

MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS RENÉ RACHOU
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

EFEITO DA TEMPERATURA NA INFECÇÃO DE *RHODNIUS PROLIXUS* POR
TRYPANOSOMA CRUZI E *TRYPANOSOMA RANGELI*.

por

Juliana de Oliveira Rodrigues

BELO HORIZONTE

FEVEREIRO / 2013

DISSERTAÇÃO

MDIP-CPqRR

J.O. RODRIGUES

2013

MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS RENÉ RACHOU
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

**EFEITO DA TEMPERATURA NA INFECÇÃO DE *RHODNIUS PROLIXUS* POR
TRYPANOSOMA CRUZI E *TRYPANOSOMA RANGELI*.**

por

Juliana de Oliveira Rodrigues

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

Orientação: Dra. Alessandra Aparecida Guarneri

BELO HORIZONTE

FEVEREIRO / 2013

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

R696e Rodrigues, Juliana de Oliveira.
2013

Efeito da temperatura na infecção de *Rhodnius prolixus* por *Trypanosoma cruzi* e *Trypanosoma rangeli* / Juliana de Oliveira Rodrigues. – Belo Horizonte, 2013.

XVIII, 83 f.: il.; 210 x 297mm.

Bibliografia: f. 79 - 101

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

1. Doença de Chagas/transmissão 2. *Trypanosoma cruzi*/parasitologia 3. *Trypanosoma rangeli*/parasitologia 4. Interações Hospedeiro-Parasita/fisiologia I. Título. II. Guarneri, Alessandra Aparecida (Orientação).

CDD – 22. ed. – 616.936 3

MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS RENÉ RACHOU
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

EFEITO DA TEMPERATURA NA INFECÇÃO DE *RHODNIUS PROLIXUS* POR
TRYPANOSOMA CRUZI E *TRYPANOSOMA RANGELI*.

por

Juliana de Oliveira Rodrigues

Banca Examinadora:

Profa. Dra. Alessandra Aparecida Guarneri (Presidente)

Prof. Dr. Rodrigo Pinto Soares

Profa. Dra. Andrea Mara Macedo

Dissertação defendida e aprovada em: 28/02/2013

Aos meus pais e ao meu irmão.

A todos aqueles que de alguma maneira contribuíram para a minha formação
pessoal e profissional.

“Todo o futuro da nossa espécie, todo o governo das sociedades, toda a prosperidade moral e material das nações dependem da ciência, como a vida do homem depende do ar. Ora, a ciência é toda observação, toda exatidão, toda verificação experimental. Perceber os fenômenos, discernir as relações, comparar as analogias e as dessemelhanças, classificar as realidades, e induzir as leis, eis a ciência; eis, portanto, o alvo que a educação deve ter em mira.”

Rui Barbosa

AGRADECIMENTOS

À Prof^a. Dra. Alessandra Guarneri, por ter acreditado no meu potencial e confiado a mim esse trabalho. Pela oportunidade de aprendizado e orientação que me proporcionaram um rico conhecimento científico e profissional. Pelos conselhos e amizade construída ao longo desses anos de convivência.

Ao Dr. Marcelo Gustavo Lorenzo, pela colaboração e disponibilidade para enriquecedoras discussões científicas.

Ao Prof^o. Dr. Simon Elliot, Sam, pela colaboração nesse projeto.

Ao Prof^o. Dr. Olindo Assis, pelo auxílio na técnica de Citometria de Fluxo.

À Dra. Liléia Diotaiuti por ter me recebido no laboratório de Triatomíneos.

À Dra. Juliana Alves da Silva, Ju, que caiu do céu como um anjo e contribuiu imensamente para os experimentos de biologia molecular e análises dos dados. Pela imensurável ajuda e convivência prazerosa.

Aos professores da pós-graduação pelos ensinamentos. De maneira especial ao Dr. João Carlos Pinto Dias pelo exemplo de profissional e pela acolhida sempre carinhosa.

Ao Prof^o. Dr. Jarbas que me ingressou na carreira científica.

À Rafa Paim, pela disponibilidade em ajudar nos experimentos e escrita. Pelo incentivo e amizade. Pelas risadas e bons momentos vividos nas viagens a congressos.

À minha pequena grande amiga Robertinha! Pela imensurável ajuda. Pela alegria contagiante mesmo nos dias mais difíceis. Pela paciência e conselhos. Pelos inúmeros bons momentos vividos no cotidiano e viagens. Pela compreensão, carinho e palavras de incentivo.

À Fellet, Thessinha, Lelê e Lu que dividiram comigo momentos de aflições e angustias, mas, sobretudo de felicidade! Pela amizade sincera!

Ao New, por estar sempre disposto a ajudar com um sorriso no rosto.

Ao João Victor, pelo ajuda nas formatações. Pela amizade, carinho e sábios conselhos.

Ao Luis, pelas palavras de força e estímulo.

À Fabi, que entrou na minha vida por acaso e conquistou minha amizade com seu jeito alegre e admirável de viver! Pela amizade sólida e verdadeira. Pelas boas risadas e momentos únicos!

À Gabizinha, anjinho que trouxe outro anjo para a minha vida!

À Ana Lu, amiga confidente que conquistou minha admiração e carinho. Por entender minhas inquietudes e saber acalmar meu coração. Por estar sempre ao meu lado mesmo com a distância física.

À Laurinha, por estar sempre presente. Por entender a minha ausência e estar sempre disposta a momentos de descontração para aliviar o estresse. Por todos os conselhos, incentivo e força.

À Raquelita e a Elisuda pelos momentos diários de descontração e boas risadas!

À Gina, pela recepção tão carinhosa na minha chegada ao laboratório.

Aos demais colegas do laboratório, simplesmente pelo agradável convívio. Em especial ao João Paulo, José Manuel, Marinely e Ivana.

Ao Thi, pelo amor sem medidas. Pela compreensão e paciência nos períodos de estresse. Por entender o meu momento e abdicar de datas festivas para estar ao meu lado. Pela cumplicidade e por cada gesto e demonstração de amor e carinho!

Ao meu irmão, Xand, alicerce da minha vida! Pela amizade e carinho que traz uma leveza a mais para minha vida!

À minha mãe, meu verdadeiro exemplo de vida, fé e coragem. Pelo amor incondicional. Por acreditar em mim sempre. Ao meu pai, meu exemplo de superação e força. Por não terem medido esforços para a minha formação, abrindo mão dos próprios sonhos em prol dos meus!

A Deus, meu motivo de força que nunca me deixou desistir dos meus objetivos e sonhos. Por iluminar o meu caminho e me amparar nos momentos mais difíceis.

Muito obrigado!

Agradeço às instituições financeiras que apoiaram diretamente esse trabalho:

Ao Centro de Pesquisas René Rachou / FIOCRUZ, pela oportunidade de realizar esse trabalho;

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou;

A Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais – FAPEMIG,

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq;

Ao INCT, Institutos Nacionais de Ciência e Tecnologia.

Agradeço também a Biblioteca do CPqRR, pela catalogação e normalização da dissertação.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	XII
LISTA DE TABELAS.....	XIV
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	XV
RESUMO.....	XVI
ABSTRACT.....	XVII
1 INTRODUÇÃO.....	19
2 OBJETIVOS.....	22
2.1 Objetivo Geral.....	22
2.2 Objetivos Específicos.....	22
3 REVISÃO DA LITERATURA.....	24
3.1 Triatomíneos.....	24
3.2 Associações entre triatomíneos e o <i>Trypanosoma cruzi</i>	27
3.3 Associações entre triatomíneos e <i>Trypanosoma rangeli</i>	30
3.4 O papel da temperatura no desenvolvimento de insetos e nas interações com seus parasitos.....	34
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	38
4.1 – Triatomíneos.....	38
4.2 – Parasitos.....	38
4.3 – Avaliação do crescimento dos parasitos em meio de cultura, submetidos a diferentes temperaturas.....	39
4.3.1 - Reagentes e Soluções.....	39
4.3.2 – Marcação dos Parasitos.....	40
4.3.3 – Ensaio Biológico.....	40
4.4 – Avaliação do desenvolvimento de insetos infectados submetidos a diferentes temperaturas.....	42
4.4.1 - Infecção por <i>Trypanosoma cruzi</i>	42
4.4.2 - Infecção por <i>Trypanosoma rangeli</i>	42

4.5 – Quantificação do <i>Trypanosoma cruzi</i> no trato intestinal de <i>Rhodnius prolixus</i> , em insetos submetidos a diferentes temperaturas	43
4.5.1 - Infecção por <i>Trypanosoma cruzi</i> e ensaio biológico	43
4.5.2 – Extrações de DNA.....	45
4.5.3 – PCR quantitativo em Tempo Real.....	45
4.6 – Análises Estatísticas.....	47
5 RESULTADOS.....	49
5.1 - Avaliação do crescimento dos parasitos em meio de cultura, submetidos a diferentes temperaturas.....	49
5.2 – Avaliação do desenvolvimento de insetos infectados submetidos a diferentes temperaturas.....	52
5.2.1 Insetos infectados por <i>Trypanosoma cruzi</i>	52
5.2.2 Insetos infectados por <i>Trypanosoma rangeli</i>	56
5.3 – Quantificação do <i>Trypanosoma cruzi</i> no trato intestinal de <i>Rhodnius prolixus</i> , em insetos submetidos a diferentes temperaturas	62
7 CONCLUSÕES.....	77
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	79

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Ciclo biológico de *Rhodnius prolixus* representando o desenvolvimento do tipo paurometábolo dos triatomíneos (Foto: Newmar Pinto Marlière). Legenda: NI, ninfa de primeiro estágio; NII, ninfa de segundo estágio; NIII, ninfa de terceiro estágio; NIV, ninfa de quarto estágio e NV, ninfa de quinto estágio.....24
- Figura 2** – Ciclo Biológico do *T. cruzi* no triatomíneo (hospedeiro invertebrado). (Adaptado de Garcia *et al.*, 2007)28
- Figura 3** – Ciclo biológico do *T. rangeli* no triatomíneo (hospedeiro invertebrado). (Adaptado de Grisard e Steindel, 2003).....32
- Figura 4** – Caixas de temperatura controladas, mantidas em estufa BOD, onde foram realizados os ensaios.....41
- Figura 5** – Esquema do tubo digestivo de um triatomíneo. As setas indicam cada porção do tubo digestivo (Adaptado de Garcia *et al.*, 2007).....43
- Figura 6** – Crescimento de epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* e *Trypanosoma rangeli* em cultura, mantidos em diferentes temperaturas. As barras de erro representam a média de duas repetições.....50
- Figura 7** – Mortalidade de epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* e *Trypanosoma rangeli* em cultura, mantidos em diferentes temperaturas. Foram incluídos os dados de células coradas com PI e com FDA+PI, indicativo de células mortas ou em processo de morte celular. As barras de erro representam a média de duas repetições.....51
- Figura 8** – Efeito da infecção por *Trypanosoma cruzi* no período necessário para alcançar o terceiro estágio de ninfas de *Rhodnius prolixus* mantidas em diferentes temperaturas. Os valores de p indicados em cada gráfico representam a significância estatística das comparações entre os tratamentos (Log-Rank).....53
- Figura 9** – Efeito da infecção por *Trypanosoma cruzi* nas taxas de mortalidade de ninfas de *Rhodnius prolixus* mantidas a diferentes temperaturas. Os valores de p indicados em cada gráfico representam a significância estatística das comparações entre os tratamentos (Log-Rank).....55

