. Os camundongos foram expostos a partir da deposição de parasitos (como descrito no item 3.4.1.2.) e submetidos a biópsias de pele realizadas nos tempos 30min, 12h e 1, 2, 4, 7 e 15d após a exposição, sendo que para cada tempo foram avaliadas amostras originadas de três animais diferentes. Como controles foram utilizadas amostras de pele não submetidas a nenhum procedimento; amostras de pele puncionadas e expostas ao meio de cultura M199 e amostras de pele expostas a picadas de triatomíneos não infectados. Imediatamente após a coleta das amostras, as mesmas foram transferidas, individualmente, para microtubos plásticos que continham 1,8ml de paraformaldeído (PFA) a 4% em tampão fosfato (pH 7,2 – 7,4), sendo mantidas nessas

condições por um período de 24h. Concluída a etapa de fixação, a solução de PFA foi retirada e substituída por 1,8ml de álcool 70%, onde permaneceu até o momento da inclusão. A inclusão do tecido foi feita em Paraplast (Sigma Aldrich Chemie, Deutschland, Germany), como segue: as amostras foram desidratadas por imersão em banhos sucessivos de álcool, em concentrações crescentes (álcool 80%, 90% e álcool absoluto), por 30min cada banho. Em seguida, as amostras foram diafanizadas, por imersão em xilol por 20min. Todos esses procedimentos foram realizados em temperatura ambiente. As amostras de tecido foram então infiltradas com Paraplast, em dois banhos sucessivos a 56°C, durante 1h cada. Por fim, as amostras foram incluídas individualmente em formas de 2x2cm contendo Paraplast líquido. As formas permaneceram em temperatura ambiente por um período de 24h para solidificação dos blocos. Finalizada a inclusão, os blocos foram submetidos à microtomia, obtendo-se secções de 7µm, distendidas sobre lâminas histológicas. As secções foram então coradas rotineiramente com hematoxilina e eosina (HE). As lâminas foram analisadas em microscópio óptico Axioplan 2 (Zeiss, Campbell, USA), para microscopia de campo claro equipado com uma lâmpada halógena 100W e os seguintes parâmetros foram considerados: presença do parasito nas camadas da pele e em seus anexos (pelos e glândulas), interação do parasito com células da pele e com seus anexos e presença de focos inflamatórios.

3.4.1.6 Rastreamento do DNA de *T. rangeli* no sítio da picada em diferentes períodos após a exposição

Para este ensaio foram usadas amostras de fragmentos de pele (3mm²) excisados nos tempos 30min, 1-7 e 15d após a exposição por picada de ninfas infectadas (como descrito no item 3.4.1.1.). O DNA dos fragmentos de pele foi extraído com o kit Wizard® Genomic DNA Purification (Promega Corporation, Madison, USA) conforme instruções do fabricante para preparo de amostras de cauda de camundongo. Para tal, as amostras foram cortadas com o auxílio de um bisturi em fragmentos de aproximadamente 1mm e maceradas com um pistilo em um microtubo de 1,5ml contendo 600µl de solução de lise (Nuclei Lysis Solution + EDTA 0,5M). Os demais passos da extração foram seguidos de acordo com instruções do fabricante. Os extratos de DNA foram quantificados em um NanoDrop Spectrophotometer (Thermo Scientific, Wilmington, USA) para a avaliação da concentração e qualidade dos mesmos. As reações de qPCR foram realizadas em um volume final de 20µl contendo 300ng de

DNA, 10µl de Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Waltham, USA) e 0,5µM de cada iniciador. Um par de iniciadores que amplifica um fragmento de 104pb do gene *KMP-11* (Kinetoplastid Membrane Protein), que codifica uma proteína abundante e presente em diversos parasitos da Ordem Kinetoplastida, inclusive *Trypanosoma rangeli* (KMP84_F: GAAGTTCTTTGCGGACAAGC, KMP188_R: TTGAACTTGTCGGTGTGCTC) foi utilizado nas reações. A escolha dos iniciadores foi possível a partir da publicação do genoma do *T. rangeli* publicado por Stoco e colaboradores em 2014. A quantificação do número de parasitos presentes nas amostras foi realizada através da utilização de uma curva padrão em todas as corridas de qPCR. A curva padrão consistiu em diluições seriadas de uma amostra contendo uma quantidade de DNA inicial correspondente a 1×10^5 parasitos e pele de camundongo. Para a preparação da amostra, 5×10^8 epimastigotas de cultura e um fragmento de 3mm² de pele de um camundongo não infectado foram adicionados a um tubo e submetidos à extração de DNA como descrito anteriormente. No passo final da extração, o DNA foi ressuspensionado em 50µl de tampão de eluição e diluído 100x, de modo a se obter uma concentração de 1×10^5 parasitos/µl. Dessa concentração foram feitas diluições seriadas (5x) para se obter uma curva com sete pontos. Foram utilizadas as seguintes condições para a amplificação: 95°C - 10min, seguido por 40 ciclos de 95°C - 15seg, 60°C - 1min. Uma análise da curva de dissociação (T_m) foi realizada para confirmar a especificidade da reação. Como controles foram utilizados extrato de DNA de epimastigotas de cultura de *T. rangeli*; extrato de DNA de pele de camundongo não submetido a nenhum procedimento e uma amostra constituída de mix de qPCR sem adição de DNA.

3.4.2 Avaliação do sangue, linfonodos e baço como locais de circulação de parasitos e de estabelecimento da infecção

3.4.2.1 Avaliação do efeito da infecção pelo *T. rangeli* nos pesos dos linfonodos mesentéricos e do baço

Para a realização deste ensaio e do ensaio descrito no item 3.4.2.2., camundongos anestesiados serviram como fonte alimentar para três ninfas de 5º estágio infectadas por *T. rangeli* (com jejum de aproximadamente 30 dias) durante 30min. Concluída a alimentação, os camundongos (exceto os referentes ao tempo 30min) foram acondicionados em gaiolas que continham água e ração *ad libitum* até a realização das biópsias. Nos tempos de 30min, 2, 4, 7 e 15d após a alimentação dos insetos, os animais

foram anestesiados (n=5 para cada tempo avaliado) e pesados em balança eletrônica (Shimadzu, São Paulo, Brasil). Amostras de sangue foram coletadas dos animais infectados a fim de serem utilizadas no ensaio descrito no item 3.4.2.2. A coleta do sangue dos animais foi realizada após a pesagem e antes da coleta dos órgãos. Para tal, o camundongo foi colocado em posição de decúbito dorsal e após higienização com álcool 70%, realizou-se a coleta do sangue (aproximadamente 1ml) através de punção cardíaca, com auxílio de uma seringa de 1ml acoplada em uma agulha (0,3x13 mm; BD Precision Glide, Brasil). Imediatamente após a coleta, a amostra de sangue foi transferida para um microtubo contendo 50µl de EDTA 0,5M. Finalizada a punção cardíaca, foi verificado se o animal ainda apresentava sinais vitais. Em caso positivo, o mesmo era submetido à eutanásia por administração de sobredose de anestésico. Para a coleta dos órgãos foi realizada uma incisão transversal no abdômen para acesso à cavidade abdominal. Primeiramente realizou-se a coleta dos linfonodos mesentéricos com auxílio de pinças e tesoura cirúrgica. Os linfonodos foram limpos para retirada de tecido adiposo aderido ao tecido linfoide, pesados, e transferidos para um microtubo contendo 500µl de PBS. O baço foi então retirado, pesado e armazenado em um microtubo contendo aproximadamente 800µl de PBS. As amostras coletadas foram armazenadas a -20°C até o seu processamento. O grupo controle foi constituído por animais não infectados oriundos do mesmo lote de animais. Foram realizados os mesmos procedimentos descritos para o grupo infectado com exceção do armazenamento das amostras. Os pesos proporcionais dos órgãos (baços e linfonodos) foram obtidos a partir da divisão do peso de cada órgão pelo peso do respectivo animal do qual foi obtido órgão.

3.4.2.2 Rastreamento do DNA de *T. rangeli* no sangue, linfonodos mesentéricos e baço de animais infectados em diferentes períodos após a exposição

O DNA das amostras de sangue, linfonodos e baço foi extraído com o kit Wizard® Genomic DNA Purification (Promega Corporation, Madison, USA) conforme instruções do fabricante. As amostras de sangue foram extraídas conforme instruções para preparo de amostras de sangue total, utilizando-se um volume de 300µl de sangue. Os linfonodos mesentéricos e o baço foram extraídos conforme protocolo para preparo de amostras de cérebro e fígado, com modificações. Inicialmente as amostras foram transferidas para microtubos de 2,0ml contendo 1,2ml ou 1,7ml de solução de lise dependendo do peso do órgão (1,2ml para órgãos com peso<100mg e 1,7ml para órgãos

com peso > 100mg). O órgão foi então cortado em fragmentos menores com auxílio de uma tesoura de microdissecação e então submetido à agitação com esferas metálicas (Retsch, Haan, Germany) na frequência de 30 vezes/seg, durante 3min. Após a dissociação, um volume correspondente a 20mg do órgão foi coletado de cada microtubo e transferido a um novo tubo onde adicionou-se solução de lise até um volume final de 600µl. A solução foi então incubada durante 30min a 65°C. Finalizada a primeira incubação, foi adicionado a cada amostra 20µl de proteinase K (20ng/µl; Promega Corporation, Madison, USA) e a mesma foi submetida à incubação a 55°C durante aproximadamente 20h. Concluída a segunda incubação, os demais passos da extração foram seguidos de acordo com instruções do fabricante. Os extratos de DNA foram quantificados no aparelho NanoDrop Spectrophotometer (Thermo Scientific, Wilmington, USA) para a avaliação da concentração e qualidade dos mesmos. As reações de qPCR em tempo real foram realizadas como descrito no item 3.4.1.6.

3.5 Análise estatística

O número de parasitos presentes nas amostras de pele e os pesos proporcionais do baço e dos linfonodos foram submetidos à análise de normalidade pelo teste Shapiro-Wilk's. O número de parasitos presentes nas amostras de pele foi comparado pelo teste não paramétrico Kruskal-Wallis. Os pesos proporcionais dos linfonodos foram comparados por ANOVA de dois fatores e os pesos proporcionais dos baços foram comparados através do modelo GLM. O nível de significância (p) utilizado para os testes foi de 0,05.

4 Resultados

4.1 Avaliação da transmissão do *Trypanosoma rangeli* entre insetos através do comportamento de co-alimentação em pombos

A transmissão do parasito entre insetos foi avaliada a partir da alimentação de insetos infectados (doadores) e insetos não infectados (receptores) em pombos não infectados, sob diferentes condições. Quando a alimentação simultânea de um inseto doador e um receptor foi avaliada, observou-se que 16% dos insetos receptores apresentaram parasitos no trato intestinal (Fig. 3). Entretanto, quando a proporção inseto doador/receptor foi alterada para 1:5 e a distância entre eles aumentada, somente foi observada infecção naqueles insetos receptores que se alimentaram simultaneamente com o doador. Nesse caso, a taxa de infecção observada foi de 9% (Fig. 3). Quando os insetos receptores foram alimentados após 30 minutos ou 24 horas após o término da alimentação dos insetos doadores nos pombos não foi observada a infecção.

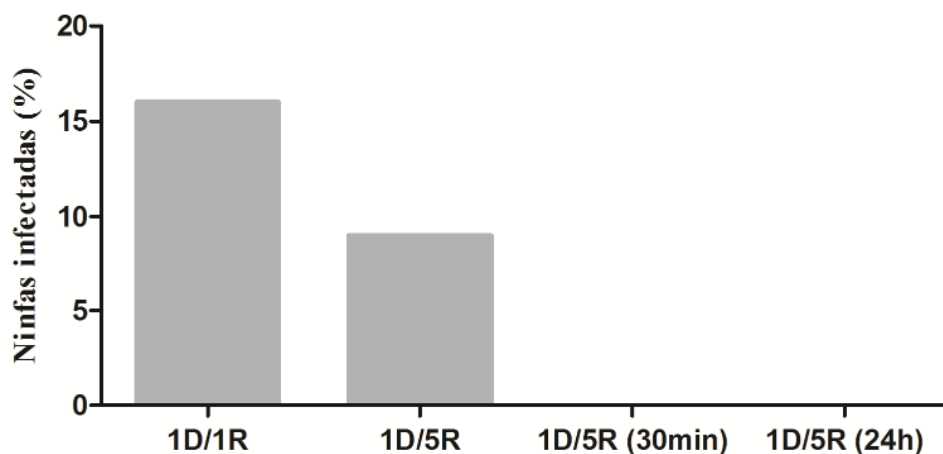


Figura 3. Taxas de infecção de ninfas de 5º estágio de *Rhodnius prolixus* que co-alimentaram com um co-específico infectado com *Trypanosoma rangeli* (D=doador; R=receptor; na condição 1D/5R a distância entre doador e receptores foi de 6cm). Foram realizadas cinco repetições para cada condição.

4.2. Avaliação da lise de formas tripomastigotas metacíclicas de *Trypanosoma rangeli* mediada pela ação do sistema complemento de pombos e camundongos

Para avaliar se o sistema complemento de pombos e camundongos é capaz de lisar as formas infectivas do *T. rangeli*, tripomastigotas metacíclicos foram incubados durante 30min com o soro inativado ou não desses animais. A incubação de tripomastigotas com soro não inativado de camundongo promoveu uma redução de 3%

no número inicial de parasitos (Fig. 4). Entretanto, quando os parasitos foram incubados com o soro não inativado de pombo, observou-se uma redução de 98% no número de parasitos (Fig. 4).

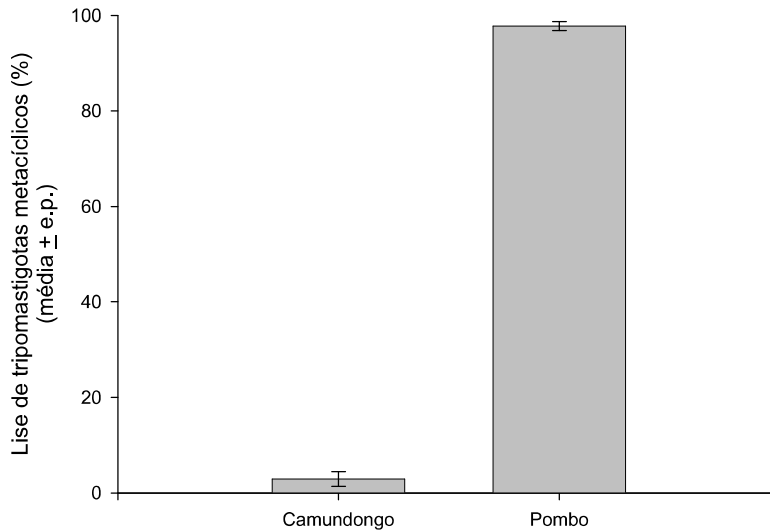


Figura 4. Lise de tripomastigotas metacíclicos de *T. rangeli* mediada pelo sistema complemento de camundongos e pombos. Os dados estão apresentados como a porcentagem de lise observada após incubação dos parasitos com soro não inativado por 30min (n=3).

4.3 Avaliação do estabelecimento da infecção por *Trypanosoma rangeli* a partir de parasitos liberados na pele de camundongos

Para avaliar se o *T. rangeli* é capaz de estabelecer uma infecção em camundongos a partir de parasitos liberados na pele (durante a fase de sondagem) e não na circulação sanguínea (fase de ingurgitamento), camundongos foram expostos à picada de triatomíneos infectados ou à deposição de tripomastigotas na pele previamente puncionada. Após sete dias, os animais foram submetidos a xenodiagnóstico para avaliar se houve o estabelecimento da infecção. O exame mostrou que 50% dos camundongos (n=12) previamente expostos ao parasito através da picada foram capazes de transmitir a infecção para triatomíneos não infectados (Fig. 5). As taxas de infecção para os animais expostos ao *T. rangeli* por deposição foram de 100% (n=10) (Fig. 5).

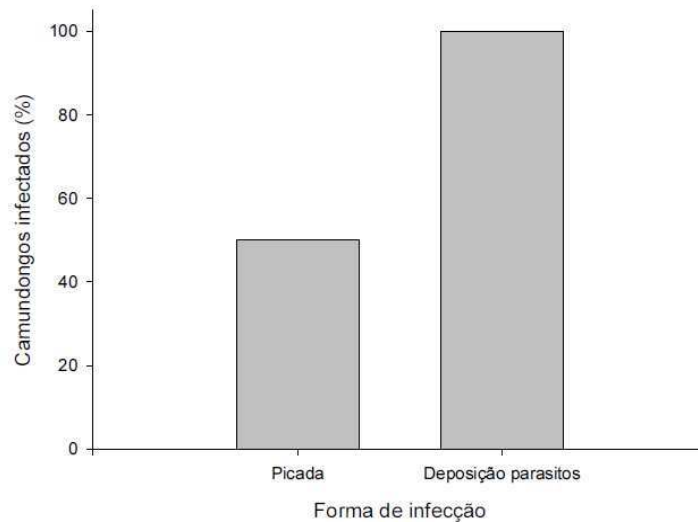


Figura 5. Taxas de infecção de camundongos que foram expostos ao *Trypanosoma rangeli*. Os animais foram expostos por picadas de ninfas de 5º estágio de *R. prolixus* infectadas (n=12) e por deposição de tripomastigotas metacíclicos na pele previamente puncionada (n=10).

4.4. Avaliação das alterações que ocorrem na pele de camundongos expostos ao *Trypanosoma rangeli*

Para avaliar as alterações que ocorrem na pele de camundongos expostos ao *T. rangeli*, os animais foram infectados por deposição de tripomastigotas metacíclicos na área central do abdômen previamente puncionado. Secções histológicas obtidas de animais controles que não foram submetidos a procedimentos de punção (Fig. 6A) ou infecção (Fig. 6B) apresentaram as camadas típicas da pele: a epiderme (e) caracterizada por um delgado epitélio estratificado queratinizado, não vascular; a derme (d) formada por tecido conjuntivo denso e irregular altamente vascularizado; e a hipoderme (h) caracterizada pela presença de uma grande quantidade de adipócitos uniloculares. Numerosos folículos pilosos (fp) foram observados, cujas grandes porções terminais estavam inseridas na derme e hipoderme. Também foram observadas numerosas glândulas sebáceas (s) associadas aos folículos pilosos (Fig. 6A). Secções histológicas de amostras controles puncionadas imediatamente após o procedimento (30min) também mostraram estruturas cutâneas típicas, não sendo observados infiltrados inflamatórios (Fig. 6B). A exposição de camundongos à picada de ninfas não infectadas mostrou pequenos focos inflamatórios concentrados na região da hipoderme 1d após a exposição (7A, B e C), com presença de células mononucleares (7B). Na pele dos animais que foram expostos a tripomastigotas metacíclicos imediatamente após o procedimento (30min) foram observados numerosos parasitos concentrados na região da

derme e principalmente na região da hipoderme (Fig. 6C, setas). Não foram observados infiltrados inflamatórios nesse período.

