

MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mestrado em Programa de Pós-Graduação Stricto sensu em Medicina Tropical

Estudos sobre a competência e a capacidade
vetorial de *Triatoma brasiliensis brasiliensis*,
Triatoma juazeirensis e seus híbridos experimentais,
sob condições de laboratório

Nathália Cordeiro Correia

Rio de Janeiro
Abril de 2015

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

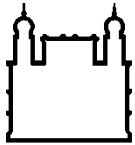
C824 Correia, Nathália Cordeiro

Estudos sobre a competência e a capacidade vetorial de *Triatoma brasiliensis brasiliensis*, *Triatoma juazeirensis* e seus híbridos experimentais, sob condições de laboratório / Nathália Cordeiro Correia. – Rio de Janeiro, 2015.
xiv, 98 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Medicina Tropical, 2015.
Bibliografia: f. 82-98

1. Doença de Chagas. 2. Infecção experimental. 3. Suscetibilidade.
4. Comportamento. I. Título.

CDD 616.9363



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical
Nível de Mestrado Acadêmico

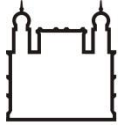
DISSERTAÇÃO

Nathália Cordeiro Correia

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical do IOC – FioCruz, nível de Mestrado Acadêmico como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientadores: Dra. Jane Margaret Costa
Dr. Carlos José de Carvalho Moreira

Rio de Janeiro – Brasil
Abril de 2015



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

**Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical
Nível de Mestrado Acadêmico**

Nathália Cordeiro Correia

“Estudos sobre a competência e a capacidade vetorial de *Triatoma brasiliensis brasiliensis*, *Triatoma juazeirensis* e seus híbridos experimentais, sob condições de laboratório”

**Orientadores: Dra. Jane Margaret Costa
Dr. Carlos José de Carvalho Moreira**

Aprovada em: 02 / 04 / 2015

EXAMINADORES:

Dra. Teresa Cristina Monte Gonçalves – Presidente (IOC - Fiocruz)

Dra. Jacenir Reis dos Santos Mallet (IOC - Fiocruz)

Dra. Suzete Araújo Oliveira Gomes (Instituto de Biologia - UFF)

Dra. Ângela Cristina Verissimo Junqueira (IOC - Fiocruz)

Dra. Simone Patrícia Carneiro Freitas (IOC - Fiocruz)

Rio de Janeiro, 02 de abril de 2015

AGRADECIMENTOS

À Dra. Jane Costa, por estar guiando meu caminho nesta jornada científica desde a iniciação científica. Suas correções e cobranças foram essenciais para o meu crescimento profissional.

Ao Dr. Carlos José de Carvalho Moreira, pelo auxílio na bancada, orientação e carinho. Em pouco tempo foi construído grande respeito e admiração.

À Dra. Teresa Cristina Monte Gonçalves e equipe do Laboratório de Transmissores de Leishmanioses, Setor de Entomologia Médica e Forense, por terem disponibilizado o insetário e pelo ótimo convívio diário.

À equipe do Laboratório de Doenças Parasitárias, em especial à Laura Cristina, Bárbara, Ms. Amanda, Maria José, Severino, Laura, Thalia. Obrigada pelo maravilhoso convívio que me proporcionaram e por terem me ajudado quando precisava.

Ao Prof. Pedro Cabelo, pelo auxílio nas análises estatísticas.

À Dra. Ana Jansen e equipe técnica por terem cedido as cepas utilizadas no trabalho e mantido a disponibilidade do laboratório.

À Ms. Vanessa Lima Neiva e Cátia Cabral, pelo auxílio na manutenção das colônias de insetos.

À coordenação do curso de mestrado, inicialmente ao Dr. Felipe Aníbal e atualmente à Dra. Martha Suarez, e ao corpo docente pela excelência no aprendizado. E ainda a todos os funcionários do apoio técnico, que sempre estiveram à disposição.

À CAPES e FAPERJ, pelo apoio financeiro neste trabalho.

Aos membros da banca examinadora, por se disponibilizarem a fazer uma

detalhada revisão do trabalho.

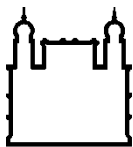
Aos queridos colegas e amigos do LABE, por fazerem do local de trabalho um ambiente agradável e amistoso. Aprendo um pouco mais todos os dias com vocês.

À Ms. Márcia Gumiel e ao Dr. Carlos Eduardo Almeida, que apesar da distância física se fizeram presentes em conselhos, recomendações ao trabalho, além de terem participado dessa trajetória desde a iniciação científica.

Aos colegas e amigos do curso de mestrado: Antônia, Bruno, Caroline, Deiviane, Jéssica, Luciana, Luzinei, Marjorie, Natalia Oliveira, Nathalia Beatriz, Tayany, por terem feito esse período ser muito agradável, devido à alegria constante.

Aos meus pais, por serem a rocha da minha vida, e me guiarem sempre em direção ao melhor caminho e às minhas tias que sempre me incentivam a crescer e vencer.

Aos meus maravilhosos amigos, que me acompanham durante tantos anos nesta trilha de aprendizado, sempre solícitos e atenciosos; entendendo como é necessário o tempo gasto para se dedicar aos estudos.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Estudos sobre a Competência e a Capacidade vetorial de *Triatoma brasiliensis brasiliensis*, *Triatoma juazeirensis* e seus híbridos experimentais, sob condições de laboratório

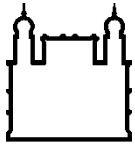
RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM MEDICINA TROPICAL

Nathália Cordeiro Correia

Triatoma b. brasiliensis, considerado um dos principais vetores da doença de Chagas nas áreas do semiárido nordestino brasileiro, faz parte de um complexo de espécies proposto por estudos multidisciplinares. Atualmente, neste complexo estão incluídos *Triatoma b. macromelasoma* e *Triatoma juazeirensis*, apresentando um padrão de distribuição parapátrico nos estados de Pernambuco e Bahia, respectivamente. Todas as espécies do complexo *T. brasiliensis* foram encontradas infectadas naturalmente por *Trypanosoma cruzi* e podem invadir e/ou colonizar as habitações demonstrando diferentes graus de adaptação aos ecótopos artificiais. Em laboratório, estas espécies podem se reproduzir e gerar obtidos híbridos férteis. Assim, a hipótese de existirem híbridos naturais foi testada por estudos morfométricos comparativos das asas e também do padrão cromático do pronoto. Os resultados sugeriram a existência de uma área de hibridação natural no estado de Pernambuco onde posteriormente uma alta variabilidade fenotípica foi registrada, corroborando a hipótese levantada. Pernambuco apresenta altos índices de infestação domiciliar por triatomíneos os quais podem ser encontrados em ecótopos naturais, portanto, os riscos de transmissão do agente etiológico e as possibilidades de reinfestação das casas demandam um constante monitoramento e controle dos vetores nas áreas habitadas. Este trabalho teve por objetivo comparar parâmetros relacionados à competência vetorial de ninfas de 5º estágio de *T. b. brasiliensis* e *T. juazeirensis* e de seus híbridos experimentais (Hjb - ♀ *T. juazeirensis* x ♂ *T. b. brasiliensis* e Hbj - ♀ *T. b. brasiliensis* x ♂ *T. juazeirensis*), obtidos por cruzamentos recíprocos entre as espécies. A suscetibilidade dos híbridos e parentais à infecção por *T. cruzi* foi analisada pela alimentação artificial com a cepa TcI 0354, e posteriormente dissecados nos períodos de 10, 20 e 30 dias. Os comportamentos alimentar e de defecação foram analisados comparativamente pelo: 1- registro do tempo de início do repasto sanguíneo em camundongos, 2- tempo de duração da alimentação, 3- tempo do término da alimentação e tempo e comportamento de defecação. Os insetos foram pesados antes e após a alimentação nos dois experimentos. Híbridos e parentais apresentaram-se infectados por *T. cruzi* durante os 30 dias após a alimentação infectante, predominantemente com epimastigotas. A quantidade de epimastigotas no estômago e no intestino de *T. juazeirensis* foi significativamente menor do que híbridos e *T. b. brasiliensis*. A população de tripomastigota metacíclica foi significativamente maior em híbridos no intestino e ampola retal. Os híbridos demonstraram-se mais suscetíveis à infecção por apresentarem estatisticamente um padrão da infecção ao longo do tempo mais homogêneo do que seus parentais. Não foi encontrada relação entre volume de sangue ingerido e taxa de infecção. Híbridos e parentais apresentaram voracidade, pois procuraram avidamente a fonte alimentar nas primeiras semanas. Após a segunda semana, os híbridos levaram mais tempo para iniciarem o repasto sanguíneo e ainda na primeira semana levaram mais tempo para defecar após a alimentação quando comparados aos parentais. *T. b. brasiliensis*, apresentou as menores médias de tempo para se aproximar da fonte alimentar e iniciar a alimentação, porém não foi estatisticamente diferente de *T. juazeirensis*. Todos os grupos defecaram próximo do camundongo, *T. b. brasiliensis* defecou mais vezes em menos de um minuto. Este trabalho ressalta a importância epidemiológica desta área em que são encontrados os fenótipos de *T. b. brasiliensis*, pois híbridos e parentais apresentaram características de bons vetores, sendo os híbridos mais suscetíveis à infecção pela cepa 0354 do que as espécies parentais, enquanto que os parentais apresentaram melhor comportamento alimentar e de defecação.

Palavras-chave: Doença de Chagas; Infecção experimental; Suscetibilidade; Comportamento



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Studies on the vectorial competence and capacity of *Triatoma brasiliensis brasiliensis*, *Triatoma juazeirensis* and their experimental hybrids, under laboratory conditions

ABSTRACT

MASTER DISSERTATION/PHD THESIS IN (example: MEDICINA TROPICAL)

Nathália Cordeiro Correia

Triatoma b. brasiliensis is considered one of the main vectors of Chagas disease in the Northeast Region of Brazil and belongs to a species complex proposed by multidisciplinary studies. In this species complex, is also included *Triatoma b. macromelasoma* and *Triatoma juazeirensis*, geographically distributed in a parapatric form in Pernambuco and Bahia States, respectively. All species of *Triatoma brasiliensis* complex can be found infected by *Trypanosoma cruzi* in nature and invading and/or colonizing human habitations with different degrees of adaptation to each artificial ecotope. Since experimental crossings between all of those species can result in fertile hybrids, there was a question whether those hybrids could naturally exist that was tested by morphometric comparisons of the wings and chromatic pattern of pronotum. It was latter suggested the existence of a natural hybridization zone in Pernambuco State in which there is a high phenotypic variability, in corroboration with the hypothesis raised. There are high rates of house infestation by triatomine in Pernambuco State, and it is also found insects in natural ecotopes, therefore there is a high risk of transmission of the etiological agent caused by the possibility of domiciliary reinfestations by insect vector, which demands constant monitoring and control of vectors. This study aimed to compare some of the parameters related to the vector competence of *T. b. brasiliensis*, *T. juazeirensis* and their experimental hybrids (Hjb - ♀ *T. juazeirensis* x ♂ *T. b. brasiliensis* and Hbj - ♀ *T. b. brasiliensis* x ♂ *T. juazeirensis*) in the 5th nymphal stage, obtained through reciprocal crosses. It was analyzed their susceptibility to infection with *T. cruzi* through artificial feeding with TcI 0354 strain, and then dissected in the 10th, 20th and 30th days after infection. The feeding and defecation behaviors were comparatively analyzed by the parameters: 1- the elapsed time for the insect to start feeding in mice, 2- the elapsed time between the end of feeding, 3- the defecation time and behavior were registered. We weighed the insects before and after both feeding experiments. Hybrids and parental species maintained infected with the 0354 strain of *T. cruzi* in the 30 days after the infective of experiment and the epimastigote was the most found form of the parasite. It was significantly lower the number of epimastigotes in the stomach and intestine of *T. juazeirensis* in comparison to hybrids and *T. b. brasiliensis*. It was detected a significantly higher percentage of metacyclic trypomastigotes in the intestine and rectum of hybrids. These hybrids demonstrated higher susceptibility to this strain because they present statistically a homogenous pattern of infection. It wasn't found any relationship between ingested blood volume and rates of infection. Hybrids and parental species showed feeding voraciously as they eagerly sought food source in the first weeks of feeding. After two weeks, hybrids took longer time to begin the blood meal. In addition, in the first week of observation the hybrids took more time for defecation after feeding when compared with parental species. *T. b. brasiliensis* showed the lowest average time to approach the food source and start feeding, but it was not statistically different from *T. juazeirensis*. All groups of insects defecated near or directly in the mouse but *T. b. brasiliensis* did it more times in less than 1 minute. This work stress the epidemiological importance in this geographical area of the phenotypes of *T. b. brasiliensis*, since either hybrids and their parental species presented vector capacity, although hybrids seem to be more susceptible to infection with 0354 *T. cruzi* strain than parental species, the latter presented better feeding and defecation behavior.

Key words: Chagas disease; Experimental infection; Susceptibility; Behaviour.

ÍNDICE

RESUMO.....	vi
ABSTRACT.....	vii
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Doença de Chagas.....	1
1.2 Vetores.....	3
1.3 <i>Trypanosoma cruzi</i>	5
1.4 Cenário epidemiológico da doença de Chagas.....	8
1.5 Doença de Chagas na região Nordeste	9
1.6 Complexo <i>Triatoma brasiliensis</i>	13
1.7 Suscetibilidade à infecção por <i>T. cruzi</i> em híbrido.....	16
1.8 Comportamento alimentar e de defecação.....	17
2. JUSTIFICATIVA	19
3. OBJETIVOS	21
3.1 Geral.....	21
3.2 Específicos.....	21
4. MATERIAL E MÉTODOS	22
4.1 Insetos	23
4.2 Cruzamentos em laboratório.....	23
4.3 Cultura de <i>T. cruzi</i>	25
4.4 Alimentação infectante dos insetos.....	26
4.5 Análise das formas de <i>T. cruzi</i> nos insetos.....	28
4.6 Comportamento alimentar e de defecação.....	30
4.7 Análises Estatísticas.....	31
5. RESULTADOS.....	32
5.1 Cruzamentos das espécies em laboratório.....	32
5.2 Suscetibilidade de <i>T. b. brasiliensis</i> , <i>T. juazeirensis</i> e híbridos à infecção por <i>T. cruzi</i>	32
5.2.1 Desenvolvimento de <i>T. cruzi</i> em Híbridos Hbj.....	34
5.2.2 Desenvolvimento de <i>T. cruzi</i> em Híbridos Hjb.....	37
5.2.3 Desenvolvimento de <i>T. cruzi</i> em <i>T. juazeirensis</i>	39
5.2.4 Desenvolvimento de <i>T. cruzi</i> em <i>T. b. brasiliensis</i>	41
5.2.5 Suscetibilidade à infecção e análises estatísticas.....	43

5.2.6	Volume de sangue ingerido.....	44
5.3	Comportamento alimentar e de defecação.....	46
5.3.1	Total de alimentações realizadas.....	46
5.3.2	Início da alimentação.....	46
5.3.3	Duração da alimentação e peso adquirido.....	48
5.3.4	Defecações Totais.....	50
5.3.5	Defecações durante a alimentação.....	51
5.3.6	Tempo de defecação até 1min após a alimentação.....	53
5.3.7	Tempo de defecação até 10min após a alimentação.....	53
5.3.8	Comportamento de defecação.....	55
6.	DISCUSSÃO.....	56
6.1	Cruzamento das espécies em laboratório.....	56
6.2	Suscetibilidade de <i>T. b. brasiliensis</i> , <i>T. juazeirensis</i> e híbridos à infecção por <i>T. cruzi</i>	58
6.2.1	Relação infecção x Quantidade de sangue ingerida.....	64
6.2.2	Suscetibilidade à infecção por <i>T. cruzi</i>	65
6.2.3	Dinâmica da infecção nos híbridos.....	67
6.3	Comportamento alimentar e de defecação.....	70
6.3.1	Voracidade.....	70
6.3.2	Duração da alimentação.....	72
6.3.3	Ingestão de sangue.....	73
6.3.4	Tempo de defecação e comportamento.....	76
7.	CONCLUSÕES.....	80
8.	PERSPECTIVAS.....	81
9.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	82

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1: Municípios com a presença de triatomíneos e com alto risco de transmissão vetorial da doença de Chagas, sujeitos a serem beneficiados pelo Programa de Melhoria Habitacional da FUNASA (Fonte: FUNASA, 2006).....9

Figura 4.1: Comparação de tamanho entre as espécies e os híbridos provenientes do cruzamento dos triatomíneos. Adultos (A-D) (barra = 25 mm) e ninfas de 5º estágio de desenvolvimento (A'-D') (barra = 20 mm) das espécies: *T. b. brasiliensis* (A e A') e *T. juazeirensis* (B e B') e seus híbridos "Hbj" (♀ *T. b. brasiliensis* x ♂ *T. juazeirensis*) (C e C') e "Hjb" (♀ *T. juazeirensis* x ♂ *T. b. brasiliensis*) (D e D').....24

Figura 4.2: Curva de crescimento de cepas de *Trypanosoma cruzi*. Formas epimastigotas (Epi), formas em transição (Trans) e tripomastigotas (Tripo) da cepa 0354, crescida em meio LIT por 7 dias. O número de parasitos foi mensurado pela contagem em câmara de Neubauer em microscópio óptico. Média de duplicatas.....26

Figura 4.3: Alimentação artificial, dos triatomíneos, em banho-maria com sangue de coelho.....27

Figura 4.4: Identificação dos insetos para posterior pesagem individual. Padrão de marcação dos insetos em diferentes sequências: (A) nas pernas nos triatomíneos correspondentes de 1 – 30; e (B) pernas e pronoto nos triatomíneos correspondentes de 31 – 60.....28

Figura 4.5: Material biológico dos triatomíneos para análise de infecção. (A) Tubos de Eppendorfs individualizados por inseto, contendo: estômago, intestino e ampola retal dos 10 espécimes dissecados no dia. (B) Divisão do tubo digestório: estômago, intestino e ampola retal (aumento x40)..... 29

Figura 4.6: Triatomíneos separados para pesagem e alimentação. (A e B) Frascos contendo as ninfas de 5º estágio de *T. b. brasiliensis*, *T. juazeirensis* e os híbridos (Hbj e Hjb), individualizados. (C) Triatomíneo se alimentando individualmente em camundongo.....31

Figura 5.1: As diferentes formas de *Trypanosoma cruzi* encontradas ao longo do tubo digestório dos híbridos Hbj (♀ *T. b. brasiliensis* x ♂ *T. juazeirensis*). (A) Formas epimastigotas, (B) tripomastigotas e (C) formas de transição (aumento de x100).....34

Figura 5.2: Desenvolvimento de *Trypanosoma cruzi* (cepa 0354) no híbrido Hbj (♀ *T. b. brasiliensis* x ♂ *T. juazeirensis*) nos 10º, 20º e 30º dias após alimentação infectante: (A) Estômago; (B) Intestino; (C) Ampola retal. A coluna preta representa a forma epimastigota, a coluna cinza representa as formas transitórias e a coluna bege os tripomastigotas metacíclicos.....36

Figura 5.3: Desenvolvimento de *Trypanosoma cruzi* (cepa 0354) no híbrido Hjb (cruzamento de ♀ *T. juazeirensis* x ♂ *T. b. brasiliensis*) nos 10^o e 20^o dias após alimentação infectante. (A) Estômago; (B) Intestino; (C) Ampola retal. A coluna preta representa a forma epimastigota, a coluna cinza representa as formas de transição e a coluna bege os tripomastigotas metacíclicos.....38

Figura 5.4: Desenvolvimento de *Trypanosoma cruzi* (cepa 0354) em *T. juazeirensis* nos 10^o e 20^o dias após alimentação infectante. (A) Estômago; (B) Intestino; (C) Ampola retal. A coluna preta representa a forma epimastigota, a coluna cinza representa as formas de transição e a coluna bege os tripomastigotas metacíclicos.....40

Figura 5.5: Desenvolvimento de *Trypanosoma cruzi* (cepa 0354) em *T. b. brasiliensis* nos 10^o e 20^o dias após alimentação infectante. (A) Estômago; (B) Intestino; (C) Ampola retal. A coluna vinho representa a forma epimastigota, a coluna rosa representa as formas de transição e a coluna laranja os tripomastigotas metacíclicos.....42

Figura 5.6: Densidade populacional de *Trypanosoma cruzi* (cepa 0354) nos híbridos Hbj e Hjb e em *Triatoma juazeirensis* e *Triatoma b. brasiliensis* nos 10^o, 20^o e 30^o dias após alimentação infectante.....44

Figura 5.7: Tempo médio (em minutos) do início da alimentação em que os espécimes de 5^o estágio de Hbj, Hjb, *Triatoma b. brasiliensis* e *Triatoma juazeirensis*, no período de cinco semanas.....47

Figura 5.8: Média e desvio padrão de peso (mg) adquirido semanalmente, após alimentação. Quantidade de espécimes observados: Hbj 1^a à 10^a semana (n=30); Hjb 1^a à 10^a (n=12); *T. b. brasiliensis* 1^a à 6^a (n=30), 7 e 8 (n=19), 9 e 10 (n=18) e *T. juazeirensis* 1^a à 6^a (n=30), 7 e 8 (n=27), 9 e 10 (n=20).....50

Figura 5.9: Porcentagem de defecações que ocorreram durante o repasto (barra cinza escura) e após o repasto (barra cinza clara). Nos híbridos: Hbj (n= 30); Hjb (n= 12); e nos parentais: *T. b. brasiliensis* (n= 30) e *T. juazeirensis* (n= 30).....52

Figura 5.10: Porcentagem de defecações dos espécimes observados até 10min após o repasto.....54

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1.1: Casos confirmados de doença de Chagas aguda por Unidade Federativa nos períodos de 2001 a 2006. Fonte: Ministério da Saúde/SVS - SINAN.....	11
Tabela 1.2: Casos confirmados de doença de Chagas aguda por Unidade Federativa nos períodos de 2007 a 2013. Fonte: Ministério da Saúde/SVS - Sinan NET.....	12
Tabela 4.1: Dados das espécies fundadoras das colônias utilizadas no estudo.....	23
Tabela 5.1: Porcentagem das formas de <i>Trypanosoma cruzi</i> encontradas por compartimento do tubo digestório (estômago, intestino e ampola retal), nos 10 ^o , 20 ^o e 30 ^o dias após a infecção. <i>Triatoma juazeirensis</i> , <i>Triatoma b. brasiliensis</i> e seus híbridos Hbj (♀ <i>T. b. brasiliensis</i> x ♂ <i>T. juazeirensis</i>) e Hjb (♀ <i>T. juazeirensis</i> x ♂ <i>T. b. brasiliensis</i>).....	33
Tabela 5.2: Volume de sangue ingerido (mg) e densidade parasitária encontrada nos espécimes nos 10 ^o , 20 ^o e 30 ^o dias após a infecção.....	45
Tabela 5.3: Percentual de repastos semanais pelos espécimes.....	46
Tabela 5.4: Tempo médio (\bar{X}), Desvio Padrão (DP) e amplitudes: Mínima (Mín) e Máxima (Máx), em minutos da duração do repasto semanal realizada pelos espécimes (n) de Hbj e Hjb e <i>Triatoma b. brasiliensis</i> e <i>Triatoma juazeirensis</i>	49
Tabela 5.5: Porcentagem do total de defecações realizadas e porcentagem de insetos no 5 ^o estágio, que defecaram mais de uma vez na mesma alimentação.....	51

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

- Hbj – híbridos F1 do cruzamento de ♀ *T. b. brasiliensis* x ♂ *T. juazeirensis*
Hjb – híbridos F1 do cruzamento de ♀ *T. juazeirensis* x ♂ *T. b. brasiliensis*
epi – formas epimastigotas
trans – formas transitórias
tripo – formas tripomastigotas metacíclicas
UF – unidade federativa do Brasil
Ign – casos ignorados
RN – Estado do Rio Grande do Norte
BA – Estado da Bahia
X – média aritmética
DP – desvio padrão
mín. – mínimo
máx. – máximo
mg – miligramas
min – minutos
n – número de exemplares
ml – miligramas
INCOSUL - Iniciativa do Cone Sul
OPAS – Organização Pan-Americana da Saúde
DTU's – Discrete Typing Units
WHO – World Health Organization
FUNASA – Fundação Nacional de Saúde
DATASUS – departamento de informatização das atividades do Sistema Único de Saúde
IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
SVS – Secretaria de Vigilância em Saúde
SINAN – Sistema de Informação de Agravos de Notificação
PE – Estado de Pernambuco
DNA mt – ácido desoxirribonucleico mitocondrial
RNA r – ribossomal ribonucleic acid (ácido ribonucleico ribossomal)
ITS-2 – marcador molecular (Internal Transcribed Spacer 2)

DNA – deoxyribonucleic acid (ácido desoxirribonucleico)

Cyt b – cytochrome b (citocromo b)

COLTRYP – Coleção de *Trypanosoma* de Mamíferos Silvestres, Domésticos e Vetores, do Instituto Oswaldo Cruz.