- Figura 10** – Efeito da infecção por *Trypanosoma rangeli* T1 no período necessário para alcançar o quinto estágio de ninfas de *Rhodnius prolixus* mantidas em diferentes temperaturas. Os valores de p indicados em cada gráfico representam a significância estatística das comparações entre os tratamentos (Log-Rank).....58
- Figura 11** – Efeito da infecção por *Trypanosoma rangeli* T2 no período necessário para alcançar o quinto estágio de ninfas de *Rhodnius prolixus* mantidas em diferentes temperaturas. Os valores de p indicados em cada gráfico representam a significância estatística das comparações entre os tratamentos (Log-Rank).....59
- Figura 12** - Quantificação através de contagem em câmara de Neubauer do número de parasitos de *Trypanosoma cruzi* no trato intestinal de *Rhodnius prolixus*.....63
- Figura 13** - Quantificação por qPCR do número de parasitos de *Trypanosoma cruzi* no trato intestinal de *Rhodnius prolixus*, 15 dias após a infecção dos insetos.....64
- Figura 14** - Quantificação por qPCR do número de parasitos de *Trypanosoma cruzi* no trato intestinal de *Rhodnius prolixus*, 30 dias após a infecção dos insetos.....65
- Figura 15** - Quantificação por qPCR do número de parasitos de *Trypanosoma cruzi* no trato intestinal de *Rhodnius prolixus*, 60 dias após a infecção dos insetos.....66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Sequências dos iniciadores específicos para <i>T. cruzi</i> utilizados para amplificação dos produtos de DNA por PCR em tempo real (Cummings e Tarleton, 2003).....	46
Tabela 2 – Efeito da infecção por <i>Trypanosoma cruzi</i> no <i>fitness</i> de ninfas de <i>Rhodnius prolixus</i>	54
Tabela 3 – Efeitos da infecção por <i>Trypanosoma rangeli</i> no <i>fitness</i> de ninfas de <i>Rhodnius prolixus</i>	60
Tabela 4 – Taxa de infecção de ninfas de <i>Rhodnius prolixus</i> 30 dias pós-infecção.....	61

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AR – Ampola Retal

BOD – Biochemical Oxygen Demand

°C – Grau Celsius

CEUA – Comitê de Ética no Uso de Animais

CO₂ – Dióxido de Carbono

CPqRR – Centro de Pesquisas René Rachou

DNA – Ácido desoxiribonucléico

FDA – Diacetato de Fluoresceína

FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz

IMA – Intestino Médio Anterior

IMP – Intestino Médio Posterior

Kg - kilograma

LATEC – Laboratório de Triatomíneos e Epidemiologia da Doença de Chagas

LIT – Liver Infusion Tryptose

mg – miligramas

nM – Nanomolar

Na₂HPO₄ – Sódio fosfato

pb – Pares de Bases

PBS – Phosphate Buffered Saline

PI – Iodeto de Propideo

qPCR – PCR quantitativo em Tempo Real

T1- Tratamento 1

T2 – Tratamento 2

WHO - World Health Organization

μL – Microlitro

RESUMO

A temperatura ambiental afeta diversos processos bioquímicos, fisiológicos e comportamentais, especialmente em animais ectotérmicos. Mudanças nesse parâmetro podem alterar o *fitness* de insetos vetores e sua distribuição no ambiente, modificando conseqüentemente, a dinâmica de transmissão de doenças. O objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos da temperatura no desenvolvimento da infecção de *Trypanosoma cruzi* e *Trypanosoma rangeli* em *Rhodnius prolixus*. Os ensaios com *T. rangeli* foram desenvolvidos com parasitos submetidos a dois tratamentos. *T. rangeli* T1 foram obtidos através de passagens em LIT por três meses. *T. rangeli* T2 foram mantidos em LIT por um mês após uma passagem triatomíneo-camundongo. Inicialmente, o crescimento dos parasitos em meio de cultura submetidos a diferentes temperaturas (21, 24, 27 e 30°C) foi avaliado. O crescimento do *T. cruzi* foi termodependente, com um aumento de 28 vezes da população mantida em 30°C ao final de sete dias. A mortalidade ficou abaixo dos 10%, exceto para os parasitos mantidos a 21°C, onde esse valor ficou próximo aos 20%. Para os dois tratamentos de *T. rangeli*, o crescimento máximo foi observado a 27°C. Entretanto, as populações de *T. rangeli* T2 cresceram mais do que as de *T. rangeli* T1 e apresentaram taxas de mortalidade mais baixas, em torno de 5%. O próximo objetivo foi avaliar diferentes parâmetros fisiológicos de *R. prolixus* infectados pelos parasitos e submetidos às mesmas condições de temperaturas. A infecção por *T. cruzi* prolongou o período intermudas em todas as temperaturas e reduziu o número de insetos aparentemente saudáveis em 20%. A virulência do parasito foi dependente da temperatura e do estado nutricional dos insetos. *T. rangeli* T1 foi mais virulento do que *T. rangeli* T2, particularmente nas temperaturas mais baixas. Finalmente, o crescimento do *T. cruzi* no inseto foi quantificado por qPCR e câmara de Neubauer. Os resultados, ainda preliminares, corroboraram com os dados do crescimento do parasito em LIT. De maneira geral, os resultados sugerem que os dois parasitos podem ser patogênicos ao vetor na natureza, dependendo das condições a que são submetidos.

ABSTRACT

Environmental temperature affects many biochemical, physiological and behavioural processes, especially in ectotherm animals. Changes in temperature can influence the fitness of insect vectors and modify their distribution in the environment, altering the dynamics for disease transmission. The aim of the present study was to evaluate the effects of temperature on the development of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* in *Rhodnius prolixus* during infection. Assays using *T. rangeli* were developed with parasites which have undergone two different treatments. *T. rangeli* T1 were kept in LIT medium for more than three months with weekly passages. *T. rangeli* T2 were cultured in LIT medium for only one month after a cyclical transmission in mice and triatomines. Initially, the growth of the parasites in culture medium under different temperatures (21, 24, 27 and 30 ° C) was evaluated. Growth of *T. cruzi* epimastigotes was temperature dependent, with a 28 times increase in population size of the culture maintained at 30°C for seven days. The mortality rate was below 10% on average, except for the parasite culture kept at 21°C in which this value was near 20%. For both *T. rangeli* T1 and T2 treatments the largest population growth was observed, at 27°C. However, populations of *T. rangeli* T2 presented growth rates higher than *T. rangeli* T1 and mortality rates were also lower, at around 5%. The next objective was to assess various physiological parameters of *R. prolixus* infected by parasites and subjected to the same temperature conditions. *T. cruzi* Infection delayed moulting times at all temperatures and reduced the number of apparently healthy insects in 20%. Parasite virulence was dependent on temperature and nutritional status of the insects. *T. rangeli* T1 was more virulent than *T. rangeli* T2, particularly at lower temperatures. Finally, the growth of *T. cruzi* in the insect was quantified by qPCR and parasite counts using a Neubauer chamber. The results, although preliminary, seem to corroborate the data for parasite growth from LIT medium culture. Overall, the results suggest that the two parasites may be pathogenic to the vector in nature, depending on the conditions which they are subjected.

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A distribuição espacial e a abundância da maioria dos seres vivos são resultantes de interações entre parâmetros bióticos e abióticos dentro de um ecossistema (Blanford e Thomas, 2000). A temperatura ambiental é um fator abiótico que apresenta um efeito direto na sobrevivência de diferentes animais, principalmente os ectotérmicos. Em insetos, as variáveis climáticas podem promover alterações na fisiologia (Li, *et al.*, 2011; Amarasekare e Savage, 2012), no comportamento (Martin *et al.*, 2011; Ipekdal e Caglar, 2012) e no tamanho do corpo (Reiskind e Zarrabi, 2012). Para os insetos hematófagos a temperatura também apresenta um papel fundamental como estímulo para a localização de seus hospedeiros (Abdullah, 1961).

Sabe-se também que a temperatura ambiental pode influenciar a interação entre hospedeiros e seus parasitos, tanto na habilidade do parasito em colonizar o seu vetor quanto do vetor em se defender dos parasitos (Thomas e Blandford, 2003). Mudanças na temperatura podem alterar o *fitness* de insetos vetores, modificando sua distribuição no ambiente e, conseqüentemente, alterando a dinâmica de transmissão de doenças (Moore *et al.*, 2002). Além disso, muitos estudos vêm demonstrando que a capacidade de um agente patogênico matar o seu hospedeiro depende fundamentalmente da temperatura corporal do hospedeiro, e de como esta varia com as condições ambientais externas (Blanford e Thomas, 1999; Inglis *et al.*, 1997; Thomas e Blanford, 2003).

Os triatomíneos (Hemiptera: Reduviidae) são insetos de hábitos noturnos e hematófagos, que necessitam de sangue em todas as suas fases de desenvolvimento. São primariamente insetos silvestres, vivendo em seus ambientes naturais associados a animais de sangue quente (Lent e Wygodzinsky, 1979). Algumas espécies, no entanto, podem colonizar ambientes humanos, e deste modo, o homem e seus animais domésticos tornam-se sua fonte de alimentação (Schofield, 1994).

Além disso, os triatomíneos também são vetores de protozoários parasitos, como o *Trypanosoma cruzi* e o *Trypanosoma rangeli*. O *T. cruzi* é o agente

etiológico da doença de Chagas, e não tem sido relacionado como patogênico aos seus hospedeiros invertebrados. O *T. rangeli*, embora compartilhe os mesmos hospedeiros com o *T. cruzi*, não causa doença ao homem. Entretanto, este parasito promove diferentes níveis de patogenicidade para o inseto vetor, principalmente às espécies de gênero *Rhodnius* (Brecher e Wigglesworth, 1944; Friend e Smith, 1967; D'Alessandro 1976; Eichler e Schaub, 1998; Ferreira *et al*, 2010). A principal diferença no ciclo biológico dessas duas espécies, é que o *T. cruzi* se desenvolve exclusivamente no interior do trato intestinal dos triatomíneos, enquanto que o *T. rangeli* pode também invadir a hemocele e colonizar as suas glândulas salivares.

A influência da temperatura ambiental vem sendo amplamente estudada para os triatomíneos (Okasha, 1964, Di Luciano, 1983, Lazzari, 1991, Guarneri *et al.*, 2003). Diversos estudos mostram que a temperatura pode afetar diferentes parâmetros biológicos dessas espécies, tais como oviposição, fecundidade, maturidade sexual, dispersão e seleção de esconderijos (Clark, 1935, Lehane *et al.*, 1992, Lazzari, 1991, Schofield *et al.*, 1992, Lorenzo e Lazzari, 1999, Botto-Mahan, 2006). Embora exista uma grande quantidade de estudos associando os fatores climáticos e seus efeitos sobre os processos fisiológicos e comportamentais nas diferentes fases de desenvolvimento dos triatomíneos, até o momento pouco se sabe sobre o papel das condições abióticas na capacidade vetorial dessas espécies considerando os efeitos da interação entre hospedeiros e patógenos. Diante disso, o estudo das relações parasito-hospedeiro-fatores abióticos se torna essencial para um entendimento mais amplo dos fenômenos de interação entre as espécies.

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar os efeitos da temperatura ambiental no desenvolvimento da infecção de *Trypanosoma rangeli* e *Trypanosoma cruzi* em *Rhodnius prolixus*.

2.2 Objetivos Específicos

1. Avaliar se a temperatura ambiental afeta o desenvolvimento dos parasitos em meio de cultura;
2. Avaliar parâmetros de desenvolvimento, como período intermudas, mortalidade e ecdise, em insetos infectados submetidos a diferentes temperaturas;
3. Avaliar quantitativamente o crescimento do *T. cruzi* nas diferentes porções do trato intestinal em insetos submetidos a diferentes temperaturas e em diferentes momentos da infecção.

REVISÃO DA LITERATURA

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Triatomíneos

Os triatomíneos são classificados como insetos pertencentes à família Reduviidae, subfamília Triatominae (Hemiptera, Heteroptera), definida por seu hábito hematófago que está presente em todas as espécies desse grupo. Os triatomíneos são paurometábolos, apresentando cinco fases ninfais e a fase adulta, sendo o repasto sanguíneo fundamental em todos os estágios evolutivos (Figura 1).