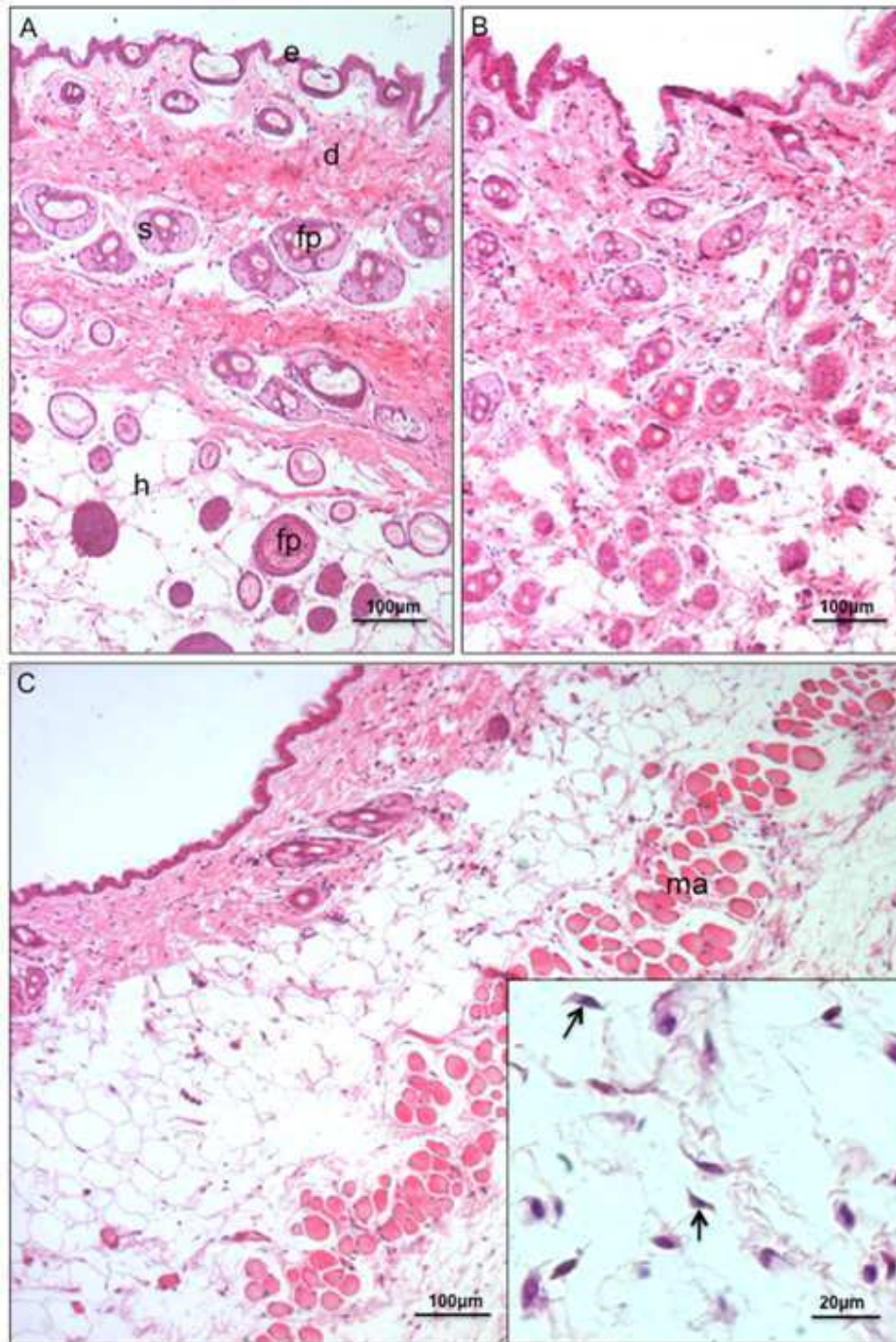


Figura 6. Fotomicrografias de secções histológicas coradas com HE de pele de camundongos imediatamente após a exposição (30min). Em ambos, pele controle (A) e pele controle puncionada e adicionada de meio M199 (30min; B), camadas típicas (e = epiderme, d = derme, h = hipoderme) e apêndices (fp = folículos pilosos; s = glândulas sebáceas). Nenhum infiltrado inflamatório foi observado em nenhum dos controles. Na pele de animais que foram expostos a tripomastigotas imediatamente após o procedimento (30min, C) numerosos parasitos concentrados na região da hipoderme (encarte, setas) podem ser observados. Infiltrados inflamatórios não foram observados

neste período. Parte da musculatura abdominal (m) também pode ser observada na secção.

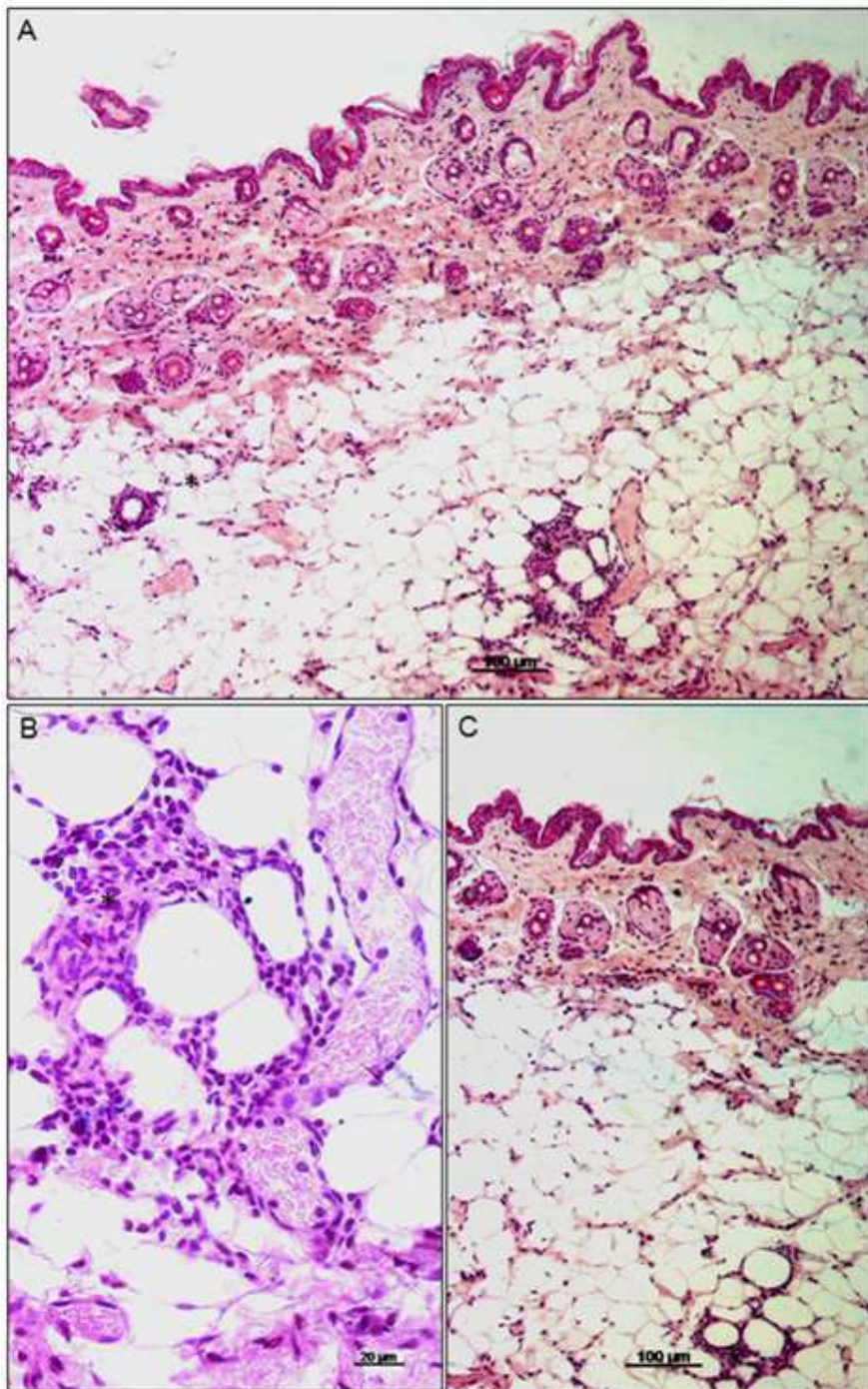


Figura 7. Fotomicrografias de secções histológicas coradas com HE de pele de camundongos submetidos à picada de insetos não infectados 1d após exposição. Em A, B e C, observam-se focos inflamatórios pontuais (asteriscos) na hipoderme dos animais 1d após exposição à saliva. É possível observar a presença de células mononucleares nos infiltrados (B).

Nas amostras de pele expostas ao meio M199, 12h após a punção foram identificados alguns focos inflamatórios pontuais na derme (Fig. 8A). Monócitos e linfócitos foram as células mais presentes. Os infiltrados inflamatórios foram muito reduzidos 1d após a exposição (Fig. 8C) e desapareceram nos períodos subsequentemente avaliados (Fig. 9A e 9C; 10A e 10C). Nas amostras expostas ao *T. rangeli* as formas tripomastigotas ainda eram observadas na derme e hipoderme 12h após a exposição, mas com menor frequência do que nas amostras de 30min. Além disso, a presença de parasitos induziu a formação de infiltrados inflamatórios proeminentes, localizados na derme e hipoderme e próximos ao local de inserção da agulha, onde também foi observado tecido fibroso cicatricial (Fig. 8B). Em relação às células presentes nos infiltrados inflamatórios, foi observado um número considerável de mastócitos e eosinófilos, bem como células mononucleares típicas (Fig. 8B). As secções histológicas das amostras obtidas 1d após a exposição também mostraram tripomastigotas na região da derme e da hipoderme, embora em uma densidade ainda menor do que aquela encontrada 12h após a exposição (Fig. 8D). O perfil inflamatório foi semelhante ao observado em 12h após a exposição, com presença de células mononucleares, eosinófilos e mastócitos (Fig. 8D). Além disso, o tecido fibroso cicatricial ainda era observado no local de inserção da agulha (Fig. 8D).

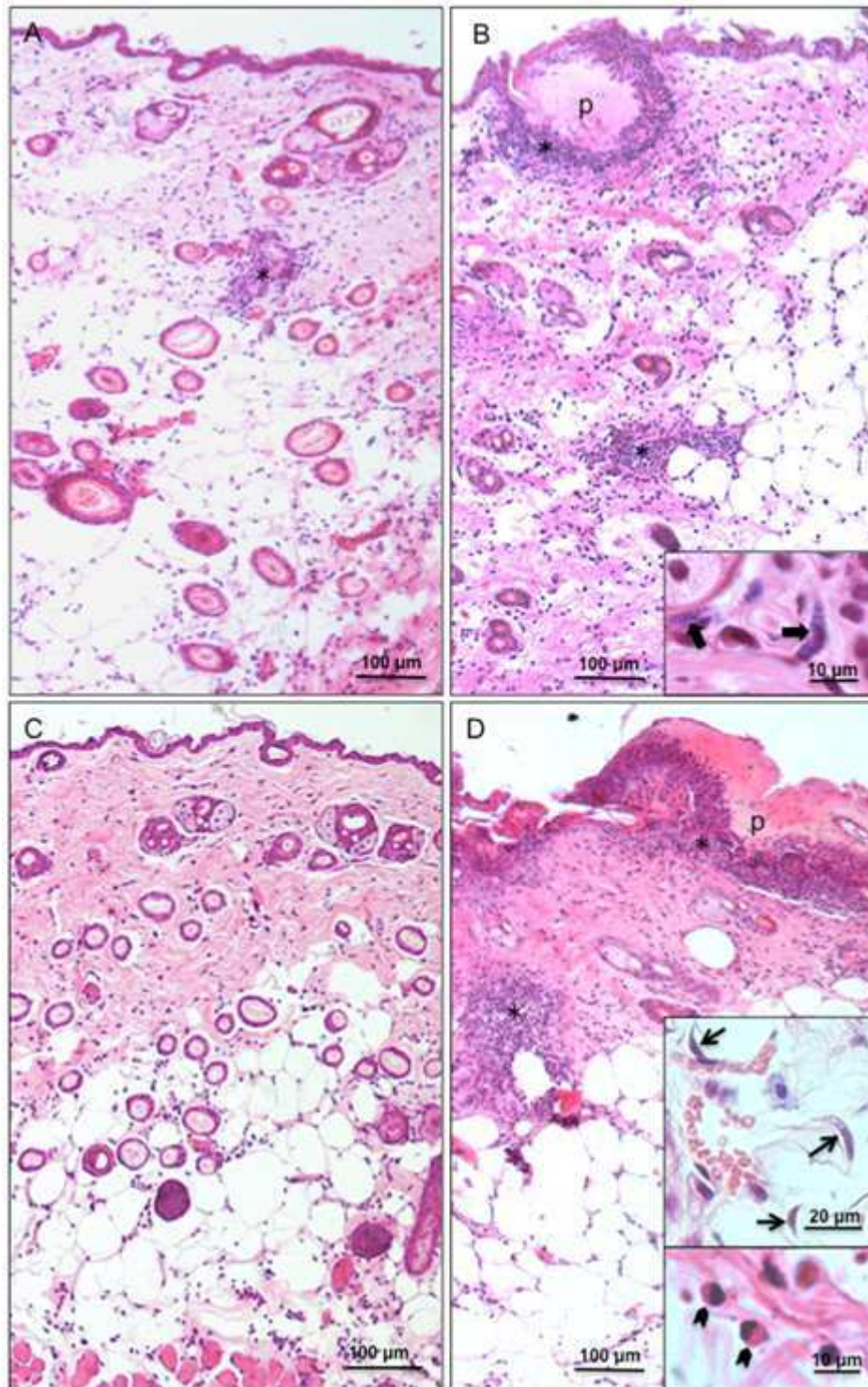


Figura 8. Fotomicrografias de secções histológicas coradas com HE de pele de camundongos em 12h e 1d após a exposição. Doze horas após a punção, em amostras expostas ao meio M199, pode-se observar focos inflamatórios pontuais, (asterisco) (A). Apenas focos inflamatórios raros é observada após 1d de exposição ao meio M199 (C). Importantes infiltrados inflamatórios, tanto difusos como focais (asteriscos), são observados na pele de animais expostos a tripomastigotas após 12h e 1d da exposição (B e D), destacando-se a presença de numerosos mastócitos (encarte em B, seta larga) e eosinófilos (encarte em D, ponta de seta), além de células mononucleares típicas. Os tripomastigotas ainda são visualizados na hipoderme 1d após a exposição (encarte em

D, setas). Nos dois períodos pós-exposição, focos inflamatórios intensos e formação de tecido fibroso cicatricial no local da punção ainda são observados (p).

Não foram observados parasitos nas secções de pele obtidas em 2d após a exposição. Entretanto, o processo inflamatório ainda era intenso e observado tanto na derme como na hipoderme, aparentemente abrangendo uma área maior quando comparado com as amostras de animais com 1d pós-exposição (Fig.9B). Secções obtidas de animais com 4 e 7d pós-exposição mostraram um processo inflamatório ainda mais intenso e amplo (tanto na derme como na hipoderme) quando comparado com a pele de animais obtidas em tempos de exposição anteriores (Fig. 9D e 10B). Não foram observadas diferenças aparentes entre estes dois tempos de exposição ao parasito. Também não foram encontrados infiltrados inflamatórios nas secções histológicas de amostras com 15d após a exposição (Fig. 10D).

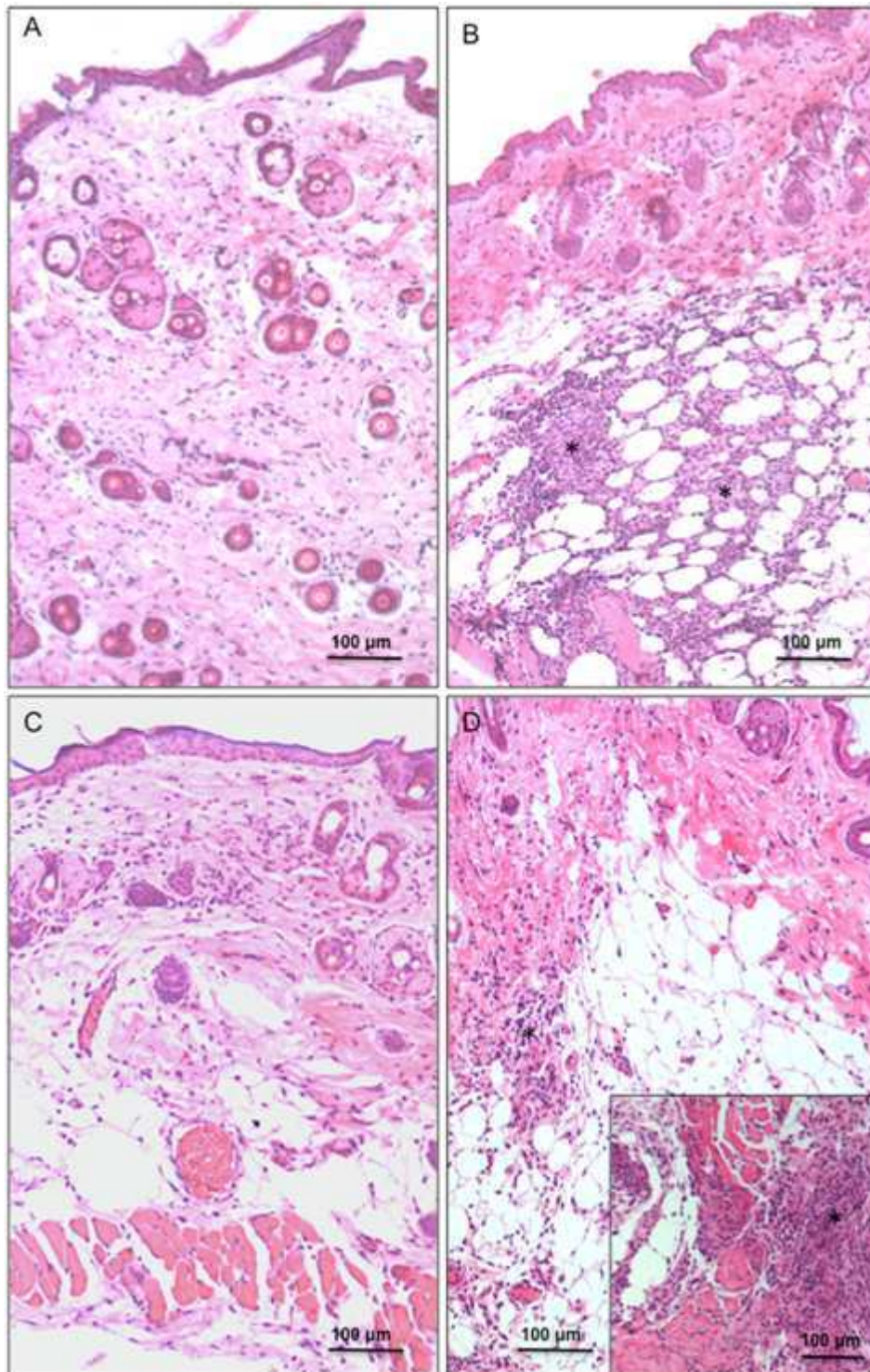


Figura 9. Fotomicrografias de secções histológicas coradas com HE de pele de camundongos em 2 e 4d após exposição. Não são observados infiltrados inflamatórios na pele de animais expostos ao meio M199 em dois (A) e quatro (C) dias após a exposição. Na pele de animais com 2d pós-exposição a tripomastigotas (B), embora não sejam observados mais parasitos, persiste o processo inflamatório (asteriscos), especialmente na região da hipoderme e mais intenso do que o observado em tempos anteriores de exposição. Em 4d após a exposição (D), o processo inflamatório se intensifica ainda mais, com grandes focos de células inflamatórias na hipoderme e derme (asteriscos, encarte em D).