PCR – Polymerase Chain Reaction (reação em cadeia da polimerase).

BOD – Estufas incubadoras de Demanda Bioquímica de Oxigênio

NNN – Meio de cultura bifásico (Neal, Novy, Nicolle)

LIT – Meio de cultura Liver Infusion Tryptose (infusão de fígado e triptose)

V/V – Volume/Volume

PBS – Phosphate Buffered Saline. Solução tampão de fosfato-salino.

ANOVA – Análise de variância. Técnica estatística que avalia médias de populações.

SPSS – Statistical Package for the Social Sciences. Programa de computador para cálculos estatísticos.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Doença de Chagas

Estudando os casos de malária na região de Lassance, norte de Minas Gerais, em abril de 1909, o pesquisador Carlos Chagas descobriu uma nova endemia, a doença de Chagas ou tripanossomíase americana (Chagas 1909; Lent 1999), que se tratava de uma antropozoonose causada pelo protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) e transmitida por insetos hematófagos da subfamília Triatominae (Hemiptera: Reduviidae) (Lent & Wygodzinsky 1979).

Num cenário em que o parasito vivia restrito à área silvestre, mantendo-se no ambiente natural circulando entre o inseto vetor e mamíferos, o homem se inseriu no ciclo epidemiológico da doença de Chagas ao invadir esse ambiente, juntamente com os seus animais domésticos (Coura 2007). Este evento propiciou que os insetos vetores explorassem novos ecótopos e infestassem o domicílio e peridomicílio, como por exemplo, casas de pau-a-pique (barro e madeira), habitações típicas das zonas rurais, e lugares de criação de animais, como galinheiros e currais, formando-se assim um ciclo domiciliar e peridomiciliar do parasito (Dias 1986; Kropft 2009). Assim, neste contexto a doença de Chagas passou a ser considerada uma enfermidade quase exclusiva de áreas rurais (Coura 2007).

Até hoje, os triatomíneos ainda são associados a casas de construção precária, porém devido o processo de urbanização das zonas rurais passaram a ser encontrados também em casas de alvenaria (Almeida *et al.* 2009) e até mesmo nas grandes capitais como, por exemplo Salvador (BA) e São Luís (MA) (Brazil *et al.* 1985; Dias-Lima & Sherlock 2000; Coura & Viñas 2010).

Nas regiões endêmicas da doença, a principal forma de transmissão ocorre pelo contato com as fezes contaminadas dos triatomíneos, via lesão ocasionada pela picada do inseto ou nas mucosas (Dias 2006). Porém há uma preocupação quanto as regiões não endêmicas, devido ao grande fluxo migratório atualmente, falta de controle dos bancos de sangue e ainda a presença de triatomíneos não infectados nestas áreas, poderia desencadear o ciclo de transmissão. Motivo pelo qual é necessária a melhoria do sistema de vigilância nacional e internacional, além da disseminação de informações a respeito da doença nestas regiões (Coura & Viñas 2010).

As outras formas de transmissão são por via transplacentária, transfusão de sangue, transplante de órgãos, via oral e poucos casos relacionados à acidentes de laboratório (Vinhaes & Dias 2000).

Com o controle vetorial e a crescente ocupação da região amazônica, são crescentes os casos de doença de Chagas por via oral, em regiões não endêmicas, sob a forma de surtos epidêmicos que acontecem em decorrência do consumo de alimentos contaminados com triatomíneos triturados ou as suas fezes e também através do consumo de carne mal cozida de animais silvestres (Junqueira *et al.* 2011). A via oral poderia explicar melhor como ocorre a infecção de predadores na natureza ao contrário da contaminação por fezes, pois a densa pelagem desses animais poderia ser uma barreira para o parasito penetrar a pele (Guarneri *et al.* 2012).

São muitas as manifestações da doença, que ocorrem de acordo com o tropismo celular do parasito. Na fase aguda ocorre uma infecção generalizada, em que é possível encontrar o parasito no coração, trato gastro-intestinal e sistema nervoso. Porém nem sempre essas manifestações estão presentes em indivíduos infectados, tratando-se, neste caso, de casos assintomáticos ou oligossintomáticos (poucos sintomas) (Junqueira *et al.* 2011; Siqueira-Batista *et al.* 2007).

Quando o paciente entra na fase crônica da doença, passa a apresentar baixos níveis de parasitemia, isto é, não se encontra ou há muito pouco parasito na corrente sanguínea, quase indetectáveis pelos métodos parasitológicos diretos. As diferentes formas da doença são determinadas de acordo com os tipos de lesões, sendo a forma indeterminada com ausência de manifestações clínicas (normalmente provenientes de pacientes que eram assintomáticos), forma cardíaca (com alterações cardíacas) e forma digestiva (lesões gastro-intestinais, geralmente observada com megaesôfago e megacólon), as quais podem aparecer anos após a infecção (Junqueira *et al.* 2011; Siqueira-Batista *et al.* 2007).

O tratamento mais eficaz conhecido é pelo uso das drogas benznidasol ou benznidasol e nifurtimox. Ambas são eficazes em 80% dos casos agudos, somente se administrado no início da infecção e 20% dos casos crônicos. Porém, nifurtimox não está disponível no Brasil e o uso de benznidasol é restrito às clínicas especializadas, pois requer monitorização médica durante o

curso do tratamento. Há ainda a problemática dos efeitos colaterais significativos produzidos por ambas as drogas e a resistência ao tratamento por algumas cepas de *T. cruzi* (Coura 2009).

1.2 Vetores

Os triatomíneos são insetos da família Reduviidae (ordem Hemiptera, subordem Heteroptera), composta em sua maioria por insetos predadores, sendo a única exceção a subfamília Triatominae que é obrigatoriamente hematófaga em todas as fases da vida. Apresentam o comportamento de solenofagia, em que retiram o sangue diretamente dos vasos sanguíneos, com sua probóscide longa e flexível. Esta forma de alimentação reduz o dano tecidual, minimizando o desencadeamento das respostas fisiológicas de reparo no sítio da alimentação (Costa-Lima 1940; Lent & Wygodzinsky 1979; Silva 2009).

A última atualização da lista de triatomíneos contabiliza 148 espécies válidas, distribuídas em 18 gêneros e cinco tribos. A maioria destas espécies é encontrada na região neotropical e algumas poucas podem ser encontradas nos Estados Unidos, centro-sul da África, sudeste da Ásia e norte da Austrália. No Brasil, foram registradas até o momento 64 espécies (Galvão *et al.* 2003; Jurberg *et al.* 2014).

Os vetores da doença de Chagas estão distribuídos desde o sul dos Estados Unidos até o sul da Argentina, porém a maioria dos casos de infecção humana se concentra na América Latina (Rey 2002). Em julho de 1991 foi realizada uma reunião entre os países endêmicos de doença de Chagas na América Latina, a Iniciativa do Cone Sul (INCOSUL), programa de cooperação internacional no combate a endemia, em que participaram os países da América do Sul: Argentina, Brasil, Chile, Uruguai, Paraguai e Bolívia, onde se situam mais de dois terços dos portadores da doença de Chagas das Américas (Schmunis 1991; Dias 2007).

Triatoma infestans (Klug 1834) era o principal vetor do Cone Sul, que distribuía-se desde a Patagônia até o nordeste do Brasil e sul do Peru (Dias *et al.* 2013), sendo assim o foco de eliminação pelo programa. Em 2006 foi conferido, pela Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS) ao Brasil, o certificado de eliminação de *T. infestans* nas áreas de infestação através do

controle químico (inseticidas piretróides), além do rigoroso controle nos bancos de sangue (Silveira & Vinhaes 1999; Dias 2007; Silveira 2011). No Brasil, ocorrem ainda outras espécies nativas que colonizam domicílios humanos, como *Panstrongylus megistus* (Burmeister, 1835), *Triatoma brasiliensis* Neiva, 1911, *Triatoma pseudomaculata* Corrêa & Espínola, 1964, e *Rhodnius nasutus* Stål, 1859, entre outros (Dias 2007).

O habitat natural dos triatomíneos é de forma geral em abrigos que podem ser constituídos por frestas em complexos rochosos, ninhos de animais silvestres tais como aves, répteis, mamíferos de pequeno porte, como roedores, morcegos e marsupiais. Seu habitat varia de acordo com a espécie de triatomíneo e a região em que ela se encontra, pois, estes insetos tendem a se alojar perto ou no local onde se encontra sua fonte alimentar (Lent & Wygodzinsky 1979).

Das espécies que conseguiram se adaptar às habitações humanas e seus entornos, algumas conseguiram se instalar formando colônias e se alimentando quase exclusivamente do homem e seus animais domésticos (Dias 1994).

De acordo com a variedade de habitats das diferentes espécies de triatomíneos podemos classificá-los como silvestres, domiciliados e peridomiciliados. Tanto os silvestres quanto os peridomiciliados podem ocasionalmente invadir as casas atraídos pela luz (Bos 1988). Os triatomíneos apresentam hábito noturno quando associados com vertebrados, como os humanos, sendo assim durante o dia adentra as frestas das paredes, coberturas das casas, e qualquer outro esconderijo, como telhas e madeiras empilhadas ao redor da casa e durante a noite sai para realizar seu repasto sanguíneo (Lazzari 1992).

O ciclo de vida dos triatomíneos se inicia com a oviposição da fêmea, seguida de cinco fases ninfais e o adulto. Para o seu desenvolvimento realizam o hematofagismo em todas as fases, assim como para as fêmeas é importante para a oviposição (Costa-Lima 1940; Lent & Wygodzinsky 1979; Silva 2009).

O hábito hematofágico possibilita que o parasito *T. cruzi* mantenha o seu ciclo de vida nos insetos (triatomíneos) e nos hospedeiros vertebrados (mamíferos) causando a doença de Chagas (Silva 2009).

No triatomíneo, o parasito se desenvolve ao longo do trato intestinal.

Este é dividido em três regiões: intestino anterior, médio (estômago e intestino) e posterior. Estas regiões se diferem na sua morfologia e funções e, portanto, nas condições microambientais a que os parasitos estarão expostos (Guarneri *et al.* 2012; Junqueira *et al.* 2011; Ramírez-Pérez 1969; Silva 2009).

O processo de digestão do triatomíneo inicia-se no intestino anterior, pelo contato com substâncias produzidas pelas glândulas salivares. No estômago, o sangue é estocado e ocorre a lise dos eritrócitos (Azambuja *et al.* 1999). Poucas horas após a ingestão de sangue, camadas de membranas perimicrovilares se desenvolvem, formando um espaço entre ela e as membranas microvilares, criando diferentes compartimentos para as enzimas digestivas (Burgos e Gutierrez 1976; Guarneri *et al.* 2012).

Todo intestino médio contém no seu lúmen a membrana perimicrovilar, que envolve o alimento ingerido (Gonzalez *et al.* 1999), e separa o conteúdo luminal em dois compartimentos, o espaço endoperitrófico e ectoperitrófico (Silva *et al.* 2012). A ampola retal é um saco muscular onde ficam retidas as fezes e urina, que podem conter o *T. cruzi*, e que serão juntamente eliminadas pelo reto (Junqueira *et al.* 2011).

A capacidade vetorial destes insetos está relacionada aos seus parâmetros ecológicos, comportamentais e fisiológicos que permitem seu contato direto com o hospedeiro e o parasito. Dentre esses parâmetros a eficiência que o inseto apresenta para realizar o repasto sanguíneo é considerado como um dos principais fatores para o sucesso do parasito. O maior número de repastos sanguíneos realizado pelo inseto aumenta a probabilidade de que ele se infecte e transmita o parasito para diferentes hospedeiros vertebrados. Ao se alimentar, há um estímulo da digestão, aumentando as chances de defecação ainda sobre o hospedeiro, e a probabilidade de transmissão do parasito para o hospedeiro vertebrado (Silva 2009).

1.3 *Trypanosoma cruzi*

O protozoário *Trypanosoma cruzi* é flagelado com um núcleo e uma organela, o cinetoplasto, que concentra o seu DNA extracelular (k-DNA), característica que o inclui na ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae

(Brener 1977). Sua reprodução é assexuada por divisão binária. Trata-se de um parasito heteroxênio, que pode ser encontrado infectando uma ampla variedade de hospedeiros mamíferos e espécies de triatomíneos, nos mais diferentes ecótopos, como: nos desertos norte-americanos, nos altiplanos andinos, nas florestas amazônica e atlântica e no complexo caatinga-cerrado-pampa úmido. Em alguns desses ecótopos pode ser encontrado também outro parasito, *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920, infectando mamíferos e triatomíneos, porém diferente de *T. cruzi*, não é patogênico ao homem (Junqueira *et al.* 2011).

Trypanosoma cruzi apresenta diferentes formas evolutivas no hospedeiro vertebrado e no inseto vetor. Ao longo do seu ciclo vital, suas alterações morfológicas são mais representativas do que qualquer outro organismo da família Trypanosomatidae (Kollien & Shaub 2000). A superfície celular dessas diferentes formas é constituída por macromoléculas de composição variável, o que reflete na interação do parasito com a célula hospedeira (Junqueira *et al.* 2011).

A forma amastigota é arredondada sem flagelo exteriorizado, e realiza divisão binária intracelular em mamíferos. A forma epimastigota é móvel e se multiplica no intestino do inseto; seu cinetoplasto é anterior ao núcleo e a membrana ondulante é menos evidente do que na forma tripomastigota. Esta não se multiplica, é extracelular de ampla movimentação, e pode ser encontrada no hospedeiro vertebrado no sangue periférico sendo denominada tripomastigota sanguínea, e no hospedeiro invertebrado, no intestino posterior, mais precisamente na ampola retal, denominada tripomastigota metacíclico. Nesta forma, o corpo celular é fusiforme, com um grande núcleo mediano e o cinetoplasto na região posterior. Seu flagelo é longo, emergindo do corpúsculo basal e percorrendo todo o corpo celular no sentido longitudinal, fazendo protrar a membrana celular caracteristicamente em forma de “membrana ondulante”. Do polo anterior do parasito sai a porção livre do flagelo (Dias *et al.* 2013).

No hospedeiro mamífero, logo após a penetração, o *T. cruzi* em sua forma de tripomastigota metacíclica invade diferentes tipos de células, por fagocitose, endocitose ou penetração ativa, para que não sejam destruídos pelo sistema imune do hospedeiro, diferenciando-se posteriormente em

amastigotas. O parasito tem tropismo por células musculares estriadas e lisas, macrófagos e também por células epiteliais e fibroblastos. As formas amastigotas dividem-se por divisão binária, saturando o citoplasma das células que se rompem e liberam as tripomastigotas, que caem na circulação sanguínea, algumas indo infectar novas células e reiniciar o ciclo (Kollien & Schaub 2000).

O triatomíneo atraído pela temperatura corporal, CO₂ e outros fatores inerentes do hospedeiro, ao sugar o sangue do hospedeiro vertebrado infectado, ingere as formas tripomastigotas sanguíneas. Neste novo ambiente, o parasito se depara com o primeiro obstáculo para sua sobrevivência, a saliva do inseto, que possui componentes que podem lisá-los (Kollien & Schaub 2000).

Em sequência, sofrem a pressão seletiva no estômago onde encontram enzimas digestivas, lectinas, aglutininas, diferenças na temperatura, osmolaridade e pH, que são capazes de causar a morte. Os parasitos que conseguem passar por essas barreiras iniciam a transformação em epimastigotas e/ou esferomastigotas, à medida que migram pelas diferentes porções do intestino do inseto e também ao mesmo tempo se multiplicam, tornando-se abundantes no intestino médio. Nesta região algumas formas epimastigotas permanecem se multiplicando intensamente por divisão binária ao longo da vida do inseto, outros irão se aderir pelo flagelo ao epitélio do intestino, na membrana perimicrovilar, o que acontece através da interação com glicoinositolfosfolipídios, proteínas e glicoproteínas presentes na membrana do parasito. Alguns desses epimastigotas migram para a região posterior do tubo digestório, a ampola retal, onde se diferenciam em tripomastigotas metacíclicas, processo denominado de metaciclogênese (Dias *et al.* 2013).

No ato da excreção das fezes, das fezes e urina ou ainda somente a urina, as formas tripomastigotas metacíclicas infectantes para o hospedeiro vertebrado, são eliminadas. Todo este ciclo se completa de 2 a 4 semanas, dependendo da quantidade de parasito ingerida e da adaptação da cepa ao inseto vetor (Guarneri *et al.* 2012; Dias *et al.* 2013).

De acordo com Alvarenga & Bronfen (1997) a interação de uma cepa de *T. cruzi* com determinada espécie de vetor pode modificar a proporcionalidade

do número de epimastigotas, esferomastigotas e tripomastigotas metacíclicos, no trato digestório deste vetor.

As cepas de *T. cruzi* apresentam diversidade biológica, bioquímica, molecular e genética, além de sua complexidade eco-epidemiológica. Estas diferentes características implicam em diferentes níveis de adaptação às diferentes espécies vetoras, variações na suscetibilidade a quimioterápicos, tendências histiotrópicas nos hospedeiros vertebrados, etc (Zingales *et al.* 2009).

A mais recente classificação utilizou como ferramenta marcadores moleculares, subdividindo o táxon de *T. cruzi* em seis linhagens ou DTUs (Discret Taxonomic Units): TCI, TCII, TCIII, TCIV, TCV e TCVI (Zingales *et al.* 2009). Parasitos referentes a diferentes DTUs apresentam distribuição geográfica distinta. A prevalência da DTU I, por exemplo, é encontrada em pacientes do México, América Central, países do Norte da América do Sul e Amazônia, que apresentam em sua maioria a forma indeterminada e cardíaca da doença (Zingales *et al.* 2011).

1.4 Cenário epidemiológico da doença de Chagas

Apesar dos esforços para o controle da doença, na América Latina permanece tendo grande importância à saúde pública, uma vez que atualmente 7 à 8 milhões de pessoas ainda estão infectadas com *T. cruzi* (WHO 2014). Na lista de doenças negligenciadas na América Latina encontra-se no topo juntamente com as helmintíases e o impacto é relevante, chegando a ser de 5 a 10 vezes maior do que a malária (Hotez *et al.* 2008). Além disso, ainda não foi desenvolvida nenhuma vacina ou droga para eliminar a infecção causada pelo parasito na fase crônica da doença, sendo esta a causa de alta morbimortalidade (Vinhaes & Dias 2000; Dias *et al.* 2009).

Como em quase todos os casos, com a exceção da migração de populações, o triatomíneo está sempre envolvido na transmissão, seja direta ou indiretamente, então a maioria dos esforços na atenuação da doença enfoca na interrupção da transmissão vetorial natural, controlando vetores nos domicílios com inseticidas piretróides (Silveira & Vinhaes 1999; WHO 2014).

Diotaiuti *et al.* (2000) comentaram sobre a dificuldade do controle vetorial devido a capacidade que algumas espécies de triatomíneos têm de persistir e colonizar casas já borrifadas com piretróides.

A FUNASA (Fundação Nacional de Saúde) iniciou um programa de melhoria das habitações nas regiões endêmicas de doença de Chagas, cujas condições físicas favoreciam a instalação do inseto vetor. Reforçando o projeto implantou-se ações de caráter educativo, desenvolvidas simultaneamente junto às comunidades beneficiadas (Fig. 1.1) (FUNASA 2006).



Figura 1.1: Municípios com a presença de triatomíneos e com alto risco de transmissão vetorial da doença de Chagas, sujeitos a serem beneficiados pelo Programa de Melhoria Habitacional da FUNASA (Fonte: FUNASA, 2006).

1.5 Doença de Chagas na região Nordeste

Desde a introdução das políticas de controle de transmissão vetorial, o Brasil demonstrou redução na mortalidade por casos de doença de Chagas aguda, mas ainda assim continuou apresentando casos anuais, permanecendo como agravo de relevante importância (Braz *et al.* 2011).

No Brasil, a região Nordeste é a segunda maior região com casos agudos e índice de infestação triatomínica. Apresenta uma diversidade de espécies de triatomíneos, que correspondem a 50% de todas as espécies registradas no Brasil, onde os vetores habitam os mais diversos biomas, dentre eles cita-se a floresta tropical e subtropical, onde podem ser encontrados

Triatoma sordida (Stål, 1989), *Triatoma vitticeps* (Stål, 1989), *Panstrongylus diasi* Pinto & Lent, 1946, *Panstrongylus lutzi* (Neiva & Pinto, 1923), *Panstrongylus megistus* (Burmeister, 1835), nos cerrados e caatingas encontra-se *T. brasiliensis*, *Triatoma rubrofasciata* (De Geer, 1773), *T. sordida*, nas florestas secas, tropicais e subtropicais *Psammolestes tertius* Lent & Jurberg, 1965, *Triatoma costalimai* Verano & Galvão, 1958, *T. pseudomaculata*, *T. sordida*, *P. megistus* e *Panstrongylus geniculatus* (Latreille, 1811) e nas florestas xerofíticas onde se encontra *T. brasiliensis*, *T. costalimai*, *T. sordida*, *P. diasi* e *P. geniculatus* (Forattini 1980; Schofield 1994; Carcavallo *et al.* 1997; Dias *et al.* 2000; Costa & Lorenzo 2009).

No período de 2001 a 2006 a região Nordeste apresentava o maior número de casos confirmados de doença de Chagas do Brasil (Tab. 1.1), com uma população total de 27,83% de todo o território brasileiro (Dias *et al.* 2000; DATASUS 2006; IBGE 2010). No estado da Bahia foi confirmado 403 casos de doença de Chagas aguda, sendo este o maior número de casos agudos da infecção neste período.

Tabela 1.1: Casos confirmados de doença de Chagas aguda por Unidade Federativa nos períodos de 2001 a 2006. Fonte: Ministério da Saúde/SVS - SINAN.

UF	Ano						Total
	2001	2002	2003	2004	2005	2006	
Ign/Em Branco	22	66	96	78	80	113	455
Bahia	15	54	132	84	85	33	403
Rio Grande do Norte	13	18	116	20	36	12	215
Pernambuco	5	44	49	37	20	12	167
Pará	0	17	25	20	10	94	166
Piauí	25	20	34	3	36	21	139
Rio Grande do Sul	9	21	20	20	15	13	98
Minas Gerais	3	10	12	20	23	17	85
Sergipe	8	3	4	16	30	23	84
Paraíba	4	3	18	14	15	14	68
Amapá	11	7	6	17	13	8	62
Alagoas	7	8	15	8	11	4	53
Ceará	0	3	15	4	12	10	44
Santa Catarina	3	1	4	8	25	2	43
Goiás	1	3	5	2	7	10	28
Rondônia	2	1	8	3	9	2	25
Mato Grosso do Sul	0	2	6	9	4	0	21
Amazonas	0	0	1	10	3	2	16
Paraná	1	2	5	3	5	0	16
Maranhão	1	2	4	4	0	3	14
São Paulo	1	1	4	3	2	3	14
Espírito Santo	2	4	1	2	3	0	12
Mato Grosso	2	3	1	1	1	1	9
Rio de Janeiro	0	2	1	1	3	0	7
Acre	0	1	1	1	0	1	4
Tocantins	0	0	1	0	0	0	1
Distrito Federal	0	0	1	0	0	0	1
Total	135	296	585	388	448	398	2250

Após o ano de 2006 houve um grande declínio no número de casos agudos (Tab. 1.2) e mortes no país. Este fato pode ser explicado devido à eficiência dos programas de controle na transmissão vetorial, ou por falhas na notificação dos casos. O estado da Bahia, por exemplo, não apresentou nenhum caso no período de 2007 a 2013.