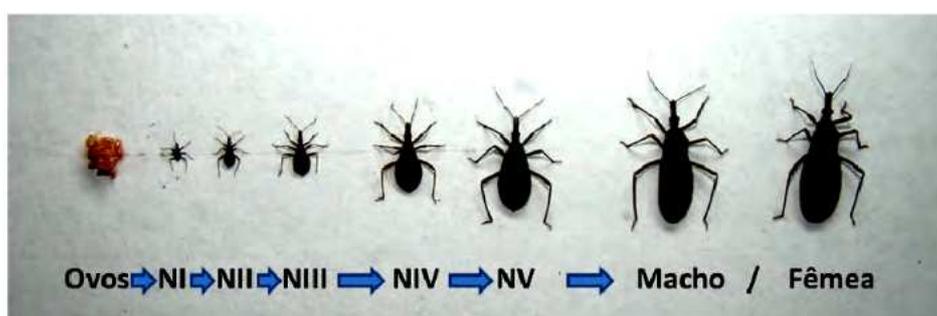


Figura 1 - Ciclo biológico de *Rhodnius prolixus* representando o desenvolvimento do tipo paurometábolo dos triatomíneos (Foto: Newmar Pinto Marlière). Legenda: NI, ninfa de primeiro estágio; NII, ninfa de segundo estágio; NIII, ninfa de terceiro estágio; NIV, ninfa de quarto estágio e NV, ninfa de quinto estágio.

Atualmente são reconhecidas 140 espécies de triatomíneos, divididas em cinco tribos e 15 gêneros, sendo a maioria delas encontradas na América Latina (Schofield e Galvão, 2009). Desse total, 61 espécies estão presentes no Brasil (Galvão *et al.*, 2003).

Os triatomíneos são primitivamente insetos silvestres, característica esta mantida ainda hoje pela maioria das espécies encontradas nos focos naturais, onde vivem associadas a uma grande variedade de animais silvestres (Sherlock, 1979). Seu habitat primário é o interior de abrigos, tocas e ninhos de animais de sangue quente em ocos de árvores, palmeiras, fendas de rochas, entre outros (Lent e Wygodzinsky, 1979). Esses micro-ambientes normalmente protegem os insetos das

variações extremas de temperatura e umidade relativa além de permitir o fácil acesso a fonte alimentar. Alimentam-se de uma série de hospedeiros, dentre eles, aves, marsupiais, edentados, roedores, primatas e morcegos de várias espécies, além de vertebrados ectotérmicos (Lent e Wygodzinsky, 1979). Os triatomíneos são capazes de subsistir com alimentações sanguíneas abundantes e ocasionais, uma vez que, entre os repastos, podem permanecer por longos períodos de tempo sem desidratar-se e, aparentemente, sem sofrer danos fisiológicos (Friend e Smith, 1985).

Seu aparato bucal está adaptado para a penetração na pele do hospedeiro, para o encontro de vasos sanguíneos apropriados e para a alimentação rápida. Além disso, na saliva desses insetos estão presentes substâncias anticoagulantes, anestésicas e vasodilatadoras que auxiliam na ingestão do sangue (Hellmann e Hawkins, 1964, Ribeiro *et al.*, 2004, Araujo *et al.*, 2009).

Assim como os demais insetos hematófagos, os triatomíneos apresentam uma maquinaria sensorial bem desenvolvida para localizar e escolher seus hospedeiros (Guerenstein e Lazzari, 2009). Os triatomíneos têm em suas antenas uma diversidade de pêlos sensoriais denominados sensilas. Essas estruturas estão distribuídas ao longo da antena e são capazes de detectar diferentes estímulos mecânicos, químicos, térmicos ou de umidade (Guerenstein e Lazzari, 2009). O calor, a umidade e odores liberados pelos hospedeiros (ex. CO₂, ácido láctico) estão diretamente envolvidos no processo de busca do hospedeiro pelos triatomíneos (Barrozo *et al.*, 2003; Lazzari e Núñez, 1989; Lehane, 2005).

Os triatomíneos são insetos de hábito noturno e desenvolvem a maioria das suas atividades como a busca por alimento, parceiros sexuais e refúgio durante o período da noite (Núñez, 1987, Lorenzo e Lazzari, 1993). Apresentam dois picos de atividade, sendo um no início da escotofase, relacionado com a busca por hospedeiro, e outro no início da fotofase, relacionado com a volta ao abrigo (Lazzari, 1992, Lorenzo e Lazzari, 1996, Guarneri *et al.*, 2003). Além disso, apresentam fototaxia negativa (Reisenman *et al.*, 1998, Reisenman e Lazzari, 2006), permanecendo na maior parte do tempo escondidos em seus abrigos em estado de akinesia e agregados aos seus coespecíficos (Guerenstein e Lazzari, 2009; Lazzari, 1992; Lorenzo e Lazzari, 1996, Bodin *et al.*, 2009).

A ação antrópica sobre a vegetação das Américas Central e do Sul permitiu a dispersão dos triatomíneos para novos ambientes. A colonização de novos ecótopos por triatomíneos silvestres depende de uma série de fatores, dentre eles sua constituição genética, que confere mecanismos fisiológicos que possibilitam a adaptação a um novo contexto ambiental, como temperatura, umidade e fontes alimentares provavelmente diferentes dos seus ecótopos naturais (Aragão e Dias 1956, Forattini, 1980, Burgos *et al.*, 1994, Curto de Casas *et al.*, 1994, Schofield, 2000). Dessa maneira, algumas espécies são capazes de invadir e colonizar ambientes peridomésticos como galinheiros e currais, e domicílios humanos, onde o homem e seus animais domésticos, tais como o gato, cachorro, rato e coelho, passam a funcionar como fontes de alimentação (Schofield, 1994).

Além das lesões ocasionadas pela picada e a espoliação sanguínea que causam ao hospedeiro, os triatomíneos podem também transmitir parasitos, como o *T. cruzi* e o *T. rangeli*. A doença de Chagas, causada pelo *T. cruzi* e também conhecida como tripanossomíase americana, é uma doença humana tropical endêmica em grandes áreas da América do Sul e Central. Entre as doenças parasitárias, é classificada como uma das mais importantes da América Latina em termos de impacto social e econômico (DNDi América Latina, 2010). É transmitida aos seres humanos principalmente através das fezes de triatomíneos infectados que são liberadas durante o repasto sanguíneo e entram em contato com a injúria causada pela picada. Outras formas de transmissão incluem a via congênita, a transfusional, a ingestão acidental de *T. cruzi*, além de outras de menor relevância epidemiológica (Dias, 1979; Schofield, 1994). Estima-se que 10 milhões de pessoas estão infectadas em todo o mundo, principalmente na América Latina onde a doença é endêmica, e mais de 25 milhões de pessoas se encontram em áreas de transmissão (WHO, 2012).

As taxas de infecção natural de triatomíneos por *T. cruzi* variam muito entre espécies e de acordo com a sua proximidade de contato com os reservatórios de parasitos. Entre a maioria dos triatomíneos domésticos, não mais do que 5% são infectados (ver revisão Coura e Borges-Pereira, 2010).

O *R. prolixus* é um dos vetores mais eficientes na transmissão do *T. cruzi* (Borges-Pereira *et al.*, 1988). Assume-se que essa espécie evoluiu de uma forma

ancestral de *Rhodnius* da região Amazônica, tornando-se altamente adaptado ao habitat doméstico e peridoméstico, em diversos países da América Central e do Sul, sobretudo na Venezuela e Colômbia, onde continua a ser um importante vetor doméstico de *T. cruzi* (Schofield e Galvão, 2009). Isto se deve a alta susceptibilidade desse triatomíneo à infecção pelo *T. cruzi* e a sua elevada capacidade reprodutiva, podendo chegar a três gerações por ano. A espécie também possui uma alta capacidade de disseminação e domiciliação além de apresentar taxas de infecção que podem ser superiores a 30% (Peñalver, 1958; Dorn *et al.*, 2001; Monroy *et al.*, 2003).

Assim como pode ocorrer em outras espécies de triatomíneos do gênero *Rhodnius*, o *R. prolixus* pode manter infecções mistas de *T. cruzi* e *T. rangeli* que podem ser igualmente transmitidas aos hospedeiros mamíferos, inclusive o homem. Este fato tem importância médica e epidemiológica, uma vez que a infecção humana pelo *T. rangeli* ocasiona reações sorológicas cruzadas com o *T. cruzi*, dificultando o diagnóstico da doença de Chagas (Hudson *et al.*, 1988).

Apesar de não ser encontrado no Brasil, *R. prolixus* é amplamente utilizado como modelo experimental uma vez que vários processos fisiológicos de insetos foram inicialmente estudados na espécie (Wigglesworth, 1934, 1936, 1940).

3.2 Associações entre triatomíneos e o *Trypanosoma cruzi*

O *T. cruzi* pertence à ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae. É um protozoário heteroxênico que infecta triatomíneos e mamíferos nas Américas. Este parasito apresenta alta plasticidade controlada geneticamente, o que lhe confere adaptação para cerca de 40 espécies de triatomíneos e para mais de 1.000 espécies de mamíferos, cumprindo diversas exigências metabólicas em seu complexo ciclo de vida (Teixeira *et al.*, 2009). Entretanto, ao longo da história evolutiva entre hospedeiros e tripanosomas, ambos vêm desenvolvendo mecanismos estratégicos para facilitar o desenvolvimento do parasito, no caso dos tripanosomas, ou interromper seu desenvolvimento, no caso dos hospedeiros (Gaunt e Miles, 2000; Azambuja, 2005; Garcia, 2007).

O *T. cruzi* tem um ciclo evolutivo complexo que apresenta formas morfológicas e funcionais distintas, alternando entre as fases de divisão e fases não replicativas. Entre as formas de divisão estão as epimastigotas, presentes no intestino do vetor e também observadas durante a fase logarítmica de crescimento em culturas axênicas, e amastigotas, encontradas em células de mamíferos. Já as formas não replicativas incluem tripomastigotas metacíclicos encontrados nas fezes e na urina do vetor e na fase estacionária de crescimento em culturas axênicas do parasito, e tripomastigotas encontrados na corrente sanguínea de mamíferos e em fase líquida de cultura de parasitos em célula (Hoare e Wallace, 1966; Tyler e Engman, 2001).

No hospedeiro invertebrado o ciclo do parasito inicia-se quando o triatomíneo ingere formas tripomastigotas durante o repasto sanguíneo em mamíferos infectados. O parasito se diferencia e divide sob a forma epimastigota no intestino médio posterior do inseto (Ferreira *et al.*, 2011) e se diferencia na ampola retal em formas tripomastigotas metacíclicas que serão liberadas juntamente com as fezes e poderão ser transmitidas a outros mamíferos no próximo repasto (Figura 2). No hospedeiro mamífero, as formas tripomastigotas são capazes de invadir diferentes tipos celulares onde se diferenciam em formas amastigotas que se dividem e vão gerar os tripomastigotas sanguíneos, que entram na circulação e são as formas infectantes para o triatomíneo (Brener, 1973; Zeledon, 1987; Garcia e Azambuja, 1991).

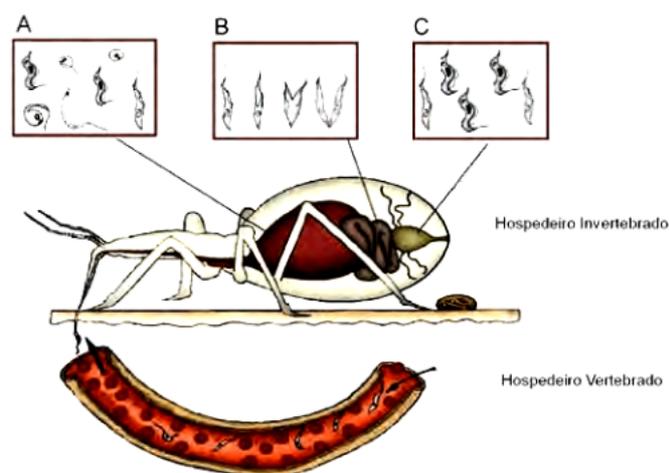


Figura 2 – Ciclo Biológico do *T. cruzi* no triatomíneo (hospedeiro invertebrado) (Adaptado de Garcia *et al.*, 2007).

