

Ana Paula Machado do Nascimento

**ESTUDO DA DINÂMICA DA CO-INFECÇÃO POR  
*Trypanosoma cruzi* E *Trypanosoma rangeli* NO HOSPEDEIRO  
INVERTEBRADO E NO HOSPEDEIRO MAMÍFERO**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Mestre em Biotecnologia e Biociências.

**Orientadores:**

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Patrícia Hermes Stoco

Prof. Dr. Edmundo Carlos Grisard

Florianópolis, SC  
2015

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

do Nascimento, Ana Paula Machado

Estudo da dinâmica da co-infecção por *Trypanosoma cruzi* e *Trypanosoma rangeli* no hospedeiro invertebrado e no hospedeiro mamífero / Ana Paula Machado do Nascimento ; orientador, Edmundo Carlos Grisard ; coorientadora, Patrícia Hermes Stoco. - Florianópolis, SC, 2015.  
165 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós Graduação em Biotecnologia e Biociências.

Inclui referências

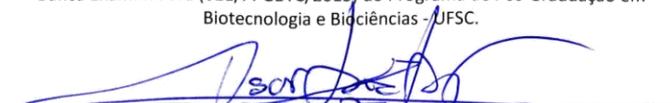
1. Biotecnologia e Biociências. 2. *Trypanosoma cruzi*. 3. *Trypanosoma rangeli*. 4. interação in vivo. 5. co-infecção. I. Grisard, Edmundo Carlos. II. Stoco, Patrícia Hermes. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências. IV. Título.

**“Estudo da dinâmica da co-infecção por *Trypanosoma cruzi* e *Trypanosoma rangeli* no hospedeiro invertebrado e no hospedeiro mamífero”**

Por

**Ana Paula Machado do Nascimento**

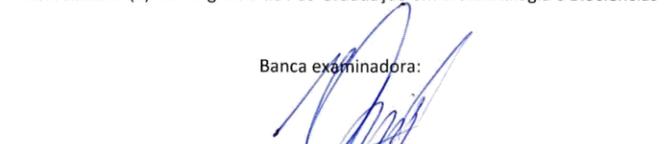
Dissertação julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da Banca Examinadora (021/PPGBTC/2015) do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências - UFSC.



Prof(a). Dr(a). Oscar Bruna Romero

Coordenador(a) do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências

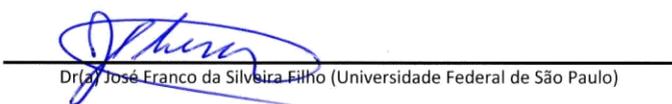
Banca examinadora:



Dr(a) Edmundo Carlos Grisard (Universidade Federal de Santa Catarina)  
Orientador(a)



Dr(a) Patrícia Hermes Stoco (Universidade Federal de Santa Catarina)  
Coorientador(a)



Dr(a) José Franco da Silveira Filho (Universidade Federal de São Paulo)



Dr(a) André de Nóbrega Pitaluga (Fundação Oswaldo Cruz)



Dr(a) Rafael Diego da Rosa (Universidade Federal de Santa Catarina)

Florianópolis, 06 de novembro de 2015.



Este trabalho é dedicado aos meus amados pais, Ivonete Machado e Pedro Paulo Xavier do Nascimento e a minha avó Irma Xavier do Nascimento pelo seu amor incondicional.



## AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente a Deus por me conceder saúde, disposição e inteligência para realizar este trabalho.

Aos meus orientadores, por me ensinarem que existe um universo dentro de um tubo de ensaio, por me permitirem me apaixonar pela ciência e descobrir o quão incrível pode ser o mundo da pesquisa. Por me ensinarem a enxergar as coisas do ponto de vista biológico, por me concederem um projeto que para mim ao menos foi bastante desafiador e principalmente por acreditarem que eu, uma enfermeira de araque, poderia realizar um bom trabalho e deixar alguma contribuição para o laboratório que cuidam com tanto zelo, sempre oportunizando as melhores condições de trabalho para todos nós.

Obrigada ao Professor Mário, por ter me orientado durante a iniciação científica quando eu não fazia a menor ideia do que era um laboratório de pesquisa e por ter me convidado para realizar o mestrado.

Gostaria de agradecer a duas pessoas por simplesmente por serem as mais maravilhosas que eu conheço e pela imensa sorte que eu tenho em poder chama-los de Pai e Mãe, muito obrigada por abdicarem de várias coisas para que eu pudesse viver os meus sonhos, muito obrigada por serem meu Herói e minha Heroína, e acima de tudo muito obrigada por nem sempre entenderem, mas por igualmente apoiarem todas as minhas decisões e permitirem que eu tivesse todas as experiências que desejei.

Obrigada a todos os companheiros de laboratório, primeiramente ao Maiko, que foi quem me recebeu pela primeira vez na Proto, pelas risadas e pelas pizzas, a Greicy que me auxiliou em vários momentos, especialmente nos experimentos com camundongos, pelas várias risadas nos momentos em que eu mais precisava e acima de tudo por aturar a minha “bipolaridade científica” e pela sua incrível capacidade de sempre ver o “copo meio cheio”.

A Ana por toda a sua ajuda e por sempre se mostrar disposta a me ajudar. A Ingrid que foi super mãezona e sempre se preocupava com o bem estar dos outros e por dar valiosos conselhos sobre a vida. A Carine que me ajudou em tantos momentos que nem saberia citar aqui, sempre atenciosa e carinhosa.

A Ibeth e ao Jair por compartilharem toda a sua experiência comigo e por serem exemplos de dedicação e profissionalismo.

A Danna, por todas as lembrancinhas de viagem, por adotar a Sissi e dar um lar a ela e por sempre ser solícita quando precisei. A

Carime e Laís, minhas companheiras de mestrado e que me auxiliaram nos momentos iniciais de toda esta jornada.

A Bibi, Vanessa e o Dennis e também a Emily, Shirley e Demétrio, funcionários do LAMEB, que em vários momentos me socorreram e marcaram “aquele horário” de última hora ou realizaram um “encaixe” nos dias mais atribulados para que eu pudesse realizar os meus experimentos, meu muito obrigada pessoal. Obrigada ao Dr. Álvaro Menin pelo auxílio nas análises histopatológicas.

Obrigada a Leila e a Fernanda por toda ajuda no biotério com as minhas “milhares” de caixas e longos experimentos com animais, vocês são ótimas meninas.

Obrigada ao Marcelo que me acompanha desde a época de monitoria, a Dona Nica que faz muita falta em nossos dias por ser sempre tão alegre e dedicada e também a Dona Lucimara por manter as coisas sempre organizadas para que pudéssemos realizar nosso trabalho da melhor forma possível.

Um agradecimento especial ao Professor Orlando por ser a pessoa mais metódica e organizada que eu conheço o Senhor me ensinou valiosas dicas. A Professora Márcia por ter me orientado durante a monitoria de parasitologia, acho que foi aí que tudo começou e também é claro a Marília, que é uma das pessoas mais interessantes que eu conheço você é um exemplo para mim.

A Rafa, Marjorie, Dani, Carol, Werica e a toda a equipe da UNIFESP que me receberam muito bem em seu laboratório durante o tempo que lá permaneci. Ao Professor José Franco da Silveira Filho é claro, por ceder o espaço, por ser tão gentil e acolhedor e por aceitar se deslocar para participar desta banca.

Obrigada ao Professor André Pitaluga também por aceitar o convite, por me auxiliar nos experimentos com os triatomíneos e por me oportunizar conhecer e abordar coisas novas para este trabalho. Ao Professor Rafael, por se dispor a ser relator deste trabalho e por participar da banca. Ao Professor Daniel por todos os comentários pertinentes, por avaliar o meu projeto inicialmente e por se dispor também a participar da banca. Meu muito obrigada a todos vocês.

Aos meus familiares que sempre me incentivaram a estudar, que sempre demonstraram o seu orgulho por mim, a começar pela minha Vó Irma, por todos os “mimos”, por costurar todos os meus vestidos, por ser sempre tão amorosa e tão “coruja”. A minha Tia Rosana por ser uma das pessoas mais generosas que eu conheço e por me ensinar lições importantes de como ser.

A Bruna por ter sido a prima, a amiga e em vários momentos a irmã que eu precisava. Muito obrigada pelas idas ao Shopping para espairer, pelos “baldes de café” e montanhas de tortuguitas quando meus experimentos não funcionavam. Com você tudo foi mais leve, mais fácil e muito mais divertido, muito obrigada por feito parte da minha vida.

Aos meus amigos Jullie, Moisés e Vinny desculpem-me pela ausência, por faltar nos aniversários, almoços e todos os grandes eventos de “Just Dance”, obrigada por compreenderem e apoiarem este momento da minha vida. A Ana, minha xará, colega de profissão e amiga de longa data, muito obrigada por sempre estar por perto. Aos colegas do LIDI, LIA e LVA por me salvarem em várias situações e sempre serem solícitos aos meus pedidos.

Agradeço a CAPES pela concessão da bolsa e ao CNPq por todo o apoio financeiro para o desenvolvimento deste projeto.

Obrigada a todos que fizeram parte direta ou indiretamente desta jornada.



“É muito melhor lançar-se em busca de conquistas grandiosas, mesmo expondo-se ao fracasso, do que alinhar-se com os pobres de espírito, que nem gozam muito nem sofrem muito, porque vivem numa penumbra cinzenta, onde não conhecem nem vitória, nem derrota.”

(Theodore Roosevelt)



## RESUMO

O *Trypanosoma cruzi* e o *Trypanosoma rangeli* são duas espécies de protozoários de ocorrência simpátrica entre as Américas do Sul e Central e que compartilham os mesmos hospedeiros invertebrados, hospedeiros mamíferos silvestres e domésticos, incluindo seres humanos. Uma vez que infecções mistas *T. rangeli/T. cruzi* já foram relatadas para diversos hospedeiros, buscamos gerar ferramentas para analisar a dinâmica da co-infecção, tendo gerado cepas de ambas as espécies que expressassem marcadores fluorescentes diferentes. Após a obtenção das cepas transfectadas, as mesmas foram clonadas e ensaios de PFGE confirmaram a integração dos plasmídeos pTREXmRFP/pTREXnGFP-Neo, pTREXmRFP-Hygro e pROCKGFP-Neo no genoma dos parasitos. Com estas ferramentas foi possível realizar um estudo quantitativo da cinética da infecção mista e das variações populacionais dos parasitos em ambos os hospedeiros mamífero e invertebrado. A avaliação do crescimento em diferentes proporções das duas espécies em co-cultivo axênico em meio LIT não revelou diferenças significativas se comparado ao cultivo isolado de cada cepa. Infecções de células THP-1 com os parasitos transfectados revelou uma diferença significativa no que diz respeito às cepas selvagens e transfectadas de *T. cruzi*, sendo caracterizada por um número menor de formas amastigotas por célula infectada em relação à cepa parental nos tempos de 2, 4, 8 e 24 h de infecção, porém ao comparar as taxas e tempos de multiplicação de cada uma das cepas, as diferenças não foram significativas. Ensaios preliminares *in vitro* da interação de hemócitos extraídos de *Rhodnius prolixus* com uma cepa de *T. rangeli* transfectada com o plasmídeo pTREXnGFP-Neo permitiram evidenciar uma rápida interação do parasito com estes tipos celulares, sendo registrada a internalização em várias situações, não sendo evidenciados sinais de multiplicação do *T. rangeli* nestes tipos celulares. Foram também realizados ensaios preliminares *in vivo* de co-infecção de *Rhodnius prolixus* por *T. cruzi* e *T. rangeli*, revelando uma resposta diferencial frente à infecção exclusiva pelo *T. cruzi* e *T. rangeli* em relação à co- infecção neste vetor. Em camundongos Balb/C a infecção prévia pelo *T. rangeli* não foi capaz de gerar uma proteção significativa contra a infecção subsequente pelo *T. cruzi*, porém é capaz de gerar uma redução da parasitemia causada pelo *T. cruzi* além de aumentar a sobrevivência dos animais infectados.

**Palavras-chave:** *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma rangeli*, Interação *in vivo*, co-infecção.



## ABSTRACT

*Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* are two species of sympatric occurrence of protozoa between South and Central America that share the same invertebrates hosts, wild and domestic mammalian hosts, including humans. Once mixed infections *T. rangeli* / *T. cruzi* have been reported for various hosts, we seek to generate tools for analyzing the dynamics of co-infection, having generated strains of both species that expressed different fluorescent markers. After obtaining the transfected strains, they were cloned and PFGE assays confirmed the integration of the plasmids pTREXmRFP / pTREXnGFP-Neo, and pROCKGFP pTREXmRFP-Hygro-Neo into the genome of parasites. With these tools it was possible to perform a quantitative kinetic study of mixed infection and population variations of the parasites in both mammal and invertebrate hosts. The evaluation of different growth ratios of the two species in axenic co-cultivation in LIT medium revealed no significant differences when compared to the isolated culture of each strain. THP-1 cells infections with transfected parasites revealed a significant difference in respect to the wild and transfected *T. cruzi* strains, characterized by a smaller number of amastigotes per infected cell In relation to parental strain on times 2, 4, 8 and 24 h of infection. However, when comparing propagation rates and times of each of the strains, the differences were not significant. Preliminary assays in vitro of the interaction of hemocytes extracted from *Rhodnius prolixus* with *T. rangeli* strain transfected with the pTREXnGFP-Neo plasmid showed a rapid interaction of the parasite with these cell types, internalization being recorded in various situations, not being evidenced signals of multiplication of *T. rangeli* in these cell types. It was also carried out preliminary tests in vivo of co-infection of *Rhodnius prolixus* by *T. cruzi* and *T. rangeli*, showing a differential response against exclusive infection by *T. cruzi* and *T. rangeli* regarding co-infection in this vector. In mice BALB / C, prior infection with *T. rangeli* was not able to generate a significant protection against subsequent infection by *T. cruzi*, but it is able to generate a reduction in parasitemia caused by *T. cruzi*, in addition to increasing the survival of infected animals.

**Keywords:** *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma rangeli*, in vivo interaction, co-infection.



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

cDNA- Ácido desoxirribonucleico complementar  
cm<sup>2</sup> – centímetro quadrado  
CO<sub>2</sub> – Dióxido de carbono  
DAPI – 4',6 Diamidino-2- fenilindol  
DMEM : Meio de cultura Eagle modificado por Dulbecco (do inglês *Dulbecco's Modified Eagle Medium*)  
DNA – Ácido desoxirribonucleico  
dNTP: Desoxirribonucleotídeos Fosfatados  
dpi –Dias pós infecção  
DTU- Unidades discretas de tipagem (do inglês *Discrete Typing Units*)  
EDTA: Ácido etilenodiamino tetra-acético  
FACS: Seleção de células por citometria de fluxo (do inglês *Flow Cytometer Cell Sorter*)  
GAPDH - Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase  
GFP – proteína verde fluorescente (do inglês *Green Fluorescent Protein*)  
G418 – Antibiótico análogo à Neomicina (Geneticin)  
HE- Hematoxilina e Eosina  
IgG – Imunoglobulina G  
IgM – Imunoglobulina M  
kDa- Kilodaltons  
kDNA- DNA do cinetoplasto  
LIT – Meio de cultura de infusão de fígado e triptose (do inglês *Liver Infusion Triptose*)  
LMP: Baixo ponto de fusão (do inglês *Low Melting Point*)  
M – molar  
mM – milimolar  
ml – mililitro  
MOI- Multiplicidade de infecção (do inglês *Multiplicity of Infection*)  
OMS - Organização Mundial da Saúde  
Neo: Gene de resistência a neomicina  
NNN- Meio Neal, Novy e Nicolle  
ng – nanograma  
nm – nanômetro  
pb – pares de base  
PCR- Reação em cadeia da polimerase (do inglês *Polymerase Chain Reaction*)  
qPCR – PCR quantitativa ( do inglês *Quantitative Polymerase Chain Reaction*)

pH- Potencial Hidrogeniônico

PBS – tampão salina fosfato, pH 7,4 (do inglês *Phosphate Buffered Saline*)

PFGE – Eletroforese em campo pulsado (do inglês *Pulsed Field Gel Eletrophoresis*)

PMA- Forbol-12-miristato-13-acetato

rDNA- DNA ribossomal

RPMI- Meio de cultura *Roswell Park Memorial Institute*

RFP – proteína vermelha fluorescente (do inglês *Red Fluorescent Protein*)

RT- Transcrição reversa

SBF- Soro Bovino Fetal

U – unidade

µg – micrograma

µl – microlitro

## LISTA DE FIGURA

<b>Figura 1:</b> Forma tripomastigota sanguínea de <i>Trypanosoma cruzi</i> . Fonte: Laboratório de Protozoologia – UFSC, 2010.....	31
<b>Figura 2:</b> Ciclo biológico do <i>Trypanosoma cruzi</i> . Fonte: CDC.....	33
<b>Figura 3:</b> Forma tripomastigota sanguínea de <i>Trypanosoma rangeli</i> . Fonte: STOCO, 2010.....	37
<b>Figura 4:</b> Ciclo biológico do <i>Trypanosoma rangeli</i> . (A) Tripomastigotas sanguíneos de <i>T. rangeli</i> sugado pelo triatomíneo no momento do repasto sanguíneo; (B) Presença do parasito no tubo digestivo na forma epimastigota curta e longa; (C) Passagem do parasito através do epitélio intestinal para a hemolinfa, onde o parasito se multiplica livremente; (D) Interação do <i>T. rangeli</i> com os hemócitos do triatomíneo; (E) Epimastigotas longos de <i>T. rangeli</i> aderem às glândulas salivares; (F) Metacicloogênese do <i>T. rangeli</i> na luz das glândulas salivares, diferenciando-se em tripomastigotas metacíclicos. Fonte: STOCO <i>et al.</i> , 2014.....	39
<b>Figura 5:</b> Mapa das Américas do Sul e Central demonstrando as áreas com presença de casos de infecção humana pelo <i>Trypanosoma cruzi</i> até 1992 (fundo sombreado) e os pontos correspondem aos casos de infecções humanas pelo <i>Trypanosoma rangeli</i> , demonstrando a ocorrência simpátrica entre estas duas espécies (GRISARD <i>et al.</i> , 2003).....	46
<b>Figura 6:</b> Representação esquemática dos plasmídeos pTREXGFP/RFPNeo (A) e pROCKGFPNeo (B).....	54
<b>Figura 7:</b> <i>Trypanosoma rangeli</i> expressando as proteínas fluorescentes GFP e RFP. Em (A), <i>T. rangeli</i> cepa Choachí GFP transfectado com o plasmídeo pTREXnGFP-Neo. Em (B), <i>T. rangeli</i> cepa Choachí RFP transfectado com o plasmídeo pTREXmRFP-Neo.....	71
<b>Figura 8:</b> Diferentes cepas de <i>Trypanosoma cruzi</i> expressando as proteínas fluorescentes GFP e RFP. Em (A), <i>T. cruzi</i> cepa Y transfectado com o plasmídeo pROCK-GFP-Neo; Em (B), <i>T. cruzi</i> cepa SC28 e em (C) <i>T. cruzi</i> clone CL Brener transfectados com o plasmídeo pTREXmRFP-Hygro.....	72
<b>Figura 9:</b> Histograma de citometria de fluxo (FITC-A) de <i>Trypanosoma rangeli</i> Choachí GFP. Em (A) população não clonada e em (B), população após diluição seriada. Em preto a cepa selvagem, utilizada como controle e em verde os parasitos transfectados expressando a proteína verde fluorescente.....	73
<b>Figura 10:</b> Histograma de citometria de fluxo (PerCP-A) de <i>T.rangeli</i> Choachí RFP. Em (A) população não clonada e em (B) população após	

diluição seriada. Em preto a cepa selvagem, utilizada como controle e em vermelho os parasitos transfectados expressando o gene da proteína vermelha fluorescente.....74

**Figura 11:** Histograma de citometria de fluxo (FITC-A) de *T. cruzi* Y GFP. Em (A) população não clonada e em (B) população clonada pela técnica de diluição limitante. Em preto a cepa selvagem, utilizada como controle e em verde os parasitos transfectados expressando a proteína verde fluorescente.....75

**Figura 12:** Histograma de citometria de fluxo (PerCP-A) de *T. cruzi* SC28 RFP. Em (A) população não clonada e em (B) população clonada. Em preto a cepa selvagem utilizada como controle e em vermelho os parasitos transfectados expressando a proteína vermelha fluorescente.....75

**Figura 13:** Histograma de citometria de fluxo (PE-A) de *Trypanosoma cruzi* CL Brener RFP. Em preto a cepa selvagem, utilizada como controle e em vermelho os parasitos transfectados clonados expressando o gene da proteína vermelha fluorescente.....76

**Figura 14:** Perfil de separação cromossômica das cepas de *Trypanosoma cruzi* e *Trypanosoma rangeli* obtido pela técnica de eletroforese em campo pulsado (PFGE). 1) Padrão de alto peso molecular (Cromossomas de *Hansenula wingei*); 2) *T. rangeli* Choachí WT; 3) *T. rangeli* Choachí GFP; 4) *T. rangeli* Choachí RFP; 5) *T. cruzi* SC 28 WT; 6) *T. cruzi* SC 28 RFP; 7) *T. cruzi* Y WT; 8) *T. cruzi* Y GFP; 9) *T. cruzi* CL Brener WT; 10) *T. cruzi* CL Brener RFP; 11) Padrão de baixo peso molecular (Cromossomas de *Saccharomyces cerevisiae*).....77

**Figura 15:** Integração do plasmídeo pTREXmRFP-Hygro e do plasmídeo pTREXnGFP-Neo no genoma da cepa Choachí de *Trypanosoma rangeli* PFGE no genoma da cepa CL Brener de *Trypanosoma cruzi*. (A) PFGE das cepas selvagem (WT) e transfectada (RFP) e hibridização com sonda para o gene higromicina. (B) Integração das cepas selvagem (WT) e transfectada (GFP) e a hibridização com sonda para Neomicina.....78

**Figura 16:** Curva de crescimento das cepas fluorescentes de *Trypanosoma rangeli* e *Trypanosoma cruzi*. As cepas *T. rangeli* GFP e RFP, *T. cruzi* Y GFP, *T. cruzi* CL Brener RFP e *T. cruzi* SC28 RFP e suas respectivas cepas selvagens foram quantificadas através de contagem em câmara de Neubauer, durante 11 dias.....80

**Figura 17:** Análise de crescimento *in vitro* das cepas CL Brener RFP de *Trypanosoma cruzi* (barras vermelhas) e Choachí GFP de *Trypanosoma*

*rangeli* (Barras verdes) em co-cultivo realizado com diferentes proporções de cada espécie. (A) Número de parasitos determinado por contagem em câmara de Neubauer através de microscopia de Fluorescência. (B) Determinação do número de parasitos por citometria de fluxo (20.000 eventos). Os asteriscos representam as diferenças estatísticas através do teste t de student pareado (\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,005$  e \*\*\*  $p < 0,0005$ ). O crescimento foi verificado durante 11 dias, sendo a citometria de fluxo realizada nos dias 1, 4, 7 e 10 do experimento.....83

**Figura 18:** Análise de crescimento *in vitro* das cepas SC28 RFP de *Trypanosoma cruzi* (Barras vermelhas) e Choachí GFP de *Trypanosoma rangeli* (Barras verdes) em co-cultivo realizado com diferentes proporções de cada espécie. (A) Número de parasitos determinado por contagem em câmara de Neubauer através de microscopia de Fluorescência. (B) Determinação do número de parasitos por citometria de fluxo (20.000 eventos). Os asteriscos representam as diferenças estatísticas através do teste t de student pareado (\*  $p < 0,05$ , e \*\*  $p < 0,005$ ). O crescimento foi verificado durante 11 dias, sendo a citometria de fluxo realizada nos dias 2, 4, 7, 9 e 11 do experimento.....87

**Figura 19:** Gráfico Dot Plot de citometria de fluxo mostrando as proporções 1:1 do ensaio de co-cultura entre *Trypanosoma cruzi* SC28 RFP e *Trypanosoma rangeli* Choachí GFP. As espécies estão agrupadas de acordo com a fluorescência expressa. O canal PerCP para a fluorescência vermelha e o canal FITC para a fluorescência verde.....89

**Figura 20:** Análise de crescimento *in vitro* das cepas Y GFP de *Trypanosoma cruzi* (barras verdes) e Choachí GFP de *Trypanosoma rangeli* (Barras vermelhas) em co-cultivo realizado com diferentes proporções de cada espécie. (A) Número de parasitos determinado por contagem em câmara de Neubauer através de microscopia de Fluorescência. (B) Determinação do número de parasitos por citometria de fluxo (20.000 eventos). Os asteriscos representam as diferenças estatísticas através do teste t de Student pareado (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,005$ ). O crescimento foi verificado durante 11 dias, sendo a citometria de fluxo realizada nos dias 1, 3, 5, 8 e 10 do experimento.....91

**Figura 21:** Infecção de célula L929 com *Trypanosoma cruzi* Y GFP utilizando formas tripomastigotas sanguíneas.....93

<b>Figura 22:</b> Infecção <i>in vitro</i> de células THP-1 com cepas SC28 RFP, CL Brener RFP e Y GFP de <i>Trypanosoma cruzi</i> (24 h de infecção).....	94
<b>Figura 23:</b> Interação de células THP-1 com <i>Trypanosoma rangeli</i> (cepas Choachí GFP e RFP) após quatro horas de interação.....	95
<b>Figura 24:</b> Representação gráfica do percentual de células THP-1 infectadas com <i>Trypanosoma cruzi</i> cepas CL Brener (A), Y (B) e SC 28 (C) e <i>Trypanosoma rangeli</i> cepa Choachí GFP e RFP. O gráfico representa o percentual de células THP-1 infectadas após 2 , 4,8 e 24 h de infecção. *p<0,05, ** p < 0,005 e *** p <0,0005.....	97
<b>Figura 25:</b> Co-infecção de células THP-1 por cepas de <i>Trypanosoma cruzi</i> (Tc) transfectadas. Os tempos indicados correspondem ao tempo de interação do parasito com a célula em horas.....	98
<b>Figura 26:</b> Número total de amastigotas observados em células THP-1 co-infectadas por <i>Trypanosoma cruzi</i> e <i>Trypanosoma rangeli</i> . O gráfico representa o número de amastigotas intracelulares e parasitos aderidos e internalizados após 2 , 4,8 e 24 h de infecção com <i>T. cruzi</i> CL Brener RFP e <i>T. rangeli</i> Choachí GFP (A). Y GFP e Choachí RFP (B) e SC 28 RFP e Choachí GFP (C). ** p < 0,005 *** p <0,0005.....	100
<b>Figura 27:</b> Células THP-1 infectadas com diferentes cepas selvagens de <i>Trypanosoma cruzi</i> e cepas do parasito transfectadas com os plasmídeos pTREXmRFP-Hygro, pTREXmRFP-Neo, e pROCKnGFP- Neo. Coloração pelo método de Giemsa após 24 h e 72 h de infecção. A barra corresponde a 10µm.....	103
<b>Figura 28:</b> Microfotografias do intestino de <i>Rhodnius prolixus</i> infectado com <i>Trypanosoma cruzi</i> SC28 RFP e <i>Trypanosoma rangeli</i> Choachí GFP.....	106
<b>Figura 29:</b> Análise de especificidade dos iniciadores desenhados para a amplificação dos genes relacionados a imunidade em <i>Rhodnius prolixus</i> . (A) Curva de dissociação dos genes: Actina (ACT), Cactus (CAC), Caudal (CAD), Draper (DRA), Profenoxidase (PPO) e Prolixicina (PROL). (B) Gel de poliacrilamida 8% corado pelo brometo de etídio revelando os produtos de amplificação dos iniciadores desenhados.....	107
<b>Figura 30:</b> Abundância relativa do mRNA de Profenoxidase (PPO) em <i>Rhodnius prolixus</i> infectados com <i>Trypanosoma rangeli</i> , e/ ou <i>Trypanosoma cruzi</i> . (A) Níveis relativos de mRNA de PPO no tubo digestivo anterior de um <i>pull</i> de cinco insetos após 24 h , sete e 14 pós alimentação artificial com mistura de sangue inativado e parasitos. (B),	

Níveis relativos de mRNA de PPO no tubo digestivo posterior sete e 14 após alimentação artificial com mistura de sangue inativado e parasitos.....110

**Figura 31:** Abundância relativa de mRNA do gene Prolixicina (PROL) em *Rhodnius prolixus* infectados com *Trypanosoma rangeli* e / ou *Trypanosoma cruzi*. (A) Níveis relativos de mRNA de PROL no tubo digestivo anterior de um *pull* de cinco insetos por grupo após 24h , sete e 14 dias após alimentação artificial com mistura de sangue inativado e parasitos. Em (B), Níveis relativos de mRNA de PROL no tubo digestivo posterior após sete e 14 dias após alimentação artificial com mistura de sangue inativado e parasitos.....111

**Figura 32:** Abundância relativa de mRNA do gene CAUDAL (CAD) em *Rhodnius prolixus* infectados com *Trypanosoma rangeli* e / ou *Trypanosoma cruzi*. (A) Níveis relativos de mRNA de CAD no tubo digestivo anterior de um *pull* de cinco insetos por grupo após 24h , sete e 14 dias após alimentação artificial com mistura de sangue inativado e parasitos. Em (B), Níveis relativos de mRNA de CAD no tubo digestivo posterior após sete e 14 dias após o repasto infectivo com uma mistura de sangue inativado e parasitos.....113

**Figura 33:** Abundância relativa de mRNA do gene DRAPER (DRA) em *Rhodnius prolixus* infectados com *Trypanosoma rangeli* e / ou *Trypanosoma cruzi*. (A) Níveis relativos de mRNA de DRA no tubo digestivo anterior de um *pull* de cinco insetos por grupo após 24h , sete e 14 dias após alimentação artificial com mistura de sangue inativado e parasitos. Em (B), níveis relativos de mRNA de DRAPER no tubo digestivo posterior após sete e 14 dias após alimentação artificial com mistura de sangue inativado e parasitos.....114

**Figura 34:** Abundância relativa de mRNA do gene CACTUS (CAC) em *Rhodnius prolixus* infectados com *Trypanosoma rangeli* e / ou *Trypanosoma cruzi*. (A) Níveis relativos de mRNA de CAC no tubo digestivo anterior de um *pull* de cinco insetos por grupo após 24 h, sete e 14 dias após alimentação artificial com mistura de sangue inativado e parasitos. Em (B), níveis relativos de mRNA de CAC no tubo digestivo posterior após sete e 14 dias após alimentação artificial com mistura de sangue inativado e parasitos.....115

**Figura 35:** Hemócitos de *Rhodnius prolixus* infectados com *Trypanosoma rangeli* Choachí GFP após 24 h de infecção.....116

**Figura 36:** Hemócitos de *Rhodnius prolixus* infectados pelo *Trypanosoma rangeli* Choachí GFP corados com Giemsa e observados em microscopia de campo claro. Em (A), (B), (C) e (D), tipos celulares

encontrados na hemolinfa de <i>Rhodnius prolixus</i> após 24 h de infecção.....	117
<b>Figura 37:</b> Hemócitos de <i>Rhodnius prolixus</i> infectados pelo <i>Trypanosoma rangeli</i> Choachí GFP corados pelo método de Giemsa e observados em microscopia de campo claro. Em (A), (B), (C) e (D), tipos celulares encontrados na hemolinfa de <i>R. prolixus</i> após 48 h de infecção.....	118
<b>Figura 38:</b> Hemócitos de <i>Rhodnius prolixus</i> infectados pelo <i>Trypanosoma rangeli</i> Choachí GFP corados pelo método de Giemsa e observados em microscopia de campo claro. Em (A), (B), (C) e (D), tipos celulares encontrados na hemolinfa de <i>R. prolixus</i> após 120 h de infecção.....	119
<b>Figura 39:</b> Ensaio de interação celular <i>ex vivo</i> entre hemócitos de <i>Rhodnius prolixus</i> com o <i>Trypanosoma rangeli</i> GFP e entre células THP-1 com o <i>T. cruzi</i> GFP corados pelo LysoTracker <sup>®</sup> para avaliação do envolvimento de lisossomos na resposta do triatomíneo ao parasito.....	120
<b>Figura 40:</b> Formas tripomastigotas sanguíneas de <i>Trypanosoma cruzi</i> e <i>Trypanosoma rangeli</i> transfectadas com os plasmídeos pTREM-RFP-Neo/Hygro, pTREM-GFP-Neo e pROCKGFP-Neo, em sangue de camundongo experimentalmente infectado.....	121
<b>Figura 41:</b> Curva de parasitemia das cepas de <i>Trypanosoma cruzi</i> e <i>Trypanosoma rangeli</i> transfectadas e selvagens. Em (A) curva de parasitemia da cepa Y GFP e WT de <i>T. cruzi</i> . Em (B), a cepa SC 28 RFP e WT de <i>T. cruzi</i> . Em (C), a cepa CL Brener RFP e WT de <i>T. cruzi</i> e em (D), a cepa Choachí WT, RFP e GFP de <i>T. rangeli</i> . *** p<0,0001.....	123
<b>Figura 42:</b> Identificação de <i>Trypanosoma cruzi</i> em sangue de animais infectados com as cepas selvagens e transfectadas de CL Brener. Gel de poliacrilamida a 8%, corado com brometo de etídeo dos produtos de PCR dos iniciadores S35 e S36. 1) Padrão de baixo peso molecular (pUC 18 digerido com <i>HaeIII</i> . 2 -5) Camundongos infectados com CL Brener WT. 6-9) Camundongos infectados com CL Brener RFP. 10) Controle negativo e 11) Controle positivo.....	125
<b>Figura 43:</b> Percentual de sobrevivência em camundongos Balb/C co-infectados com <i>Trypanosoma cruzi</i> Y e <i>Trypanosoma rangeli</i> Choachí.....	126
<b>Figura 44:</b> Curva de parasitemia de camundongos Balb/C infectados com <i>Trypanosoma rangeli</i> e / ou <i>Trypanosoma cruzi</i> . (A) Parasitemia do animal infectado com <i>T. rangeli</i> Choachí RFP isoladamente. (B), Parasitemia do animal infectado com <i>T. cruzi</i> Y GFP isoladamente. (C)	

Parasitemia dos animais infectados com *T. cruzi* e desafiados com *T. rangeli* 15 dias após. (D) Parasitemia dos animais infectados com *T. rangeli* e desafiados com *T. cruzi* 15 dias após. (E) Parasitemia dos animais infectados simultaneamente com as duas espécies.....128

**Figura 45:** Padronização de qPCR para quantificação dos genes RFP e GFP. Em A, curva de dissociação do iniciador GFP e curva padrão para quantificação absoluta com  $R^2$ : 0,995 e em B, curva de dissociação do iniciador RFP e curva padrão para quantificação absoluta com  $R^2$ : 0,994. Em C Gel de poliacrilamida 8 % corado em Brometo de Etídeo. 1 – Padrão de peso molecular 100 pb. 2 – GFP 3- RFP. 4- Controle negativo GFP. 5 – Controle negativo RFP.....130



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Relação das cepas transfectadas e os plasmídeos utilizados.....	54
<b>Tabela 2:</b> Iniciadores desenhados para a amplificação de genes relacionados ao sistema imune de <i>Rhodnius prolixus</i> .....	67
<b>Tabela 3:</b> Iniciadores utilizados para amplificação dos genes RFP e GFP nos ensaios de qPCR.....	68
<b>Tabela 4:</b> Taxa de multiplicação e tempo de duplicação das cepas de <i>Trypanosoma cruzi</i> CL Brener WT e RFP, SC 28 WT e RFP e Y WT e GFP.....	102



## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>33</b>
1.1 <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	33
1.1.1 O ciclo biológico do <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	34
1.1.2 Interações biológicas do <i>T. cruzi</i> com o inseto vetor.....	35
1.1.3 Interações biológicas do <i>T. cruzi</i> com o hospedeiro mamífero.....	38
1.2 <i>Trypanosoma rangeli</i> .....	38
1.2.1 O ciclo gico do <i>T. rangeli</i> .....	39
1.2.2 Interação biológica do <i>T. rangeli</i> com o inseto vetor.....	42
1.2.3 Interações do <i>T. rangeli</i> / <i>T. cruzi</i> com os hemócitos do hospedeiro invertebrado.....	45
1.2.4 Interações do <i>T. rangeli</i> com o hospedeiro mamífero.....	46
1.3 Co-infecção por <i>T. cruzi</i> e <i>T. rangeli</i> .....	47
<b>2. JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>50</b>
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>53</b>
3.1 Objetivo Geral.....	53
3.2 Objetivos Específicos.....	53
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>54</b>
4.1 Parasitos.....	55
4.2 Obtenção dos parasitos fluorescentes com os plasmídeos pTREXnGFP-Neo/ pTREXmRFP-Neo e pROCK-GFPNeo.....	56
4.2.1 Transformação em <i>Escherichia coli</i> DH5 $\alpha$ Cálcio competente.....	57
4.2.2 Extração de DNA plasmidial.....	57
4.2.3 Linearização dos plasmídeos com enzima de restrição.....	57
4.2.4 Tranfecção dos parasitos.....	58
4.2.5 Clonagem das populações transfectadas.....	59
4.3 Análise do percentual de parasitos fluorescentes por Citometria de fluxo.....	59
4.4 Confirmação da integração do DNA plasmidial no DNA genômico de <i>T. rangeli</i> e <i>T. cruzi</i> .....	60
4.4.1 Preparação e inclusão de DNA cromossômico de <i>T. rangeli</i> e <i>T. cruzi</i> em blocos de agarose para PFGE.....	60
4.4.2 Separação das bandas cromossômicas de <i>T. rangeli</i> e <i>T. cruzi</i> por PFGE.....	61
4.4.3 Transferência do DNA cromossômico para filtros de nylon (“Chromo blot”).....	61
4.4.4 Marcação dos fragmentos de DNA por incorporação de fósforo radioativo.....	61
4.4.5 Hibridização das membranas com sonda radioativa.....	62

4.5 Crescimento <i>in vitro</i> das cepas transfectadas em cultivo axênico e em ensaios de co-cultura e co-infecção em células THP-1.....	62
4.5.1 Quantificação dos parasitos em câmara de Neubauer em microscopia convencional e de fluorescência.....	63
4.5.2 Células.....	63
4.5.2.1 Indução da diferenciação celular <i>in vitro</i> das células THP-1....	63
4.5.2.2 Infecção em células THP-1 por formas tripomastigotas de cultura de <i>T. cruzi</i> e <i>T. rangeli</i> .....	64
4.5.2.3 Determinação do tempo de duplicação dos parasitos selvagens e transfectados.....	65
4.6 Triatomíneos.....	65
4.6.1 Avaliação da estabilidade e da infectividade da cepa SC28 RFP de <i>T. cruzi</i> e Choachí GFP de <i>T. rangeli</i> transfectantes para <i>R. prolixus</i> .....	66
4.6.2 Grupos amostrais para avaliação da modulação de genes relacionados à imunidade de <i>R. prolixus</i> quando co-infectados por <i>T. cruzi</i> e <i>T. rangeli</i> .....	66
4.6.3 Dissecção dos triatomíneos para obtenção dos tecidos.....	66
4.6.4 Extração das amostras de RNA pelo método do Trizol.....	67
4.6.5 Síntese de cDNA.....	67
4.6.6 Ensaio de qPCR para a avaliação dos níveis de transcritos dos genes relacionados à imunidade de <i>Rhodnius prolixus</i> e quantificação absoluta da carga parasitária em camundongos Balb/c.....	67
4.7 Obtenção e infecção “ <i>ex vivo</i> ” dos hemócitos de <i>Rhodnius prolixus</i> .....	69
4.7.1 Ensaio de infecção de hemócitos de <i>R. prolixus</i> com <i>T. rangeli</i> Choachí GFP tratados com Lisotracker® .....	70
4.8 Camundongos.....	71
4.8.1 Ensaio de infecção no hospedeiro mamífero.....	71
4.8.2 Avaliação da parasitemia no hospedeiro mamífero.....	72
4.8.3 Avaliação histopatológica do hospedeiro mamífero.....	72
<b>5. RESULTADOS.....</b>	<b>73</b>
5.1 Obtenção das linhagens transfectantes.....	73
5.1.1 Análise das populações de parasitos expressando as proteínas fluorescentes.....	75
5.1.2 Integração dos genes GFP e RFP no genoma dos parasitos transfectados.....	78
5.1.3 Análise do crescimento <i>in vitro</i> das cepas transfectadas de <i>T. cruzi</i> e <i>T. rangeli</i> em cultivo axênico.....	81
5.1.4 Análise do crescimento <i>in vitro</i> dos parasitos transfectados em co-cultura.....	83

5.2	Análise da infecção experimental de células THP-1 por <i>T. cruzi</i> (Cepas SC28 RFP, CL Brener RFP e Y GFP).....	95
5.3	Análise da infecção experimental de células THP-1 por <i>T. rangeli</i> (Cepas Choachí GFP e RFP).....	96
5.5	Avaliação da infectividade e da evolução de cepas transfectadas de <i>T. cruzi</i> e <i>T. rangeli</i> em <i>R. prolixus</i> .....	105
5.6	Análise da especificidade dos iniciadores dirigidos aos genes de imunidade de <i>R. prolixus</i> .....	106
5.6.1	Análise da expressão relativa de genes de imunidade de <i>R. prolixus</i> frente a infecção por <i>T. cruzi</i> e/ou <i>T. rangeli</i> .....	109
5.7	Análise da infecção “ex vivo” de hemócitos de <i>R. prolixus</i> pelo <i>T. rangeli</i> Choachí GFP.....	116
5.7.1	Análise do recrutamento lisossomal dos hemócitos de <i>R. prolixus</i> frente à infecção com <i>T. rangeli</i> Choachí GFP.....	119
5.8	Expressão das proteínas fluorescentes na forma tripomastigota sanguínea em camundongos Balb/C.....	120
5.8.1	Perfil de parasitemia das cepas de <i>T. cruzi</i> e <i>T. rangeli</i> transfectadas em relação as suas respectivas parentais.....	122
5.9	Avaliação da parasitemia da co-infecção de <i>T. cruzi</i> GFP e <i>T. rangeli</i> RFP em camundongos Balb/C.....	125
5.10	Avaliação das alterações histopatológicas da co-infecção de <i>T. cruzi</i> e <i>T. rangeli</i> RFP em camundongos Balb/C.....	129
5.11	Padronização da qPCR para quantificação absoluta da carga parasitária presente nas amostras dos tecidos.....	129
<b>6.</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>131</b>
<b>7.</b>	<b>CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS.....</b>	<b>145</b>
<b>8.</b>	<b>REFERÊNCIA.....</b>	<b>147</b>

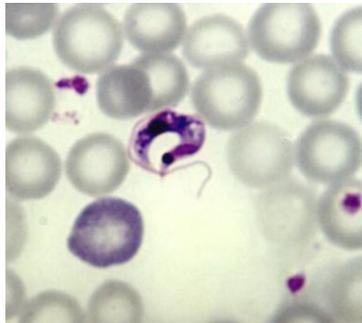


## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 *Trypanosoma cruzi*

O *Trypanosoma cruzi*, descoberto pelo médico-pesquisador Carlos Chagas em 1909, na cidade de Lassance, Minas Gerais, é um protozoário hemoflagelado, pertencente à Ordem Kinetoplastida e a Família Trypanosomatidae (NEVES, 2005). Agente etiológico de uma antroponose que afeta cerca de 10 milhões pessoas em todo o mundo, dentre os quais 6 a 7 milhões somente na América Latina, nas últimas décadas, tem sido cada vez mais encontrado nos Estados Unidos, Canadá, Europa e alguns países do Pacífico Ocidental, o que pode ser atribuído principalmente à mobilidade da população entre a América Latina e no resto do mundo (OMS, 2015).