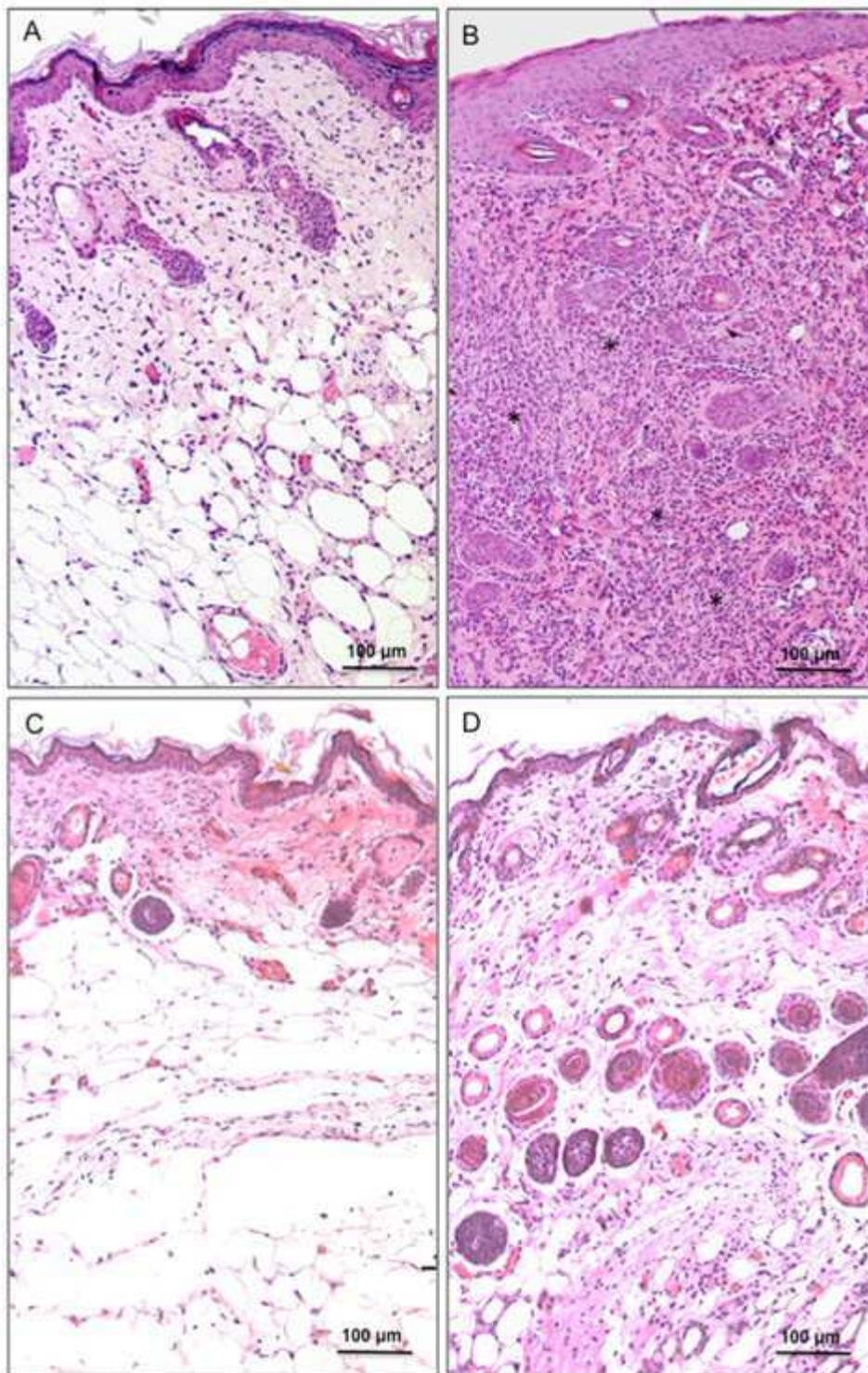


Figura 10. Fotomicrografias de secções histológicas coradas com HE de pele de camundongos em 7 e 15d após exposição. Não são identificados infiltrados inflamatórios na pele de animais expostos ao meio M199, tanto no 7 (A) quanto aos 15 (C) dias após a exposição. Na pele de animais expostos a tripomastigotas persiste inflamação intensa (asterisco) 7d após a exposição (B). Quinze dias após a exposição a tripomastigotas (D), não são observados processos inflamatórios importantes.

4.5 Rastreamento do DNA de *Trypanosoma rangeli* no sítio da picada em diferentes períodos após sua liberação

Para avaliar a presença de *T. rangeli* no sítio da picada, rastreamos o DNA do parasito através da qPCR em diferentes períodos após a picada de ninfas infectadas. Interessantemente, uma proporção dos parasitos injetados durante o período de sondagem parece permanecer na pele por vários dias (Fig. 11). Utilizando o par de iniciadores KMP84_F e KMP188_R, foi possível detectar a presença de DNA de *T. rangeli* até sete dias após a exposição (amostras de pelo menos seis animais foram avaliadas para cada dia). A porcentagem de amostras de pele positivas foi diferente ao longo do período avaliado, variando de menos de 20% no 4º dia pós-exposição, para mais de 70% nos períodos de 30min, 1º e 7º dias pós-exposição. Não foi observada amplificação em nove fragmentos de pele obtidos de diferentes camundongos aos 15 dias pós-exposição.

A quantificação do número de parasitos nas amostras nas quais o DNA do *T. rangeli* foi detectado mostrou uma redução média no número de parasitos nas primeiras 24h pós-exposição de aproximadamente 33%. No entanto, não foram encontradas diferenças significativas no número de parasitos quando comparados os diferentes períodos, provavelmente devido a elevada variabilidade observada nas amostras (Fig. 12, Kruskal-Wallis, ns.).

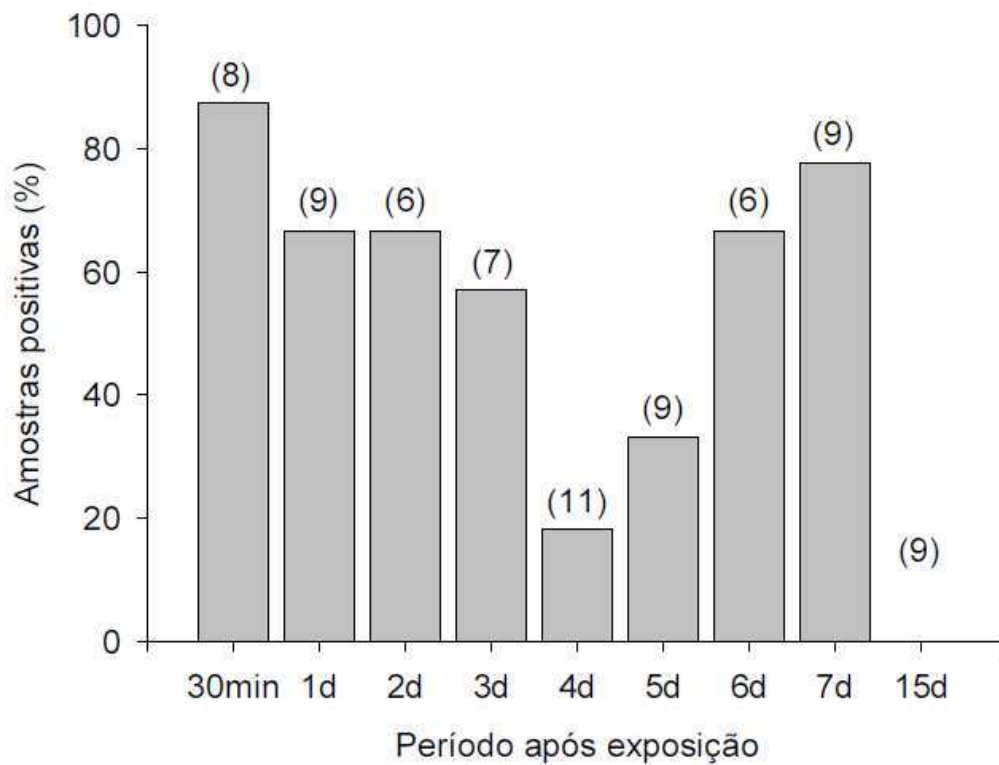


Figura 11. Porcentagem de amostras que apresentaram DNA de *Trypanosoma rangeli* em diferentes períodos pós-exposição. Os valores entre parênteses indicam o número de amostras analisadas para cada período.

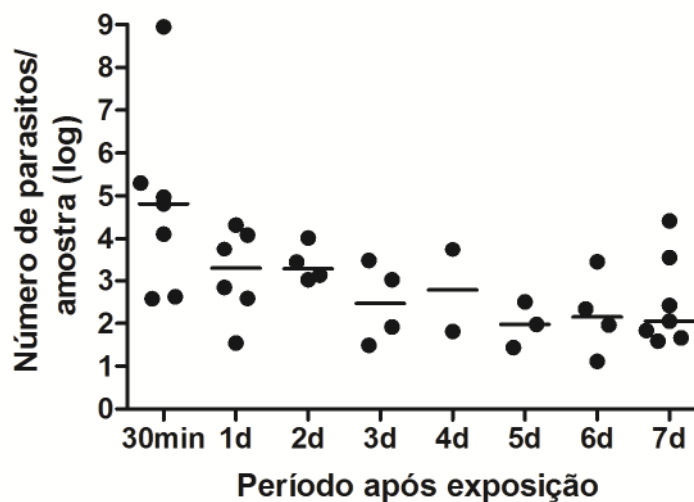


Figura 12. Quantificação de DNA de *Trypanosoma rangeli* em amostras de pele de camundongos infectados em diferentes períodos após a exposição. Cada ponto representa o número estimado de parasitos por cada amostra individual. As barras representam a mediana dos valores encontrados para cada período avaliado. O eixo Y mostra valores em escala logarítmica (Kruskal-Wallis, n.s.).

4.6 Rastreamento do DNA de *Trypanosoma rangeli* no sangue, linfonodos mesentéricos e baço de camundongos em diferentes períodos após a infecção

Assim como na pele, o DNA de *T. rangeli* foi rastreado por qPCR em amostras de sangue, linfonodos e baço de camundongos infectados em diferentes períodos pós-infecção. A presença de DNA do parasito foi detectada em amostras de sangue obtidas em todos os períodos avaliados (Fig. 13; os períodos de 12h e 1d não foram avaliados). Com exceção dos dias 7 e 15 pós-infecção, onde 80% das amostras foram positivas para a presença do DNA do parasito, o restante dos períodos tiveram 100% das amostras positivas (Fig. 13). No caso dos linfonodos mesentéricos, o DNA do parasito também foi detectado em todos os períodos avaliados. A porcentagem de amostras positivas se manteve entre 60 e 80% nos primeiros dois dias após a infecção. Uma redução na porcentagem foi observada no dia 4º dia pós-infecção (25%), e alcançou 100% nos períodos subsequentes, isto é, 7 e 15 dias pós-infecção (Fig. 13). As amostras de baço somente apresentaram DNA do *T. rangeli* nos dias 1, 7 e 15 pós-exposição com taxas de positividade de 20, 80 e 20%, respectivamente (Fig. 13).

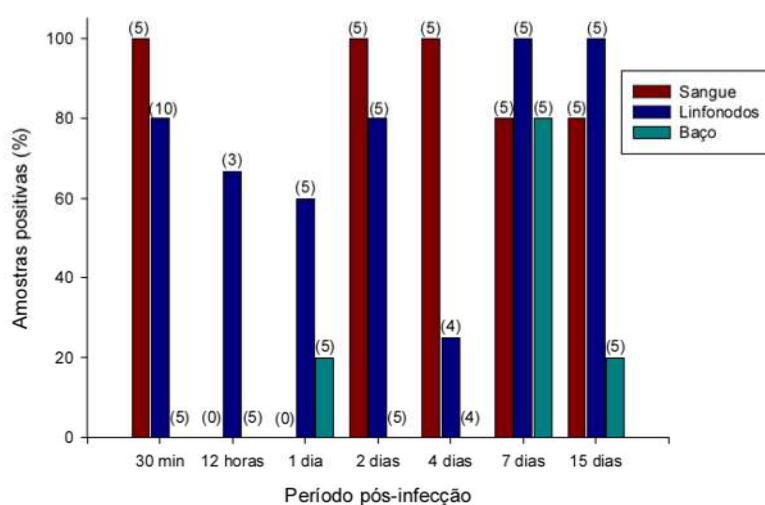


Figura 13. Porcentagem de amostras de sangue, linfonodos mesentéricos e baço que apresentaram DNA de *T. rangeli* durante diferentes períodos pós-infecção. O DNA do parasito foi amplificado por qPCR utilizando-se os iniciadores KMP84_F e KMP188_R. Os números em parênteses representam o número de amostras avaliadas para cada período.

A quantificação do número de parasitos presentes nas amostras de sangue, linfonodos e baço que foram positivas para a presença do DNA do *T. rangeli* mostrou variação na abundância de DNA ao longo do tempo (Fig. 14). Não foi possível analisar estatisticamente os dados, devido ao número reduzido de amostras positivas em alguns

períodos. Novos grupos estão sendo montados para aumentar o número de amostras e confirmar os resultados obtidos até o presente momento. Mesmo de forma preliminar, é possível observar um discreto aumento no número de parasitos nas amostras de sangue dois dias após a exposição (Fig. 14A). Com relação aos números de parasitos obtidos nas amostras de linfonodo, é possível observar uma redução na abundância nas 12h pós-exposição. Após esse período, os números se mantiveram constantes no restante dos períodos analisados (Fig. 14B). A abundância de parasitos nas poucas amostras positivas no baço foi semelhante à observada nas amostras de linfonodos (Fig. 14C). A figura 15 mostra os valores médios de abundância de parasitos nos três órgãos analisados nos diferentes períodos pós-exposição. É possível observar que os números médios de parasitos/mg de tecido dos linfonodos e do baço (nas amostras positivas) foram quase o dobro daqueles obtidos nas amostras de sangue (parasitos/ μ l).

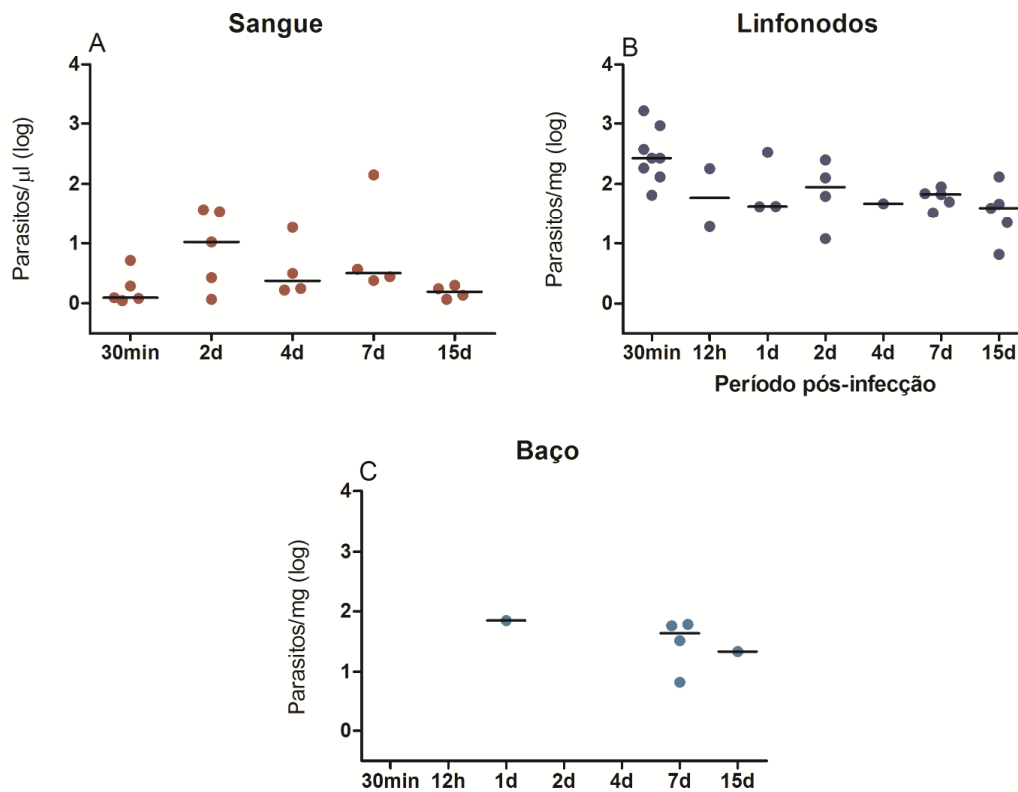


Figura 14. Quantificação do número de parasitos presentes em amostras de sangue (A), linfonodos mesentéricos (B) e baço (C) de camundongos infectados por *Trypanosoma rangeli* em diferentes períodos pós-infecção. Cada ponto representa o número estimado de parasitos em uma amostra. As barras representam a média dos valores encontrados para cada período avaliado. O eixo Y mostra valores em escala logarítmica.

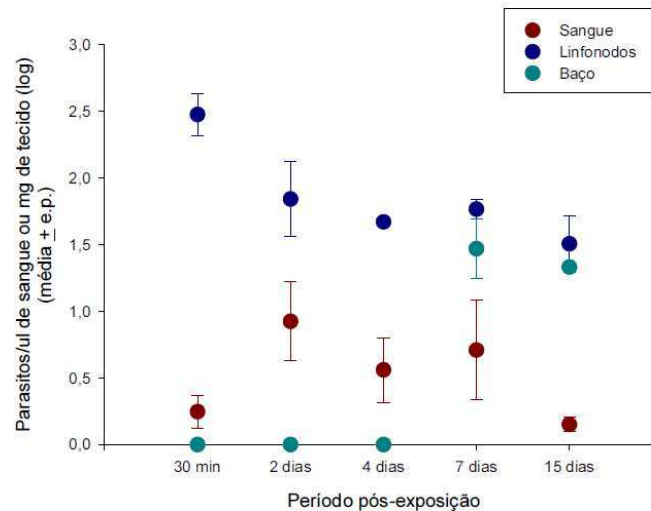


Figura 15. Abundância de parasitos presentes em amostras de sangue (círculos vermelhos), linfonodos mesentéricos (círculos azuis) e baço (círculos verdes) de camundongos infectados por *Trypanosoma rangeli* em diferentes períodos pós-infecção. Cada ponto representa a média do número estimado de parasitos por período. O eixo Y mostra valores em escala logarítmica.

4.7 Avaliação do efeito da infecção pelo *T. rangeli* nos pesos proporcionais dos linfonodos mesentéricos e dos baços em relação aos pesos dos camundongos

Durante a coleta dos órgãos para extração de DNA, observou-se um aparente aumento dos órgãos provenientes de animais infectados. Sendo assim, decidimos avaliar se a infecção promovia diferenças no peso dos linfonodos e do baço. Para isso, o peso do órgão normalizado pelo peso do animal foi comparado entre camundongos provenientes do mesmo lote de animais infectados ou não pelo parasito. A análise mostrou que o peso dos linfonodos mesentéricos do grupo infectado apresentou um aumento significativo em comparação ao peso dos linfonodos do grupo controle (Fig. 16; ANOVA, $p=0,0003$). Entretanto, não foram observadas diferenças significativas quando os pesos do órgão foram comparados entre os diferentes períodos analisados (ANOVA, n.s.). Já a análise dos pesos proporcionais do baço mostrou um efeito da infecção (Fig. 17; GLM, $p=0,01$) que foi dependente do tempo (Fig. 18; GLM, 2d=n.s., 4d=n.s., 7d=0,06, 15d=0,0013).

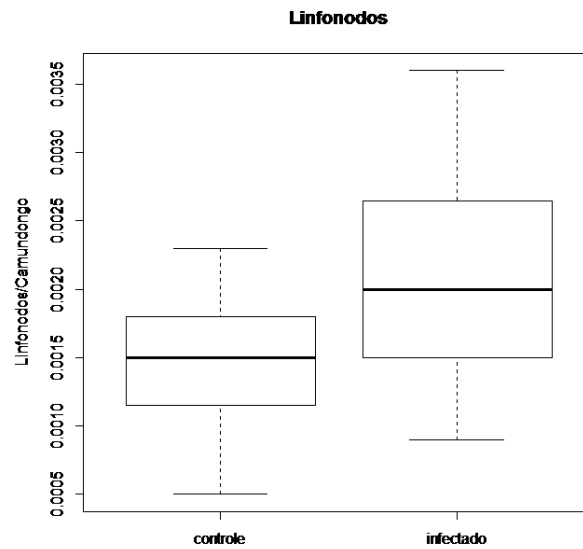


Figura 16. Pesos proporcionais (g) dos linfonodos mesentéricos de camundongos infectados ou não por *Trypanosoma rangeli* (ANOVA, $p=0,0003$). As linhas em negrito representam a mediana que encontra-se entre o primeiro e o terceiro quartil; as linhas pontilhadas representam os limites superior e inferior, respectivamente.

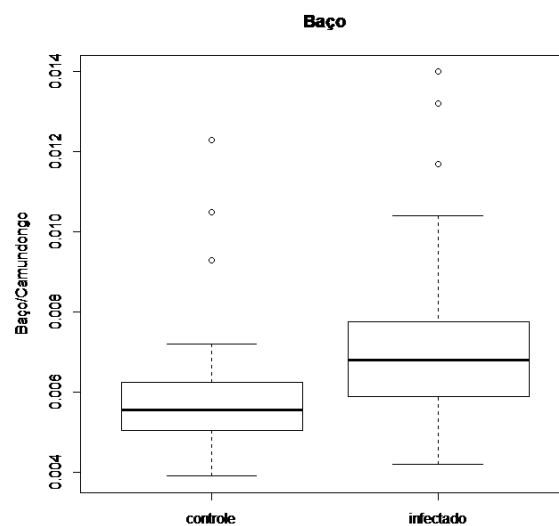


Figura 17. Pesos proporcionais (g) do baços de camundongos infectados ou não por *Trypanosoma rangeli* (GLM, $p=0,01$). As linhas em negrito representam a mediana que encontra-se entre o primeiro e o terceiro quartil; as linhas pontilhadas representam os limites superior e inferior, respectivamente. Os círculos representam os outliers.