A presença do *T. cruzi* no intestino do hospedeiro invertebrado desencadeia uma série de reações imunológicas que irão interagir com o parasito, interferir na sua capacidade de colonização e afetar a sua sobrevivência. Fatores como temperatura, pH e estado nutricional do vetor também podem interferir nessa interação. Além disso, substâncias produzidas pelo inseto como, por exemplo, componentes da saliva, lisozimas, defensinas, lectinas e aglutininas estão também envolvidas na resposta imunológica do vetor à presença do *T. cruzi* (ver revisão Garcia *et al.*, 2010). Embora a maioria das bactérias presentes ao longo do intestino dos triatomíneos seja considerada comensal (Schaub 2009), algumas espécies apresentam atividade tripanolítica, podendo provocar a lise de determinadas cepas do parasito (Azambuja *et al.*, 2004).

O intestino médio anterior de *R. prolixus* produz um fator hemolítico, que afeta o desenvolvimento do *T. cruzi* (Azambuja *et al.*, 1983). Além disso, as glândulas salivares de *T. infestans* produzem uma proteína, denominada de trialisina, que tem a capacidade de lisar tripomastigotas de *T. cruzi* (Amino *et al.*, 2002). Além dos fatores presentes no lúmen e tecidos intestinais do vetor, um período de jejum muito prolongado dos insetos pode levar a uma escassez nutricional dos parasitos e culminar na eliminação da infecção (Schaub *et al.*, 1989). O *T. cruzi* presente no intestino do vetor parece competir por nutrientes, uma vez que em situações de jejum, a resistência dos insetos é reduzida (Schaub, 1989). Um dos nutrientes provenientes do sangue ingerido e sabidamente utilizado pelo *T. cruzi* é o heme, que não é produzido pelo parasito e precisa ser adquirido de seus hospedeiros (Salzman e cols., 1982; Lombardo e cols., 2003).

Embora exista uma intensa colonização do intestino do vetor por diferentes cepas de *T. cruzi*, a literatura sugere que este parasito não é patogênico ao seu hospedeiro invertebrado (Eichler e Schaub, 2002). Estudos de microscopia eletrônica revelaram que a infecção do *T. infestans* pelo *T. cruzi* não afeta a produção das membranas perimicrovilares que se formam após a alimentação (Billingsley e Downe, 1983) ou as microvilosidades do intestino posterior, sendo que aparentemente, os parasitos permanecem aderidos ao epitélio intestinal pelos flagelos (Kollien *et al.*, 1998). A análise do desenvolvimento dos simbiossitos *Nocardia*

sp. e *Rhodococcus rhodnii* no intestino de *Triatoma infestans* e *R. prolixus*, respectivamente, na presença do *T. cruzi*, mostrou que o parasito não afeta as taxas de crescimento dessas bactérias (Eichler e Schaub, 2002).

Estudos prévios não demonstraram uma influência do parasito no desenvolvimento do vetor (Juarez, 1970; Zeledón, 1970; Santos e Lacombe, 1985; Schaub 1978, 1988), entretando, Lima *et al.*, (1992) mostraram uma diminuição no número de ovos postos por fêmeas de *Panstrongylus megistus* infectadas pelo *T. cruzi*. Um estudo experimental com *Mepraia spinolai* infectados através de repetidas alimentações em camundongos infectados por *T. cruzi* demonstrou que os insetos tiveram um prolongamento no tempo de muda e apresentaram uma redução em diferentes variáveis relacionadas ao tamanho do corpo, inclusive no tamanho das gônadas (Botto-Mahan *et al.*, 2008).

Alterações comportamentais também têm sido observadas em triatomíneos infectados por *T. cruzi*. Botto-Mahan *et al.* (2006) demonstraram que *Mepraia spinolai* infectados pelo *T. cruzi* respondem mais rapidamente a sinais da presença de potenciais hospedeiros quando comparados a insetos não infectados. Além disso, *M. spinolai* infectados picam mais vezes e defecam mais rapidamente que insetos não infectados, o que poderia implicar em um aumento nas chances de transmissão do parasito ao hospedeiro vertebrado (Botto-Mahan *et al.*, 2006).

Rodrigues *et al.* (2008) avaliaram o comportamento de fototaxia negativa de ninfas de *R. prolixus* infectadas por *T. cruzi* e não encontraram diferenças em relação aos insetos controle. Entretanto, a atividade locomotora de ninfas infectadas foi reduzida na escotofase (Marlière *et al.*, 2011), período em que os triatomíneos saem dos abrigos à procura de fontes de alimentação ou parceiros sexuais.

3.3 Associações entre triatomíneos e *Trypanosoma rangeli*

O *Trypanosoma rangeli* é também um parasito heteroxênico que compartilha com o *T. cruzi* os mesmos hospedeiros invertebrados e vertebrados, incluindo o homem e animais domésticos. Apesar de não ser patogênico ao homem, o parasito é capaz de induzir uma resposta imune humoral com elevados títulos de anticorpos, os quais determinam uma elevada reatividade cruzada com antígenos do *T. cruzi*,

dificultando o diagnóstico sorológico da doença de Chagas, especialmente em sua fase crônica (Schotelius, 1987; Grisard *et al.*, 1999). Ao analisar formas epimastigotas de cultura do *T. rangeli*, Afchain e colaboradores (1979) verificaram que este compartilha cerca de 60% de sua constituição antigênica solúvel com o *T. cruzi*, o que explicaria a reatividade sorológica cruzada e os consequentes resultados falso-positivos que incorrem em um elevado custo sócio-econômico. Estes dados foram confirmados em um estudo que utilizou diferentes cepas e formas do *T. rangeli* e soros de pacientes apresentando distintas formas clínicas da doença de Chagas (Moraes *et al.*, 2008).

Pouco se sabe a respeito do curso da infecção no hospedeiro vertebrado, sendo que vários estudos demonstram que a taxa de infectividade de diferentes cepas deste parasito frente a linhagens celulares distintas (fagocíticas e não fagocíticas) é sempre muito baixa e os parasitos tendem a desaparecer ao longo do tempo de interação, sugerindo a ausência de multiplicação intracelular, especialmente observada em macrófagos (Molyneaux, 1973; Osorio *et al.*, 1995; Tanoura *et al.*, 1999; Eger-Mangrich *et al.*, 2001).

Nos hospedeiros invertebrados, o ciclo inicia-se quando formas tripomastigotas são ingeridas durante o repasto sanguíneo em um hospedeiro mamífero infectado. Quando atingem o intestino médio anterior, os parasitos se diferenciam em formas epimastigotas e tornam-se capazes de se multiplicar colonizando todo o trato intestinal do inseto (Ferreira *et al.*, 2011). As formas epimastigotas podem cruzar o epitélio intestinal e atingir a hemocele. Uma vez na hemolinfa, os parasitos continuam se dividindo, migram e invadem as glândulas salivares, onde se diferenciam em tripomastigotas metacíclicos, formas infectantes que podem ser transmitidas para os hospedeiros vertebrados durante o repasto sanguíneo do vetor (D'Alessandro, 1976; D'Alessandro-Bacigalupo e Saraiva, 1992).

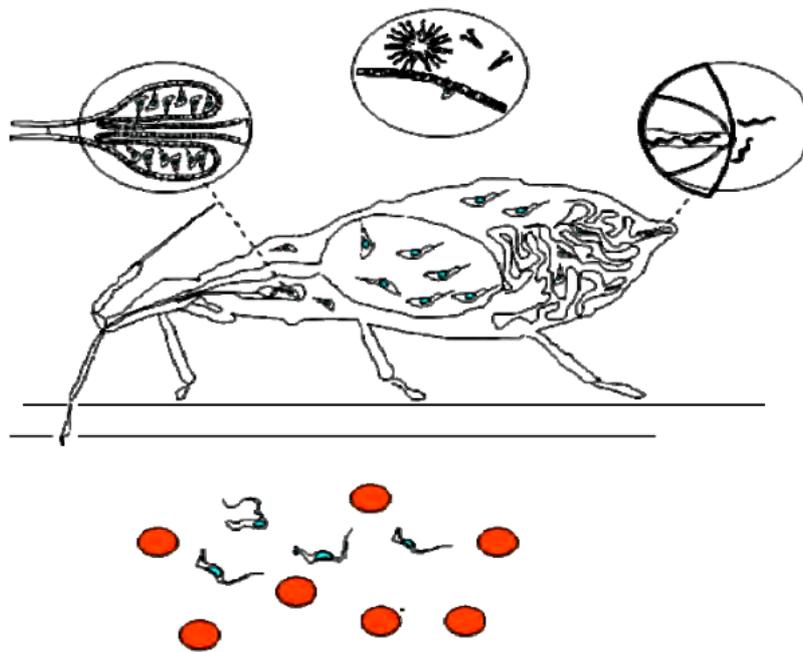


Figura 3 – Ciclo biológico do *T. rangeli* no triatomíneo (hospedeiro invertebrado) (Adaptado de Grisard e Steindel, 2003).

A presença do parasito no trato intestinal do vetor pode persistir ao longo de toda a vida do inseto. Entretanto, diferentemente da forma clássica de transmissão do *T. cruzi*, as formas encontradas nas fezes do vetor não parecem ser infectivas (Rentifo *et al.*, 1950; D'Alessandro, 1976; Tobie, 1964; Hecker *et al.*, 1990).

Em infecções naturais, a porcentagem de insetos que apresentam parasitos ao longo do trato intestinal e também na hemolinfa e glândulas salivares é variável, ficando entre 2 e 50% (Añez *et al.*, 1987; Groot, 1954; Hecker *et al.*, 1990; Marinkelle, 1968; Tobie, 1965, 1970; Ferreira *et al.*, 2010). Ainda não se sabe os fatores envolvidos no desenvolvimento de infecções completas por *T. rangeli*. Pequenas alterações nos resíduos de açúcar das glicoproteínas de superfície presentes nos trypanosomatídeos poderiam contribuir para o aumento ou diminuição da porcentagem de parasitos que conseguem penetrar o epitélio intestinal e alcançar a hemocele e as glândulas salivares (Rudin *et al.*, 1989).

Uma importante descoberta sobre a interação do *T. rangeli* com o hospedeiro invertebrado foi a influência que a infecção pelo parasito tem sobre as populações

de simbioses do intestino de *R. prolixus* (Eichler e Schaub, 2002). A diminuição no número de simbioses ocasionada pela presença do *T. rangeli* pode levar a uma série de efeitos deletérios ao vetor, que incluem o retardo do desenvolvimento ninfal (Brecher e Wigglesworth, 1944; Lake e Friend, 1967), aumento nas taxas de mortalidade (Harrington, 1960), distúrbios na digestão e excreção (Brecher e Wigglesworth, 1944; Eichler e Schaub, 1998) e reduções do sistema traqueal (Eichler e Schaub, 1998).

Uma vez na hemolinfa, o *T. rangeli* é reconhecido pelo sistema de defesa do inseto e inicia-se uma série de eventos celulares e humorais que irão atuar como fatores limitantes para o desenvolvimento do parasito, incluindo a produção de lisozimas de atividade tripanolítica, ativação do sistema pró-fenoxidase, fagocitose e microagregação de hemócitos, aglutinação e produção de ânions superóxido (ver revisão Garcia *et al.*, 2010). Sabe-se que a resposta imune do inseto é voltada preferencialmente formas curtas do parasito enquanto que formas longas seriam responsáveis pela manutenção da infecção bem como, pela invasão das glândulas salivares (Mello *et al.*, 1995, 1999; Gomes *et al.*, 1999, 2003). Deste modo, estas formas epimastigotas longas do *T. rangeli* estariam funcionando como o escape do parasito frente às respostas imunológicas do inseto. A presença do parasito na hemolinfa pode afetar a sobrevivência do inseto bem como prolongar o seu desenvolvimento. Além disso, insetos que apresentam infecções massivas na hemolinfa podem exibir alterações morfológicas (Grewal, 1957; Tobie, 1961; Añez, 1984). Outra característica marcante em insetos que apresentam altas taxas de infecção é a elevada mortalidade durante o processo de muda, além daqueles que não conseguem sair da antiga cutícula (Añez, 1984). Recentemente, Ferreira *et al.* (2010) demonstraram que a infecção pelo *T. rangeli* leva a um aumento na quantidade de lipídeos e de corpos gordurosos na hemolinfa de *R. prolixus* e que a sua presença exclusivamente na hemolinfa é suficiente para provocar alterações no desenvolvimento dos insetos, inclusive prolongando o período entre mudas.