Este parasito possui um ciclo biológico complexo do tipo heteroxênico e passa por diferentes formas evolutivas no interior do hospedeiro mamífero (ser humano, quati, mucura, tatu, morcego, paca, porco-espinho, macaco, gambá, cão, gato, entre outros) e nos insetos vetores: *Triatoma infestans*, *Triatoma sordida*, *Triatoma rubrovaria*, *Triatoma pseudomaculata*, *Triatoma brasiliensis*, *Panstrongylus lutzi*, *Panstrongylus megistus*, *Triatoma tibiamaculata*, *Rhodnius prolixus*, entre outros. Nos países da América do Sul (Argentina, Bolívia, Brasil, Chile, Paraguai e Uruguai) o *T. infestans* foi o maior responsável pela epidemia chagásica (BRASIL, 2009; MELO *et al.*, 2008; REY, 2008; DE ISOLA *et al.*, 1981; DIAS; AMATO NETO 2011; SOUSSUMI, 2004).



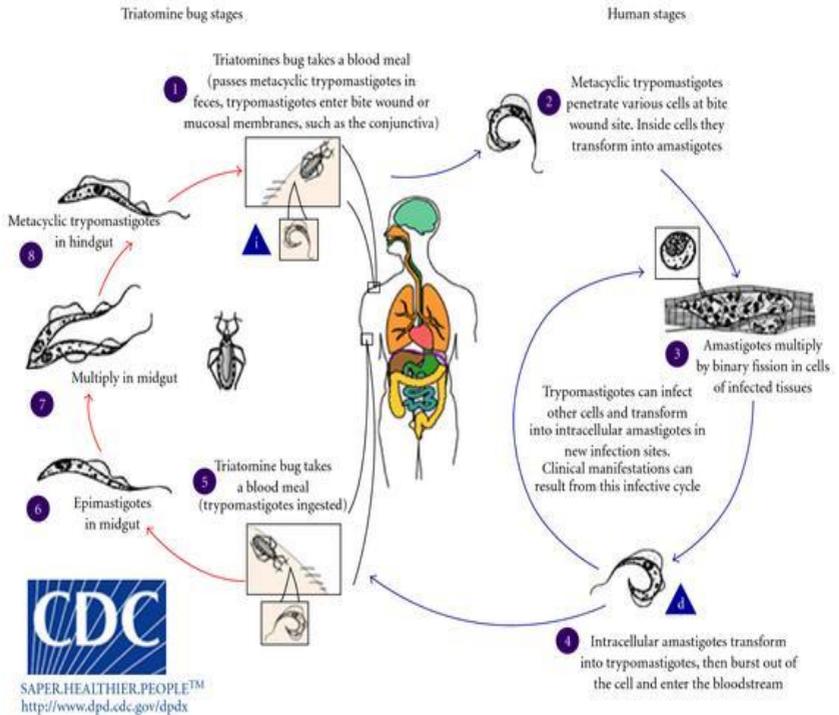
**Figura 1:** Forma tripomastigota sanguínea de *Trypanosoma cruzi*.

Fonte: Laboratório de Protozoologia – UFSC, 2010.

### 1.1.1 O ciclo biológico do *Trypanosoma cruzi*

Após a ingestão de formas tripomastigotas sanguíneas durante o repasto sanguíneo do vetor, o *T. cruzi* se diferencia em formas epimastigotas no intestino anterior, estas formas se multiplicam por divisão binária e colonizam todo o trato intestinal do inseto. Na porção final, denominada ampola retal, o parasito realiza o processo de metaciclogênese e se diferencia em tripomastigota metacíclico (NEVES, 2005). Estas formas infectantes são eliminadas nas fezes e urina. A transmissão da infecção ocorre, principalmente, pela deposição de fezes do inseto vetor sobre o hospedeiro mamífero durante o repasto sanguíneo, podendo o parasito penetrar por soluções de continuidade na pele ou pelas mucosas (NEVES, 2005, COURA, 2003).

Uma vez na corrente sanguínea esses parasitos invadem as células do hospedeiro e no interior destas se diferenciam para as formas amastigotas onde sofrem sucessivas divisões binárias. Momentos antes de a membrana celular romper, os parasitos realizam um novo processo de diferenciação para as formas tripomastigotas. Estas formas são liberadas na corrente sanguínea e são capazes de infectar novas células e tecidos. Existe um tropismo para fibras musculares cardíacas e lisas onde se originam os ninhos de amastigotas, sendo que a presença destes parasitos nestes tecidos na fase crônica da infecção associada à resposta imunológica do hospedeiro pode originar os quadros de megacólon, megasôfago e/ou cardiomegalia (NEVES, 2005, COURA, 2003).



**Figura 2:** Ciclo biológico do *Trypanosoma cruzi*. Fonte: CDC

### 1.1.2 Interações biológicas do *T. cruzi* com o inseto vetor

Segundo Isola *et al.* (1981) são vários os fatores que estão envolvidos no desenvolvimento do *T. cruzi* no intestino do inseto vetor. Dentre as barreiras que o parasito encontra podemos citar os componentes da saliva do inseto, uma série de enzimas digestivas quais o parasito necessitará superar para dar continuidade ao curso da infecção, além da temperatura, osmolaridade, pH, a própria dieta do invertebrado e também lectinas e aglutininas que apresentam capacidade de interagir com o parasito, prejudicando sua capacidade de invasão e colonização no inseto (SOARES *et al.*, 2006).

O trato intestinal dos triatomíneos é dividido em três regiões: intestino anterior, intestino médio (sendo dividido em médio anterior e médio posterior) e intestino posterior. Cada porção do aparelho digestivo destes insetos apresentam funções e condições ambientais bastante distintas que vão interferir no comportamento e morfologia do

parasito. Inicialmente, o sangue ingerido durante o repasto sanguíneo é armazenado no intestino médio anterior, onde a única modificação sofrida será a lise das hemácias. A digestão propriamente dita se dará no intestino médio posterior, que corresponde à região mais estreita de todo o intestino médio do triatomíneo (BILLINGSLEY; DOWNE, 1986; SCHAUB; BOKER 1986).

As regiões anterior e posterior do intestino médio possuem camadas de membranas extracelulares, conhecidas como membranas perimicrovilares, que são desenvolvidas e projetadas logo após a alimentação, de modo a criar diferentes espaços para que as enzimas digestivas possam agir (BILLINGSLEY; DOWNE, 1983, 1986; TERRA; FERREIRA, 2005).

A porção final no trato intestinal, o reto, é formada por cutículas recobertas por hidrocarbonetos, onde os resíduos da alimentação são estocados até o momento de serem eliminados durante a defecação do inseto (KOLLIEN; SCHAUB, 1998).

Conforme mencionado acima, no intestino anterior do inseto, o único processo de modificação que ocorre é a lise das células sanguíneas, porém apenas esta atividade hemolítica já pode afetar significativamente o parasito. A cepa Y de *T. cruzi* apresenta uma sensibilidade maior a este processo do que o clone Dm28, que consegue manter a infecção em níveis muito mais altos, mas, no entanto parece ser mais afetado pelas aglutininas presentes no estômago de *R. prolixus* em infecções experimentais (MELLO *et al.*, 1996).

Cerca de dois dias pós-alimentação, o *T. cruzi* já pode ser encontrado próximo às membranas extracelulares do inseto, porém sem penetrá-las. Parece haver uma relação diretamente proporcional entre o número de membranas e o número de parasitos presentes, porém não parece haver modificações destas estruturas pela presença do *T. cruzi* (KOLLIEN; SCHAUB, 1998).

Após fazerem a diferenciação de tripomastigotas para epimastigota no intestino médio do inseto, estas formas permanecem aderidas as membranas perimicrovilares que parecem ser importantes para a divisão do parasito (GONZALEZ *et al.*, 1999). Esta adesão é mediada pelo ancoramento do flagelo a estas membranas. Além disso, a superfície do *T. cruzi* também possui glicoinositolfosfolipídeos, que são importantes moléculas associadas à adesão dos parasitos na membrana enquanto epimastigotas. As formas tripomastigotas tem uma expressão bastante diminuída destas moléculas, o que faz com que elas fiquem livres na ampola retal e sejam eliminadas mais facilmente nas fezes do triatomíneo (NOGUEIRA *et al.*, 2007).

Em relação ao seu comportamento na hemolinfa, segundo trabalho realizado por (MELLO *et al.*, 1996), foi observado que o *T. cruzi* não se divide e não induz atividade tripanolítica quando diretamente inoculado na hemolinfa, porém parece induzir a um aumento de lisozimas e a formação de nódulos. Aparentemente, o *T. cruzi* ao contrário do *T. rangeli* parece não apresentar mecanismos contra algumas defesas imunológicas existentes na hemolinfa do triatomíneo.

Sabe-se que os triatomíneos são capazes de suportar grandes períodos em jejum, e isto influencia diretamente no curso da infecção pelo *T. cruzi*, que pode ficar sem aporte nutricional para realizar o seu desenvolvimento e multiplicação. Segundo Schaub e Boker (1986), a infecção pode ser perdida em determinadas situações onde o jejum do animal é prolongado, porém essa relação depende de outros fatores, como a espécie de triatomíneo em questão, seu estágio de desenvolvimento, e também da cepa do parasito.

Um estudo realizado por Kollien e Schaub (1998), revelou que ninfas com jejum superior a 30 dias, tiveram uma perda total da infecção. Além disso, naquelas onde os parasitos conseguiram alcançar a região da ampola retal, a população parasitária foi diminuída com o prolongamento do período de jejum. Ao que se deduz, o *T. cruzi* parece competir com seu vetor pelos nutrientes, já que nestas circunstâncias, a resistência do inseto a carência nutricional também é reduzida. Assim, ele poderia diminuir as reservas do triatomíneo ocasionando novas tentativas de alimentação por parte do inseto, o que causaria aumento nos ataques, contribuindo para o aumento epidemiológico da doença (SCHAUB, 1989; KOLLIEN; SCHAUB, 2000).

Em relação à patogenicidade do parasito sobre o inseto, os estudos ainda são controversos. Segundo Schaub (1988), ao realizar experimentos com a cepa Chile 5 não foi possível verificar diferenças entre os animais infectados e o grupo controle no que diz respeito ao período de muda, alteração esta observada em infecções com o *T. rangeli*.

Entretanto, em outro estudo realizado por Lima *et al.* (1992), foi relatada uma redução sutil na fecundidade do triatomíneo *P. megistus* infectados experimentalmente com a cepa VLE – 95. A postura de ovos foi 3,5 vezes menor nas fêmeas infectadas em relação ao grupo controle, bem como foi possível observar um menor número de ovos férteis e uma menor taxa de eclosão. Neste trabalho não foram registradas diferenças entre o período de muda ou taxa de mortalidade.

### 1.1.3 Interações biológicas do *T. cruzi* com o hospedeiro mamífero

A interação do *T. cruzi* com seus hospedeiros mamíferos, pode se apresentar de maneira bastante variada, podendo gerar graves alterações fisiopatológicas e levar o indivíduo a óbito, ou permanecer de forma latente durante anos em perfeito equilíbrio com o hospedeiro. Fatores como a cepa do parasito, o estado imunológico e nutricional do hospedeiro e a carga parasitária a qual o indivíduo foi exposto, são fundamentais para o prognóstico da parasitose.

O contato inicial do *T. cruzi* com o hospedeiro mamífero ocorre pelas formas tripomastigotas transmitidas através das fezes do triatomíneo que atingem a circulação periférica do hospedeiro. Estes parasitos migram em direção a células do sistema fagocitário do hospedeiro, e após a internalização se estabelecem intracelularmente na forma de amastigotas. Esta forma biológica perfaz multiplicações intensas e diferencia-se para o estágio de tripomastigota novamente, até a ruptura da membrana celular, reiniciando o ciclo de invasão as células do sistema fagocítico. Desta forma pode levar a um processo degenerativo e proliferativo, fazendo com que a resposta imune do hospedeiro torne-se muito responsiva a esta infecção, originando uma resposta inflamatória focal (NEVES, 2005).

Posteriormente a isto, tem-se a formação das lesões celulares, que podem apresentar-se de formas mais discretas, inclusive sendo reversíveis em determinadas situações, até levar a necrose e perda da estrutura celular. No ser humano, os tipos celulares mais afetados são as células musculares cardíacas e lisas e também os neurônios, este último especialmente na fase aguda da doença (NEVES, 2005).

Por fim, em decorrência dos processos fisiopatológicos demonstrados anteriormente, tem-se a fibrose, um tecido de reposição criado em resposta ao estresse causado pela presença do parasito, que se configura como uma estrutura rígida, com baixa vascularização comprometendo o músculo cardíaco em desempenhar seu papel na hemodinâmica do organismo (NEVES, 2005).

### 1.2 *Trypanosoma rangeli*

O *T. rangeli*, é um protozoário hemoflagelado, heteroxênico, sendo a segunda espécie de *Trypanosoma* frequentemente infectando mamíferos e triatomíneos nos países da América latina. (GRISARD et al., 1999, GUHL; VALLEJO, 2003). Este protozoário, descoberto em 1920 por Enrique Tejera, na Venezuela, pertence à mesma Ordem e Família do *T. cruzi*. Ambos os parasitos podem infectar diversas

espécies de insetos triatomíneos e de mamíferos domésticos e silvestres, incluindo o homem (CUBA CUBA, 1998).

O ciclo biológico do *T. rangeli* envolve uma complexa relação com seus hospedeiros mamíferos e invertebrados as quais são mediadas por fatores não claramente compreendidos até o presente momento (D'ALESSANDRO, 1976). Em especial, não há determinação do local de sua multiplicação ou mesmo de sua permanência intra ou extracelular no hospedeiro mamífero.

Apesar do *T. rangeli* ser não patogênico para o ser humano, sua infecção representa interferências na epidemiologia e também no diagnóstico específico da infecção pelo *T. cruzi* uma vez que estes dois parasitos compartilham uma ampla área geográfica de ocorrência e também hospedeiros mamíferos e vetores (D'ALESSANDRO, 1976, GRISARD *et al.*, 1999).



**Figura 3:** Forma tripomastigota sanguínea de *Trypanosoma rangeli*.

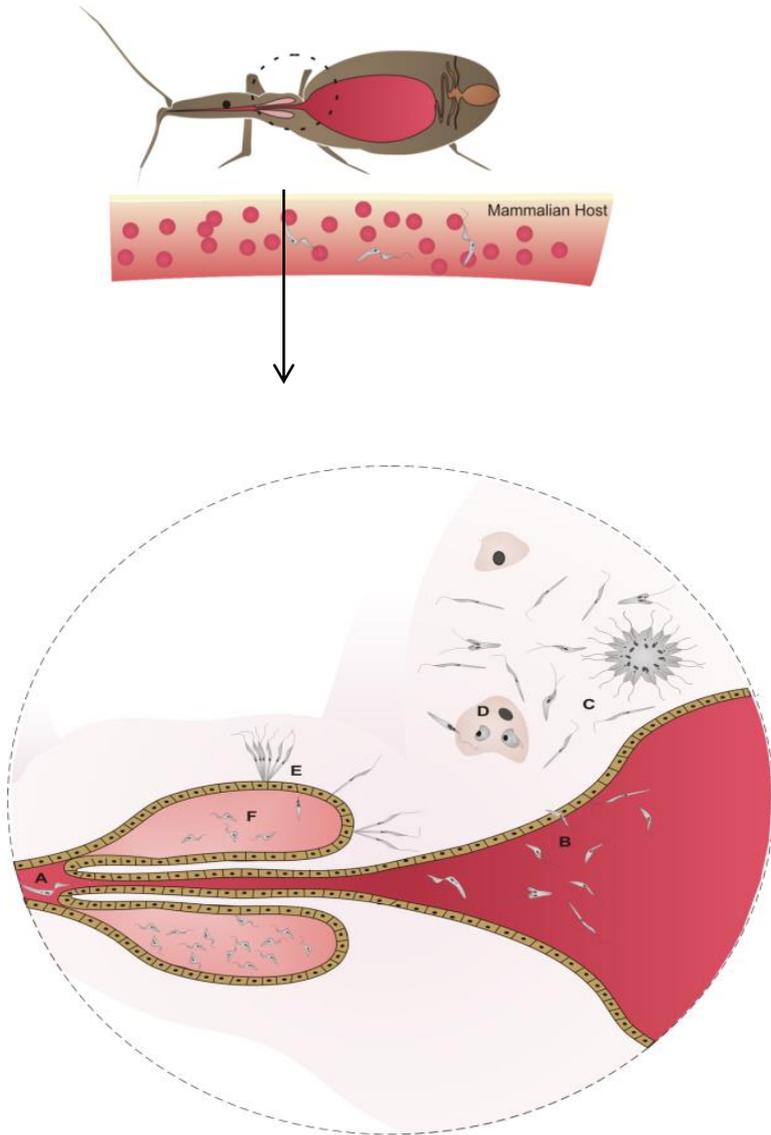
Fonte: STOCO, 2010

### 1.2.1 O ciclo biológico do *T. rangeli*

O ciclo biológico do *T. rangeli*, embora não completamente elucidado, inicia-se quando o triatomíneo (inseto vetor) ingere o sangue de animais infectados contendo as formas tripomastigotas. Uma vez no trato intestinal do inseto, este se diferencia em formas epimastigotas longas e curtas, quais se dividem e atravessam por sua vez o epitélio intestinal alcançando a cavidade celômica e a hemolinfa, onde se multiplicam sucessivamente por divisão binária. Os que conseguem sobreviver ao sistema de defesa do inseto invadem as glândulas salivares deste, e diferenciam-se em tripomastigotas metacíclicos, que é a forma infectante para o hospedeiro mamífero. Estes são transmitidos

## 40 INTRODUÇÃO

através da picada do inseto (GRISARD *et al.*, 1999; GUHL; VALLEJO, 2003; D' ALESSANDRO, 1976, D' ALESSANDRO-BACIGALUPO e SARAIVA 1992) sendo que o curso da infecção no hospedeiro mamífero ainda não foi elucidado.



**Figura 4:** Ciclo biológico do *Trypanosoma rangeli*. (A) Tripomastigotas sanguíneos de *T. rangeli* sugado pelo triatomíneo no momento do repasto sanguíneo; (B) Presença do parasito no tubo digestivo na forma epimastigota curta e longa; (C) Passagem do parasito através do epitélio intestinal para a hemolinfa, onde o parasito se multiplica livremente; (D) Interação do *T. rangeli*

com os hemócitos do triatomíneo; (E) Epimastigotas longos de *T. rangeli* aderem às glândulas salivares; (F) Metaciclogênese do *T. rangeli* na luz das glândulas salivares, diferenciando-se em tripomastigotas metacíclicos. Fonte: STOCO, 2014

### 1.2.2 Interação biológica do *T. rangeli* com o inseto vetor

Durante o repasto sanguíneo o triatomíneo ingere as formas tripomastigotas circulantes no sangue de um hospedeiro mamífero infectado com *T. rangeli* e, desta forma, o protozoário migra em direção ao trato intestinal do inseto, podendo permanecer ali durante toda a vida do triatomíneo.

No trato digestivo de *R. prolixus*, após a diferenciação dos tripomastigotas sanguíneos para epimastigotas, os parasitos realizam divisões assimétricas e dão origem aos epimastigotas de forma curta e longa que colonizam o intestino, sendo as formas curtas responsáveis pela invasão na hemocele do inseto. No trato intestinal, os parasitos são observados livres no lúmen, nunca aderidos ao epitélio. Porém eles são capazes de interagir com o mesmo e estima-se que esta ação seja mediada por lectinas presentes na superfície do próprio parasito e da célula do hospedeiro, ocorrendo através do flagelo ou da porção final do protozoário (HECKER *et al.*, 1990, DE OLIVEIRA; DE SOUZA, 2001). Estudos realizados com mais de 2.500 triatomíneos de três espécies diferentes infectados com duas cepas de *T. rangeli*, demonstraram que apenas entre 2 a 5% destes insetos apresentaram infecção da hemolinfa (HECKER *et al.*, 1990).

Os motivos pelo qual os parasitos não continuam o seu ciclo biológico no interior do inseto vetor não atravessando o epitélio intestinal e migrando em direção a hemolinfa ainda não está claramente elucidado, mas sabidamente existe uma importante relação com a espécie de triatomíneo, uma vez que estudo com o *T. infestans* demonstraram que mesmo inoculando os insetos diretamente na hemolinfa a infecção era eliminada e a glândula salivar nunca foi invadida pelo parasito (HECKER *et al.*, 1990).

Estes dados corroboram com os encontrados no trabalho de Gregório e Ratcliffe (1991) que afirma que o intestino de *T. infestans*, em comparação ao de *R. prolixus*, apresenta níveis mais altos de aglutininas contra o *T. rangeli*. E embora não se saiba ao certo se as aglutininas desempenham algum papel de atividade lítica contra o parasito, elas poderiam em associação com outras moléculas, interferir no desenvolvimento do *T. rangeli* no intestino do *T. infestans*. Além

disso, a saliva deste triatomíneo tem atividade lítica sobre o parasito, sendo mais uma barreira ao estabelecimento da infecção intestinal.

Estudos anteriores revelaram que a passagem do parasito pelo epitélio intestinal ocorre através de uma rota intracelular, sendo os parasitos foram observados dentro de vacúolos das células epiteliais. As células infectadas não apresentaram mudanças estruturais mesmo com vários parasitos presentes no seu interior. Para alcançar a hemolinfa, após passarem pela lâmina basal, os parasitos deixaram os vacúolos celulares previamente formados (HECKER *et al.*, 1990).

Oliveira e Souza (2001) demonstraram a existência de alterações morfológicas e uma densidade menor no citoplasma das células invadidas pelos parasitos através de estudos de microscopia eletrônica. Entretanto, durante a passagem pelo epitélio intestinal, não foi visualizada a presença de vacúolos envolvendo os parasitos durante a passagem pelas células.

A invasão da hemolinfa pelo parasito pode levar várias semanas, quando a infecção intestinal já esta bem estabelecida (GREWAL, 1956; D'ALESSANDRO, 1961). No entanto AÑEZ (1983) relata que foi observada a presença de parasitos na hemolinfa em um período menor que 24 horas após a alimentação infectante. Estes resultados são bastante variáveis de acordo com a cepa utilizada e também com a espécie do inseto vetor (TOBIE, 1961; ZELEDON; BLANCO, 1965).

É sabido que em condições naturais a porcentagem de *R. prolixus* que apresentam infecção natural pelo *T. rangeli* na hemolinfa é baixa (D'ALESSANDRO, 1961; TOBIE, 1961). Em infecções realizadas através de inoculação direta na hemolinfa, foi observado que a glândula salivar não era regularmente invadida e, se invadida, a infecção não era persistente. Isto pode ocorrer principalmente por tempo prolongado dos parasitos em cultura, sem passagens cíclicas em seus hospedeiros que alteram a infectividade da cepa (TOBIE, 1961). Neste mesmo estudo foi observada a multiplicação dos parasitos e uma grande heterogeneidade de formas. Nas culturas *in vitro* utilizadas na infecção dos triatomíneos, formas epimastigotas longas e curtas do *T. rangeli* costumam ser encontradas, porém há predomínio das formas curtas.

Alguns estudos afirmam que o sistema imunológico de *R. prolixus* parece atuar preferencialmente contra as formas epimastigotas curtas de *T. rangeli*. Este fato proporcionaria às formas longas a capacidade de escapar desta resposta, se tornando responsáveis pela manutenção da infecção e também pela invasão nas glândulas salivares

do inseto (MELLO *et al.*, 1996; MELLO *et al.*, 1999; GOMES *et al.*, 1999; GOMES *et al.*, 2003).

Conforme mencionado anteriormente a transmissão do *T. rangeli* é realizada durante a picada do triatomíneo e para isso, se faz necessária a metacicloênese nas glândulas salivares. O mecanismo que leva os epimastigotas a invadirem as células das glândulas salivares, ainda não está completamente elucidado, apesar de já ser descrita uma proteína formadora de poros, a qual pode ter um papel na penetração dos parasitos na glândula (MEIRELLES *et al.*, 2005).

Segundo Ellis *et al.* (1980), o *T. rangeli* inicia a penetração na glândula através do flagelo e posteriormente do corpo celular, perpassando a camada celular e também a sua membrana basal. Aparentemente, o *T. rangeli* atravessa as células da glândula dentro de vacúolos.

O *T. rangeli* quando nas glândulas salivares de *R. prolixus*, parece causar lesões ao inseto, por impedir a expressão completa de seu maquinário anti-hemostático (GARCIA *et al.*, 1994). Isto afeta o padrão alimentar do triatomíneo, reduzindo a habilidade do inseto ingerir sangue e induzindo a um aumento no número e no tempo das picadas, o que aumenta as chances de transmissão do *T. rangeli* (AÑEZ; EAST, 1984).

Tejera (1920), ao realizar a descoberta do *T. rangeli* encontrou os insetos infectados aparentemente sem danos. Porém, ao realizar ensaios de infecção com *R. prolixus*, Grewal (1956) relatou alterações como: incapacidade dos insetos em realizar a ecdise, alterações morfológicas, de movimentação, de cor, aumento na quantidade de hemolinfa e mortalidade. Quando dissecados, estes animais se encontravam fortemente infectados, em nível de intestino e/ou hemolinfa.

Segundo Heckel *et al.* (1990), efeitos patogênicos de *T. rangeli* em *R. prolixus* também poderiam ser vistos nas células epiteliais do intestino médio através de uma perda de citoplasma e nas células da glândula salivares, onde há uma alta densidade de parasitos.

No estudo de Ferreira *et al.* (2010) foi analisada a taxa de excreção e de perda de água em ninfas infectadas que apresentaram aumento de volume da hemolinfa, porém não se observou alteração no desequilíbrio hídrico. No entanto foi registrado um aumento na quantidade de lipídeos e de corpos gordurosos, uma importante estrutura do sistema de defesa do inseto.

### 1.2.3 Interações do *T. rangeli*/ *T. cruzi* com os hemócitos do hospedeiro invertebrado

Em muitas espécies de insetos, incluindo os triatomíneos, a resposta imune celular a patógenos têm sido associada a dois mecanismos: 1) a nodulação e encapsulação e 2) a fagocitose por parte dos hemócitos (RATCLIFFE; ROWLEY 1979).

Os hemócitos correspondem às células encontradas dentro da hemolinfa de um inseto que são equivalentes ao sangue e as células em vertebrados. Como diferentes tipos de hemócitos, podem ser citados os plasmatócitos, células de cristal e lamelócitos. Estas células têm papéis importantes na imunidade através da secreção de citocinas e pela capacidade fagocítica (BUCHON; SILVERMAN; CHERRY, 2014; FLORES-VILLEGAS *et al.*, 2015). Estas células também estão envolvidas na produção de peptídeos antimicrobianos, tais como: lisozimas, atacinas, cecropinas, prolixicinas e defensinas. Estes peptídeos apresentam um importante papel na atenuação, mas não na eliminação da infecção pelo *T. cruzi* (FLORES-VILLEGAS *et al.*, 2015).

Trabalhos de microscopia eletrônica realizados por Oliveira e Souza (2003), indicam que os plasmatócitos são as células associadas à fagocitose das formas epimastigotas de *T. rangeli*. Estas são encontradas no interior de vacúolos parasitóforos que se fundem com o lisossomo, o que pode gerar a digestão do parasito no interior deste vacúolo.

Takle (1988) demonstrou que a agregação observada nos hemócitos ocorre poucos dias após a inoculação do *T. rangeli* na hemolinfa dos triatomíneos, quando eles já se encontram em abundância, multiplicando-se livremente.

O comportamento de *T. rangeli* e *T. cruzi* com os componentes da hemolinfa do inseto são bastante distintos. Mediante infecção experimental, foi identificado que o *T. cruzi* não é capaz de se dividir, apresentando um rápido desaparecimento, enquanto o *T. rangeli* apresenta uma alta taxa de divisão e infecção. Uma vez na hemolinfa, o *T. cruzi* é capaz de ativar apenas uma resposta por parte das lisozimas, não gerando qualquer outra resposta antibacteriana, já o *T. rangeli* é capaz de interagir a ponto de promover um aumento no número dos hemócitos. Estes resultados demonstraram que o *T. rangeli* parece estar muito mais habilitado para escapar do sistema imune do vetor, garantindo assim o estabelecimento da infecção (MELLO *et al.*, 1994).

### 1.2.4 Interações do *T. rangeli* com o hospedeiro mamífero

Casos de infecções humanas pelo *T. rangeli* foram descritos em mais de sete países das Américas Central e do Sul, sendo estes: Venezuela, com o número mais expressivo - 1.144 casos (DIAS; TORREALBA, 1943; PÍFANO, 1954; D'ALESSANDRO, 1976), GUATEMALA, com 1.117 (LEÓN, 1946; D'ALESSANDRO; SARAIVA, 1992), Panamá (181 casos) (SALDAÑA *et al.*, 2005), Colômbia (121 casos) (REY e UCRÓS, 1939), El Salvador (61 casos) (ZELEDÓN, 1956), Costa Rica (2 casos) (MONTERO, 1958), e Brasil (6 casos) (LUCENA; MARQUES, 1954; COURA *et al.*, 1996; SOUZA *et al.*, 2008).

De acordo com D'Alessandro- Bacigalupo e Saraiva (1992), a infecção humana pelo *T. rangeli* é assintomática, com parasitemia de baixos níveis e ausência de formas em divisão nos tecidos e no sangue. Alguns estudos apontam indícios de que o *T. rangeli* seja capaz de se dividir no hospedeiro mamífero, como por exemplo, a presença de níveis de parasitemia em camundongos infectados experimentalmente de até sete vezes maiores que a quantidade de parasitos inoculados originalmente (URDANETA-MORALES; TEJERO, 1985). Porém ainda existem divergências sobre o local exato onde esta multiplicação se dá, e principalmente se ela ocorre de modo intracelular ou extracelular. Em infecções experimentais *in vitro*, utilizando células Vero, macrófagos murino e pró-monócitos com diferentes cepas de *T. rangeli* não foi observado multiplicação intracelular (EGER-MANGRICH *et al.*, 2001).

Estes dados corroboram com os obtidos por Osório *et al.* (1995), onde a linhagem células U937 apresentou formas denominadas amastigotas-like, que divergiam em tamanho dos amastigotas de *T. cruzi*, mas também não apresentavam evidências de multiplicação. No entanto, ao alimentar triatomíneos com estas células infectadas, a viabilidade dos parasitos foi confirmada pelo estabelecimento da infecção nos insetos. Os autores sugerem que a esta resistência do *T. rangeli* ao meio intracelular, pode se configurar como um mecanismo no estabelecimento de infecções crônicas no mamífero.

Durante a infecção primária em camundongos, estudos revelam que a parasitemia costuma ser crescente até o 4º dia de infecção, persistindo em média por duas semanas. Além disso, os camundongos tornam-se resistentes à sucessivas infecções com o *T. rangeli* (AÑEZ *et al.*, 1985).

### 1.3 Co-infecção por *T. cruzi* e *T. rangeli*

Estudos anteriores utilizando parasitos fluorescentes relataram não haver alteração no ciclo biológico de *T. cruzi* ou de *T. rangeli* quando em infecções mistas (GUEVARA *et al.*, 2005). Entretanto, não existem relatos em relação a uma infecção prévia por uma das espécies e uma reinfecção posterior pelo outro parasito. Os registros na literatura são ainda mais escassos quando relacionados ao comportamento das infecções mistas entre o *T. rangeli* e o *T. cruzi*, se resumindo apenas a sua existência, não explorando o curso do desenvolvimento desta co-infecção, em consequência da coexistência do *T. rangeli* nas áreas que são consideradas endêmicas para o *T. cruzi*, conforme ilustrado pelo mapa abaixo (Figura 5).

Estas espécies produzem infecções mistas em vetores e hospedeiros vertebrados. Este fato, associado à dificuldade de diferenciação morfológica entre as espécies complica o diagnóstico específico da doença de Chagas. Além disso, o *T. rangeli* compartilha com o *T. cruzi* aproximadamente 60 % dos antígenos solúveis de superfície de formas epimastigotas, sendo possível que um número elevado de anticorpos gerados após infecções por *T. rangeli* seja erroneamente visto como indicativo de uma infecção por *T. cruzi*, resultando em diagnósticos falso-positivos da doença de Chagas (AFCHAIN *et al.*, 1979, GUHL; MARINKELLE, 1982).



**Figura 5:** Mapa das Américas do Sul e Central demonstrando as áreas com presença de casos de infecção humana pelo *Trypanosoma cruzi* até 1992 (fundo sombreado) e os pontos correspondem aos casos de infecções humanas pelo *Trypanosoma rangeli*, demonstrando a ocorrência simpátrica entre estas duas espécies (GRISARD *et al.*, 2003).

Na busca por marcadores de diagnóstico específicos Moraes *et al.* (2008) demonstraram que soros de pacientes chagásicos em fase aguda da doença reconhecem um número menor de proteínas em extrato proteico de *T. rangeli* em relação ao soro de pacientes chagásicos crônicos. Duas proteínas de aproximadamente 32 e 40 kDa foram fortemente reconhecidas por soros de pacientes chagásicos agudos em extratos de *T. cruzi* que não foram detectadas em *T. rangeli*.

Saldaña *et al.* (2005) demonstrou que o soro de crianças positivas para o *T. rangeli*, não apresenta nenhum tipo de reconhecimento para o *T. cruzi* em ensaios de imunofluorescência indireta, ELISA ou Western blot. Outros estudos anteriores também já haviam demonstrado não haver reconhecimento de antígenos de *T. cruzi* em pacientes com sorologia positiva pelo *T. rangeli* (GUHL *et al.*, 1987, HUDSON *et al.*, 1988, VASQUEZ *et al.* 1997). Porém, como a forma encontrada no hospedeiro mamífero é a forma tripomastigota e pouco se sabe a respeito das propriedades imunogênicas desta, mais estudos são necessários para elucidar melhor esta questão ainda controversa (SALDAÑA *et al.*, 2005).

Um estudo realizado por Saldaña *et al.* (2005) no Panamá teve por objetivo avaliar a soro-prevalência de infecções por *T. rangeli* e pelo *T. cruzi*. Um número total de 206 crianças de 3 a 14 anos de idade foram testadas utilizando testes de triagem e testes confirmatórios parasitológicos, sorológicos e moleculares. Cerca de 9,7% das crianças estavam infectadas com *Trypanosoma* sp., 6,8 % por *T. rangeli* e 2,9% estavam infectadas com o *T. cruzi*, não tendo sido encontradas infecções mistas. Os autores acreditam que o predomínio de *T. rangeli* deste estudo, se foi devido ao mecanismo de transmissão do parasito, que se dá pela saliva, ao contrário do *T. cruzi*, que se dá pelas fezes. Uma vez que o predomínio do parasito no vetor foi maior para o *T. cruzi* (61%) do que para o *T. rangeli* (23%).

Estudo realizado por Guhl e Vallejo (2003) apontam que uma infecção anterior com o *T. rangeli*, poderia abrandar ou fazer com que uma infecção subsequente pelo *T. cruzi* fosse mais amena, por conta da resposta imune humoral que o parasito parece gerar.



## 2. JUSTIFICATIVA

Apesar da existência de inúmeros trabalhos a respeito do *T. rangeli* do ponto de vista molecular e proteômico (GRISARD *et al.*, 1999), inclusive recentemente a publicação do próprio genoma do parasito (STOCO *et al.*, 2014), ainda existe uma série de lacunas no que diz respeito às interações biológicas do *T. rangeli* com seus hospedeiros. Em relação aos triatomíneos, o conhecimento é um pouco maior, sobretudo em relação ao ciclo e ao modo pelo qual o triatomíneo apresenta determinadas defesas para combater a infecção pelo parasito (GARCIA *et al.*, 1994; GOMES *et al.*, 2002). Porém o comportamento do *T. rangeli* no hospedeiro mamífero ainda é uma grande questão não respondida, não se sabendo o local de sua multiplicação e onde o parasito se aloja.

Diversos são os estudos que comentam sobre a coexistência geográfica do *T. cruzi* e do *T. rangeli*, em especial pelos parasitos compartilharem os mesmos hospedeiros (SALDAÑA, 2005). Entretanto, estes estudos se limitam a identificar esta co-infecção, não existindo dados concretos sobre a dinâmica da infecção, tanto no inseto vetor quanto no hospedeiro vertebrado.

Considerando a possibilidade de interferências que uma espécie pode causar em relação ao desenvolvimento da outra quando em uma infecção mista ou subsequente, o fato de que a co- infecção ocorre naturalmente e a maneira como estes parasitos se comportam no interior dos seus hospedeiros, surgiu à proposta deste trabalho: Qual é a dinâmica da co-infecção por *T. cruzi* e *T. rangeli* nos hospedeiros invertebrado e mamífero e também em sistemas isolados (apenas em meio axênico) e também em infecções celulares *in vitro*?

Através da criação de ferramentas moleculares que permitam a visualização e localização do parasito, este estudo pretende trabalhar com as seguintes hipóteses:

- 1) A infecção prévia por uma das espécies mencionadas no hospedeiro mamífero determina alterações no curso da infecção subsequente pela outra espécie.

- 2) Existem alterações na dinâmica da infecção pelo *T. rangeli* quando esta ocorre simultaneamente com o *T. cruzi*, no hospedeiro invertebrado e mamífero.



### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo Geral

Este trabalho teve como objetivo geral caracterizar aspectos biológicos e moleculares da co-infecção por *T. rangeli* e *T. cruzi* no hospedeiro invertebrado (o inseto vetor) e no hospedeiro mamífero.

#### 3.2 Objetivos Específicos

Para a concretização do objetivo geral, o projeto foi norteado pelos seguintes objetivos específicos:

- Avaliar o crescimento das cepas Choachí de *T. rangeli* e as cepas CL Brener, Y e SC 28 de *T. cruzi* quando cultivados conjuntamente em meio axênico;
- Avaliar a dinâmica da infecção e da co-infecção celular com as cepas Choachí de *T. rangeli* e as cepas CL Brener, Y e SC 28 de *T. cruzi*;
- Avaliar comparativamente a dinâmica da infecção do *T. rangeli* e *T. cruzi* em *R. prolixus*, de modo isolado e coabitando o inseto vetor, em relação aos níveis de transcrição de genes relacionados à imunidade;
- Avaliar a interação “*ex-vivo*” entre os hemócitos de *Rhodnius prolixus* e o *T. rangeli*;
- Avaliar comparativamente a dinâmica da infecção do *T. rangeli* e *T. cruzi* em camundongos Balb/C, de modo isolado e coabitando o hospedeiro mamífero;
- Verificar o efeito da infecção prévia por uma das espécies mencionadas no hospedeiro mamífero sobre a infecção subsequente pela outra espécie.



## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Parasitos

Neste trabalho foram utilizados os seguintes parasitos: *T. rangeli* cepa Choachí, sendo originalmente isolada de glândulas salivares de *R. prolixus* naturalmente infectado e capturado na Colômbia (SCHOTTELIUS, 1987); *T. cruzi* cepa Y, isolada de um caso humano em fase aguda, na cidade de Marília, São Paulo em 1950 (SILVA e NUSSENZWEIG, 1953), *T. cruzi* CL Brener, clone da cepa CL isolada de *T. infestans* naturalmente infectado no Rio Grande do Sul (BRENER e CHIARI, 1971) e *T. cruzi* cepa SC28 isolada de gambá (*Didelphis marsupialis*), na Ilha do Arvoredo, Santa Catarina em 1994 (STEINDEL *et al.*, 1995).

Os epimastigotas das cepas mencionadas foram cultivados a 27,5°C em meio LIT (*Liver Infusion Tryptose*) suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF), 50 U/ml de penicilina e 50 µg/ml de estreptomicina (Cultilab, Campinas) através de repiques semanais.