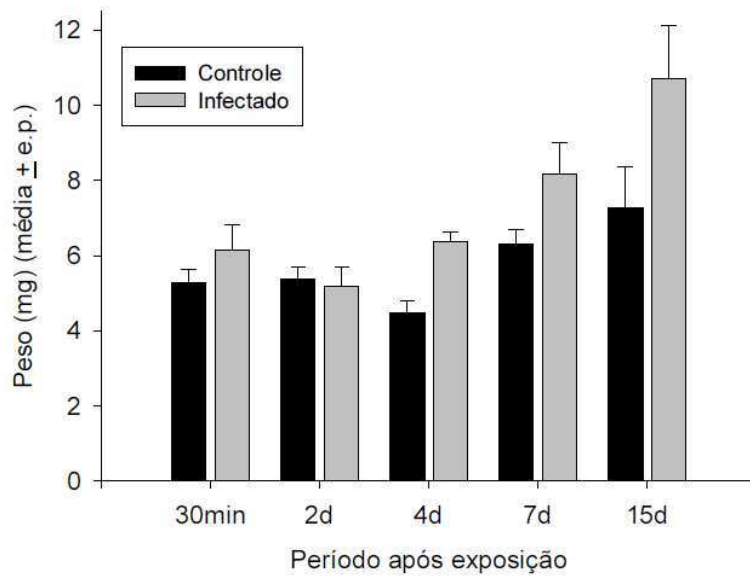


Figura 18. Pesos proporcionais do baços de camundongos infectados ou não por *Trypanosoma rangeli* em diferentes períodos após a exposição (GLM, 2, 4 e 7 d.p.i, $p=n.s.$; 15 d.p.i, $p=0,02$).

5 Discussão

A transmissão de patógenos entre artrópodes infectados e não infectados via co-alimentação em um vertebrado não infectado tem sido descrita em diversas espécies como, por exemplo, a transmissão de vírus e bactérias entre carrapatos (Randolph et al., 1996; Lawrie et al., 2004; Randolph, 2011), e o vírus da estomatite vesicular transmitido entre moscas pretas (Mead et al., 2000). Recentemente, nós demonstramos que a transmissão de *T. rangeli* através do comportamento de co-alimentação de ninfas de *R. prolixus* em camundongos é uma forma eficiente do parasito ser transmitido entre co-específicos (Ferreira et al., 2015). No presente estudo, demonstramos pela primeira vez que aves podem participar do ciclo de transmissão do *T. rangeli* através do comportamento de co-alimentação. Os resultados mostraram que quando insetos infectados co-alimentaram em pombos com co-específicos saudáveis, os insetos saudáveis adquiriram a infecção em taxas de 9 - 16%, de acordo com a proximidade dos dois insetos. Entretanto, quando os insetos saudáveis se alimentaram no pombo após o término da alimentação do inseto infectado, a transmissão do parasito não foi mais observada. As condições refratárias do sangue de aves para tripanosomas do clado de *T. rangeli* são bastante conhecidas, devido a ação do sistema complemento que lisa as formas infectivas (Dias, 1944; Kierszenbaum et al. 1976; Mintergoedbloed et al., 1981) e tem um papel relevante na imunidade inata, atuando como uma das primeiras barreiras contra patógenos. Estudos utilizando epimastigotas de cultura de *T. rangeli* demonstraram que estas formas são resistentes à lise mediada pelo complemento de várias espécies de mamíferos (Schottelius et al., 1986; Acosta et al., 1991; Steindel et al., 1991), mas suscetíveis ao soro fresco de galinhas (Schottelius et al., 1986). De nosso conhecimento, até o presente momento nenhum estudo avaliou a suscetibilidade das formas tripomastigotas metacíclicas de *T. rangeli* ao sistema complemento. Sendo assim, nós incubamos estas formas com soro não inativado de camundongos e pombos. Os resultados mostraram que da mesma forma que o observado para as formas epimastigotas, os tripomastigotas metacíclicos foram lisados pelo soro de pombo, mas não pelo soro de camundongo. Entretanto, nossos resultados mostraram transmissão do parasito entre insetos durante a co-alimentação em pombos, quando estes foram utilizados como fonte alimentar, mesmo que numa taxa inferior do que aquela observada quando camundongos foram usados como fonte de alimentação (Ferreira et al., 2015). Este encontro surpreendente sugere a possibilidade que dentre os milhares de

parasitos liberados por um triatomíneo infectado durante sua alimentação, alguns possam ser ingeridos ainda vivos por um co-específico antes da ação do complemento. Uma vez dentro do trato intestinal do inseto, os parasitos estariam protegidos por proteínas secretadas na saliva e no conteúdo intestinal dos triatomíneos que agem como inibidores de complemento e protegem o epitélio intestinal de injúrias (Barros et al., 2009; Soares et al., 2012). Uma vez que as espécies do gênero *Rhodnius* são normalmente encontradas associadas a ninhos de aves (Teixeira et al., 2001; Dias et al., 2008) a descoberta que aves podem permitir a transferência de parasitos entre insetos de uma colônia abre uma nova gama de estudos ecológicos e epidemiológicos sobre a transmissão do *T. rangeli*.

A resistência das formas tripomastigotas metacíclicas do *T. rangeli* ao sistema complemento de mamíferos pode ser um fator importante que permite ao parasito o início do estabelecimento da infecção nesse grupo de vertebrados. Como mencionado anteriormente, o ciclo do *T. rangeli* no hospedeiro vertebrado ainda não é conhecido, particularmente no que se refere aos seus locais de multiplicação. Apesar de diversos órgãos terem sido estudados (Herbig-Sandreuter, 1957; Scorza et al., 1986; Urdaneta-Morales e Tejero, 1986), a pele, que é o local pelo qual o parasito inicia a entrada no hospedeiro vertebrado, até o momento não foi avaliada. Sendo assim, um dos objetivos do presente estudo foi avaliar este órgão durante os períodos iniciais da infecção. Como já mencionado, a saliva dos triatomíneos é inoculada na pele durante o período de sondagem (Soares et al., 2006) e com ela provavelmente deve chegar uma proporção significativa dos cerca de 50.000 parasitos liberados durante o processo de ingestão (Ferreira et al., 2015). Inicialmente, nós tentamos avaliar se o *T. rangeli* liberado apenas na pele, ao invés de ter sido injetado dentro de vasos sanguíneos, também poderia estabelecer uma infecção. Para isso, camundongos foram expostos a picadas de ninfas infectadas, que foram regularmente interrompidas para evitar a canulação de vasos. Adicionalmente, a pele de camundongos foi diretamente exposta a tripomastigotas metacíclicos, que foram liberados após punção superficial da área. Os camundongos foram posteriormente submetidos a xenodiagnóstico que mostrou que somente metade dos camundongos expostos a ninfas infectadas desenvolveu a infecção quando os insetos foram impedidos de se alimentar. É importante mencionar que as taxas de infecção quando os insetos completam o processo alimentar nesse modelo são próximas de 90% (Ferreira et al., 2015). Isto parece sugerir que alcançar a circulação é relevante para que o parasito chegue até o local onde a multiplicação ocorre, o que poderia ter

acontecido naqueles casos em que os camundongos se infectaram. O aumento das taxas de infecção para 100% quando *T. rangeli* foi liberado diretamente na pele após punção superficial poderia ser devido a rupturas na microcirculação durante o procedimento associado a uma maior quantidade de parasitos liberados.

Ao avaliarmos a presença de parasitos em secções histológicas de pele infectada, somente foi possível detectá-los em amostras coletadas nas primeiras 24 horas após a exposição. Todos os parasitos encontrados durante este período foram extracelulares e puderam ser vistos livres na derme, e principalmente na hipoderme. Também não foram observados parasitos em processo de multiplicação. Apesar da ausência de visualização do *T. rangeli* depois do primeiro dia da exposição, uma indicação indireta da sua presença na pele foi a identificação de infiltrados inflamatórios importantes observados a partir de 12 horas até sete dias após a exposição. A acentuada presença de eosinófilos e mastócitos no local da inflamação pode estar provavelmente relacionada à eliminação dos parasitos da pele. Infiltrados inflamatórios com recrutamento destes tipos celulares são frequentemente observados em infecções por protozoários e têm sido relacionados ao controle da parasitemia pelo hospedeiro vertebrado. Por exemplo, camundongos infectados experimentalmente com *Leishmania mexicana mexicana*, apresentaram um recrutamento progressivo de eosinófilos e neutrófilos 72 horas após a infecção (Grimaldi e Pamela, 1984). Bovinos e búfalos expostos a picadas de moscas tsé-tsé infectadas com *T. brucei*, foram analisados quanto ao perfil das células presentes nos infiltrados inflamatórios (Grootenhuis et al. 1990). A diminuição da parasitemia e da patologia da doença observada nos búfalos em relação aos bovinos foi relacionada com a eosinofilia presente nos búfalos (Grootenhuis et al. 1990). Um aumento do número de eosinófilos observado no sangue periférico de camundongos infectados com formas tripomastigotas metacíclicos do *T. cruzi* também foi relacionado ao controle da parasitemia (Vieira et al., 2012).

O recrutamento de células do sistema imunológico para a pele do hospedeiro pode ocorrer não somente em resposta à invasão por patógenos, mas também como resultado da lesão física causada por artrópodes hematófagos durante a alimentação de sangue. Os artrópodes hematófagos usam diferentes estratégias para retirar sangue de seus hospedeiros vertebrados. Enquanto algumas espécies retiram sangue a partir de um poço hemorrágico formado na pele, outras o obtêm diretamente dos vasos do hospedeiro (Lavoipierre et al., 1959, Daniel et al., 1983, Lehane, 2005). Em comum, todos os artrópodes hematófagos secretam uma saliva composta por um coquetel de proteínas

que interfere nos processos hemostáticos desencadeados durante a alimentação, que inclui anticoagulantes, anestésicos, vasodilatadores e imunomoduladores (revisado por Ribeiro et al., 1998). Além de auxiliar na manutenção de um fluxo sanguíneo contínuo durante o período da ingestão, estas moléculas podem também recrutar células do sistema imunológico do hospedeiro (Nascimento et al., 2001; Andrade et al., 2005, Mesquita 2008). Por exemplo, camundongos expostos a picadas de *Anopheles gambiae* não infectados, apresentaram no local da picada diferentes tipos celulares, como neutrófilos, eosinófilos, macrófagos e mastócitos, três horas após a exposição ao mosquito (Choumet et al., 2012). A saliva foi identificada na pele dos animais por até 18 horas após a alimentação. Quando os mosquitos foram infectados com *Plasmodium berghei*, a presença dos esporozoítos promoveu uma diminuição na quantidade de células imunomoduladoras associadas à saliva (Choumet et al., 2012). No presente estudo, não podemos excluir que nas primeiras horas da infecção por *T. rangeli*, algumas células tenham sido recrutadas para o sítio de infecção em consequência da saliva presente no extrato depositado na pele do camundongo. Entretanto, os perfis de células encontradas nos locais expostos à saliva de triatomíneos não infectados que realizaram sondagem na pele de camundongos foi diferente daquele observado em amostras com a presença do *T. rangeli*, com monócitos e linfócitos como as principais células recrutadas. No presente estudo, a inflamação difusa observada depois do segundo dia de exposição foi provavelmente promovida pela presença do *T. rangeli*, já que ela não foi observada em amostras controle (pele exposta ao meio de cultura ou picadas de insetos não infectados), onde somente focos inflamatórios pontuais foram encontrados. O perfil das células recrutadas provavelmente depende também da espécie de triatomíneo, uma vez que os componentes da saliva variam entre os diferentes grupos (Ribeiro et al., 1998). A saliva de *Triatoma dimidiata*, por exemplo, induz a formação de um infiltrado composto por neutrófilos e eosinófilos. Esse perfil se altera, com a presença de macrófagos e neutrófilos quando fezes de *T. cruzi* são adicionadas ao inóculo (Monteon et al., 2016). É importante mencionar que a infecção pelo *T. rangeli* reduz em aproximadamente 50% as proteínas estocadas nas glândulas salivares de *R. prolixus* (Paim et al., 2013), diminuindo assim a quantidade de componentes salivares liberada durante a alimentação do inseto, o que poderia ter reduzido o efeito do recrutamento celular como resultado de deposição de saliva.

O *T. rangeli* somente foi visualizado nas secções histológicas nas primeiras 24 horas de infecção. Entretanto a persistência de infiltrados inflamatórios sugeria a

presença do parasito na pele. Sendo assim, o DNA do parasito foi então rastreado na pele dos camundongos em diferentes períodos após a exposição. De acordo com nossos resultados, foi possível mostrar pela primeira vez a presença de DNA de *T. rangeli* na pele de um mamífero por um período de sete dias, nos mesmos períodos em que os infiltrados inflamatórios foram observados. Uma redução considerável no número de parasitos foi observada nas primeiras 24h após a exposição, mas os parasitos que permaneceram no local de inoculação puderam ainda ser detectados por mais seis dias. Vale ressaltar que o material nuclear de organismos eliminados por drogas ou respostas imunológicas é rapidamente eliminado (~48h) da circulação (Jarra e Snounou, 1998) o que indica a presença de parasitos viáveis nas detecções. A proporção de camundongos em que o DNA do *T. rangeli* foi detectado variou durante o período avaliado. Particularmente, encontramos uma baixa porcentagem de animais com amostras positivas no quarto e quinto dias após a exposição. Cabe salientar, que os resultados são representativos de experimentos realizados em quatro diferentes momentos, com diferentes amostras de camundongos, insetos e parasitos. Interessantemente, esse período corresponde ao pico de parasitemia observado em camundongos experimentalmente infectados (Molyneux, 1973; Urdaneta-Morales e Tejero, 1986; Zuñiga et al., 1997). Estudos adicionais, que envolvam a avaliação da ativação da resposta imune do hospedeiro são necessários para uma melhor compreensão desses resultados.

A presença de protozoários na pele do hospedeiro durante períodos transitórios tem sido relatada por diversos autores (Sidjanski et al., 1997; Amino et al., 2006; Kebaier et al., 2009; Gueirard et al., 2010; Caljon et al., 2016). Sidjanski e colaboradores (1997) infectaram camundongos Balb/c através da picada de *Anopheles stephensi* infectados com *Plasmodium yoelii*. Os autores demonstraram que parte dos esporozoítos que foram liberados no sítio da infecção permanece na pele do hospedeiro por pelo menos cinco minutos. Além disso, observaram que em cerca de 15min, parte dos esporozoítos antes presentes na pele deixaram o sítio da infecção e migraram para a circulação do hospedeiro (Sidjanski et al., 1997). Em outro trabalho, Amino e colaboradores (2006) demonstraram que mais da metade dos esporozoítos de *Plasmodium berguei* liberados por *A. stephensi* na orelha de camundongos permaneceu no sítio da inoculação por 1h após a exposição. Resultados similares foram descritos por Kebaier e colaboradores (2009), onde observou-se que em média 40% dos esporozoítos liberados por mosquitos infectados na pele de camundongos permaneceram no local por

até 6h após a infecção. Gueirard e colaboradores (2010) mostraram que logo após a picada, aproximadamente 50% dos parasitos permaneceram no sítio da infecção. Destes, aproximadamente 10% ainda estavam na pele 24h após a infecção. Além disso, os parasitos foram encontrados na derme e em associação a folículos pilosos (sítio considerado imuno-privilegiado), se desenvolvendo em formas semelhantes a merozoítos capazes de infectar eritrócitos (Gueirard et al., 2010). Os autores sugerem que nesse caso, a pele poderia servir como um potencial reservatório secundário de merozoítos infecciosos, e/ou poderia funcionar como fonte de surtos de infecção, como no caso dos hipnozoítos de *P. vivax* (Cogswell, 1992; Gueirard et al., 2010). Recentemente, um estudo com *T. brucei*, um modelo mais próximo do *T. rangeli*, também demonstrou a permanência de parasitos na pele após serem liberados pelos seus vetores durante alimentação em orelhas de camundongos (Caljon et al., 2016). Nesse estudo, os autores infectaram camundongos, coletaram o local da picada nos tempos 4, 5, 18, 42, 66 e 90 horas pós-infecção e verificaram que os parasitos não só permaneceram no local da picada nos períodos de 4, 5, 18, e 66 horas pós-infecção, como iniciaram uma fase de multiplicação associados aos adipócitos na derme (Caljon et al., 2016). Os autores sugeriram que a presença dos parasitos na pele pode funcionar como uma fonte de infecção para moscas tsé-tsé durante a infecção aguda (Caljon et al., 2016).

Uma vez que nossos resultados indicam que o *T. rangeli* parece não permanecer na pele do hospedeiro mamífero por mais de sete dias, quais seriam os outros locais do corpo, que poderiam atuar como destino dos parasitos durante o início da infecção? O sangue é sabidamente um local de destino do parasito no começo da infecção, tendo sido avaliado por diferentes autores (Molyneux, 1973; Urdaneta-Morales e Tejero, 1985; Zuñiga et al., 1997). No presente estudo, nós rastreamos o DNA do parasito no sangue de camundongos em diferentes períodos após a alimentação de insetos infectados e, corroborando com a literatura, o parasito foi detectado no sangue de mais de 80% das amostras durante as duas semanas de investigação. A abundância de parasitos se manteve baixa durante todo o período, com exceção do segundo dia onde foi possível observar um discreto aumento na quantidade de DNA detectada, o que também está de acordo com os dados da literatura (Molyneux, 1973; Urdaneta-Morales e Tejero, 1985; Zuñiga et al., 1997). Entretanto, devido à variabilidade dos dados associada a um número reduzido de animais avaliados, um aumento no número de amostras se torna necessário para confirmar essas afirmações. Apesar disso, já é

possível sugerir que o parasito mantém uma população basal na circulação, o que garantiria a sua transmissão ao hospedeiro invertebrado, como já demonstrado através de xenodiagnóstico (Añez, 1985; Ferreira et al., 2015).

O sistema linfático é possivelmente um dos primeiros locais a entrar em contato com patógenos liberados na derme, já que é responsável por drenar o excesso de fluidos intersticiais para o sistema circulatório. No caminho, o fluido atravessa os linfonodos cuja função é a remoção de debris e de patógenos da linfa, antes da mesma atingir a circulação sanguínea. O linfonodo também é um sítio de respostas imune adaptativas mediadas por células T, células B e células acessórias (Abbas et al., 2015). No presente estudo, nós quantificamos o DNA de *T. rangeli* nos linfonodos mesentéricos de camundongos que foram expostos ao parasito na região central do abdômen. Apesar do número pequeno de amostras avaliadas, o que não permitiu uma análise estatística dos dados, foi possível observar um número relativamente elevado de parasitos nos linfonodos imediatamente após o término da alimentação. Provavelmente estes parasitos foram drenados juntamente com a saliva liberada na derme do animal durante o período de sondagem. Interessantemente, uma abundância considerável de parasitos se manteve durante todo o período de avaliação. Mais ainda, os dados de qPCR mostraram um aumento de amostras positivas ao logo do período, sendo que ao final dos quinze dias todas as amostras de linfonodo continham DNA de *T. rangeli*. Um aumento no tamanho do órgão de animais infectados também foi observado em comparação com animais do mesmo lote não submetidos a picadas de insetos infectados. Os dados obtidos até o momento são insuficientes para afirmar que o parasito esteja se mantendo no linfonodo. Entretanto, o órgão se torna um candidato promissor como local de multiplicação do *T. rangeli*. O encontro de outros parasitos nos linfonodos ou na linfa de animais infectados já foi descrito por diversos autores (Laveran et al., 1907; Barry et al., 1984; Martinez et al., 1985; Ahmed et al., 2003; Caljon et al., 2016). Barry e colaboradores (1984) detectaram *T. brucei* na circulação linfática de cabras cerca de um dia e meio após os animais seres picados por moscas tsé-tsé infectadas. Caljon e colaboradores (2016) detectaram o parasito em nódulos linfáticos 18 horas após a sondagem de moscas infectadas na pele de camundongos. Ahmed e colaboradores (2003) avaliaram os linfonodos, o baço e o fígado de roedores infectados por *L. infantum* durante 12 semanas de infecção. Os autores verificaram que a carga parasitária presente nos linfonodos foi inicialmente inferior a do fígado, mas se reverteu ao longo do tempo. Os linfonodos apresentaram-se parasitados por 12 semanas sugerindo que o órgão poderia

estar funcionando como um local de manutenção da infecção pela *L. infantum* (Ahmed et al., 2003). Giunchetti e colaboradores (2008) estudaram o efeito da infecção por *L. chagasi* em linfonodos do poplíteo de cães com leishmaniose visceral. Os autores mostraram que os linfonodos apresentavam uma desorganização na arquitetura do órgão, com substituição de linfócitos e estruturas foliculares por macrófagos parasitados por *L. chagasi*.