O último estágio de desenvolvimento do *T. rangeli* no hospedeiro invertebrado ocorre no interior das glândulas salivares. Os mecanismos de invasão utilizados pelos epimastigotas para penetrar nas glândulas salivares do hospedeiro invertebrado ainda estão pouco esclarecidos. Sabe-se que lectinas e carboidratos presentes na superfície do parasito estão envolvidos neste processo (Basseri *et al.*,

2002). Uma redução significativa das proteínas estocadas nas glândulas salivares de *R. prolixus*, incluindo aquelas com funções anti-hemostáticas como as nitroforinas, foi observada durante a infecção pelo *T. rangeli* (Paim *et al.*, 2013). Esta redução afeta o comportamento alimentar do inseto, levando a um aumento significativo no número de picadas e reduzindo a sua habilidade de ingerir sangue de hospedeiros vertebrados, conseqüentemente, aumentando as chances de transmissão do *T. rangeli* (Garcia *et al.*, 1994). Um estudo recente também demonstrou que a infecção pelo *T. rangeli* promove a inibição da atividade de uma tirosina fosfatase levando a uma redução da atividade da enzima responsável pela produção de óxido nítrico, o que poderia contribuir para o aumento no tempo de ingestão sanguínea pelo vetor (Gazos-Lopes *et al.*, 2012).

A infecção por *T. rangeli* também promove alterações comportamentais no inseto vetor. Ninfas de *R. prolixus* infectadas pelo parasito apresentaram uma redução no comportamento de fototaxia negativa, permanecendo mais tempo expostas à luz do que os insetos controle (Ferreira *et al.*, 2011). A infecção também alterou a atividade locomotora dos insetos que foi maior do que a exibida pelos insetos do grupo controle durante a escotofase e a fotofase (Marlière *et al.*, 2011). A avaliação do comportamento de utilização de refúgios mostrou que insetos infectados apresentaram uma movimentação mais intensa na presença de estímulos provenientes de um hospedeiro vertebrado e se mantiveram fora do abrigo após a retirada do estímulo, mesmo durante a fase de iluminação (Marlière *et al.*, 2010).

3.4 O papel da temperatura no desenvolvimento de insetos e nas interações com seus parasitos

As associações parasito-hospedeiro são elementos não aparentes dentro de uma comunidade ecológica e afetam as relações de competição intra e interespecíficas, a distribuição e abundância de espécies e a própria composição da comunidade (Horwitz e Wilcox, 2005; Thomas *et al.*, 2005). Sendo assim, os parasitos e seus hospedeiros não podem ser considerados isoladamente nem serem separados da comunidade da qual fazem parte, sendo necessário incluir também nos estudos de interação as propriedades do ambiente onde habitam (Thrall *et al.*, 2007).

A maioria dos estudos evolutivos sobre mudanças adaptativas na resistência ou suscetibilidade de hospedeiros e/ou virulência de parasitos normalmente não consideram os fatores bióticos e abióticos como tendo algum papel nas interações parasito-hospedeiro (Bull, 1994; Frank, 1996; Kraaijeveld *et al.*, 1998; Dieckmann *et al.*, 2002). Como resultado, o efeito de fatores extrínsecos na resistência ou virulência durante uma interação tem recebido pouca atenção. Entretanto, diversos estudos vêm demonstrando que a suscetibilidade do hospedeiro e a virulência do parasito são dependentes de condições abióticas (ex. Ferguson e Read, 2002; Elliot *et al.*, 2002) e que uma condição chave parece ser a temperatura ambiental (Thomas e Blanford, 2003).

Já está bem estabelecido que a temperatura afeta processos bioquímicos, fisiológicos e comportamentais em animais e existem muitos trabalhos explorando a sensibilidade térmica dos organismos e os fatores que influenciam a evolução das curvas de performance térmicas (ver revisão Thomas e Blanford, 2003). Em insetos que vivem nos trópicos, a curva de sobrevivência populacional tem a forma de um U invertido, com a sobrevivência declinando profundamente nas temperaturas máximas e mínimas e se mantendo constante nas temperaturas intermediárias (Amarasekare e Sifuentes, 2012). Assim como para os demais insetos, diversos autores têm avaliado os efeitos da temperatura sobre o desenvolvimento de vetores como *Aedes aegypti* (Yang *et al.*, 2009), *Anopheles gambiae* (Bayoh e Lindsay, 2004), *Culex tarsalis* (Dodson *et al.*, 2012), *Aedes albopictus* (Reiskind *et al.*, 2012) e *Pediculus* sp. (Gallardo *et al.*, 2009).

Os efeitos dos fatores climáticos sobre a fisiologia e o comportamento dos triatomíneos vêm sendo estudados, dada a sua importância na distribuição desses insetos e a sua potencial influência na capacidade dos triatomíneos de colonizar domicílios humanos (Schofield e Patterson, 1977; Salvatella *et al.*, 1991). A temperatura ambiental afeta diferentes parâmetros biológicos dos triatomíneos, como a eclosão de ovos (Clark, 1935; Guarneri *et al.*, 2003), a fecundidade e a maturidade sexual (Ehrenfield *et al.*, 1998; Jörg, 1960), a dispersão de adultos (Lehane *et al.*, 1992) e a seleção de esconderijos (Lorenzo e Lazzari, 1999). Por outro lado, os triatomíneos são capazes de perceber gradientes térmicos (Wigglesworth e Gillet, 1934; Lazzari e Núñez, 1989) e de escolher a temperatura preferida de acordo com o seu estado fisiológico (Di Luciano, 1983; Lazzari, 1991;

Canals *et al.*, 1997; Pires *et al.*, 2002; Schilman e Lazzari, 2004; Guarneri *et al.*, 2003).

Com relação às interações hospedeiro-parasito, existe uma gama de possíveis influências da temperatura que incluem efeitos sobre os períodos de infecção latente (Blanford e Thomas, 1999), expressão de doença latente (Mohamed *et al.*, 1985), cura do hospedeiro e mortalidade do parasito (Carruthers *et al.*, 1992; Kobayashi *et al.*, 1981; Sigsgaard, 2000), replicação do parasito (Kobayashi *et al.*, 1981) e virulência do parasito e/ou resistência do hospedeiro (Blanford e Thomas, 1999; Arthurs e Thomas, 2000; Menti *et al.*, 2000; Elliot *et al.*, 2002; Blanford *et al.*, 2003).

As mudanças no comportamento ou na fisiologia dos insetos causadas pela infecção e moduladas pela temperatura podem promover uma transmissão mais eficiente do parasito ao seu hospedeiro definitivo, provavelmente aumentando o *fitness* destes parasitos e possivelmente diminuindo o *fitness* do vetor. Tais mudanças no comportamento do vetor podem ter potenciais implicações epidemiológicas (Moore, 2002).

Embora exista um grande número de trabalhos publicados sobre os efeitos da presença do parasito no desenvolvimento, fisiologia e comportamento de seus hospedeiros, e sabendo-se que a temperatura é um fator crítico para a sobrevivência de animais ectotérmicos, é de fundamental importância compreender o papel da temperatura nas interações vetor/parasito. Dentro desse contexto, torna-se relevante compreender a dinâmica de interação entre triatomíneos e tripanosomas bem como compreender como essa relação ocorre na natureza. Espera-se que os resultados obtidos neste trabalho possam contribuir para o desenvolvimento de estratégias e ferramentas de controle desses vetores.

MATERIAIS E MÉTODOS

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 – Triatomíneos

Os exemplares da espécie *R. prolixus* utilizados neste trabalho são provenientes do insetário do Laboratório de Triatomíneos e Epidemiologia da Doença de Chagas (LATEC), de uma colônia iniciada a partir de insetos coletados em Honduras. Os insetos foram mantidos em condições semi-controladas de temperatura ($26 \pm 1^\circ\text{C}$) e umidade relativa ($65 \pm 10\%$) e em ciclo de iluminação natural.

Os triatomíneos foram criados em frascos de plástico ou acrílico cilíndricos, fechados com tecido de algodão, forrados com papel filtro para absorção de umidade e contendo uma tira de cartolina no centro do pote dobrada em sanfona para permitir uma maior superfície de contato para o inseto e facilitar a alimentação.

Os insetos foram alimentados semanalmente em galinhas ou camundongos Swiss anestesiados (Thionembutal a 2%), ou sangue de coelho citratado obtido do Cecal (Centro de Criação de Animais de Laboratório da Fundação Oswaldo Cruz, FIOCRUZ – RJ).

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

4.2 – Parasitos

Neste estudo utilizou-se a cepa CL de *T. cruzi*, multiclonal, isolada a partir do vetor *Triatoma infestans* naturalmente infectado (Brenner e Chiari, 1963) e a cepa CHOACHI de *T. rangeli*, isolada das glândulas salivares de *Rhodnius prolixus* naturalmente infectado, originado no Estado de Cundinamarca, Colômbia (Schotelius, 1987).

Epimastigotas de *T. cruzi* (cepa CL) e de *T. rangeli* (cepa CHOACHI) foram cultivados através de duas passagens semanais em meio LIT (Liver Infusion

Tryptose) acrescido de 15% de soro fetal bovino e antibiótico na concentração de 100 unidades de penicilina e 100µg de estreptomicina por mL. Os parasitos foram cultivados em tubos cilíndricos de vidro em volume final de 3mL e mantidos em estufa BOD à temperatura de 27°C.

A cepa de *T. rangeli* foi mantida através de dois diferentes tratamentos. No primeiro (T1), os parasitos foram mantidos exclusivamente em meio LIT por um período superior a 90 dias. No segundo tratamento (T2), os parasitos foram mantidos em meio LIT por 30 dias, após terem sido submetidos a uma passagem em triatomíneos, transmitidos destes para camundongos e recuperados por hemocultura. Os dois tratamentos foram utilizados para todos os experimentos desenvolvidos com esta espécie.

4.3 – Avaliação do crescimento dos parasitos em meio de cultura, submetidos a diferentes temperaturas.

4.3.1 - Reagentes e Soluções

A solução estoque de Diacetato de Fluoresceína (FDA – F7378, Sigma) foi obtida através da diluição do corante em acetona (1mg/mL) e conservada a -20°C. O FDA é um corante vital, não polar, capaz de penetrar a membrana íntegra de células viáveis, se difundindo passivamente. No citoplasma celular, o FDA é hidrolisado por esterases produzindo a fluoresceína, componente que exibe fluorescência verde quando excitado por luz azul (488nm). No ensaio, foi utilizado como marcador de células vivas.

A solução estoque de Iodeto de Propídeo (PI – P4170, Sigma) foi obtida através da diluição do corante em água para injeção estéril (1mg/mL), protegida da luz e conservada a -20°C. O PI penetra em células em processo de apoptose e se liga ao DNA de dupla fita da célula. O corante tem espectro de absorção entre 287 e 488nm e quando excitado a 630nm emite cor vermelha. No ensaio, foi utilizado como marcador de células mortas ou em processo de morte.

Para a quantificação dos parasitos foi utilizada uma quantidade fixa e conhecida de microesferas fluorescentes (FlowCount™ Fluorospheres Beckman Coulter, PN7508092-E, LOT 7548025, concentração de 986/μL).

4.3.2 – Marcação dos Parasitos

Três diferentes procedimentos de marcação foram utilizados para cada amostra: FDA (7 μg/mL), PI (25 μg/mL) e FDA + PI (nas mesmas concentrações). Uma amostra sem marcação foi utilizada como controle. Um volume final de 220μl, contendo 50μl de cultura, os corantes, 20μl de fluorosferas e PBS estéril (0.15 M NaCl em 0.01 M de sódio fosfato (Na₂HPO₄), pH 7,2) foram analisados em um citômetro de fluxo (modelo FACScan, Becton Dickinson). As análises foram realizadas utilizando-se o programa FlowJo7.6.