Todos os parasitos utilizados nos experimentos de infecção celular *in vitro*, foram previamente submetidos à passagem em camundongos Balb/C e reisolados por hemocultura em meio LIT a fim de constatar a manutenção de suas características biológicas.

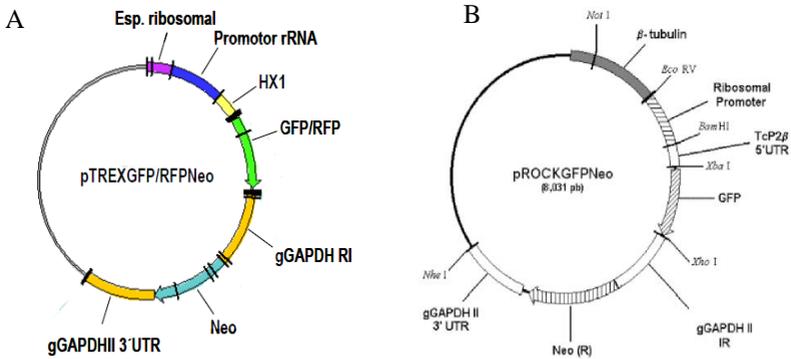
Formas tripomastigotas de cultura de *T. rangeli* foram obtidos no 7º dia de cultivo em meio DMEM pH 8,0 conforme descrito por Koerich *et al.* (2002).

As formas tripomastigotas de *T. cruzi* foram obtidas através da infecção *in vitro* de células Vero ou L929. Para tanto, foram utilizadas inicialmente na infecção de células Vero/L929 formas tripomastigotas de cultura em fase estacionária de crescimento em meio LIT (15 dias a 27°C). Após a quantificação e lavagem dos parasitos em PBS, formas tripomastigotas de *T. cruzi* foram adicionadas à garrafas de cultura contendo  $2,5 \times 10^5$  células Vero, sendo mantida a interação por 4 h. A garrafa foi então lavada duas vezes com PBS estéril para a retirada dos parasitos não aderidos, sendo adicionada de meio fresco e as células cultivadas a 37 °C em 5% de CO<sub>2</sub>. A infecção foi acompanhada diariamente até a liberação das formas tripomastigotas para o sobrenadante da cultura.

Formas tripomastigotas da cepa CL Brener de *T. cruzi* foram obtidas em temperatura de 33°C, uma vez que, conforme descrito por Brener e colaboradores (1976), o parasito só realiza diferenciação intracelular nesta temperatura.

Todas as cepas utilizadas neste estudo estão criopreservadas em nitrogênio líquido no criobanco do Laboratório de Protozoologia (MIP/CCB/UFSC).

**Figura 6:** Representação esquemática dos plasmídeos pTREXnGFP/mRFPNeo



(A) e pROCKGFPNeo (B).

**Tabela 1:** Relação das cepas transfectadas e os plasmídeos utilizados.

Espécie/Cepa	Plasmídeo	Marcador de Resistência
<i>T. cruzi</i> Y	pROCKGFP	Neomicina
<i>T. cruzi</i> SC 28	pTREXmRFP	Neomicina
<i>T. cruzi</i> CL Brener	pTREXmRFP	Higromicina
<i>T. rangeli</i> Choachí	pTREXnGFP	Neomicina
<i>T. rangeli</i> Choachí	pTREXmRFP	Neomicina

#### 4.2 Obtenção dos parasitos fluorescentes com os plasmídeos pTREXnGFP-Neo/ pTREXmRFP-Neo e pROCKGFPNeo

Para a obtenção das cepas transfectadas, foram utilizados os vetores pTREXnGFP-Neo/ pTREXmRFP-Neo. Estes plasmídeos são vetores de expressão transiente derivados do vetor pTREX, conforme descrito por Vazquez e Levin (1999). Foi ainda utilizado o plasmídeo pROCK-GFP-

Neo, sendo o gene da GFP para esta construção obtido do vetor pTCRGFPNeo (TEIXEIRA *et al.*, 1999). Estes plasmídeos apresentam regiões codificadoras para o gene da neomicina fosfotransferase (NEOr) que confere resistência a neomicina e ao seu análogo G418, antibiótico utilizado no processo de seleção dos parasitos após a transfecção (PIRES, 2008).

#### **4.2.1 Transformação em *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ Cálcio competente**

Alíquotas de 220  $\mu$ l de bactérias *E. coli* (cepa DH5 $\alpha$ ) CaCl<sub>2</sub> competentes (SAMBROOK *et al.*, 1989), foram misturadas com diferentes quantidades do DNA plasmidial, mantidas em banho de gelo por 30 minutos e transformadas por choque térmico a 42°C por 45 segundos. Posteriormente, foram adicionados 300  $\mu$ l de meio SOC líquido (2,0% de triptona, 1% de extrato de levedura, 0,5% de NaCl, pH 7,0) sendo mantida a cultura por 1 hora a 37 °C sob agitação constante (180 rpm, agitador EVLAB, 020A). As bactérias foram plaqueadas em meio LB (Luria Bertani) ágar (1,5%) suplementado com 100  $\mu$ g /ml de ampicilina, e mantidas por 16 horas a 37 °C.

Uma colônia isolada foi coletada e as bactérias crescidas sob agitação constante (180 rpm) em 10 ml de meio LB líquido suplementado com 100  $\mu$ g/ml de ampicilina por 16 horas. A partir deste pré-inóculo, 1 ml era transferido em 100 ml do mesmo meio de cultura e submetido a crescimento sob agitação constante por um período de 16-21h, até o alcance de uma densidade óptica entre 2-5 para subsequente extração do DNA plasmidial.

#### **4.2.2 Extração de DNA plasmidial**

O DNA plasmidial foi extraído da cultura bacteriana, foi realizado através do kit *Pure Yield™ Plasmid Midiprep System* (Promega), conforme instruções do fabricante. As amostras do DNA plasmidial obtido foram dosadas em espectrofotômetro BioPhotometer (Eppendorf) a 260 nm, sendo o grau de pureza das amostras determinado pela relação da absorbância a 260/280nm. A qualidade das amostras foi também observada através de eletroforese em gel de agarose 1,0 % corada pelo brometo de etídio.

#### **4.2.3 Linearização dos plasmídeos com enzima de restrição**

Com o intuito de obter uma transfecção integrativa, a transfecção foi realizada com plasmídeos previamente linearizados com

enzimas de restrição. Para tanto, o plasmídeo pROCKGFP-Neo foi linearizado com a enzima de restrição *NotI* (New England Biolabs) que cliva o plasmídeo na região do locus da  $\beta$ -tubulina. Os plasmídeos pTREMRF-Neo e pTREN-GFP-Neo foram linearizados com a enzima de restrição *NheI* (New England Bio labs), que cliva o plasmídeo na região intergênica do gGAPDH. Em ambas as situações, foi utilizado 4  $\mu$ l das respectivas enzimas e 30  $\mu$ g de DNA plasmidial em reações de 16 horas a 37°C. O DNA digerido foi aplicado em gel de agarose 0,8 % em tampão TBE (0,01 M de Tris base, 0,09% de ácido bórico anidro, 0,1% de EDTA 0,5 M pH 8,0). Para acompanhar a migração do DNA no gel, as amostras foram aplicadas na presença do tampão de amostra (0,25% de azul de bromofenol, 0,25% de xilenocianol, 30% de glicerol). Após coloração do gel em solução de brometo de etídeo (0,5  $\mu$ g/ml) este foi visualizado em luz ultravioleta, fotografado e as bandas foram recortadas e purificadas com o Kit *Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification* (GE Healthcare), sendo o DNA eluído em 20  $\mu$ l de água ultrapura.

#### 4.2.4 Tranfecção dos parasitos

As transfecções da cepa Choachí de *T. rangeli* com o plasmídeo pTREN-GFP-Neo e da cepa SC28 de *T. cruzi* com o plasmídeo pTREMRF-Neo, foram realizadas utilizando o kit *Human Dendritic Cell Nucleofector* (Lonza, Basel) conforme as instruções do fabricante. As transfecções da cepa Y de *T. cruzi* com o plasmídeo pROCKGFP-Neo e da cepa Choachí de *T. rangeli* com o plasmídeo pTREMRF-Neo foram realizadas utilizando o tampão BSF (NaPO<sub>4</sub> 0,5 M pH 7,3, KCl 0,3 M, Hepes 0,5 M pH 7,3, CaCl<sub>2</sub> 50 mM).

Inicialmente, cada cultura foi contada em câmara de Neubauer e  $5 \times 10^7$  parasitos foram lavados duas vezes em PBS pH 7,4, adicionados do tampão de eletroporação do kit ou do tampão BSF e de 10  $\mu$ g dos respectivos DNA plasmidiais. Todo o volume destas suspensões foi transferido para cubetas de eletroporação de 0,2 centímetros (cm) de abertura e submetido à eletroporação no aparelho *Nucleofector*<sup>®</sup> (Lonza) em condições elétricas estabelecidas pelo programa U-33. Após um único pulso, os parasitos foram transferidos para tubos contendo 2 ml de meio NNN-LIT.

Após 24 horas a 27°C, as culturas foram acrescidas de G-418 (Geneticin) (Sigma- Aldrich) em uma concentração inicial de 25  $\mu$ g/ml para o *T. rangeli* e 250  $\mu$ g/ml para o *T. cruzi*. Os parasitos foram então mantidos através de repiques semanais em meio LIT 10% SBF e

crescentes concentrações de G-418. A avaliação da fluorescência foi realizada em microscópio Olympus BX 40 nos filtros FITC e também para Rodamina, sendo os resultados digitalmente fotografados.

#### **4.2.5 Clonagem das populações transfectadas**

O método de escolha para as clonagens das cepas de *T. cruzi* foi por diluição limitante a fim de padronizar os experimentos uma vez que o *T. rangeli* não permite clonagem por cultura em meio semi-sólido ou sólido. Inicialmente, a concentração dos parasitos foi estabelecida através de contagem em câmara de Neubauer e diluída até que se obtivesse a 0,5 parasito/200 µl de meio de cultura. O meio de cultura foi suplementado com 5 % de sangue humano desfibrinado e inativado a 56°C por 30 minutos. Após 28 dias foram visualizados parasitos fluorescentes em determinados poços e então estes foram transferidos para tubos com ágar sangue contendo meio LIT suplementado com 10 % SBF.

As culturas de *T. rangeli* foram submetidas à clonagem por diluição seriada, onde se iniciou o plaqueamento com a concentração de 100 parasitos/200 µl na primeira fileira, sendo realizada uma diluição no fator 2 até a concentração de um e meio parasito/200 µl. Após 15 dias em cultura, o poço de 12,5, foi o de menor diluição que apresentou parasitos fluorescentes. Estes parasitos foram inicialmente transferidos para tubo de 1,5 ml com 500 µl de SBF, e após aumentar sua densidade foram transferidos para tubo de 15 ml com ágar sangue. Todas as culturas foram submetidas à citometria de fluxo para análise do percentual de fluorescência e homogeneidade das populações clonadas.

#### **4.3 Análise do percentual de parasitos fluorescentes por Citometria de fluxo**

Para avaliar a homogeneidade da expressão de fluorescência após a clonagem, as cepas foram analisadas por citômetro de fluxo antes e após este processo.

Para isso 200 µl das culturas foram lavados duas vezes com PBS para retirar quaisquer impurezas existentes no meio de cultura que pudesse causar interferência na leitura das amostras e suspensas em 200 µl de PBS, colocadas em tubo de acrílico apropriado, e processadas no aparelho FACS Canto II (Becton Dickson) do Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia (LAMEB) da UFSC.

Para as análises de citometria das proporções de *T. rangeli* e *T. cruzi* descritas no item 4.5, realizou-se a seguinte preparação das amostras em co-cultivo: as culturas foram submetidas à citometria em

dias alternados, onde um total de 200 µl da cultura era retirado de cada uma das triplicadas biológicas, colocados em tubos de acrílico próprios para citometria, acrescidos de 500 µl de PBS e levados ao citômetro de fluxo. A análise dos dados foi realizada com auxílio do programa Flowing Software, 2.5.1<sup>®</sup>.

Os ensaios de citometria de fluxo, bem como as contagens em câmara de Neubauer foram submetidos ao teste t de Student pareado do Programa Graph Pad Prism Versão 5.01.

### **4.4 Confirmação da integração do DNA plasmidial no DNA genômico de *T. rangeli* e *T. cruzi***

Com o intuito de verificar a integração do DNA plasmidial no DNA genômico dos parasitos transfectados, as cepas geneticamente manipuladas foram analisadas por eletroforese em campo pulsado (PFGE), seguidas de hibridização dos fragmentos de DNA com sondas radioativas dirigida para os genes de resistência a Neomicina e Higromicina.

#### **4.4.1 Preparação e inclusão de DNA cromossômico de *T. rangeli* e *T. cruzi* em blocos de agarose para PFGE**

Os cromossomos dos parasitos (CL Brener, SC28 e Y - *T. cruzi*/Choachí - *T. rangeli*) foram incluídos em blocos de agarose. Cerca de  $1 \times 10^7$  epimastigotas foram lavados três vezes com PBS por centrifugação a  $3.000 \times g$  por 10 min a temperatura ambiente e homogeneizados em agarose LMT (*Low Melting Temperature* – Sea Plaque, GTG, FMC) a 2% preparada em água bidestilada. Para cada bloco utilizou-se cerca de 100 µl dessa suspensão, contendo aproximadamente  $10^7$  parasitas, que foram depositados em formas apropriadas e mantidas a 4° C até a agarose solidificar. Os blocos foram então desprendidos das formas e mantidos em solução de lise (Tris/HCl 10 mM, pH 8,0; EDTA 500 mM, pH 8,0; sarcosil 1%; proteinase K 1 mg/ml) a 56° C por 16 h. Foram lavados três vezes com TE (Tris/HCl 10 mM; EDTA 1 mM, pH 8,0), sendo cada lavagem realizada por 30 minutos em banho a 56°C. Por fim, os blocos foram estocados em EDTA 0,5 M pH 8,0 a 4° C até serem submetidos à PFGE.

#### 4.4.2 Separação das bandas cromossômicas de *T. rangeli* e *T. cruzi* por PFGE

Os blocos de agarose foram submetidos à eletroforese de campo pulsado em gel de agarose no aparelho *Gene Navigator™ System* (Pharmacia). Os géis foram preparados com agarose Seaken (FMC – Bioproducts) 1,1% em TBE 0,5X (Tris-borato 25 mM, EDTA 0,5 mM, pH 8,0). As corridas eletroforéticas duraram 132 h com voltagem constante de 80 V a 13° C, aplicando-se pulsos homogêneos (N/S, L/O) de 90 s por 30 h, 120 s por 30 h, 200 s por 24 h, 350 s por 24 h e 800 s por 24 h, com interpolação. Em cada corrida eletroforética utilizaram-se como padrão os cromossomos de *Hansenula wingei* e *Saccharomyces cerevisiae*. Posteriormente, o resultado foi observado através da coloração do gel em solução de brometo de etídeo sendo fotografado sob luz ultravioleta.

#### 4.4.3 Transferência do DNA cromossômico para filtros de nylon (“Chromo blot”)

Após a corrida eletroforética, o DNA foi transferido para membranas de nylon empregando-se o sistema *Vacuum Gene XL* (Pharmacia). Os géis foram depositados sobre a membrana otimizada para a transferência de ácidos nucleicos (Amersham Hybond-N – GE Healthcare) e tratados com as seguintes soluções: depuração (HCl 0,25 M) por 30 min, denaturação (NaOH 0,5 M, NaCl 1M) por 30 min, neutralização (Tris base 1M e NaCl 0,6 M) por 30 min e SSC 20X (NaCl 3M; Na<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub> 0,3 pH 7,0) por 4 h. Após a transferência, as membranas foram irradiadas com luz ultravioleta (150 mJ) para fixação do DNA no aparelho *GS Gene Linker UV Chamber* (BioRad).

#### 4.4.4. Marcação dos fragmentos de DNA por incorporação de fósforo radioativo

As sondas utilizadas são dirigidas ao gene de resistência à Neomicina e Higromicina e foram marcadas pela técnica de *random primer*, na qual oligonucleotídeos contendo sequências randômicas servem de iniciadores para a síntese de DNA, com incorporação dos nucleotídeos marcados adicionados à mistura de reação. Inicialmente, cerca de 50 ng do DNA moldes foram desnaturados e incubados com os componentes do sistema *Random Primer DNA labelling system* (Life Technologies) e com 40 µCi de [α-32P] dCTP durante 1 h a 25° C. A reação foi interrompida com a adição de 5 µl de EDTA 0,25 M pH 8,0. Em seguida, o material foi cromatografado por colunas G-50 seguindo o

protocolo do kit *ProbeQuant™ G-50 Micro-Columns* (GE Healthcare). A radioatividade incorporada foi medida por espectrometria de cintilação líquida, utilizando um analisador de cintilação líquida *Tri-Carb 2810TR – Perkin Elmer*.

### 4.4.5 Hibridização das membranas com sonda radioativa

As membranas foram pré-hibridizadas por 1 h a 42° C sob leve agitação com solução de pré-hibridização (formamida 50%; SSC 5X; Denhardt's 5X; DNA simples fita 0,1 mg/ml de sperma de Salmão). Em seguida, a solução foi substituída pelo mesmo tampão contendo a sonda radioativa desnaturada a 100° C por 5 min. A hibridização foi processada por 16 h a 42° C com agitação. Após a hibridização, as membranas foram submetidas a duas lavagens sucessivas de 30 min com SSC 2X 0,1% e SDS 0,1% a 42° C, seguido de duas lavagens com SSC 0,1X 0,1% e SDS 0,1% a 56° C e exposição a filmes de raios-X (X-Omat Kodak) em cassetes com tela intensificadora à -70° C por 24-48 h. Após a exposição, o filme foi revelado. O processo de revelação é manual e consiste na imersão do filme em solução reveladora para filmes raios-X (*Rapid*, HEXA) por 2 minutos, em seguida os filmes são fixados em solução fixadora para filmes raios-X (*Minit-fix*, HEXA).

### 4.5 Crescimento *in vitro* das cepas transfectadas em cultivo axênico e em ensaios de co-cultura e co-infecção em células THP-1

Para analisar possíveis alterações nos padrões de crescimento das cepas transfectadas, suas curvas de crescimento em meio LIT foram comparadas ao padrão de crescimento das respectivas cepas selvagens. Uma concentração inicial de  $2 \times 10^6$  parasitos/ml foi utilizada e as culturas foram mantidas a 27° C em 5 ml de meio LIT 10 % SBF, 1% de Estreptomicina e Penicilina (10.000 U/ml), em tubos cônicos de 15 ml, sendo todas as análises realizadas em triplicata. As curvas de crescimento das cepas transfectadas e suas respectivas parentais foram submetidas ao teste t de Student não pareado.

Para o experimento de co-cultura, os parasitos foram mantidos em meio axênico nas mesmas condições acima, apresentando, entretanto uma concentração inicial de  $4 \times 10^6$  parasitos/ml nas proporções de 1:1, 1:2, 2:1, 1:5, 5:1 de mistura das diferentes combinações de *T. cruzi* e *T. rangeli* (*T. rangeli* GFP X *T. cruzi* CL Brener RFP; *T. rangeli* GFP X *T. cruzi* SC28 RFP; *T. rangeli* RFP X *T. cruzi* Y GFP).

#### 4.5.1 Quantificação dos parasitos em câmara de Neubauer em microscopia convencional e de fluorescência

Para quantificar os parasitos em câmara de Neubauer, as culturas foram diluídas progressivamente conforme a densidade populacional foi aumentando. Para evitar os erros de contagem, em decorrência da movimentação dos parasitos, foram acrescentados 10% de glicerol ao volume final das diluições realizadas. A contagem foi realizada em microscopia convencional, e posteriormente em microscopia de fluorescência, alternando os filtros WG e WB para visualizar cada uma das fluorescências por vez. A análise dos valores obtidos foi realizada através do Software GraphPad Prism Versão 5.01.

#### 4.5.2 Células

Células Vero (ATCC: CCL81) e L929 (ATCC: CCL 1), foram mantidas para obtenção das formas tripomastigotas de *T. cruzi*. As células THP-1 (linhagem humana de origem monocítica, derivada de paciente com leucemia monocítica aguda – ATCC#TIB-202) foram cultivadas em garrafa de cultura de 75 cm<sup>2</sup> em meio RPMI-1640 (HiMedia Laboratories) pH 7,4 suplementado com 10% SBF, 12,5 mM de HEPES (Gibco), 2 mM de Glutamax<sup>®</sup>, (Gibco), 1 mM de Piruvato de Sódio (Gibco) (aqui definido como RPMI completo) e mantidas a 37°C com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>.

As células foram mantidas através de repiques semanais na densidade de 3 x 10<sup>5</sup> células por ml em um total de 12 ml de cultura. A identificação de células viáveis foi determinada com o uso do corante de viabilidade celular Azul de Trypan (0,02 %), quantificadas em câmara de Neubauer e ajustadas na concentração desejada em meio RPMI completo. Para os experimentos descritos a seguir utilizaram-se células até a 15<sup>a</sup> passagem. Os experimentos foram realizados em duplicatas técnicas e biológicas.

##### 4.5.2.1 Indução da diferenciação celular *in vitro* das células THP-1

Células THP-1 coletadas no 3<sup>o</sup> e 4<sup>o</sup> dia de crescimento em meio RPMI foram quantificadas e induzidas a diferenciação em fagócitos aderentes conforme descrito por Schwende *et al.* (1996). Para tanto, foram plaqueadas 1,5 x 10<sup>5</sup> células sobre lamínulas de vidro (13x13 mm) e cultivadas em placas de 24 poços contendo meio RPMI completo acrescido de Forbol-12-miristato-13-acetato – PMA (50 µg/ml) (Sigma-Aldrich) a 37°C com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> por 72 h. Após a

aderência celular, as células THP-1 foram utilizadas nos ensaios de interação celular.

### **4.5.2.2 Infecção em células THP-1 por formas tripomastigotas de cultura de *T. cruzi* e *T. rangeli***

Com o intuito de avaliar se os processos de transfecção, seleção e clonagem não haviam induzido alterações no perfil biológico de interação, infectividade e multiplicação *in vitro* das cepas trabalhadas, foi realizado inicialmente um ensaio comparativo de infecção *in vitro* de células THP-1 utilizando as cepas transfectadas de *T. cruzi* e *T. rangeli* e as suas respectivas cepas selvagens. Além disso, realizamos ensaios de co-infecção *T. cruzi* / *T. rangeli* visando observar alterações nos perfis de infecção quando comparados à ensaios de infecção de células THP-1 por somente uma das espécies.

As células preparadas conforme o descrito em 4.6.1 foram adicionadas as formas tripomastigotas utilizando-se uma razão parasito : célula (MOI) de 1: 5 quando realizado ensaios com *T. cruzi* SC28 WT e RFP; 1: 10 quando realizado com *T. cruzi* cepas Y WT e GFP e CL Brener WT e RFP; e 1:30 quando realizado ensaios com o *T. rangeli* cepas Choachí WT, RFP e GFP. Cabe salientar que a utilização de MOI distinto para cada cepa ou espécie de parasito foi baseada em estudos anteriores de interação parasito-célula (TOMA *et al.*, 2000; GRANUCCI, 2013; SCHLINDWEIN, 2014), tendo sido realizados ensaios confirmatórios.

Transcorrido o tempo inicial de interação de 1 h a 37°C, as células foram lavadas duas vezes com PBS estéril para remoção dos parasitos não aderentes, sendo adicionadas de meio RPMI completo e cultivadas nas mesmas condições anteriormente descritas (6.1.1) até o momento de serem analisadas. Os tempos determinados para a análise foram de duas (T2), quatro (T4), oito (T8), vinte e quatro (T24) e setenta e duas horas (T72). Decorrido cada tempo de interação, duas das lamínulas de cada tempo do experimento foram removidas da placa, lavadas duas vezes com PBS e coradas com Hoescht para a observação do núcleo das células e pelo método de Giemsa para as infecções isoladas. Para isso 50 µl do Hoescht foi colocado sobre as lamínulas, mantido a 37°C por 15 minutos, sendo posteriormente lavado 2x com PBS a 37°C para a montagem da lamínula em lâmina de microscopia utilizando o reagente Hydromount. Para a coloração pelo método de Giemsa os poços foram lavados três vezes com PBS pH 7,4, fixados com metanol por 60 segundos e então subsequentemente corados com uma solução de

Giemsa (Merck) durante 15 minutos. As lâminulas foram então lavadas em água deionizada e deixadas secar. Posteriormente foram montadas sobre lâminas com o auxílio de *Entellan*<sup>®</sup> (Merck).

O número de parasitos internalizados foi determinado pela contagem aleatória de 200 células por lâminula para cada um dos tempos de interação e das cepas utilizadas. A análise estatística foi realizada pelo método de ANOVA de duas vias, seguido pelo pós-teste de Bonferroni, considerando diferenças estatisticamente significativas se  $p < 0,05$ .

#### 4.5.2.3 Determinação do tempo de duplicação dos parasitos selvagens e transfectados

O tempo de duplicação de cada cepa selvagem e transfectada de *T. cruzi*, foi determinado utilizando a seguinte fórmula (JAWETZ *et al.*, 1991):

$$Td = \frac{\text{Ln}2(t1-t0)}{2,3 \log (N1/N0)}$$

Onde:

Td= tempo de duplicação

t1 = tempo final de observação

t0 = tempo inicial de observação

N1 = número médio de parasitos por célula após 72 horas de interação

N0 = número médio de parasitos por célula após 24 horas de interação

#### 4.6 Triatomíneos

Os exemplares de *R. prolixus* utilizados neste trabalho foram mantidos no insetário do Laboratório de Protozoologia da UFSC. Os insetos foram criados em frascos de acrílico cilíndricos com diâmetro de 15 cm e altura de 19 cm, forrados com papel filtro, contendo uma tira de cartolina dobrada em sanfona para aumentar a superfície interna e fechados com tecido de algodão. Os insetos foram alimentados semanalmente com camundongos Swiss ou ratos Wistar, de acordo com as normas da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFSC. A sala do insetário foi mantida a temperatura de 26 +/- 1°C, umidade relativa de 65+/- 10% e ciclo natural de iluminação.

#### **4.6.1 Avaliação da estabilidade e da infectividade da cepa SC28 RFP de *T. cruzi* e Choachí GFP de *T. rangeli* transfectantes para *R. prolixus***

A avaliação da estabilidade das transfecções e da infectividade das cepas transfectadas para triatomíneos foi realizada através de infecção por alimentação artificial. Para tanto, grupos de 25 ninfas de 4<sup>o</sup> a 5<sup>o</sup> estádios de *R. prolixus* foram submetidos a infecção com as cepas SC 28 RFP de *T. cruzi* ou com a cepa Choachí GFP de *T. rangeli*. Os triatomíneos foram alimentados por cerca de quatro horas com uma mistura de meio LIT e sangue de camundongo contendo  $4 \times 10^6$  formas tripomastigotas por ml. Se necessário, o processo foi continuado até o ingurgitamento das ninfas de *R. prolixus*. Posteriormente a um período de 30 dias, os insetos foram dissecados e tiveram os tratos digestivos posicionados sobre lamínulas de microscopia convencional e cobertas com lamínula 24 x 60 mm e observados em microscópio de fluorescência BX 40, Olympus. Para o *T. rangeli* foi adicionado um tempo de observação de 45 e 60 dias para a análise da hemolinfa e das glândulas salivares. Os insetos foram mantidos nas mesmas condições descritas no item 4.6.

#### **4.6.2 Avaliação da modulação de genes relacionados à imunidade de *R. prolixus* quando co-infectados por *T. cruzi* e *T. rangeli***

Inicialmente, quatro grupos experimentais foram utilizados neste ensaio: um grupo controle com triatomíneos não infectados, um grupo infectado com *T. rangeli* Choachí, um grupo infectado com *T. cruzi* SC28 e um grupo co-infectado com *T. rangeli* Choachí e *T. cruzi* SC28. Após a alimentação artificial realizada conforme o descrito em 4.6.1, os triatomíneos foram mantidos em estufa a +/- 27°C com 65% de umidade relativa até os tempos de coleta de 24 h, sete e 14 dias pós infecção.

#### **4.6.3 Dissecção dos triatomíneos para obtenção dos tecidos**

Em cada ponto previamente definido, a hemolinfa dos triatomíneos foi coletada através da secção de uma das patas, coletando-se a hemolinfa diretamente em um microtubo de 1,5 ml contendo o reagente Trizol<sup>®</sup> (Life Technologies) para posterior extração de RNA. Após fixação dos triatomíneos com alfinetes entomológicos sobre placas de Petri preenchidas com parafina, o tubo digestivo anterior e posterior foram retirados através de uma abertura realizada no conexivo do inseto. Os tecidos foram igualmente acondicionados em microtubos contendo

Trizol<sup>®</sup>, sendo realizada previamente a retirada do excesso de sangue ingerido. O tubo digestivo anterior dos triatomíneos foi coletado após 24 h, sete e 14 dias após o repasto sanguíneo infectivo e o tubo digestivo posterior após sete e 14 dias. Todas as amostras coletadas em Trizol<sup>®</sup> foram mantidas a -80°C até o momento da extração de RNA para os experimentos subsequentes.

#### **4.6.4 Extração das amostras de RNA pelo método do Trizol**

As amostras estocadas em Trizol<sup>®</sup> tiveram o RNA extraído conforme instruções do fabricante. Em suma, as amostras foram deixadas a temperatura ambiente por 5 min, adicionadas de 0,2 ml de clorofórmio para cada 1 ml de Trizol<sup>®</sup> e submetidas à agitação vigorosa por 15 segundos seguido de nova incubação por 3 min a temperatura ambiente. Após centrifugação a 12.000 X g por 15 minutos a 4°C, a fase aquosa foi transferida para um novo tubo e acrescentada de 0,5 ml de isopropanol para cada 1 ml de Trizol<sup>®</sup>. Esta mistura foi mantida a temperatura ambiente por 10 minutos e então novamente centrifugada a 12.000 X g a 4°C. Após descarte da fase aquosa, o RNA precipitado foi lavado com 1 ml de etanol a 75%, sendo as amostras homogeneizadas e centrifugadas a 7.500 X g por 5 minutos a 4°C. Após o descarte do etanol e secagem do precipitado à temperatura ambiente, o RNA foi eluído em 30 µl de água ultrapura livre de RNase a 60°C em banho seco por 15 minutos, sendo posteriormente quantificadas por espectrofotometria a 260/280nm para a pureza da amostra e 260/230nm para avaliar a presença de agente contaminante em equipamento Espectrofotometro (Picodrop) e estocadas a -80°C.

#### **4.6.5 Síntese de cDNA**

Inicialmente as amostras de todos os tecidos foram tratadas com DNase I Turbo<sup>®</sup> (Life technology) e o cDNA foi sintetizado através do kit *SuperScript III First – Strand Synthesis SuperMix<sup>®</sup>* (Life Technologies) de acordo com as orientações do fabricante utilizando iniciadores randômicos (*Random hexamers*).

#### **4.6.6 Ensaio de qPCR para a avaliação dos níveis de transcritos dos genes relacionados à imunidade de *Rhodnius prolixus* e quantificação absoluta da carga parasitária em camundongos Balb/c**

A avaliação da modulação da resposta imune de *R. prolixus* frente a co-infecção por *T. rangeli* e *T. cruzi* foi realizada através da

análise da expressão relativa de cinco genes relacionados à imunidade de triatomíneos (Profenoloxidase, Cactus, Caudal, Prolixicina e Draper) por PCR quantitativa em tempo real (qPCR), utilizando o gene da Actina como normalizador e referência.

Os iniciadores utilizados nas reações estão descritos na Tabela 2. As sequências para Profenoloxidase (PPO), Actina (ACT) e Prolixicina (PROL) foram retiradas do trabalho realizado por Ursic-Bedoya *et al.*(2008) e (2011) respectivamente. Os genes Cactus, Draper e Caudal tiveram seus iniciadores desenhados com base nas sequências presentes no banco de dados Vector Base.

Um total de 20 amostras foram analisadas: tubo digestivo anterior nos tempos 24 horas, 7 e 14 dias e tubo digestivo posterior nos tempos 7 e 14 dias dos seguintes grupos: *T. rangeli* Choachí, *T. rangeli* Choachí + *T. cruzi* SC28, *T. cruzi* SC28, além do controle negativo (sem adição de cDNA).

**Tabela 2:** Iniciadores utilizados na análise da expressão relativa de genes relacionados à imunidade em *Rhodnius prolixus* via qPCR.

Iniciador	Sequência 5'-3'	Tm	Produto
<b>RhPPO F</b>	ACACTGTCCCTGATACCGCA	58,2	<b>171 pb</b>
<b>RhPPO R</b>	TCCCTGTGGATGTGGCTGGC	58,3	
<b>RhACT F</b>	ATTCAAGATCATTGCTCCACCAG	55,3	<b>151 pb</b>
<b>RhACT R</b>	TTAGAAGCATTTGCGGTGGAC	55,8	
<b>RhCAC F</b>	AGATGATGACGGTGATACGCAG	56,7	<b>161 pb</b>
<b>RhCAC R</b>	GCGGATATGTCAAACTGC	56,7	
<b>RhDRA F</b>	GTCGATGTTACTGTGCGCCA	57,9	<b>126 pb</b>
<b>RhDRA R</b>	TTTGTGGTTCACAGGCTGCA	57,7	
<b>RhCAD F</b>	GTCGCTACATCACCATCCGC	58,3	<b>103 pb</b>
<b>RhCAD R</b>	CGTTCCTTGGCTCTTCGGTT	57,7	
<b>RhProl F</b>	ACAATTTTGGTGCTGCTTGTC	54,3	<b>192 pb</b>
<b>RhProl R</b>	GCTTGAGCTCTGGTCCTTCC	57,9	

Inicialmente foi avaliada a eficiência dos iniciadores a fim de estabelecer a concentração ideal de cada um deles na reação de qPCR. Para isso foi feito um *pull* de todos os cDNA das 20 amostras obtidas e, a partir desta mistura, foram realizadas em triplicada reações de amplificação com diluições desta mistura no fator 2 (1, 1/2, 1/4, 1/8, e 1/16). A partir destes resultados foi então realizado o cálculo de eficiência dos iniciadores através da fórmula:  $E = 10 - (-1/\text{slope}) - 1$ .

As reações foram realizadas com 0,2 até 0,4  $\mu\text{M}$  de cada iniciador, dependendo da eficiência apresentada, 5  $\mu\text{l}$  SYBR Select Master Mix for CFX (Applied Biosystems), 2  $\mu\text{l}$  de cDNA em um volume final de 10  $\mu\text{l}$ . Um controle negativo sem DNA foi adicionado para cada conjunto de iniciadores em todas as placas.

Para a quantificação absoluta da carga parasitária de camundongos Balb/c, amostras dos tecidos descritos no item (4.8.3) de todos os camundongos foram utilizadas para detecção e quantificação dos parasitos presentes através da técnica de PCR em tempo real. Após extração de DNA genômico através de fenol-clorofórmio (SAMBROOK; RUSSELL, 2001) as amostras foram utilizadas para amplificação no aparelho ABI Prism<sup>®</sup> 7900 HT SDS (Applied Biosystems) utilizando iniciadores específicos para os genes repórteres GFP e RFP. As reações foram realizadas com 0,3  $\mu\text{M}$  de cada iniciador, 5  $\mu\text{l}$  de SYBR<sup>®</sup> Select Master Mix for CFX e 10 ng do DNA molde em um volume final de 10  $\mu\text{l}$ . Um controle negativo sem DNA foi adicionado para cada conjunto de iniciadores em todas as placas. Os plasmídeos contendo os genes GFP e RFP foram utilizados para o estabelecimento de uma curva padrão, visando a quantificação posterior dos parasitos. As sequências dos iniciadores utilizados estão apresentadas na tabela 3.

**Tabela 3:** Iniciadores utilizados para amplificação dos genes RFP e GFP nos ensaios de qPCR

Iniciador	Sequência 5'-3'	Tm	Produto
<b>GFP F1</b>	GAAGCGTTCAACTAGCAGAC	60	<b>88 pb</b>
<b>GFP R1</b>	GTGGACAGGTAATGGTTGTC	60	
<b>RFP F</b>	AGGTCAAGACCACCTACATG	60	<b>119 pb</b>
<b>RFP R</b>	CTCGTACTGTCCACGATG	60	

As condições térmicas de amplificação foram: 95°C por 10 min seguido de 40 ciclos de 95°C por 15s e 60°C por 1 min. Uma etapa final foi incluída para obter a curva de dissociação (95° C, 60° C e 95° C por 15s cada).

#### 4.7 Obtenção e infecção “*ex vivo*” dos hemócitos de *Rhodnius prolixus*

Para os experimentos de interação *ex vivo*, os hemócitos foram obtidos a partir da hemolinfa de exemplares adultos de *R. prolixus* obtidos do insetário do Laboratório de Protozoologia da UFSC. Os

insetos foram mergulhados em etanol 70% por 15 minutos e, após lavagem com PBS estéril, tiveram uma de suas patas seccionadas e a hemolinfa gotejada diretamente sobre 1 ml de meio Schneider pH 7,4 suplementado com 20 % de SBF em lamínulas de vidro circulares (13mm) dispostas em placas de 24 poços.

O número de insetos utilizados para a coleta de hemolinfa por poço era variável de acordo com a quantidade de hemolinfa retirada de cada triatomíneo. Como regra geral, utilizou-se a confluência do fundo do poço como parâmetro, uma vez que é necessário levar em consideração a grande quantidade de outras células encontradas na hemolinfa além dos hemócitos e também o fato de que nem todas iriam permanecer viáveis para o experimento. Após 24 horas a 26°C, as lamínulas foram lavadas com PBS estéril para remoção das células não aderentes, sendo novamente suplementadas com 1 ml de meio Schneider pH 7,4 suplementado com 20 % de SBF.

Determinando-se que havia cerca de  $2 \times 10^5$  hemócitos por poço, utilizamos um M.O.I. (razão parasito/célula) de 5:1, sendo que a infecção dos hemócitos pelos parasitos seria avaliada nos tempos 0, 24, 48 e 120 horas.

Para infecção dos hemócitos, formas epimastigotas de *T. rangeli* Choachí GFP foram lavadas duas vezes em PBS e adicionadas de meio de cultura Schneider pH 7,4 contendo 20 % de SBF e tiveram sua quantidade ajustada para  $10^6$  parasitos/poço (5: 1 parasitos/célula), sendo distribuídos 1ml da suspensão de parasitos por poço, sendo os ensaios realizados em duplicata.

Decorridos os tempos de infecção acima determinados, as lamínulas eram observadas diretamente por microscopia de fluorescência e, posteriormente, o poço era lavado duas vezes com PBS e as células fixadas com metanol por 60 segundos e coradas pelo método de Giemsa. Após a secagem, as lamínulas foram montadas de forma invertida sobre lâminas de microscopia com *Entellan*<sup>®</sup>. Os resultados das observações a fresco das infecções e das lamínulas coradas por Giemsa foram registrados por microscopia de fluorescência em microscópio IX 71 e BX 40, Olympus.

### **4.7.1 Ensaio de infecção de hemócitos de *R. prolixus* com *T. rangeli* Choachí GFP tratados com Lisotracker<sup>®</sup>**

Buscando verificar o envolvimento de lisossomos dos hemócitos na interação *ex-vivo* com o *T. rangeli*, utilizamos o marcador fluorescente Lisotracker Red DND-99<sup>®</sup> (Life Technologies).

Para tanto, exemplares adultos de *R. prolixus* foram inoculados diretamente na hemolinfa com 100 µl de formas epimastigotas de *T. rangeli* Choachí GFP em fase exponencial de crescimento. Decorridas duas semanas da inoculação, foi verificada a colonização da hemolinfa pelos parasitos, sendo a mesma coletada conforme o descrito em no item 4.7., adicionando-se 60 nM do reagente Lisotracker e incubando-se a 27,5 °C por 2 h ao abrigo da luz. Após lavagem das lamínulas com PBS pH 7,4, as mesmas foram montadas de forma invertida sobre lâminas de microscopia com o reagente Hydromount. Os resultados foram observados em microscópio de fluorescência BX 40, Olympus, e registrados digitalmente.

Como controle neste experimento utilizamos hemócitos de insetos não infectados e células THP-1 não infectadas e infectadas com *T. cruzi* a fim de permitir a realização de uma análise comparativa do padrão de distribuição e/ou migração lisossomal.

#### 4.8 Camundongos

Camundongos Balb/C oriundos do Biotério Setorial do MIP/UFSC foram utilizados nos experimentos. Os animais foram mantidos em caixas com lotação máxima de até cinco camundongos, acondicionados em estantes com sistema de filtração de ar acoplado individualmente por gaiola. Os animais foram alimentados *ad libitum* com ração irradiada e autoclavada e água filtrada e autoclavada, sendo mantidos em ciclo natural de iluminação. Todos os procedimentos foram realizados na observância dos preceitos estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal – COBEA, tendo sido o projeto aprovado pela Comissão de Ética em Uso de Animais da UFSC (Protocolo PP00822 - Ofício 120 / CEUA / PRPE/2012).

##### 4.8.1 Ensaio de infecção no hospedeiro mamífero

Grupos de oito camundongos fêmeas da linhagem Balb/C com quatro semanas de idade foram inoculados via intraperitoneal (i.p.) com  $2 \times 10^6$  formas tripomastigotas de *T. rangeli* Choachí RFP e  $1 \times 10^4$  formas tripomastigotas de *T. cruzi* Y GFP. Os grupos experimentais foram organizados da seguinte forma:

- Não infectados
- Infectados com *T. cruzi* Y WT
- Infectados com *T. cruzi* Y GFP
- Infectados com *T. rangeli* Choachí WT
- Infectados com *T. rangeli* Choachí RFP

- Co-infectados com ambos os parasitos
- Infectados inicialmente com *T. rangeli* e após 15 dias infectados com *T. cruzi*
- Infectados inicialmente com *T. cruzi* e após 15 dias infectados com *T. rangeli*

### **4.8.2 Avaliação da parasitemia no hospedeiro mamífero**

A parasitemia dos animais infectados foi determinada diariamente pelo método descrito por Brener (1962) até que não fossem mais detectada parasitemia por exame ao microscópio óptico convencional e ao microscópio de fluorescência.