Em adição aos linfonodos, o baço é outro importante órgão linfoide secundário, que realiza a remoção de patógenos e debris celulares do sangue circulante (Benjamini et al., 2002; Hall, 2011). Além disso, é o principal responsável pela síntese e liberação de anticorpos na circulação sanguínea do organismo (Benjamini et al., 2002; Hall, 2011). Diferentemente do observado no linfonodo, nossos resultados mostraram uma detecção pontual de parasitos no baço, com exceção do sétimo dia, onde 80% das amostras foram positivas para o *T. rangeli*. Interessantemente, as amostras positivas do sétimo dia pós-exposição apresentaram abundâncias semelhantes às encontradas no linfonodo. Em adição, os baços de animais infectados aumentaram significativamente em relação aos de animais não infectados, o aumento tendo sido proporcional ao tempo de infecção. A ativação de resposta imune humoral com a produção de anticorpos durante a infecção por *T. rangeli* tem sido amplamente descrita na literatura (Anthony et al., 1979; Schotelius, 1987; Basso et al., 1991; 2007; 2008; Moraes et al., 2008; Marini et al., 2011). É possível que esse aumento no peso do órgão possa estar relacionado à ativação da resposta imune adquirida, com a produção e expansão clonal de linfócitos B e de outras células do sistema imune (Benjamini et al., 2002; Abbas et al., 2015). Estudos adicionais são necessários para se investigar o papel do baço na infecção por *T. rangeli*, particularmente no que diz respeito às taxas de infecção observadas no sétimo dia pós-exposição. A presença de parasitos no baço de animais infectados já foi descrita para infecções por *Leishmania* (Laveran et al., 1907; Wilson et al., 2005; Bankoti et al., 2012; Calvo-Álvarez et al., 2015). Uma das principais alterações patológicas observadas na fase crônica da leishmaniose visceral é a esplenomegalia que parece ser promovida pela presença de células parasitadas, bem como pela resposta imunológica do órgão ao parasitismo (Laveran et al., 1907; Ahmed et al., 2003; Wilson et al., 2005; Bankoti et al., 2012; Calvo-Álvarez et al., 2015).

Com base nos nossos resultados do estudo da fase inicial da infecção por *T. rangeli* em camundongos, é possível sugerir que parte das formas de *T. rangeli* liberadas durante a fase de sondagem parece ser drenada para os linfonodos. Como o

parasito não é lisado pelo sistema complemento de camundongos, uma proporção da população permanece na pele por até uma semana e aparentemente parece ser eliminada/reduzida pelas células do sistema imune, em consequência do seu recrutamento ao sítio da picada. É possível também que parte dos parasitos que se mantêm na pele continue a ser drenado para os capilares linfáticos, o que justificaria o encontro de parasitos nos linfonodos nos diferentes períodos analisados. Entretanto, a detecção de parasitos nos linfonodos 15 dias pós-exposição parece sugerir que o parasito se mantêm nesse órgão, já que nesse período o mesmo não é mais detectado na pele. Da mesma forma, os parasitos poderiam migrar para o sistema sanguíneo e retornar posteriormente aos linfonodos. O parasito se mantêm circulando no sangue em quantidades reduzidas desde o momento da alimentação, o que garante sua transmissão para os hospedeiros invertebrados. O encontro de *T. rangeli* no baço, particularmente no sétimo dia pós-exposição, poderia estar relacionado com alguma fase de multiplicação do parasito e estudos adicionais são necessários para uma investigação mais detalhada desse fato. Sendo assim, novos grupos experimentais estão sendo montados para confirmar os resultados obtidos no presente estudo. Além disso, experimentos adicionais que incluem análise de cultura primária proveniente da dissociação de linfonodos e estudos de microscopia confocal estão sendo desenvolvidos para avaliar o papel desse órgão na manutenção da infecção por *T. rangeli*.

6 Conclusões

1. Mesmo não sendo susceptíveis à infecção por *T. rangeli*, as aves podem participar do processo de transmissão do *T. rangeli*, quando são fontes de alimentação simultânea para insetos infectados e não infectados.
2. As formas tripomastigotas metacíclicas de *T. rangeli* são suscetíveis à lise pelo sistema complemento de pombos, mas resistentes ao de camundongos.
3. A presença do *T. rangeli* na pele dos camundongos promoveu o aparecimento de infiltrados inflamatórios com recrutamento de células do sistema imunológico.
4. O *T. rangeli* foi detectado na pele de camundongos até sete dias após o início da infecção.
5. O *T. rangeli* se manteve em número reduzido na circulação sanguínea dos camundongos durante todo o período avaliado.
6. O parasito foi detectado em quantidades consideráveis nos linfonodos mesentéricos dos camundongos durante todo o período avaliado, o que sugere que o órgão possa funcionar como local de manutenção do parasito.
7. O encontro de parasitos no baço, particularmente no sétimo dia pós-exposição necessita de estudos adicionais para uma melhor compreensão do papel desse órgão no estabelecimento da infecção.

Referências bibliográficas

ABAD-FRANCH, F., et al. Biogeography and evolution of Amazonian triatomines (Heteroptera: Reduviidae): implications for Chagas disease surveillance in humid forest ecoregions. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, p. 57-70, 2007.

ABAD-FRANCH, F., et al. *Rhodnius barretti*, a new species of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae) from western Amazonia. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 108, (Suppl. 1), p. 92-99, 2013.

ABAD-FRANCH, F., et al. On palms, bugs, and Chagas disease in the Americas. **Acta tropica**, v. 151, p. 126-141, 2015.

ABBAS, A.K., et al. *Imunologia Celular e Molecular*. Elsevier, 8.ed, 2015.

ACOSTA, L., et al. Trypanosomatid isolates from Honduras: differentiation between *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli*. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 44, n. 6, p. 676-683, 1991.

AFCHAIN, D., et al. Antigenic make-up of *Trypanosoma cruzi* culture forms: identification of a specific component. **The Journal of parasitology**, p. 507-514, 1979.

AHMED, S., et al. Intradermal infection model for pathogenesis and vaccine studies of murine visceral leishmaniasis. **Infection and immunity**, v. 71, n. 1, p. 401-410, 2003.

AMINO, R., et al. Quantitative imaging of *Plasmodium* transmission from mosquito to mammal. **Nature medicine**, v. 12, n. 2, p. 220-224, 2006.

ANDRADE, B.B., et al. Haematophagous arthropod saliva and host defense system: a tale of tear and blood. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 77, n. 4, p. 665-693, 2005.

AÑEZ, N. Studies on *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920. II. Effect of *T. rangeli* on feeding behavior of Triatomine bugs. **Acta Tropica**, 1981a.

AÑEZ, N. Studies on *Trypanosoma rangeli* Tejera 1920. IV-A reconsideration of its systematic position. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 77, n. 4, p. 405-415, 1982.

AÑEZ, N. Studies on *Trypanosoma rangeli* Tejera 1920. VII-Its effect on the survival of infected triatomine bugs. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 79, n. 2, p. 249-255, 1984.

AÑEZ, N., et al. *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920: VIII. Responses to reinfections in 2 mammals. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 80, n. 2, p. 149-153, 1985.

ANTHONY, R.L., et al. Use of micro-ELISA for quantitating antibody to *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli*. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 28, n. 6, p. 969-973, 1979.

- BANKOTI, R., et al. Differential regulation of the immune response in the spleen and liver of mice infected with *Leishmania donovani*. **Journal of tropical medicine**, p. 1-7, 2012.
- BARROS, V.C., et al. The role of salivary and intestinal complement system inhibitors in the midgut protection of triatomines and mosquitoes. **PLoS One**, v. 4, n. 6, e6047, 2009.
- BARRY, J.D., et al. Parasite development and host responses during the establishment of *Trypanosoma brucei* infection transmitted by tsetse fly. **Parasitology**, v. 88, n. 1, p. 67-84, 1984.
- BARROZO, R.B., et al. Daily rhythms in disease-vector insects. **Biological Rhythm Research**, v. 35, n. 1-2, p. 79-92, 2004.
- BASSO, B., et al. Immune response and *Trypanosoma cruzi* infection in *Trypanosoma rangeli*-immunized mice. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 44, n. 4, p. 413-419, 1991.
- BASSO, B., et al. Vaccination with *Trypanosoma rangeli* reduces the infectiousness of dogs experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. **Vaccine**, v. 25, n. 19, p. 3855-3858, 2007.
- BASSO, B., et al. Vaccination with epimastigotes of different strains of *Trypanosoma rangeli* protects mice against *Trypanosoma cruzi* infection. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 103, n. 4, p. 370-374, 2008.
- BENJAMINI, E., et al. *Imunologia*. **Guanabara Koogan**, 4^o ed., 2002.
- BRECHER, G., WIGGLESWORTH, V.B. The transmission of *Actinomyces rhodnii* Erikson in *Rhodnius prolixus* Stål (Hemiptera) and its influence on the growth of the host. **Parasitology**, v. 35, n. 4, p. 220-224, 1944.
- CALJON, G., et al. The dermis as a delivery site of *Trypanosoma brucei* for tsetse flies. **PLoS pathogens**, v. 12, n. 7, e1005744, 2016.
- CALVO-ÁLVAREZ, E., et al. Infrared fluorescent imaging as a potent tool for in vitro, ex vivo and in vivo models of visceral leishmaniasis. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 9, n. 3, p. e0003666, 2015.
- CHOUMET, V., et al. Visualizing non infectious and infectious *Anopheles gambiae* blood feedings in naive and saliva-immunized mice. **PLoS One**, v. 7, n. 12, e50464, 2012.
- COGSWELL, F.B. The hypnozoite and relapse in primate malaria. **Clinical microbiology reviews**, v. 5, n. 1, p. 26-35, 1992.
- COURA, J., et al. Human infection by *Trypanosoma rangeli* in the Brazilian Amazon. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 90, n. 3, p. 278-279, 1996.

CUBA CUBA, C.A., et al. Hallazgo de *Rhodnius ecuadoriensis* Lent & León, 1958 infectado naturalmente por trypanosomas semejantes a *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920 en caseríos de la Provincia de Cascas, Contumazá, Perú. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, v. 14, p. 191-202, 1972.

CUBA CUBA, C.A. Review of biological and diagnostic aspects of *Trypanosoma* (Herpetosoma) *rangeli*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 31, n. 2, p. 207-220, 1998.

D'ALESSANDRO, A., et al. Natural infections and behavior of *Trypanosoma rangeli* and *Trypanosoma cruzi* in the vector *Rhodnius prolixus* in Colombia. **The Journal of parasitology**, p. 846-852, 1969.

D'ALESSANDRO, A. Biology of *Trypanosoma* (Herpetosoma) *rangeli* Tejera, 1920. **Biology of the Kinetoplastida**, p. 327-403, 1976.

D'ALESSANDRO, A., et al. *Trypanosoma rangeli*. **Parasitic protozoa**, v. 2, p. 1-54, 1992.

DANIEL, T.L., et al. Feeding strategy and the mechanics of blood sucking in insects. **The Journal of Theoretical Biology**, v. 105, n. 4, p. 661-677, 1983.

DEANE, L.M., et al. Occurrence of *Trypanosoma rangeli* in *Opossums* in the State of Pará. **Revista Brasileira de Malariologia**, v. 10, n. 4, p. 451-8, 1958.

DIAS, E. Não receptividade do pombo doméstico à infecção por *Schizotrypanum*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 40, n. 2, p. 191-193, 1944.

DIAS, E., TORREALBA, J.F. Verificação de flagelados semelhantes ao *Trypanosoma rangeli* Tejera, em *Rhodnius prolixus* alimentados em caso de doença de Chagas na Venezuela: considerações sobre a natureza deste protozoário. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 39, n. 3, p. 265-278, 1943.

DIAS, F.B.S., et al. Ecological aspects of *Rhodnius nasutus* Stål, 1859 (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) in palms of the Chapada do Araripe in Ceará, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 103, n. 8, p. 824-830, 2008.

EGER-MANGRICH, I., et al. Interaction of *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920 with different cell lines in vitro. **Parasitology research**, v. 87, n. 6, p. 505-509, 2001.

EICHLER, S., SCHAUB, G.A. The effects of aposymbiosis and of an infection with *Blastocrithidia triatomae* (Trypanosomatidae) on the tracheal system of the reduviid bugs *Rhodnius prolixus* and *Triatoma infestans*. **Journal of insect physiology**, v. 44, n. 2, p. 131-140, 1998.

EICHLER, S., SCHAUB, G.A. Development of symbionts in triatomine bugs and the effects of infections with trypanosomatids. **Experimental parasitology**, v. 100, n. 1, p. 17-27, 2002.

FERREIRA, L.L., et al. A standardizable protocol for infection of *Rhodnius prolixus* with *Trypanosoma rangeli*, which mimics natural infections and reveals physiological effects of infection upon the insect. **Journal of invertebrate pathology**, v. 105, n. 1, p. 91-97, 2010.

FERREIRA, L.L., et al. Revisiting *Trypanosoma rangeli* transmission involving susceptible and non-susceptible hosts. **PloS one**, v. 10, n. 10, e0140575, 2015.

GARCIA, E.S., et al. *Rhodnius prolixus*: salivary antihemostatic components decrease with *Trypanosoma rangeli* infection. **Experimental parasitology**, v. 78, n. 3, p. 287-293, 1994.

GIUNCHETTI, R.C., et al. Histopathology, parasite density and cell phenotypes of the popliteal lymph node in canine visceral leishmaniasis. **Veterinary immunology and immunopathology**, v. 121, n. 1, p. 23-33, 2008.

GREWAL, M.S. Pathogenicity of *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920 in the invertebrate host. **Experimental parasitology**, v. 6, n. 2, p. 123-130, 1957.

GRIMALDI, G.J.R., et al. Tissue eosinophilia and *Leishmania mexicana mexicana* eosinophil interactions in murine cutaneous leishmaniasis. **Parasite Immunology**, v. 6, p. 397-408, 1984.

GRISARD, E.C., et al. Mini-exon gene sequence polymorphism among *Trypanosoma rangeli* strains isolated from distinct geographical regions. **Parasitology**, v. 118, n. 4, p. 375-382, 1999.

GRÖGL, M., et al. Identification of antigens of culture forms of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* recognized by sera from patients with chronic Chagas' disease. **The Journal of parasitology**, v. 70, n. 5, p. 822-824, 1984.

GROOT, H., et al. Nota preliminar sobre inoculación a un voluntarioso humano con *Trypanosoma* sp. (*Ariarii*). **Annals Society Biology Bogotá**, v. 4, p. 99-103, 1950.

GROOT, H. Estudios sobre los trypanosomas humanos clasificados como *Trypanosoma rangeli* con especial referencia a su evolución en *Rhodnius prolixus* ya su comparación con *Trypanosoma ariarii*. **Annals Society Biology Bogotá**, v. 6, n. 3, p. 109-126, 1954.

GROOTENHUIS, J.G., et al. Susceptibility of *African buffalo* and *Boran cattle* to *Trypanosoma congolense* transmitted by *Glossina morsitans centralis*. **Veterinary Parasitology**, v. 35, n. 3, p. 219-231, 1990.

GUARNERI, A.A., et al. Comparison of feeding behaviour of *Triatoma infestans*, *Triatoma brasiliensis* and *Triatoma pseudomaculata* in different hosts by electronic monitoring of the cibarial pump. **Journal of insect physiology**, v. 46, n. 7, p. 1121-1127, 2000.

GUARNERI, A.A., LORENZO, M.G. Triatomine physiology in the context of trypanosome infection. **Journal of insect physiology**, v. 97, p. 66-76, 2017.

GUEIRARD, P., et al. Development of the malaria parasite in the skin of the mammalian host. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 43, p. 18640-18645, 2010.

GUHL, F., VALLEJO, G.A. *Trypanosoma* (Herpetosoma) *rangeli* Tejera, 1920: an updated review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, n. 4, p. 435-442, 2003.

HALL, J.E. Tratado de Fisiologia médica, **Elsevier**, 12^o ed., 2011.

HARRINGTON, J.S. Studies on *Rhodnius prolixus*: growth and development of normal and sterile bugs, and the symbiotic relationship. **Parasitology**, v. 50, n. 1-2, p. 279-286, 1960.

HECKER, H., et al. Development and interactions of *Trypanosoma rangeli* in and with the reduviid bug *Rhodnius prolixus*. **Parasitology Research**, v. 76, n. 4, p. 311-318, 1990.

HERBIG-SANDREUTER, A. Further studies on *Trypanosoma rangeli* Tejera 1920. **Acta trópica**, v. 14, n. 3, p. 193-207, 1957.

HOARE, C.A. The trypanosomes of mammals. **A Zoological Monograph**, 1972.

JARRA, W., SNOUNOU, G. Only viable parasites are detected by PCR following clearance of rodent malarial infections by drug treatment or immune responses. **Infection and immunity**, v. 66, n. 8, p. 3783-3787, 1998.

KEBAIER, C., et al. Kinetics of mosquito-injected *Plasmodium* sporozoites in mice: fewer sporozoites are injected into sporozoite-immunized mice. **PLoS pathogens**, v. 5, n. 4, e1000399, 2009.

KIERSZENBAUM, F., et al. Mechanisms of natural resistance to trypanosomal infection. Role of complement in avian resistance to *Trypanosoma cruzi* infection. **Immunology**, v. 30, n. 1, p. 1-6, 1976.

LAKE, P., FRIEND, W.G. A monoxenic relationship, *Nocardia rhodnii* Erikson in the gut of *Rhodnius prolixus* Stal (Hemiptera: Reduviidae). In: **Proceedings of the Entomological Society of Ontario**, v. 98, p. 53-57, 1967.

LAVERAN, A., et al. Trypanosomes and trypanosomiases. Baillière, **Tindall and Cox**, 1907.

LAVOPIERRE, M.M.J., et al. Studies on the methods of feeding of blood-sucking arthropods: I—The manner in which triatomine bugs obtain their blood-meal, as observed in the tissues of the living rodent, with some remarks on the effects of the bite on human volunteers. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 53, n. 2, p. 235-250, 1959.

LAWRIE, C.H., et al. *Ixodid* and *Argasid* tick species and West Nile virus. **Emerging infectious diseases**, v. 10, n. 4, p. 653-657, 2004.

LEHANE, M.J. The biology of blood-sucking in insects. **Cambridge University Press**, 2005.

LENT, H., WYGODZINSKY, P. Revision of the Triatominae (Hemiptera, Reduviidae), and their significance as vectors of Chagas' disease. **Bulletin of the American Museum of Natural History**, v. 163, n. 3, p. 123-520, 1979.

LEVINE, N.D., et al. A newly revised classification of the protozoa. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 27, n. 1, p. 37-58, 1980.

MAIA DA SILVA, F., et al. Comparative phylogeography of *Trypanosoma rangeli* and *Rhodnius* (Hemiptera: Reduviidae) supports a long coexistence of parasite lineages and their sympatric vectors. **Molecular ecology**, v. 16, n. 16, p. 3361-3373, 2007.

MARINI, V., et al. Vaccination with *Trypanosoma rangeli* modulates the profiles of immunoglobulins and IL-6 at local and systemic levels in the early phase of *Trypanosoma cruzi* experimental infection. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 106, n. 1, p. 32-37, 2011.

MARINKELLE, C.J. Observations on human, monkey and bat trypanosomes and their vectors in Colombia. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 60, n. 1, p. 109-116, 1966.

MARINKELLE, C.J. Pathogenicity of *Trypanosoma rangeli* for *Rhodnius prolixus* StÅL in nature (Hemiptera: Reduviidae) (Kinetoplastida: Trypanosomatidae). **Journal of medical entomology**, v. 5, n. 4, p. 497-499, 1968.

MARQUEZ, D.D.S., et al. Susceptibility of different triatomine species to *Trypanosoma rangeli* experimental infection. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 6, n. 1, p. 50-56, 2006.

MARTINEZ, A.J., et al. *Acanthamoeba*, an opportunistic microorganism: a review. **Infection**, v. 13, n. 6, p. 251-256, 1985.

MEAD, D.G, et al. Transmission of vesicular stomatitis virus from infected to non infected black flies co-feeding on non viremic deer mice. **Science**, v. 287, n. 5452, p. 485-487, 2000.

MENDES-SOUSA, A.F, et al. Different host complement systems and their interactions with saliva from *Lutzomyia longipalpis* (Diptera, Psychodidae) and *Leishmania infantum* promastigotes. **PLoS One**, v. 8, n. 11, e79787, 2013.