Porém, um estudo realizado em Pernambuco mostrou que nesta área e na região Nordeste como um todo não foi observada redução de casos de mortes pela doença, como houve nacionalmente, que poderia sugerir que o

controle e a prevenção da doença de Chagas nesta região foram negligenciados, resultando na emergência de novos casos e no aumento na taxa de mortalidade, decorrente de casos crônicos (Braz *et al.* 2011).

Tabela 1.2: Casos confirmados de doença de Chagas aguda por Unidade Federativa nos períodos de 2007 a 2013. Fonte: Ministério da Saúde/SVS - SINAN NET

UF	Ano							Total
	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	
Pará	110	59	204	22	204	154	111	864
Amapá	12	33	6	0	22	10	8	91
Amazonas	28	0	4	24	0	3	4	63
Tocantins	1	2	3	0	30	0	0	36
Maranhão	2	5	4	0	20	0	0	31
Goiás	0	0	0	0	10	0	0	10
Piauí	1	1	0	0	2	0	0	4
Pernambuco	0	0	0	0	2	0	2	4
Rio Grande do Norte	0	0	0	0	0	1	2	3
Mato Grosso	1	0	0	0	2	0	0	3
Rondônia	0	0	0	0	2	0	0	2
Acre	0	0	1	0	0	0	1	2
Minas Gerais	0	0	0	0	0	0	2	2
Espírito Santo	0	0	0	0	1	1	0	2
Rio Grande do Sul	0	0	0	0	0	1	1	2
Mato Grosso do Sul	0	0	2	0	0	0	0	2
Roraima	0	0	0	0	0	1	0	1
Ceará	0	1	0	0	0	0	0	1
Paraíba	0	0	0	0	1	0	0	1
Sergipe	0	0	0	0	0	0	1	1
Rio de Janeiro	0	0	0	0	0	1	0	1
São Paulo	0	0	0	0	0	0	1	1
Total	155	101	224	46	296	172	133	1127

Dados levantados nos períodos de 1995 a 2008 mostraram que a zona rural de Pernambuco apresentou uma maior concentração de admissões hospitalares por doença de Chagas. O município de Sertão de Moxotó, por exemplo, apresentou a mais alta taxa de hospitalizações com 1,15 por 100.000 habitantes, sendo que a taxa nacional foi de 0,99 por 100,000 habitantes (Braz *et al.* 2011). Os casos de transmissão por transfusão sanguínea em Pernambuco diminuíram consideravelmente entre os anos de 2002 e 2007, com a prevalência caindo de 4,4% para 0,17% (Melo *et al.* 2009). Dados

recentes mostram que 70 dos 185 municípios de Pernambuco apresentou ao menos um caso agudo (Santos *et al.* 2015). Portanto, ressalta-se que é fundamental a manutenção e a melhoria das ações médicas, a melhoria no diagnóstico sorológico do controle e da prevenção já existentes.

Neste cenário epidemiológico do semiárido nordestino brasileiro a espécie *T. brasiliensis* é considerada um dos principais vetores da região (Silveira & Vinhaes 1999; Costa *et al.* 1998, 2003a; Silva MBA *et al.* 2012), pois além de sua ampla distribuição geográfica no bioma da Caatinga, também apresenta alto índice de infestação domiciliar e alta taxa de infecção natural por *T. cruzi*, fatores importantes que apontam esta espécie como um importante vetor da doença de Chagas (Costa *et al.* 1998, 2002, 2003a).

1.6 Complexo *Triatoma brasiliensis*

Este complexo de espécies está assim constituído de acordo com Costa *et al.* (2013) por cinco membros que ocorrem desde o norte do estado de Minas Gerais até as áreas mais secas do Maranhão. Este grupo de triatomíneos ocupa predominantemente áreas da Caatinga.

Triatoma brasiliensis, Neiva, 1911 tem como localidade tipo o município de Caicó no Rio Grando do Norte, Região Nordeste do Brasil, e ocorre também nos seguintes estados: Ceará, Piauí, Bahia, Maranhão e Paraíba (Costa-Lima 1940; Dias *et al.* 2000). Trinta anos depois, Neiva & Lent (1941) descreveram um espécime similar à *T. brasiliensis*, com padrão cromático diferente, encontrado na localidade de Espinosa (Minas Gerais), identificando então como subespécie, *Triatoma brasiliensis melanica* Neiva & Lent, 1941 e conseqüentemente *T. brasiliensis* ficou como subespécie, *T. b. brasiliensis* Neiva, 1911.

Galvão (1956) recebeu um espécime de Juazeiro (BA) identificado como *T. infestans*, mas observando seu padrão cromático percebeu que era diferente do padrão de *T. infestans* e semelhante a *T. brasiliensis*. Analisou exemplares coletados em Petrolina (PE) e Curaça (BA), localidades vizinhas. Com base em suas análises elaborou uma chave taxonômica para as subespécies de *T. brasiliensis* incluindo uma terceira descrita por ele: *Triatoma brasiliensis macromelasoma*. Mais tarde, Lent & Wygodzinsky (1979) sinonimizaram todos os morfotipos em uma só espécie, *T. brasiliensis*, pois segundo os autores,

seria frequente a ocorrência de formas intermediárias.

Devido às inúmeras questões relevantes a serem respondidas sobre as “variações cromáticas” observadas em *T. brasiliensis*, estudos multidisciplinares e várias coletas intensivas foram realizadas nas localidades-tipo onde as três subespécies haviam sido descritas. Logo nos primeiros estudos morfológicos dos ovos foram encontradas diferenças no exocório, caracterizando as populações “brasiliensis”, “melanica” e “macromelasoma”. Foi ainda distinguida uma quarta forma cromática caracterizada como “população juazeiro”, proveniente de espécimes coletados em Juazeiro (BA) (Costa *et al.* 1997a, b). Estudos posteriores utilizando análises isoenzimáticas identificaram as populações de *T. brasiliensis* como geneticamente distintas (Costa *et al.* 1997b), corroborando os resultados morfológicos anteriores (Costa *et al.* 1997a). Outros estudos abordando aspectos biológicos (Costa & Marchon-Silva, 1998), ecológicos (Costa *et al.* 1998, 2002), cruzamentos experimentais (Costa *et al.* 2003b) e sequências de DNAm (Monteiro *et al.* 2004) também foram realizados para elucidar o posicionamento taxonômico dessas diferentes variações cromáticas.

No estudo dos cruzamentos das populações em laboratório foi possível evidenciar infertilidade e pouca fertilidade na geração F2 em duas combinações: ♂ *brasiliensis* x ♀ *melanica* e ♀ *brasiliensis* x ♂ *melanica*, respectivamente (Costa *et al.* 2003b).

Os resultados obtidos destes estudos multidisciplinares evidenciaram que as quatro diferentes populações se tratavam de um complexo de espécies.

Triatoma sherlocki Papa, Jurberg, Carcavallo, Cerqueira & Barata 2002 foi o mais recente membro adicionado ao complexo *T. brasiliensis* com base nos estudos filogenéticos, análise do sequenciamento do gene citocromo B (DNAm) e subunidade 16S do RNAr (RNA ribossomal), os quais o incluiu no clado espécie-irmã de *T. melanica* (Mendonça *et al.* 2009).

Recentemente, Costa *et al.* (2013) realizaram uma revisão do grupo e elaboraram uma chave taxonômica para os cinco membros do complexo *T. brasiliensis* que hoje é constituído por duas subespécies (*Triatoma brasiliensis brasiliensis* e *Triatoma brasiliensis macromelasoma*) e três espécies (*Triatoma melanica*, *Triatoma juazeirensis* Costa & Felix, 2007 e *Triatoma sherlocki*).

Os membros deste complexo de espécies se distribuem

geograficamente por todo Nordeste, sendo *T. b. brasiliensis* encontrado nos estados de Alagoas, Ceará, Paraíba, Piauí, Sergipe, Maranhão e Rio Grande do Norte; *T. melanica* no norte de Minas Gerais e extremo sul da Bahia; *T. sherlocki* na região noroeste central da Bahia; *T. b. macromelasoma* em Pernambuco; e *T. juazeirensis* na Bahia. *Triatoma b. macromelasoma* e *T. juazeirensis* parecem estar separadas pelo Rio São Francisco que atua como barreira física entre elas (Costa *et al.* 2009). Ambas são encontradas nos ambientes silvestre e peridomiciliar principalmente, com baixa taxa de infecção natural.

Costa *et al.* (2002) observaram que no nicho ecológico que *T. b. macromelasoma* ocupava não se encontrava qualquer outro membro do complexo, o que poderia favorecer seu isolamento reprodutivo. Porém, devido ao fato de *T. b. macromelasoma* e *T. juazeirensis*, habitarem ecótopos similares e devido as drásticas mudanças ambientais nas áreas ocupadas pelos referidos vetores, a probabilidade de encontro entre elas poderia ser aumentada (Costa *et al.* 1998) trazendo também maiores possibilidades de ocorrência de híbridos naturais (Costa *et al.* 2003b).

Para esclarecer se no estado de Pernambuco poderia estar ocorrendo uma área de hibridação natural, foram realizadas coletas em vários locais e encontrou-se treze fenótipos diferentes de *T. b. brasiliensis*, em ecótopos artificiais e naturais. A maioria dos espécimes estava no peridomicílio, onde circulavam cães, gatos e galinhas (Gumiel 2011). Costa *et al.* (1997a) e Monteiro *et al.* (2004) já haviam identificado *T. b. macromelasoma* como linhagem evolutiva distinta de *T. b. brasiliensis*, porém observaram inconsistências quanto ao fenótipo e genótipo de alguns espécimes morfologicamente identificados como *T. b. macromelasoma*.

Estudos morfométricos das asas assim como o padrão cromático do pronoto de todos os membros do complexo em comparação com híbridos de laboratório mostraram uma correlação entre *T. b. macromelasoma* e os híbridos experimentais do cruzamento de *T. b. brasiliensis* e *T. juazeirensis*, sugerindo a possibilidade de um processo de especiação híbrida homoploidal (Costa *et al.* 2009).

1.7 Suscetibilidade à infecção por *T. cruzi* em híbridos

São vários os fatores que determinam a suscetibilidade de uma espécie de triatomíneo à infecção pelo parasito, dentre eles a densidade parasitária que é modulada por barreiras fisiológicas do inseto, tais como componentes da saliva e enzimas digestivas, mudanças na temperatura, osmolalidade e reserva de nutrientes (Kollien & Schaub 2000).

A relação entre a diversidade de *T. cruzi* e sua transmissibilidade vetorial pelas diferentes espécies de triatomíneo, que pode ser regulada pelos parâmetros de variações comportamentais dos insetos vetores, é um dos temas mais estudados. Atualmente sabe-se que as populações de *T. cruzi* diferem na capacidade de se multiplicar e diferenciar de acordo com a espécie de triatomíneo e ainda dependendo do comportamento do inseto, ele estará mais ou menos suscetível a entrar em contato com o parasito (Schaub *et al.* 1989; Mello *et al.* 1996).

É possível analisar a suscetibilidade à infecção por *T. cruzi* das diferentes espécies de triatomíneos pelos procedimentos também utilizados na realização do xenodiagnóstico indireto, onde os insetos são infectados experimentalmente objetivando detectar as formas flageladas de *T. cruzi* (Silva & Salha 1994).

Estudos já demonstraram que híbridos naturais podem apresentar prevalência infectiva mais alta em relação às espécies parentais (Herrera-Aguilar *et al.* 2009; Martínez-Hernandez *et al.* 2010). Como os híbridos de *Triatoma dimidiata* (Latreille, 1811) identificados por meio do sequenciamento de ITS-2 DNA nuclear e *cyt b*, que apresentaram prevalência de infecção 2-3 vezes maior do que os Grupos 2 e 3, populações simpátricas dos quatro grupos taxonômicos de *T. dimidiata*, e que se encontram em uma zona híbrida. Este achado mostra como a segregação dos genótipos pode ser um fator importante para competência vetorial e risco de transmissão de *T. cruzi* (Herrera-Aguilar *et al.* 2009). Possíveis híbridos naturais de *Meccus picturatus* (Usinger, 1939) e *Meccus pallidipennis* (Stål, 1872) também apresentaram índice de infecção natural mais elevada em ambientes domésticos que as espécies *Meccus longipennis* (Usinger, 1939), *M. picturatus* e *M. pallidipennis* em Talpa de Allende no México (Martínez-Hernandez *et al.* 2010).

Os estudos sobre a capacidade das diversas espécies de triatomíneos de se infectar com o parasito associada à capacidade de invasão domiciliar pelos vetores são de extrema valia para os Órgãos do governo porque auxiliam na aplicação e monitoramento de medidas de controle dos vetores da doença de Chagas (Costa *et al.* 2003a; Martínez-Hernandez *et al.* 2010).

1.8 Comportamento alimentar e de defecação

O estudo da biologia dos triatomíneos tem sido realizado por muitos autores ao longo dos anos, pois determina características específicas que podem avaliar a competência vetorial dos insetos e auxiliar no planejamento de medidas de controle. Estudos sobre o comportamento alimentar, analisam parâmetros como: o momento que o inseto inicia a alimentação, o tempo que passa ingerindo sangue e em contato com hospedeiro, e o mais importante o tempo de defecação, que contribuem para o entendimento da transmissão de *T. cruzi*, possibilitando estimar o grau de importância vetorial de cada espécie (Gonçalves *et al.* 1988; Oliveira 2013).

Zeledón *et al.* (1977) afirmam que espécies que defecam em até 10 minutos após a alimentação sanguínea podem ser consideradas vetores potencialmente eficazes para transmissão de *T. cruzi*, pois a possibilidade de os insetos ainda estarem em contato com o hospedeiro é maior. E ainda que não defecassem nesse tempo seria importante considerar o comportamento após o repasto do triatomíneo, se este permanecesse no local em que se alimentou ou se se afastasse logo após o repasto (Rodrigues *et al.* 1995).

Há casos de algumas espécies que são encontradas naturalmente infectadas, porém não são consideradas vetores potenciais da doença de Chagas devido ao seu comportamento alimentar e de defecação, como é o caso de *Triatoma rubrofasciata* (De Geer, 1773) que apesar de ser encontrado em habitações humanas, raramente defeca durante o repasto sanguíneo (Braga & Lima 1999). Em regiões onde a doença de Chagas ocorre, mas não é endêmica, além de haver poucas espécies de triatomíneos que invadem as casas, uma das principais características destes insetos é que não defecam imediatamente após o repasto, demonstrando baixo potencial vetorial (Wood 1951). *T. vitticeps* é endêmico do Brasil, invade as moradias e apresenta elevada taxa de infecção por *T. cruzi* (Gonçalves *et al.* 2000). Entretanto, suas

características biológicas não o caracteriza como bom vetor (Gonçalves *et al.* 1988; Santos *et al.* 2006) o que pode explicar o baixo número de casos da doença em regiões de sua ocorrência (Sangenis *et al.* 2015).

A agressividade do triatomíneo para obter a fonte sanguínea também é um parâmetro relevante, pois em algumas espécies, o inseto entra rapidamente em contato com seu hospedeiro e não sai até que esteja ingurgitado. Esta característica pode ser estudada pelo número de picadas, o que implica num maior ou menor contato do triatomíneo com o hospedeiro auxiliando na avaliação do potencial vetorial de uma espécie (Rabinovich *et al.* 1979).

2. JUSTIFICATIVA

Recentemente, foi registrada a presença de diferentes fenótipos de espécimes do complexo *T. brasiliensis* em algumas áreas de Pernambuco, coincidentes ou próximas às áreas de distribuição de *T. b. macromelasoma*, e essas áreas estão situadas entre as áreas de distribuição de *T. b. brasiliensis* e *T. juazeirensis*. Estes registros, associados aos resultados dos estudos morfológicos comparativos entre híbridos experimentais e parentais, corroboram a existência de uma área de hibridação natural naquele estado e também a origem híbrida de *T. b. macromelasoma* (Costa *et al.* 2003a; 2009; 2014).

Estes fenótipos apresentaram baixa porcentagem de infecção natural no exame microscópico das fezes, obtidas por compressão abdominal quando em comparação à prevalência observada para os membros do complexo *T. brasiliensis*, sugerindo baixa suscetibilidade à infecção por *T. cruzi* (Gumiel 2011). Diferente desses achados, Herrera-Aguilar *et al.* (2009) e Martínez-Hernandez *et al.* (2010) mencionam que híbridos naturais de *T. dimidiata* apresentariam a possibilidade de maior infecção do que suas espécies parentais.

Os estudos sobre infecção parasitária comparativos entre os híbridos e os seus progenitores têm sido desenvolvidos para algumas espécies de animais e plantas (Wolinska *et al.* 2007). Porém, a suscetibilidade à infecção por *T. cruzi* em híbridos naturais e especialmente os experimentais, ainda é pouco estudada, sendo que os estudos experimentais auxiliam no entendimento de como pode estar acontecendo esta interação na natureza. E ainda, os estudos sobre híbridos experimentais podem ser usados para estabelecer o papel da hibridação natural, gerando novas variantes genéticas que podem levar a evolução adaptativa e/ou a origem de novas linhagens (Pérez *et al.* 2005).

A suscetibilidade que uma espécie de triatomíneo pode apresentar para uma determinada cepa de *T. cruzi* é variável, pois depende da adaptação da cepa do parasito à espécie de triatomíneo (Perlowagora-Szumlewicz & Carvalho-Moreira 1994), da sua abundância, capacidade de chegar ao reto e habilidade de colonizar e persistir no inseto vetor (Garcia *et al.* 2010). Além disso, os insetos vetores parecem ter maior suscetibilidade às cepas de *T. cruzi*

da mesma área geográfica que coabitam (Perlowagora-Szumlewicz *et al.* 1990; Garcia *et al.* 2007).

Com o propósito de contribuir ao conhecimento da relação biológica de membros do complexo *T. brasiliensis* com *T. cruzi* este trabalho tem como objetivo principal testar a hipótese de que os híbridos apresentam maior suscetibilidade à infecção de *T. cruzi*, realizando a infecção experimental com a cepa encontrada infectando naturalmente *T. brasiliensis*. Os resultados obtidos para os híbridos foram comparados entre os seus parentais, *T. juazeirensis* e *T. b. brasiliensis* e ainda com dados da literatura a respeito da espécie *T. b. macromelasoma*.

Triatoma b. brasiliensis apresenta voracidade alimentar e frequentemente seu comportamento de defecação é realizado ainda em contato com a fonte alimentar, mostrando-se um vetor competente (Soares *et al.* 2000). Neste sentido, vários aspectos do comportamento alimentar dos híbridos experimentais em comparação aos parentais, *T. b. brasiliensis* e *T. juazeirensis* são também de importância epidemiológica.

Os estudos dos vetores relacionados à suscetibilidade à infecção, as interações parasito-vetor e fatores que induzem o desenvolvimento do parasito, contribuem para que sejam identificadas novas estratégias de abordagem e entendimento desta relação tão importante para a área da saúde.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

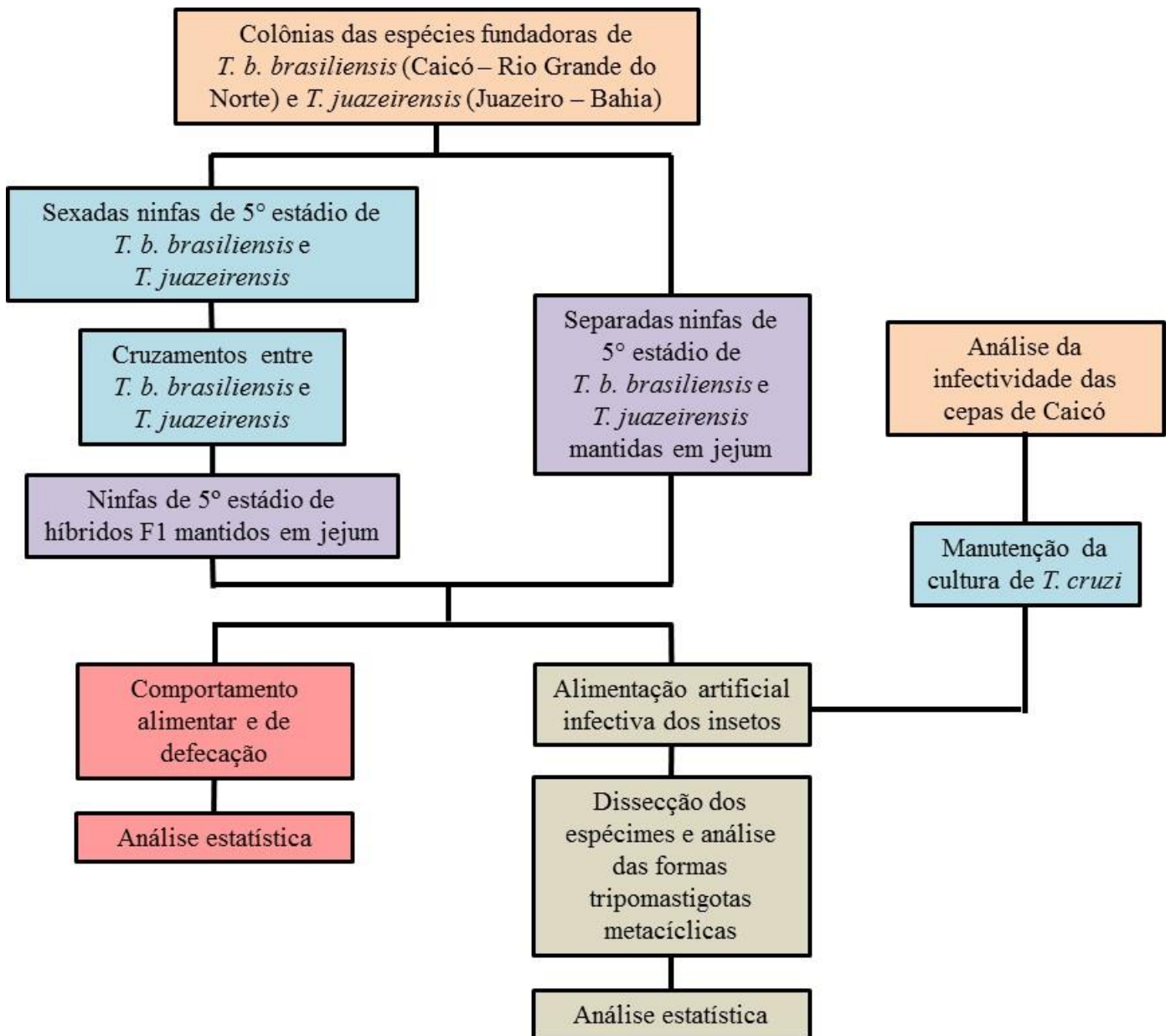
- Analisar parâmetros relacionados à competência e capacidade vetorial de *T. juazeirensis*, *T. b. brasiliensis* e seus híbridos experimentais.

3.2 Objetivos específicos

- Comparar taxas de infecção entre híbridos experimentais e as espécies parentais;
- Analisar e comparar o desenvolvimento de *T. cruzi* no trato digestivo dos grupos estudados;
- Analisar a suscetibilidade à infecção por *T. cruzi* em condições de laboratório de *T. juazeirensis*, *T. b. brasiliensis* e seus respectivos híbridos experimentais;
- Analisar o comportamento alimentar das ninfas de 5^o estágio de *T. b. brasiliensis*, *T. juazeirensis* e seus híbridos experimentais.