### **4.8.3 Avaliação histopatológica do hospedeiro mamífero**

Para as análises histopatológicas, um ou dois animais de cada grupo foram sacrificados no 15°, 35° e 50° dias pós-infecção. Para tanto, os animais foram anestesiados, os camundongos foram anestesiados com cloridrato de cetamina (Dopalen®) e cloridrato de xilazina (Rompum®) e em seguida foi realizada punção cardíaca para coleta de sangue e soro. Amostras dos tecidos (coração, fígado, baço e músculo esquelético) foram retiradas de cada animal e divididas em três frações, sendo uma parte fixada em formalina 10% tamponada para estudos histopatológicos (cortes seriados de 3 µm corados pela hematoxilina eosina - HE), outra parte submetidas à técnica de congelamento rápido, seccionadas através de um criostato para a observação da presença de dos parasitos transfectados em microscópio de fluorescência e a terceira parte armazenada em etanol 70% para extração de DNA. Na análise histopatológica, cinco lâminas para cada animal foram avaliadas em microscopia convencional em objetiva de 10x, 40x e 100x, para pesquisa de parasitos intra ou extracelulares e avaliação de reação inflamatória nos tecidos em comparação com o grupo controle não infectado. A intensidade de inflamação foi dada de acordo com critérios histopatológicos. Os experimentos de análise histopatológica foram realizados em colaboração com o Prof. Dr. Álvaro Menin do Instituto de Diagnóstico Veterinário (VERTA) de Curitiba, SC.

## 5. RESULTADOS

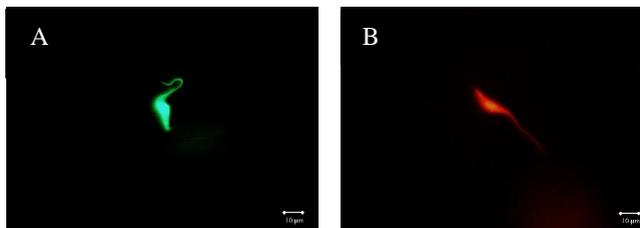
### 5.1 Obtenção das linhagens transfectantes

Anteriormente aos ensaios de co-cultivo e co-infecção *in vivo/in vitro* fazia-se necessário avaliar a estabilidade das ferramentas moleculares criadas que possibilitassem a fácil identificação de ambas as espécies quando em coabitação em qualquer ambiente *in vitro* ou frente a infecções *in vivo*.

Assim, após o processo de transfecção, a cepa Choachí de *T. rangeli* tranfectada com o plasmídeo pTREXnGFP-Neo e pTREXmRFP-Neo, passou a ser denominada *T. rangeli* GFP e RFP respectivamente, assim como a cepas Y de *T. cruzi* tranfectada com o plasmídeo pROCKGFP-Neo, foi denominada *T. cruzi* Y GFP, a cepa SC 28 tranfectada com o plasmídeo pTREXmRFP-Neo, denominada *T. cruzi* SC28 RFP e por fim a cepa CL Brener, tranfectada com o plasmídeo pTREXmRFP-Hygro denominada *T. cruzi* CL Brener RFP.

Após a linearização do DNA plasmidial pTREXmRFP/nGFP-Neo para o *T. rangeli*, foi realizada a eletroporação, e os parasitos foram submetidos à seleção com G-418. O *T. rangeli* apresenta uma alta sensibilidade a esta molécula, sendo que as doses iniciais foram de 25 µg/ml e sua adição foi crescente de acordo com a recuperação da cultura. Este protozoário foi selecionado com 100 µg/ml de G-418. Esta seleção levou aproximadamente 40 dias, porém a cultura levou cerca de 90 dias para obter o crescimento linear dos parasitos, permitindo a expansão, repique e congelamento da cultura.

Os parasitos transfectados com o tampão BSF apresentaram maior taxa de mortalidade do que os transfectados com o kit comercial, porém em ambas as situações os parasitos foram transfectados e selecionados com sucesso (Figura 7).



**Figura 7:** *Trypanosoma rangeli* expressando as proteínas fluorescentes GFP e RFP. (A), *T. rangeli* cepa Choachí GFP transfectado com o plasmídeo

## 74 RESULTADOS

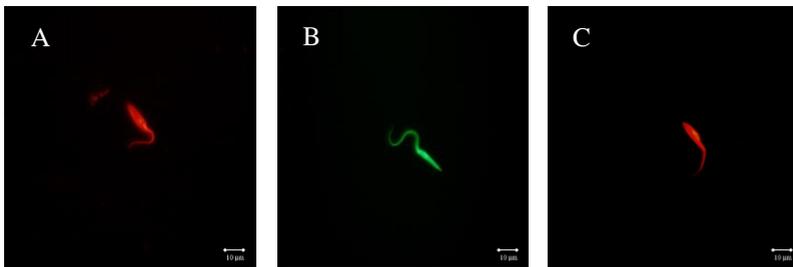
pTREXnGFP-Neo. (B), *T. rangeli* cepa Choachí RFP transfectado com o plasmídeo pTREXmRFP-Neo. A barra de aumento corresponde a 10  $\mu$ m.

Uma vez que as cepas selvagens de *T. cruzi* revelaram ser mais resistentes ao G-418 do que as cepas selvagens de *T. rangeli*, o processo de seleção das cepas de *T. cruzi* transfectadas foi mais longo e exigiu concentrações mais elevadas do antibiótico G-418.

O início da seleção da cepa SC28 RFP de *T. cruzi* foi realizado com 250  $\mu$ g/ml de G-418. Esta concentração foi aumentada gradativamente até a concentração final de 500  $\mu$ g/ml, onde a população já estava selecionada, com duração aproximada de 60 dias (Figura 8A).

A cepa Y de *T. cruzi* transfectada com o plasmídeo pROCKGFP-Neo recebeu uma dose inicial de 100  $\mu$ g/ml. A concentração do antibiótico foi aumentada semanalmente, sendo 50  $\mu$ g/ml adicionados a concentração já estabelecida, até que a completa seleção ocorreu com 400  $\mu$ g/ml de G-418, durante um período de aproximadamente 60 dias.

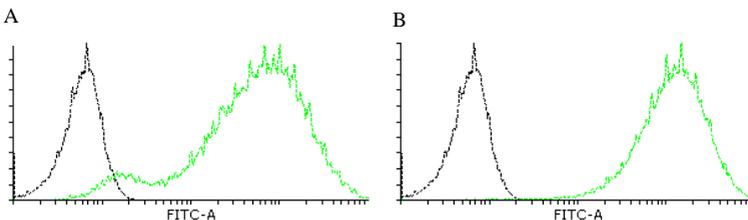
Esta mesma cepa havia sido anteriormente transfectada com o plasmídeo pTREXnGFP-Neo. Entretanto, os parasitos pararam de expressar a proteína fluorescente mesmo em concentrações crescentes de G-418, indicando uma possível recombinação do DNA plasmidial, ou morriam quando a seleção era iniciada com uma maior concentração do antibiótico (500  $\mu$ g/ml). Assim, optamos por realizar uma nova transfecção com o plasmídeo pROCKGFP-Neo (Figura 8B). Temos ainda em C, a cepa CL Brener clonada expressando RFP.



**Figura 8:** Diferentes cepas de *Trypanosoma cruzi* expressando as proteínas fluorescentes GFP e RFP. Em (A), *T. cruzi* cepa SC 28 transfectado com o plasmídeo pTREXmRFP-Neo; (B), *T. cruzi* cepa Y transfectada com o plasmídeo pROCKGFP-Neo e (C) *T. cruzi* clone CL Brener transfectados com o plasmídeo pTREXmRFP-Hygro. A barra de aumento corresponde a 10  $\mu$ m.

### 5.1.1 Análise das populações de parasitos expressando as proteínas fluorescentes

A análise das cepas transfectadas por citometria de fluxo revelou percentuais distintos de parasitos fluorescentes antes e após o processo de clonagem. Cerca de 92,94 % da população de *T. rangeli* Choachí GFP apresentava fluorescência (Figura 9A) e, após o processo de clonagem, o percentual de parasitos fluorescentes passou para 99,66% (Figura 9B). Uma vez que o *T. rangeli*, não pode ser clonado em meio sólido ou semi-sólido como o *T. cruzi*, possivelmente por ser um parasito que não se comporta muito bem em densidades baixas, a clonagem foi realizada por diluição limitante em placa sendo a população clonada a partir de uma diluição que apresentava 12,5 parasitos/poço. Embora estejamos utilizando uma população obtida de um número restrito não de um único clone, a análise de citometria de fluxo revelou um incremento na porcentagem de parasitos fluorescentes ainda que a larga base das curvas obtidas revele variações nos níveis de expressão da GFP.

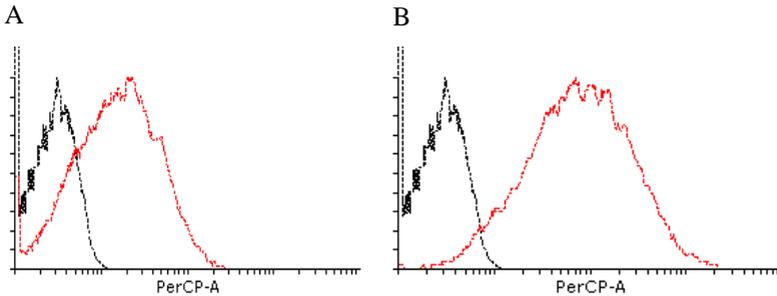


**Figura 9:** Histograma de citometria de fluxo (FITC-A) de *Trypanosoma rangeli* Choachí GFP. (A) população não clonada e (B), população após diluição seriada. Em preto a cepa selvagem, utilizada como controle e em verde os parasitos transfectados expressando a proteína verde fluorescente.

Para o *T. rangeli* RFP, o percentual encontrado foi de 57,92% de parasitos que estavam expressando RFP, o restante (42,08%) se encontravam sobrepostos à curva referente à população selvagem (Figura 10A). Após a clonagem por diluição seriada desta população transfectada, o percentual de parasitos fluorescentes teve um incremento

## 76 RESULTADOS

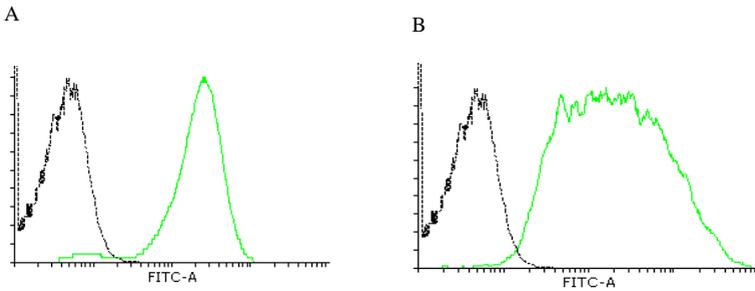
para 91,80% (Figura 10B). Apesar de 8,2% de a população ser considerada negativa pela análise de FACS, não observamos parasitos não fluorescentes na observação direta por microscopia de fluorescência



**Figura 10:** Histograma de citometria de fluxo (PerCP-A) de *T. rangeli* Choachí RFP. (A) população não clonada e (B) população após diluição seriada. Em preto a cepa selvagem, utilizada como controle e em vermelho os parasitos transfectados expressando o gene da proteína vermelha fluorescente.

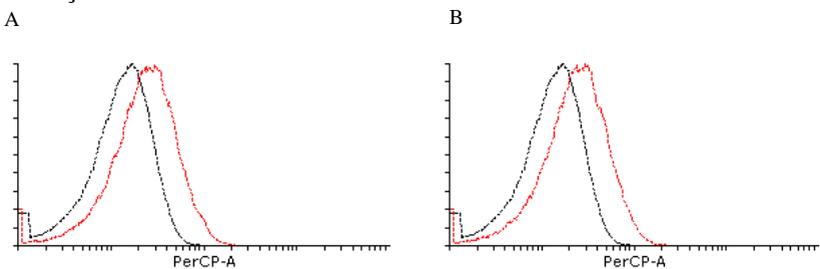
Para a cepa Y de *T. cruzi*, cujo percentual de parasitos fluorescentes anterior ao processo de clonagem já era bastante representativo (98,19%) (Figura 11A), o processo de clonagem teve como objetivo a diminuição da heterogeneidade da expressão da fluorescência observada por microscopia.

Após 26 dias do processo de clonagem por diluição limitante (0,5 parasito/poço) clones foram visualizados por microscopia, sendo selecionados aqueles cuja fluorescência era mais intensa. O percentual de parasitos fluorescentes após a clonagem foi de 98,83% (Figura 11B), apresentando estes um nível de fluorescência mais homogêneo se comparado à população originalmente transfectada. Cabe ressaltar que a citometria de fluxo conta eventos, que, neste caso, podem corresponder a um parasito morto, porém íntegro, cuja fluorescência ainda detectada.



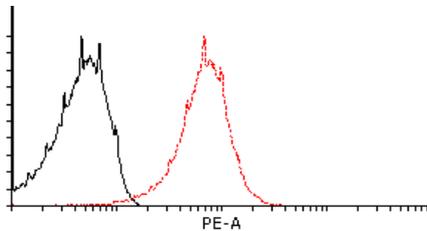
**Figura 11:** Histograma de citometria de fluxo (FITC-A) de *T. cruzi* Y GFP. Em (A) população não clonada e em (B) população clonada pela técnica de diluição limitante. Em preto a cepa selvagem, utilizada como controle e em verde os parasitos transfectados expressando a proteína verde fluorescente.

Curiosamente, a cepa *T. cruzi* SC28 RFP, quando submetida à citometria de fluxo demonstrou uma sobreposição muito grande com a população selvagem (Figura 12A), indicando um número majoritário de parasitos negativos, não condizendo com o observado na microscopia de fluorescência. Mesmo após o processo de clonagem utilizando diluição limitante de 0,5 parasito/poço não obtivemos uma melhor seleção da população transfectada, praticamente não havendo alteração da sobreposição das curvas entre parasitos da cepa selvagem e os transfectados, revelando um percentual de parasitos fluorescentes de apenas 4,82% (Figura 12B). Intrigantemente, não observamos parasitos não fluorescentes nas amostras de cultura em meio LIT, na parasitemia sanguínea de camundongos experimentalmente infectados ou ainda em infecções de células Vero ou L929.



**Figura 12:** Histograma de citometria de fluxo (PerCP-A) de *T. cruzi* SC28 RFP. (A) população não clonada e (B) população clonada. Em preto a cepa selvagem utilizada como controle e em vermelho os parasitos transfectados expressando a proteína vermelha fluorescente.

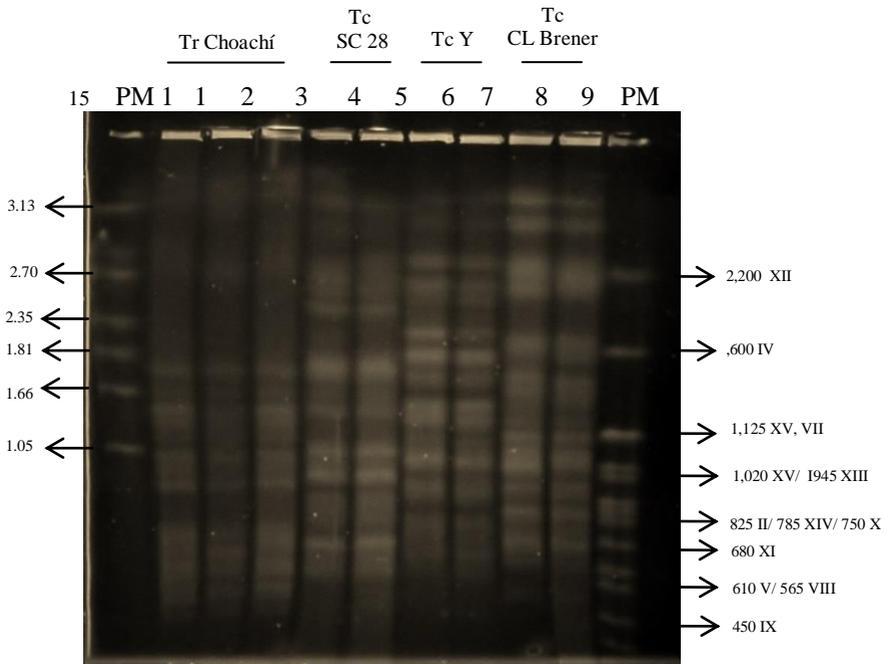
A cepa *T. cruzi* CL Brener RFP já foi recebida clonada, possuindo um percentual de parasitos fluorescentes de 97,28 % (Figura 13). O deslocamento do histograma dos parasitos transfectados no canal PE-A não ocorreu de maneira tão acentuada como para os parasitos GFP no canal do FITC-A (Figura 9 A e B e Figura 11 B), onde a fluorescência dos parasitos extrapola a escala de detecção do aparelho devido a intensidade da fluorescência expressa. Entretanto, a cepa CL Brener RFP de *T. cruzi* apresentou uma expressão mais homogênea da RFP na população transfectada se comparada os demais parasitos transfectados conforme o revelado pela baixa sobreposição das curvas dos parasitos selvagens e transfectados.



**Figura 13:** Histograma de citometria de fluxo (PE-A) de *Trypanosoma cruzi* CL Brener RFP. Em preto a cepa selvagem, utilizada como controle e em vermelho os parasitos transfectados clonados expressando o gene da proteína vermelha fluorescente.

### 5.1.2 Integração dos genes GFP e RFP no genoma dos parasitos transfectados

Após realizar os ensaios *in vitro* com as cepas Choachí RFP/GFP de *T. rangeli*, e as cepas Y GFP, SC 28 RFP e CL Brener RFP de *T. cruzi*, foi realizada a técnica de eletroforese em campo pulsado para confirmar a incorporação do DNA plasmidial no genoma. Após a eletroforese (Figura 14) é possível observar o perfil cromossômico de cada uma das cepas estudadas neste trabalho.

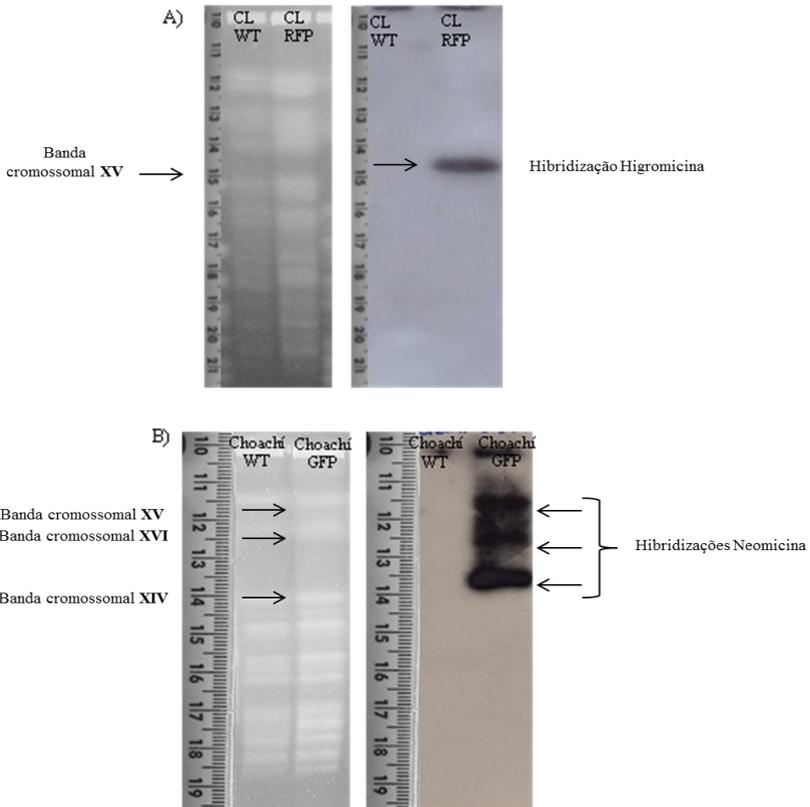


**Figura 14:** Perfil de separação cromossômica das cepas de *Trypanosoma cruzi* e *Trypanosoma rangeli* obtido pela técnica de eletroforese em campo pulsado (PFGE). PM1) Padrão de alto peso molecular (Cromossomas de *Hansenula wingei*); 1) *T. rangeli* Choachí WT; 2) *T. rangeli* Choachí GFP; 3) *T. rangeli* Choachí RFP; 4) *T. cruzi* SC 28 WT; 5) *T. cruzi* SC 28 RFP; 6) *T. cruzi* Y WT; 7) *T. cruzi* Y GFP; 8) *T. cruzi* CL Brener WT; 9) *T. cruzi* CL Brener RFP; PM 2) Padrão de baixo peso molecular (os algarismos em Romano representam as bandas cromossomais de *Saccharomyces cerevisiae*).

Após a resolução por PFGE, o DNA de *T. cruzi* CL Brener transfectado com o plasmídeo pTREXmRFP-Hygro foi hibridizado com uma sonda dirigida ao gene da Higromicina, sendo possível detectar um único sinal na banda cromossomal 15 de forma exclusiva nos parasitos transfectados (Figura 15A). Uma vez que nesta mesma banda cromossômica estão representados os cromossomos 9, 15, 22 e 40, podemos constatar que houve a integração do DNA plasmidial no genoma do parasito, não sendo possível afirmar a existência de uma ou mais cópias do mesmo.

## 80 RESULTADOS

Para o *T. rangeli* Choachí transfectado com o plasmídeo pTREXnGFPNeo, observamos a marcação de três bandas cromossômicas (bandas 14, 15 e 16) resultantes da hibridização com o gene da Neomicina (Figura 15B), permitindo evidenciar que ao menos três cópias do DNA plasmidial foram integradas no genoma do parasito. As demais cepas utilizadas neste trabalho já tiveram seus cariótipos resolvidos por PFGE, estando unicamente no aguardo de disponibilidade de material radioativo para a marcação das sondas e realização dos ensaios de hibridização.



**Figura 15:** Integração do plasmídeo pTREXmRFP-Hygro e do plasmídeo pTREXnGFP-Neo no genoma da cepa CL Brener de *Trypanosoma cruzi* e no genoma da cepa Choachí de *Trypanosoma rangeli*. (A) PFGE das cepas selvagem (WT) e transfectada (RFP) e hibridização com sonda para o gene

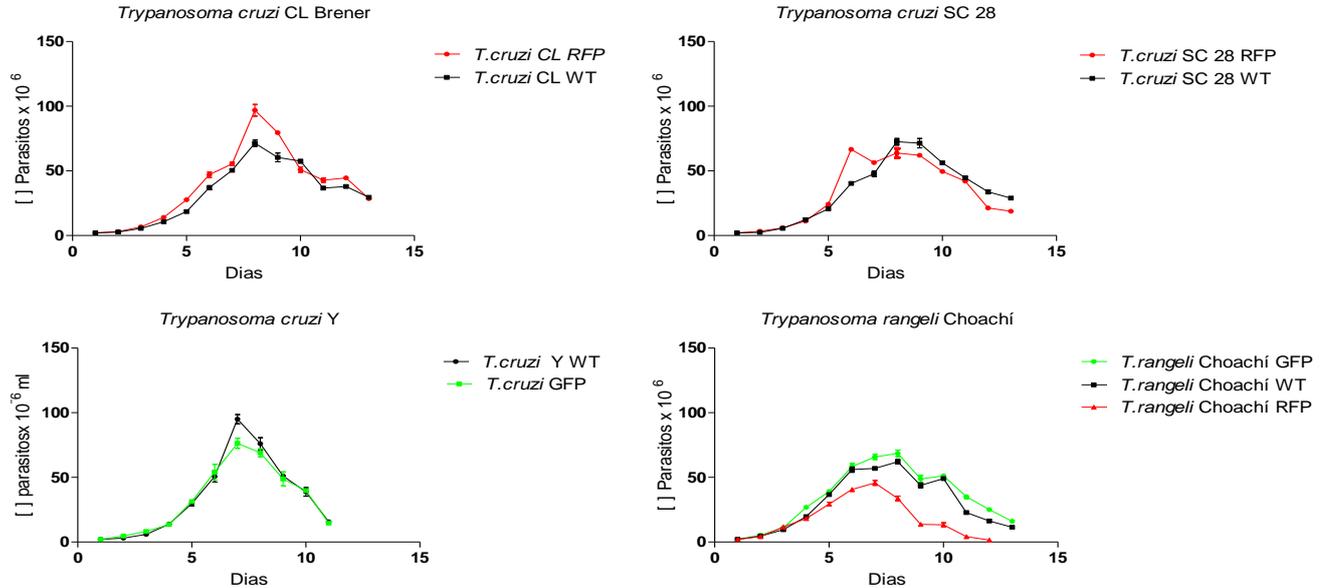
Higromicina. (B) Integração das cepas selvagem (WT) e transfectada (GFP) e a hibridização com sonda para Neomicina.

### **5.1.3 Análise do crescimento *in vitro* das cepas transfectadas de *T. cruzi* e *T. rangeli* em cultivo axênico**

Ao comparar o perfil de crescimento *in vitro* de cada par selvagem/ transfectado observam-se diferenças entre as cepas quanto ao número de parasitos em cada dia de contagem e quanto aos picos de crescimento, entretanto não foram detectadas diferenças significativas, tendo sido mantido um padrão de crescimento (Figura 16).

Assim nesta fase inicial de caracterização e comparação da ferramenta molecular criada em relação aos aspectos biológicos na forma epimastigota não foram observadas alterações no que diz respeito a sua cinética de crescimento. Indicando que o processo de transfecção e clonagem qual foram submetidos não causou alterações neste parâmetro.

## 82 RESULTADOS



**Figura 16:** Curva de crescimento das cepas fluorescentes de *Trypanosoma rangeli* e *Trypanosoma cruzi*. As cepas *T. rangeli* Choachí GFP e RFP, *T. cruzi* Y GFP, *T. cruzi* CL Brener RFP e *T. cruzi* SC28 RFP e suas respectivas cepas selvagens foram quantificadas através de contagem em câmara de Neubauer durante 11 dias.

#### 5.1.4 Análise do crescimento *in vitro* dos parasitos transfectados em co-cultura

Com o intuito de verificar se a presença de um parasito poderia interferir na cinética de crescimento da outra espécie apenas em meio axênico foram realizados os ensaios de co-cultura em diferentes proporções.

Inicialmente o *T. cruzi* CL Brener apresentou uma taxa de crescimento superior ao *T. rangeli* Choachí (Figura 17), sendo que mesmo na proporção de 5 *T. rangeli* : 1 *T. cruzi*, ao final do oitavo dia a concentração de *T. cruzi* já era superior a população de *T. rangeli*. Nas concentrações muito baixas de *T. rangeli* foi observado também que, embora o parasito consiga se multiplicar, a baixa concentração de *T. rangeli* no meio de cultura interfere realmente no seu crescimento se comparado ao cultivo axênico, não permitindo que o *T. cruzi* alcance grandes densidades.

Independentemente das proporções iniciais de *T. cruzi* e de *T. rangeli* em co-cultivo (1:1, 1:2, 2:1, 1:5 e 5:1) as curvas de crescimento até o segundo dia mantêm um padrão similar às cepas quando em cultivo axênico. Entretanto, a partir do terceiro dia de co-cultivo, as contagens dos números de parasitos vão diferindo (\*  $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,005$  e \*\*\*  $p < 0,0005$ ) do número de parasitos em cultivo axênico, conforme apresentado na figura 17 (A).

Na figura 17 temos os gráficos correspondentes as contagens em câmara de Neubauer por 11 dias (17A) e os ensaios de citometria de fluxo em dias alternados (17 B). No primeiro gráfico da figura A, onde temos a proporção inicial de 50% de *T. cruzi* para 50% de *T. rangeli* é observado que ela se mantém próximo a esta razão até o quarto dia de experimento e que posterior a isso, tem-se um declínio mais acentuado do *T. rangeli* e/ou um crescimento maior do *T. cruzi*, sendo que no décimo primeiro dia, a razão é praticamente de 1/5 de *T. rangeli* em relação à população total (Figura 17A).

Nos gráficos das proporções 1:2 e 2:1 (Figura 17A), o comportamento do *T. rangeli* é bastante semelhante, apresentando curvas de crescimento de mesmo padrão nas duas proporções, inclusive chegando a razões finais bem próximas em ambas as proporções (Figura 17A).

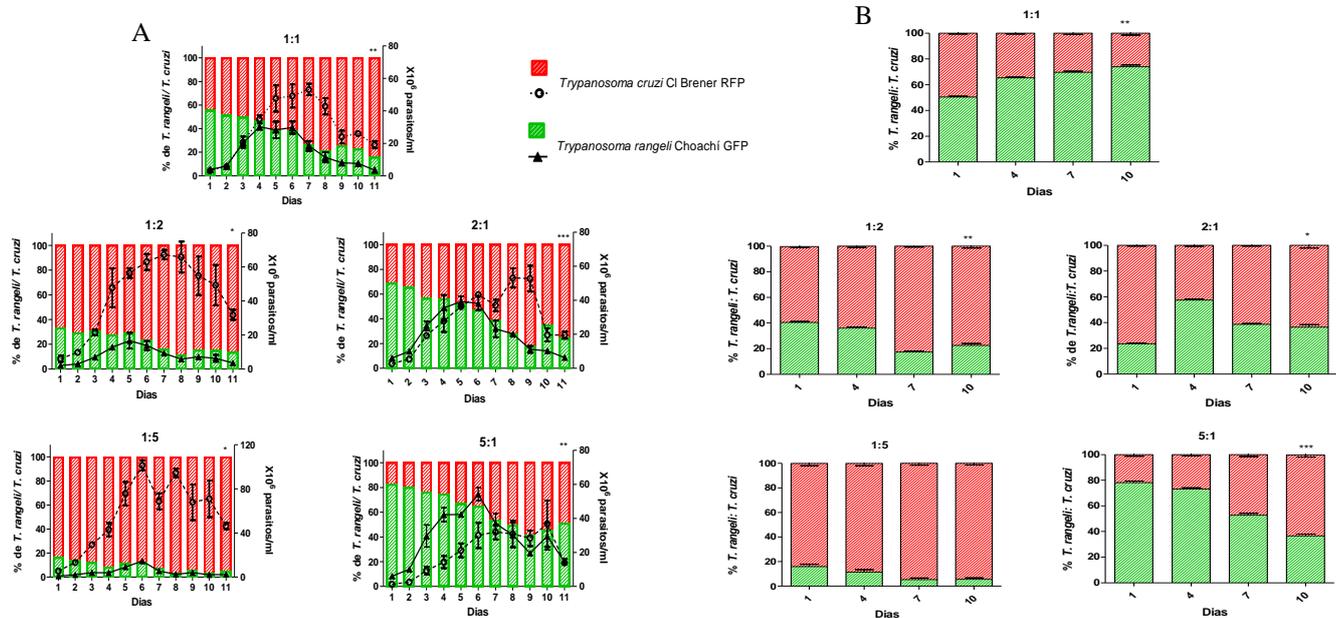
Nos últimos dois gráficos da figura 17(A) onde as proporções eram mais extremas, de 1:5 e 5:1, é notório que a representatividade de *T. rangeli* na proporção de 1:5 com *T. cruzi* é pouco expressiva, não

## 84 RESULTADOS

conseguindo o parasito alcançar uma densidade maior que o inóculo inicial em nenhum momento da curva de crescimento, tendo seu pico máximo no quinto dia. No gráfico de proporção *T. rangeli* / *T. cruzi* de 5:1, observa-se no quarto dia um aumento da porcentagem de *T. rangeli*, porém não ultrapassando o inóculo inicial.

Em relação a figura 17 (B), onde se tem registrado os ensaios de citometria de fluxo realizados nos dias 1, 4, 7 e 10, observa-se que existe correspondência com os ensaios realizados em microscopia de fluorescência se compararmos as proporções entre os respectivos dias. Porém nesta segunda situação as diferenças nas proporções são menos alteradas em relação aos dias de contagem em câmara de Neubauer.

Observamos ainda na figura 17 (A), a curva de crescimento dos parasitos em cada uma das proporções e é notável que de acordo com a mistura feita entre *T. rangeli* e *T. cruzi* o modo como os parasitos se comportam é diferente. Porém em todas as proporções observamos que o *T. cruzi* consegue ultrapassar as concentrações totais de *T. rangeli* por ml, inclusive no último gráfico (17 A), de proporção **5:1**, observamos que no 10º dia de cultivo o *T. cruzi* é capaz de ultrapassá-lo. Nas proporções **1:5** e **5:1** embora em concentrações finais sejam bem diferentes o pico de crescimento do *T. rangeli* ocorreu em ambas as situações no sexto dia. No gráfico **2:1**, observamos que quando o *T. rangeli* é quem esta em maior densidade, ocorreu um pico mais tardio do *T. cruzi* em relação ao gráfico **1:1**, **1:2** e ainda **1:5**.



**Figura 17:** Análise de crescimento *in vitro* das cepas CL Brener RFP de *Trypanosoma cruzi* (barras vermelhas) e Choachí GFP de *Trypanosoma rangeli* (Barras verdes) em co-cultivo realizado com diferentes proporções de cada espécie. (A) Número de parasitos determinado por contagem em câmara de Neubauer através de microscopia de Fluorescência. (B) Determinação do número de parasitos por citometria de fluxo (20.000 eventos). Os asteriscos representam as diferenças estatísticas através do teste

t de Student pareado (\* $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,005$  e\*\*\*  $p < 0,0005$ ). O crescimento foi verificado durante 11 dias, sendo a citometria de fluxo realizada nos dias 1, 4, 7 e 10 do experimento.

Quando realizado o mesmo experimento com a cepa SC28 RFP de *T. cruzi* (Figura 18) foi observado um perfil bastante semelhante aquele encontrado com a cepa CL Brener, onde mais uma vez o *T. cruzi* cresce alcançando valores mais altos que o *T. rangeli* e consegue também resistir melhor à carência nutricional conforme os dias do ensaio transcorriam em todas as proporções (1;1, 1:2, 2:1, 1:5 e 5:1 ).

As proporções foram mantidas mais próximas da relação inicial (Figura 18 A e B) demonstrando que os tempos de duplicação entre estas cepas de *T. cruzi* e *T. rangeli* foram bastante próximos. Entretanto, assim como o ocorrido com a cepa CL Brener, a cepa SC 28 de *T. cruzi*, resiste mais tempo em cultura em relação ao *T. rangeli* podendo estar relacionado ao fato de este parasito resiste melhor a depleção de nutrientes em cultura, e embora tenha apresentado um declínio, no 11º dia de experimento ainda haviam parasitos viáveis e em divisão. Este fato não ocorre para o *T. rangeli*, que ao final do experimento possuía alterações morfológicas e ausência de motilidade.

Observamos que entre o terceiro e o quarto dia de co-cultivo parece haver um aumento no percentual de *T. rangeli* em relação ao inóculo inicial, o que representa o momento em que o parasito alcança o seu pico de crescimento em cultura axênica, enquanto o pico de crescimento exponencial de *T. cruzi* se apresenta próximo ao 7º dia, onde o *T. rangeli* já está em fase de declínio. Porém, durante o período observado, as proporções se mantêm semelhantes ao inóculo inicial (Figura 18 A e B).

A análise por citometria de fluxo (Figura 18 B) realizada com a cepa SC28 RFP de *T. cruzi* e a cepa Choachí GFP de *T. rangeli* revelou ser condizente com as contagens em microscopia de fluorescência (Figura 18 A), porém indicando novamente um valor maior para o *T. rangeli* do que a proporção determinada com a contagem em câmara de Neubauer, superestimando a população destes parasitos, o que poderia ser acarretado pelo próprio aparelho em relação ao canal FITC, onde ao realizar os ensaios com parasitos expressando GFP, a fluorescência expressa ultrapassava o limite de detecção do citômetro.

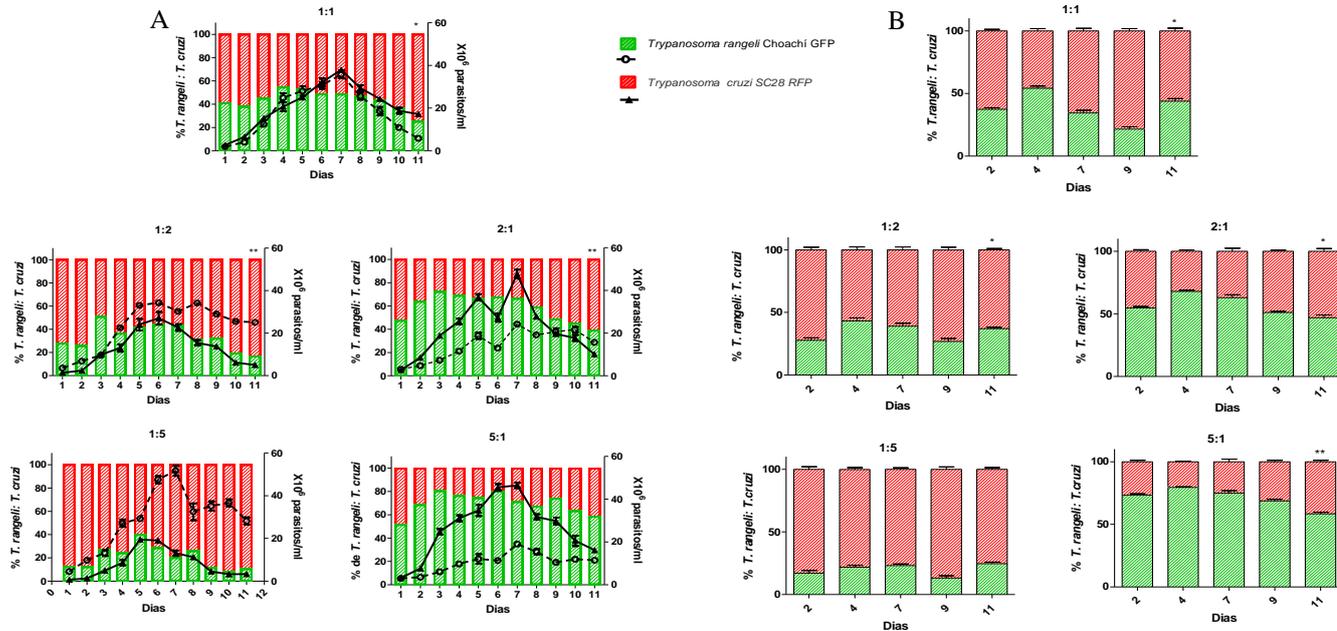
Outro dado que chama a atenção é que na proporção 5: 1 de *T. rangeli*: *T. cruzi*, observamos que embora tenha um aumento no percentual de *T. cruzi*, o percentual de *T. rangeli* ainda é superior ao de *T. cruzi* (Figura 18 B), o que não ocorreu no ensaio anterior com a cepa CL Brener (17 B).

Nos gráficos de linhas, sobrepostos a figura 17 (A), podemos observar crescimentos muito similares entre estas duas cepas, inclusive

## 88 RESULTADOS

sendo registrado um crescimento discretamente maior para o *T. rangeli* na proporção **1:1**.

Neste ensaio foi observado que a presença do *T. rangeli*, independentemente de concentrações iniciais superiores ou inferiores em relação ao *T. cruzi* causou determinadas oscilações no crescimento do *T. cruzi*, porém em todos os gráficos o pico de crescimento da cepa SC 28 pode ser observado no 7º dia de cultivo, para o *T. rangeli*, no entanto este parâmetro alternou entre o 6º e 7º dia. Dentre os três ensaios foi evidenciado que a cepa SC28 é a que mais se assemelhou ao *T. rangeli* no que diz respeito ao crescimento *in vitro* na forma epimastigota.

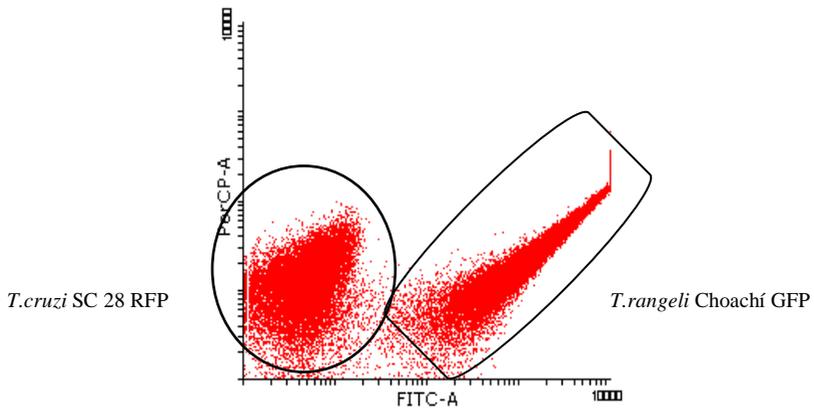


**Figura 18:** Análise de crescimento *in vitro* das cepas SC28 RFP de *Trypanosoma cruzi* (Barras vermelhas) e Choachí GFP de *Trypanosoma rangeli* (Barras verdes) em co-cultivo realizado com diferentes proporções de cada espécie. (A) Número de parasitos determinado por contagem em câmara de Neubauer através de microscopia de Fluorescência. (B) Determinação do número de parasitos por citometria de fluxo (20.000 eventos). Os asteriscos representam as diferenças estatísticas através do teste

## 90 RESULTADOS

t de Student pareado (\* $p < 0,05$ , e \*\*  $p < 0,005$ ). O crescimento foi verificado durante 11 dias, sendo a citometria de fluxo realizada nos dias 2, 4, 7, 9 e 11 do experimento.