MESQUITA, R.D., et al. *Trypanosoma cruzi* infection is enhanced by vector saliva through immunosuppressant mechanisms mediated by lysophosphatidylcholine. **Infection and immunity**, v. 76, n. 12, p. 5543-5552, 2008.

MINTER-GOEDBLOED, E., et al. The insusceptibility of chickens to *Trypanosoma* (Schizotrypanum) *cruzi*. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 75, n. 3, p. 350-353, 1981.

MOLYNEUX, D. Division of the human trypanosome, *Trypanosoma* (Herpetosoma) *rangeli*. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 67, n. 3, p. 371-372, 1973.

MONTEON, V., et al. Pre-exposure to faeces or saliva of *Triatoma dimidiata* decreases parasitemia in mice challenged with *Trypanosoma cruzi*: a description of the inflammatory reaction at the inoculation site. **Annals of Parasitology**, v. 62, n. 3, p. 209-219, 2016.

MORAES, M.H., et al. Different serological cross-reactivity of *Trypanosoma rangeli* forms in *Trypanosoma cruzi*-infected patients sera. **Parasites and vectors**, v. 1, n. 1, p. 1-20, 2008.

NASCIMENTO, R.J., et al. Human IgG1 and IgG4: the main antibodies against *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) salivary gland proteins. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 65, n. 3, p. 219-226, 2001.

O'DALY, J.A., et al. Comparison of chagasic and non-chagasic myocardopathies by ELISA and immunoblotting with antigens of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli*. **Acta tropica**, v. 56, n. 4, p. 265-287, 1994.

OSORIO, Y., et al. Infectivity of *Trypanosoma rangeli* in a promonocytic mammalian cell line. **The Journal of parasitology**, p. 687-693, 1995.

PAIM, R.M., et al. The interaction between *Trypanosoma rangeli* and the nitrophorins in the salivary glands of the triatomine *Rhodnius prolixus* (Hemiptera; Reduviidae). **Insect biochemistry and molecular biology**, v. 43, n. 3, p. 229-236, 2013.

PAREDES H.C., PAREDES M.R.P. Un caso de infeccion humana por *T. rangeli*. **Revista de la Facultad de Medicina**, v. 18, n. 4, p. 343-375, 1949.

PIFANO, C.F., et al. Primera comprobacion de *Trypanosoma rangeli* en el organismo humano por cultivo de sangre periferica. **Archivos Venezolanos de Patologia Tropical y Parasitologia Médica**, v. 1, p. 1-31, 1948.

PIFANO, C.F. Nueva Trypanosomiasis humana de la región neotrópica producida por el *Trypanosoma rangeli* con especial referencia a Venezuela. **Archivos Venezolanos de Patologia Tropical y Parasitologia Médica**, v. 2, n. 2, p. 89-120, 1954.

PINEDA, V., et al. Prevalence of trypanosome infections in dogs from Chagas disease endemic regions in Panama, Central America. **Veterinary parasitology**, v. 178, n. 3, p. 360-363, 2011.

RAMIREZ, L.E., et al. High prevalence of *Trypanosoma rangeli* and *Trypanosoma cruzi* in opossums and triatomids in a formerly-endemic area of Chagas disease in Southeast Brazil. **Acta tropica**, v. 84, n. 3, p. 189-198, 2002.

RANDOLPH, S.E., et al. Co-feeding ticks: epidemiological significance for tick-borne pathogen transmission. **Parasitology today**, v. 12, n. 12, p. 472-479, 1996.

RANDOLPH, S.E. Transmission of tick-borne pathogens between co-feeding ticks: Milan Labuda's enduring paradigm. **Ticks and tick-borne diseases**, v. 2, n. 4, p. 179-182, 2011.

REY MATIZ .H., UCROS G.H. Nota preliminar sobre el hallazgo del *Schizotrypanum cruzi* y del *Trypanosoma rangeli* en el *Rhodnius prolixus* en algunas regiones del oriente de cundinamarca. **Revista de la Facultad de Medicina**, v. 8, n. 2, p. 76-78, 1939.

RIBEIRO, J.M.C. Role of saliva in blood-feeding by arthropods. **Annual review of entomology**, v. 32, n. 1, p. 463-478, 1987.

RIBEIRO, J.M.C., et al. Role of salivary antihemostatic components in blood feeding by triatomine bugs (Heteroptera). **Journal of Medical Entomology**, v. 35, n. 4, p. 599-610, 1998.

RODRIGUES, J.O., et al. Temperature and parasite life-history are important modulators of the outcome of *Trypanosoma rangeli* – *Rhodnius prolixus* interactions. **Parasitology**, v. 143, n. 11, p. 1459-1468, 2016.

ROSA, J.A., et al. Description of *Rhodnius montenegrensis* n. sp. (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) from the state of Rondônia, Brazil. **Zootaxa**, v. 3478, p. 62-76, 2012.

SALDAÑA, A., et al. *Trypanosoma rangeli*: epimastigote immunogenicity and cross-reaction with *Trypanosoma cruzi*. **The Journal of Parasitology**, v. 82, p. 363-366, 1996.

SANT'ANNA, M.R.V., et al. Feeding behaviour of morphologically similar *Rhodnius* species: influence of mechanical characteristics and salivary function. **Journal of insect Physiology**, v. 47, n. 12, p. 1459-1465, 2001.

SCHOFIELD, C.J. Chagas disease, triatomine bugs, and bloodloss. **The Lancet**, v. 317, n. 8233, p. 1316, 1981.

SCHOTTELIUS, J., et al. Comparative investigations of Latin American trypanosomes with lectins and complement lysis test. **Tropical medicine and Parasitology**, v. 37, n. 1, p. 54-58, 1986.

SCHOTTELIUS, J. Neuraminidase fluorescence test for the differentiation of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli*. **Tropical Medicine and Parasitology**, v. 38, n. 4, p. 323-327, 1987.

SCORZA, C., et al. *Trypanosoma* (*Herpetosoma*) *rangeli* Tejera, 1920: Preliminary report on histopathology in experimentally infected mice. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 28, n. 5, p. 371-378, 1986.

SIDJANSKI, S., et al. Delayed migration of *Plasmodium* sporozoites from the mosquito bite site to the blood. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 57, n. 4, p. 426-429, 1997.

SOARES, A.C., et al. Salivation pattern of *Rhodnius prolixus* (Reduviidae; Triatominae) in mouse skin. **Journal of Insect Physiology**, v. 52, n. 5, p. 468-472, 2006.

SOARES, R.P., et al. Intraspecies variation in *Trypanosoma cruzi* GPI-mucins: biological activities and differential expression of α -galactosyl residues. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 87, n. 1, p. 87-96, 2012.

SOUSA, M.A., et al. *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920, in chronic Chagas' disease patients under ambulatory care at the Evandro Chagas Clinical Research Institute (IPEC—Fiocruz, Brazil). **Parasitology Research**, v. 103, n. 3, p. 697-703, 2008.

SOUSA, O.E., JOHNSON, C.M. Frequency and distribution of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* in the Republic of Panamá. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 20, n. 3, p. 405-410, 1971.

STEINDEL, M., et al. *Trypanosoma rangeli* (Tejera, 1920) isolated from a sylvatic rodent (*Echimys dasythrix*) in Santa Catarina Island, Santa Catarina State: first report of this trypanosome in Southern Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 86, n. 1, p. 73-79, 1991.

STEINDEL, M. Caracterização de Cepas de *Trypanosoma rangeli* e *Trypanosoma cruzi* Isoladas de Reservatórios e Vetores Silvestres em Santa Catarina. **Tese**, 1993.

STEVENS, J.R., et al. The taxonomic position and evolutionary relationships of *Trypanosoma rangeli*. **International Journal for Parasitology**, v. 29, n. 5, p. 749-757, 1999.

STEVENS, J.R., et al. The molecular evolution of Trypanosomatidae. **Advances in Parasitology**, v. 48, p. 1-53, 2001.

STOCO, P.H., et al. Genome of the avirulent human-infective trypanosome — *Trypanosoma rangeli*. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 9, e3176, 2014.

TANOURA, K., et al. *Trypanosoma rangeli* — In vitro Metacyclogenesis and fate of metacyclic trypomastigotes after infection to mice and fibroblast cultures. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 46, n. 1, p. 43-48, 1999.

TEIXEIRA, A.R., et al. Emerging Chagas disease: trophic network and cycle of transmission of *Trypanosoma cruzi* from palm trees in the Amazon. **Emerging Infectious Diseases**, v. 7, n. 1, p. 100-112, 2001.

TEJERA, F. Un nouveau flagellé de *Rhodnius prolixus*, *Trypanosoma* (ou *Crithidia*) *rangeli* n. sp. **Le Bulletin de la Société de Pathologie Exotique**, v. 13, p. 527-530, 1920.

TOBIE, E.J. Experimental transmission and biological comparison of strains of *Trypanosoma rangeli*. **Experimental Parasitology**, v. 11, n. 1, p. 1-9, 1961.

TOBIE, E.J. Experimental transmission and biological comparison of strains of *Trypanosoma rangeli*. **Experimental parasitology**, v. 11, n. 1, p. 1-9, 1961.

URDANETA-MORALES, S., et al. *Trypanosoma* (Herpetosoma) *rangeli* Tejera, 1920: Mouse model for high, sustained parasitemia. **The Journal of Parasitology**, p. 409-414, 1985.

URDANETA-MORALES, S., et al. *Trypanosoma* (Herpetosoma) *rangeli* Tejera, 1920: intracellular amastigote stages of reproduction in white mice. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 28, n. 3, p. 166-169, 1986.

VALLEJO, G.A., et al. Mantenimiento en el laboratorio de *Trypanosoma* (Herpetosoma) *rangeli* Tejera, 1920. **Revista de Biología Tropical**, v. 34, p. 75-81, 1986.

VALLEJO, G.A., et al. Laboratory maintenance of *Trypanosoma* (Herpetosoma) *rangeli* Tejera, 1920. **Revista de biología tropical**, v. 34, n. 1, p. 75-81, 1986.

VALLEJO, G.A., et al. Comportamiento de la infección y diferenciación morfológica entre *Trypanosoma cruzi* y *Trypanosoma rangeli* en el intestino del vector *Rhodnius prolixus*. **Revista Brasileira de Biologia**, v. 48, n. 3, p. 577-587, 1988.

VIEIRA, P.M.A., et al. Different infective forms trigger distinct immune response in experimental Chagas disease. **PloS One**, v. 7, n. 3, e32912, 2012.

WATKINS, R. *Trypanosoma rangeli*: effect on excretion in *Rhodnius prolixus*. **Journal of invertebrate Pathology**, v. 17, n. 1, p. 67-71, 1971.

WILSON, M.E., et al. Immunopathogenesis of infection with the visceralizing *Leishmania* species. **Microbial Pathogenesis**, v. 38, n. 4, p. 147-160, 2005.

ZICCARDI, M., et al. Trypanosomes of non-human primates from the National Centre of Primates, Ananindeua, State of Pará, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 95, n. 2, p. 157-159, 2000.

ZÚÑIGA, C., et al. *Trypanosoma rangeli*: increase in virulence with inocula of different origins in the experimental infection in mice. **Parasitology research**, v. 83, n. 8, p. 797-800, 1997.

RESEARCH ARTICLE

Revisiting *Trypanosoma rangeli* Transmission Involving Susceptible and Non-Susceptible Hosts


Luciana de Lima Ferreira¹, Marcos Horácio Pereira², Alessandra Aparecida Guarneri^{1*}

1 Vector Behavior and Pathogen Interaction Group, Centro de Pesquisas René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, Belo Horizonte, Brazil, **2** Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil

* guarneri@cpqrr.fiocruz.br



CrossMark
click for updates

 OPEN ACCESS

Citation: Ferreira LdL, Pereira MH, Guarneri AA (2015) Revisiting *Trypanosoma rangeli* Transmission Involving Susceptible and Non-Susceptible Hosts. PLoS ONE 10(10): e0140575. doi:10.1371/journal.pone.0140575

Editor: Pedro L. Oliveira, Universidade Federal do Rio de Janeiro, BRAZIL

Received: June 10, 2015

Accepted: September 26, 2015

Published: October 15, 2015

Copyright: © 2015 Ferreira et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper.

Funding: This work was supported by INCT-EM/ CNPq (Institutos Nacionais de Ciência e Tecnologia—Entomologia Molecular/Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico)—(573959/2008-0), PAPES VI/FIOCRUZ (Programa Institucional de Indução a Ciência, Tecnologia e Inovação em Saúde / Fundação Oswaldo Cruz)—(407614/2012-5), PROEP/FIOCRUZ (Programa de Excelência em Pesquisa / Fundação Oswaldo Cruz)—(401973/2012-3) and FAPEMIG (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais).

Abstract

Trypanosoma rangeli infects several triatomine and mammal species in South America. Its transmission is known to occur when a healthy insect feeds on an infected mammal or when an infected insect bites a healthy mammal. In the present study we evaluated the classic way of *T. rangeli* transmission started by the bite of a single infected triatomine, as well as alternative ways of circulation of this parasite among invertebrate hosts. The number of metacyclic trypomastigotes eliminated from salivary glands during a blood meal was quantified for unfed and recently fed nymphs. The quantification showed that ~50,000 parasites can be liberated during a single blood meal. The transmission of *T. rangeli* from mice to *R. prolixus* was evaluated using infections started through the bite of a single infected nymph. The mice that served as the blood source for single infected nymphs showed a high percentage of infection and efficiently transmitted the infection to new insects. Parasites were recovered by xenodiagnosis in insects fed on mice with infections that lasted approximately four months. Hemolymphagy and co-feeding were tested to evaluate insect-insect *T. rangeli* transmission. *T. rangeli* was not transmitted during hemolymphagy. However, insects that had co-fed on mice with infected conspecifics exhibited infection rates of approximately 80%. Surprisingly, 16% of the recipient nymphs became infected when pigeons were used as hosts. Our results show that *T. rangeli* is efficiently transmitted between the evaluated hosts. Not only are the insect-mouse-insect transmission rates high, but parasites can also be transmitted between insects while co-feeding on a living host. We show for the first time that birds can be part of the *T. rangeli* transmission cycle as we proved that insect-insect transmission is feasible during a co-feeding on these hosts.

Introduction

Trypanosoma rangeli was first described by Tejera in 1920 [1]; since then, many studies have been undertaken to examine its interactions with its hosts. In the Americas, this parasite infects triatomines and mammals, including man, although it does not cause disease in humans [2].

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

However, *T. rangeli* exhibits different levels of pathogenicity to its invertebrate hosts [3–6]. Parasite development inside vectors begins when trypomastigote forms are ingested together with blood meals from infected mammals. These forms transform into epimastigotes inside the vector midgut and then multiply and colonize the intestinal tract. During the infection, some parasites can cross the intestinal epithelium and reach the hemocoel. Parasites that manage to cross the hemolymph divide and migrate to the salivary glands where they transform into metacyclic trypomastigotes, which are the forms that infect vertebrate hosts and that are transmitted in the saliva during blood meals [2].

Despite our understanding of the transmission process, gaps remain in our understanding of the triatomine-parasite-mammal interaction; the most intriguing questions concern the development of *T. rangeli* in vertebrate hosts. To date, it remains unclear how the parasite is maintained in these hosts due to conflicting findings [7–9]. Apparently, no intracellular replicative forms are present, as is observed in *Trypanosoma cruzi* [10] and *Leishmania* spp. [11], and no multiplicative forms are present in the blood circulation, as occurs in *T. brucei* [12] and *T. conorhini* [13]. Nevertheless, *T. rangeli* is found abundantly in nature [14, 15] and infects several triatomine species and an extensive variety of mammals [16–18]. In addition, *T. rangeli* completes its development only in triatomines from the genus *Rhodnius* [15]. Biological and molecular studies suggest that these parasites and their vectors have coexisted over a long period, with diverging lineages that are associated with sympatric species of *Rhodnius* but without an apparent association with vertebrate host species [18–20]. This evolutionary relationship between *T. rangeli* and its invertebrate hosts, in conjunction with the lack of reports of parasite multiplication in vertebrate hosts, suggests the existence of forms of transmission other than the classic form in which insects become infected while feeding on an infected mammal. There are a few reports that suggest that insect-insect parasite transmission can occur through hemolymphagy, when one insect takes hemolymph from a conspecific [21] or during a simultaneous blood feeding [22], although the relevance of these alternative transmission routes in parasite circulation has not been established. Therefore, we used a strain of *T. rangeli* that was maintained through cyclical passages in triatomines and mice and established a protocol that mimics the natural transmission to evaluate how *T. rangeli* circulates between mice and *Rhodnius prolixus* and the importance of insect-insect transmission for parasite circulation.

Materials and Methods

Organisms

The CHOACHI strain, which was isolated from naturally infected *R. prolixus* from Colombia [23], was used. Epimastigote forms were cultured at 27°C by two weekly passages in liver-infusion tryptose (LIT) supplemented with 15% fetal bovine serum (FBS), 100 µl of streptomycin/ml and 100 units/ml of penicillin. To maintain strain infectivity, parasites were submitted to triatomine-mouse passages every three months [24].

Rhodnius prolixus was obtained from a colony that was originally established with insects collected in Honduras in approximately 1990, which is maintained by the Vector Behavior and Pathogen Interaction Group. Insects were reared at 26±1°C and a relative humidity of 65±10% under natural illumination. The insects were fed on chicken and mice that were anesthetized with intraperitoneal injections of a ketamine (150 mg/kg; Cristália, Brazil)/xylazine (10 mg/kg; Bayer, Brazil) mixture. All animal protocols followed the norms of FIOCRUZ regarding animal maintenance and experimentation and were approved by the Ethics Committee on Animal Use (Comissão de Ética no Uso de Animais—Fundação Oswaldo Cruz; CEUA-FIOCRUZ) under the number L-058/08.

Male mice from the Swiss Webster lineage weighing approximately 30 g and adult pigeons (*Columba livia*) of both sexes weighing approximately 450 g (both the mice and pigeons were obtained from the biotery of Centro de Pesquisa René Rachou) were used as vertebrate host models. The animals were anesthetized as described above. Rabbit blood was obtained from CECAL (Centro de Criação de Animais de Laboratório)-FIOCRUZ.

Rhodnius prolixus infection

Third instar nymphs (7 days after molting) were fed on an artificial feeding apparatus containing citrated, heat-inactivated (56°C/30 min) rabbit blood containing a suspension of *T. rangeli* epimastigotes (1×10^5 parasites/ml). Epimastigotes were obtained from a 10-day culture medium; the parasites were washed and resuspended in sterile phosphate buffered saline (PBS; 0.15 M NaCl in 0.01 M sodium phosphate, pH 7.4). To ensure the presence of parasites in the hemolymph and salivary glands, insects were also infected intracelomically as described previously [25]. Briefly, nymphs were inoculated in the side of the thorax with 1 μ l of parasite suspension (5×10^4 parasites/ml) after molting to the 4th instar (7 days after molting). Twenty-four hours after inoculation, the nymphs were allowed to feed on anesthetized mice. Control insects were fed on rabbit blood and inoculated with PBS on the same days as the infected ones.

Estimation of the number of parasites liberated by *T. rangeli*-infected nymphs during a blood meal on mice

The number of parasites liberated during a blood meal was estimated as previously described [26]. A group of nymphs was infected as described, and 45 days after intracelomic inoculation, the salivary glands from half of the nymphs ($n = 11$) were dissected. The remaining nymphs ($n = 11$) were fed on anesthetized mice, and their salivary glands were dissected immediately after completion of the blood meal. Each pair of glands was placed on a glass slide containing PBS to wash the glands and remove the hemolymph parasites. The glands were then transferred to 1.5-ml plastic microcentrifuge tubes containing 100 μ l of PBS, ruptured with forceps, and the contents were homogenized. Ten microliters of the homogenate was collected and quantified using a Neubauer chamber. The remaining 90 μ l was subjected to DNA extraction using the NucleoSpin Tissue XS kit (Macherey-Nagel, Bethlehem, PA, USA) according to the manufacturer's instructions. The purified DNA was diluted in 22 μ l of water for subsequent estimation of the number of parasites using real-time PCR (qPCR). To quantify the number of parasites in the salivary glands of fed and unfed insects, a standard curve was constructed using serial dilutions of the plasmid pGEM-T Easy (Promega, Fitchburg, WI, USA) containing a 137-bp multicopy sequence related to the gene for RNA-Cl1 sno *T. rangeli*, which was used to detect the parasite (GenBank: AY028385.2, forward: 5' gaaagcgcaagagagat-3' and reverse: 5'-tgatggctatcacgcaag-3') [27]. The plasmid was diluted to obtain a standard curve encompassing the range from 10^0 to 10^7 molecules; the resulting curve was used to estimate the number of copies present in each sample. The qPCR reactions were performed using an ABIPRISM 7500 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Each reaction was conducted in triplicate and contained 2 μ l of DNA, 300 nM of each primer, and 12.5 μ l Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) in a final volume of 25 μ l. The DNA was amplified using the following protocol: 95°C for 10 min, followed by 40 cycles at 95°C for 15 sec and 60°C for 1 min. A melting curve analysis was used to verify that a single product was amplified. A negative control without the presence of primers was included. The number of parasites released from the salivary glands during the blood meal was estimated using a Neubauer chamber. The estimation was done by subtracting the average number of parasites present in the salivary glands after feeding from the average number of parasites

present before feeding. PCR quantifications were used to estimate the percentage of reduction in the *T. rangeli* DNA amount in salivary glands from fed and unfed infected insects.