4.3.3 – Ensaio Biológico

Para avaliar o crescimento dos parasitos em meio de cultura, garrafas de cultura de 25cm² receberam uma concentração inicial de 1x10⁶ parasitos/mL em um volume final de 8mL de meio LIT por garrafa. As garrafas foram imediatamente transferidas para caixas com temperatura controlada e mantidas nas mesmas condições durante sete dias (Figura 4). As temperaturas testadas foram de 21, 24, 27 e 30°C. Para cada nível de temperatura foram testadas simultaneamente duas garrafas.

Diariamente uma amostra de 50μL de cada garrafa foi coletada, marcada com os corantes fluorescentes, e o número de células vivas e mortas foi contado no citômetro de fluxo. Uma vez que o citômetro de fluxo somente conta número de eventos sem correlacioná-los com volume, o número de parasitos foi estimado através da sua comparação com uma quantidade conhecida de fluorosferas.



Figura 4 – Caixas de temperatura controladas, mantidas em estufa BOD, onde foram realizados os ensaios.

4.4 – Avaliação do desenvolvimento de insetos infectados submetidos a diferentes temperaturas

4.4.1 - Infecção por *Trypanosoma cruzi*

Ninfas de segundo estágio com aproximadamente sete dias de jejum foram alimentadas em alimentador artificial contendo sangue de coelho inativado (56°C, 30min), e uma suspensão de epimastigotas de cultura de *T. cruzi* numa concentração de 1×10^7 parasitos/mL. Insetos alimentados apenas com sangue foram utilizados como controle. Um dia após a alimentação, os insetos foram transferidos para placas de Petri contendo papel de filtro como substrato (grupo infectado, n=126 e grupo controle, n=132; máximo oito insetos por placa). As placas foram mantidas em câmaras com temperaturas de 21, 24, 27 e 30°C (Figura 4).

Neste ensaio foram avaliados o tempo de duração do estágio e a mortalidade dos insetos durante um período de 90 dias após a ocorrência da ecdise. No final do ensaio, os insetos sobreviventes foram examinados para a presença de parasitos.

4.4.2 - Infecção por *Trypanosoma rangeli*

A infecção dos insetos por *T. rangeli* foi realizada de acordo com Ferreira *et al.* (2010). Ninfas de quarto estágio com sete dias de jejum foram inoculadas com 1µL de PBS estéril contendo 50 epimastigotas de cultura (5×10^4 par/mL). O inóculo foi realizado diretamente na cavidade celomática do inseto utilizando-se uma seringa Hamilton de 50µL com uma agulha acoplada (13 × 3,30 G, 1/2"). Um dia após o inóculo, as ninfas foram alimentadas em camundongos anestesiados e 24 horas após, transferidas para placas de Petri contendo papel de filtro como substrato (n=120 para T1 e 80 para T2, máximo de seis ninfas por placa). Para cada uma das temperaturas, insetos inoculados com o mesmo volume de PBS estéril foram utilizados como controle (n=120 para T1 e 76 para T2, máximo de seis ninfas por placa). As placas foram mantidas em câmaras com temperaturas de 21, 24, 27 e 30°C (Figura 4). Para os dois tratamentos de *T. rangeli* foram avaliados o tempo de duração do estágio e a mortalidade dos insetos durante um período de 30 dias após

a ocorrência da ecdise. No final do ensaio, os insetos sobreviventes foram examinados para a presença de parasitos na hemolinfa e nas glândulas salivares.

Para o exame da positividade da hemolinfa foi feito um corte com o auxílio de uma tesoura fina no tarso do primeiro par de patas de cada ninfa e uma pequena gota foi coletada diretamente em lâmina e visualizada em microscópio. Para o exame das glândulas, a cabeça de cada ninfa foi retirada com o auxílio de pinças finas e as glândulas foram transferidas para lâminas contendo solução salina 0,9%. Uma laminula foi colocada sobre o material para a visualização em microscópio em aumento de 400x.

4.5 – Quantificação do *Trypanosoma cruzi* no trato intestinal de *Rhodnius prolixus*, em insetos submetidos a diferentes temperaturas

4.5.1 - Infecção por *Trypanosoma cruzi* e ensaio biológico

Camundongos B6.129S7-IFN γ knockout (KO) obtidos do Biotério Central do CPqRR foram infectados via intraperitoneal com 5.000 epimastigostas de *T. cruzi*. No sétimo dia pós-infecção, a parasitemia foi contada segundo a metodologia descrita por Brener (1962).

Ninfas de quinto estágio foram individualmente pesadas e individualizadas em frascos plásticos (3,5 x 2cm), contendo papel de filtro como substrato e cobertos com tecido de forma a permitir a alimentação dos insetos.

Para a alimentação das ninfas, o camundongo foi anestesiado intraperitonealmente com uma mistura de ketamina a 150 mg/kg (Cristalia; Brasil) e xilazina 10 mg/kg (Bayer; Brasil) e a cada ninfa foi permitido ingerir o equivalente a 30mg de sangue. Após a alimentação, as ninfas foram mantidas em câmaras com temperaturas controladas de 21, 24, 27 e 30°C (Figura 4). No dia seguinte à infecção, os insetos foram retirados das câmaras, alimentados em alimentador artificial contendo sangue de coelho citratado para realizarem a alimentação completa. Em seguida foram transferidos novamente para as câmaras com temperatura controlada até a realização dos ensaios. Os insetos que permaneceram

nas câmaras por períodos superiores a 30 dias receberam uma segunda alimentação no 45º dia pós-infecção.

A avaliação do número de parasitos foi realizada nos dias 15, 30 e 60 após a infecção. Para cada período e temperatura testados, quatro insetos foram individualmente dissecados e seus intestinos médio anterior, médio posterior e ampola retal (Figura 5) transferidos para tubos cônicos contendo 20µL de PBS estéril. Durante o processo de dissecação as amostras foram mantidas em gelo e posteriormente estocadas a -20°C até a extração do DNA.

Para cada temperatura avaliada, amostras de dois ou mais insetos foram também utilizadas para contagem em câmara de Neubauer. Para isso, as amostras foram homogeneizadas e 5µl de cada uma das partes dissecadas, diluídas em 45µl de PBS e 10µl do material diluído utilizados para contagem.

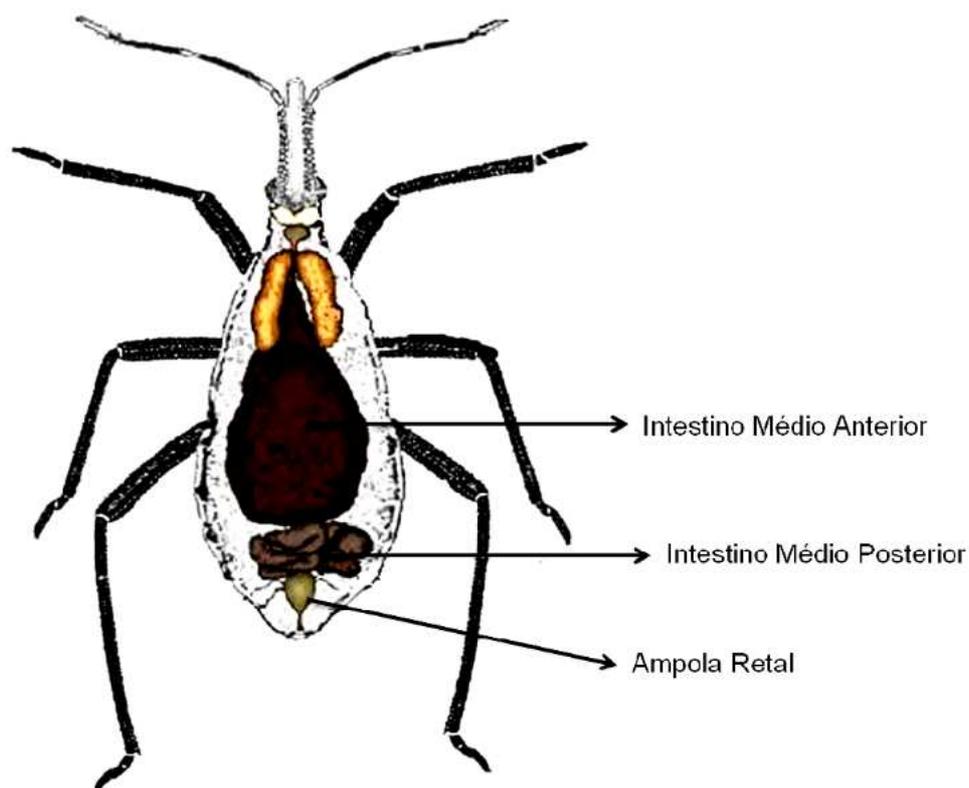


Figura 5 – Esquema do tubo digestivo de um triatomíneo. As setas indicam cada porção do tubo digestivo (Adaptado de Garcia *et al.*, 2007).

4.5.2 – Extrações de DNA

As amostras obtidas no item 4.5.1 (de intestino médio anterior, intestino médio posterior e ampola retal de insetos individuais) foram submetidas à extração de DNA utilizando-se o Kit Wizard Genomic DNA Purification (Promega) seguindo-se o protocolo sugerido pelo fabricante para extração de DNA de amostras de sangue, que se baseia em quatro etapas. Primeiramente uma solução de lise celular foi utilizada para lisar a membrana das células, seguindo-se uma segunda solução de lise para romper o núcleo das células. Na terceira etapa foi utilizada uma solução de precipitação de proteínas. Para melhor visualização do pellet de DNA, 4µl de glicogênio (40mg/mL, Invitrogen) foram adicionados a cada amostra e em seguida uma solução de isopropanol foi utilizada para precipitar o DNA obtido. Uma solução de álcool a 70% foi utilizada para lavar o DNA e eliminar qualquer material inespecífico. Após esse procedimento de lavagem foi feita uma centrifugação e o sobrenadante foi descartado. O pellet de DNA obtido foi ressuspensão em água ultra pura (Gibco) e quantificado em um aparelho Nanodrop (Thermo Scientific). Para essa quantificação, foram utilizados 2µL do total obtido.

Amostras de DNA foram também extraídas de parasitos mantidos em meio de cultura e também de sangue de camundongos IFN γ -KO não infectados e infectados com *T. cruzi* para serem utilizadas como controle positivo da reação de PCR. Além disso, amostras de intestinos de insetos não infectados e sangue de camundongo IFN γ -KO foram utilizados para controle negativo da reação. Novamente, o Kit Wizard Genomic DNA purification foi utilizado, seguindo-se neste processo o protocolo sugerido para amostras de cultura de células e para amostras de sangue.

4.5.3 – PCR quantitativo em Tempo Real

Os produtos obtidos nas extrações de DNA foram submetidos à análise por PCR em tempo real (qPCR) para se obter uma quantificação molecular do número de parasitos. Para as reações de qPCR foram utilizados iniciadores específicos para amplificar um fragmento de 182pb de *T. cruzi* (TCZ) (Cummings e Tarleton, 2003), e as reações foram realizadas em um equipamento ABI Prism 7500 Sequence

Detection System (Applied Biosystems). As sequências dos iniciadores utilizados para a amplificação de DNA específico para o *T. cruzi* estão listadas na tabela 1.

Tabela 1 – Sequências dos iniciadores específicos para *T. cruzi* utilizados para amplificação dos produtos de DNA por PCR em tempo real (Cummings e Tarleton, 2003).

Iniciadores	Sequências
TCZ – F	5' GCTCTTGCCCACAMGGGTGC 3' Onde M = A ou C
TCZ – R	5' CCAAGCAGCGGATAGTTCAGG 3'

As reações de PCR em tempo real foram realizadas utilizando-se o Power SYBR Green PCR Master Mix Kit (Applied Biosystems) de acordo com as recomendações do fabricante. A análise dos resultados foi feita pelo ABIPRISM 7500 Sequence Detection System (Applied Biosystems). Cada reação foi realizada em triplicata, contendo 2µl do DNA molde, 300nM de cada iniciador, 12,5µl do Power SYBR® Green PCR Master Mix em um volume final de 25µl. As condições de amplificação foram: desnaturação inicial a 95°C por 10 minutos, 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 segundos, ligação dos iniciadores e extensão a 60°C por 1 minuto. Durante as reações, foram feitas análises das curvas de dissociação dos amplificados de cada amostra a fim de verificar se as qPCRs estavam gerando mais de um produto.