Importante ressaltar que, conforme apontado anteriormente, o citômetro de fluxo, apresentava uma capacidade de detecção muito baixa para a cepa SC28 RFP, porém como o *T. rangeli* Choachí GFP após a clonagem não apresentava parasitos em sobreposição com a sua população selvagem e também pela complexidade diferente apresentada pelas duas espécies, foi possível distinguir as duas cepas ao realizar a análise no gráfico de Dot Plot pelos eixos FITC e PE, pois as duas populações ficavam agrupadas de modo a não haver sobreposição (Figura 19).



**Figura 19:** Gráfico Dot Plot de citometria de fluxo mostrando as proporções 1:1 do ensaio de co-cultura entre *Trypanosoma cruzi* SC28 RFP e *Trypanosoma rangeli* Choachí GFP. As espécies estão agrupadas de acordo com a fluorescência expressa. O canal PerCP para a fluorescência vermelha e o canal FITC para a fluorescência verde.

A cepa Y de *T. cruzi* apresentou a mesma relação com o *T. rangeli* RFP já evidenciado nos dois ensaios anteriores, porém ela se assemelhou mais com a cepa SC28, pois não alcança densidades tão altas quanto à cepa CL Brener. Todas as proporções foram modificadas, porém nem todas demonstraram diferenças significativas conforme apresentado na Figura 20.

Ao realizar as comparações entre os ensaios de contagem em microscopia de fluorescência diariamente e os ensaios de citometria de fluxo realizados em dias alternados, observamos que existe uma

## 92 RESULTADOS

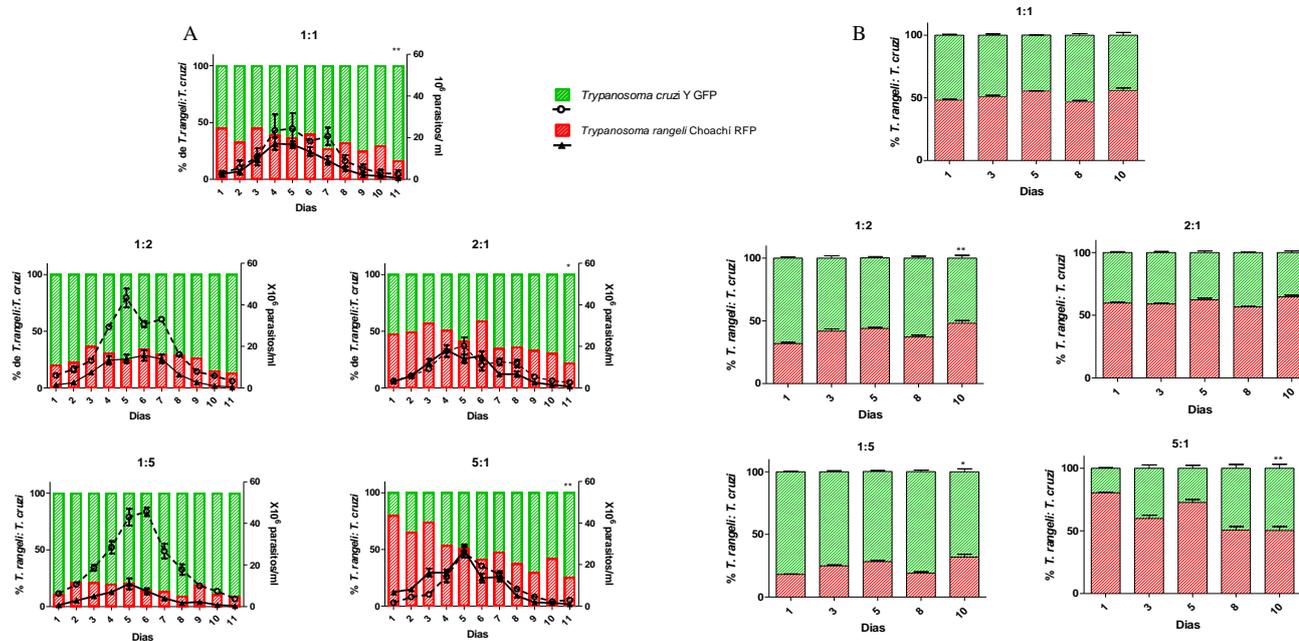
correspondência entre os ensaios, indicando que a citometria de fluxo pode ser uma importante ferramenta para avaliação das proporções destes parasitos quando em cultura tendo a expressão da proteína fluorescente como base para a identificação.

Em relação as contagens em câmara de Neubauer ( Figura 20 A) observamos que as proporções entre as duas espécies são mais notoriamente alteradas onde a concentração de *T. rangeli* é maior que a de *T. cruzi* ( 2: 1 e 5: 1 de *T. rangeli* :*T. cruzi* ), conforme ilustrado na Figura 20 (A). Em relação a citometria de Fluxo (Figura 20 B), observamos significâncias estatísticas diferentes, onde os gráficos de proporções 1:1, 1:2, 2:1 e 1:5 são os que apresentam as maiores alterações nas proporções *T. rangeli* : *T. cruzi*, porém conforme citato anteriormente estas diferenças apresentadas entre as duas técnicas, podem ser em decorrência da incapacidade do citômetro, no tipo de ensaio realizado, em detectar a viabilidade do parasito, contabilizando os eventos baseado apenas na presença ou ausência de fluorescência.

Ao observamos os gráficos de linhas (Figura 20 A), correspondentes ao crescimento do parasito, observamos um crescimento mais abrupto da cepa Y e um decaimento mais acentuado também. Seu pico de crescimento variou entre o 5º e 6º dia de cultivo para todas as proporções.

Se observarmos no eixo da direita, veremos que ele também não alcança densidades tão altas, assemelhando-se mais a cepa SC 28, do que a cepa CL Brener. Em proporções **1:2** e **1:5**, onde a concentração inicial de *T. cruzi* são maiores, observa-se que seu crescimento é muito mais pronunciado, em comparação com os gráficos **2:1** e **5:1** onde se tem as concentrações iniciais superiores para o *T. rangeli*. No entanto o *T. cruzi* Y sempre conseguiu se sobressair, até mesmo na proporção **5:1** de *T. rangeli*, onde no 7º dia de cultivo ele já estava em maior densidade na cultura.

Mediante estes ensaios podemos observar que em todas as proporções existem alterações do crescimento de uma espécie ou cepa quando em co-cultivo em comparação com o perfil apresentado nos crescimentos isolados, porém ele não se mostrou limitante para o desenvolvimento do parasito para nenhuma das cepas aqui utilizadas.



**Figura 20:** Análise de crescimento *in vitro* das cepas GFP de *Trypanosoma cruzi* (barras verdes) e Choachí GFP de *Trypanosoma rangeli* (Barras vermelhas) em co-cultivo realizado com diferentes proporções de cada espécie. (A) Número de parasitos determinado por contagem em câmara de Neubauer através de microscopia de Fluorescência. (B) Determinação do número de parasitos por citometria de fluxo (20.000 eventos). Os asteriscos representam as diferenças estatísticas através do teste

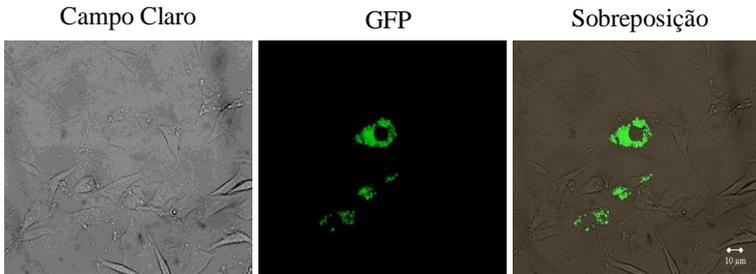
## 94 RESULTADOS

t de Student pareado (\*p < 0,05, \*\*p < 0,005. O crescimento foi verificado durante 11 dias, sendo a citometria de fluxo realizada nos dias 1, 3, 5, 8 e 10 do experimento.

### 5.2 Análise da infecção experimental de células THP-1 por *T. cruzi* (Cepas SC28 RFP, CL Brener RFP e Y GFP).

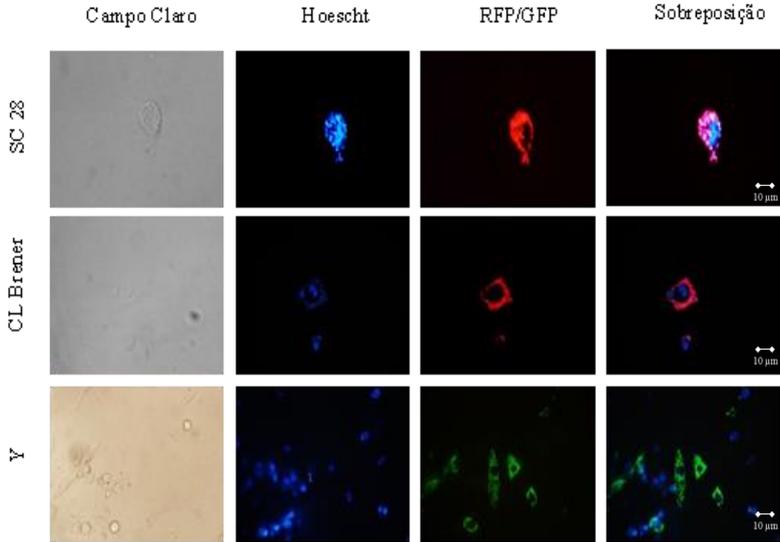
Posteriormente ao ensaio realizado apenas em meio axênico tínhamos por intuito avaliar a co-infecções a nível celular em diferentes tempos de interação com células de uma linhagem monocítica, diferenciadas *in vitro* para uma linhagem fagocítica (THP-1).

Após a infecção *in vitro* das células Vero/ L929 com as cepas selvagens e transfectadas e a co-infecção *T. cruzi*/*T. rangeli*, elas foram submetidas a análise em microscopia de luz e de fluorescência. A cepa Y GFP apresentou diferenças de infectividade / multiplicação em relação à cepa parental e que após as passagens em células e camundongos as características biológicas da cepa original foram recuperadas, conforme ilustrado na figura 21.



**Figura 21:** Infecção de célula L929 com *Trypanosoma cruzi* Y GFP utilizando formas tripomastigotas sanguíneas. A barra corresponde a 10 µm.

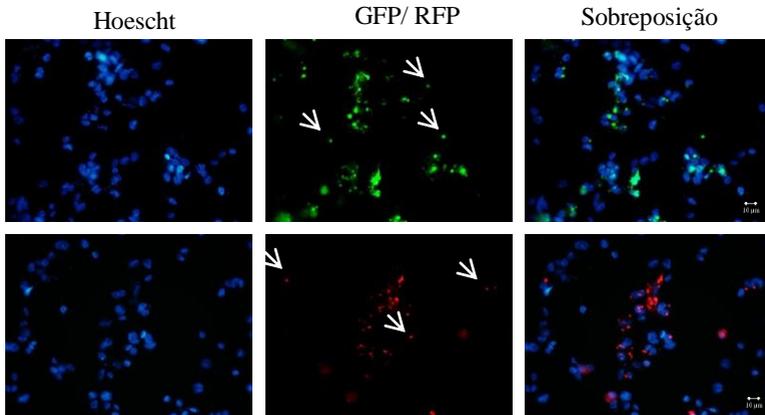
As cepas de *T. cruzi* transfectadas apresentaram uma fluorescência (RFP e GFP) forte e estável durante a infecção celular, corroborando com estudos anteriores (Pires *et al.*, 2008). Além disso, as cepas de *T. cruzi* mantiveram as mesmas capacidades de suas cepas parentais em infectar as células, diferenciar-se para formas amastigotas e se multiplicar no interior das mesmas (Figura 22).



**Figura 22:** Infecção *in vitro* de células THP-1 com cepas SC28 RFP, CL Brener RFP e Y GFP de *Trypanosoma cruzi* (24 h de infecção). A barra corresponde a 10 µm.

### 5.3 Análise da infecção experimental de células THP-1 por *T. rangeli* (Cepas Choachí GFP e RFP)

Após quatro horas de interação do *T. rangeli* com as células THP-1, observa-se parasitos fluorescentes (GFP e RFP) com morfologia alterada no interior das células, não sendo observadas morfologias clássicas como as observadas para *T. cruzi* (amastigotas ou tripomastigotas). São observados parasitos de formato mais arredondado (Figura 23), (indicado pelas flechas) que se assemelham muito à forma amastigota de *T. cruzi*, usualmente denominadas de “amastigota-like” na literatura, porém não foi confirmada a sua localização intracelular e não foram observados parasitos se multiplicando, indicando que o *T. rangeli* não possui a capacidade de sobreviver ou de se multiplicar no interior desta linhagem célula (Figura 23).



**Figura 23:** Interação de células THP-1 com *Trypanosoma rangeli* (cepas Choachí GFP e RFP) após quatro horas de interação. A barra corresponde a 10  $\mu\text{m}$ .

#### 5.4 Análise da co-infecção experimental de células THP-1 com *T. rangeli* e *T. cruzi*

O percentual de células infectadas nos casos de co-infecção se mostrou menor em relação às infecções isoladas para o *T. cruzi* (Figura 24). O número de células co-infectadas foi baixo, em torno de 2 – 5 % variando de acordo com a cepa de *T. cruzi* e também com o tempo.

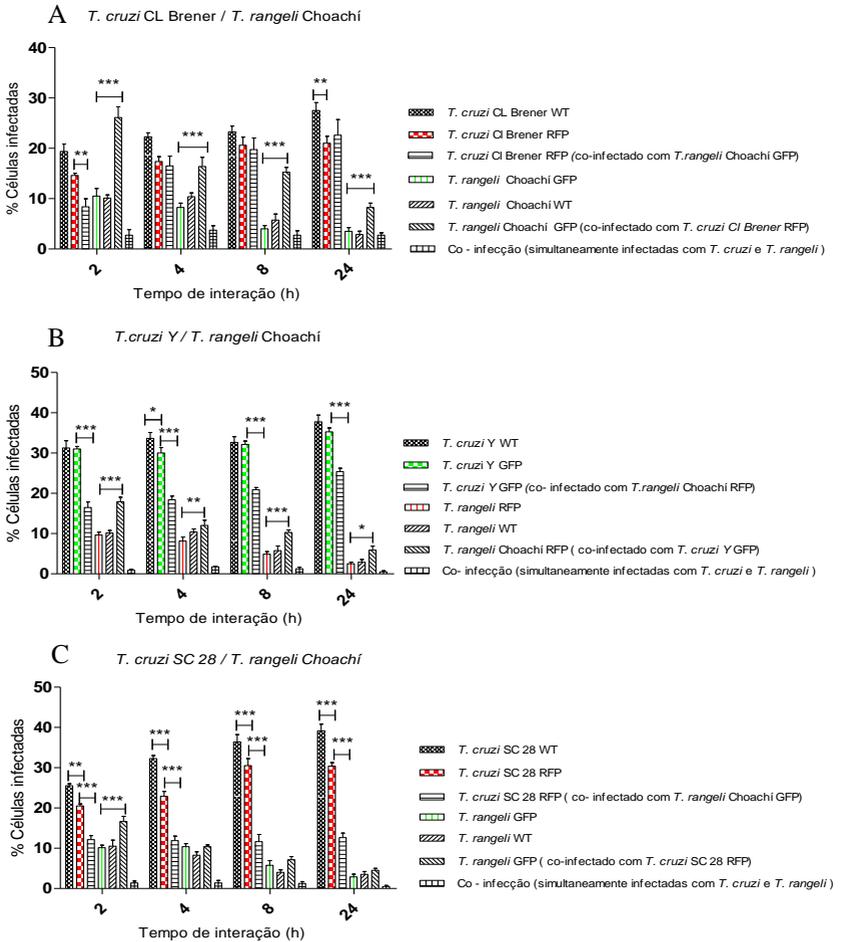
A cepa CL Brener RFP demonstrou diferenças significativas (\*\* $p < 0,005$ ) no percentual de células infectadas em comparação com sua cepa parental apenas no tempo de 24h (Figura 24 A). Também foram observadas diferenças nos tempos 2h (\*\* $p < 0,005$ ) ao compararmos a cepa CL Brener RFP isoladamente e durante a sua co-infecção com o *T. rangeli* GFP. Neste ensaio não foram evidenciadas diferenças da cepa Choachí GFP de *T. rangeli* em relação a sua cepa parental nas infecções isoladas, porém ao compararmos a transfectante isolada com as infecções com o *T. cruzi*, foram evidenciadas diferenças estatísticas em todos os tempos utilizados neste ensaio (\*\* $p < 0,0005$ ), (Figura 24 A).

Em relação ao ensaio de co-infecção com a cepa Y GFP e a cepa Choachí RFP foi observada uma diferença estatística entre a cepa transfectada e parental no tempo 4h (\*  $p < 0,05$ ), porém divergentemente do que ocorreu no ensaio anterior com a cepa CL Brener, quando comparados o percentual de células infectadas pelo *T. cruzi* nas

## 98 RESULTADOS

infecções isoladas e nas co-infecções com o *T. rangeli*, todos os tempos apresentaram diferenças significativas ( $***p < 0,0005$ ), e o mesmo padrão foi observado para o *T. rangeli* RFP, ao compararmos as infecções isoladas em relação as co-infecções com o *T. cruzi* Y GFP. Porém a relação é inversa, onde o *T. cruzi* isoladamente apresenta um maior percentual de células infectadas em comparação com as co-infecções, enquanto o *T. rangeli* apresenta um percentual maior de células infectadas quando em co-infecções com o *T. cruzi* (Figura 24 B). Não foram evidenciadas diferenças significativas entre o *T. rangeli* RFP e sua cepa parental.

Em relação a cepa SC 28 RFP observamos que ela apresentou diferenças estatísticas ao ser comparada com sua cepa parental ( $**p < 0,005$  e  $***p < 0,0005$ ) e também ao compararmos o seu percentual nas infecções isoladas com os percentuais obtidos durante os ensaios de co- infecção com o *T. rangeli* GFP ( $***p < 0,0005$ ) (Figura 24 C). Observamos que não existem diferenças significativas entre o *T. rangeli* GFP e sua cepa parental, conforme já havia sido demonstrado no ensaio anterior com a cepa CL Brener (24 A), no entanto no tempo 2 (h) observa-se uma diferença estatística ( $***p < 0,0005$ ) em relação a infecção isolada desta cepa em comparação com o percentual encontrado na co-infecção com o *T. cruzi* e novamente, como o observado no ensaio anterior com o *T. cruzi* Y GFP, o percentual de células infectadas é maior quando este parasito esta na presença do *T. cruzi*.

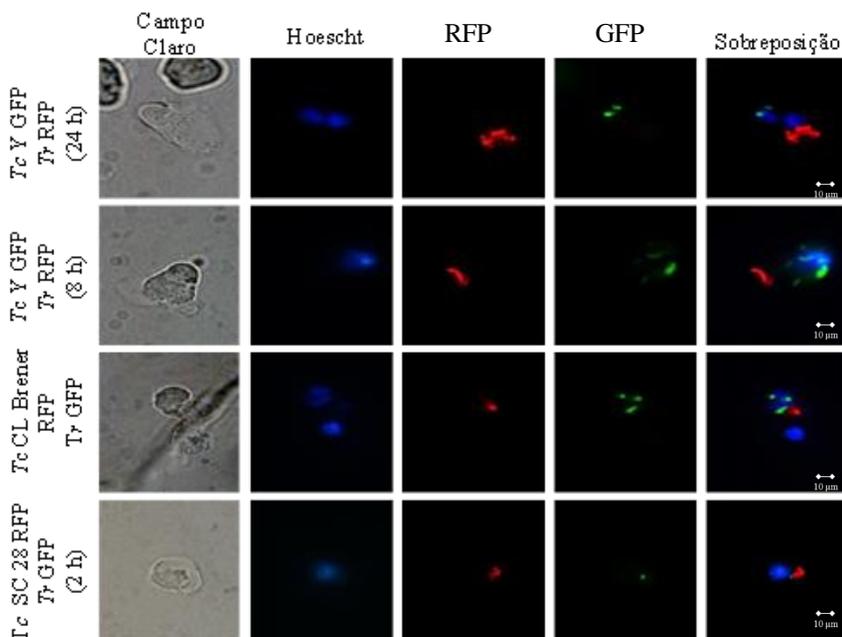


**Figura 24:** Representação gráfica do percentual de células THP-1 infectadas com *Trypanosoma cruzi* cepas CL Brener (A), Y (B) e SC 28 (C) e *Trypanosoma rangeli* cepa Choachi GFP e RFP. O gráfico representa o percentual de células THP-1 infectadas após 2 , 4,8 e 24 h de infecção. \*p< 0,05, \*\* p < 0,005 e \*\*\* p <0,0005.

Na figura abaixo são registrados alguns tempos da co-infecção entre as diferentes cepas de *T. cruzi* e a cepa Choachi de *T. rangeli*, evidenciando que estes parasitos são capazes de coabitar a mesma célula. Observamos também que conforme transcorrem os tempos de infecção, os parasitos *T. rangeli* que haviam sido internalizados na

## 100 RESULTADOS

célula, vão sofrendo um processo de digestão no interior desta (T 24h), nos tempos iniciais após a internalização ou quando o parasito ainda encontra-se aderido ou no sobrenadante, mesmo após 8 h, ainda foram visualizadas formas tripomastigotas com morfologia característica (Figura 25).

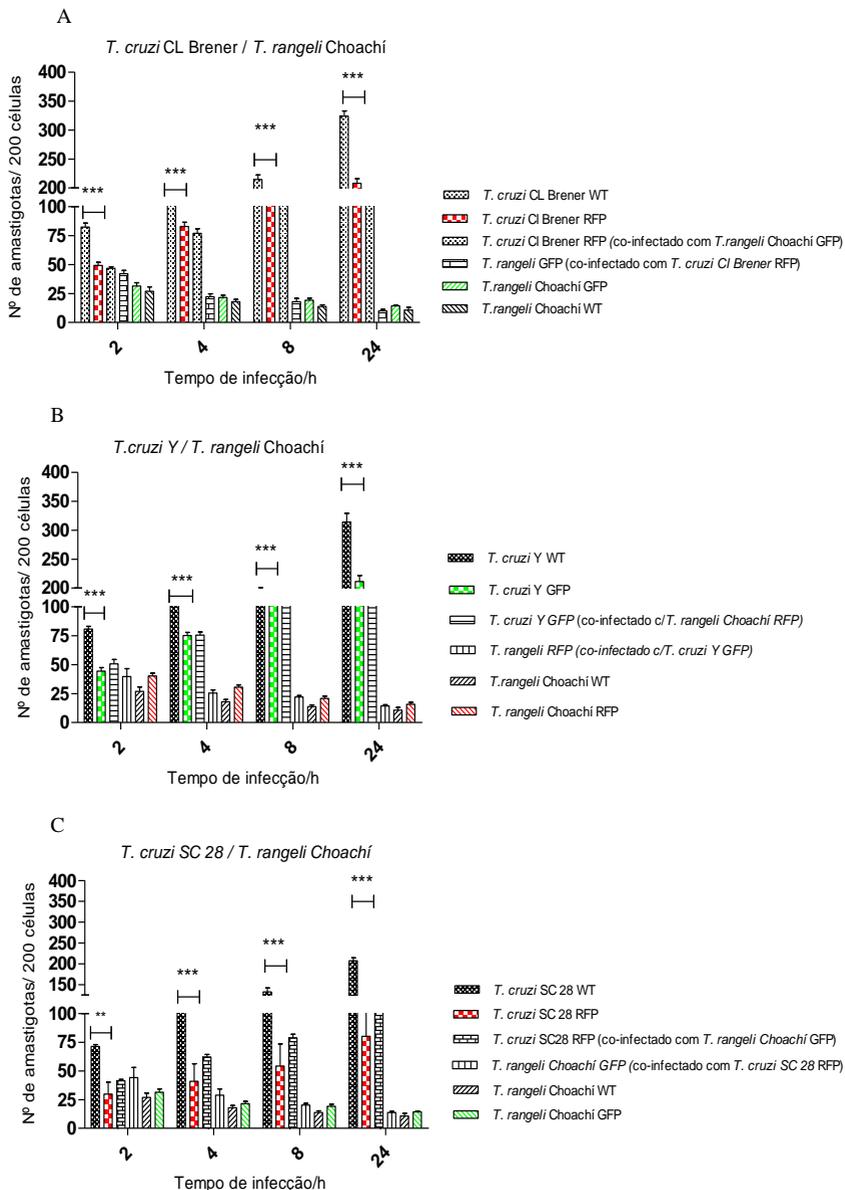


**Figura 25:** Co-infecção de células THP-1 por cepas de *Trypanosoma cruzi* (Tc) e *Trypanosoma rangeli* transfectadas. Os tempos indicados correspondem ao tempo de interação do parasito com a célula em horas. A barra corresponde a 10µm.

Ao realizar os testes estatísticos foi observado que existem diferenças importantes no que diz respeito ao número de amastigotas das cepas selvagens de *T. cruzi* quando em comparação com as cepas transfectadas. O processo de transfecção conforme visto anteriormente parece não gerar grandes modificações nas formas epimastigotas, porém parece afetar diretamente na infectividade “*in vitro*” por alterar justamente a capacidade das formas tripomastigotas em aderir e invadir a célula (Figuras 26).

O mesmo padrão pode ser observado independente da cepa de *T. cruzi* utilizada neste estudo. Embora as modificações realizadas não devessem causar modificações quanto à infectividade do parasito, por se tratar simplesmente da expressão de um gene de uma proteína fluorescente, elas foram bastante expressivas durante este ensaio de infecção “*in vitro*”. Não foram evidenciadas diferenças na interação parasito-célula em relação às cepas selvagens e transfectadas de *T. rangeli* Choachí no que diz respeito a este parâmetro.

# 102 RESULTADOS



**Figura 26:** Número total de amastigotas observados em células THP-1 co-infectadas por *Trypanosoma cruzi* e *Trypanosoma rangeli*. O gráfico representa

o número de amastigotas intracelulares e parasitos aderidos e internalizados após 2 , 4,8 e 24 h de infecção com *T. cruzi* CL Brener RFP e *T. rangeli* Choachí GFP (A), Y GFP e Choachí RFP (B) e SC 28 RFP e Choachí GFP (C). \*\* p < 0,005 \*\*\* p < 0,0005.

Uma vez que todas as cepas de *T. cruzi* foram capazes de se multiplicar nestas células, foi possível realizar um comparativo do tempo de duplicação e da taxa de multiplicação das cepas selvagens e transfectadas. Curiosamente, as taxas de multiplicação e o tempo de duplicação das cepas selvagens e transfectadas são extremamente parecidos (Tabela 4), o que sugere que o processo de transfecção parece afetar inicialmente o contato do parasito com a célula, mas uma vez no interior desta, ele age como a sua cepa parental no que diz respeito a estes dois parâmetros avaliados.

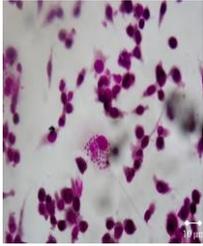
Do ponto de vista microscópico, é possível observar nas infecções celulares *in vitro* que não existem grandes diferenças entre o perfil de infecção das cepas transfectadas e selvagens de CL Brener e Y nos tempos 24 e 72 h pós infecção e observados o número de células infectadas e o número de amastigotas por célula infectada (Figura 27).

**Tabela 4:** Taxa de multiplicação e tempo de duplicação *in vitro* das cepas CL Brener WT e RFP, SC 28 WT e RFP e Y WT e GFP de *Trypanosoma cruzi* em células da linhagem THP-1.

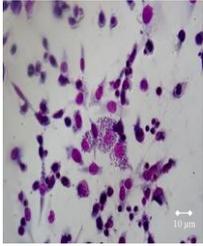
<b>Cepas</b>	<b>Taxa de Multiplicação</b>	<b>Tempo de duplicação</b>
<b>Y WT</b>	3,16	29h34min
<b>Y GFP</b>	3,14	29h07min
<b>CL Brener WT</b>	2,53	36h25min
<b>CL Brener RFP</b>	2,65	34h 14min
<b>SC 28 WT</b>	2,78	32h52min
<b>SC 28 RFP</b>	2,49	36h49min

105 RESULTADOS

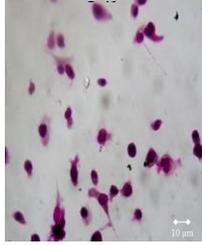
CL Brener RFP  
24h



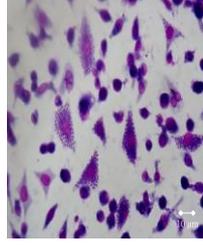
CL Brener RFP  
72h



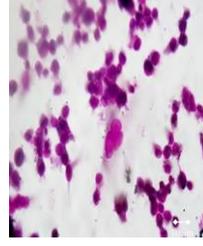
SC 28 RFP



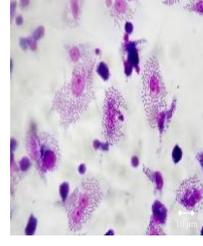
SC 28 RFP



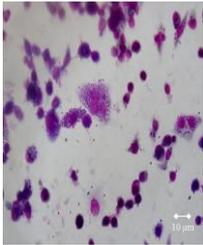
Y GFP 24h



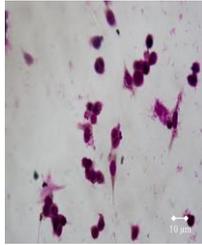
Y GFP 72h



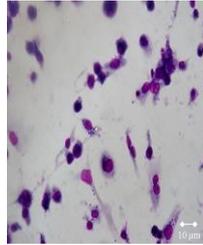
CL Brener WT  
24h



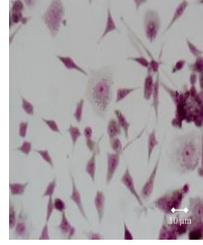
CL Brener WT  
72h



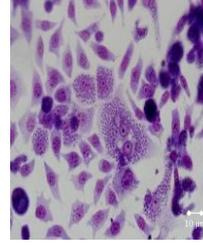
SC 28 WT 24h



SC 28 WT 72h



Y WT 24h



Y WT 72h

## 106 RESULTADOS

**Figura 27:** Células THP-1 infectadas com diferentes cepas selvagens de *Trypanosoma cruzi* e cepas do parasito transfectadas com o plasmídeo pTREM-RFP-Hygro, pTREM-RFP-Neo. Coloração pelo método Giemsa após 24 e 72h de infecção. A barra corresponde a 10  $\mu\text{m}$ .

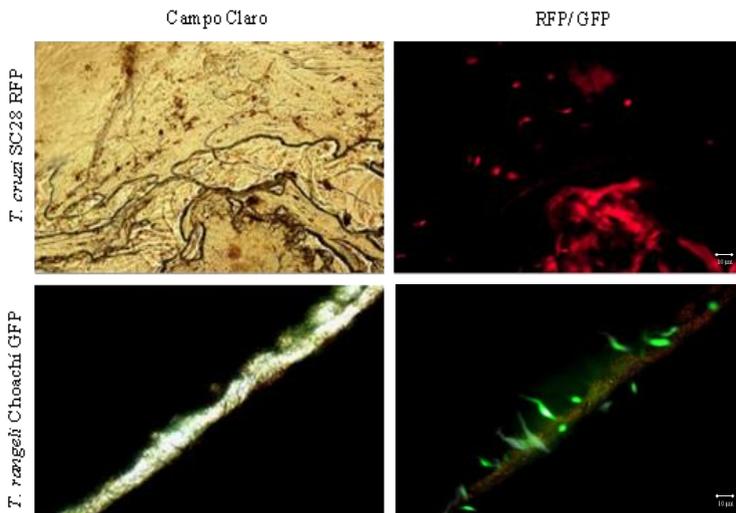
Ao término deste ensaio observamos inicialmente a estabilidade da ferramenta criada também nas formas amastigotas para o *T. cruzi* e no caso do *T. rangeli* também foi registrado que mesmo após ser fagocitado pela célula, a fluorescência ainda era detectada.

Além disso, constatou-se que apesar de raros os eventos de co-infecção na mesma célula são possíveis e também que a presença do *T. rangeli* é capaz de diminuir o percentual de células infectadas pelo *T. cruzi*, sendo ainda mais evidente para cepa Y, reduzindo este percentual em cerca de 10 % e ainda que a relação inversa acontece para o *T. rangeli*, onde a presença do *T. cruzi* aumentou o seu percentual de infecção celular também em cerca de 10 %.

### **5.5 Avaliação da infectividade e da evolução de cepas transfectadas de *T. cruzi* e *T. rangeli* em *R. prolixus***

Finalizado os ensaios *in vitro*, fazia-se necessário testar também a estabilidade da ferramenta criada, uma vez que os parasitos estivessem no interior do inseto vetor.

A avaliação da manutenção das características biológicas dos parasitos e da estabilidade da expressão das proteínas fluorescentes das cepas de *T. rangeli* e *T. cruzi* foi realizada através de infecções experimentais em *R. prolixus*. A análise de diferentes tecidos, em especial o conteúdo e a membrana intestinal, revelou a manutenção da expressão das proteínas fluorescentes por *T. cruzi* e *T. rangeli* mesmo na ausência de pressão seletiva, indicando a estabilidade das transfecções realizadas. Os insetos infectados com *T. rangeli* não tiveram em nenhum dos tempos observados a hemolinfa ou glândula salivar colonizada pelo parasito, porém em infecções com a cepa Choachí selvagem foram visualizados parasitos na glândula salivar em 15 % de um total de 20 insetos. Conforme mencionado anteriormente o *T. rangeli* GFP havia sido submetido ao ensaio de PFGE e a integração foi confirmada, porém aqui avaliamos esta estabilidade *in vivo* (Figura 28).

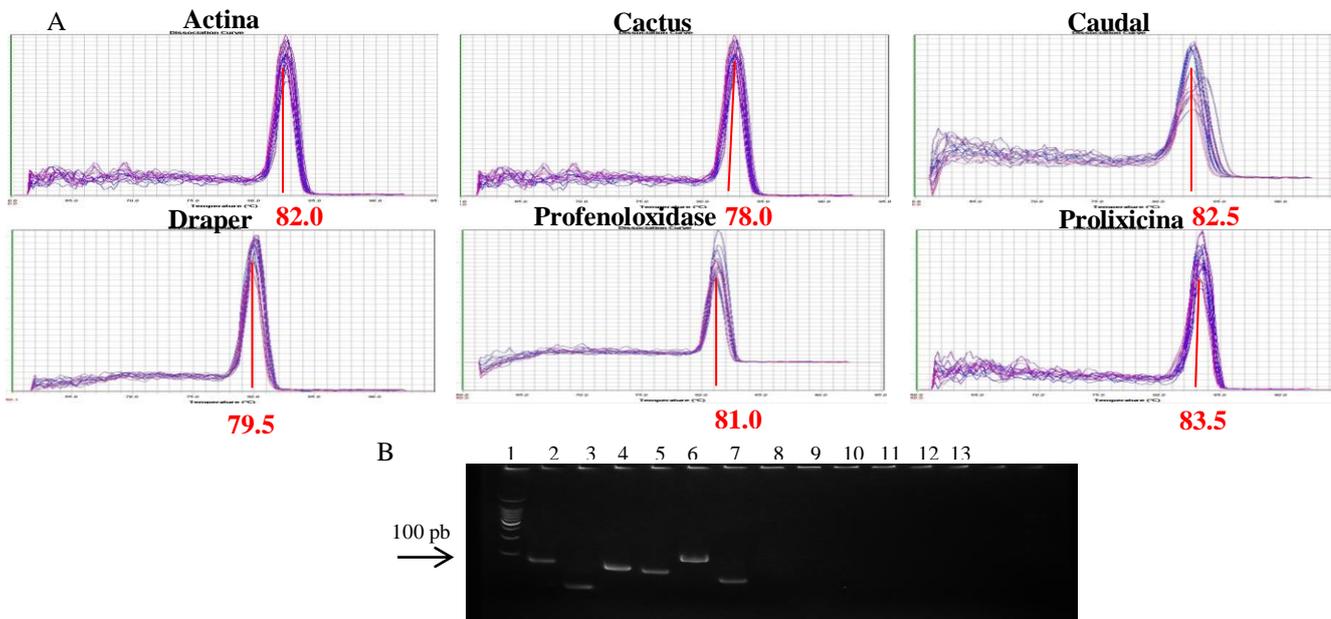


**Figura 28:** Microfotografias do intestino de *Rhodnius prolixus* infectado com *Trypanosoma cruzi* SC28 RFP e *Trypanosoma rangeli* Choachí GFP. A barra representa 10µm.

### 5.6 Análise da especificidade dos iniciadores dirigidos aos genes de imunidade de *Rhodnius prolixus*

A fim de avaliar a responsividade dos genes anteriormente citados frente a uma infecção pelo *T. cruzi*, *T. rangeli* e ainda em uma co-infecção, as amostras do tudo digestivo anterior e posterior foram submetidas a técnica de qPCR para avaliação da expressão relativa destes genes em cada um dos tratamentos empregados.

Os resultados obtidos na análise da curva de dissociação estão apresentados na figura 29. Com auxílio do software SDS v 2.4<sup>®</sup> (Applied Biosystems), foi observada a formação na curva de dissociação de pico único para todos os conjuntos de iniciadores utilizados, não originando dímeros de primers ou outros interferentes para a reação.



**Figura 29:** Análise de especificidade dos iniciadores desenhados para a amplificação dos genes relacionados a imunidade em *Rhodnius prolixus*. (A) Curva de dissociação dos genes: Actina (ACT), Cactus (CAC), Caudal (CAD), Draper (DRA), Profenoloxidase (PPO) e Prolixicina (PROL). (B) Gel de poliacrilamida 8% corado pelo brometo de etídio revelando os

## 108 RESULTADOS

produtos de amplificação dos iniciadores desenhados 1- Padrão de peso molecular 100 pb (Promega). 2 - PPO. 3- CAD. 4 - CAC. 5- ACT. 6 - PROL. 7 DRA. 8 a 13 – na mesma ordem os respectivos controles negativos das reações.

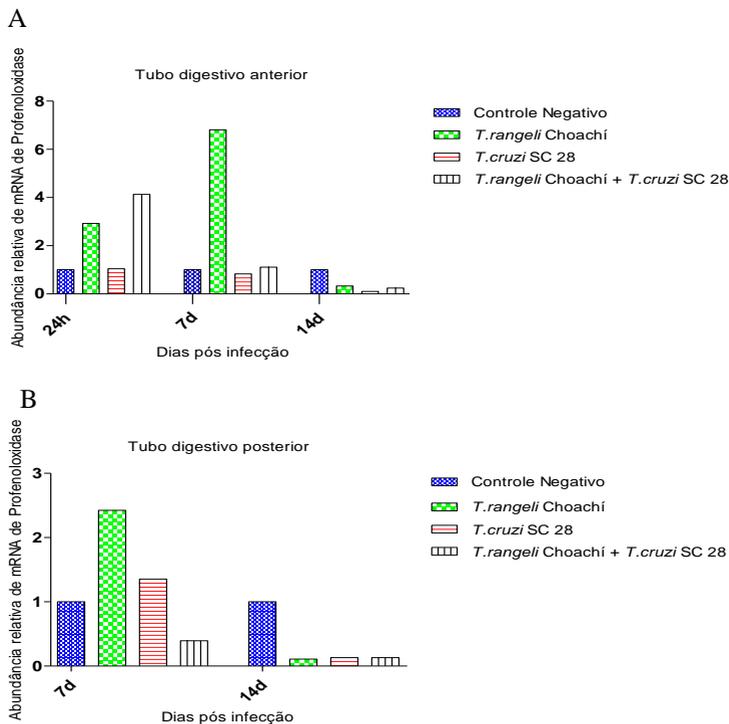
Conforme pode ser observado na figura 30 A, todos os iniciadores apresentaram temperaturas de dissociação diferentes, sendo: Actina 82 °C, Cactus 78 °C, Caudal 82,5 °C, Draper 79,5 °C, Profenoloxidase 81°C e Prolixicina 83°C, o que revela não haver nenhuma sobreposição entre os picos apresentados por cada par de iniciadores.

Os produtos de amplificação gerados com cada par de iniciador foram resolvidos por eletroforese em gel de poliacrilamida a 8% onde também pudemos observar a especificidade dos iniciadores (Figura 29 B).

### **5.6.1 Análise da expressão relativa de genes de imunidade de *R. prolixus* frente a infecção por *T. cruzi* e/ou *T. rangeli***

Salientamos inicialmente que os resultados apresentados abaixo são preliminares, correspondendo a um único ensaio sem replicata biológica ou técnica. Novos ensaios estão sendo realizados a fim de avaliar os resultados obtidos.

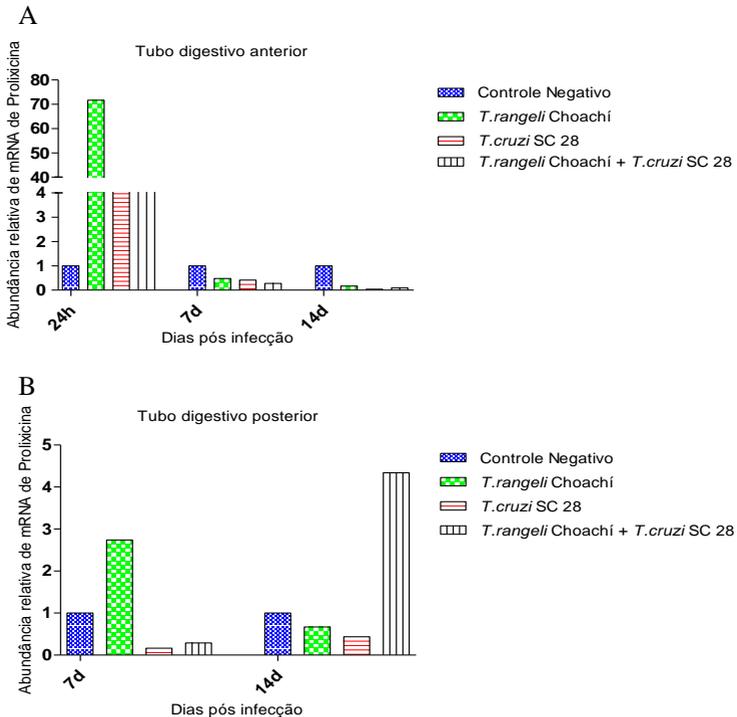
Dentre os genes avaliados foi analisada a expressão do gene Profenoloxidase (PPO) no tubo digestivo anterior e posterior do inseto vetor quando infectado ou não pelos parasitos mencionados anteriormente (Figura 30).