4. MATERIAL E MÉTODOS

FLUXOGRAMA:



Legenda:

- Etapa 1
- Etapa 2
- Etapa 3
- Etapa 4
- Etapa 5

4.1 Insetos

Os insetos utilizados neste trabalho são provenientes de colônias de *T. b. brasiliensis* (Caicó – Rio Grande do Norte) e *T. juazeirensis* (Curaça – Bahia), cujos exemplares fundadores foram coletados por membros da equipe do Laboratório de Biodiversidade Entomológica e mantidos no Laboratório de Transmissores de Leishmanioses, sob condição de temperatura controlada (Tab. 4.1).

Tabela 4.1: Dados das espécies fundadoras das colônias utilizadas no estudo.

Espécie	Estado	Município	Data de coleta	Coordenadas geográficas
<i>T. brasiliensis</i>	RN	Caicó	12/05/2011	06° 27' S 37° 05' O
<i>T. juazeirensis</i>	BA	Curaça	24/11/2013	09°12' S 39°83' O

Sessenta ninfas de 5^o estágio de cada espécie foram separadas e mantidas em jejum por 30 dias, e então utilizadas no experimento de infecção com *T. cruzi*.

Também foram separadas destas colônias ninfas de 4^o estágio alimentadas semanalmente em camundongos Swiss Webster (LW 18-11) que ao mudarem para o 5^o estágio foram separadas para duas etapas: ninfas de 5^o estágio sexadas para formarem casais para o cruzamento interespecífico, para a obtenção de adultos virgens; e ninfas de 5^o estágio mantidas em jejum por 10 dias para realizar o estudo de comportamento alimentar e de defecação.

Todos os insetos foram acondicionados em potes plásticos (14x14x15 cm) identificados e forrados com papel filtro, no fundo do pote e também dobrado em forma de sanfona, para aumentar a superfície de contato e absorção da umidade e dos dejetos dos insetos.

4.2 Cruzamentos das espécies em laboratório

Após a muda imaginal, os insetos foram inicialmente separados em cinco fêmeas e cinco machos de cada espécie para formar casais. Na eventual morte desses espécimes separados em casais, outros triatomíneos os substituíram para manter o cruzamento das espécies. Foram feitos

cruzamentos entre as espécies *T. b. brasiliensis* (Caicó – Rio Grande do Norte) e *T. juazeirensis* (Juazeiro – Bahia) (Fig. 4.1). Os casais foram individualizados por cruzamento em pequenos potes revestidos internamente com papel filtro, sendo constituídos por fêmeas *T. b. brasiliensis* e machos *T. juazeirensis* e a combinação inversa, fêmeas *T. juazeirensis* e machos *T. b. brasiliensis*, alimentados semanalmente com camundongos Swiss Webster (Licença LW-18/11). Os cruzamentos foram iniciados em março de 2013. Os híbridos F1 obtidos foram acompanhados até a obtenção de 30 ninfas de 5º estágio de cada cruzamento.

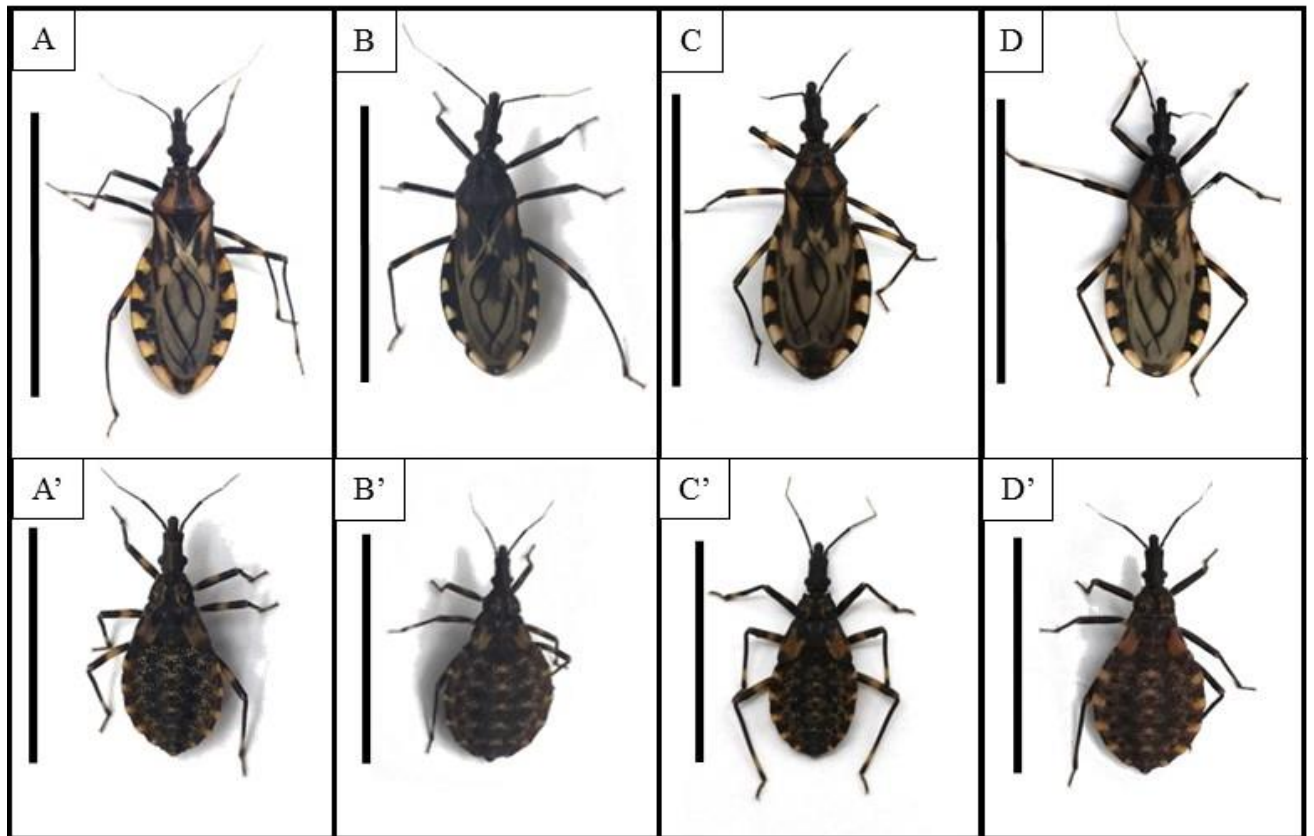


Figura 4.1: Comparação de tamanho entre as espécies e os híbridos provenientes do cruzamento dos triatomíneos. Adultos (A-D) (barra = 25 mm) e ninfas de 5º estágio de desenvolvimento (A'-D') (barra = 20 mm) das espécies: *T. b. brasiliensis* (A e A') e *T. juazeirensis* (B e B') e seus híbridos "Hbj" (♀ *T. b. brasiliensis* x ♂ *T. juazeirensis*) (C e C') e "Hjb" (♀ *T. juazeirensis* x ♂ *T. b. brasiliensis*) (D e D').

4.3 Cultura de *T. cruzi*

Através do sistema COLTRYP (Coleção de *Trypanosoma* de Mamíferos Silvestres, Domésticos e Vetores) buscou-se cepas (Tcl) isoladas a partir de *T. b. brasiliensis* naturalmente infectados provenientes de Caicó, localidade tipo da espécie, no Laboratório de Biologia de Tripanosomatídeos, mantidas em criopreservação à -195°C em nitrogênio líquido, desde 2006. Os isolados foram previamente caracterizados, por PCR. As culturas foram examinadas semanalmente em câmara de Neubauer, para avaliar a concentração de formas epimastigotas.

A capacidade de replicação de duas cepas (0338 e 0354) foi avaliada com espécimes de *T. infestans*, pois não havia dados sobre o seu desenvolvimento no inseto vetor. Cinco ninfas de 5º estágio foram dissecadas em intervalos de 10 dias até o 30º dia após a alimentação infectante.

Os resultados com *T. infestans* mostraram que ambas as cepas 0354 e 0338 foram capazes de infectar o vetor e apresentaram desenvolvimento num padrão homogêneo, mantendo a infecção até o 30º dia, último dia de acompanhamento do estudo. Porém optou-se pela cepa, a 0354, que apresentou desenvolvimento mais rápido.

As culturas foram mantidas em estufa BOD à 27°C, cultivado sob a forma epimastigota em meio bifásico, do tipo ágar-sangue. As formas epimastigotas cresceram no meio NNN (McNeal, Novy e Nicole) com adição de LIT (infuso de fígado e triptose) suplementado com 10% de soro fetal bovino. Os repiques da cultura-mãe foram realizados a cada sete dias. A curva de crescimento foi quantificada através de contagem em hemocítômetro (Fig. 4.2)

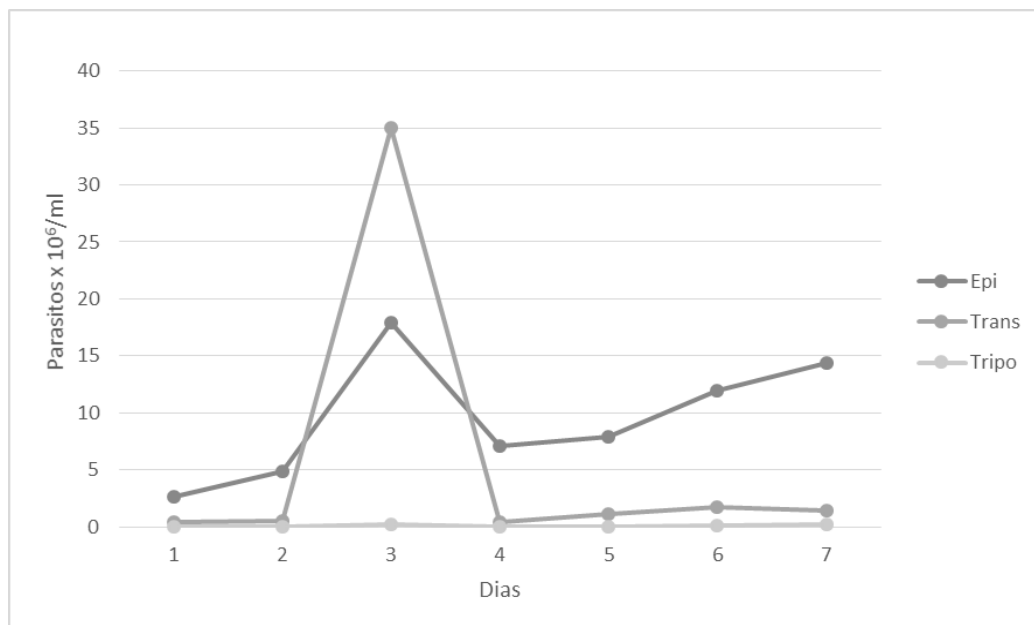


Figura 4.2: Curva de crescimento de cepas de *Trypanosoma cruzi*. Formas epimastigotas (Epi), formas em transição (Trans) e tripomastigotas (Tripo) da cepa 0354, crescida em meio LIT por 7 dias. O número de parasitos foi mensurado pela contagem em câmara de Neubauer em microscópio óptico. Média de duplicatas.

4.4 Alimentação infectante dos insetos

Foram utilizados os quatro grupos de triatomíneos (*T. b. brasiliensis*, *T. juazeirensis* e híbridos resultantes dos cruzamentos *T. b. brasiliensis* fêmea com *T. juazeirensis* macho e *T. b. brasiliensis* macho com *T. juazeirensis* fêmea) que foram artificialmente alimentados através de membranas de látex com sangue de coelho citratado (0,1ml de citrato de sódio/ml de sangue). Para cada grupo de inseto infectado com a cepa 0354 de *T. cruzi*, foram utilizados 10 ml de sangue de coelho citratado que foi inicialmente centrifugado a velocidade de 3500 rpm durante 10 min para a separação dos eritrócitos do plasma. A parte líquida do sangue foi retirada e os eritrócitos foram lavados em PBS por 3 vezes consecutivas utilizando-se o mesmo procedimento de centrifugação.

Após a lavagem, os eritrócitos foram ressuspensos em meio LIT (volume correspondente ao plasma retirado) contendo $1,5 \times 10^7$ /ml de formas epimastigotas em fase exponencial de crescimento (v/v), e contados através da câmara de Neubauer. Esta mistura foi então transferida para um frasco de vidro (“mamadeira”) revestido em sua parte inferior por uma membrana de látex, que servia para reter o sangue e propiciar a alimentação artificial dos insetos. Estes

frascos permitem a circulação periférica da água aquecida, através da conexão com um banho-maria circulante, que mantém a temperatura do sangue à $\sim 37^{\circ}\text{C}$ (Fig. 4.3). Para cada alimentação, os insetos foram separados em 15 espécimes por pote, de forma que todos pudessem circular e alcançar a fonte alimentar. Dessa maneira, foram mantidos na alimentação até atingirem o ingurgitamento. As ninfas que não se alimentaram foram descartadas do experimento.



Figura 4.3: Alimentação artificial, dos triatomíneos, em banho-maria com sangue de coelho.

Para calcular o volume de sangue ingerido, os insetos foram marcados individualmente com diferentes cores de tinta guache (não tóxica) nas pernas e pronoto (de acordo com o grupo) em sequências diferentes (Fig 4.4), para que assim fossem distinguidos uns dos outros dentro do mesmo pote. Foram então pesados individualmente em balança de precisão antes e após o repasto infectante e o cálculo se deu pela diferença de peso apresentada antes e após o repasto infectante. As ninfas foram distribuídas em frascos identificados e com papel filtro, trocado quinzenalmente.

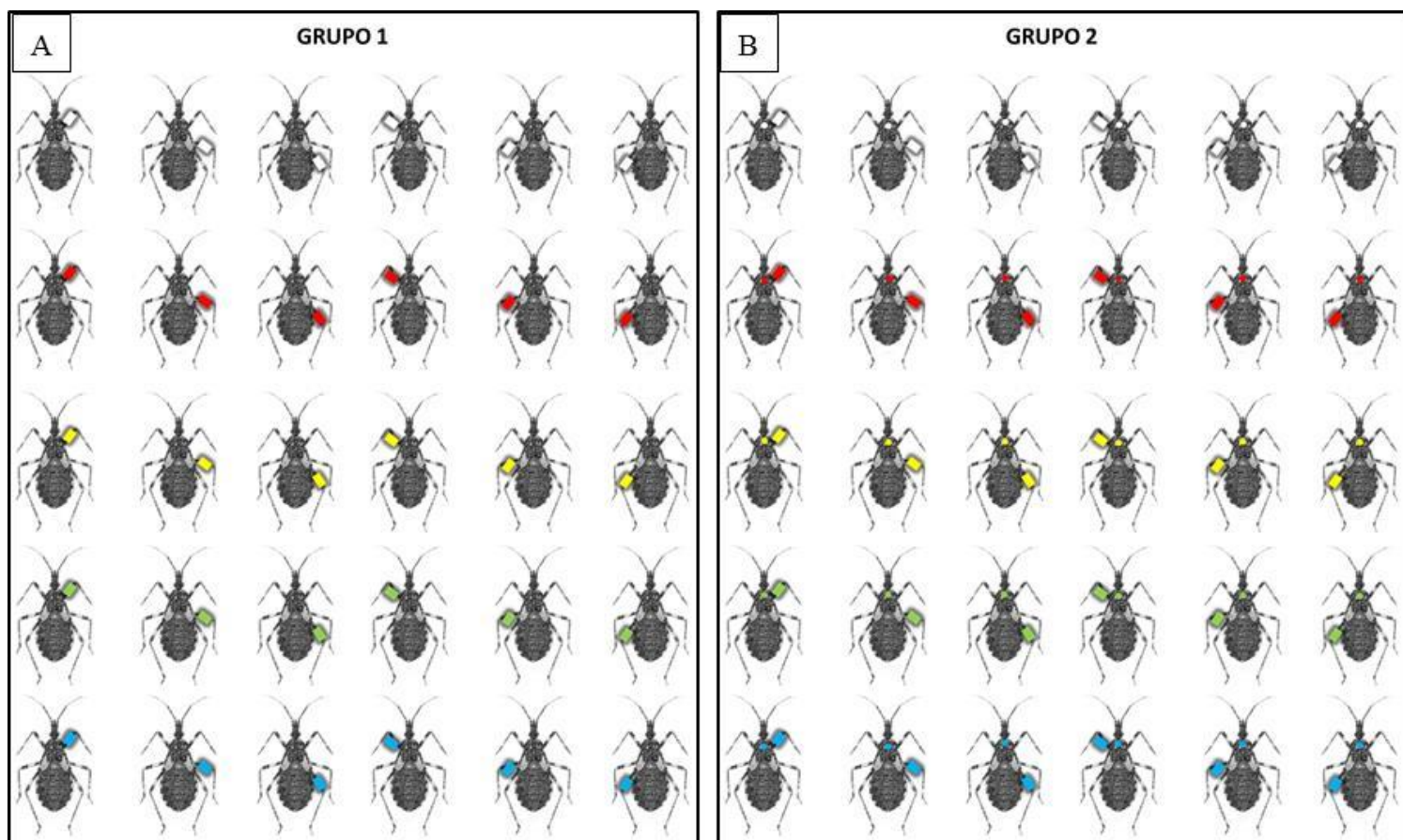


Figura 4.4: Identificação dos insetos para posterior pesagem individual. Padrão de marcação dos insetos em diferentes sequências: (A) nas pernas nos triatomíneos correspondentes de 1 – 30; e (B) pernas e pronoto nos triatomíneos correspondentes de 31 – 60.

O número total de insetos utilizados no experimento foi de 30, entretanto para que houvessem as reposições em caso de necessidade, trabalhou-se com um sobressalente de 42 à 60 indivíduos.

Uma segunda alimentação não infectiva com sangue de galinha foi feita com esses grupos quinze dias após a primeira alimentação, pois é sabido que a porcentagem de flagelados sofre um declínio à medida que os insetos ficam longos períodos em jejum (Kollien & Schaub 1998).

4.5 Análise das formas de *T. cruzi* nos insetos

A quantificação dos parasitos no intestino foi realizada em todo o tubo digestório. As laterais do abdômen foram cortadas, na altura do conexivo, no

sentido pósterio-anterior, removeu-se a região dorsal com a pinça, expondo todo o tubo digestório que foi pinçado por suas extremidades anterior e posterior, e transferido para uma placa de Petri, onde foi separado em três segmentos: estômago, intestino e ampola retal, e posteriormente transferidos para tubos de Eppendorfs e então macerados em 200µl de PBS (pH 7,2) (Fig. 4.5).

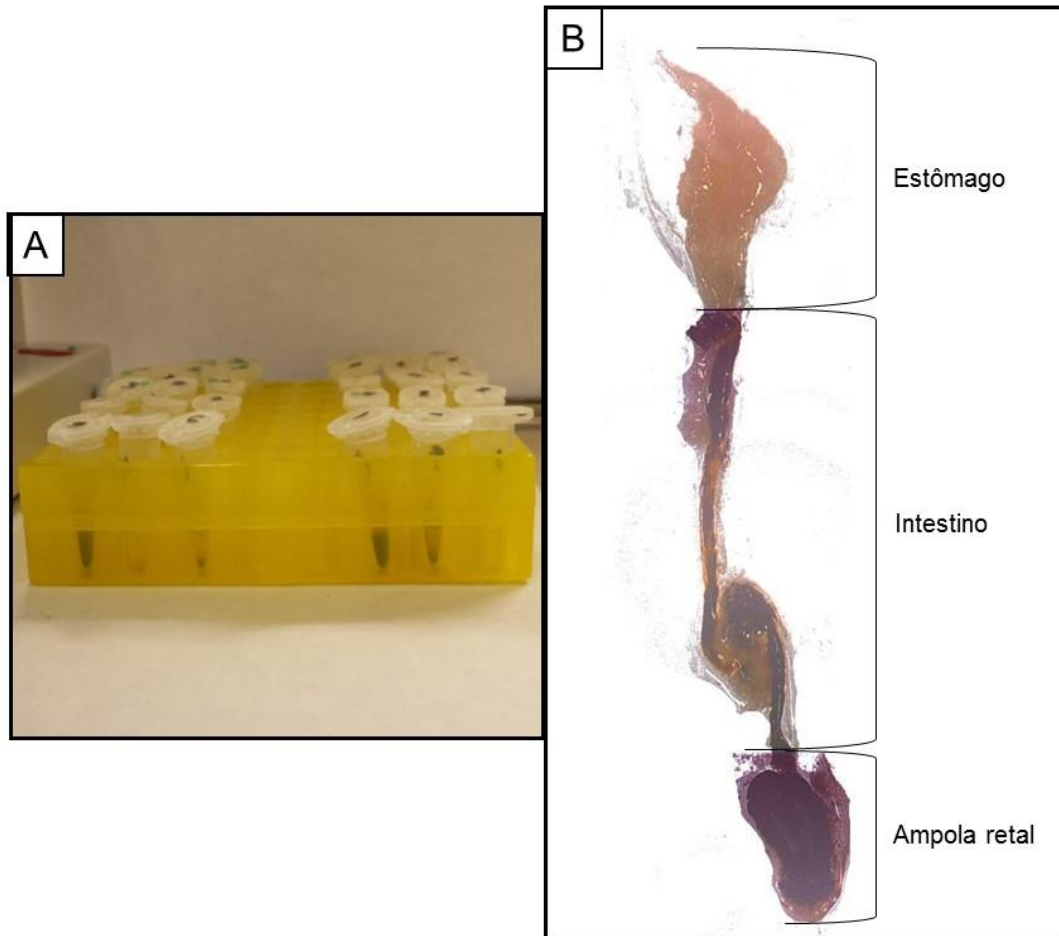


Figura 4.5: Material biológico dos triatomíneos para análise de infecção. (A) Tubos de Eppendorfs individualizados por inseto, contendo: estômago, intestino e ampola retal dos 10 espécimes dissecados no dia. (B) Divisão do tubo digestório: estômago, intestino e ampola retal (aumento x40).

A cada intervalo de dez dias, durante um mês após a alimentação infectante (10, 20 e 30 dias), dez insetos foram dissecados, para exame do conteúdo biológico (fezes e tecidos do trato digestivo) de cada segmento do tubo digestório, individualmente visualizados em câmara de Neubauer para a contagem diferencial das seguintes formas evolutivas estabelecidas:

epimastigotas, tripomastigotas metacíclicos e formas em transição (Perlowagora-Szumlewicz & Moreira 1994; Mello *et al.* 1996; Alvarenga & Bronfen 1997; Carvalho-Moreira *et al.* 2003; Araújo *et al.* 2008).

Também foram confeccionados esfregaços, corados pelo método May-Grünwald-Giemsa para fotomicroscopias, sendo este método considerado padrão-ouro para investigação e classificação das fases de desenvolvimento de *T. cruzi* (Perlowagora-Szumlewicz & Moreira 1994).

4.6 Comportamento alimentar e de defecação

Para o estudo do comportamento alimentar e de defecação, 15 ninfas de 5º estágio recém-mudadas de *T. b. brasiliensis*, *T. juazeirensis* e seus híbridos de laboratório foram mantidas em jejum por 10 dias. Os espécimes foram separados em frascos de Borrel, identificados individualmente com etiqueta e forrados com papel filtro, alimentados em camundongos Swiss Webster (Licença LW-18/11) (Fig. 4.6) para a análise dos seguintes parâmetros: tempo de início e término do repasto, tempo de duração, e tempo e comportamento de defecação. A alimentação e registro destas observações foram realizados semanalmente até que os espécimes realizassem a muda imaginal.

Para iniciar a alimentação os espécimes foram aproximados da fonte alimentar em uma folha de papel filtro, sendo cronometrado o início da alimentação a partir do momento que o inseto inseria o rostro no camundongo. O registro do término da alimentação somente se dava com a saciedade do inseto. Para avaliar o tempo em que o triatomíneo esteve em contato com a fonte alimentar, a duração total da alimentação foi calculada descontando as interrupções realizadas pelo inseto. Os espécimes que não quiseram se alimentar foram observados por até 15 minutos.

Após o repasto, os insetos foram observados num período de 10 minutos para que quantificação de defecações realizadas. Os espécimes foram pesados antes e após a alimentação para quantificar o sangue ingerido.



Figura 4.6: Triatomíneos separados para pesagem e alimentação. (A e B) Frascos contendo as ninfas de 5º estágio de *T. b. brasiliensis*, *T. juazeirensis* e os híbridos (Hbj e Hjb), individualizados. (C) Triatomíneo se alimentando individualmente em camundongo.