Um controle negativo (sem adição de DNA) foi incluído para o conjunto de iniciadores e utilizado para confirmar a ausência de DNA genômico inespecífico e para verificar se houve formação de dímeros de iniciadores ou de qualquer contaminação nas reações.

Uma curva padrão foi gerada como descrito por Caldas *et al.* (2012), utilizando-se 8 diluições seriadas em água (1:10). Para isso, foi preparada uma mistura de amostras de DNA extraídos de sangue de camundongo B6.129S7 INF- γ KO não infectado e de parasitos de meio de cultura, de forma que a concentração inicial fosse equivalente a $5 \cdot 10^6$ parasitos/100 μ l de sangue .

4.6 – Análises Estatísticas

As análises do crescimento dos parasitos em meio de cultura foram focadas nos efeitos da temperatura nas taxas de crescimento e foram realizadas no programa (R) pelo colaborador do estudo, Dr. S.L. Elliot. O primeiro passo foi determinar as taxas de crescimento (ou seja, as curvas de regressão) para cada replicata (garrafa) em cada tratamento de temperatura. Para isso, os tamanhos das populações de parasitos vivos foram log-transformados (ou seja, logaritmo do número de parasitos + 1) e modelos de efeitos mistos lineares foram utilizados para a análise de medidas repetidas (ou seja, dias 1, 2, 3, etc). Esta análise gerou oito curvas de crescimento para cada um dos três parasitos testados (duas repetições de quatro temperaturas). Estas foram submetidas a análises de regressão para avaliar possíveis efeitos da temperatura nas taxas de crescimento.

O efeito da infecção na duração do período intermudas e na sobrevivência dos insetos mantidos nas diferentes temperaturas, foi analisado através da comparação de curvas de sobrevivência, utilizando-se o Teste Log-Rank. As taxas de sobrevivência, ecdise e defeitos na muda foram analisadas através do teste Z de proporções para amostras independentes. A infecção das glândulas salivares entre insetos submetidos a diferentes temperaturas foi avaliada através do teste Qui-quadrado, comparando-se os pares através de bipartição. Para todas as análises o nível de significância considerado foi de $p < 0,05$.

RESULTADOS

5 RESULTADOS

5.1 - Avaliação do crescimento dos parasitos em meio de cultura, submetidos a diferentes temperaturas

O crescimento *in vitro* da população de *T. cruzi* aumentou com o aumento da temperatura de 21-30°C (Figura 6A; $p < 0,0001$ para o efeito da temperatura), com as maiores populações sendo obtidas na temperatura de 30°C (386×10^3 parasitos). Os parasitos mantidos nas temperaturas de 21 e 24°C não mostraram um aumento expressivo no crescimento ao longo dos sete dias de acompanhamento. O melhor ajuste da regressão da curva de crescimento *versus* temperatura (Figura 6B) não foi curvado, indicando que o pico de crescimento deve ter ocorrido a 30°C ou mais. De modo geral, o perfil de crescimento do *T. cruzi* foi maior (entre 6-60 vezes) que o encontrado para o *T. rangeli* quando os parasitos foram submetidos às mesmas condições (Figura 6A, C e E).

Os dois tratamentos de *T. rangeli* também cresceram mais em temperaturas mais altas, mas nestes casos, os melhores ajustes de regressão foram funções quadráticas, indicando que as curvas tiveram seus picos de crescimento em 27°C para os dois tratamentos (Figuras 6C-F; $p < 0,01$ para ambos os tratamentos). O *T. rangeli* T1 (parasitos que foram mantidos exclusivamente em meio LIT) apresentou as menores taxas de crescimento, não ultrapassando 60×10^3 parasitos em nenhuma das temperaturas a que foi submetido (Figura 6C). Entre as temperaturas avaliadas, o perfil de crescimento do parasito foi menor em 21 e 30°C (Figura 6C). A maior população alcançada para o *T. rangeli* T2 (parasitos mantidos em meio LIT por 30 dias, após terem sido submetidos a uma passagem em triatomíneos e camundongos e posteriormente recuperados por hemocultura) foi obtida em 27°C (120×10^3 parasitos). Para as temperaturas de 24 e 30°C o crescimento foi semelhante e aproximou-se de 100×10^3 parasitos no sétimo dia. Assim como para todos os outros parasitos estudados, a temperatura de 21°C foi a que apresentou as menores taxas de crescimento.

As taxas de mortalidade de *T. cruzi* ficaram abaixo de 10%, com exceção dos parasitos mantidos em 21°C que apresentaram valores acima dos 20% (Figura 7A). Para o *T. rangeli* T1, as taxas de mortalidade ficaram entre 10 e 40%, a temperatura de 27°C mostrando as mortalidades mais baixas (Figura 7B). As taxas de

mortalidade para o *T. rangeli* T2 foram consistentemente mais baixas do que 10%, independentemente da temperatura a que foram expostos (Figura 7C).

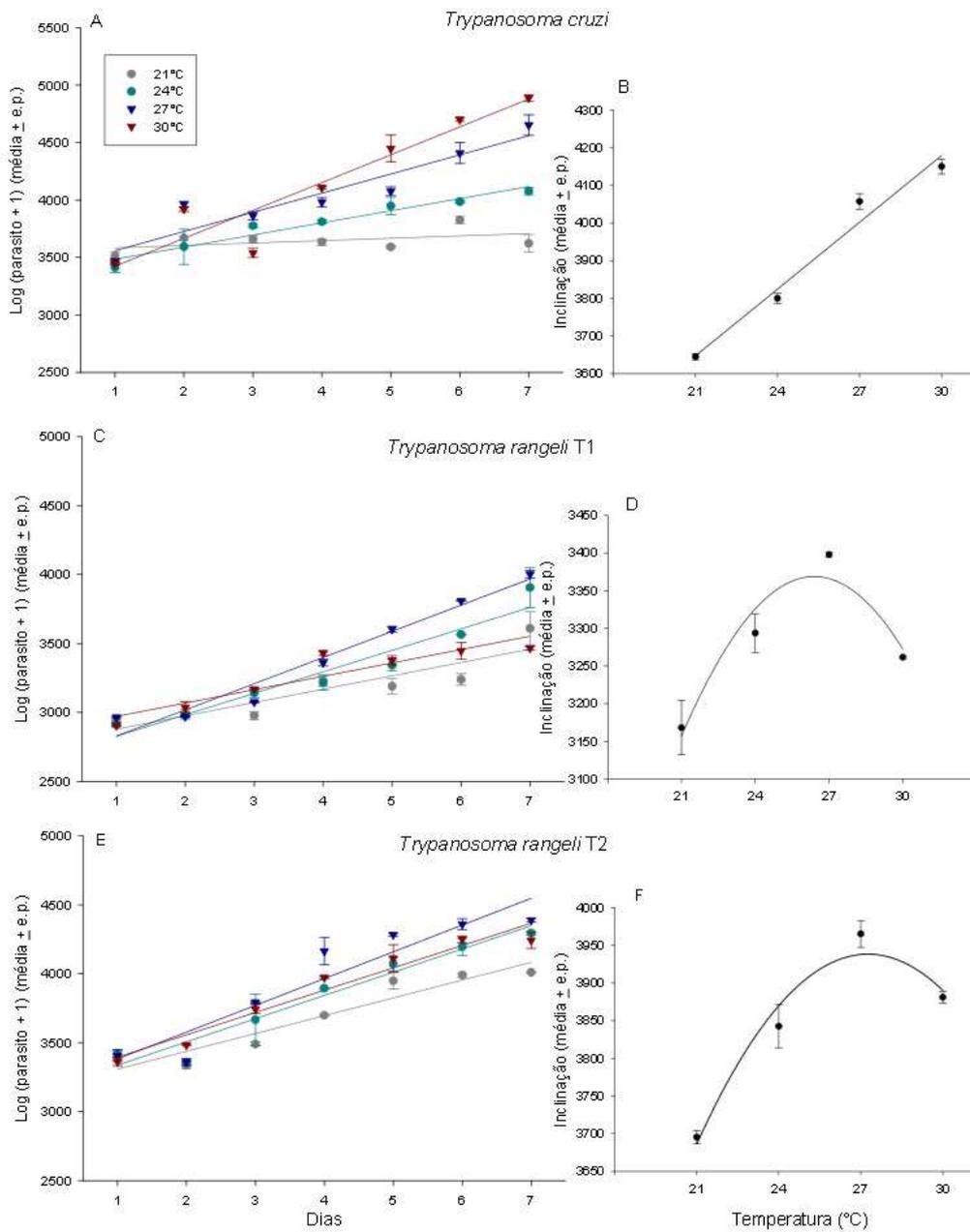


Figura 6 - Crescimento de epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* e *Trypanosoma rangeli* em cultura, mantidos em diferentes temperaturas. As barras representam o erro da média de duas repetições.

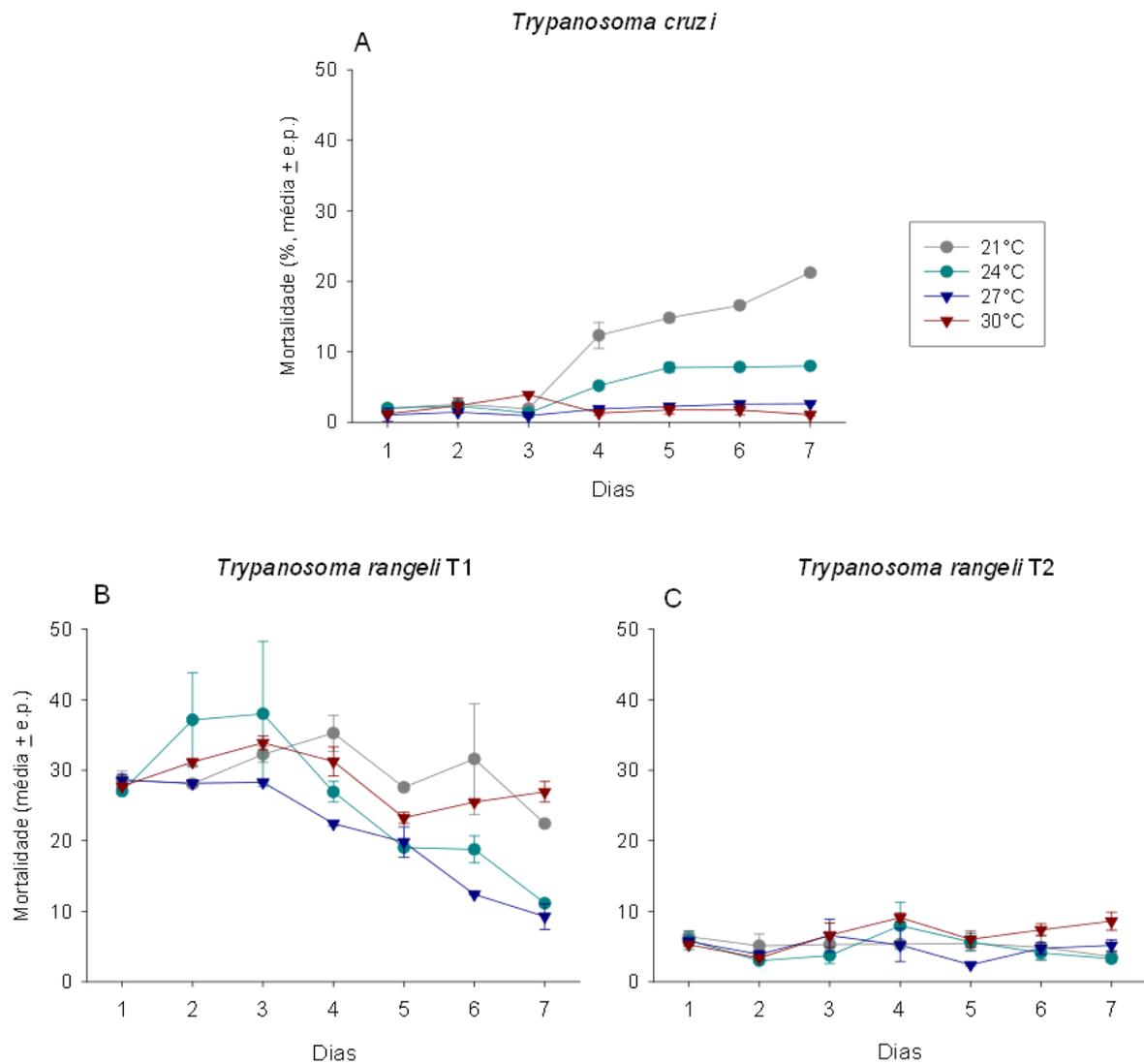


Figura 7 - Mortalidade de epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* e *Trypanosoma rangeli* em cultura, mantidos em diferentes temperaturas. Foram incluídos os dados de células coradas com PI e com FDA+PI, indicativo de células mortas ou em processo de morte celular. As barras representam o erro da média de duas repetições.