**Figura 30:** Abundância relativa do mRNA de Profenoloxidase (PPO) em *Rhodnius prolixus* infectados com *Trypanosoma rangeli*, e/ ou *Trypanosoma cruzi*. (A) Níveis relativos de mRNA de PPO no tubo digestivo anterior de um *pull* de cinco insetos após 24 h, sete e 14 pós alimentação artificial com mistura de sangue inativado e parasitos. (B), Níveis relativos de mRNA de PPO no tubo digestivo posterior sete e 14 após alimentação artificial com mistura de sangue inativado e parasitos.

Um aumento nos níveis de mRNA deste gene é observado principalmente para o grupo de insetos que havia sido infectado exclusivamente pelo *T. rangeli* nos tempos de 24 h e sete dias no intestino anterior, e também pelo grupo infectado com ambos os parasitos no tempo 24 h. Em relação ao tubo digestivo posterior, o grupo infectado exclusivamente pelo *T. rangeli* apresentou níveis de mRNA de PPO 2,5 vezes maiores que o controle.

Posteriormente observa-se que no tempo 14 dias pós infecção (dpi), o perfil de expressão muda consideravelmente, sendo possível observar que em todos os grupos infectados e nos dois tecidos coletados, os níveis de mRNA de PPO foram menores do que no controle não infectado (30 B).



**Figura 31:** Abundância relativa de mRNA do gene Prolixicina (PROL) em *Rhodnius prolixus* infectados com *Trypanosoma rangeli* e / ou *Trypanosoma cruzi*. (A) Níveis relativos de mRNA de PROL no tubo digestivo anterior de um pull de cinco insetos por grupo após 24h, sete e 14 dias após alimentação artificial com mistura de sangue inativado e parasitos. Em (B), Níveis relativos de mRNA de PROL no tubo digestivo posterior após sete e 14 dias após alimentação artificial com mistura de sangue inativado e parasitos.

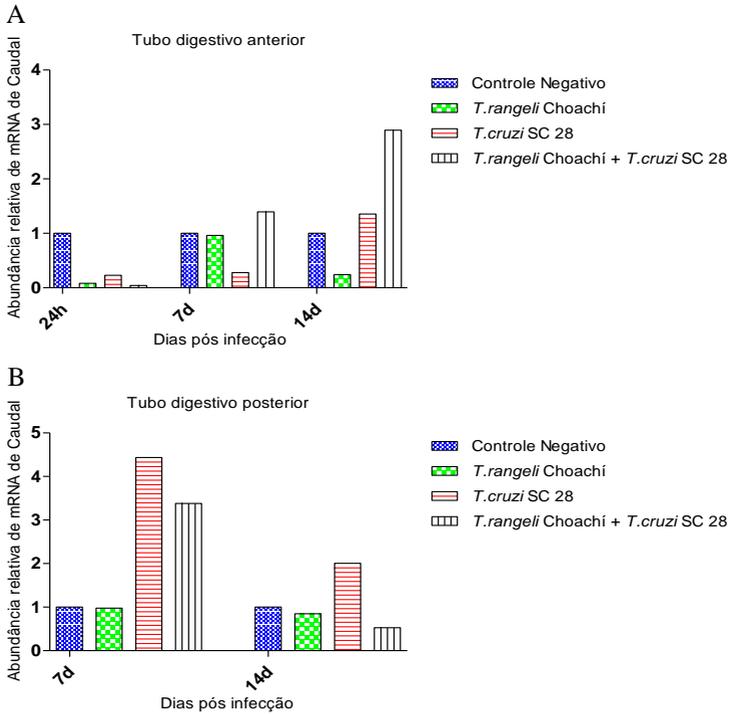
Em relação aos níveis de mRNA do gene Prolixicina (PROL) no tubo digestivo anterior houve um aumento de quase 70 vezes no

grupo infectado exclusivamente pelo *T. rangeli* em relação ao grupo controle (Figura 31 A). De maneira mais sutil, tivemos o aumento nos grupos infectados somente com *T. cruzi* e também no grupo da infecção mista. Porém, por mais pronunciado que tenha sido este aumento, ele ocorreu apenas no tempo 24 h, e posteriormente nos tempos sete e 14 dpi, observa-se uma diminuição do mRNA de Prolixicina, indicando uma provável supressão da transcrição gênica pela infecção pelos parasitos no tubo digestivo anterior do inseto.

Contrariamente ao observado nos tempos sete e 14 dpi no tubo digestivo anterior, onde todos os grupos haviam tido uma redução dos níveis de mRNA de PROL, o grupo infectado com o *T. rangeli* apresentou no tubo digestivo posterior um aumento de três vezes em relação ao controle no tempo de sete dias após a infecção (31 B). No tempo de 14 dpi somente o grupo correspondente à infecção mista também apresentou um aumento de cerca de quatro vezes a expressão relativa de PROL em relação aos outros grupos (31 B)

O gene Caudal (CAD) também foi estudado, e observamos que no intestino anterior dos triatomíneos infectados, logo após a infecção (24 h) todos os grupos tiveram uma transcrição diminuída deste gene, conforme o esperado (Figura 32 A). Posteriormente, no tempo de sete dias após a infecção tem-se um pequeno aumento no grupo co-infectado e uma diminuição da transcrição no grupo infectado pelo *T. cruzi*. No tempo 14 dpi, observa-se um aumento de duas vezes nos níveis de mRNA no grupo co-infectado. No tubo digestivo posterior foi observado um aumento no grupo infectado exclusivamente com *T. cruzi* e no grupo da co-infecção para o tempo sete dias enquanto no tempo 14 dpi, temos um aumento apenas para o *T. cruzi* novamente.

O *T. cruzi* por sua vez, parece ter ativado mais a via Imd, pois isso promoveu um aumento significativo nos níveis de transcritos no tempo 14 dpi do tubo digestivo anterior (32 A), e nos tempos sete e 14 dpi do tubo digestivo posterior para este grupo (32 B). Faz-se importante salientar que estes resultados correspondem a níveis de transcritos de cinco diferentes animais em cada grupo, não representando uma variação individual que permitisse uma análise estatística.

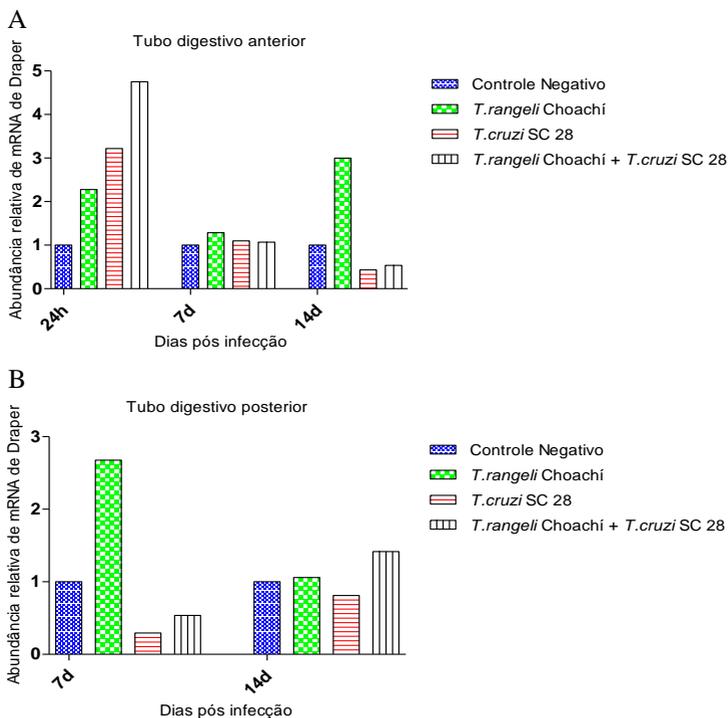


**Figura 32:** Abundância relativa de mRNA do gene CAUDAL (CAD) em *Rhodnius prolixus* infectados com *Trypanosoma rangeli* e / ou *Trypanosoma cruzi*. (A) Níveis relativos de mRNA de CAD no tubo digestivo anterior de um pull de cinco insetos por grupo após 24h , sete e 14 dias após alimentação artificial com mistura de sangue inativado e parasitos. Em (B), Níveis relativos de mRNA de CAD no tubo digestivo posterior após sete e 14 dias após o repasto infectivo com uma mistura de sangue inativado e parasitos.

Ainda que sejam escassas as informações na literatura sobre o gene Draper (DRA) no modelo de triatomíneos, foi possível observar em nosso estudo que no intestino anterior há um aumento da transcrição de DRA 24 horas pós-infecção em todos os grupos infectados (Figura 33). Diferentemente, quase cinco vezes mais mRNA de DRA é encontrado no grupo da co-infecção *T. cruzi*/*T. rangeli* em relação aos controles, o que pode ser devido a uma potencialização da resposta imune do inseto quando na presença simultânea das duas espécies. Ao analisarmos o tempo de 14 dpi observa-se um aumento na quantidade de

mRNA de DRA no grupo infectado exclusivamente com o *T. rangeli* (33 A) e o mesmo ocorre para o intestino posterior (33 B).

Outra observação é que existe uma sutil diminuição nos níveis de mRNA do grupo infectado exclusivamente com o *T. cruzi* no tempo 7 e 14 dpi no intestino anterior (33 A) e nos tempos sete e 14 dpi no intestino posterior (33B).

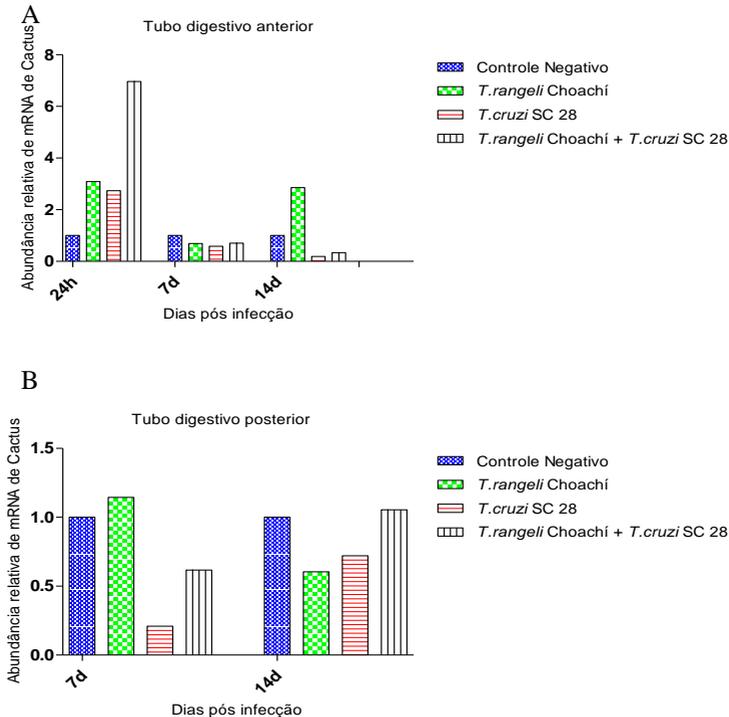


**Figura 33:** Abundância relativa de mRNA do gene DRAPER (DRA) em *Rhodnius prolixus* infectados com *Trypanosoma rangeli* e / ou *Trypanosoma cruzi*. (A) Níveis relativos de mRNA de DRA no tubo digestivo anterior de um pull de cinco insetos por grupo após 24h, sete e 14 dias após alimentação artificial com mistura de sangue inativado e parasitos. Em (B), níveis relativos de mRNA de DRAPER no tubo digestivo posterior após sete e 14 dias após alimentação artificial com mistura de sangue inativado e parasitos.

Na figura 34 (A) observa-se que no intestino anterior existe um aumento nos níveis de mRNA para Cactus (CAC) no grupo co-

infectado no tempo 24 h. Quando em co-infecção pode ser que estas duas espécies podem desencadear uma resposta imune mais intensa por parte triatomíneo, que não é tão acentuada nas infecções únicas por uma das espécies, embora ela também exista. No tempo 14 dias, existe um aumento apenas no grupo infectado pelo *T. rangeli*, enquanto os outros grupos apresentam uma diminuição da transcrição.

Em relação ao tubo digestivo posterior, aos sete dias pós-infecção observa-se uma diminuição considerável no nível de mRNA de CAC no grupo infectado exclusivamente pelo *T. cruzi*. Já nos insetos co-infectados por *T. cruzi* e *T. rangeli* esta diminuição não é tão marcante e poderia ser considerada um intermediário entre a resposta induzida unicamente pelo *T. cruzi* ou pelo *T. rangeli*, indicando uma provável modulação diferencial quando em co-infecção (34 B).



**Figura 34:** Abundância relativa de mRNA do gene CACTUS (CAC) em *Rhodnius prolixus* infectados com *Trypanosoma rangeli* e / ou *Trypanosoma cruzi*. (A) Níveis relativos de mRNA de CAC no tubo digestivo anterior de um

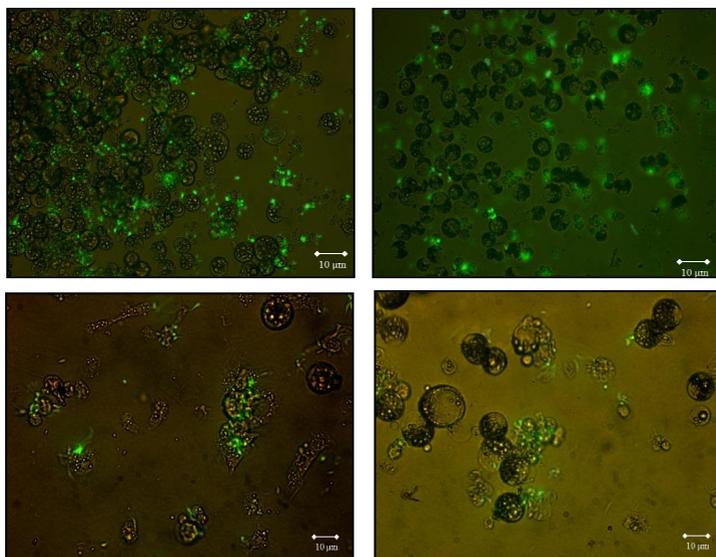
*pull* de cinco insetos por grupo após 24 h, sete e 14 dias após alimentação artificial com mistura de sangue inativado e parasitos. Em (B), níveis relativos de mRNA de CAC no tubo digestivo posterior após sete e 14 dias após alimentação artificial com mistura de sangue inativado e parasitos.

Neste ensaio preliminar, observamos que o sistema imunológico do inseto, mostrou-se mais responsivo frente a uma infecção pelo *T. rangeli* em relação aos níveis de mRNA totais dos genes aqui estudados.

### 5.7 Análise da infecção “ex vivo” de hemócitos de *R. prolixus* pelo *T. rangeli* Choachí GFP

Oportunizando a ferramenta criada e a fácil identificação que tínhamos do *T. rangeli* expressando a GFP, optou-se por realizar um ensaio ex vivo com hemócitos extraídos de *R. prolixus* para avaliar o comportamento do parasito com o tipo celular em questão.

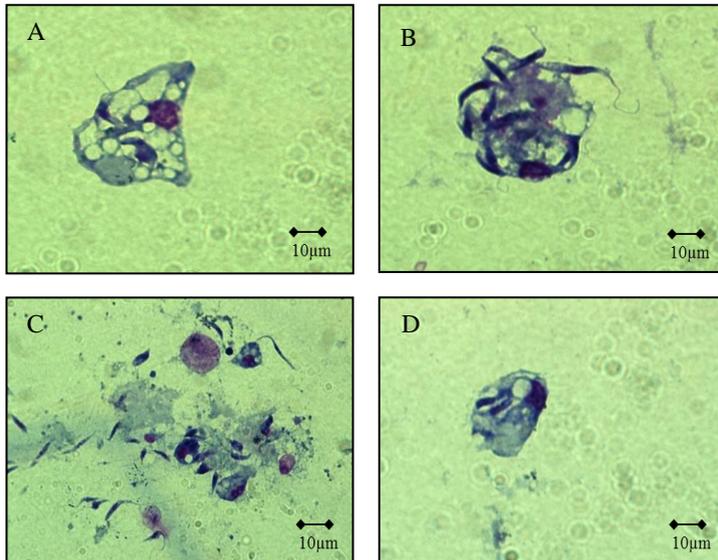
Observamos, tanto por microscopia de fluorescência quanto por microscopia de luz das lamínulas coradas por Giemsa, a presença de *T. rangeli* no interior de hemócitos de *R. prolixus* (Figuras 35 e 36).



**Figura 35:** Hemócitos de *Rhodnius prolixus* infectados com *Trypanosoma rangeli* Choachí GFP após 24 h de infecção. A barra corresponde a 10 µm.

Logo no início da infecção (tempo 0), a interação do parasito com os hemócitos era imediata e o processo de aderência do flagelo na membrana das células já era evidenciado. Em relação ao processo de internalização, do tempo 0 h até o tempo 24 h, a placa foi observada após 3, 6 e 9 h, não sendo visualizadas mudanças substanciais na interação parasito-célula e por isso optou-se que o primeiro tempo analisado seria de 24 h.

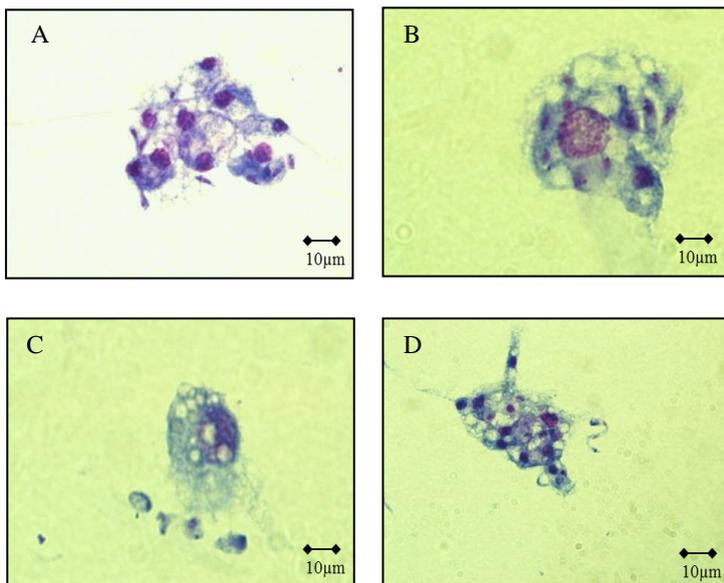
Após corar as lamínulas do tempo 24 h pelo método de Giemsa (Figura 36), podemos observar parasitos no interior das células, também aderidos e próximo a ela. Na figura 36 A, observa-se que as células infectadas pelo *T. rangeli* estão altamente vacuolizadas e com o citoplasma bastante distendido. Na figura 36 B é possível verificar também um agregado de parasitos ao que parece ser uma estrutura celular, demonstrando a interação do parasito com as estruturas existentes na hemolinfa do inseto, assim como em mais tipos celulares, como os Oenocitoides, plasmatócitos e pró-hemócitos (Figura 36 C) (OLIVEIRA; SOUZA, 2003).



**Figura 36:** Hemócitos de *Rhodnius prolixus* infectados pelo *Trypanosoma rangeli* Choachí GFP corados com Giemsa e observados em microscopia de campo claro. Em (A), (B), (C) e (D), tipos celulares encontrados na hemolinfa de *Rhodnius prolixus* após 24 h de infecção. A barra corresponde a 10 µm.

Após o tempo 48 h de infecção, novamente foi observada a existência de interação dos parasitos com as células (Figura 37). Na primeira e na quarta imagem podemos ver a agregação de hemócitos e várias formas epimastigotas do parasito, o que poderia indicar uma ativação do sistema celular do inseto em controlar a infecção

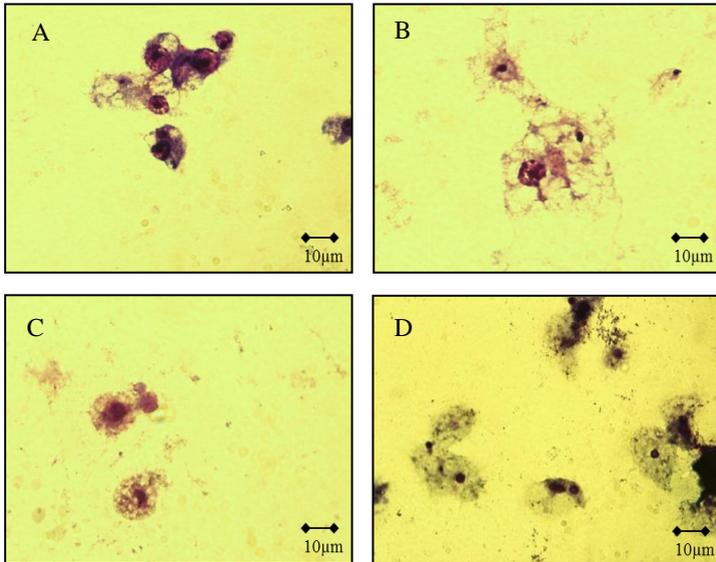
Na figura 37 C é possível visualizar estruturas de formato mais arredondado, porém nenhuma destas formas foi visualizada no interior dos hemócitos ou indica estar em processo de divisão.



**Figura 37:** Hemócitos de *Rhodnius prolixus* infectados pelo *Trypanosoma rangeli* Choachí GFP corados pelo método de Giemsa e observados em microscopia de campo claro. Em (A), (B), (C) e (D), tipos celulares encontrados na hemolinfa de *R. prolixus* após 48 h de infecção. A barra corresponde a 10µm.

No tempo de 120 h pós infecção não houve mais viabilidade celular dos hemócitos. Ao realizar a coloração com Giemsa (Figura 38), foi observado que o citoplasma destas células estava vacuolizado e a membrana estava rompida ou disforme em algumas circunstâncias de *R. prolixus* estava e até a presença dos parasitos foi de difícil detecção, não

sendo visualizada nenhuma estrutura íntegra o suficiente para afirmar se tratar do *T. rangeli*.



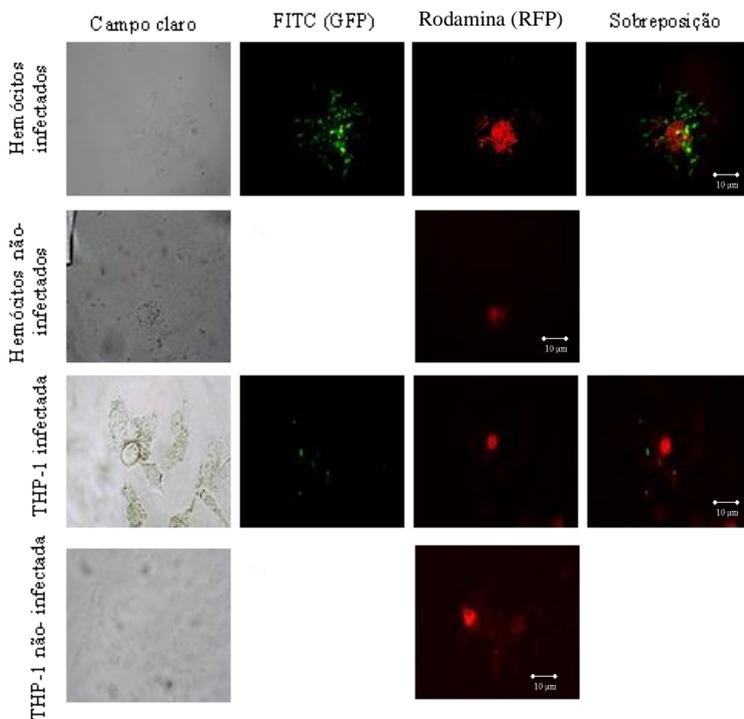
**Figura 38:** Hemócitos de *Rhodnius prolixus* infectados pelo *Trypanosoma rangeli* Choachí GFP corados pelo método de Giemsa e observados em microscopia de campo claro. Em (A), (B), (C) e (D), tipos celulares encontrados na hemolinfa de *R. prolixus* após 120 h de infecção. A barra corresponde a 10µm.

### 5.7.1 Análise do recrutamento lisossomal dos hemócitos de *Rhodnius prolixus* frente à infecção com *T.rangeli* Choachí GFP

Neste ensaio preliminar a marcação dos hemócitos de *R. prolixus* com Lysotracker<sup>®</sup> quando da interação *ex vivo* com o *T. rangeli* GFP revelou uma agregação de estruturas ácidas que co-localizavam com agregados de parasitos fluorescentes, indicando que possa estar havendo uma produção e recrutamento de estruturas lisossomais em resposta à presença do parasito (Figura 39).

## 120 RESULTADOS

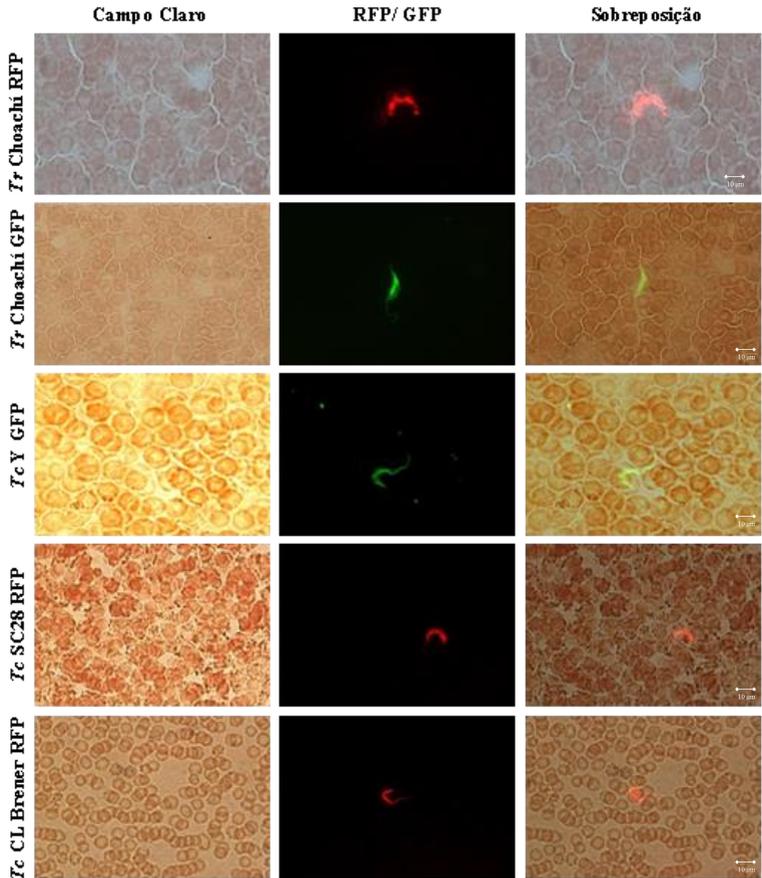
Mesmo considerando que não tenhamos uma clara associação da marcação (co-localização) do Lysotracker® com os parasitos fluorescentes e que se possa cogitar uma não especificidade do marcador neste tipo celular, não foi observada nenhuma marcação nos hemócitos não infectados. Corroborando este fato, sabe-se que este tipo de marcação pode ocorrer inclusive em decorrência do estresse ao qual a célula é submetida pelos processos de manipulação, cultivo e/ou diferenciação *in vitro* como o observado para as células THP-1 (Figura 39).



**Figura 39:** Ensaio de interação celular *ex vivo* entre hemócitos de *Rhodnius prolixus* com o *Trypanosoma rangeli* GFP e entre células THP-1 com o *T. cruzi* GFP corados pelo Lysotracker® para avaliação do envolvimento de lisossomos na resposta do triatomíneo ao parasito. A barra corresponde a 10µm.

### 5.8 Expressão das proteínas fluorescentes na forma tripomastigota sanguínea em camundongos Balb/C:

A análise da estabilidade das cepas transfectantes foi inicialmente avaliada através de infecção experimental de camundongos, tendo sido observadas formas tripomastigotas sanguíneas fluorescentes (Figura 40).



**Figura 40:** Formas tripomastigotas sanguíneas de *Trypanosoma cruzi* e *Trypanosoma rangeli* transfectadas com os plasmídeos pTREM-RFP-

Neo/Hygro, pTREXnGFP-Neo e pROCKGFP-Neo, em sangue de camundongo experimentalmente infectado.

Foram visualizados alguns parasitos não fluorescentes tanto para o *T. cruzi* cepa Y GFP, quanto para o *T. rangeli* RFP e GFP, o que pode se dar tanto por uma recombinação do próprio parasito no interior do hospedeiro, quanto por alguma falha no processo de clonagem por diluição limitante, que poderia ter a proteína momentaneamente não produzida.

Durante as passagens em animais, para o reisolamento das cepas utilizadas neste trabalho, também foi observado um evento similar, eram encontrados parasitos fluorescentes e não fluorescentes no sangue periférico dos animais, porém ao reisolar a cepa por hemocultura, observou-se um nível muito maior de parasitos fluorescentes.

Assim, a fluorescência se restabelecia em cultura e a proporção era mantida mesmo após diferenciação *in vitro* no caso do *T. rangeli* ou em infecção em células Vero/ L929 para o *T. cruzi*.

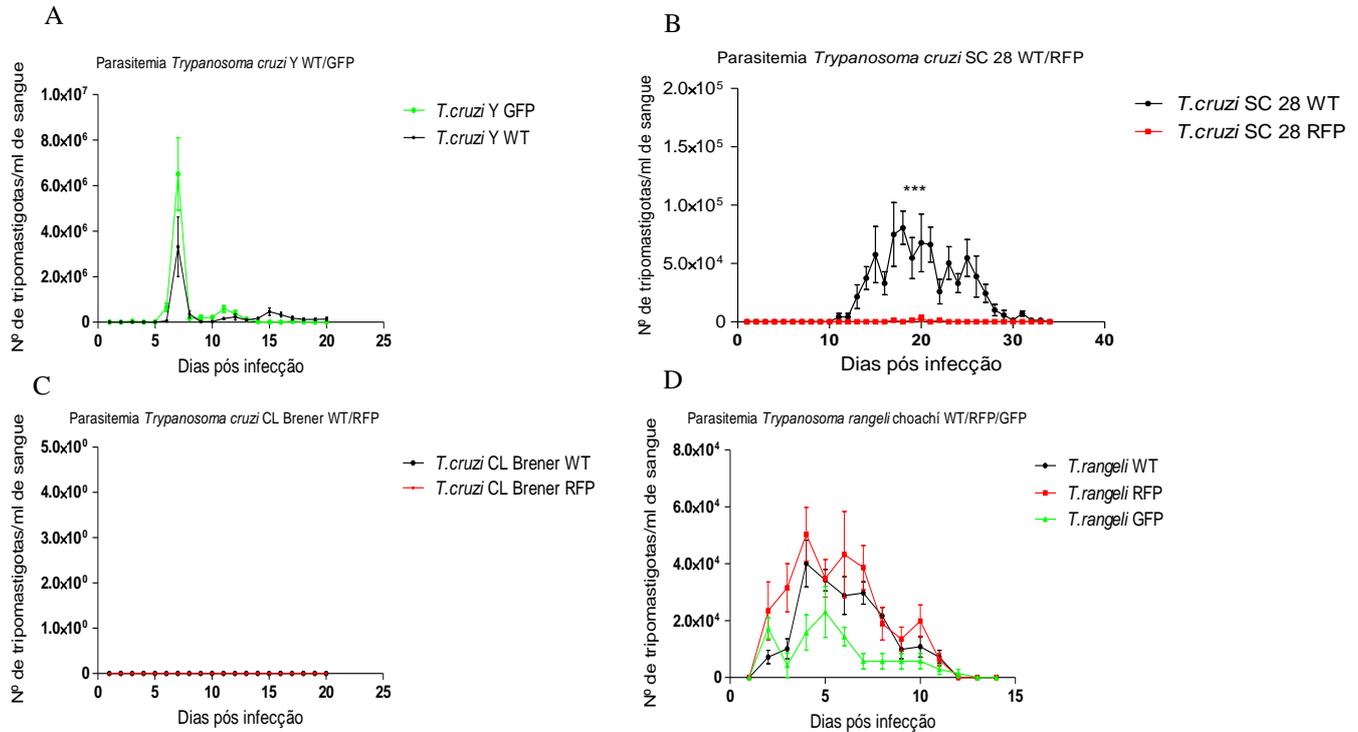
### **5.8.1 Perfil de parasitemia das cepas de *T. cruzi* e *T. rangeli* transfectadas em relação as suas respectivas parentais:**

Ao realizar o ensaio de infecção com as cepas mencionadas acima, foi observado primeiramente que o perfil de parasitemia foi muito semelhante para as cepas selvagens e transfectadas, indicando que para o *T. rangeli* Choachí RFP e para o *T. cruzi* Y GFP a manipulação gênica realizada pelo processo de transfecção e seleção, não parece causar alterações quanto à infectividade (Figuras 41 A e D).

Embora a cepa SC 28, tenha demonstrado uma taxa e tempo de duplicação muito semelhante a sua cepa parental nos ensaios de infecção em célula THP-1, ao observar o perfil de parasitemia de ambas, os padrões são bastante diferentes (Figura 41 B).

O clone CL Brener não produziu parasitemia patente através do inóculo de  $10^4$  formas tripomastigotas de cultura utilizadas neste trabalho (Figura 41 C).

Ao analisar comparativamente a parasitemia das cepas transfectadas e suas respectivas cepas parentais, a única espécie e cepa a demonstrar diferenças significativas foi *T. cruzi* cepa SC28 (\*\*\*)  $p < 0,0001$ ).

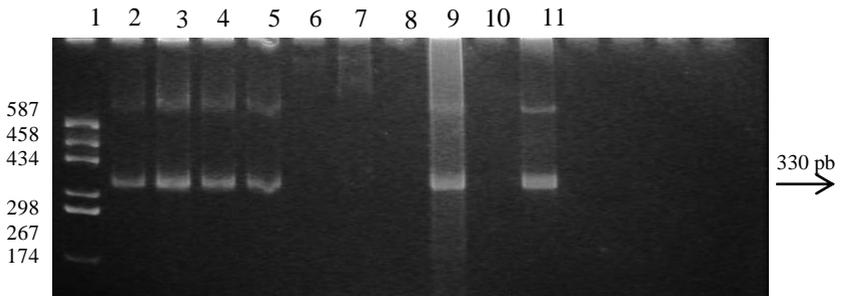


**Figura 41:** Curva de parasitemia das cepas de *Trypanosoma cruzi* e *Trypanosoma rangeli* transfectadas e selvagens. Em (A)

## 124 RESULTADOS

curva de parasitemia da cepa Y GFP e WT de *T. cruzi*. Em (B), a cepa SC 28 RFP e WT de *T. cruzi*. Em (C), a cepa CL Brener RFP e WT de *T. cruzi* e em (D), a cepa Choachí WT, RFP e GFP de *T. rangeli*. \*\*\*  $p < 0,0001$ .

Conforme indicado acima, a cepa CL Brener não apresentou parasitemia patente e devido a baixa parasitemia e dificuldade em recuperar a cepa em cultura, realizou-se um PCR com os iniciadores S35 (5'AAATAATGTACGGGTGGAGATGCATGA3') e S36 (5'GGGTTTCGATTGGGGTTGGTGT3') dirigidos a região dos mini círculos do kDNA de *T. cruzi* e de *T. rangeli* (VALLEJO *et al.*, 1999). Observa-se na figura 42 que todas as amostras correspondentes a cepa selvagem de *T. cruzi* CL Brener apresentaram-se positivas, enquanto que a cepa CL Brener RFP apresentou apenas um animal positivo na PCR.



**Figura 42:** Identificação de *Trypanosoma cruzi* em sangue de animais infectados com as cepas selvagem e transfectadas de CL Brener. Gel de poliacrilamida a 8%, corado com brometo de etídeo dos produtos de PCR dos iniciadores S35 e S36. 1) Padrão de baixo peso molecular (pUC 18 digerido com *HaeIII*. 2 -5) Camundongos infectados com CL Brener WT. 6-9) Camundongos infectados com CL Brener RFP. 10) Controle negativo e 11) Controle positivo.

### 5.9 Avaliação da parasitemia da co-infecção de *T. cruzi* GFP e *T. rangeli* RFP em camundongos Balb/C

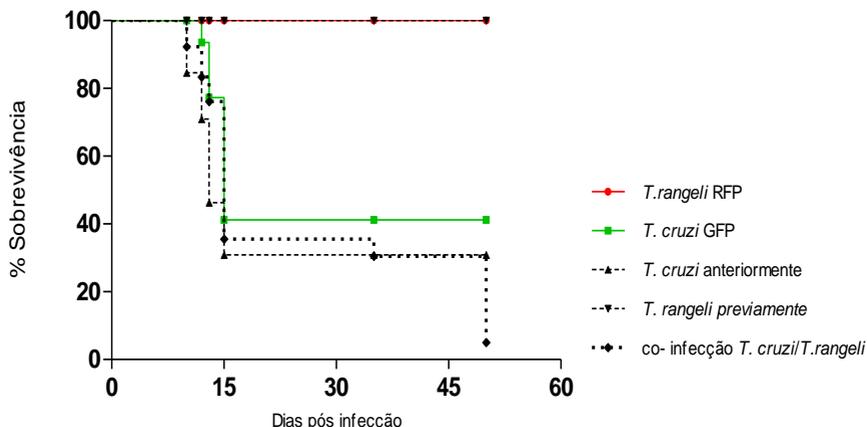
Ao analisar a figura 44 (A e B) observa-se os perfis normais das cepas isoladas e como já bastante caracterizado, cerca de 24 h após a infecção já eram observadas formas tripomastigotas no sangue dos animais infectados com *T. rangeli*, com um pico de parasitemia no 4º dpi. Embora os estudos ainda sejam bastante controversos em relação a uma provável proteção que o *T. rangeli* poderia promover a uma infecção com o *T. cruzi*, resultados observados neste trabalho, indicam que uma infecção prévia com o *T. rangeli* não parece inibir o estabelecimento de uma infecção subsequente pelo *T. cruzi*. Nesta situação foi constatada a presença de uma parasitemia menos acentuada

e um pico mais tardio para o *T. cruzi*, uma vez que ele costuma ocorrer no 7º dpi para a cepa utilizada e nos animais desafiados isso foi registrado no 8º dia pós infecção.

O *T. rangeli*, por sua vez também não apresentou grandes alterações quando em infecção em animais previamente infectados com *T. cruzi*. Já o *T. rangeli* apresentou parasitemia padrão de curta persistência (12 dpi), caracterizada por um baixo número de formas tripomastigotas sanguíneas e com o pico por volta do 4º dpi.

A infecção anterior pelo *T. rangeli*, embora não confira uma proteção propriamente dita, causou uma sobrevida maior nos animais em relação ao grupo infectado anteriormente com *T. cruzi*. A taxa de mortalidade dos animais desafiados com *T. cruzi* foi 0% enquanto para o grupo desafiado com o *T. rangeli* foi de 75%, em apenas 15 dpi (Figura 43).

A co-infecção apresentou valores de parasitemia mais baixos, porém a taxa de mortalidade dos animais se assemelhou a infecção isolada pelo *T. cruzi*, apresentando ao término de 45 dpi apenas 12,5% de sobrevivência dos animais. O único animal sobrevivente havia registrado uma parasitemia mais branda e foi o último do grupo a apresentar parasitos circulantes no sangue (11º dpi), o que sugere que sua sobrevida possa inclusive ser uma resistência particular apresentada por este animal (Figura 43).



**Figura 43:** Percentual de sobrevivência em camundongos Balb/C co-infectados com *Trypanosoma cruzi* Y e *Trypanosoma rangeli* Choachí

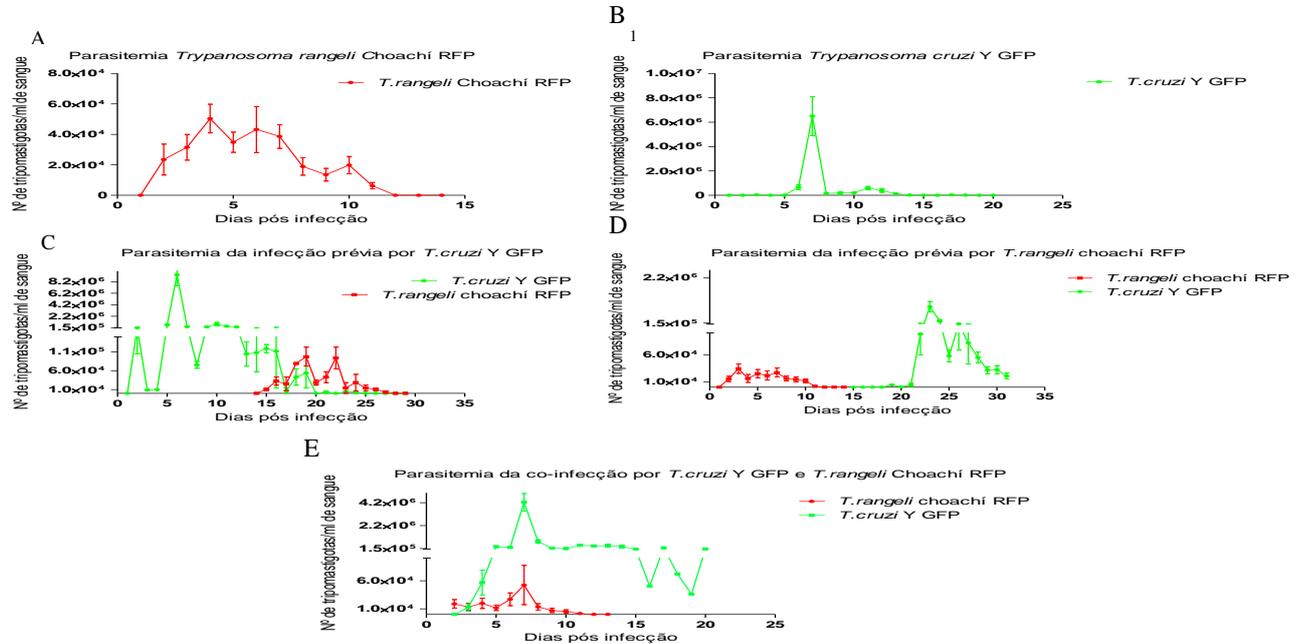
A infecção pelo *T. cruzi* isoladamente também se demonstrou bastante agressiva para os camundongos Balb/C, sendo que em apenas 15 dpi 50 % dos animais haviam morrido.