4.7 Análises Estatísticas

As análises das formas de *T. cruzi* no inseto foram avaliadas através do teste ANOVA dupla classificação (two way), com teste complementar (Newmann-Keuls), para avaliar as diferenças significativas nos diferentes dias após alimentação e nas diferentes regiões do intestino (Kollien & Schaub 1998).

As análises dos parâmetros comportamentais (alimentar e de defecação)

foram avaliadas através do teste não paramétrico Kruskal–Wallis (programa SPSS versão 22). No caso em que o teste fosse significativo, devido ao programa não identificar qual ou quais os grupos são diferentes, foi usado o teste ANOVA com a opção de testes complementares (Post-Hoc).

5. RESULTADOS

5.1 Cruzamentos das espécies em laboratório

Foram obtidos híbridos dos cruzamentos entre as espécies *T. b. brasiliensis* e *T. juazeirensis*: **Hbj** são os híbridos resultantes do cruzamento ♀*T. b. brasiliensis* x ♂*T. juazeirensis* e **Hjb** os híbridos do cruzamento ♀*T. juazeirensis* x ♂*T. b. brasiliensis*.

Dos primeiros cinco casais, do cruzamento de ♀*T. b. brasiliensis* x ♂*T. juazeirensis* foram obtidos 70 ovos, e de ♀*T. juazeirensis* x ♂*T. b. brasiliensis* ovipuseram 19 ovos. A partir daí os machos e fêmeas desses cruzamentos que morreram foram substituídos por outros espécimes virgens da colônia, dando continuidade aos cruzamentos. Ao todo foram utilizados para o experimento de infecção, com a cepa 0354 de *T. cruzi*, 105 ninfas de 5° estágio de Hbj e 74 ninfas 5° estágio de Hjb. Para a análise do comportamento de alimentação e defecação outras 30 ninfas de Hbj e 12 ninfas de Hjb no 5° estágio foram acompanhadas.

5.2 Suscetibilidade de *T. b. brasiliensis*, *T. juazeirensis* e seus híbridos experimentais à infecção da cepa 0354 de *T. cruzi*

As formas encontradas no tubo digestório foram denominadas de: formas epimastigotas, tripomastigotas metacíclicas e as demais formas intermediárias do parasito foram chamadas de formas de transição, de acordo com Perlowagora-Szumlewicz & Moreira (1994).

Na tabela 5.1 é apresentada as porcentagens das formas do parasito encontradas por compartimento, nos respectivos períodos de observação. Pode-se observar que a porcentagem de epimastigotas foi sempre maior, independente da porção analisada (estômago, intestino ou ampola retal), tanto

nos híbridos (Hbj e Hjb) quanto em seus parentais (*T. juazeirensis* e *T. b. brasiliensis*). No estômago Híbridos e parentais apresentaram maior densidade populacional de epimastigotas, nos primeiros 20 dias, sendo o pico no 10º dia.

Tabela 5.1: Porcentagem das formas de *Trypanosoma cruzi* encontradas por compartimento do tubo digestório (estômago, intestino e ampola retal), nos 10º, 20º e 30º dias após a infecção. *Triatoma juazeirensis*, *Triatoma b. brasiliensis* e seus híbridos Hbj (♀ *T. b. brasiliensis* x ♂ *T. juazeirensis*) e Hjb (♀ *T. juazeirensis* x ♂ *T. b. brasiliensis*).

Espécimes /Dias	Tubo digestório /Formas	Estômago			Intestino			Ampola Retal		
		Epimastigotas	F. de Transição	Tripomastigotas	Epimastigotas	F. de Transição	Tripomastigotas	Epimastigotas	F. de Transição	Tripomastigotas
Híbridos Hbj	10	85%	9%	7%	73%	9%	18%	82%	13%	6%
	20	76%	11%	12%	71%	7%	22%	76%	8%	16%
	30	54%	33%	13%	85%	9%	6%	79%	9%	11%
Híbridos Hjb	10	88%	7%	6%	84%	9%	7%	84%	7%	10%
	20	77%	13%	10%	77%	10%	13%	62%	7%	31%
	30	52%	48%	0%	72%	14%	14%	91%	4%	5%
<i>T. juazeirensis</i>	10	88%	11%	1%	92%	6%	1%	95%	5%	0%
	20	78%	22%	0%	87%	13%	0%	82%	16%	2%
	30	78%	22%	0%	86%	9%	5%	84%	9%	6%
<i>T. b. brasiliensis</i>	10	92%	6%	2%	94%	6%	0%	96%	4%	0%
	20	76%	21%	3%	89%	11%	0%	85%	14%	1%
	30	91%	9%	0%	85%	11%	4%	81%	15%	4%

No tubo digestório, os insetos híbridos apresentaram um crescimento na

densidade populacional ao longo dos dias de observação. A quantidade de parasitos encontrados na ampola retal em comparação aos demais compartimentos foi menor tanto em híbridos como em seus parentais.

5.2.1 Desenvolvimento de *T. cruzi* em Híbridos Hbj – No estômago a densidade parasitária sofreu decréscimo ao longo da análise. No 10º dia, a densidade parasitária nesta região correspondia a 81,2% de flagelados do total. No 20º dia encontrou-se 65% e no 30º dia apenas 12,1% do total da densidade parasitária. Neste último período de observação, a densidade populacional foi muito baixa, sendo contabilizadas 3×10^5 formas epimastigotas, 2×10^5 formas de transição e $0,7 \times 10^5$ tripomastigotas metacíclicas.

No intestino, a densidade populacional aumentou, sendo 14,1% no 10º dia, 25,5% no 20º, saltando para 61,5% no 30º, em comparação aos demais compartimentos do tubo digestório dos insetos. Essa mesma dinâmica foi observada na ampola retal com 5,5% de parasitos no 10º dia, 9,5% no 20º e 26,4% no 30º.

A forma epimastigota (Fig. 5.1 A) foi encontrada em maior número no estômago, no 10º dia. No 30º dia encontrou-se apenas $\bar{X} = 4 \times 10^5$ de epimastigotas nesta região. No intestino e ampola retal observou-se uma estabilidade na distribuição da população de epimastigotas em todos os períodos, no intestino $\bar{X} = 23 \times 10^5$ parasitos e na ampola retal obteve-se $\bar{X} = 9 \times 10^5$ parasitos.



Figura 5.1: As diferentes formas de *Trypanosoma cruzi* encontradas ao longo do tubo digestório dos híbridos Hbj ($\text{♀ } T. b. \text{brasiliensis} \times \text{♂ } T. \text{juazeirensis}$). (A) Formas epimastigotas, (B) tripomastigotas e (C) formas de transição (aumento de $\times 100$).

As formas tripomastigotas (Fig. 5.1 B) estavam presentes em todo o tubo digestório. Na figura 5.2, observa-se que no 10º dia a população de tripomastigotas encontrava-se em maior número no estômago e ao longo do tempo foi diminuindo até quase não encontrar mais espécimes que tinham esta forma nesta região. No 20º dia quatro espécimes examinados não apresentaram tripomastigotas no estômago, e no 30º dia isto ocorreu com 7 espécimes. O intestino foi bem colonizado por esta forma, sendo encontrada em todos os períodos de observação na grande maioria dos espécimes, sendo que apenas em um espécime no 10º e no 20º dias não foram encontrados tripomastigotas nesta região. O período em que se encontrou a maior porcentagem de tripomastigotas metacíclicas foi no 20º dia no intestino, com 22,1% (Tab. 5.1). Na ampola retal observou-se um aumento gradual da população de tripomastigotas ao longo do tempo. O 30º dia foi o período com maior concentração de formas tripomastigotas metacíclicas na ampola retal, mas a porcentagem foi de apenas 11,4% (Fig. 5.2, Tab. 5.1).

Foram encontradas formas de transição (Fig. 5.1 C) no tubo digestório, em todos os dias de observação, a densidade populacional no estômago ao 30º dia se encontra baixa, porque em apenas três espécimes foi observado a referida forma. No estômago, 10º dia, ocorreu o pico de formas de transição com $\bar{X} = 1 \times 10^5$ parasitos (Fig. 5.2).

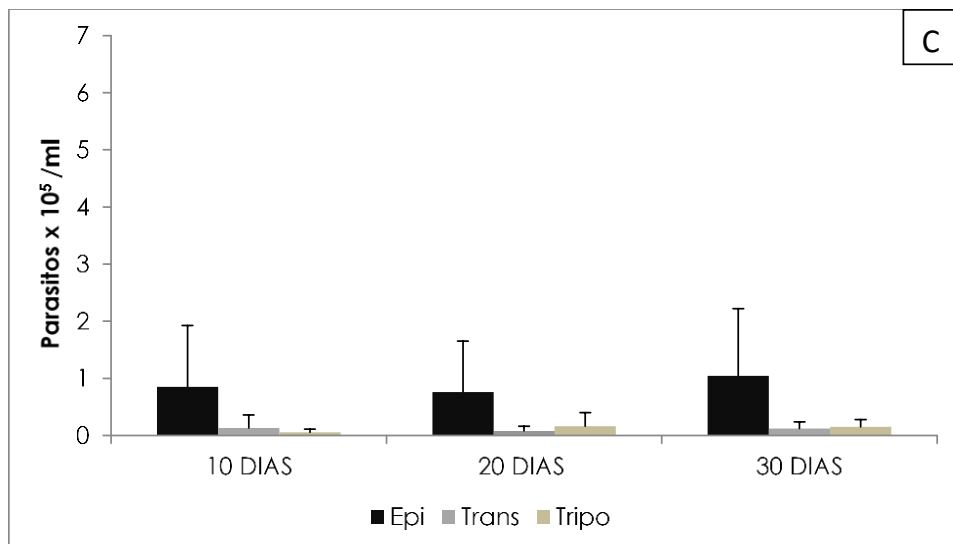
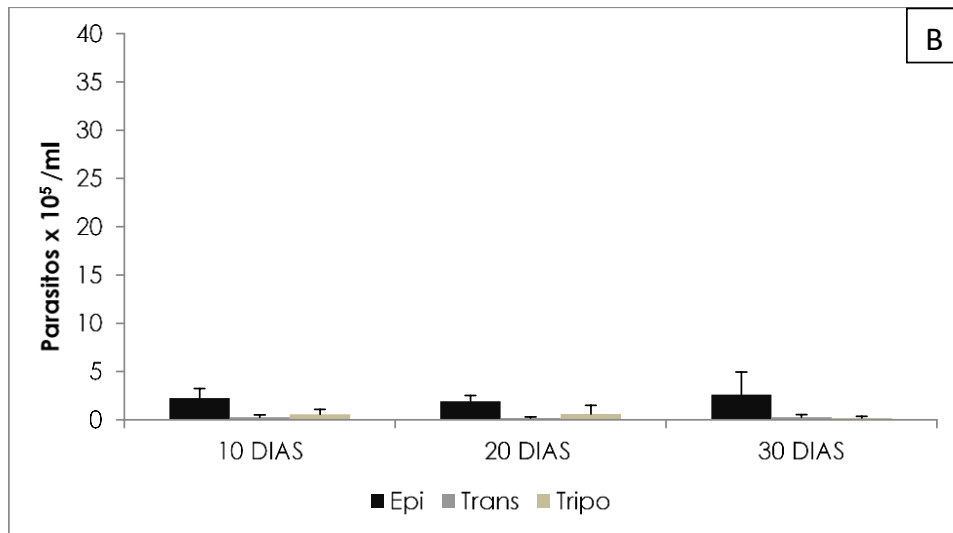
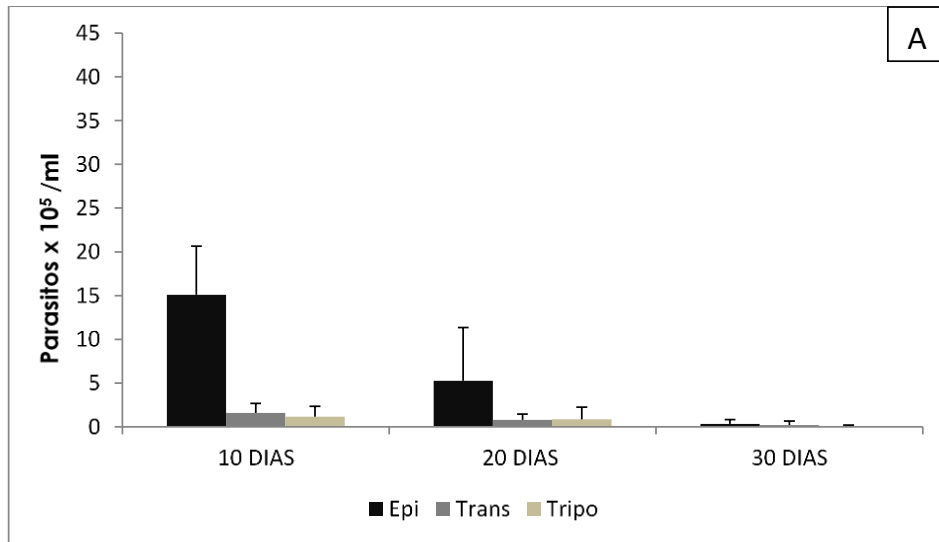


Figura 5.2: Desenvolvimento de *Trypanosoma cruzi* (cepa 0354) no híbrido Hbj ($\text{♀} T. b. brasiliensis \times \text{♂} T. juazeirensis$) no 10^o, 20^o e 30^o dias após alimentação infectante: (A) Estômago; (B) Intestino; (C) Ampola retal. A coluna preta representa a forma epimastigota, a coluna cinza representa as formas de transição e a coluna bege os tripomastigotas metacíclicos.

5.2.2 Desenvolvimento de *T. cruzi* em Híbridos Hjb –

Inicialmente densidade parasitária se concentrou no estômago, variando de 85,8% (10° dia), 73,5% (20°). No 30° dia somente foi encontrado no estômago 0,9% do total de parasitos. Neste último período de observação somente cinco espécimes apresentaram parasitos no estômago, sendo a forma epimastigota a mais encontrada, não sendo observada a presença de nenhuma forma tripomastigota.

No intestino de Hjb a densidade parasitária demonstrou elevação variando de 10,6% (10° dia), 16,8% (20°) e 83,3% (30°), embora no 30° dia não tenham sido encontrados tripomastigotas em alguns espécimes (n=5). Na ampola, a densidade parasitária também apresentou elevação, variando de retal também de 3,7% (10° dia), 9,7% (20°) e 15,8% (30°).

Na figura 5.3 A, observa-se uma maior quantidade de formas epimastigotas no estômago, com $\bar{X} = 12 \times 10^5$ ao 10° dia, ocorrendo decréscimo ao longo do período de observação. No 30° dia foram encontrados parasitos em somente 5 espécimes ($\bar{X} = 0,4 \times 10^5$ epimastigotas). No intestino, as formas epimastigotas sempre estiveram presentes em abundância, chegando a uma $\bar{X} = 5 \times 10^5$ (30° dia) (Fig. 5.3 B). Na ampola retal houve aumento da população de epimastigotas ao longo dos dias, chegando a 1×10^5 (30° dia) (Fig. 5.3 C).

Nos 10° e 20° dias foram encontrados tripomastigotas em todo o tubo digestório (Fig. 5.3), e no 30° dia não foi encontrado em nenhum espécime na região do estômago. Neste mesmo período de observação, 5 espécimes não apresentavam tripomastigotas no intestino e na ampola retal. A maior porcentagem de tripomastigotas foi encontrado no intestino (30° dia) (Tab. 5.1). No 20° dia, apesar da baixa densidade populacional (9,7%) na ampola retal a forma tripomastigota metacíclica chegou a 30,9% dos flagelados, sendo que o inseto com a maior quantidade apresentou concentração de $\sim 3 \times 10^5$ tripomastigotas metacíclicos.

No 30° dia, as formas de transição estavam mais presentes no estômago e no intestino (Tab. 5.1, Fig. 5.3 A, B). No estômago foi encontrado o pico de formas de transição $\bar{X} = 1 \times 10^5$ parasitos (10° dia), já no 30° dia foi observada a permanência de formas de transição em apenas um inseto (04×10^5). Na ampola retal, a maior média de formas de transição foi observada no 20° dia

($0,1 \times 10^5$).

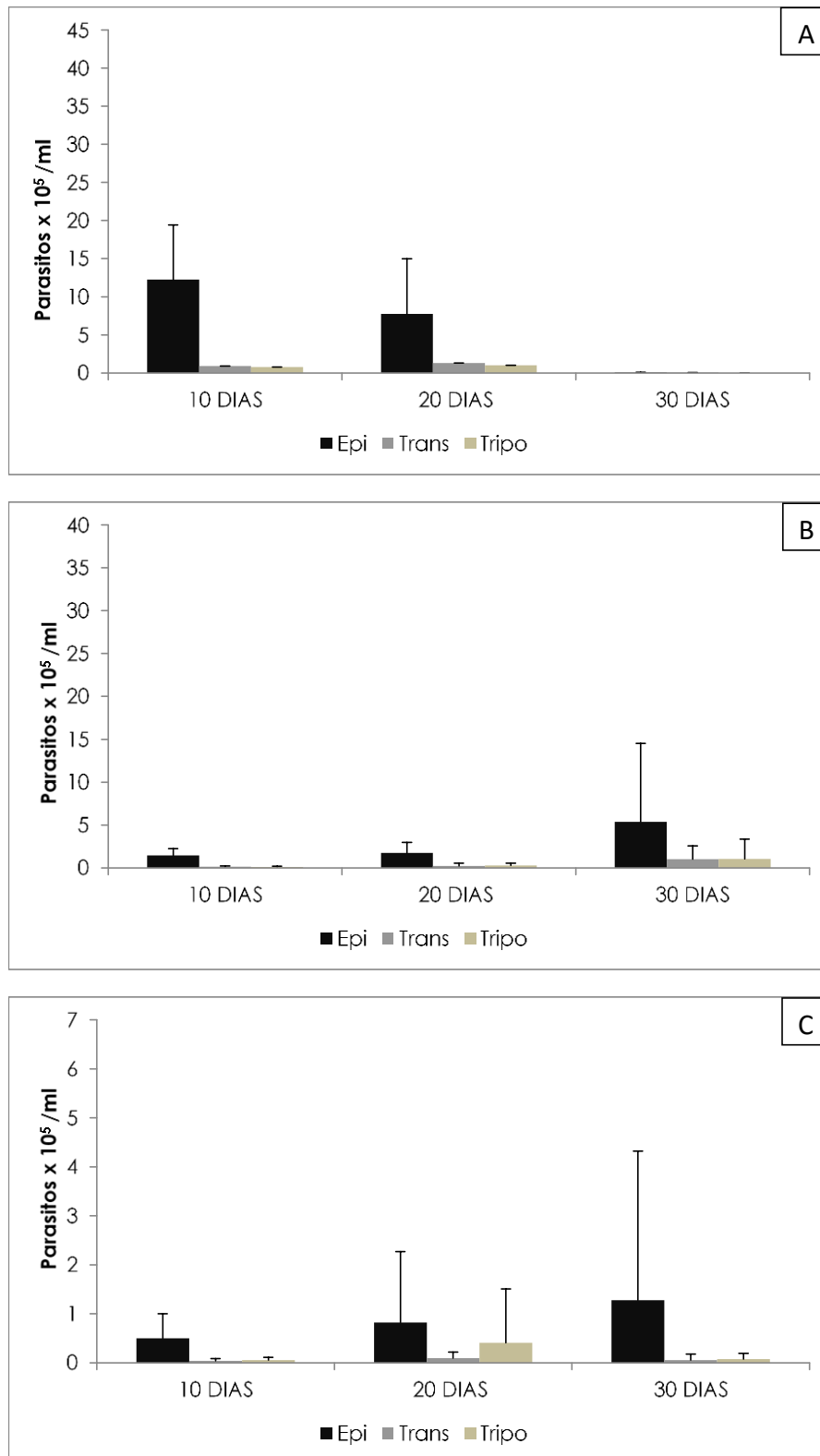


Figura 5.3: Desenvolvimento de *Trypanosoma cruzi* (cepa 0354) no híbrido Hjb (cruzamento de ♀ *T. juazeirensis* x ♂ *T. b. brasiliensis*) nos 10^o e 20^o dias após alimentação infectante. (A) Estômago; (B) Intestino; (C) Ampola retal. A coluna preta representa a forma epimastigota, a coluna cinza representa as formas de transição e a coluna bege os tripomastigotas metacíclicos.

5.2.3 Desenvolvimento de *T. cruzi* em *T. juazeirensis* – A

densidade parasitária no estômago no 10° dia foi de 70,9%, no 20° dia (3,9%), e no 30° dia (20,2). No intestino e ampola retal houve elevação da densidade parasitária nos 2 primeiros períodos de observação, sendo no intestino 28,8% (10° dia), 86,4% (20°) e 72% (30°) e na ampola retal, 0,3% (10° dia), 9,6% (20°) e 7,7% (30°).

A forma epimastigota foi a prevalente no estômago nos 30 dias de análise, apresentando percentuais de 87,7% da população total (10° dia), 77,8% (20°) e 77,5% (30°). A maior concentração destas formas foi encontrada no intestino, no 10° (92,3%) e no 20° (87,1%) dias, e no 30° dia (85,5%). Na ampola retal, no 10° (94,7%) e no 20° (81,8%) dias, e no 30° dia (84,1%) (Tab. 5.1). Foi observado que no 30° dia, a ampola retal apresentou a maior concentração de epimastigotas ($\bar{X}= 1 \times 10^5$) (Fig. 5.4 C).

Nos primeiros 20 dias poucos espécimes apresentaram formas tripomastigotas, em qualquer um dos compartimentos do tubo digestório. No 10° dia foi encontrada $\bar{X}= 0,1 \times 10^5$ no estômago (n=2), e $0,06 \times 10^5$ no intestino (n=5); e no 20° dia somente um inseto apresentou $0,02 \times 10^5$ no intestino (n=1) e $0,1 \times 10^5$ na ampola retal (n=1). Na ampola retal, no 10° dia e no estômago, no 20° dia, nenhum espécime apresentou formas tripomastigotas. No 30° dia cinco espécimes apresentaram $\bar{X}= 9 \times 10^4$ de tripomastigotas no intestino e quatro espécimes apresentaram $\bar{X}= 1 \times 10^4$ na ampola retal (Fig. 5.4).

Nos 30 dias de observação as formas de transição encontraram-se primordialmente no intestino dos insetos, sendo que a maior média verificada foi de 1×10^5 (30° dia) (Fig. 5.4 B). No estômago, as formas de transição representaram 11% (10° dia) da população parasitária e 22,2% no 20° e 30° dia. Na ampola retal, esta forma representou 5,3% (10° dia) da população, 15,9% no 20° e 9,4% no 30°.

Neste grupo de insetos foi observado o maior número de espécimes com porções do tubo digestório sem apresentarem parasitos. No 10° dia cinco insetos não apresentaram nenhuma forma de *T. cruzi* no estômago, dois insetos sem nenhuma forma no intestino e sete insetos sem parasitos na ampola retal, sendo um deles totalmente negativo. No 20° dia, sete insetos não apresentaram formas no estômago, e três insetos foram negativos na ampola retal.

O alto valor de desvio padrão no estômago no 10º dia para a forma epimastigota foi devido ao fato de somente um espécime apresentar uma concentração de formas equivalente à 74,3% de toda a amostra (Fig. 5.4 A).