T. rangeli transmission from infected mice to *R. prolixus* nymphs over time

Mice ($n = 31$, divided into three replicate experiments) were anesthetized and exposed to individual infected 5th instar nymphs (30 days after molting) for 50 min. The fed nymphs were then removed, and the salivary glands were dissected to confirm infection (only mice that had been bitten by an infected nymph were used). On days 1–7, 15 and 30 after infection, the infected mice were anesthetized and offered to individual uninfected 5th instar nymphs (30 days after molting) for 50 min. Five mice were also evaluated 126 days post infection (dpi). Immediately after feeding, the nymphs were transferred to a BOD chamber ($27 \pm 1^\circ\text{C}$, 12:12 L:D) and maintained under these conditions for 21 days, after which the intestinal contents and hemolymph were examined for parasites. Insects that presented parasites in the hemolymph were maintained in the same conditions for 30 days, when the salivary glands were examined. At the end of each assay, all mice were tested for the presence of parasites by direct examination. Parasitemia was assessed by counting the trypomastigotes in 5 μl of tail vein blood [28]. Mice that were used as a food source for nymphs that proved negative were also bled at the end of the experiment ($n = 3$). The collected blood (~ 0.8 ml) was inoculated in LIT (1 ml) + NNN medium (1 ml), and the hemocultures were examined after 20 days.

Insect-insect *T. rangeli* transmission during hemolymphagy

Hemolymphagy was evaluated as previously described [29]. Fifth instar nymphs containing parasites in their hemolymph served as the food source. Three days before the assay, infected nymphs were fed on anesthetized mice. To increase the feeding motivation of the starved insects, the infected 5th instar nymphs were maintained at 40°C for three min immediately before the start of each assay. Nymphs were then individually immobilized with adhesive tape inside a cylindrical container (5.5 cm in diameter and 8.0 cm high) that was lined with filter paper. Second instar nymphs (10 days after molting; $n = 10$) were liberated and maintained in the container for 10 min together with the infected nymph. During this period, the number of nymphs that attempted to bite the fed nymph was recorded. This experiment was repeated twice. In a second experiment, 2nd instar nymphs (20 days after molting; $n = 10$) were maintained together with one infected 5th instar nymph (10 days post feeding) for 15 days in a cylindrical container (as described before) that was covered with cotton fabric. After this period, the 5th instar nymph was removed, and the 2nd instar nymphs were fed on anesthetized mice and transferred to a BOD chamber ($27 \pm 1^\circ\text{C}$, 12:12 L:D). Insects were maintained under these conditions until molting to the 3rd instar, when the intestinal tract, hemolymph and salivary glands were examined under microscopy to determine the presence of parasites.

Insect-insect *T. rangeli* transmission by co-feeding on vertebrate

One donor-infected nymph and one recipient-uninfected nymph were placed into a cylindrical container (5.5 cm in diameter and 8.0 cm high) covered with cotton fabric and divided into two sectors by a narrow piece of cardstock paper, which prevented contact between the insects ($n = 13$ and $n = 25$ for mouse and pigeon, respectively). One anesthetized mouse or pigeon was placed ventral side down on the container for 40 min as a food source. After this, the vertebrate and the donor nymph were removed from the apparatus. The recipient nymph was transferred to a BOD chamber ($27 \pm 1^\circ\text{C}$, 12:12 L:D) and maintained under these conditions for 21 days, after which the intestinal tract, hemolymph and salivary glands were examined to determine

the presence of parasites. Additional assays were performed using five 5th instar nymph recipients together with one 5th instar donor for both mice (n = 4) and pigeon studies. In the experiment using pigeons as hosts, the following assays were performed: a) recipients feeding simultaneously with the donor, but placed 6 cm apart from it (n = 5 pigeons); b) recipients feeding 30 min after the donor had finished the meal (n = 5 pigeons); c) recipients feeding 24 h after the donor had finished the meal (n = 5 pigeons).

Evaluation of complement-mediated *T. rangeli* lysis

T. rangeli lysis mediated by mice/pigeon complement action was evaluated as previously described [30]. Blood samples were obtained from anesthetized adult pigeons and mice. After incubation at 37°C for one hour, the blood was centrifuged for 5 min at 5,000 g and 4°C to obtain serum. Serum from each donor was divided into aliquots, and half of them were incubated at 56°C for 30 min to inactivate the complement system. All aliquots were stored at -70°C and each aliquot was used only once. Metacyclic trypomastigotes were obtained from salivary glands that were removed from infected 5th instar nymphs. The salivary glands were transferred to a microtube containing 50 µl of 199 Medium (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) and then ruptured and homogenized. In each trial, 40 µl of serum (heat or non-heat inactivated) plus 10 µl of a metacyclic trypomastigote suspension (varying between 2 and 3.4 × 10⁶ parasites/ml) were incubated at 41°C or 37°C (with pigeon or mouse sera, respectively) for 30 min. The number of parasites was quantified in a Neubauer chamber at 0 and 30 min of incubation. The percentage of lysis observed in non-heat inactivated serum after 30 min of incubation was normalized in relation to the corresponding values obtained using inactivated serum.

Statistical analysis

The numbers of parasites present in the salivary glands of fed and unfed insects were compared using the t test. The numbers of parasites in the intestinal tract of nymphs fed on mice at different stages of infection were compared between trials and among days of infection. In this case, data normality was evaluated using Shapiro-Wilk's W. Variables were compared using non-parametric Mann-Whitney and Kruskal-Wallis tests; the groups responsible for the differences found using the Kruskal-Wallis test were identified using the Mann-Whitney test with the Bonferroni correction [31]. Differences were considered significant at p < 0.05 except when the Bonferroni correction was used, when differences were considered significant at p < 0.005.

Results

Estimation of the number of parasites released by *T. rangeli*-infected nymphs during a blood meal on mice

The number of parasites/DNA amount present in the salivary glands of unfed and fed *R. prolixus* nymphs is shown in the Table 1. Despite the large variability observed among the samples, a significant reduction was observed in the number of parasites/parasite DNA present in the salivary glands after a blood meal (t test, p = 0.001 when counting using a Neubauer chamber and qPCR). The estimations from Neubauer quantifications showed that approximately 54,000 parasites were liberated during a single blood meal, which corresponds to 76% of the parasite burden in the salivary glands of starved nymphs. The relative estimation by qPCR showed that about 68.4% of the parasites inside the glands were released into the host after a blood meal.

Table 1. Estimation of the parasite load present in the salivary gland (SG) of starved and fed 5th instar nymphs of *R. prolixus* 45 days after infection by *T. rangeli* (parasites—Neubauer chamber and RNA-C11 sno gene copies/ μ L—qPCR). Values correspond to means \pm SE.

Quantification method	Starved nymphs (n = 11)	Fed nymphs (n = 11)	p value	Parasites released
Neubauer chamber (parasites/SG)	$7.1 \times 10^4 \pm 4.0 \times 10^4$	$1.7 \times 10^4 \pm 1.4 \times 10^4$	0.001	5.4×10^4
qPCR (gene copy/SG)	$11.4 \times 10^4 \pm 6.4 \times 10^4$	$3.6 \times 10^4 \pm 2.7 \times 10^4$	0.001	-

doi:10.1371/journal.pone.0140575.t001

T. rangeli transmission from infected mice to *R. prolixus* nymphs over time

Twenty-eight (90.3%) of 31 rodents that served as the food source to one infected nymph became infected by *T. rangeli*. Infection was confirmed by examining the intestinal contents of fed nymphs and/or hemoculture; parasite transmission to insects was evaluated using these infected mice. The percentage of infected nymphs that fed on mice on different days of infection is shown in Fig 1. Triatomine infection rates were high on all days, reaching approximately 80% except in one replicate, when none of the insects that fed on 30 dpi became infected. Parasites were also present in the hemolymph of 10 infected insects (4.8%), although they were not found in the salivary glands.

The number of parasites found in the intestinal tract of the infected insects was highly variable among samples, but it was possible to observe an effect of the duration of the mouse infection on this parameter (Fig 2, Kruskal-Wallis, $p < 0.0001$). The number of parasites was lower in insects that fed on mice at 15 and 30 dpi, but infection returned to high levels in mice with more prolonged infection (126 dpi).



Fig 1. Infection rates of *R. prolixus* 5th instar nymphs that fed on *T. rangeli*-infected mice on different days after infection. The data shown represent the mean of three biological replicates, except from the data for 126 days post infection, which are based on a single experiment using five tested insects. For the other replicates, 25–30 nymphs were used for each evaluation day.

doi:10.1371/journal.pone.0140575.g001

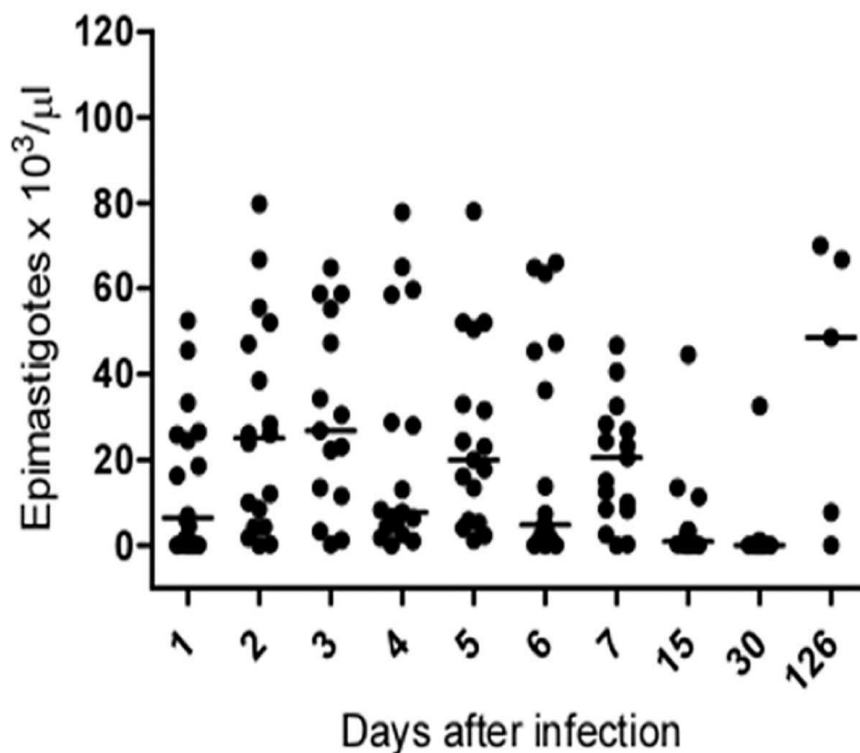


Fig 2. Number of parasites found in the intestinal tract of *T. rangeli*-infected *R. prolixus* 5th instar nymphs that were fed on mice at different stages of infection. The horizontal lines represent the median value obtained for each group.

doi:10.1371/journal.pone.0140575.g002

The number of parasites found in the circulating blood of infected mice was evaluated on 1–7, 15 and 30 dpi. Of the 24 evaluated mice, only two (8.3%; 7 dpi) exhibited *T. rangeli* parasitemia.

Insect-insect *T. rangeli* transmission during hemolymphagy

To evaluate the importance of *T. rangeli* transmission among insects through hemolymphagy, we developed two assays. Initially, the motivation of starved nymphs to feed on a fed conspecific was evaluated. Only one nymph (5%) of the 20 insects evaluated in two different assays attempted to bite the infected nymph during the assay. In this case, the starved nymph remained in contact with the infected one for 2.7 min with no visual ingestion being observed. Because 10 days of starvation is probably too short a time to trigger feeding in *Rhodnius* nymphs, we decided to keep 2nd instar nymphs, which were starved for 20 days, together with one infected, fed 5th instar nymph for 15 days. The intestinal tracts of the nymphs were examined after the insects had molted to the 3rd instar; however, no insect had been infected.

Insect-insect *T. rangeli* transmission during co-feeding on vertebrate

After taking a blood meal on mice together with infected conspecifics, 76.9% of the 5th instar nymphs became infected by *T. rangeli* (Fig 3). Even in assays where one donor nymph shared a mammal host with five recipient nymphs, a similar percentage of infection (63.1%) was observed. Interestingly, 16% of the recipient nymphs became infected when pigeons were used as hosts (1 donor vs 1 recipient). When one donor together with five recipient nymphs were

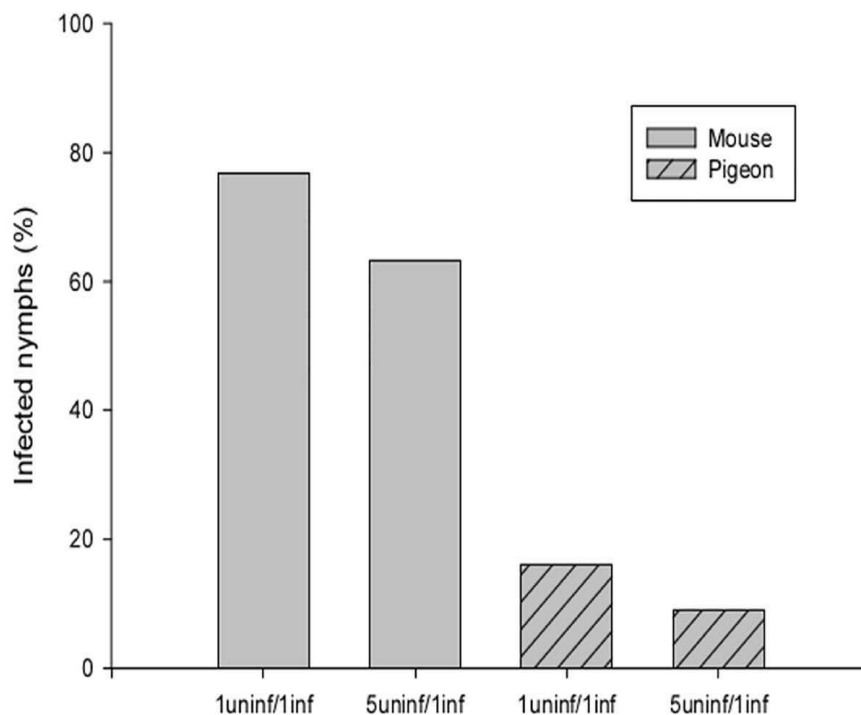


Fig 3. Rates of infection of nymphs that co-fed with *T. rangeli*-infected conspecifics (uninf = uninfected; inf = infected). In the 5uninf/1inf assay using pigeons as hosts, recipient insects were 6 cm apart from the donor.

doi:10.1371/journal.pone.0140575.g003

simultaneously offered a blood meal at two different points on the pigeon, 9% became infected (2 out of 22 individuals, as 3 out of 25 did not feed in the experiments). In the assays in which uninfected nymphs fed on *T. rangeli* exposed pigeons either 30 min or 24 h after parasite inoculation, no insects were found to be infected.

Evaluation of complement-mediated *T. rangeli* lysis

To determine whether metacyclic trypomastigotes are lysed by the complement systems of the mouse and pigeon, parasite suspensions that were obtained from infected insect salivary glands were incubated with serum from both hosts. A lysis of approximately 1% was observed in parasites incubated with heat-inactivated sera from both hosts. In the same way, approximately 3% of the parasites were lysed when incubated with non-heat inactivated serum from mice. However, when parasites were incubated with non-heat inactivated serum from pigeons, approximately 98% of the parasites were lysed after 30 min of incubation (Fig 4).

Discussion

Salivation during feeding is known to occur during both probing and ingestion periods for *R. prolixus* [32], and approximately 50% of the saliva which has previously been produced and stored is released during feeding in live host [33]. We have previously shown that an infected *R. prolixus* 5th instar can bear up to 100,000 parasites, almost all of them metacyclic trypomastigotes, in its salivary glands [26]. The present study showed that approximately 50,000 parasites can be released during blood feeding. Which proportion of this parasite population is liberated on the skin during probing, directly injected into circulating blood or ingested together with the blood, remains to be determined. Nevertheless, even when a host is inoculated with a large

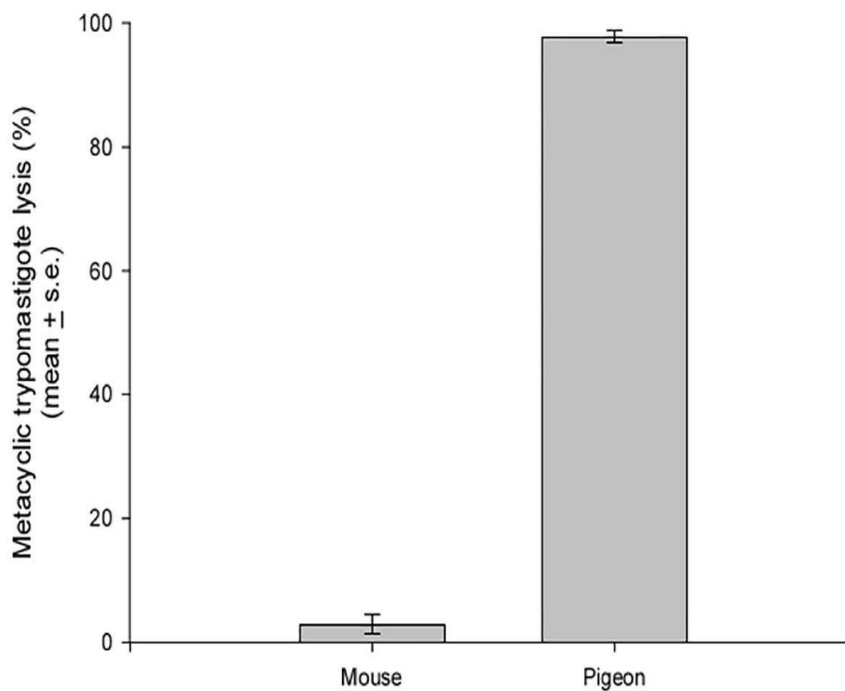


Fig 4. Complement-mediated *T. rangeli* metacyclic trypanomastigote lysis by mouse and pigeon serum. Data are presented as the percentage of lysed trypanomastigotes after 30 min of incubation with non-heat inactivated serum ($n = 3$).

doi:10.1371/journal.pone.0140575.g004

number of parasites, if there are no multiplicative forms present in the vertebrate host, as suggested by several studies [9, 34], the infection will be gradually lost. To evaluate this hypothesis, we infected mice through a single contact with an infected insect and offered these mice to uninfected nymphs on different days after infection. The observed infection rates demonstrated that the transmission of *T. rangeli* from insect to mouse is highly efficient, reaching values as high as 90%. In a similar manner, these infected mice were able to transmit the parasite to approximately 80% of the insects that fed on them. Moreover, these elevated infection rates were maintained in insects that fed on mice with old infections, clearly demonstrating that the infection is not lost over time. Given these results, it is likely that *T. rangeli* develops a multiplicative cycle in its vertebrate host. The presence of reproductive forms of *T. rangeli* in vertebrates is suggested by results obtained in some studies [7, 8, 35]; however, strong evidence of this presence has not been presented. Our results add more support for this idea. In addition, despite the effectiveness of the transmission, parasites were rarely found circulating in mouse blood, even on day 0 when a large number of the parasites had been injected by the infected insect; this finding raises the possibility that the parasites can hide in some host tissues or organs.