Pode-se observar na figura 43 que em geral as mortes aconteceram de maneira mais acentuada nos tempos iniciais, que representa o momento em que o parasito esta circulante no sangue, fase aguda da doença.

Posteriormente, os animais que conseguem passar por este período, tem a doença cronicada e conseguem sobreviver por mais tempo (Figura 43).

A co-infecção simultânea de *T. cruzi* e *T. rangeli*, não revelou grandes modificações no que diz respeito ao perfil de parasitemia das cepas utilizadas.

O que de mais notório ocorreu foi um atraso no pico da cepa Choachí de *T. rangeli* que costuma ocorrer em torno do 4º dpi e na infecção simultânea com o *T. cruzi* teve este padrão deslocado para o 7º dpi (44 E). O pico de parasitemia da cepa Y de *T. cruzi* que de fato ocorre em torno do 7º dpi também se caracterizou por um número menor de formas tripomastigotas sanguíneas em relação à infecção isolada, chegando a quase metade do número total



**Figura 44:** Parasitemia do animal infectado com *T. rangeli* Choachí RFP isoladamente. (B), Parasitemia do animal infectado com *T. cruzi* Y GFP isoladamente. (C) Parasitemia dos animais infectados com *T. cruzi* e desafiados com *T. rangeli* 15 dias após. (D) Parasitemia dos animais infectados com *T. rangeli* e desafiados com *T. cruzi* 15 dias após. (E) Parasitemia dos animais infectados simultaneamente com as duas espécies.

### **5.10 Avaliação das alterações histopatológicas da co-infecção de *T.cruzi* GFP e *T.rangeli* RFP em camundongos Balb/C**

Conforme descrito anteriormente, as análises histopatológicas estão em fase de processamento pelo no instituto VERTA de Curitiba, SC.

### **5.11 Quantificação absoluta da carga parasitária presente nas amostras dos tecidos**

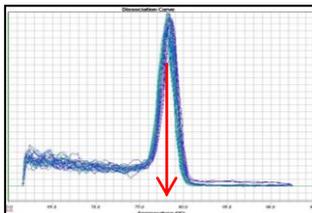
Com base nos genes das proteínas fluorescentes, foi realizada a padronização de uma qPCR para a quantificação absoluta de *T. cruzi* e *T. rangeli* nos tecidos dos animais infectados, com iniciadores GFP e RFP respectivamente.

Inicialmente realizamos um ensaio para determinar uma curva de quantificação absoluta com base em diluições conhecidas dos plasmídeos pTREXmRFP-Neo e pROCKGFP-Neo, utilizando-se de  $10^1$  até  $10^7$  cópias dos plasmídeos.

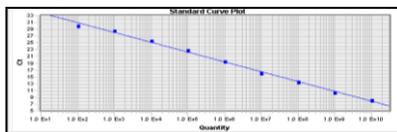
Após a qPCR, observou-se as curvas de dissociação que apresentaram um único pico e temperaturas de Melting distintas, sendo  $78,5^\circ\text{C}$  para o GFP e  $85,5^\circ\text{C}$  para o RFP. As curvas padrão para realizar a quantificação absoluta apresentaram razões bem próximas, sendo o  $R^2 = 0,995$  para GFP e  $0,994$  para RFP (Figura 45).

Os produtos de amplificação dos genes GFP e RFP também foram resolvidos em gel de poliacrilamida 8 %, indicando a amplificação de um único produto conforme pode ser observado na figura 45 C.

A Curva de dissociação GFP

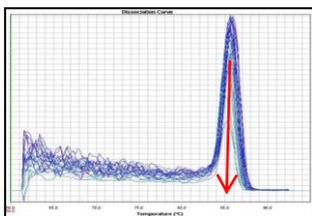


$R^2 : 0,995$

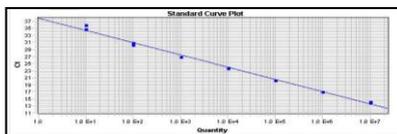


78,5

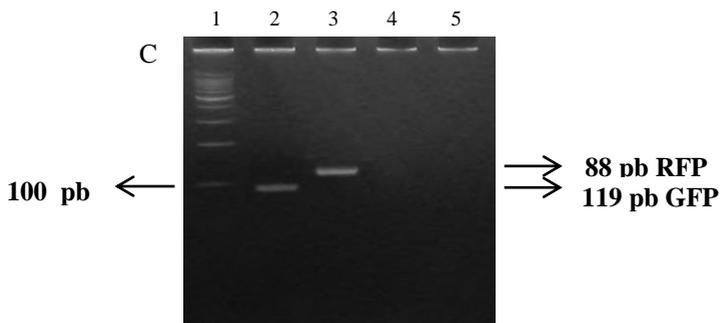
B Curva de dissociação RFP



$R^2 : 0,994$



85,5



**Figura 45:** Padronização de qPCR para quantificação dos genes RFP e GFP. Em A, curva de dissociação do iniciador GFP e curva padrão para quantificação absoluta com  $R^2 : 0,995$  e em B, curva de dissociação do iniciador RFP e curva padrão para quantificação absoluta com  $R^2 : 0,994$ . Em C Gel de poliacrilamida 8 % corado em Brometo de Etídeo. 1 – Padrão de peso molecular 100 pb. 2 – GFP 3- RFP. 4- Controle negativo GFP. 5 – Controle negativo RFP.

## 5. DISCUSSÃO

Desde a descoberta do *Trypanosoma cruzi* em 1909 pelo pesquisador Carlos Chagas, muito se tem avançado no que diz respeito às características moleculares e bioquímicas do parasito, além de técnicas cada vez mais sensíveis para o diagnóstico da doença, que incluem técnicas de biologia molecular com a capacidade de detectar quantidades muito baixas de DNA do parasito ou ainda antígenos oriundos de sua interação com o hospedeiro.

Entretanto as descobertas biológicas e a própria interação do parasito com seus vetores e hospedeiros ainda apresenta pontos críticos incompreensíveis até hoje, o que pode ser atribuído principalmente pela diversidade genética e características particulares apresentadas pelos tripanosomatídeos de um modo geral (MACEDO; PENA 1998).

Em relação ao *Trypanosoma rangeli*, descoberto há quase 100 anos por Enrique Tejera (1920), as dúvidas são ainda mais primordiais, sendo que até hoje não se sabe o curso da infecção deste parasito uma vez que se encontra no interior do hospedeiro mamífero.

Sabe-se menos ainda o que ocorre quando estas espécies, de ocorrência simpátrica e que compartilham os mesmos vetores e hospedeiros, estão em coabitação *in vitro* e/ou *in vivo*.

Considerando-se a semelhança morfológica entre os dois parasitos e a necessidade de se trabalhar com as duas espécies conjuntamente a fim de avaliar a influência de uma sobre a outra, fez-se necessário a geração de ferramentas moleculares que promovessem a fácil identificação do parasito em co-cultivo axênico, em co-infecção com linhagens celulares e também no interior do inseto vetor e do hospedeiro mamífero.

Frente a isso, com o auxílio de técnicas moleculares originou-se linhagens transfectantes de *T. cruzi* e *T. rangeli* que expressam genes de proteínas fluorescentes (GFP/RFP) como marcadores que facilitam a localização destas espécies.

Diversas pesquisas realizadas nos últimos tempos têm demonstrado a expressão de genes exógenos em organismos tripanosomatídeos, como o próprio *T. cruzi* (PIRES *et al.*, 2008) e também parasitos do gênero *Leishmania* (CALVO-ÁLVAREZ *et al.* 2014). Estas ferramentas tem-se mostrado úteis para elucidação de questões relacionadas à troca gênica ou ainda com a inserção de genes úteis para detecção da viabilidade do parasito frente a tratamentos com drogas, como é o caso de *T. cruzi* expressando o gene da  $\beta$ -galactosidase (BUCKNER *et al.*, 1996).

Este processo de transfecção dos parasitos pode ocorrer basicamente de duas formas: i) o DNA recombinante pode ser inserido no genoma total do parasito via recombinação homóloga, ou ii) pode permanecer de forma episomal em seu citoplasma. Porém esta segunda opção apresenta algumas limitações, pois o DNA exógeno pode ser eliminado pelo parasito, sendo que este normalmente permanece intracelular através da presença de algum antibiótico colocado constantemente no meio de cultura dos parasitos, para o qual o plasmídeo apresenta o gene de resistência.

Nesta situação onde se fazia necessário que a expressão do gene ocorresse de forma estável e sem a presença do antibiótico devido principalmente aos ensaios “*in vivo*”, utilizou-se os plasmídeos linearizados, para que as extremidades upstream e downstream fossem liberadas e pudessem por recombinação homóloga integrar no genoma total dos parasitos, assim os vetores: pTREX<sub>m</sub>RFP-Neo, pTREX<sub>n</sub>GFP-Neo, amplamente utilizados para transfecções com *T. cruzi* (GUEVARA *et al.*, 2005; LORENZI *et al.*, 2003; VAZQUEZ; LEVIN, 1999) e também o vetor pROCKGFP-Neo (DAROCHA *et al.*, 2004), sendo o gene GFP, obtido do vetor pTCRGFPNeo (TEIXEIRA *et al.*, 1999) foram empregados neste processo.

Foi evidenciado que o *T. rangeli* apresenta uma sensibilidade diferencial ao antibiótico G418, utilizado para a seleção dos parasitos após a eletroporação, sendo que a cepa Choachí GFP/RFP não necessitou de concentrações superiores a 100 µg/ml para que a população fluorescente fosse selecionada. Enquanto para as cepas de *T. cruzi*, as concentrações foram cinco vezes superiores.

Durante os ensaios de microscopia de fluorescência foi observado que as cepas Choachí GFP/RFP de *T. rangeli* demonstravam uma expressão mais intensa da proteína fluorescente em relação ao que era visto ao analisar as cepas de *T. cruzi*, o que poderia ser um indicativo de um maior número de cópias do DNA plasmidial no *T. rangeli* em relação ao *T. cruzi*. Os primeiros resultados de PFGE com as cepas CL Brener de *T. cruzi* e Choachí de *T. rangeli* demonstraram a hibridização de uma banda cromossomal para o gene da Higromicina (*T. cruzi*) e três bandas para o gene da Neomicina (*T. rangeli*). Faz-se necessário aguardar os demais resultados a fim de comprovar se de fato o *T. rangeli* é mais permissivo a entrada de cópias em seu DNA ou no próprio citoplasma em relação ao *T. cruzi* para este gene, dentre as cepas aqui estudadas. Porém cabe salientar que se trata de uma especulação, uma vez que não existe um total controle do número de inserções.

Conforme citado anteriormente ao realizar a transfecção da cepa Y com o plasmídeo pTREXnGFP não obtivemos sucesso, onde mesmo com concentrações crescentes da droga o parasito parou de expressar o gene da proteína fluorescente, porém mostrou-se resistente frente a presença do antibiótico.

Estudo realizado por Regis da Silva e colaboradores (2006) indicam a existência de uma proteína conhecida como *TcRAD51* que poderia estar associada com estes eventos de reparo. Embora não se saiba como é a expressão desta proteína por diferentes cepas de *T. cruzi*, é provável que a cepa Y apresente uma taxa maior desta recombinase fazendo com que sua manipulação se torne mais dificultada em relação às outras cepas utilizadas no presente estudo.

Foi evidenciado também que mesmo após a clonagem, a cepa SC 28 RFP de *T. cruzi* tinha uma população inferior a 5% que foi reconhecida como fluorescente pelo citômetro de fluxo, embora durante a microscopia de fluorescência os parasitos eram observados expressando o gene da RFP. Neste ponto tem-se um fenômeno qual não temos como explicar neste momento com base nos resultados que possuímos.

Após o processo de transfecção, seleção e clonagem, foi realizada a curva de crescimento de todas as linhagens transfectadas e pode-se concluir que a manipulação gênica realizada através da integração do DNA plasmidial no genoma dos parasitos transfectados não incorreu em alterações de seus perfis de crescimento axênico *in vitro*.

Após a geração de todas as linhagens transfectantes de *T. cruzi* GFP/ RFP e *T. rangeli* GFP/ RFP e comprovada a estabilidade da expressão da proteína fluorescente, tínhamos um conjunto de ferramentas que possibilitava os estudos de interação *T. cruzi* e *T. rangeli* em qualquer ambiente em coabitação.

Cabe ressaltar que o *T. cruzi* e o *T. rangeli* são organismos digenéticos e como tal apresentam formas biológicas e constituições proteicas diferentes em cada forma do seu ciclo de vida. Tendo em vista esta informação, o fato de termos criado parasitos que expressão de maneira estável a proteína fluorescente em um percentual superior a 90 % em todas as transfecções, excetuando a cepa SC 28, faz com que tenhamos uma importante ferramenta que poderá ser amplamente utilizada em outros estudos no laboratório.

Inicialmente observamos o comportamento destas duas espécies quando em co-cultivo em meio axênico. Constatou-se que em todas as proporções e combinações de cepas de *T. rangeli* e *T. cruzi*, foi notório

que o *T. cruzi* apresenta um crescimento muito mais expressivo e uma resiliência muito maior em meio de cultura. Isto é caracterizado por uma concentração maior de *T. cruzi* por ml de cultura após 11 dias de crescimento, mesmo quando maiores concentrações iniciais de *T. rangeli* são utilizadas. Além disso, o *T. cruzi* apresenta um declínio de forma mais branda após a fase logarítmica de crescimento, demonstrando uma melhor capacidade deste parasito, em relação ao *T. Rangeli*, em responder a situações de estresse nutricional.

Ao comparar os resultados de citometria de fluxo com as contagens em câmara de Neubauer, foi constatado que as alterações de proporção eram menos pronunciadas em relação a esta primeira metodologia. O que poderia ser resultado da capacidade que o aparelho tem em detectar a fluorescência e não a viabilidade do parasito, particularmente no modo como este ensaio foi realizado, contabilizando um evento que não esta viável, porém que expressa a proteína fluorescente.

Constatamos ainda que mesmo se tratando da mesma espécie, as diferentes cepas de *T. cruzi* apresentaram cinéticas de crescimento diferentes, sendo algumas mais próximas ao *T. rangeli* como no caso da cepa SC 28 e Y, ou ainda aquelas que apresentam quase o dobro da densidade do *T. rangeli*, como é o caso da cepa CL Brener. Analisou-se que apenas o cultivo isolado destas espécies em meio axênico não gerou grandes alterações na dinâmica de crescimento de um parasito em detrimento ao outro, pois os tempos de pico e declínio foram semelhantes aos encontrados nos crescimentos isolados.

No ensaio de co-infecção em células THP-1, foi de nosso interesse estudar se as duas espécies poderiam interferir no potencial infectivo de uma sobre a outra e ainda se uma mesma célula poderia ser infectada pelo *T. cruzi* e pelo *T. rangeli*.

Conforme foi registrado por microscopia de fluorescência este evento ocorreu com todas as combinações de *T. cruzi* e *T. rangeli* utilizadas neste estudo, embora a co-infecção tenha se configurado como um evento raro, ocorrendo entre 2 a 5 % dos casos dependendo do tempo de interação analisado. O que pode ser devido a capacidade fagocítica da linhagem celular utilizada, pela infectividade das cepas de *T. cruzi* usadas neste trabalho, bem como o MOI diferenciado utilizado entre as duas espécies, sendo superior para o *T. rangeli*. Em outro trabalho realizado com diferentes cepas de *T. cruzi* fluorescentes, os autores apontaram apenas cerca de 1% de células co-infectadas (PIRES *et al.*, 2008), ou seja apontando a co-infecção como um evento raro inclusive quando observado com uma única espécie.

Observamos ainda que existe uma alteração no percentual infectivo do *T. cruzi* e do *T. rangeli* quando em co-infecção, onde este primeiro apresentou um percentual menor de células infectas quando em contato com o *T. rangeli* em comparação com as infecções isoladas. Isto ocorreu para todas as cepas de *T. cruzi*.

Através destes resultados, observamos uma interferência no percentual de infecção do *T. cruzi*, quando em co-infecção com o *T. rangeli*. Esta alteração pode estar relacionada a algum mecanismo da própria célula, uma vez que um MOI muito superior do *T. rangeli* poderia alterar o meio, a própria maquinaria celular e o estresse qual ela é submetida ao tentar eliminar este parasito, causando alterações substanciais na célula e o impedimento da internalização do *T. cruzi*.

Foram vistas diferenças também no número total de amastigotas entre todas as cepas de *T. cruzi* ao compararmos a cepa transfectada e sua respectiva parental, sendo uma diferença ainda mais expressiva para a cepa SC 28 RFP, que em todos os tempos de interação apresentou um comportamento diferente de sua cepa parental. Em virtude da não existência da cepa transfectada anterior ao processo de clonagem, não é possível definir se a baixa infectividade de *T. cruzi* SC28 RFP ocorreu devido à seleção de um clone com infectividade baixa ou se a transfecção ocasionou em mudanças no fenótipo e/ou genótipo do parasito que interfira neste aspecto. Diversos são os trabalhos inclusive que trabalham com o estudo de clones não infectivos de *T. cruzi* oriundos de cepas infectivas, justamente pela característica multiclonal advinda da biologia deste parasito (MACEDO; PENA, 1998).

Curiosamente, ao calcular as taxas de multiplicação e os tempos de duplicação os valores eram muito próximos das cepas transfectadas em comparação a sua parental. Isto evidencia que após a internalização do parasito na célula, a expressão da proteína fluorescente não interfere em seu comportamento biológico.

Estudos anteriormente realizados por Toma *et al.* (2000) com as cepas SC 28, CL e Y de *T. cruzi* em diferentes linhagens celulares (Vero, L929 e Macrófagos Murinos), apresentam dados discordantes com os apresentados na tabela 2 deste trabalho. Naquele estudo baseado unicamente em microscopia de luz de lâminas coradas pelo método de Giemsa os tempos de duplicação são menores para as cepas Y e CL e maior para a cepa SC28. Cabe também salientar que neste trabalho foi utilizado o clone CL Brener, proveniente da cepa CL e que as linhagens celulares utilizadas diferem da THP-1 que é uma célula de linhagem humana, ao contrário do macrófago Murino utilizado por Toma *et al.* (2000).

Em relação ao *T. rangeli* tem-se um valor maior no percentual de células infectadas nas co-infecções com o *T. cruzi* em relação às infecções isoladas, porém isto pode ocorrer principalmente em relação à técnica empregada, pois todas as infecções isoladas neste trabalho foram submetidas à coloração de Giemsa, enquanto que as infecções mistas eram submetidas a microscopia de fluorescência, e o uso de parasitos fluorescentes apresentou uma melhora substancial no processo de observação desta interação uma vez que permite a clara visualização dos parasitos aderidos e/ou intracelulares, o que não é tão sensível quando se utiliza unicamente a coloração pelo método de Giemsa.

Este ensaio também foi importante para comprovarmos a estabilidade da proteína fluorescente na forma amastigota e, além disso, também se observou que todas as vezes que o parasito estava na forma amastigota a expressão da fluorescência ocorria de forma mais intensa. Estudo realizado por Teixeira *et al.* (1995) relacionam que quando a integração do gene GFP ocorre no *loco* do gene TCR27 pode haver uma superexpressão dele nas formas amastigotas, pois na construção do plasmídeo, existe fragmentos da região 3' e 5' UTR do gene de amastina, fazendo com que essas sequências levem a uma maior estabilidade do mRNA na forma amastigota de *T. cruzi* (TEIXEIRA *et al.*, 1995), corroborando com os dados encontrados.

Finalizado os experimentos *in vitro*, fazia-se necessário confirmar não só a estabilidade da ferramenta criada para os estudos *in vivo*, como também a interação destas duas espécies em nível de vetores e hospedeiros.

Um dos objetivos iniciais do presente estudo era acompanhar o ciclo completo do *T. cruzi* e do *T. rangeli* no hospedeiro invertebrado, utilizando para tal os parasitos transfectados. Entretanto, o tempo requerido para a geração e caracterização dos parasitos transfectados aliado a não infectividade completa do *T. rangeli* transfectado para *R. prolixus* impediram o desenvolvimento completo do estudo. Esta impossibilidade pode ser possivelmente devida i) ao prolongado cultivo axênico *in vitro* das cepas transfectadas e/ou ii) à alterações biológicas resultantes ou ocasionadas pelas manipulações genéticas realizadas ou ainda o processo de seleção clonal, as quais não foram analisadas.

Assim optou-se por realizar um estudo com a cepa SC 28 parental de *T. cruzi*, sendo de uma DTU Tc I, comumente associada ao ciclo de transmissão vetorial, e a cepa Choachí Selvagem de *T. rangeli*. Nesta situação foi avaliada a transcrição de genes relacionados à imunidade do inseto, dentre os seis genes utilizados (Cactus, Draper, Caudal, Prolixicina, Profenoxidase e Actina como gene referência),

pode se afirmar que de um modo geral o triatomíneo é muito mais responsivo as infecções isoladas pelo *T. rangeli* do que nas infecções pelo *T. cruzi* ou ainda nas infecções mistas.

O *T. rangeli* mostrou-se mais imunogênico que o *T. cruzi*, o que pode ser uma consequência da capacidade invasiva que este parasito tem, por exemplo, em ultrapassar os epitélios intestinais e da glândula salivar, enquanto o *T. cruzi* fica restrito ao trato intestinal.

É sabido que durante a ecdise, tem-se o momento cujo inseto esta mais suscetível a infecções por perder a primeira proteção natural, o seu exoesqueleto de quitina. Altos níveis desta enzima também foi identificado em seu intestino anterior. A Fenoloxidase apresenta uma importante ação contra bactérias Gram-negativas, como por exemplo, *E. coli* (URSIC-BEDOYA *et al.* 2011; VIEIRA *et al.*, 2014).

Castro *et al.* (2012) relataram um aumento da atividade da Fenoloxidase em *R. prolixus* experimentalmente infectados com a cepa Dm28c de *T. cruzi*, porém nas condições realizadas o parasito parece ser refratário à este aumento, conseguindo completar o seu desenvolvimento. Este trabalho ainda sugere que esta enzima não inibe o crescimento do parasito, porém pode causar a morte de algumas bactérias que poderiam causar a lise do parasito ou ainda competir com ele no interior no inseto vetor, assim o aumento deste gene registrado no ensaio preliminar, corresponde a uma importante modulação que o parasito, em especial o *T. rangeli* causa no inseto vetor, podendo ser crucial para o seu estabelecimento.

No presente estudo foi observado um aumento maior nos níveis de mRNA totais nos insetos que haviam sido infectados exclusivamente pelo *T. rangeli*, em relação aos outros grupos experimentais traçados. O que pode surgir em decorrência da capacidade invasiva que o *T. rangeli* apresenta em comparação com o *T. cruzi*.

Em relação ao gene da Prolixicina foi observamos o aumento mais significativo, de quase 70 vezes em relação ao controle, para o grupo infectado exclusivamente com o *T. rangeli* no tempo 24 dpi, indicando uma resposta rápida e elevada deste peptídeo antimicrobiano sobre o *T. rangeli*. Estudo realizado por Ursic-Bedoya *et al.* (2011), relatam que a quantidade de Prolixicina no intestino não é o suficiente para eliminar uma infecção pelo *T. cruzi* e que esta ineficiência poderia ser causada por proteases existentes neste ambiente, porém mesmo sem a eliminação do parasito, o peptídeo se mostra responsivo frente a uma infecção pelo *T. cruzi*, neste trabalho sendo mais pronunciado no tempo 24h após o repasto infectivo.

Vieira e colaboradores (2015) ao avaliar a expressão de Prolixicina no tubo digestivo anterior e posterior de *R. prolixus* experimentalmente infectados com *T. rangeli* cepa Macias demonstraram que a expressão de Prolixicina é constitutivamente baixa, tanto no tempo de um dia quanto no tempo sete dias após o repasto infectivo, o que discorda dos resultados encontrados neste trabalho. Entretanto, serão necessários novos ensaios para comprovar se a Prolixicina elevada foi uma resposta diferencial a cepa utilizada, ou a condições particulares dos insetos utilizados neste experimento.

Em relação ao gene Caudal (CAD), sabe-se que ele é um regulador negativo de transcrição, encontrado e descrito no epitélio intestinal de *D. melanogaster*, sendo importante para a manutenção da homeostase tecidual por prevenir a ativação da via Imd e assim evitar responsividade excessiva contra determinados microorganismos. Isto acontece, pois o sistema imunológico sempre “super ativo”, pode fazer com o que inseto desenvolva um quadro “inflamatório-like” e assim deixa-lo mais suscetível a outras infecções (MYLLIMAKI *et al.*, 2014), além de causar um alto custo energético, reduzindo o fitness biológico do inseto. Devido ao seu papel, o esperado é que frente a uma infecção ele seja menos expresso para que o sistema imunológico do inseto possa responder com uma maior facilidade a presença do parasito.

A comparação dos resultados obtidos sugere que a infecção pelo *T. cruzi* induz discreto aumento no nível de transcritos de CAD em *R. prolixus* do que a infecção pelo *T. rangeli*, onde os números são muito próximos ou menores aos apresentados pelo controle negativo. Estes resultados são condizentes se consideradas as mudanças fisiológicas que o *T. rangeli* é capaz de gerar no triatomíneo infectado (RATCLIFFE; ROWLEY, 1979; VIEIRA *et al.*, 2015; MELLO *et al.*, 1994), onde poderia se esperar uma redução da expressão de CAD no tubo digestivo anterior e posterior, como uma forma do inseto responder frente a infecção sofrida.

Outro gene analisado foi Draper (DRA), pertencente à família Nimrod que em *D. melanogaster*, possui três membros: *Draper*, *nimC1* e *eater*. Este gene já foi igualmente descrito em outros organismos, porém sua função só está bem elucidada em *D. melanogaster*, onde é um gene expresso na glia, nos hemócitos e também em outros tecidos. Além disso, DRA é principalmente expresso na fase de desenvolvimento do inseto por estar relacionado com a fagocitose de células apoptóticas que surgem neste período, assim como em resposta frente à infecções bacterianas (ESTÉVEZ-LAU; HILLYER, 2013; HASHIMOTO *et al.*, 2009).

Estudos realizados com *D. melanogaster* e *Anopheles gambiae* (ESTÉVEZ-LAU; HILLYER, 2013; HASHIMOTO *et al.*, 2008) relatam a importância do produto de expressão deste gene no combate à infecção por patógenos, inclusive neste segundo modelo, sendo importante no combate contra o próprio *Plasmodium*. Entretanto, no caso da infecção por *T. cruzi* o próprio parasito parece inibir esta resposta de uma forma mais efetiva que o *T. rangeli*.

O último gene estudado a fim de avaliar a resposta do triatomíneo foi o gene Cactus (CAC), que apresenta homologia com o gene I $\kappa$ B de mamíferos, que quando degradado promove a ativação de determinadas citocinas, como por exemplo Interleucina 1 e o TNF -  $\alpha$ . O CAC é um importante inibidor dos fatores de transcrição DIF/Dorsal ou Rel. Este fator sofre translocação e assim promove a modulação da imunidade da via Toll, uma proteína transmembrana responsável pelo reconhecimento de fungos e bactérias gram-positivas. Sem esta sinalização inicial vinda através da cascata de protease extracelular, bem como a ativação de Toll, não haveria a secreção de determinados peptídeos antimicrobianos na hemolinfa do inseto (LEMAITRE; HOFFMANN, 2007; TSAKAS; MARMARAS, 2010). Sem esta cascata de eventos, as reações intracelulares não seriam capazes de induzir a produção de peptídeos antibacterianos, deixando assim o inseto susceptível a infecção (STOKES *et al.* 2015).

Em relação a este gene, especificamente observou-se um aumento nos níveis relativos de mRNA apenas quando em co-infecção, o que poderia ser indicativo de que estas duas espécies podem desencadear uma resposta imune mais intensa em *R. prolixus* para CAC, que não é tão acentuada nas infecções únicas. Uma vez que o aumento de CAC inibe Toll e por consequência a responsividade do inseto contra patógenos.

Trabalho realizado por Malière e colaboradores (2015), indicam uma resposta diferencial em *R. prolixus* em relação a genes associados a locomoção do inseto. Este trabalho indica que triatomíneos experimentalmente infectados com *T. rangeli*, apresentam aumento da locomoção, enquanto o grupo infectado com *T. cruzi* demonstra diminuição deste parâmetro. Em casos de co-infecção, se o *T. rangeli* conseguir se sobressair em relação a esta resposta perante o *T. cruzi*, esta alteração poderia favorecer a dispersão destes insetos infectados. Logo estudos que analisem o comportamento do sistema imunológico do inseto, frente a uma co-infecção são relevantes inclusive para a análise de propagação vetorial da Doença de Chagas.

Estes resultados preliminares indicam que o *T. rangeli* induz uma reatividade maior por parte do sistema imune de *R. prolixus*, enquanto que a infecção pelo *T. cruzi* sugere a supressão desta resposta do inseto. Porém faz-se necessário a repetição dos ensaios a fim de excluir se as respostas obtidas não correspondem exclusivamente ao viés da técnica empregada, ou ao grupo amostral utilizado.

Os ensaios “*ex-vivo*” com os hemócitos de *R. prolixus*, células existentes na hemolinfa deste inseto foram realizados principalmente, com o intuito de oportunizar a ferramenta criada. O uso de parasitos fluorescentes foi de fundamental importância na facilitação da localização dos mesmos no interior das células uma vez que somente pelo método de Giemsa não há uma clara diferenciação dos mesmos. Importante ressaltar que neste ensaio não foi realizado nenhum tipo de co-infecção, pois o *T. cruzi* é um parasito restrito ao trato gastrointestinal do inseto, não sendo registrada sua presença na hemolinfa em condições naturais. Quando em infecção experimental deste parasito, diretamente na hemolinfa também foi constatado que aos poucos o parasito era eliminado, não apresentando capacidade para sobreviver neste ambiente assim como o *T. rangeli* (MELLO *et al.*, 1994).

Ao contrário do que ocorre com o *T. cruzi* em interações com linhagens celulares *in vitro*, nas quais o parasito consegue perfazer diferenciações para as formas amastigotas e assim gerar sucessivas divisões no interior desta (NEVES, 2005) o *T. rangeli* quando em hemócitos de *R. prolixus* mantém sua conformação e fica na realidade enovelado no interior da célula, ocupando grande parte de seu citosol (OLIVEIRA; SOUZA, 2003). As células infectadas apresentaram-se bem vacuolizadas e em nenhum dos tempos utilizados neste estudo foi observado a presença de divisão intracelular do *T. rangeli* nestas células, o que corrobora com os dados obtidos por Oliveira e Souza (2003).

Tendo sido este um estudo preliminar *ex-vivo* buscando determinar se a utilização de parasitos transfectados pode auxiliar na compreensão da interação hemócito-*T. rangeli* podemos concluir que estudos *in vivo* podem ser realizados e são necessários face à baixa viabilidade dos hemócitos nestes ensaios.

Posteriormente foram realizados ensaios em camundongos Balb/c, com o intuito de avaliar não apenas a co-infecção entre estas duas espécies, mas também se a infecção prévia por uma delas poderia gerar alterações no curso da infecção pela espécie subsequente.

Inicialmente durante os experimentos de parasitemia, foi constatada a presença de parasitos não fluorescentes no sangue

periférico dos camundongos, embora isto correspondesse a um percentual muito baixo em relação ao total de parasitos contabilizados, não causando prejuízos para que se traçasse o perfil de parasitemia dos animais infectados com as cepas de *T. rangeli* e *T. cruzi*.

Em passagem cíclica em camundongo o parasito esta sujeito a uma série de mecanismos de defesa do sistema imunológico do animal e também sem a pressão seletiva da droga G-418, o que poderia fazer com que ele parasse de expressar determinadas proteínas que não são vitais para a infecção neste hospedeiro e uma vez em cultura, onde a situação é completamente invertida, ele volta a ter a pressão do antibiótico e a ausência do sistema imunológico do animal.

No trabalho realizado por Pires (2008), também foi observado que parasitos da cepa JG de *T. cruzi* que expressavam GFP foram identificados no sangue de camundongos imunossuprimidos, porém eles não estavam fluorescentes. Os parasitos só voltaram a expressar GFP após reisolamento por hemocultura e posteriormente mesmo na presença de G-418 os parasitos foram perdendo progressivamente toda a fluorescência, porém isto não ocorreu com nenhuma das cepas utilizadas neste trabalho.

Ao compararmos o perfil de parasitemia das cepas transfectadas com as suas respectivas parentais, observou-se que apenas o *T. cruzi* SC 28 RFP, apresentou divergências significativas.

Devido à baixa virulência da CL Brener em relação a sua cepa de origem CL e também a todas as modificações realizadas *in vitro*, faz-se necessário inóculos maiores para que o perfil possa ser devidamente traçado, uma vez que foram necessárias sucessivas passagens em animal e também inóculos muito altos apenas para que se obtivesse a positividade da parasitemia. Conclui-se que ela de fato apresenta uma parasitemia mais branda em relação à cepa Y e a SC28.

Recentemente alguns trabalhos têm sido relatados acerca do clone CL14, oriundo da cepa CL que é avirulento (SOARES *et al.*, 2003). Alguns trabalhos relatam que o clone CL Brener também apresenta a forma tripomastigota sanguínea com um potencial infectivo menor que sua cepa parental CL. Porém este mesmo estudo indica que 16 dias após a inoculação de  $5 \times 10^3$  formas tripomastigotas sanguíneas, a taxa de mortalidade dos camundongos Balb/C infectados foi de 100% (ZINGALES *et al.*, 1997).

Constatado que os perfis de parasitemia entre as cepas selvagens e transfectadas eram bastante semelhantes para a cepa Y de *T. cruzi* e para todas as cepas de *T. rangeli*, e o grande conhecimento que se tem sobre a patogenia desta cepa em relação a este modelo

experimental, optou-se por realizar os ensaios no hospedeiro mamífero com a cepa Y GFP e Choachí RFP.

Através deste experimento, foi observado que a infecção prévia pelo *T. rangeli* não gerou proteção contra a infecção subsequente pelo *T. cruzi*, porém foi capaz de abrandar a parasitemia apresentada pelo *T. cruzi* e aumentar a sobrevida deste grupo de animais, sendo que mesmo 120 dias após o desafio com o *T. cruzi* nenhum animal previamente infectado com o *T. rangeli* morreu.

Estes dados concordam com os estudos de imunização prévia do *T. rangeli* e infecção posterior com o *T. cruzi*, que demonstraram uma resistência dos modelos experimentais utilizados, conferindo uma proteção significativa após a imunização dos animais com epimastigotas de *T. rangeli* lisados com saponina (BASSO *et al.*, 2007; 2008; 2014). É relevante também levar em consideração que as formas utilizadas para os experimentos de imunização nos trabalhos citados acima, são as formas epimastigotas, que não são consideradas infectivas para o hospedeiro mamífero. Enquanto isso, neste estudo utilizamos as formas tripomastigotas diferenciadas *in vitro*, sabidamente infectantes para o hospedeiro mamífero.

Estes resultados nos levam a crer que há semelhança de antígenos existentes entre estes dois parasitos que permitem o abrandamento da infecção causada pelo *T. cruzi*, e que estes antígenos podem ser algo expresso tanto nas formas epimastigotas quanto tripomastigotas do *T. rangeli*.

Embora o *T. rangeli* seja um parasito não – patogênico, ele é capaz de deflagrar uma importante resposta imune humoral resultando em altos níveis de anticorpos, e assim promovendo esta reatividade cruzada, devido a grande similaridade de seus antígenos de superfície (GRISARD *et al.*, 1999, AFCHAIN, *et al.* 1979, MORAES *et al.* (2008) demonstraram que o soro de pacientes chagásicos na fase aguda e crônica da doença são capazes de gerar o reconhecimento de determinadas proteínas do *T. rangeli*, tanto na forma epimastigota quanto tripomastigota.

O caso de reatividade cruzada entre o *T. cruzi*, já foi reportado em diferentes níveis com outras patologias, a constar toxoplasmose, hanseníase, tuberculose e frequentemente reportado com as leishmanioses (CABALLERO *et al.*, 2007; DESQUESNES *et al.*, 2007; BERRIZBIETIA *et al.*, 2004; UMEZAWA *et al.*, 1996; CAMARGO, 1992).

Em relação ao *T. rangeli*, foi registrado que a infecção anterior pelo *T. cruzi* não gerou nenhuma influência no seu perfil de parasitemia,

indicando que embora o *T. rangeli* gere alguma resposta capaz de reconhecer o *T. cruzi*, a situação inversa parece não acontecer.

Nos casos de co-infecção simultânea, praticamente não foram registradas alterações quanto ao pico de parasitemia, o perfil da curva, o número de parasitos encontrados ou na sobrevivência dos animais, sendo na realidade o grupo que apresentou a maior taxa de mortalidade. Rodrigues *et al.* (2010), ao realizar a co-infecção com diferentes cepas de *T. cruzi* revelam a existência de uma modulação do sistema imunológico dos camundongos Balb/C, sendo capaz de resultar em uma atenuação da sintomatologia, parasitismo no coração e parasitemia da cepa.

O período de intervalo entre a infecção e o desafio, pode apresentar-se como um período importante para o reconhecimento do organismo do animal. Quando ambas as espécies confrontam juntamente o sistema imunológico do animal, esse reconhecimento não parece ser gerado.

A relação de similaridade gênica existente entre *T. cruzi* e *T. rangeli* é o suficiente para gerar a identificação de determinadas proteínas e proporcionar até certo ponto a modulação e abrandamento da infecção causada pelo *T. cruzi*, porém não parece ser suficiente para prevenir uma infecção pela espécie subsequente.

Em todos os ambientes nos quais os dois parasitos estiveram em contato, foi demonstrado que existe algum tipo de interferência de uma espécie sobre a outra. Seja diminuindo o percentual de infecção celular do *T. cruzi*, modulando o sistema imunológico do inseto vetor de uma maneira diferencial ou ainda alterando a parasitemia e a sobrevivência de animais infectados por estas duas espécies.

Sabe-se que os eventos de co-infecção são possíveis naturalmente devido à ocorrência simpátrica das duas espécies e ao fato de compartilharem os mesmos vetores e hospedeiros. Estes resultados apontam que quando em coabitação é possível que uma espécie altere o curso da infecção subsequente de modo a interferir na própria patogenia da Doença de Chagas.

Sugere-se por fim que na natureza os eventos de co-infecção devam existir com relativa frequência uma vez que aparentemente não há impedimento para que as duas espécies coabitem o mesmo ambiente, vetor ou hospedeiro.



## 6. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

Analisando em conjunto os resultados obtidos, podemos concluir que a manipulação pela qual os parasitos foram submetidos não gerou alterações quanto ao seu perfil de crescimento nas formas epimastigotas, entretanto o percentual de células THP-1 infectadas foi menor nas linhagens transfectantes em relação à cepa parental. A infecção no hospedeiro mamífero apresentou divergências no perfil de parasitemia apenas para a cepa SC 28 RFP. O *T. rangeli* Choachí GFP mostrou-se como uma ferramenta útil no estudo das interações parasito-hemócitos.

Em relação aos estudos de co-infecção foi evidenciado que existe mudanças na interação do *T. rangeli* e do *T. cruzi* em células THP-1 e que a infecção prévia pelo *T. rangeli* foi capaz de causar alterações na infecção subsequente pelo *T. cruzi* em camundongos Balb/c.

A respeito dos estudos preliminares em triatomíneos *R. prolixus*, observou-se a interação diferencial que cada parasito causa nos genes relacionados à imunidade em *R. prolixus* aqui estudados, concluindo-se que em casos de co-infecção pode haver alterações na propagação da própria Doença de Chagas no que diz respeito à transmissão vetorial.

Como perspectivas do trabalho, têm-se as linhagens de parasitos transfectantes desenvolvidas que podem facilitar também o estudo entre diferentes cepas de *T. cruzi*, uma vez que foram geradas cepas de três tipos de DTUs (I, II e VI).

Assim como os estudos realizados com os hemócitos de *R. prolixus* tornaram a visualização do parasito facilitada, devido à expressão da proteína fluorescente, esta mesma estratégia poderá ser utilizada para acompanhar a passagem do *T. rangeli* através do epitélio intestinal e também pela glândula salivar, uma vez que ainda existem lacunas a respeito do que faz o parasito realizar o ciclo completo enquanto alguns permanecem restritos ao trato gastrointestinal.

A ferramenta ainda oportuniza avaliar a existência da troca de informação genética entre parasitos da mesma cepa, expressando dois tipos de fluorescências diferentes, como no caso do *T. rangeli* Choachí RFP e GFP.