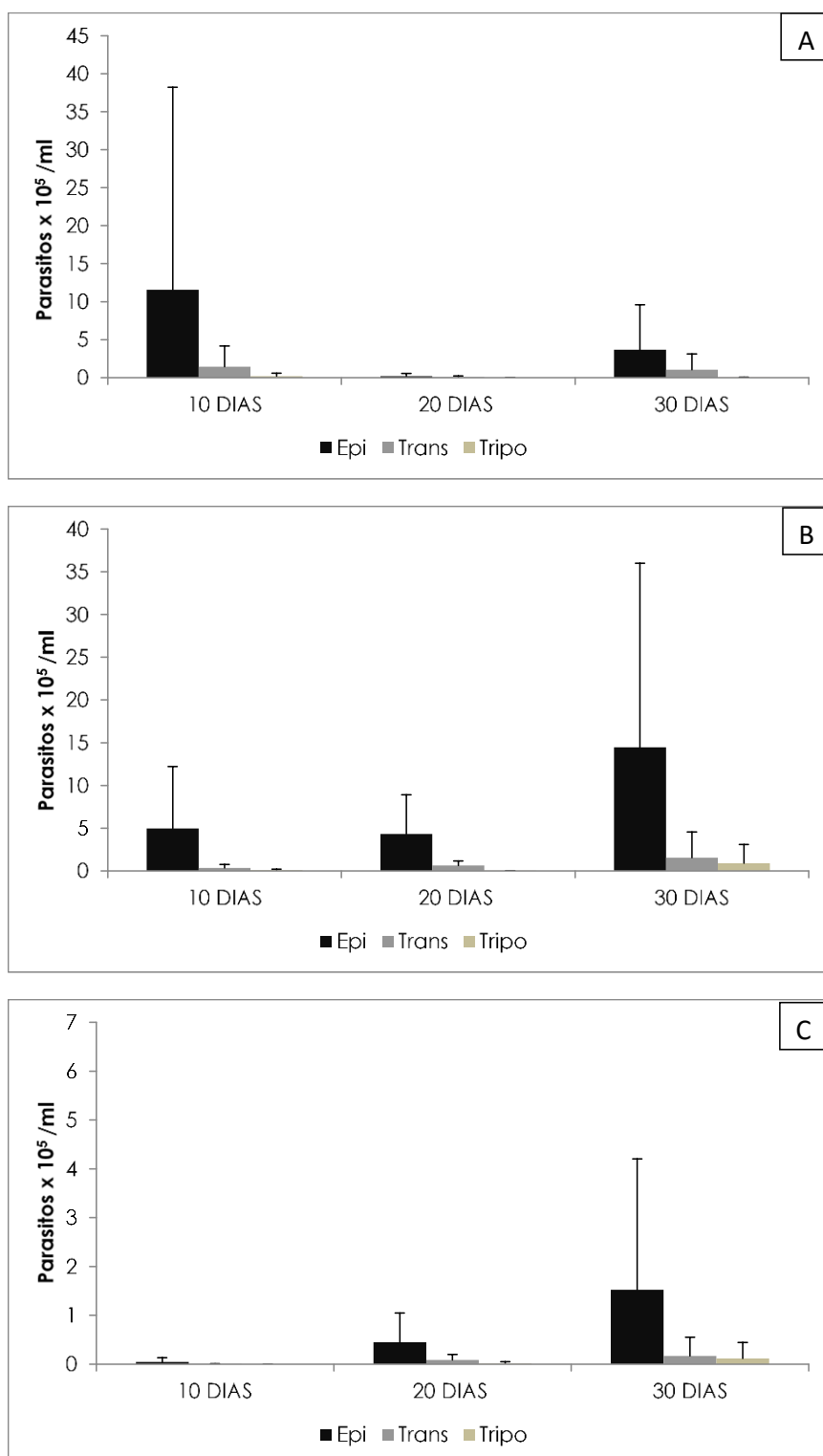


Figura 5.4: Desenvolvimento de *Trypanosoma cruzi* (cepa 0354) em *T. juazeirensis* nos 10º e 20º dias após alimentação infectante. (A) Estômago; (B) Intestino; (C) Ampola retal. A coluna preta representa a forma epimastigota, a coluna cinza representa as formas de transição e a coluna bege os tripomastigotas metacíclicos.

5.2.4 Desenvolvimento de *T. cruzi* em *T. b. brasiliensis* – A

densidade parasitária no estômago decresceu ao longo do tempo. No 10º dia, a população no estômago representou 84,8% da densidade parasitária, no 20º (27,2%) e no 30º (11,6%). No 30º dia cinco espécimes não apresentaram parasitos no estômago. No intestino, a maior concentração de parasitos foi no 20º dia (63,2%), e no 10º (14,1%) e 30º (57,4%). A ampola retal apresentou densidade parasitária inicialmente de 1,1% (10º dia), 9,6% (20º) e 30,9% (30º).

A concentração da população de epimastigotas no estômago supera os demais grupos estudados, com $\bar{X} = 26 \times 10^5$ (10º dia). Somente no 30º dia no estômago, a proporção de epimastigotas foi menor. No intestino e na ampola retal observou-se uma estabilidade na distribuição da população de epimastigotas nos períodos de observação (Fig. 5.5).

No 10º dia, as formas tripomastigotas predominaram no estômago (1,7%), pois não foram encontradas essas formas em nenhum dos demais compartimentos. No 20º dia foram quantificados poucos, tendo sido encontrado tripomastigotas em pelo menos um espécime analisado, em cada porção do tubo digestório, sendo no estômago 3,0%, no intestino 0,1% e na ampola retal 1,3%. No 30º dia, não foi encontrado nenhum tripomastigota no estômago de todos os espécimes analisados, e o intestino e ampola passaram a apresentar a maior densidade populacional desta forma com médias de $0,2 \times 10^5$ (3,6%) e $0,1 \times 10^5$ (9,6%), respectivamente (Tab. 5.1, Fig. 5.5).

As formas de transição se encontravam bem distribuídas no tubo digestório, em todos os dias de observação, com exceção da ampola no 10º dia com somente três espécimes ($\bar{X} = 0,01 \times 10^5$) e estômago no 30º dia também três espécimes ($\bar{X} = 0,08 \times 10^5$), sendo este o período de menor densidade parasitária nesta porção do tubo digestório. No estômago, no 10º dia apresentou (5,9%), o pico de formas de transição no 20º dia com $\bar{X} = 2 \times 10^5$ parasitos (21,0%). Na ampola, encontrou-se 4,0% dessa forma no 10º dia e 14,0% nos 20º e 30º dias (Tab. 5.1). Porém no 30º dia, em que foi encontrada a maior densidade parasitária nesta porção, foi quantificada $\bar{X} = 0,2 \times 10^5$ de tripomastigotas.

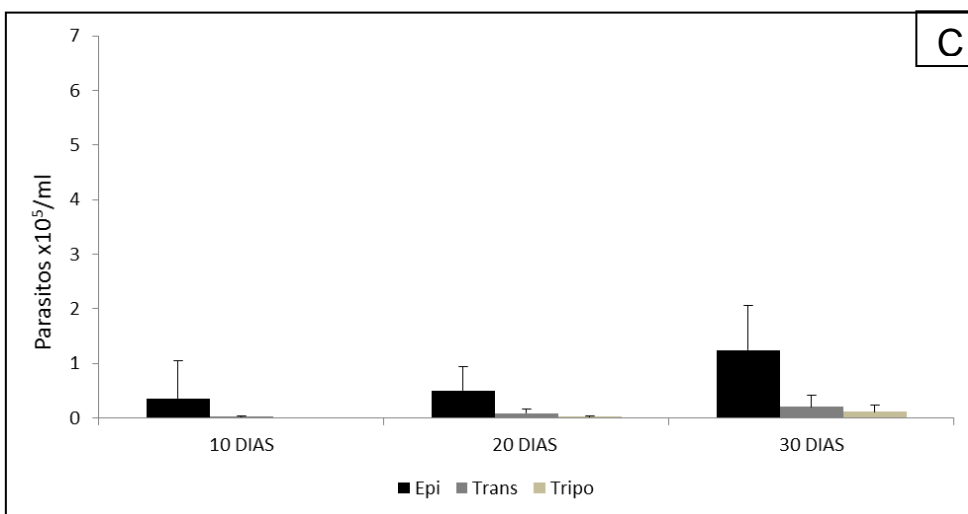
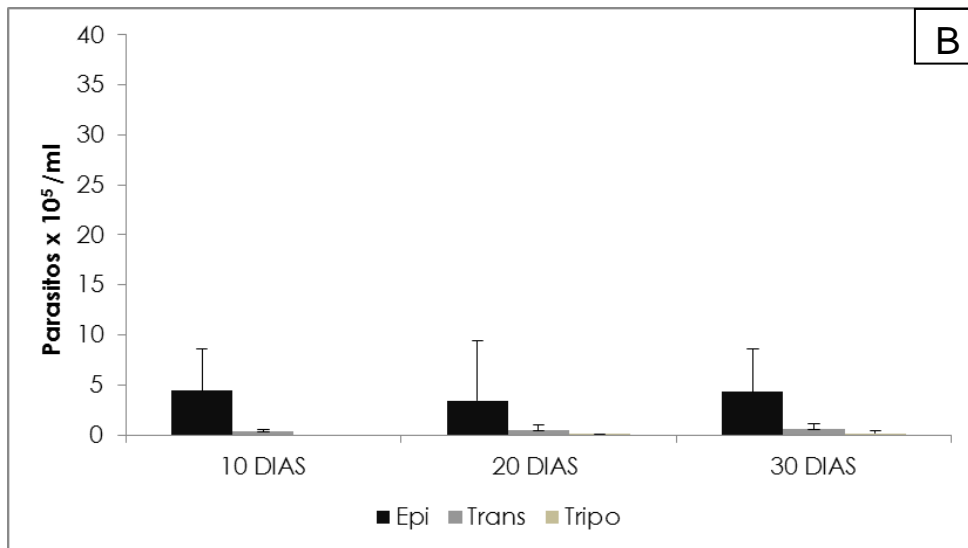
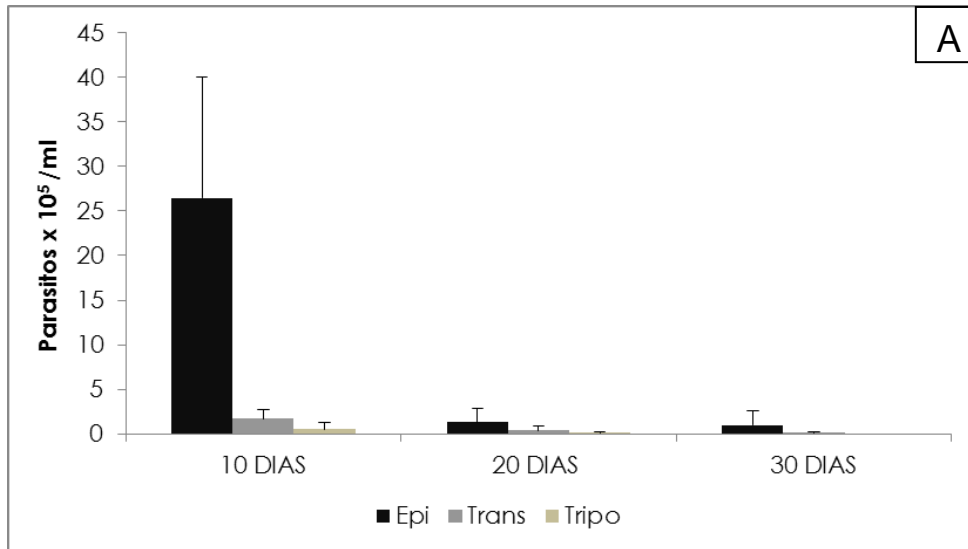


Figura 5.5: Desenvolvimento de *Trypanosoma cruzi* (cepa 0354) em *T. b. brasiliensis* nos 10^o e 20^o dias após alimentação infectante. (A) Estômago; (B) Intestino; (C) Ampola retal. A coluna vinho representa a forma epimastigota, a coluna rosa representa as formas de transição e a coluna laranja os tripomastigotas metacíclicos.

5.2.5 Suscetibilidade à infecção e análises estatísticas

Na figura 5.6 observa-se como a interação entre a cepa 0354 ocorreu de forma diferente com os híbridos e parentais nos três compartimentos do tubo digestório. Não foram encontradas diferenças significativas entre Hbj e Hjb, e por isso foram identificados como um único grupo.

No estômago, o número de epimastigotas e formas de transição foi significativamente menor em *T. juazeirensis* do que nos híbridos e *T. b. brasiliensis* ($\chi^2=12,016$; $\chi^2=19,899$; $p=0,029$ e $p=0,01$). Segundo a análise estatística *T. b. brasiliensis* apresentou valor intermediário de epimastigotas no estômago, sendo assim não foi possível diferenciá-lo dos híbridos através do teste estatístico, porém pode-se concluir que a média de epimastigotas nesta região apresentada por *T. b. brasiliensis* foi alta (20×10^5), aproximando-o do grupo de híbridos. A quantidade de tripomastigotas no estômago foi significativamente maior em híbridos do que nos parentais ($\chi^2=43,550$; $p=0,013$).

No intestino somente foi encontrada diferença significativa em relação à quantidade de tripomastigotas, os quais nos híbridos apresentaram maior número do que parentais ($\chi^2=26,603$; $p<0,001$).

Na ampola retal, *T. juazeirensis* apresentou a menor média de epimastigotas em relação aos demais que constituem um único grupo, sendo que as maiores médias destes foram no 20º e 30º dias ($\chi^2=12,464$; $p=0,09$). A população de formas de transição na ampola retal não apresentou diferença significativa entre as espécies. Porém foi possível identificar que as maiores médias encontradas em todos os grupos foram nos 20º e 30º dias ($\chi^2=19,496$; $p=0,05$). A análise do total de formas tripomastigotas metacíclicas na região da ampola retal demonstrou que em todos os grupos ocorreu um aumento ($\chi^2=32,007$; $p<0,01$) do 10º para o 20º dia ($\chi^2=15,550$; $p<0,01$), porém a quantidade encontrada nos híbridos foi significativamente maior do que o que foi encontrado nos parentais.

No último período de observação (30º dia), os híbridos apresentaram queda de tripomastigotas na ampola retal (Hbj, 10º dia $n=6$, $\bar{X}= 6 \times 10^3$, 20º dia $n=6$, $\bar{X}= 2 \times 10^4$; 30º dia $n=8$, $\bar{X}= 1 \times 10^4$; Hjb, 10º dia $n=6$, $\bar{X}= 6 \times 10^3$; 20º dia $n=6$, $\bar{X}= 4 \times 10^4$; 30º dia $n=5$, $\bar{X}= 7 \times 10^3$) e as espécies parentais apresentaram elevação da população dessa forma (*T. b. brasiliensis*, 20º dia $n=1$, $\bar{X}= 7 \times 10^2$;

30° dia n=7, \bar{X} = 1×10^4 ; *T. juazeirensis*, 20° dia n=1, \bar{X} = 1×10^2 ; 30° dia n=4, \bar{X} = 1×10^4).

Os dados estatísticos e do crescimento populacional do parasito nos grupos de triatomíneos estudados evidenciaram um padrão mais homogêneo nos híbridos (Fig. 5.6) do que nos parentais.

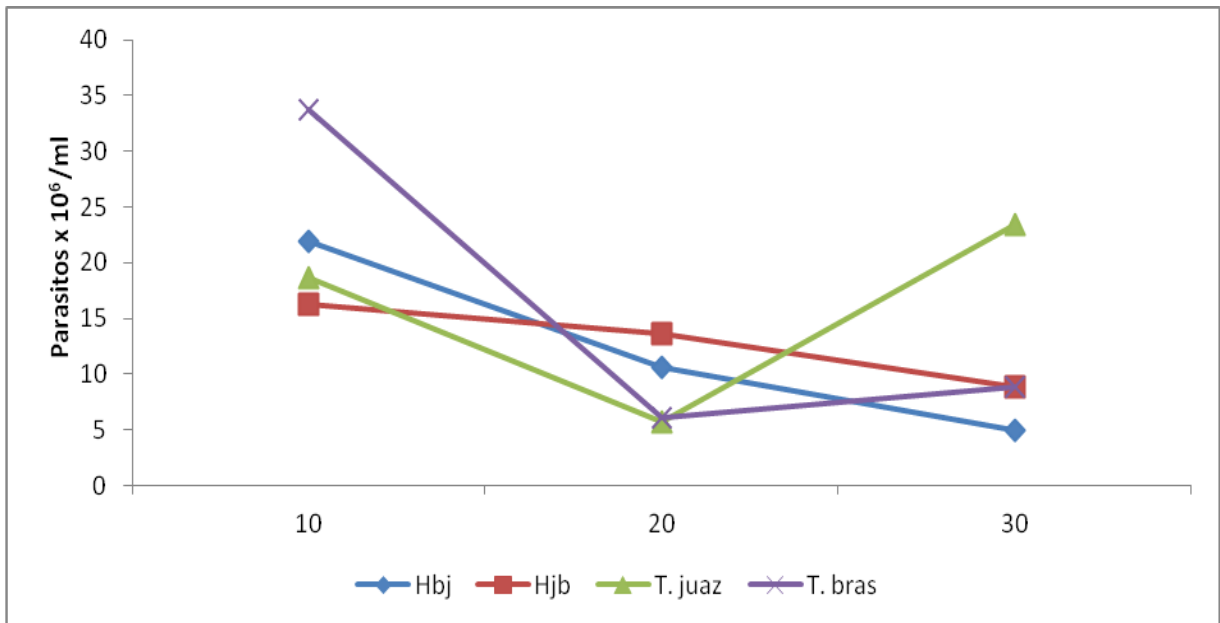


Figura 5.6: Densidade populacional de *Trypanosoma cruzi* (cepa 0354) nos híbridos Hbj e Hjb e em *Triatoma juazeirensis* e *Triatoma b. brasiliensis* nos 10º, 20º e 30º dias após alimentação infectante.

5.2.6 Volume de sangue ingerido – Não foi observada correlação entre o volume de sangue ingerido e a infecção pelo parasito. Espécimes que obtiveram baixa infectividade ingeriram o mesmo volume de sangue do que os que apresentaram infecção mais alta (Tab. 5.2). Um inseto negativo no grupo de *T. juazeirensis*, por exemplo, ingeriu 3x o próprio peso em sangue, em comparação aos que apresentaram infecção mais alta e que ingeriram de 3 a 5x o próprio peso em sangue.

Tabela 5.2: Volume de sangue ingerido (mg) e densidade parasitária encontrada nos espécimes nos 10^o, 20^o e 30^o dias após a infecção.

Espécimes	Dias após infecção					
	10		20		30	
	Peso (mg)	Parasitos	Peso (mg)	Parasitos	Peso (mg)	Parasitos
Híbridos Hbj	230	14 x10 ⁵	200	7 x10 ⁵	157	1 x10 ⁵
	116	27 x10 ⁵	95	8 x10 ⁵	113	2 x10 ⁵
	227	21 x10 ⁵	162	7 x10 ⁵	91	4 x10 ⁵
	197	20 x10 ⁵	141	21 x10 ⁵	127	9 x10 ⁵
	344	20 x10 ⁵	216	5 x10 ⁵	128	7 x10 ⁵
	107	24 x10 ⁵	364	5 x10 ⁵	225	4 x10 ⁵
	150	36 x10 ⁵	283	21 x10 ⁵	108	10 x10 ⁵
	391	23 x10 ⁵	332	6 x10 ⁵	75	3 x10 ⁵
	296	22 x10 ⁵	117	24 x10 ⁵	162	2 x10 ⁵
	154	14 x10 ⁵	228	2 x10 ⁵	111	7 x10 ⁵
Híbridos Hjb	480	7 x10 ⁵	110	10 x10 ⁵	177	0,5 x10 ⁵
	334	30 x10 ⁵	127	23 x10 ⁵	123	13 x10 ⁵
	121	18 x10 ⁵	535	12 x10 ⁵	111	18 x10 ⁵
	235	15 x10 ⁵	125	0,8 x10 ⁵	155	10 x10 ⁵
	262	14 x10 ⁵	291	1 x10 ⁵	196	1 x10 ⁵
	116	11 x10 ⁵	108	7 x10 ⁵	65	8 x10 ⁵
	134	9 x10 ⁵	48	11 x10 ⁵	209	3 x10 ⁵
	124	14 x10 ⁵	153	28 x10 ⁵	228	2 x10 ⁵
	257	27 x10 ⁵	438	10 x10 ⁵	20	0,1 x10 ⁵
	242	17 x10 ⁵	302	33 x10 ⁵	155	32 x10 ⁵
<i>Triatoma juazeirensis</i>	43	11 x10 ⁵	83	12 x10 ⁵	205	12 x10 ⁵
	123	0	94	1 x10 ⁵	396	20 x10 ⁵
	146	0,3 x10 ⁵	109	2 x10 ⁵	102	24 x10 ⁵
	163	2 x10 ⁵	140	2 x10 ⁵	177	82 x10 ⁵
	164	18 x10 ⁵	141	9 x10 ⁵	89	0,8 x10 ⁵
	239	43 x10 ⁵	159	17 x10 ⁵	257	2 x10 ⁵
	295	6 x10 ⁵	218	6 x10 ⁵	149	3 x10 ⁵
	328	0,6 x10 ⁵	278	2 x10 ⁵	152	47 x10 ⁵
	390	9 x10 ⁵	328	2 x10 ⁵	160	16 x10 ⁵
	213	97 x10 ⁵	336	2 x10 ⁵	142	28 x10 ⁵
<i>Triatoma b. brasiliensis</i>	220	49 x10 ⁵	707	27 x10 ⁵	241	4 x10 ⁵
	209	38 x10 ⁵	345	6 x10 ⁵	307	5 x10 ⁵
	140	80 x10 ⁵	297	3 x10 ⁵	363	7 x10 ⁵
	75	48 x10 ⁵	286	4 x10 ⁵	128	3 x10 ⁵
	202	50 x10 ⁵	410	6 x10 ⁵	170	10 x10 ⁵
	311	43 x10 ⁵	184	1 x10 ⁵	383	3 x10 ⁵
	100	10 x10 ⁵	410	5 x10 ⁵	480	8 x10 ⁵
	101	36 x10 ⁵	59	2 x10 ⁵	375	6 x10 ⁵
	92	28 x10 ⁵	125	4 x10 ⁵	297	25 x10 ⁵
	140	28 x10 ⁵	219	2 x10 ⁵	320	6 x10 ⁵

5.3 Comportamento alimentar e de defecação

5.3.1 Total de alimentações realizadas – A análise da alimentação das ninfas de 5º estágio mostrou que durante as duas primeiras semanas os insetos buscaram avidamente a fonte alimentar para saciar o período de jejum de 10 dias. Da 3ª para 5ª semana esta procura foi diminuindo, exceto para Hbj e *T. b. brasiliensis* que se mantiveram constantes (Tab. 5.3).

Tabela 5.3: Percentual de repastos semanais pelos espécimes.

Espécimes	N	Semana				
		1ª	2ª	3ª	4ª	5ª
Híbridos Hbj	30	100%	87%	63%	33%	27%
Híbridos Hjb	12	83%	100%	50%	50%	50%
<i>T. b. brasiliensis</i>	30	77%	93%	77%	57%	57%
<i>T. juazeirensis</i>	30	97%	93%	47%	37%	30%

O tempo de acompanhamento das alimentações variou de acordo com o tempo em que foram obtidas as ninfas de 5º estágio, sendo assim *T. b. brasiliensis* e *T. juazeirensis* foram acompanhados até a 6ª semana e Hbj e Hjb até a 10ª semana. Observou-se que geralmente após um período de duas semanas as ninfas que não realizaram a ecdise voltaram a se alimentar. Os híbridos necessitaram de mais tempo para realizar a ecdise, entretanto poucos insetos procuraram a fonte alimentar neste período. Aqueles que não se alimentaram apresentaram o comportamento de busca de um refúgio.

A partir da 6ª semana de alimentação de *T. juazeirensis* houve a primeira muda imaginal enquanto que para *T. b. brasiliensis* esta somente ocorreu na 8ª semana. Ambos os grupos de híbridos (“Hbj” e “Hjb”) iniciaram a muda imaginal a partir da 7ª semana de alimentação. Até 8ª semana, 11 espécimes de *T. juazeirensis*, um de Hbj, dois de Hjb e três de *T. b. brasiliensis* realizaram a muda imaginal.

5.3.2 Início da alimentação – Todos os grupos estudados mostraram voracidade na procura da fonte alimentar, iniciando o repasto sanguíneo no tempo mínimo de menos de um segundo.