Once *T. rangeli* colonizes the intestinal tract of the vector, the parasite must cross two important physical barriers, the intestinal epithelium and the salivary glands, to be transmitted to vertebrate hosts. In the present work, approximately 5% of nymphs that presented parasites in the intestinal tract also showed parasites in the hemolymph. The number of parasites found in the intestinal tract of these insects depended on the age of the mouse infection. Interestingly, mice with older infections produced infections with similar numbers of parasites to those of recently infected mice. Based on these results, we speculate that the parasite might modify its capacity to infect insects over time due to development in the vertebrate host. Nevertheless, the

number of parasites present in the insect gut appears unrelated to hemolymph invasion because this apparently occurred at random. The ability to reach the hemolymph appears to serve as a critical filter because hemolymph infections can occur at frequencies from 2 to 50% in insects with parasites in the intestinal tract [25, 36–38]. Perimicrovillar membranes have been implicated in the invasion process because insect exposure to radiation affects the organization and structure of microvilli, thereby allowing the parasites to reach the hemolymph earlier than in insects that are not exposed to radiation [39]. No parasites were found inside the insect salivary glands at two months post infection. Possibly, this period might be too short to allow the parasite to complete its development in the infection conditions we used. In infections in which the hemolymph was directly inoculated with the parasites from the same strain, a nine-day delay was observed before the parasites began to invade the salivary glands [26].

Because a small proportion of insects harboring parasites in the intestinal tract will also present infective parasites in the salivary glands, an effective transmission strategy is crucial for the efficient spread of the parasite to both vertebrate and triatomine hosts. Under our experimental conditions, *R. prolixus* nymphs did not exhibit motivation to feed on conspecifics. Because *R. prolixus* can survive for up to three months without food [40], we increased the starvation status in experimental nymphs and allowed them to remain with infected, fed nymphs for a longer period. However, prolonged nutritional stress associated with an increase in the period of exposure to infected nymphs did not promote parasite transmission. Hemolymphagy has been described for several triatomine species [29, 41] including *R. prolixus* [21, 42], and the occurrence of this behavior has been associated with nutritional stress at the early nymphal stages [21, 29]. Transmission of *T. rangeli* through hemolymphagy has been reported [21] when *R. prolixus* 1st instar nymphs were infected after remaining together with *R. prolixus*- and *Rhodnius robustus*-infected 5th instar nymphs. Nevertheless, another study did not find transmission when 1,000 *R. prolixus* nymphs were exposed to infected insects for 15 days [43]. Under the conditions evaluated in the present study, the transmission of *T. rangeli* between nymphs through hemolymphagy would not play a relevant role in parasite circulation. Even so, it would be relevant to evaluate the possibility of insect-insect *T. rangeli* transmission in other contexts, such as through hemolymphagy during the molting period or in instances of coprophagy or cleptohematophagy (the taking of blood from recently fed conspecifics, as often observed in laboratory feeds).

An alternative mode of *T. rangeli* transmission is parasite transference from an infected to an uninfected insect when the insects feed simultaneously on the same vertebrate host. The co-feeding transmission using mammals as hosts has been previously reported in triatomines [22], although the experimental conditions were not clearly described. In the present study, we used a device to physically separate infected and uninfected nymphs to prevent cleptohematophagy. Under these conditions, a high transmission rate was achieved. Even when the infected nymph was allowed to feed with five uninfected nymphs, the transmission rate was still elevated. Therefore, our data strongly suggest that this mode of transmission can play a relevant role in the maintenance of *T. rangeli* in nature in the absence of a host with systemic infection. The efficiency of pathogen transmission by co-feeding in ticks has been demonstrated for several tick-borne viruses and bacteria (see revision in [44]). Virus transmission was supported even when natural hosts having neutralizing antibodies were used as hosts [45]. Co-feeding transmission of West Nile virus has been showed to occur in argasid tick species, which unlike ixodid ticks, typically feed for less than 2 hours [46]. In addition, the vesicular stomatitis virus has been showed to be transmitted by black flies during co-feeding in non viremic hosts [47].

Unexpectedly, when pigeons were used as a blood source, 16% of the healthy nymphs that had co-fed with one infected conspecific became infected. Parasites were transmitted even when uninfected and infected nymphs were placed at distant points on the host. It is worth

mentioning that this represents the first time that a bird has been implicated in the transmission of a trypanosome from the *T. cruzi* clade. The refractory conditions of avian blood for trypanosomes of this clade is well known because the infectious forms are lysed by the avian complement system [48, 49], which plays an important role in innate immunity by acting as a first barrier against pathogens. Cultured epimastigotes of *T. rangeli* have been shown to be resistant to complement-mediated lysis in several mammal species [16, 50, 51]. These *T. rangeli* forms, however, are lysed by normal fresh chicken serum [50]. To our knowledge, no studies have evaluated the susceptibility of *T. rangeli* metacyclic trypomastigotes to a complement system; therefore, we incubated these forms with non-heat inactivated sera from mouse and pigeon. As seen with epimastigotes, metacyclic trypomastigotes were lysed by pigeon but not by mouse serum. Nevertheless, our results showed insect-insect transmission during co-feeding when pigeons were used as hosts, even if in a lower rate than those observed when mice were the living hosts. This surprising finding suggests the possibility that among the thousands of parasites liberated during the blood ingestion, some can reach the receiving insect before the action of complement. Once inside the insect intestinal tract, parasites would be protected against complement action because both the saliva and the intestinal contents of triatomines contain complement inhibitors that protect the intestinal epithelium from damage [52].

Triatomine insects are opportunistic feeders that are adapted to occasional, large meals. These insects live in small colonies in association with warm-blooded animals in nests that are usually temporarily occupied and that depend on the food supply in the vicinity and offspring growth. Feeding motivation, as several other behaviors expressed by triatomines, is temporally-modulated, being the individuals more likely to feed during the first hours of the night (see revision in [53]). In this sense, one can expect that co-feeding is a behavior commonly found in the natural refuges of these insects. Our results indicate that the presence of a vertebrate, independently of being infected, and even if transient, would ensure parasite spreading among individuals in a colony. Since *Rhodnius* species can be found associated with avian nests [54, 55] the finding that birds can also allow parasite transfer between insects opens a new avenue of ecological and epidemiological studies on *T. rangeli* transmission.

Conclusions

Our results showed that *T. rangeli* is easily acquired by triatomines during blood feeding on mice. Even if no parasitemia is apparent, these infected mammals can act as sources of *T. rangeli* for long periods. *T. rangeli* was also efficiently transmitted from insect to insect by co-feeding on mice. In addition, we showed for the first time that transmission by co-feeding on pigeons is also feasible. Based on our results, we suggest that both, efficient parasite acquisition during blood feeding on infected mammals and the process of infection through co-feeding, would ensure a high number of insects harboring parasites in their intestinal tracts. Due to the variable (sometimes low) rate of parasites crossing the intestinal epithelium a higher number of gut infected insects would mean that a higher percentage of them present parasites in the salivary glands, therefore increasing the probabilities of transmission to mammal hosts. Finally, efficient transmission by inoculation of infective forms to mammal hosts would grant cycle completion.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: AAG MHP. Performed the experiments: LLF. Analyzed the data: LLF AAG. Contributed reagents/materials/analysis tools: MHP AAG. Wrote the paper: LLF MHP AAG. Obtained permission for animal use: AAG.

References

1. Tejera E. Un nouveau flagella de *Rhodnius prolixus*. *Trypanosoma* (ou *Crithidia*) *rangeli* n.sp. Bull Soc Path Exot. 1920; 13: 527–530.
2. D'Alessandro-Bacigalupo A, Saraiva NG. *Trypanosoma rangeli*. In: Kreier JP, Baker J, editors. Parasitic Protozoa. California: Academic Press; 1992. pp. 1–54.
3. Brecher G, Wigglesworth VB. The transmission of *Actinomyces rhodnii* Erikson in *Rhodnius prolixus* Stal (Hemiptera) and its influence on the growth of the host. Parasitology. 1944; 35: 220–224.
4. Lake P, Friend WG. A monoxenic relationship, *Nocardia rhodnii* Erikson in the gut of *Rhodnius prolixus* Stal (Hemiptera: Reduviidae). Proc Entomol Soc Ont. 1967; 98: 53–57.
5. Grewal MS. Pathogenicity of *Trypanosoma rangeli* Tejera, in the invertebrate host. Exp Parasitol. 1957; 6: 123–130. PMID: [13414810](#)
6. Fellet MR, Lorenzo MG, Elliot SL, Carrasco D, Guarneri AA. Effects of infection by *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* on the reproductive performance of the vector *Rhodnius prolixus*. PLoS One. 2014; 9(8):e105255. doi: [10.1371/journal.pone.0105255](#) PMID: [25136800](#)
7. Scorza C, Urdaneta-Morales S, Tejero F. *Trypanosoma* (*Herpetosoma*) *rangeli* Tejera, 1920. Preliminary report on histopathology in experimentally infected mice. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 1986; 28: 371–378. PMID: [3589398](#)
8. Osório Y, Travi BL, Palma G, Saravia NG. Infectivity of *Trypanosoma rangeli* in a promonocytic mammalian cell line. J Parasitol. 1995; 81: 687–693. PMID: [7472856](#)
9. Eger-Mangrich I, Oliveira MA, Grisard EC, De Souza W, Steindel M. Interaction of *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920 with different cells line *in vitro*. Parasitol Res. 2001; 87: 505–509. PMID: [11411954](#)
10. Chagas C. Nova tripanossomiase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., m. sp., agente etiológico de nova entidade mórbida do homem. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1909; 1: 159–218.
11. Molyneux DH, Killick-Kendrick R, Peters W. Morphology, ultrastructure and life cycles. In: Peters W, Killick-Kendrick R, editors. The leishmaniasis in biology and medicine. London: Academic Press; 1987. pp. 121–176.
12. Ormerod WE. Development of *Trypanosoma brucei* in the mammalian host. In: Lumsden WH, Evans DA, editors. Biology of the Kinetoplastida. London: Academic Press; 1979. p. 339–393.
13. Mansfield J. M. Nonpathogenic trypanosomes of mammals. In: Kreier JP, editor. Parasitic protozoa. New York: Academic Press; 1977. pp. 297–327.
14. de Souza AA, Povoá M, Lima A, Cedillos R. Vertebrate hosts and vectors of *Trypanosoma rangeli* in the Amazon basin of Brazil. Am J Trop Med Hyg. 1983; 32: 1251–1259. PMID: [6418015](#)
15. Maia da Silva F, Rodrigues AC, Campaner M, Takata CSA, Brigido MC, Junqueira ACV, et al. Randomly amplified polymorphic DNA analysis of *Trypanosoma rangeli* and allied species from human, monkeys and other sylvatic mammals of the Brazilian Amazon disclosed a new group and a species-specific marker. Parasitology. 2004; 128: 283–294. PMID: [15074877](#)
16. 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 Island, Santa Catarina State: first report of this trypanosome in Southern Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1991; 86: 73–79. PMID: [1842404](#)
17. Ramirez LE, Lages-Silva E, Alvarenga-Franco F, Matos A, Vargas N, Fernandes O, et al. 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: 89–98.
18. Maia da Silva F, Junqueira ACV, Campaner M, Rodrigues AC, Crisante G, Ramirez LE, et al. Comparative phylogeography of *Trypanosoma rangeli* and *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae) supports a long coexistence of parasite lineages and their sympatric vector. Mol Ecol. 2007; 16: 3361–3373. PMID: [17688539](#)
19. Vallejo GA, Guhl F, Carranza JC, Moreno J, Triana O, Grisard EC. Parity between kinetoplast DNA and mini-exon gene sequences supports either clonal evolution or speciation in *Trypanosoma rangeli* strains isolated from *Rhodnius colombiensis*, *R. pallenscens* and *R. prolixus* in Colombia. Infect Genet Evol. 2003; 3: 39–45. PMID: [12797971](#)
20. Barreto-Santana D, Schuenker LS, da Fonseca AR, Gurgel-Gonçalves R, Cuba-Cuba CA. Susceptibilidade de diferentes espécies de *Rhodnius* (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) a uma cepa brasileira de *Trypanosoma rangeli* (SC58/KP1). Biomedica. 2014; 35: 1.
21. Añez N. Studies on *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920. III. Direct transmission of *T. rangeli* between triatomine-bugs. Ann Trop Med Parasitol. 1982; 76: 641–647. PMID: [6763503](#)

22. Tobie EJ. Experimental transmission and biological comparison of strains of *Trypanosoma rangeli*. *Exp Parasitol*. 1961; 11: 1–9. PMID: [13831308](#)
23. Schottelius J. Neuraminidase fluorescent test for differentiation of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli*. *Trop Med Parasitol*. 1987; 38: 323–327. PMID: [3327143](#)
24. Vallejo GA, Marinkelle CJ, Guhl F, Sánchez N. Mantenimiento en el laboratorio de *Trypanosoma (Herpetosoma) rangeli* Tejera, 1920. *Rev Biol Trop*. 1986; 34: 75–81. PMID: [3313550](#)
25. Ferreira LL, Lorenzo MG, Elliot SL, Guarneri AA. A standardizable protocol for infection of *Rhodnius prolixus* with *Trypanosoma rangeli*, which mimics natural infections and reveals physiological effects on infection upon the insect. *J Invert Pathol*. 2010; 105: 91–97.
26. Paim RMM, Pereira MH, Araújo RN, Gontijo NF, Guarneri AA. The interaction between *Trypanosoma rangeli* and the nitrophorins in the salivary glands of the triatomine *Rhodnius prolixus* (Hemiptera; Reduviidae). *Insect Biochem Mol Biol*. 2013; 43: 229–236. doi: [10.1016/j.ibmb.2012.12.011](#) PMID: [23295786](#)
27. Morales L, Romero I, Diez H, Del Portillo P, Montilla M, Nicholls S, et al. Characterization of a candidate *Trypanosoma rangeli* small nucleolar RNA gene and its application in a PCR-based parasite detection. *Exp Parasitol*. 2002; 102: 72–80. PMID: [12706742](#)
28. Brener Z. Therapeutic activity and criterion of cure in mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1962; 4: 389–396. PMID: [14015230](#)
29. Alves CL, Araujo RN, Gontijo NF, Pereira MH. Importance and physiological effects of hemolymphagy in triatomines (Hemiptera: Reduviidae). *J Med Entomol*. 2011; 48: 372–381. PMID: [21485376](#)
30. Mendes-Sousa AF, Nascimento AAS, Queiroz DC, Vale VF, Fujiwara RT, Araújo RN, et al. Different host complement systems and their interactions with saliva from *Lutzomyia longipalpis* (Diptera, Psychodidae) and *Leishmania infantum* promastigotes. *PLoS One*. 2013; 8(11):e79787. doi: [10.1371/journal.pone.0079787](#) PMID: [24255715](#)
31. Zar JH. *Biostatistical Analysis*. New Jersey: Prentice Hall; 1999. pp. 209.
32. Soares AC, Carvalho-Tavares J, Gontijo NF, Santos VC, Teixeira MM, Pereira MH. Salivation pattern of *Rhodnius prolixus* (Reduviidae; Triatominae) in mouse skin. *J Insect Physiol*. 2006; 52: 468–472. PMID: [16580013](#)
33. Nussenzweig RH, Bentley DL, Ribeiro JM. Nitric oxide loading of the salivary nitric-oxide-carrying hemoproteins (nitrophorins) in the blood-sucking bug *Rhodnius prolixus*. *J Exp Biol*. 1995; 198: 1093–1098. PMID: [8627144](#)
34. Tanoura K. *Trypanosoma rangeli* in vitro metacyclogenesis and fate of metacyclic trypomastigotes after infection to mice and fibroblast cultures. *J Eukaryot Microbiol*. 1999; 46: 43–48. PMID: [10188259](#)
35. Urdaneta-Morales S, Tejero F. *Trypanosoma (Herpetosoma) rangeli* Tejera 1920: Intracellular amastigote stages of reproduction in white mice. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1986; 28: 166–169. PMID: [3823740](#)
36. Tobie EJ. Biological factors influencing transmission of *Trypanosoma rangeli* by *Rhodnius prolixus*. *J Parasitol*. 1965; 51: 837–841. PMID: [5857287](#)
37. Marinkelle CJ. Pathogenicity of *Trypanosoma rangeli* for *Rhodnius prolixus* Stal in nature (Hemiptera: Reduviidae) (Kinetoplastida: Trypanosomatidae). *J Med Entomol*. 1968; 5: 497–499. PMID: [5699971](#)
38. Tobie EJ. Observations on the development of *Trypanosoma rangeli* in the hemocel of *Rhodnius prolixus*. *J Invert Pathol*. 1970; 15: 118–125.
39. Gomes SAO, Graciano GL, Nogueira NFS, de Souza W, Garcia ES, Azambuja P. Effects of gamma irradiation on the development of *Trypanosoma rangeli* in the vector *Rhodnius prolixus*. *J Invertebr Pathol*. 2002; 79: 86–92. PMID: [12095237](#)
40. Friend WG, Smith JJB. La fisiología de los triatomíneos con especial referencia a la alimentación por sangre. In: Carcavallo RU, Rabinovich JE, editors. *Factores biológicos y ecológicos en la enfermedad de Chagas*. Organización Panamericana de la Salud; 1985. pp. 55–72.
41. Ryckman RE. Recent observations of cannibalism in *Triatoma* (Hemiptera: Reduviidae). *J Parasitol*. 1951; 37: 433–434. PMID: [14889379](#)
42. Brumpt E. Importance du cannibalisme et de la coprophagie chez les Réduvidés hématophages (*Rhodnius*, *Triatoma*) pour la conservation des trypanosomes pathogènes en dehors de l'hôte vertébré. *Bull Soc Pathol Exot*. 1914; 7: 702–705.
43. Marinkelle CJ. Direct transmission of *Trypanosoma cruzi* between individuals of *Rhodnius prolixus* Stal. *Rev Biol Trop*. 1965; 13: 55–58.
44. Randolph SE, Gern L, Nuttall PA. Co-feeding ticks: epidemiological significance for tick-borne pathogen transmission. *Parasitol Today*. 1996; 12: 472–479. PMID: [15275266](#)

45. Labuda M, Kozuch O, Zuffová E, Elecková E, Hails RS, Nuttall PA. Tick-borne encephalitis virus transmission between ticks co-feeding on specific immune natural rodent hosts. *Virology*. 1997; 235: 138–143. PMID: [9300045](#)
46. Lawrie CH, Uzcátegui NY, Gould EA, Nuttall PA. Ixodid and argasid tick species and West Nile virus. *Emerg Infect Dis*. 2004; 10: 653–657. PMID: [15200855](#)
47. Mead DG, Ramberg FB, Besselsen DG, Maré CJ. Transmission of vesicular stomatitis virus from infected to noninfected black flies co-feeding on nonviremic deer mice. *Science*. 2000; 287: 485–487. PMID: [10642550](#)
48. Kierszenbaum F, Ivanyi J, Budzko DB. Mechanisms of natural resistance to trypanosomal infection. Role of complement in avian resistance to *Trypanosoma cruzi* infection. *Immunology*. 1976; 30: 1. PMID: [765264](#)
49. Mintergoedbloed E, Croon JJAB. The insusceptibility of chickens to *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1981; 75: 350–353. PMID: [7034309](#)
50. Schottelius J, Marinkelle CJ, Gomez-Leiva MA. Comparative study, *in vitro* comparative investigations of Latin American trypanosomes with lectins and complement lysis test. *Trop Med Parasitol*. 1986; 37: 54–58. PMID: [3085200](#)
51. Acosta L, Romanha AJ, Cosenza H, Krettli AU. Trypanosomatid isolates from Honduras: differentiation between *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli*. *Am J Trop Med Hyg*. 1991; 44: 676–683. PMID: [1907109](#)
52. 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. doi: [10.1371/journal.pone.0006047](#) PMID: [19557176](#)
53. Barrozo RB, Schilman PE, Minoli SA, Lazzari CR. Daily rhythms in disease-vector insects. *Biol Rhythm Res*. 2004; 35: 79–92.
54. Dias FBS, Bezerra CM, Machado EMDM, Casanova C, Diotaiuti L. Ecological aspects of *Rhodnius nasutus* Stål, 1859 (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) in palms of the Chapada do Araripe in Ceará, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2008; 103: 824–830. PMID: [19148424](#)
55. Teixeira AR, Monteiro PS, Rebelo JM, Argañaraz ER, Vieira D, Lauria-Pires L, et al. Emerging Chagas disease: trophic network and cycle of transmission of *Trypanosoma cruzi* from palm trees in the Amazon. *Emerg Infect Dis*. 2001; 7: 100. PMID: [11266300](#)