## 8. REFERÊNCIAS

- AFCHAIN, D.; LE RAY, D.; FRUIT, J.; CAPRON, A. Antigenic make-up of *Trypanosoma cruzi* culture forms: identification of a specific component. **J Parasitol**, v. 65, n. 4, p. 507-14, 1979.
- ALBAJAR, P. V.; LAREDO, S. V.; TERRAZAS M. B.; COURA, J. R. Miocardiopatia dilatada em pacientes com infecção chagásica crônica. Relato de dois casos fatais autóctones do Rio Negro, Estado do Amazonas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 36, nº3, p. 401-407. 2003.
- AÑEZ, N. Studies on *Trypanosoma rangeli* Tejera 1920: VI. Developmental pattern in the haemolymph of *Rhodnius prolixus*. **Mem Inst Oswaldo Cruz** . 1983, vol.78, n.4, p. 413-419.
- AÑEZ, N., EAST, J.S., 1984. Studies on *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920 II. Its effect on feeding behaviour of triatomine bugs. **Acta Trop** 47, 93-95.
- AÑEZ, N.; VELANDIA, J.; RODRIGUEZ, A. M. Estudios sobre *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920. VIII. Respuesta a las infecciones en dos mamíferos. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 80, n. 2, p. 149-53, 1985.
- BASSO, B., CASTRO, I., INTROINI, V., GIL, P., TRUYENS, C., MORETTI, E., 2007. Vaccination with *Trypanosoma rangeli* reduces the infectiousness of dogs experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. **Vaccine** 25, 3855–3858.
- BASSO, B.; MARINI, V. Experimental Chagas disease. Innate immune response in Balb/c mice previously vaccinated with *Trypanosoma rangeli*. I. The macrophage shows immunological memory: Reality or fiction? **Immunobiology**, v. 219, n. 4, p. 275-284.
- BASSO, B., MORETTI, E., FRETES, R., 2008. Vaccination with fixed epimastigotes of different strains of *Trypanosoma rangeli* protects mice against *Trypanosoma cruzi* infection. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** 103, 370–374.
- BASSO, B.; MORETTI, E.; FRETES, R. Vaccination with *Trypanosoma rangeli* induces resistance of guinea pigs to virulent

*Trypanosoma cruzi*. **Vet Immunol Immunopathol.**, v. 157, n. 1-2, p. 119-123.

BERRIZBIETIA, M.; NDAO, M.; GOTTSCHALK, M.; ACHE, A.; VASQUEZ, F.; LACOUTURE, S.; MEDINA, M.; WARD, B. J. Development and comparison of enzyme immunoassays for diagnosis of Chagas' disease using fixed forms of *Trypanosoma cruzi* (Epimastigotes, Amastigotes, and Trypomastigotes) and assessment of antigen stability for the three assays. **J Clin Microbiol**, v. 42, n. 4, p. 1766-1769, 2004.

BILLINGSLEY, P.F., DOWNE, A.E.R., 1983. Ultrastructural changes in posterior midgut cells associated with blood feeding in adult female *Rhodnius prolixus* Stal (Heteroptera: Reduviidae). **Can J Zool** 61, 2574-2586.

BILLINGSLEY, P.F., DOWNE, A.E.R., 1985. Cellular localization of aminopeptidase in the midgut of *Rhodnius prolixus* Stal (Hemiptera: Reduviidae) during blood digestion. **Cell Tissue Res.** 241, 421-428.

BILLINGSLEY, P. F.; DOWNE, A. E., 1986. The surface morphology of the midgut cells of *Rhodnius prolixus* Stal (Hemiptera: Reduviidae) during blood digestion. **Acta Trop**, v. 43, n. 4, p. 355-366.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Caderno de atenção básica: vigilância em saúde, zoonoses**. Brasília. 2009.

BRENER, Z. Therapeutic activity and criterion of cure in mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 4 389-396, 1962.

BRENER, Z.; CHIARI, C. The effects of some immunosuppressive agents in experimental chronic Chaga's disease. **Trans R Soc Trop Med Hyg** 65:629-36, 1971.

BRENER, Z., GOLGHER, R., BERTELLI, M.S., TEIXEIRA, J.A: Strain dependent thermosensitivity influencing intracellular differentiation of *Trypanosoma cruzi* in cell culture. **J Protozool.** 23 (1) 147-150 (1976).

BUCHON, N.; SILVERMAN, N.; CHERRY, S. Immunity in *Drosophila melanogaster* from microbial recognition to whole-organism physiology. **Nat Rev Immunol**, v. 14, n. 12, p. 796-810.

BUCKNER, F. S. et al. Efficient technique for screening drugs for activity against *Trypanosoma cruzi* using parasites expressing  $\beta$ -galactosidase. **Antimicrob. Agents Chemother.** v. 40, n. 11, p. 2592-2597, 1996.

CABALLERO, Z. C.; SOUSA, O. E.; MARQUES, W. P.; SAEZ-ALQUEZAR, A.; UMEZAWA, E. S. Evaluation of serological tests to identify *Trypanosoma cruzi* infection in humans and determine cross-reactivity with *Trypanosoma rangeli* and *Leishmania* spp. **Clin Vaccine Immunol**, v. 14, n. 8, p. 1045-1049, 2007.

CALVO-A´LVAREZ E, A´LVAREZ-VELILLA R, JIMENEZ M, MOLINA R, PE´REZ-PERTEJO Y, BALAÑA-FUERCE, R; REGUERA R.M. (2014) First Evidence of Intraclonal Genetic Exchange in Trypanosomatids Using Two *Leishmania infantum* Fluorescent Transgenic Clones. **PLoS Negl Trop Dis** 8(9): e3075.

CAMARGO ME: Serological diagnosis – An Appraisal of Chagas disease serodiagnosis. In Chagas disease (American Trypanosomiasis), its impact on transfusion and clinical medicine Edited by: Wendel S, Brener Z, Camargo ME, Rassi A. São Paulo: **Sociedade Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**; 1992:165-178.

CASTRO, D. P.; MORAES, C. S.; GONZALEZ, M. S.; RATCLIFFE, N. A.; AZAMBUJA, P.; GARCIA, E. S. *Trypanosoma cruzi* immune response modulation decreases microbiota in *Rhodnius prolixus* gut and is crucial for parasite survival and development. **PLoS One**, v. 7, n. 5, p. e36591.

COLOSIO, R. C.; FALAVIGNA-GUILHERME, A. L.; GOMES, M. L.; MARQUES, D. S. O.; LALA, E. R. P.; ARAÚJO, S. M. Conhecimentos e atitudes sobre a doença de Chagas entre profissionais de saúde – Paraná, Brasil. **Revista Ciência Cuidado e Saúde**. v. 6, nº 2, p. 355-363. 2007.

COURA, JR. Tripanosomose, doença de Chagas. **Cienc. Cult.**, São Paulo, v. 55, n. 1, Jan. 2003 .

## 150 REFERÊNCIAS

- COURA JR, FERNANDES O, ARBOLEDA M, BARRETT TV, CARRARA N, DEGRAVE W, CAMPBELL DA 1996. Human infection by *Trypanosoma rangeli* in Brazilian Amazon. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 90: 278-279.
- CUBA CUBA, A. [Review of the biologic and diagnostic aspects of *Trypanosoma (Herpetosoma) rangeli*]. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 31, n. 2, p. 207-220, 1998.
- D'ALESSANDRO, A., 1961. Studies on *Trypanosoma rangeli* TEJERA, 1920. A parasite of man and other mammals. **A dissertation**. Tulane University.
- D'ALESSANDRO, A., 1976, Biology of *Trypanosoma rangeli* (Herpetosoma) *rangeli* Tejera, 1920, in: Lumsden, W.H.R e Evans, D.A (eds), Biology of Kinetoplastida. vol.1, **Academic Press**, London, pp.328-403.
- D'ALESSANDRO, A., SARAIVA N.G., 1999 , *Trypanosoma rangeli* in Gillis, H.M (Ed.), Protozoal Diseases, Arnold, , London, pp.398-412.
- D'ALESSANDRO-BACIGALUPO, A., SARAIVA N.G., 1992 , *Trypanosoma rangeli* in Kreir, J.P e Baker, J.(Ed) , Parasitic Protozoa. vol.2, **Academic Press**, London, pp. 1-54.
- DAROCHA, W.D.; SILVA, R.A.; BARTHOLOMEU, D.C., PIRES, S.F., FREITAS, J.M., MACEDO, A.M., VAZQUEZ, M.P., LEVIN, M.J., TEIXEIRA, S.M. (2004). Expression of exogenous genes in *Trypanosoma cruzi*: improving vectors and eletroporation protocols. **Parasitol. Res.** 92 (2):113-20
- DE ARAÚJO, S.M. & CHIARI, E. (1970) Caracterização biológica de clones da cepa Y, CL e MR de *Trypanosoma cruzi* em camundongos C3H isogênicos. **Mem. Inst. Osw. Cruz**, 83, 175-81.
- DE ISOLA, E. L.; LAMMEL, E. M.; KATZIN, V. J.; GONZALEZ CAPPAS, S. M. Influence of organ extracts of *Triatoma infestans* on differentiation of *Trypanosoma cruzi*. **J Parasitol**, v. 67, n. 1, p. 53-58, 1981.

DE OLIVEIRA, M. A.; DE SOUZA, W. An electron microscopic study of penetration by *Trypanosoma rangeli* into midgut cells of *Rhodnius prolixus*. **J Invertebr Pathol**, v. 77, n. 1, p. 22-26, 2001.

DESQUESNES, M.; BOSSENO, M. F.; BRENIERE, S. F. Detection of Chagas infections using *Trypanosoma evansi* crude antigen demonstrates high cross-reactions with *Trypanosoma cruzi*. **Infect Genet Evol**, v. 7, n. 4, p. 457-462, 2007.

DIAS E.; TORREALBA JF 1943. Verificação de flagelados semelhantes ao *Trypanosoma rangeli*, Tejera 1920, em *Rhodnius prolixus* alimentados em caso de doença de Chagas na Venezuela. **Mem Inst Oswaldo Cruz** 39: 266-278.

DIAS, F. B.; DIOTAIUTI, L.; ROMANHA, A. J.; BEZERRA, C. M.; MACHADO, E. M. First report on the occurrence of *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920 in the state of Ceara, Brazil, in naturally infected triatomine *Rhodnius nasutus* Stal, 1859 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 102, n. 5, p. 643-645, 2007.

DIAS, J. C.; AMATO NETO, V. [Prevention concerning the different alternative routes for transmission of *Trypanosoma cruzi* in Brazil]. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 44 Suppl 2, n., p. 68-72.

EGER-MANGRICH, I.; DE OLIVEIRA, M. A.; GRISARD, E. C.; DE SOUZA, W.; STEINDEL, M. Interaction of *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920 with different cell lines in vitro. **Parasitol Res**, v. 87, n. 6, p. 505-509, 2001.

ELLIS, D. S.; EVANS, D. A.; STAMFORD, S. The penetration of the salivary glands of *Rhodnius prolixus* by *Trypanosoma rangeli*. **Z Parasitenkd**, v. 62, n. 1, p. 63-74, 1980.

ESTEVEZ-LAO, T. Y.; HILLYER, J. F. Involvement of the *Anopheles gambiae* Nimrod gene family in mosquito immune responses. **Insect Biochem Mol Biol**, v. 44, n., p. 12-22.

FERREIRA, L. L.; LORENZO, M. G.; ELLIOT, S. L.; GUARNERI, A. A. A standardizable protocol for infection of *Rhodnius prolixus* with *Trypanosoma rangeli*, which mimics natural infections and reveals

physiological effects of infection upon the insect. **J Invertebr Pathol**, v. 105, n. 1, p. 91-97, 2010.

FLORENCIO-MARTINEZ, L.; MARQUEZ-DUENAS, C.; BALLESTEROS-RODEA, G.; MARTINEZ-CALVILLO, S.; MANNING-CELA, R. Cellular analysis of host cell infection by different developmental stages of *Trypanosoma cruzi*. **Exp Parasitol**, v. 126, n. 3, p. 332-336.

FLORES-VILLEGAS, A. L.; SALAZAR-SCHETTINO, P. M.; CORDOBA-AGUILAR, A.; GUTIERREZ-CABRERA, A. E.; ROJAS-WASTAVINO, G. E.; BUCIO-TORRES, M. I.; CABRERA-BRAVO, M. Immune defence mechanisms of triatomines against bacteria, viruses, fungi and parasites. **Bull Entomol Res**, v. 105, n. 5, p. 523-532.

GARCIA, E. S.; MELLO, C. B.; AZAMBUJA, P.; RIBEIRO, J. M. *Rhodnius prolixus*: salivary antihemostatic components decrease with *Trypanosoma rangeli* infection. **Exp Parasitol**, v. 78, n. 3, p. 287-293, 1994.

GENTA, F. A.; SOUZA, R. S.; GARCIA, E. S.; AZAMBUJA, P. Phenol oxidases from *Rhodnius prolixus*: temporal and tissue expression pattern and regulation by ecdysone. **J Insect Physiol**, v. 56, n. 9, p. 1253-1259.

GOMES, S. A.; FEDER, D.; GARCIA, E. S.; AZAMBUJA, P. Suppression of the prophenoloxidase system in *Rhodnius prolixus* orally infected with *Trypanosoma rangeli*. **J Insect Physiol**, v. 49, n. 9, p. 829-837, 2003.

GOMES, S. A.; FEDER, D.; THOMAS, N. E.; GARCIA, E. S.; AZAMBUJA, P. *Rhodnius prolixus* infected with *Trypanosoma rangeli*: In vivo and in vitro experiments. **J Invertebr Pathol**, v. 73, n. 3, p. 289-293, 1999.

GOMES, S.A.O., GRACIANO, G.L., NOGUEIRA, N.F.S., SOUZA, W., GARCIA, E.S., AZAMBUJA, P., 2002. Effects of gamma irradiation on the development of *Trypanosoma rangeli* in the vector *Rhodnius prolixus*. **J. Invertebr. Pathol.** 79, 86-92.

GONZALEZ, M. S.; NOGUEIRA, N. F.; MELLO, C. B.; DE SOUZA, W.; SCHAUB, G. A.; AZAMBUJA, P.; GARCIA, E. S. Influence of brain and azadirachtin on *Trypanosoma cruzi* development in the vector, *Rhodnius prolixus*. **Exp Parasitol**, v. 92, n. 2, p. 100-108, 1999.

GRANUCCI, N. **Estudo da interação celular parasito hospedeiro a partir da expressão heteróloga de Trans-sialidase de *trypanosoma cruzi* por *Trypanosoma rangeli* em ensaios *in vitro* e *in vivo***. 2013. 191p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia e Biociências). Curso de Pós- graduação em Biotecnologia e Biociências, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2013.

GREGÓRIO, N., RATCLIFFE, N.A., 1991. The distribution of agglutinins and lytic activity against *Trypanosoma rangeli* and erythrocytes in *Rhodnius prolixus* and *Triatoma infestans* tissue extracts and haemolymph. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**. 86, 181-186.

GREWAL, M.S., 1956. **Studies on the “ocult” trypanosomes**. PhD. Thesis. University of London.

GRISARD, Edmundo C *et al.* . Characterization of *Trypanosoma rangeli* Strains Isolated in Central and South America: an Overview. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro , v. 94, n. 2, Mar. 1999.

GUEVARA, P.; DIAS, M.; ROJAS, A.; CRISANTE, G.; ABREU-BLANCO, M. T.; UMEZAWA, E.; VAZQUEZ, M.; LEVIN, M.; ANEZ, N.; RAMIREZ, J. L. Expression of fluorescent genes in *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae): its application to parasite-vector biology. **J Med Entomol**, v. 42, n. 1, p. 48-56, 2005.

GUHL, F, HUDSON L, MARINKELLE CJ, JARAMILLO CA, BRIDGE D 1987. Clinical *Trypanosoma rangeli* infection as a complication of Chagas’ disease. **Parasitology** 94: 475-484.

GUHL, F.; MARINKELLE, C. J. Antibodies against *Trypanosoma cruzi* in mice infected with *T. rangeli*. **Ann Trop Med Parasitol**, v. 76, n. 3, p. 361, 1982.

## 154 REFERÊNCIAS

- GUHL, F.; VALLEJO, G. A. *Trypanosoma* (Herpetosoma) rangeli Tejera, 1920: an updated review. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 98, n. 4, p. 435-442, 2003.
- HASHIMOTO, Y.; TABUCHI, Y.; SAKURAI, K.; KUTSUNA, M.; KUROKAWA, K.; AWASAKI, T.; SEKIMIZU, K.; NAKANISHI, Y.; SHIRATSUCHI, A. Identification of lipoteichoic acid as a ligand for draper in the phagocytosis of *Staphylococcus aureus* by *Drosophila* hemocytes. **J Immunol**, v. 183, n. 11, p. 7451-7460, 2009.
- HECKER, H.; SCHWARZENBACH, M.; RUDIN, W. Development and interactions of *Trypanosoma rangeli* in and with the reduviid bug *Rhodnius prolixus*. **Parasitol Res**, v. 76, n. 4, p. 311-318, 1990.
- HOARE, C.A. and WALLACE, F.G. (1966) Developmental stages of trypanosomatid flagellates: a new terminology. **Nature** 212, 1385-1386.
- HUDSON L, GUHL F, DE SANCHEZ N, BRIDGE D, JARAMILLO CA, YOUNG A 1988. Longitudinal studies of the immune response of Colombian patients infected with *Trypanosoma cruzi* and *T. rangeli*. **Parasitology** 96: 449-460.
- JAWETZ E, MELNICK JL, ADELBERG EA, BROOKS GF, BUTEL JS, ORNSTON LN. O crescimento, a sobrevivência e a morte de microorganismos. In: **Microbiologia médica**. 18ª Edição Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991.
- KOERICH, L. B.; EMMANUELLE-MACHADO, P.; SANTOS, K.; GRISARD, E. C.; STEINDEL, M. Differentiation of *Trypanosoma rangeli*: high production of infective Trypomastigote forms in vitro. **Parasitol Res**, v. 88, n. 1, p. 21-25, 2002.
- KOLLIEN, A. H.; SCHAUB, G. A. The development of *Trypanosoma cruzi* (Trypanosomatidae) in the reduviid bug *Triatoma infestans* (Insecta): influence of starvation. **J Eukaryot Microbiol**, v. 45, n. 1, p. 59-63, 1998.
- KOLLIEN, A. H.; SCHAUB, G. A. The development of *Trypanosoma cruzi* in triatominae. **Parasitol Today**, v. 16, n. 9, p. 381-387, 2000.

LEMAITRE, B.; HOFFMANN, J. The host defense of *Drosophila melanogaster*. **Annu Rev Immunol**, v. 25, n., p. 697-743, 2007.

LEÓN JR 1946. Contribución al estudio de La Enfermedad de Chagas en Guatemala. Trab presentado **I Congreso Inter Med.** Poligrafiado 10.

LIMA, M.M., PEREIRA, J.B., SANTOS, J.A.A., PINTO, Z.T., BRAGA, M.V., 1992. Development and reproduction of *Panstrongylus megistus* (Hemiptera: Reduviidae) infected with *Trypanosoma cruzi*, under laboratory conditions. **Ann. Entomol. Soc. Am.** 85, 458-461.

LINDSAY, S.A., WASSERMAN, S.A. (2014). Conventional and non-conventional *Drosophila* Toll signaling. **Dev. Comp. Immunol.** 42, 16–24.

LORENZI H.A., VAZQUEZ M.P., LEVIN M.J. (2003). Integration of expression. vectors into the ribosomal locus of *Trypanosoma cruzi*. **Gene.** 310:91-9

LUCENA DT, MARQUES RJ 1954. Primeiro caso de infecção humana por *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920, no Brasil. **Rev. Bras. Med.** 11: 535-540.

LUNARDELLI, A.; BORGES, F. P.; MELLO, K. F.; ZEFERINO, A. S. A. Soroprevalência da doença de Chagas em candidatos a doadores de sangue. **Revista Brasileira de Análise Clínica.** v. 39, nº 2, p. 139-141. 2007.

MACEDO, A.M.; MARTINS, M.S.; CHIARI, E.; PENA, S.D.J.; (1992). DNA fingerprinting of *Trypanosoma cruzi*: a new tool for characterization of strains and clones. **Mol.Biochem. Parasitol.** 55: 147-154.

MACEDO, A. M.; PENA, S. D. Genetic Variability of *Trypanosoma cruzi*: Implications for the Pathogenesis of Chagas Disease. **Parasitol. Today**, v. 14, n. 3, p. 119-124, 1998.

MARLIÉRE N. P.; LATORRE-ESTIVALIS J.M.; LORENZO M.G.; CARRASCO D.; ALVES-SILVA, J.; RODRIGUES J.D.O.; FERREIRA, L.L.; LARA, L. M.; LOWENBERGER, C.; GUARNERI, A. (2015) Trypanosomes Modify the Behavior of Their Insect Hosts:

Effects on Locomotion and on the Expression of a Related Gene. **PLoS Negl Trop Dis** 9(8): e0003973.

MEIRELLES, R. M.; HENRIQUES-PONS, A.; SOARES, M. J.; STEINDEL, M. Penetration of the salivary glands of *Rhodnius domesticus* Neiva & Pinto, 1923 (Hemiptera: Reduviidae) by *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920 (Protozoa: Kinetoplastida). **Parasitol. Res.**, v. 97, n. 4, p. 259-269, 2005.

MELLO, C. B.; AZAMBUJA, P.; GARCIA, E. S.; RATCLIFFE, N. A. Differential in vitro and in vivo behavior of three strains of *Trypanosoma cruzi* in the gut and hemolymph of *Rhodnius prolixus*. **Exp Parasitol**, v. 82, n. 2, p. 112-121, 1996.

MELLO, C.B., GARCIA, E.S., RATCLIFFE, N.A., AZAMBUJA, P., 1994. *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli*: Interplay with hemolymph components of *Rhodnius prolixus*. **J. Inverteb. Pathol.** 65, 261-268.

MELLO, C.B., NIGAM, GARCIA, E.S., AZAMBUJA, P., NEWTON, R.P., RATCLIFFE, N.A., 1999. Studies on a Haemolymph Lectin Isolated from *Rhodnius prolixus* and Its Interaction with *Trypanosoma rangeli*. **Exp. Parasitol.** 91, 289–296.

MELO, A. S.; LORENA, V. M. B.; MORAES, A. B.; PINTO, M. B. A.; LEÃO, S. C.; SOARES, A. K. A.; GADELHA, M. F. S.; GOMES, Y. M. Prevalência de infecção chagásica em doadores de sangue no estado de Pernambuco, Brasil. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia.** 2008.

MONTERO GF 1958. Trypanosomiasis *rangeli* em Costa Rica. In: Congresso LatinoAmericano. **Congresso Nacional de Microbiologia**, p. 87.

MORAES, M. H; GUARNERI, A; GIRARDI, F. P; RODRIGUES, J.B; EGER-MANGRICH, I; TYLER, K.; M; STEINDEL, M. S.; GRISARD, E. C. Different serological cross-reactivity of *Trypanosoma rangeli* forms in *Trypanosoma cruzi*-infected patients sera. **Parasites & Vectors**, 1:20, jul de 2008.

MYLLYMÄKI, H; VALANNE, S; RAMET, M. - The *Drosophila* Imd Signaling Pathway. **J Immunol** 2014; 192:3455-3462.

NEVES, D. P.; MELO, A. L.; LINARDI, P. M.; VITOR, R. W. A. **Parasitologia Humana**. 11 ed. São Paulo: editora Atheneu. 2005. p. 85-108, 2005.

NOGUEIRA, N. F.; GONZALEZ, M. S.; GOMES, J. E.; DE SOUZA, W.; GARCIA, E. S.; AZAMBUJA, P.; NOHARA, L. L.; ALMEIDA, I. C.; ZINGALES, B.; COLLI, W. *Trypanosoma cruzi*: involvement of glycoinositolphospholipids in the attachment to the luminal midgut surface of *Rhodnius prolixus*. **Exp. Parasitol.**, v. 116, n. 2, p. 120-128, 2007.

OLIVEIRA, M.A., SOUZA, W., 2001. An electron microscopic study of penetration by *Trypanosoma rangeli* into midgut cells of *Rhodnius prolixus*. **J. Invertebrate Pathol.** 77, 22-26.

OLIVEIRA, M.A., SOUZA, W., 2003. Further morfological studies in the behavior of *Trypanosoma rangeli* in the hemocytes of *Rhodnius prolixus*. **Parasitol. Int.**52 299- 307.

OLIVEIRA R.P.; BROUDE N.E.; MACEDO A.M.; CANTOR C.R.; SMITH C.L.; PENA, S.D.J. (1998). Probing the genetic population structure of *Trypanosoma cruzi* with polymorphic microsatellites. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, 95:3776-3780

OLIVEIRA R.P.; MELO A.I.R.; MACEDO A.M.; CHIARI E.; PENA, S.D.J. (1999). The population structure of *Trypanosoma cruzi*: expanded anlysis of 54 strain using eight polymorphic Ca-repeat microsatellites. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** 94

OSORIO, Y.; TRAVI, B. L.; PALMA, G. I.; SARAVIA, N. G. Infectivity of *Trypanosoma rangeli* in a promonocytic mammalian cell line. **J Parasitol.**, v. 81, n. 5, p. 687-693, 1995.

PIFANO, F., MAYER, M. 1949. Hallazgo de formas evolutivas del *Trypanosoma rangeli* en el jugo de la trompa de *Rhodnius prolixus* de Venezuela. **Arch. Venez. Patol. Trop.** Pam&tot. M&d., 1, 153-158.

PÍFANO F, MAYER M, MEDINA R 1948. Primera comprobación de *Trypanosoma rangeli* en el organismo humano por cultivo de sangre periférica. **Arch. Venez. Pathol. Trop. Parasitol. Med.** 1: 135–152.

PIRES, S F. **Geração e caracterização de linhagens de *Trypanosoma cruzi* expressando proteínas fluorescentes como ferramentas para pesquisa em Doença de Chagas.** 2007. 112p. Tese. (Doutorado em Ciências). Curso de pós-graduação em Bioquímica e Imunologia. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte 2007.

PIRES S.F, DAROCHA W.D, FREITAS J.M, OLIVEIRA L.A, KITTEN G.T, MACHADO C.R, PENNA S.D.J, CHIARI E, MACEDO A.M, TEIXEIRA S.M.R. Cell culture and animal infection with distinct *Trypanosoma cruzi* strains expressing red and green fluorescent proteins. **Int. J. Parasitol.** 2008; 38: 289–297

RAMIREZ M.I., YAMAUCHI L.M., DE FREITAS L.H.J., UEMURA H., SCHENKMAN S. (2000) The use of the green fluorescent protein to monitor and improve transfection in *Trypanosoma cruzi*. **Mol Biochem Parasitol.** 111(1):235-40.

RATCLIFFE, N. A.; NIGAM, Y.; MELLO, C. B.; GARCIA, E. S.; AZAMBUJA, P. *Trypanosoma cruzi* and erythrocyte agglutinins: a comparative study of occurrence and properties in the gut and hemolymph of *Rhodnius prolixus*. **Exp Parasitol**, v. 83, n. 1, p. 83-93, 1996.

RATCLIFFE NA, ROWLEY AF 1979. Role of hemocytes in defence against biological agents. In AP Gupta, Insect Hemocytes Development, Forms, Functions, and Techniques. **Cambridge University Press**, Cambridge, p. 331-414.

REGIS-DA-SILVA, C. G.; FREITAS, J. M.; PASSOS-SILVA, D. G.; FURTADO, C.; AUGUSTO-PINTO, L.; PEREIRA, M. T.; DAROCHA, W. D.; FRANCO, G. R.; MACEDO, A. M.; HOFFMANN, J. S.; CAZAUX, C.; PENNA, S. D.; TEIXEIRA, S. M.; MACHADO, C. R. Characterization of the *Trypanosoma cruzi* Rad51 gene and its role in recombination events associated with the parasite resistance to ionizing radiation. **Mol Biochem Parasitol**, v. 149, n. 2, p. 191-200, 2006.

REY, L. **Parasitologia: parasitos e doenças parasitárias do homem nos trópicos ocidentais**. 4 ed. Rio de Janeiro: editora Guanabara koogan. 2008. p. 295-343.

REY MH, UCRÓS GH 1939. Nota preliminar sobre el hallazgo de *Trypanosoma Schizotrypanum cruzi* y del *Trypanosoma rangeli* en el *Rhodnius prolixus* en algunas regiones del oriente de Cundinamarca. **Rev. Facultad. Med.** 8: 76-78.

RODRIGUES, C. M.; VALADARES, H. M.; FRANCISCO, A. F.; ARANTES, J. M.; CAMPOS, C. F.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; MARTINS-FILHO, O. A.; ARAUJO, M. S.; ARANTES, R. M.; CHIARI, E.; FRANCO, G. R.; MACHADO, C. R.; PENNA, S. D.; FARIA, A. M.; MACEDO, A. M. Coinfection with different *Trypanosoma cruzi* strains interferes with the host immune response to infection. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 4, n. 10, p. e846.

SALDAÑA A, SAMUDIO F, MIRANDA A, HERRERA LM, SAVEDRA SP, CÁCERES L, BAYARD V, CALZADA JE 2005. Predominance of *Trypanosoma rangeli* infection in children from a Chagas disease endemic area in the West-shore of the Panama Canal. **Men Inst Oswaldo Cruz** 100: 729-731.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F. and MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. New York: cold Spring Harbor Laboratory Press.1989

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D.W. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. Cold Spring Harbor, New York. 2001.

SANCHEZ-LERMEN R. L. P.; DICK E.; SALAS J. A. P.; FONTES C. J. F. Sintomas do trato digestivo superior e distúrbios motores do esôfago em pacientes portadores da forma indeterminada da doença de Chagas crônica. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 40, nº 2, p. 197-203. 2007.

SANTOS, C. A. T.; **Infecção pelo *Trypanosoma cruzi* em doadores de sangue: revisão sistemática da literatura e estudo de prevalência no hemocentro de Goiás**. Goiânia-Go. Dissertação de mestrado em ciência da saúde. Universidade Federal de Goiás. 2011.

SCHAUB, G.A., 1988. Development of isolated and group-reared first instars of *Triatoma infestans* infected with *Trypanosoma cruzi*.

**Parasitol. Res.** 74, 593-594.

SCHAUB, G. A. Does *Trypanosoma cruzi* stress its vectors? **Parasitol.**

**Today**, v. 5, n. 6, p. 185-188, 1989.

SCHAUB, G.A., 1992. The effects of trypanosomatids on insects. **Adv.**

**Parasitol.** 31, 255–319.

SCHAUB, G.A., BOKER, C.A., 1986. Colonization of the rectum of

*Triatoma infestans* by *Trypanosoma cruzi*: influence of starvation studied by scanning electron microscopy. **Acta Trop.** 43, 349-354.

SCHLINDWEIN, A. D. **Estudo das sialidases de *Trypanosoma rangeli*: caracterização gênômica expressão heteróloga de um trans-sialidase.** 2014, 191p Tese. (Doutorado em Biotecnologia e Biociências). Curso de Pós- graduação em Biotecnologia e Biociências, Universidade Federal de Santa Catarina, 2014.

SCHOTTELIUS, J. Neuraminidase fluorescence test for the

differentiation of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli*. **Trop**

**Med Parasitol**, v.38, n.4, p.323-7, 1987.

SCHWENDE, H.; FITZKE, E.; AMBS, P.; DIETER, P. Differences in

the state of differentiation of THP-1 cells induced by phorbol ester and

1,25-dihydroxyvitamin D3. **J Leukoc Biol**, v. 59, n. 4, p. 555-561,

1996.

SILVA LH, NUSSENZWEIG V 1953. Sobre uma cepa

de *Trypanosoma cruzi* virulenta para o camundongo branco. **Folia Clin**

**Biol** 20: 191-207.

SILVA, M. M. F. **Análise do desempenho de testes**

**imunodiagnósticos para doença de Chagas e sua correlação com**

**dados epidemiológicos para definição do perfil sorológico de**

**doadores de sangue.** Tese em Patologia Clínica. Universidade Federal

do Triângulo Mineiro. Uberaba-MG. 2011.

SILVEIRA, A. C.; DIAS, J. C. P. O controle da transmissão vetorial. **Rev. História sobre a Doença de Chagas no Brasil**, v. 44, supl. II, p. 52-63, 2011.

SOUSA, O., 1972. Anotaciones sobre la Enfermedad de Chagas em Panamá. Frecuencia y distribución de *T. cruzi* y *T. rangeli*. **Rev. Biol. Trop.** 20(2):167-179.

SOUSSUMI, L. M. T. **Estudo da distribuição de doadores reativos para a doença de Chagas no hemocentro de Ribeirão Preto-SP. Ribeirão Preto-SP**, 2004. Dissertação em Saúde da Comunidade, departamento de Medicina Social. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. 2004.

SOUZA MA, FONSECA TS, SANTOS BN, PEREIRA SPS, CARVALHAL C, MORENO AMH 2008. *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920, in cronic Chagas' disease patients under ambulatory care at the Evandro Chagas Clinical Research Institute (IPEC-FIOCRUZ, Brazil). *Parasitol Res* 103: 697-703.

SOARES, A.C., CARVALHO-TAVARES B, J., GONTIJO, N.F., SANTOS, V.C., TEIXEIRA, M.M., PEREIRA, M.H., 2006. Salivation pattern of *Rhodnius prolixus* (Reduviidae; Triatominae) in mouse skin. **J. Insect Physiol.** 52, 468–472.

SOARES, M. B.; GONCALVES, R.; PYRRHO, A. S.; COSTA, D. A.; PAIVA, C. N.; GATTASS, C. R. Balanced cytokine-producing pattern in mice immunized with an avirulent *Trypanosoma cruzi*. **An Acad Bras Cienc**, v. 75, n. 2, p. 167-172, 2003.

STEINDEL M, TOMA HK, ISHIDA MMI, MURTA SMF, PINTO CJC, GRISARD EC, SCHLEMPER JR BR, RIBEIRO-RODRIGUES R, ROMANHA AJ. Biological and isoenzymatic characterization of *Trypanosoma cruzi* strains isolated from sylvatic reservoirs and vectors from the state of Santa Catarina, Southern Brazil. **Act Trop**, 60: 167-177. 1995.

STOCO, P. H.; WAGNER, G.; TALAVERA-LOPEZ, C.; GERBER, A.; ZAHA, A.; THOMPSON, C. E.; BARTHOLOMEU, D. C.; LUCKEMEYER, D. D.; BAHIA, D.; LORETO, E.; PRESTES, E. B.; LIMA, F. M.; RODRIGUES-LUIZ, G.; VALLEJO, G. A.; FILHO, J. F.;

SCHENKMAN, S.; MONTEIRO, K. M.; TYLER, K. M.; DE ALMEIDA, L. G.; ORTIZ, M. F.; CHIURILLO, M. A.; DE MORAES, M. H.; CUNHA ODE, L.; MENDONCA-NETO, R.; SILVA, R.; TEIXEIRA, S. M.; MURTA, S. M.; SINCERO, T. C.; MENDES, T. A.; URMENYI, T. P.; SILVA, V. G.; DAROCHA, W. D.; ANDERSSON, B.; ROMANHA, A. J.; STEINDEL, M.; DE VASCONCELOS, A. T.; GRISARD, E. C. Genome of the avirulent human-infective trypanosome-*Trypanosoma rangeli*. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 8, n. 9, p. e3176.

STOKES, B. A.; YADAV, S.; SHOKAL, U.; SMITH, L. C.; ELEFTHERIANOS, I. Bacterial and fungal pattern recognition receptors in homologous innate signaling pathways of insects and mammals. **Front Microbiol**, v. 6, n., p. 19.

TAKLE, G. B. Studies on the cellular immune responses of insects toward the insect pathogen *Trypanosoma rangeli*. **J Invertebr Pathol**, v. 51, n. 1, p. 64-72, 1988.

TEIXEIRA, S.M.R.; KIRCHHOFF, L.V. AND DONELSON, J.E. (1995). Posttranscriptional elements regulating expression of mRNAs from the Amastin/Tuzin gene cluster of *Trypanosoma cruzi*. **The Journal of Biol Chem.**, 270:22586- 22594.

TEIXEIRA, S.M.R.; OTSU, K.; HILL, K.L.; KIRCHHOFF, L.V. AND DONELSON, J.E. (1999). Expression of a marker for intracellular *Trypanosoma cruzi* amastigotes in extracellular spheromastigotes. **Mol. And Bioch. Parasit.** 98: 265-270.

TEJERA, E. 1920. Un nouveau flagellb de *Rhodnius prolixus*, *Trypanosoma* (OU Crithidia) *rangeli*, n.sp. **Bull. Sot. pathol. Exotique** 13, 527430.

TERRA, W.R., 1990. Evolution of digestive systems of insects. **Ann. Rev. Entomol.** 35, 181–200.

TERRA, W.R., FERREIRA, C. 2005. Biochemistry of digestion. In: Gilbert L.I., Iatrou, K., Gill, S.S. (Eds). **Comprehensive Molecular Insect Science**, Oxford: Elsevier 4: 171-224.

TOBIE, E.J.,1961. Experimental transmission and biological comparison of strains of *Trypanosoma rangeli*. **Exp. Parasitol.** 11: 1-9.

TOMA, H.K., CERÁVOLO, I.P.,GUERRA, H.L., STEINDEL,M.,ROMANHA, A.J. *Trypanosoma cruzi*: parasitaemia produced in mice does not seem to be related to in vitro parasite-cell interaction. **International Journal for Parasitology**, Elsevier 593 – 597

TSAKAS,S., MARMARAS,V.(2010). Insect immunity and its signaling: an overview. **Invert.Surv.J.** 7, 228–238.

UMEZAWA, E. S.; SHIKANAI-YASUDA, M. A.; STOLF, A. M. Changes in isotype composition and antigen recognition of anti-*Trypanosoma cruzi* antibodies from acute to chronic Chagas disease. **J Clin Lab Anal**, v. 10, n. 6, p. 407-413, 1996.

URDANETA-MORALES, S.; TEJERO, F. *Trypanosoma (Herpetosoma) rangeli* Tejera, 1920: mouse model for high, sustained parasitemia. **J Parasitol**, v. 71, n. 4, p. 409-14, 1985.

URSIC-BEDOYA, R.; BUCHHOP, J.; JOY, J. B.; DURVASULA, R.; LOWENBERGER, C. Prolixicin: a novel antimicrobial peptide isolated from *Rhodnius prolixus* with differential activity against bacteria and *Trypanosoma cruzi*. **Insect Mol Biol**, v. 20, n. 6, p. 775-786.

VALANNE,S.,WANG,J.H., RÄMET,M.(2011). The *Drosophila* Toll signaling pathway. **J. Immunol.** 186, 649–656.doi:10.4049/jimmunol.1002302

VALLEJO, G. A.; GUHL, F.; CHIARI, E.; MACEDO, A. M. Species specific detection of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* in vector and mammalian hosts by polymerase chain reaction amplification of kinetoplast minicircle DNA. **Acta Trop**, v. 72, n. 2, p. 203-212, 1999.

VAZQUEZ, M., LEVIN, M.J., 1999. Functional analysis of the intergenic regions of TcP2b gene loci allowed the construction of an improved *Trypanosoma cruzi* expression vector. **Gene** 239, 217–225.

VASQUEZ JE, KRUSNELL J, ORN A, SOUSA OE, HARRIS RA 1997. Serological diagnosis of *Trypanosoma rangeli* infected patients. A comparison of different methods and its implications for the diagnosis of Chagas' disease. **Scand J Immunol** 45: 322-330.

VIEIRA, C. S.; WANIEK, P. J.; MATTOS, D. P.; CASTRO, D. P.; MELLO, C. B.; RATCLIFFE, N. A.; GARCIA, E. S.; AZAMBUJA, P. Humoral responses in *Rhodnius prolixus*: bacterial feeding induces differential patterns of antibacterial activity and enhances mRNA levels of antimicrobial peptides in the midgut. **Parasit Vectors**, v. 7, n., p. 232.

ZELEDÓN R 1956. Hallazgo de formas evolutivas de *Trypanosoma rangeli*, Tejera 1920, en glândulas salivares de *Rhodnius prolixus*, Stal 1859, salvadoreños. **Rev Biol Trop** 4: 1-8.

ZELEDON, R. & BLANCO, E., 1965. Relaciones huésped-parásito em tripanosomiasis rangeli I.1- Infección intestinal y hemolinfática comparativa de *R.prolixus* y *T.infestans*. **Rev. Biol.Trop** 13: 143-156.

ZINGALES B, ANDRADE SG, BRIONES MRS, CAMPBELL DA, CHIARI E, FERNANDES O, GUHL F, LAGES-SILVA E, MACEDO AM, MACHADO CR, MILES MA, ROMANHA AJ, STURM NR, TIBAYRENC M, SCHIJMAN AG. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. **Mem Inst Oswaldo Cruz** 2009; 104 (7): 1051-4.

ZINGALES, B.; PEREIRA, M. E.; ALMEIDA, K. A.; UMEZAWA, E. S.; NEHME, N. S.; OLIVEIRA, R. P.; MACEDO, A.; SOUTO, R. P. Biological parameters and molecular markers of clone CL Brener--the reference organism of the *Trypanosoma cruzi* genome project. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 92, n. 6, p. 811-814, 1997.

WHITTEN, M.; SUN, F.; TEW, I.; SCHAUB, G.; SOUKOU, C.; NAPPI, A.; RATCLIFFE, N. Differential modulation of *Rhodnius prolixus* nitric oxide activities following challenge with *Trypanosoma rangeli*, *T. cruzi* and bacterial cell wall components. **Insect Biochem Mol Biol**, v. 37, n. 5, p. 440-452, 2007.

WHO, World Health Organization. Chagas disease (American trypanosomiasis) [on line] Jan 2015 [capturado 17 ago 2015]. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>.