Na primeira semana de alimentação, Hbj apresentou \bar{x} = 1min 24s para

iniciar a alimentação (tempo decorrido entre o oferecimento da fonte alimentar e a picada do inseto), Hbj com \bar{X} = 1min 52s, *T. b. brasiliensis* com \bar{X} = 1min 53 e *T. juazeirensis* com \bar{X} = 55 segundos. *T. b. brasiliensis* e *T. juazeirensis* apresentaram as menores médias de início do repasto durante as primeiras cinco semanas (Fig. 5.7). A partir da segunda semana *T. juazeirensis* e *T. b. brasiliensis* se aproximaram da fonte alimentar e iniciaram a alimentação em menos tempo, em comparação aos híbridos. No decorrer das semanas de oferecimento da alimentação, o tempo que os insetos levavam para iniciar a alimentação foi aumentando.

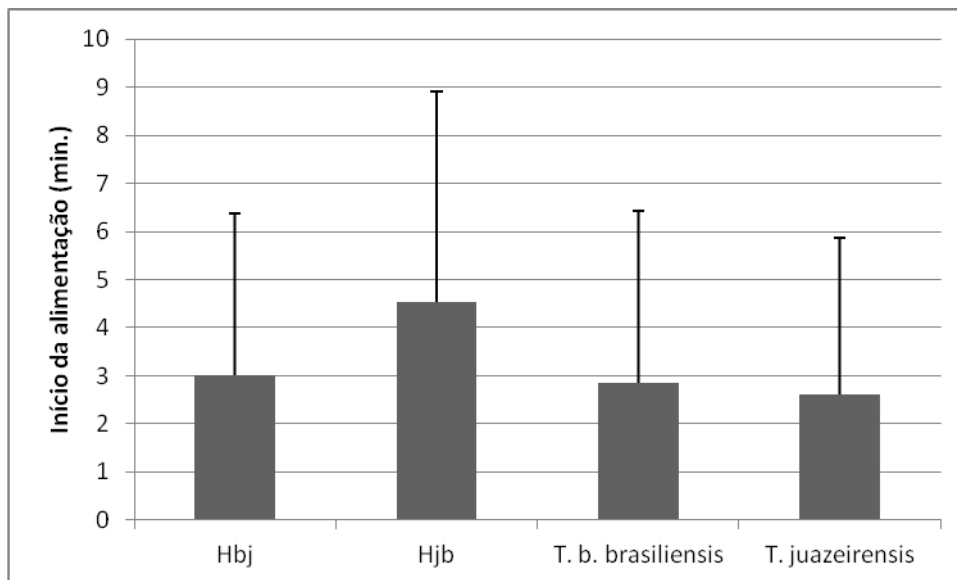


Figura 5.7: Tempo médio (em minutos) do início da alimentação em que os espécimes de 5º estágio de Hbj, Hjb, *Triatoma b. brasiliensis* e *Triatoma juazeirensis*, no período de cinco semanas.

Segundo análise estatística, houve diferença significativa entre os grupos na terceira semana de alimentação (Kruskal-Wallis $\chi^2=71,533$ $p=0,013$), segundo o teste ANOVA (teste post-hoc Tukey e Student-Newman-Keuls) o híbrido Hjb levou mais tempo para iniciar a alimentação nesse período do que os demais. Porém observou-se uma tendência em híbridos iniciarem o repasto sanguíneo mais tardiamente em comparação aos seus parentais durante toda observação.

5.3.3 Duração da alimentação e peso adquirido – Foi avaliado o tempo médio, mínimo e máximo que os espécimes passaram se alimentando e a quantidade de sangue ingerida. Hbj levou um tempo médio de 37 minutos (Mínimo = 3 minutos, Máximo = 2 horas e 49 minutos); Hjb \bar{x} = 48 minutos de duração da alimentação (Mínimo = 2 minutos, Máximo = 3 horas e 4 minutos); *T. b. brasiliensis* \bar{x} = 41 minutos (Mínimo = 46 segundos, Máximo = 2 horas e 36 minutos) e *T. juazeirensis* \bar{x} = 36 minutos, (Mínimo = 2 minutos, Máximo = 2 horas e 1 minuto).

Após a 6ª semana, alguns espécimes se aproximavam para se alimentar, mas ficavam poucos segundos e não chegavam a ingerir qualquer quantidade de sangue. Também foi observado que alguns espécimes tentavam se alimentar por longos períodos (até 3 horas) ininterruptos ou tentando posições diferentes, inserindo o rostro em diferentes locais, mas sem sucesso, pois não atingiram a repleção e nem obtiveram ganho de peso.

Segundo as análises, o parâmetro de duração da alimentação dos espécimes não demonstrou diferenças estatisticamente significativas.

A observação da média, mínimo e máximo de tempo que durou o repasto em todos os grupos, por semana encontra-se na tabela 5.4.

Tabela 5.4: Tempo médio (\bar{x}), Desvio Padrão (DP) e amplitudes: Mínima (Mín) e Máxima (Máx), em minutos da duração do repasto semanal realizada pelos espécimes (n) de Hbj e Hjb e *Triatoma b. brasiliensis* e *Triatoma juazeirensis*.

Espécimes																				
		Hbj				Hjb					<i>T. b. brasiliensis</i>					<i>T. juazeirensis</i>				
		Amplitude				Amplitude					Amplitude					Amplitude				
Semana	n	\bar{x}	DP	Mín	Máx	n	\bar{x}	DP	Mín	Máx	n	\bar{x}	DP	Mín	Máx	n	\bar{x}	DP	Mín	Máx
1 ^a	30	43,1	31,6	9,4	169,2	12	65,7	47,2	22,8	184,3	30	48,5	36,1	8,1	156,4	30	56,2	34,9	12,6	121
2 ^a	30	43,1	25	11	129,9	12	47,2	42,1	11,1	166,9	30	42,7	32,7	2,8	150,6	30	28,7	15	0,3	64,4
3 ^a	30	31	25,6	6,8	99,4	12	66,4	64,3	2,5	154,1	30	43,4	47,1	3,1	213,8	30	35,6	16,2	14,5	72,2
4 ^a	30	26,6	21,2	4,5	64,6	12	30,6	18,2	10	58,5	30	41,2	42,7	3,8	140,6	30	12,1	7,4	5	29,7
5 ^a	30	20,3	17,2	2,9	50,4	12	28,4	17,2	10,9	58,5	30	27,4	26,4	0,3	81,3	30	21,3	17,4	0,3	46,5
6 ^a	30	7,4	1,7	6	9,3	12	45,2	29,4	5,5	71,2	30	14,1	11,8	1,9	32,8	30	16,9	10,8	8,2	35,4
7 ^a	30	6,9	3,2	2,6	10,1	12	22,2	24,7	3,1	50	19	10,4	8,7	0,4	28,7	27	11,4	11,5	3,2	19,5
8 ^a	30	9,6	3,8	6,9	12,3	12	42,6	28,8	9,3	59,4	19	5,6	5,8	0,2	15,6	27	6,3	4,3	2,3	10,9
9 ^a	30	21,5	2	20,1	22,9	12	55,3	52,8	2	108,5	18	53,9	77,3	1,4	187,2	20	22,6	19,4	2,6	47,2
10 ^a	30	4,3	6,2	2	11,4	12	47,2	23,5	29	78,3	18	33	24,7	1,5	54,1	20	8	5,3	2,9	14,8

A média de peso adquirido pelos grupos durante as primeiras cinco semanas foi de 101 mg para Hbj, 51 mg para Hjb, 80 mg para *T. b. brasiliensis* e 109 mg para *T. juazeirensis* (Fig. 5.8). A primeira semana foi o período em que os insetos mais se alimentaram, apresentada diferença significativa entre as espécies ($\chi^2=180521,49$ $p<0,01$), e através dos testes post-hoc foi encontrado que Hjb e *T. b. brasiliensis* apresentaram médias de ingestão de sangue menores do que Hbj e *T. juazeirensis*.

Ao longo do tempo os insetos já não buscavam mais a fonte alimentar com a mesma frequência, e a maioria dos espécimes que chegavam a iniciar uma alimentação permaneciam por pouco tempo, acarretando na queda de ganho de peso (Fig. 5.8).

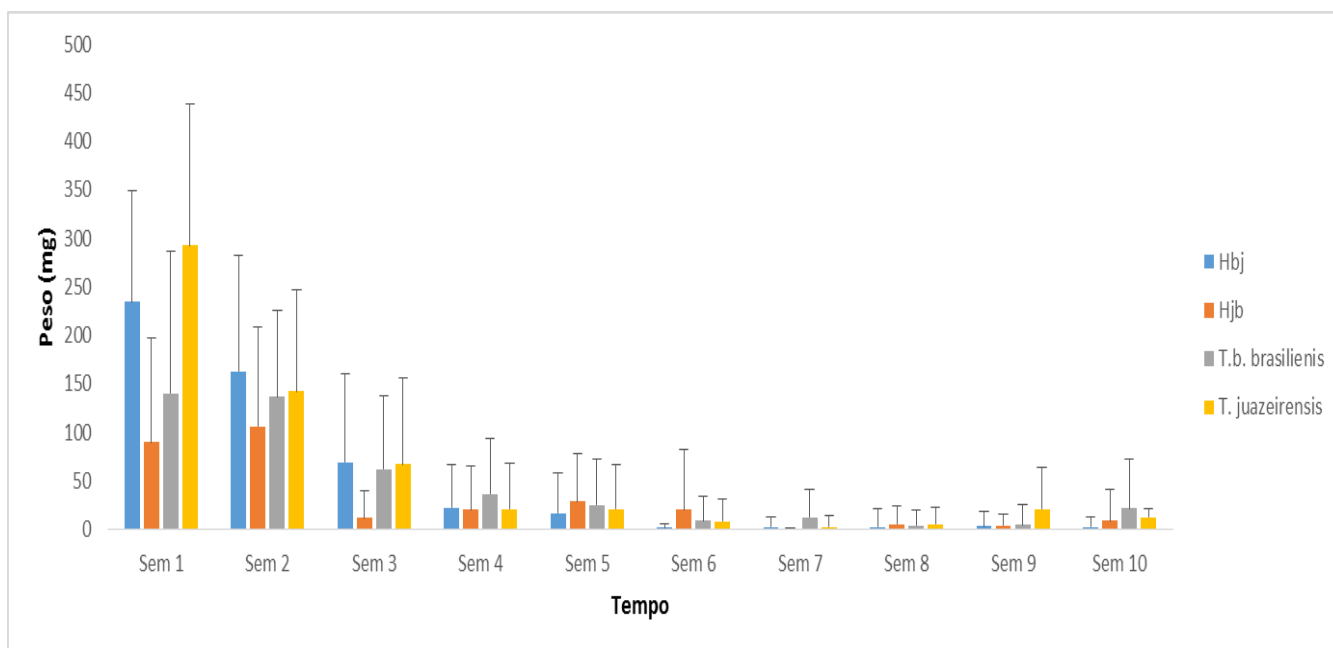


Figura 5.8: Média e desvio padrão de peso (mg) adquirido semanalmente, após alimentação. Quantidade de espécimes observados: Hbj 1^a à 10^a semana (n=30); Hjb 1^a à 10^a (n=12); *T. b. brasiliensis* 1^a à 6^a (n=30), 7 e 8 (n=19), 9 e 10 (n=18) e *T. juazeirensis* 1^a à 6^a (n=30), 7 e 8 (n=27), 9 e 10 (n=20).

5.3.4 Defecações Totais – Todos os grupos estudados defecaram até a 5^a semana de alimentação. A partir deste período, híbridos e *T. b. brasiliensis* não defecaram mais e apenas *T. juazeirensis* ainda voltou à defecar nas 6^a e 9^a semanas de alimentação (Tab. 5.5).

Alguns espécimes defecaram mais de uma vez durante a alimentação,

isto é, interrompendo a alimentação para defecar (às vezes mais de uma vez), ou defecaram mais de uma vez após a alimentação, até completar o período de 10 minutos após o término da alimentação, ou ainda os insetos que defecaram durante e após o término do repasto (Tab. 5.5, Fig. 5.9).

Tabela 5.5: Porcentagem do total de defecações realizadas e porcentagem de insetos no 5º estádio, que defecaram mais de uma vez na mesma alimentação.

Especímenes Defecação	Semanas									
	1ª		2ª		3ª		4ª		5ª	
	Defecações	Repetição de defecação	Defecações	Repetição de defecação	Defecações	Repetição de defecação	Defecações	Repetição de defecação	Defecações	Repetição de defecação
Híbridos Hbj	70%	45%	57%	6%	23%	0%	23%	14%	10%	0%
Híbridos Hjb	58%	25%	33%	0%	8%	0%	0%	0%	17%	0%
<i>T. b. brasiliensis</i>	53%	29%	60%	11%	47%	23%	17%	20%	13%	0%
<i>T. juazeirensis</i>	63%	35%	53%	19%	30%	22%	20%	0%	13%	0%

Na primeira semana de observação houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos (Kruskall-Wallis $\chi^2=34,203$ $p=0,01$) e através dos testes post-hoc foi possível identificar dois grupos distintos, em que híbridos levavam em média mais tempo para defecar após a alimentação (Hbj = 2,5 e Hjb = 4,1 minutos) do que seus parentais (*T. b. brasiliensis* = 1,8 e *T. juazeirensis* = 1,6 minutos).

5.3.5 Defecações durante a alimentação – Foi observado, em todos os grupos estudados, o comportamento de interrupção do repasto para defecar e o retorno para se alimentar.

Os espécimes de *T. b. brasiliensis* foram os que mais realizaram defecações durante a alimentação do que os demais (n=18), seguido por Hbj (n=16), *T. juazeirensis* (n=12), e Hjb (n=5). No total das cinco semanas Hjb apresentou a maior porcentagem de defecação durante a semana (41%) (Fig. 5.9), pois todos os espécimes analisados (n=12) defecaram na 3ª semana.

Dentre os demais, a variação de defecações durante o repasto foi *T. b. brasiliensis* (28%), *T. juazeirensis* (27%) e Hbj (26%).

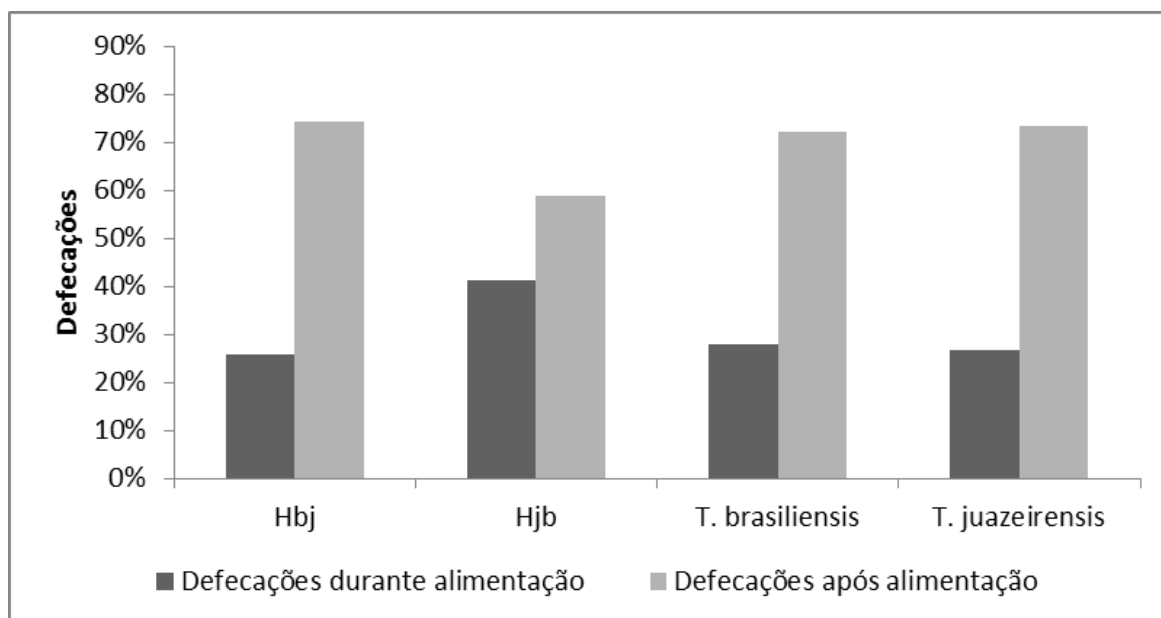


Figura 5.9: Porcentagem de defecações que ocorreram durante o repasto (barra cinza escura) e após o repasto (barra cinza clara). Nos híbridos: Hbj (n= 30); Hjb (n= 12); e nos parentais: *T. b. brasiliensis* (n= 30) e *T. juazeirensis* (n= 30).

O intervalo de tempo mais curto entre a alimentação e a defecação foi de <1 segundo e o maior tempo foi de 6min 31s, sendo que 78% dos insetos defecaram durante a alimentação até 30 segundos. Na primeira semana todos os indivíduos que defecaram durante a alimentação (n= 5) fizeram no período de tempo de <1 até 30 segundos.

T. juazeirensis apresentou o intervalo de tempo mais curto entre a alimentação e a defecação, sendo o tempo mínimo de <1 segundo e o máximo de 3min14s, sendo que 82% dos espécimes defecaram até o período de 30 segundos. Nenhum espécime defecou durante a alimentação na 3ª semana de alimentação.

Os híbridos Hbj que realizaram a defecação durante a alimentação fizeram em tempo tão curto quanto às espécies parentais, defecaram no período mínimo de <1 segundo e no máximo de 6min31, sendo que 81% dos espécimes defecaram até 30 segundos do intervalo de alimentação. Do grupo

Hjb, 60% dos espécimes defecaram até o período de 30 segundos. O período mínimo de defecações durante a alimentação apresentado por este grupo foi também de <1 segundo e máximo 3min26s.

Alguns insetos voltavam a se alimentar após terem interrompido a alimentação para defecar e muitos destes tornavam a defecar no término da alimentação, em diferentes períodos de tempo.

5.3.6 Tempo de defecação até 1min após a alimentação – Ao término da alimentação os espécimes de *T. b. brasiliensis* realizaram mais defecações em menos de 1 minuto (49%) do que os demais, seguido de Hbj (47%), *T. juazeirensis* (40%) e Hjb (29%). Assim como ocorreu nas defecações durante a alimentação, as porcentagens maiores pertencem ao período de defecações até 30 segundos, principalmente nas primeiras duas semanas de alimentação.

Somente o grupo “Hjb” que não defecou em menos de 1 minuto na primeira semana, mas a segunda semana representou 67% das defecações até 1 minuto após o repasto. Nos demais grupos, a primeira semana foi quando ocorreram mais defecações em até 1 minuto após o término do repasto: Hbj 1ª semana (48%) e 2ª semana (33%), *T. juazeirensis* 1ª semana (42%) e 2ª semana (32%) e *T. b. brasiliensis* 1ª semana (45%) e 2ª semana (30%).

5.3.7 Tempo de defecação até 10min após a alimentação – Todos os espécimes que defecaram até 10 minutos são mostrados em percentual na figura 5.10.

Ao longo do tempo a quantidade de alimentações e defecações foi diminuindo em todos os grupos, sendo que o tempo que os insetos levavam para defecar aumentava. Observa-se que a partir da 4ª semana de alimentação as defecações começam a acontecer depois de 3 minutos.

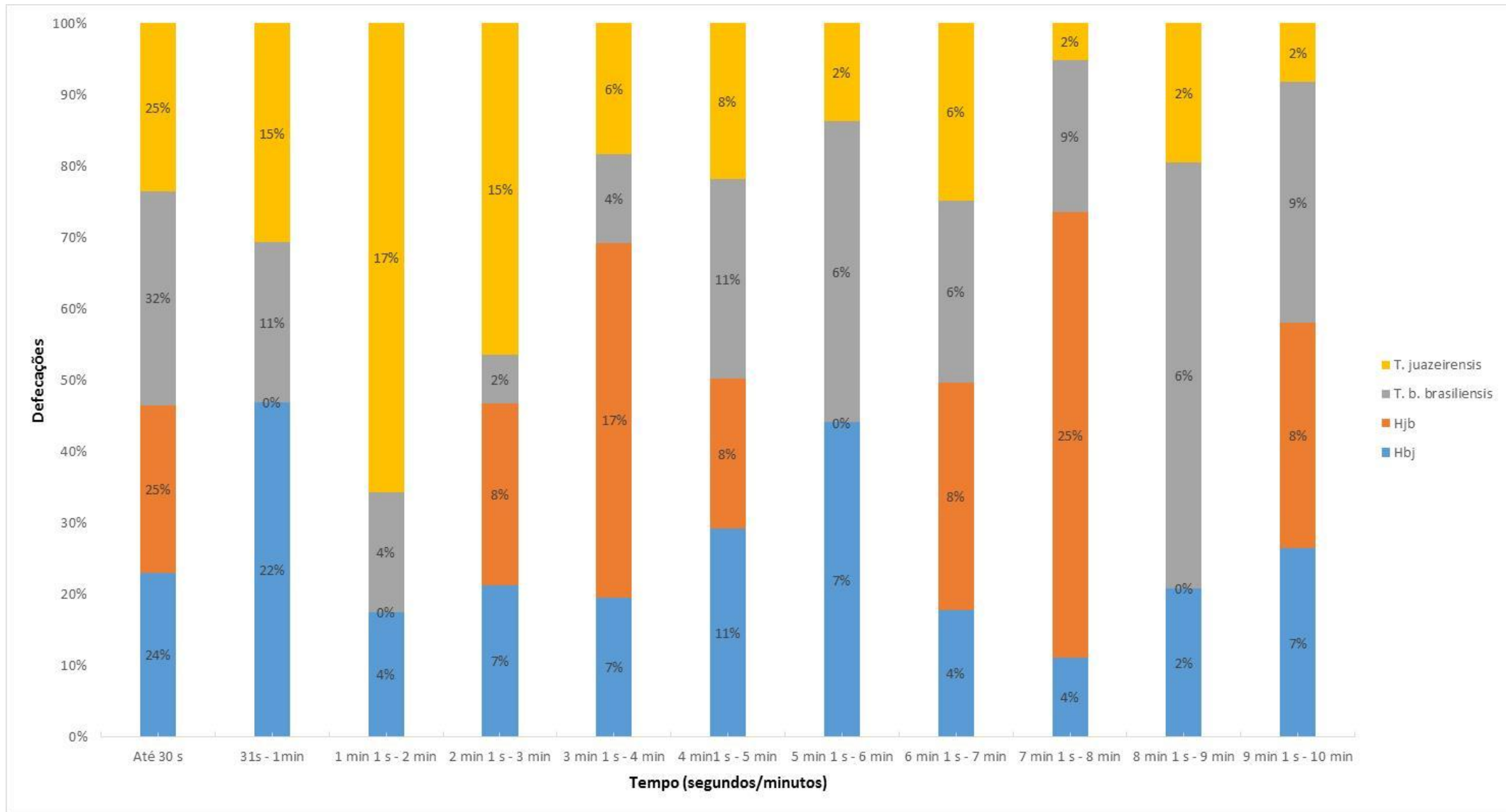


Figura 5.10: Porcentagem de defecações dos espécimes observados até 10min após o repasto.

5.3.8 Comportamento de defecação – Na primeira semana de alimentação os espécimes de todos os grupos em sua maioria eliminaram fezes, oriundas da digestão do sangue ingerido na última alimentação antes da ecdise. A partir da segunda semana os insetos defecaram mais urina, mas também urina e fezes. Após um período sem se alimentar, quando se alimentavam novamente e defecavam, geralmente eliminavam fezes ou urina junto com fezes.

Os espécimes apresentaram os seguintes comportamentos durante a defecação: a) próximo do camundongo e não se afastava para defecar; b) sobre o camundongo; c) se afastava do camundongo retrocedendo por 3, 4 ou 5 passos; d) se afastava para trás e então andava para frente e defecava arrastando o abdômen na superfície do fundo do pote, deixando um rastro das fezes; e) se afastava, rodava 360°, 180°, 170°, 160° ou 50°, e se aproximava com abdômen voltado para o camundongo e defecava. Foi observado que podem se afastar de 0,5 cm à 7 cm de distância do camundongo.