5.2 – Avaliação do desenvolvimento de insetos infectados submetidos a diferentes temperaturas

5.2.1 Insetos infectados por *Trypanosoma cruzi*

O objetivo desse experimento foi avaliar se o período intermudas e as taxas de mortalidade de insetos infectados e saudáveis variavam com a temperatura. Como esperado, independentemente da presença da infecção, a temperatura afetou o período intermudas em todos os tratamentos, uma vez que o tempo para alcançar o terceiro estágio foi reduzido conforme a temperatura foi aumentada (Figura 8, Log-Rank; $p=0,00001$ para os dois tratamentos). Independentemente da temperatura a que os insetos foram expostos, a infecção pelo *T. cruzi* prolongou o tempo necessário para as ninfas atingirem o terceiro estágio (Figura 2; Log-Rank, $p<0,0002$ para todos os tratamentos). Os tempos médios para as ninfas do grupo controle alcançarem o terceiro estágio foram de $32,1\pm 8,3$, $23,2\pm 9,5$, $17,8\pm 8,9$ e $13,3\pm 3,2$ dias para as temperaturas de 21, 24, 27 e 30°C, respectivamente. Para os insetos infectados, o tempo médio para a ocorrência da ecdise foi de $43,5\pm 9,2$, $30,0\pm 7,7$, $23,6\pm 6,3$ e $23,3\pm 10,4$ dias para as temperaturas de 21, 24, 27 e 30°C, respectivamente. Além de prolongar o tempo de muda para o terceiro estágio, a infecção pelo *T. cruzi* também diminuiu o sucesso de ecdise dos insetos mantidos a 21°C (Teste Z, $p=0,002$) e 30°C (Teste Z, $p=0,007$) (Tabela 2). A porcentagem de mudas com defeito foi baixa em todas as temperaturas e tratamentos testados, ficando em torno dos 10% (Tabela 2).

As taxas de mortalidade foram inicialmente avaliadas ao final de trinta dias após a primeira muda de cada grupo e dentro desse período não foram observadas diferenças significativas entre insetos infectados e saudáveis nas temperaturas avaliadas, exceto para os insetos infectados mantidos a 24°C, que apresentaram uma taxa de mortalidade 20% maior do que os insetos do grupo controle mantidos na mesma temperatura (Tabela 2; Teste Z, $p=0,008$).

Com objetivo de avaliar o efeito global da infecção, os insetos que ao longo do experimento morreram, não mudaram ou apresentaram defeitos na ecdise foram somados e comparados entre os tratamentos. De modo geral, a infecção por *T. cruzi* promoveu um decréscimo de 20% na população, sendo as comparações

estatisticamente significativas para os grupos mantidos a 21, 24 e 30°C (Tabela 2; Teste Z, $p=0,01$ para 21 e 24°C, $p=0,03$ para 30°C).

Para avaliar a interação da infecção com a temperatura e o jejum, a mortalidade das ninfas foi acompanhada por um período de 60 dias além daquele avaliado inicialmente (Figura 9). Independentemente da infecção, no final dos 90 dias de acompanhamento, praticamente todos os insetos mantidos a 27 e 30°C já haviam morrido, enquanto cerca da metade daqueles mantidos em 21 e 24°C permaneceram vivos (Figura 9). A comparação deste parâmetro ao longo do tempo entre os tratamentos mostrou um aumento na mortalidade em insetos infectados mantidos em 24°C (Figura 9B; Log-Rank, $p=0,02$) e 27°C (Figura 9D; Log-Rank, $p=0,0001$).

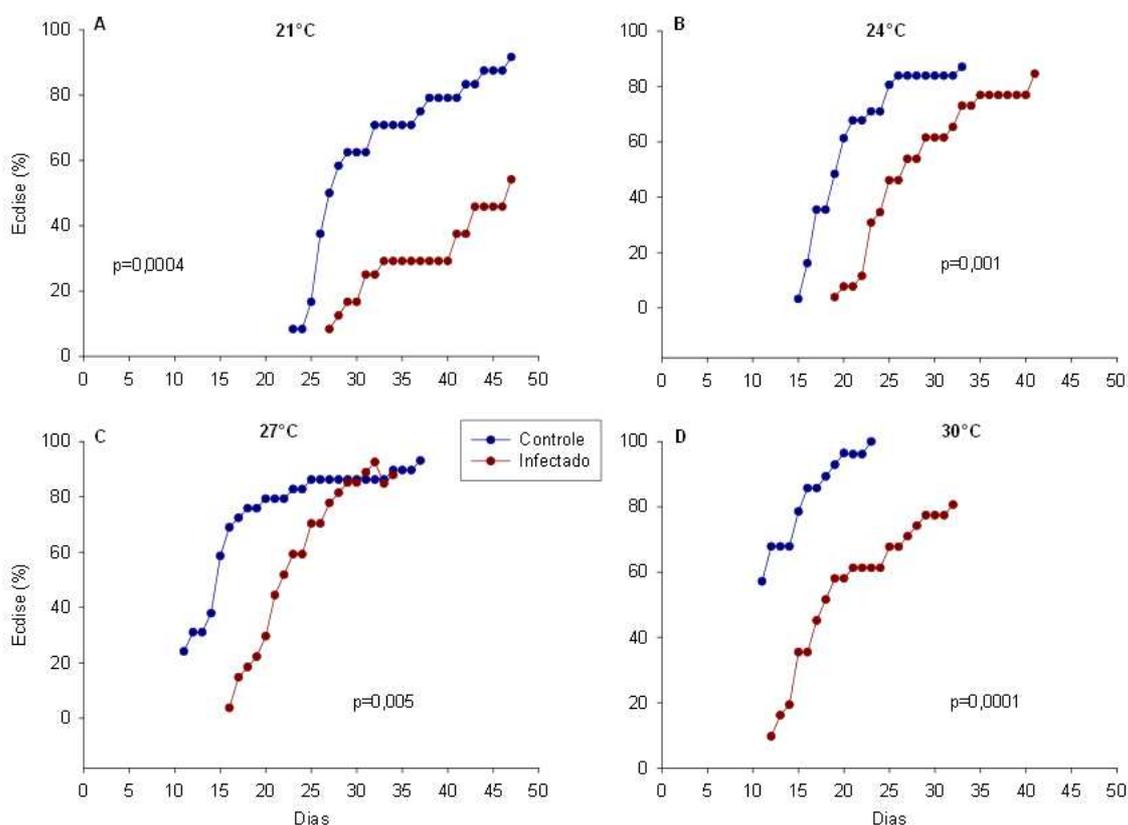


Figura 8 – Efeito da infecção por *Trypanosoma cruzi* no período necessário para alcançar o terceiro estágio de ninfas de *Rhodnius prolixus* mantidas em diferentes temperaturas. Os valores de p indicados em cada gráfico representam a significância estatística das comparações entre os tratamentos (Log-Rank).

Tabela 2 - Efeito da infecção por *Trypanosoma cruzi* no *fitness* de ninfas de *Rhodnius prolixus*

Temperatura (°C)	Status	Taxa de Mortalidade (%)	Teste Z	Não mudaram (%)	Teste Z	Defeito na muda (%)
21	Controle	25,0	n.s.	6,2	p=0,001	12,5
	Infectado	25,0		34,4		9,4
24	Controle	3,1	p=0,007	12,5	n.s	0
	Infectado	23,5		11,7		2,9
27	Controle	6,4	n.s	6,4	n.s	3,2
	Infectado	18,2		6,1		3,0
30	Controle	9,7	n.s	0	p=0,007	0
	Infectado	6,1		18,2		3,0

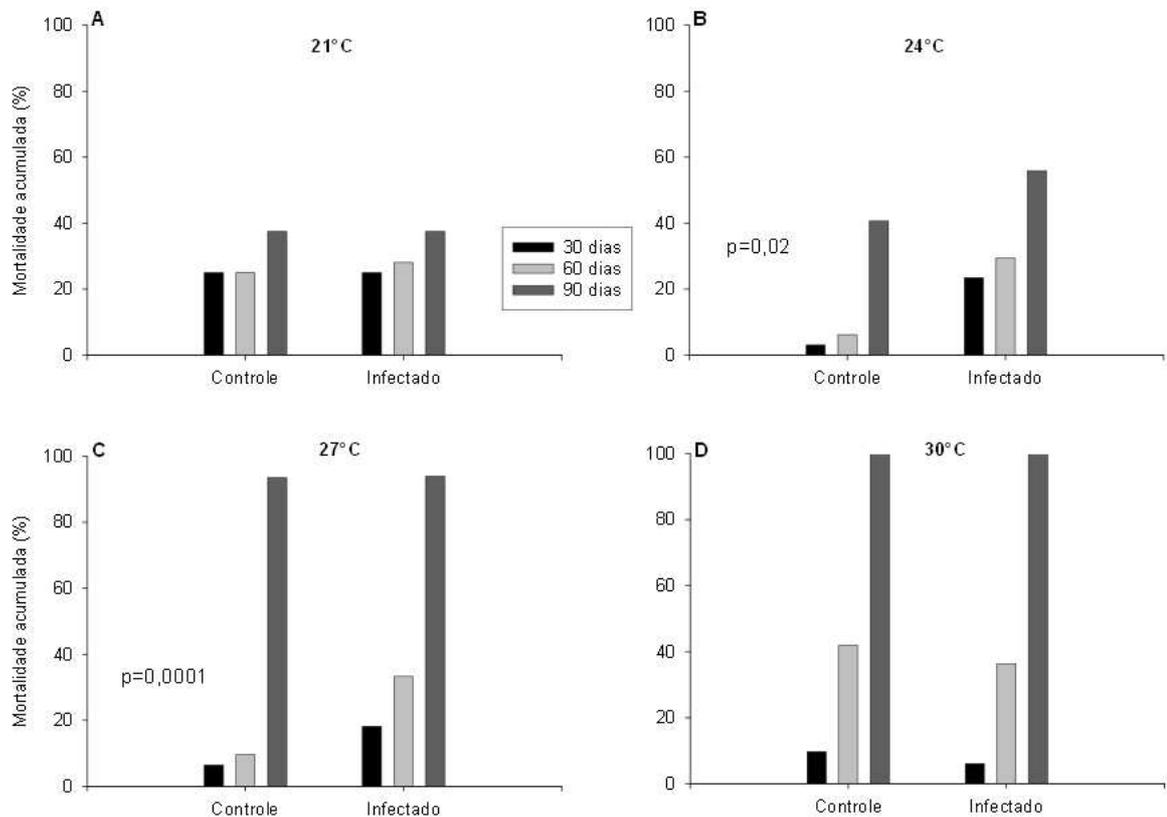


Figura 9 - Efeito da infecção por *Trypanosoma cruzi* nas taxas de mortalidade de ninfas de *Rhodnius prolixus* mantidas a diferentes temperaturas. Os valores de p indicados em cada gráfico representam a significância estatística das comparações entre os tratamentos (Log-Rank).