O comportamento mais típico observado em “Hbj” e “Hjb” foi: a) virar 180° ou 170° e defecar arrastando o abdômen na superfície; b) andar para trás virar 180° ou 160° e defecar.

T. b. brasiliensis e *T. juazeirensis* apresentaram comportamento de defecação mais próximo da fonte alimentar: a) na maioria das defecações os espécimes viravam 180° e defecavam à uma distância de 0,5 à 3 cm do camundongo ou b) permaneciam na mesma posição de alimentação e defecavam, c) defecaram diretamente em cima do camundongo e d) andavam para trás e defecavam. Ambos apresentaram este comportamento ao longo do tempo, porém *T. juazeirensis* demorava mais tempo para defecar, sendo assim somente defecava quando já havia se distanciando da fonte alimentar.

6. DISCUSSÃO

6.1 Cruzamento das espécies em laboratório

A identificação de cruzamentos naturais interespecíficos no grupo de triatomíneos vem sendo registrada ao longo dos anos e, por isso são crescentes os estudos sobre híbridos naturais (Barrett 1991; Herrera-Aguilar *et al.* 2009; Martínez-Hernandez *et al.* 2010; Mas-Coma & Bargues 2009; Noireau *et al.* 1998) e alguns com híbridos experimentais (Almeida *et al.* 2009; Correia *et al.* 2013; Martínez-Ibarra *et al.* 2008). Esses estudos geralmente tentam solucionar as relações filogenéticas entre as espécies, em que por meio de reprodução é possível comprovar o isolamento reprodutivo, como entre *Meccus* e espécies do complexo *Phyllosoma* (Martínez-Ibarra *et al.* 2008) ou o grau de compatibilidade reprodutiva como é o caso de *Triatoma lenti* Sherlock & Serafim, 1967 e *T. sherlocki*, atualmente considerados como não relacionados (Mendonça *et al.* 2014).

Diferente do complexo *Phyllosoma*, em que foi comprovado que por meio da análise morfológica dos híbridos não é possível caracterizar as populações deste complexo (Martínez-Hernandez *et al.* 2010), as características morfológicas determinam bem as espécies e subespécies do complexo *T. brasiliensis* (Costa *et al.* 1997b, 2013). Portanto os fenótipos do complexo *T. brasiliensis* recentemente encontrados em Pernambuco sugerem evidências de uma possível hibridação natural entre *T. b. brasiliensis* e *T. juazeirensis* (Costa *et al.* 2009; Gumiel 2011). Por isso, o presente estudo aborda os híbridos de *T. b. brasiliensis* e *T. juazeirensis*, por meio do cruzamento entre essas espécies, para elucidar o papel epidemiológico destes híbridos.

Usinger *et al.* (1966) comprovaram que as diferenças morfológicas não estão necessariamente correlacionadas a uma barreira biológica entre espécies. Cruzamentos experimentais entre espécies do "complexo *Triatoma infestans*" mostraram espécies com diferenças morfológicas em todos os estádios, incluindo o ovo, com isolamento ecológico, com preferências alimentares distintas, mas que apresentam alta compatibilidade reprodutiva, até

mesmo híbridos naturais. O mesmo ocorre com o complexo *Protacta*, em que as espécies mais semelhantes não conseguem gerar híbridos, enquanto que as mais distintas produzem híbridos férteis.

Os membros do complexo de espécies *T. brasiliensis* são morfológica e molecularmente distintos, porém os cruzamentos experimentais mostraram que são reprodutivamente compatíveis, ao se obter híbridos férteis (Costa *et al.* 2003b; Correia *et al.* 2013). Ainda foi possível identificar certo nível de incompatibilidade entre populações, como no caso de *T. b. brasiliensis* e *T. melanica*, que apresentaram infertilidade no cruzamento de ♂ *T. b. brasiliensis* x ♀ *T. melanica* e pouca fertilidade entre ♀ *T. b. brasiliensis* x ♂ *T. melanica*, na segunda geração (F2), indicando distanciamento filogenético entre essas duas populações e confirmado pelas análises moleculares (Costa *et al.* 1997b, 2003b; Monteiro *et al.* 2004).

Nesses cruzamentos experimentais entre membros do complexo *T. brasiliensis* não foi identificada incompatibilidade reprodutiva entre *T. b. brasiliensis* e *T. juazeirensis* (Costa *et al.* 2003b), confirmado no presente estudo. Porém, foi observado que a combinação ♀ *T. b. brasiliensis* x ♂ *T. juazeirensis* foi capaz de gerar mais híbridos F1 do que a combinação recíproca. Apesar de Costa *et al.* (2003b) só ter acompanhado o desenvolvimento de 3 casais, pode-se também perceber que na primeira geração foram obtidos mais híbridos férteis nesta mesma combinação.

Os estudos sobre a evolução das espécies, no que diz respeito ao processo de seleção natural de populações híbridas, são divergentes. Uma teoria afirma que o papel da hibridação é mínimo no processo evolutivo de uma espécie, enquanto outra teoria, que vem ganhando peso ao longo dos anos, afirma que a produção de novas combinações gênicas cria condições genéticas favoráveis para uma grande e rápida mudança evolutiva (Pérez *et al.* 2005) sugerindo também que os genótipos híbridos podem ser mais aptos do que em parentais (Burke & Arnold 2001). Em triatomíneos, com relação ao complexo *T. brasiliensis*, os estudos indicam a existência de vantagens biológicas no caso dos híbridos, pois não só os membros deste complexo são capazes de gerar híbridos férteis, como quando analisado o parâmetro de comportamento de voo, os híbridos de *T. juazeirensis* e *T. sherlocki* mostraram-

se aptos para o voo, enquanto *T. sherlocki* não voava, e ainda apresentava pernas mais longas que *T. juazeirensis* (Almeida *et al.* 2012). Muitos estudos já concluíram que a hibridação natural representa um papel importante na evolução de complexos de espécies (Arnold & Hodges 1995).

Os cruzamentos interespecíficos podem ser decisivos na origem e diversificação de espécies, resultando em importantes consequências epidemiológicas devido a diferentes competências e capacidades vetoriais apresentadas pelos híbridos (Costa *et al.* 2009).

6.2 Suscetibilidade de *T. b. brasiliensis*, *T. juazeirensis* e híbridos à infecção por *T. cruzi*

Vários fatores estão envolvidos na relação parasito-hospedeiro, para que o triatomíneo realize a transmissão de *T. cruzi* para hospedeiros suscetíveis, tais como: a suscetibilidade do inseto vetor à cepa do parasito; a média de tempo entre o repasto sanguíneo e a defecação infectante, ainda em contato direto com a pele do hospedeiro; e a quantidade de alimentações realizadas em cada estágio do ciclo de desenvolvimento. Este conjunto possibilita identificar a capacidade vetorial dos triatomíneos (Galvão *et al.* 1995), que abrange vários parâmetros biológicos, ecológicos e comportamentais do inseto, e ainda a sua competência vetorial que é estimada a partir da taxa de indivíduos da população suscetível ao agente etiológico, fatores esses intrínsecos ao inseto (Oliveira 2013).

A suscetibilidade de triatomíneos ao *T. cruzi* depende muito da interação da cepa com a espécie de triatomíneo. Muitos estudos já foram feitos a respeito desta interação, principalmente para encontrar modelos ideais para o xenodiagnóstico, importante forma de diagnóstico ainda muito utilizado (Silva & Salha 1994). Apesar das técnicas de exame por compressão abdominal ou dejeções espontâneas do inseto sejam de extrema importância para caracterizar uma espécie como infectada e capaz de transmitir o parasito, pouco informa a respeito da presença dos flagelados ao longo de seu tubo intestinal (Bronfen *et al.* 1984). Através da dissecação do tubo digestório dos insetos é possível avaliar precisamente como ocorre a interação da cepa com

os insetos, auxiliando no entendimento dos mecanismos que ocorrem durante quedas parasitárias, assim como, estabelecer os dados a respeito de espécies que se infectam, mas não conseguem desenvolver ou eliminar as formas infectantes ou ainda espécies que passam por bruscas oscilações da densidade parasitária, para entender o que acontece no intervalo entre um exame positivo e o negativo subsequente.

O processo de morfogênese no trato digestório do inseto é crucial para que o parasito complete seu ciclo de vida natural e consiga se manter no triatomíneo (Garcia *et al.* 1984). No entanto, poucos são os estudos que abordam a suscetibilidade à infecção de *T. cruzi* em híbridos naturais ou experimentais por isso é de extrema importância entender como uma determinada cepa (como no caso a cepa 0354) pode interagir com insetos parentais e híbridos, especialmente se estes apresentam importância na transmissão da endemia Chagásica, como é o caso dos membros do complexo *T. brasiliensis* (Costa *et al.* 2003a, 2013).

Martins *et al.* (2000) analisando o comportamento diferenciado de duas cepas de *T. cruzi* em três espécies diferentes de triatomíneos observaram que uma das cepas apresentou um padrão mais homogêneo, relacionado ao número de insetos positivos durante os dias examinados. No presente estudo, foram inicialmente realizadas infecções em *T. infestans* e foi observado este padrão homogêneo com ambas as cepas 0354 e 0338. Desta forma, a escolha da cepa 0354 baseou-se no seu desenvolvimento mais rápido em cultura (meio LIT).

A forma epimastigota foi prevalente em todos os compartimentos do tubo digestivo em todos os grupos estudados, fato também observado por Schaub (1989) em *T. infestans* infectados com a cepa Y, em que a forma epimastigota e ocasionalmente amastigotas e tripomastigotas metacíclicos foram encontrados no intestino. Após períodos de jejum de 3 à 4 semanas a porcentagem de formas de transição foi crescente.

A população de epimastigotas e das formas de transição no estômago de *T. juazeirensis* foi significativamente menor do que nos híbridos e em *T. b. brasiliensis*. A importância da forma epimastigota na metaciclogênese do

parasito já fora questionada, no entanto, pode-se ver que ela é predominante no tubo digestório dos insetos estudados. Este resultado corrobora que este estágio de multiplicação e persistência do parasito no tubo digestório, sendo assim a matriz das demais formas (Perlowagora-Szumlewicz & Moreira 1994).

A correlação da queda da população de epimastigotas na região da ampola e elevação da população de tripomastigotas metacíclicas encontrado nos espécimes analisados, com exceção de *T. juazeirensis*, é um evento esperado nas espécies que apresentam boa suscetibilidade à cepa de *T. cruzi* como *R. neglectus*, *R. prolixus* e *P. megistus* para cepa Y (Perlowagora-Szumlewicz & Moreira 1994)

Perlowagora-Szumlewicz & Moreira (1994) demonstraram que a presença da forma de transição é absolutamente necessária, sendo um estágio indeterminado, para transformação de epimastigotas em tripomastigotas metacíclicos. A rapidez com que ocorre a transformação da forma epimastigota para tripomastigota metacíclica depende da natureza da cepa de *T. cruzi*, sendo que a cepa que consegue realizar a transformação mais rapidamente apresenta melhores condições de multiplicação, estabelecimento da infecção, e produção de mais formas tripomastigotas metacíclicas (Garcia *et al.* 1984). No presente estudo foi possível identificar que a população das formas em transição esteve muito bem distribuída no intestino dos espécimes de forma geral, porém é interessante ressaltar que no 30º dia de observação, enquanto nos híbridos e *T. b. brasiliensis* a população parasitária caiu bruscamente, sendo primordialmente encontrada formas epimastigotas e de transição no intestino e ampola retal, em *T. juazeirensis* estas formas apareceram em grande quantidade no estômago neste período. Schaub (1989) em análise do desenvolvimento de *T. cruzi* em *T. infestans*, verificou que as formas de transição de ambas as cepas Chile 5 e 7 se desenvolveram no intestino e no reto, ocorrendo principalmente no último.

Em comparação à porcentagem da população de epimastigotas, a porcentagem de tripomastigotas metacíclicos foi baixa, assim como foi observado em estudo com a cepa Y infectando nove espécies de triatomíneos analisadas até 30 dias após a infecção (Perlowagora-Szumlewicz & Moreira 1994), e em *T. pseudomaculata* e *R. neglectus* até os 60 dias após infecção

(Carvalho-Moreira *et al.* 2003).

No entanto, após um longo período, a taxa das formas tripomastigotas metacíclicas tende a cair, por exemplo, em *T. infestans* infectados com as cepas Y, Yú-Yú e CL houve um aumento da eliminação destas formas até o 60º dia, mas a partir do 90º dia não se observou mais este comportamento, sugerindo uma estabilização ou finalização do processo de colonização do parasito no intestino dos insetos (Alvaregua & Bronfen 1997). Perlowagora-Szumlewicz & Moreira (1994) também identificaram esta queda em *R. neglectus*, *R. prolixus*, *P. megistus* e *T. rubrovaria*.

No estudo de Perlowagora-Szumlewicz & Moreira (1994), *R. neglectus* foi a única espécie que começou a apresentar tripomastigotas metacíclicas a partir do 15º dia após a infecção, enquanto que nas demais espécies estudadas somente a partir do 30º dia. No presente estudo, a maioria dos espécimes híbridos apresentou tripomastigotas metacíclicas desde o 10º dia, aumentando a quantidade ao passar do tempo assim como o observado nas espécies dos estudos supracitadas.

Nos híbridos, a segunda forma mais encontrada no intestino foi a tripomastigota, e nos parentais, a forma de transição. Em um estudo com as cepas Chile 5 e 7 infectando *T. infestans*, ambas as cepas apresentaram mais formas intermediárias no intestino, encontradas principalmente na 3ª semana. Durante a análise de 12 semanas, raramente foi encontrada a forma tripomastigota metacíclica (Schaub 1989). No presente estudo já era encontrada a forma metacíclica desde a 2ª semana (10º dia) em todos os grupos.

Schaub (1989) observou em *T. infestans* que à medida que a população de epimastigotas caía no reto a população de tripomastigotas aumentava. A cepa 0354 também apresentou este comportamento em todos os grupos estudados no presente trabalho. Porém, a presente avaliação foi até o 30º dia, e portanto, obteve-se uma quantidade menor de tripomastigotas que a encontrada com a cepa Chile 7, utilizada por Schaub (1989), em que seu desenvolvimento foi acompanhado até 12 semanas, chegando a representar 30% da população parasitária nesta região.

No 30º dia de análise foi visto uma pequena queda de tripomastigotas metacíclicas na ampola retal dos híbridos, enquanto que as espécies parentais apresentaram pequena elevação da população. Bronfen *et al.* (1984) também observaram em *T. infestans* uma pequena tendência à perda da infecção com a cepa Y, em insetos que nos exames com compressão abdominal anteriores encontravam-se positivos, enquanto que *P. megistus*, considerado pelos autores a espécie mais suscetível à infecção, por ter apresentado melhor interação com a cepa Y, continuou apresentando-se infectado ao longo do tempo. Porém, apesar dessa pequena queda, que não foi estatisticamente comprovada, os insetos híbridos permaneceram com populações de formas de transição e tripomastigotas mais altas do que seus parentais, em todos os compartimentos intestinais ao longo de todo estudo.

Foi observado em vários experimentos que a taxa de infecção por *T. cruzi* no inseto vetor cai ou se estabiliza a partir de um determinado tempo, sendo possível identificar os períodos em que apresentam as maiores taxas de infecção. Esses períodos são considerados os ideais para a leitura do xenodiagnóstico com o triatomíneo, que varia de acordo com a espécie, porém na maioria dos insetos o pico apresenta-se entre 60 e 90 dias após a infecção (Silva *et al.* 1993; Silva *et al.* 1994; Silva & Salha 1994).

O desenvolvimento da cepa 0354 demonstrou uma boa interação com *T. b. brasiliensis*, *T. juazeirensis* e, principalmente, nos híbridos, quando comparados com outros trabalhos em que utilizaram diferentes cepas e que apresentaram experimentalmente, baixos níveis de infecção. Diferentemente do que ocorreu com a cepa Y, no trabalho de Mello *et al.* (1996), que não conseguiu completar o seu ciclo de vida infectando o tubo digestório de *R. prolixus*, enquanto que outras cepas (Dm28c e Cl) conseguiram em aproximadamente 60 e 50% dos insetos.

No estudo prévio sobre a infectividade da cepa 0354 foi possível observar um comportamento diferente em *T. infestans*. A forma epimastigota foi prevalente em todo o tubo digestório até o 20º dia após infecção, porém no 30º dia a forma tripomastigota metacíclica foi a mais encontrada, especialmente na ampola retal, ao contrário dos híbridos e parentais, onde a forma epimastigota foi prevalente durante todos os períodos de observação. Isto sugere um ritmo

de desenvolvimento mais lento da cepa 0354 nas espécies do complexo *T. brasiliensis* e seus híbridos do que em *T. infestans*.

Quando se analisa o desenvolvimento de *T. cruzi* no trato digestivo do inseto, deve-se considerá-lo como micro-habitat onde o parasito interage com diferentes fatores que podem modular o seu desenvolvimento, como a quantidade de sangue ingerido, fatores hemolíticos, membrana perimicrovilar, e o complexo imune inato do inseto, entre outros (Perlowagora-Szumlewicz *et al.* 1990; Perlowagora-Szumlewicz & Moreira 1994; Carvalho-Moreira *et al.* 2003).

Triatoma b. brasiliensis é encontrado com altas taxas de infecção na natureza (Costa *et al.* 2003a; Silva *et al.* 2012), no entanto, no presente estudo, observou-se inicialmente uma baixa porcentagem de tripomastigotas metacíclicas, assim como Perlowagora-Szumlewicz & Moreira (1994) também observaram não só em *T. b. brasiliensis* como em outras espécies também encontradas naturalmente com altas taxas de infecção. Por outro lado, nos híbridos a porcentagem de tripomastigotas metacíclicas na ampola retal foi maior do que nas espécies parentais.

Os resultados mostraram que *T. juazeirensis* pode se infectar e a partir do 30º dia começar a eliminar formas tripomastigotas metacíclicas, assim como os híbridos entre *T. juazeirensis* e *T. b. brasiliensis* puderam se infectar e apresentaram a capacidade de albergar o parasito desde os primeiros dez dias de infecção. No entanto, ambos são encontrados com taxa de infecção natural baixa (Costa *et al.* 1998, Gumiel 2011). Pode ser que no local em que são encontrados *T. b. macromelasoma*, *T. juazeirensis* e vários fenótipos deste complexo de espécies, a circulação da cepa seja baixa nos reservatórios apresentando baixa infecção por *T. cruzi*. No entanto, Phillips & Bertram (1967) julgam que os triatomíneos, mesmo nos hospedeiros com infecções discretas, ingerem quantidade suficiente de tripanosomas para o desenvolvimento de suas infecções. Estas dependeriam da susceptibilidade do triatomíneo e não da quantidade de tripanosomas ingerida.

O índice de mortalidade após a infecção antes que pudesse ser realizada a disseção foi de 30%, o que pode ser explicado pela diferença que ocorre no estabelecimento do parasito, nos diferentes níveis de patologia.

Índices de alta mortalidade no 5º estágio já foram observados por autores em várias espécies de triatomíneos, como em *Triatoma nitida* Usinger, 1939 (Galvão *et al.* 1995), *Dipetalogaster maxima* (Uhler, 1894) (Costa *et al.* 1987), *Rhodnius pictipes* Stål, 1872 (Rocha *et al.* 1994) e *T. infestans* (Rabinovich 1972), que podem estar correlacionados a vários fatores entre eles: ao manuseio da colônia ou à ausência de determinados microorganismos simbiotes naturais no inseto (Galvão *et al.* 1995).

Os espécimes foram alimentados 15 dias após a alimentação infectante, porque, após longos períodos sem alimentação, os efeitos são evidentes sobre as densidades populacionais dos parasitos e isso vai depender da espécie e do estágio de desenvolvimento do triatomíneo, da cepa do parasito, e da dose e duração da infecção. Kollien & Schaub (1998), observaram uma perda total de parasitos no intestino médio posterior de ninfas de *T. infestans* em jejum por mais de 30 dias.

É interessante notar que após este período da alimentação não infectante, o parasito apresentou comportamento distinto em híbridos e parentais. Sabe-se que no processo de alimentação ocorre grande mudança fisiológica no inseto, pois o sangue altera o micro-habitat no intestino do inseto. O reto, por exemplo, apresenta pH levemente ácido, e após a ingestão de sangue, dentro de 24h apresenta um pH alcalino. Tais mudanças bruscas no inseto são ainda mais significativas para o parasito, por isso após uma alimentação, em insetos com uma infecção pré-estabelecida, a população de parasitos existente no estômago morre, dependendo da espécie do inseto, podendo ser recolonizada posteriormente, por epimastigotas originários do intestino (Kollien & Schaub 2000).

6.2.1 Relação infecção x Quantidade de sangue ingerida

Para que o inseto se infecte com o parasito é necessário realizar o repasto sanguíneo infectante e alguns estudos apontam que para que o inseto apresente infecção alta, seria necessária a ingestão de grande quantidade de sangue infectado com o parasito. Mas sabe-se também que a permanência do parasito no inseto vai depender de vários fatores relacionados ao sistema

imune do inseto (Kolliien & Schaub 2000).

Avaliando a suscetibilidade de quatro espécies de triatomíneo à infecção pela cepa Y, Silva & Salha (1994) não encontraram influência na quantidade de sangue ingerida no nível de infecção apresentada pelos insetos. Corroborando os resultados destes outros autores, os espécimes que apresentaram infecção alta ($\sim 49 \times 10^5$) ingeriram a mesma ou até menos quantidade de sangue (~ 220 mg) do que os espécimes que apresentaram infecção mais baixa ($\sim 4 \times 10^5$). Também foi verificado que espécimes que ingeriram pouca quantidade de sangue (ex.: 91 mg) apresentaram quantidade de parasitos suficiente para iniciar o desenvolvimento no tubo digestório e manter a infecção até 30 dias após a alimentação.

6.2.2 Suscetibilidade à infecção por *T. cruzi*

Dias (1939) realizou o xenodiagnóstico com *R. prolixus* da Venezuela, onde a espécie é vetor primário e do Brasil alimentados em cães infectados com cepas venezuelanas e brasileiras de *T. cruzi*. O autor demonstrou que os vetores nativos apresentaram maior suscetibilidade às cepas da mesma região geográfica, isto é, os espécimes de *R. prolixus* da Venezuela foram mais suscetíveis à infecção pela cepa venezuelana e o mesmo ocorreu com as cepas e triatomíneos nativos do Brasil.

Porém, outros autores já mostraram que uma cepa pode se adaptar a um inseto vetor não nativo. Zeledón & Vieto (1957) observaram que o único vetor domiciliar da doença de Chagas na Costa Rica, *T. dimidiata*, apresentou a menor taxa de infecção à cepa da Costa Rica, isolada da própria espécie, em comparação às outras quatro espécies exóticas: *R. prolixus* proveniente de El Salvador, *Rhodnius pallescens* Barber, 1932 do Panamá, *T. infestans* do Chile e *T. phyllosoma* do México. *R. prolixus* foi a espécie que melhor se infectou com a cepa costa-riquenha, em que todos espécimes encontravam-se positivos. Pelas observações expostas, pode-se admitir a ideia de que certas espécies de triatomíneos sejam mais suscetíveis do que outras ao se infectarem com diferentes cepas de *T. cruzi*.

As análises da cepa 0354 concordam com os últimos estudos, pois esta cepa foi isolada de *T. b. brasiliensis* proveniente de Caicó-RN e, no entanto, foi observado um melhor desenvolvimento nos insetos híbridos do que na própria espécie de onde foi isolado o parasito.

Além das diferenças de suscetibilidade de espécies diferentes às cepas nativas ou não, foram observadas também pequenas diferenças de suscetibilidades intraespecíficas, em triatomíneos infectados com a mesma cepa de *T. cruzi*: um grupo de *T. infestans* de colônia e o outro grupo de espécimes recém-coletados do ambiente natural (Phillips & Bertram 1967). Talvez este fato explique o porquê de *T. b. brasiliensis* ter apresentado inicialmente infecção inferior aos híbridos com a cepa 0354, sendo que se esperava altos níveis de infecção, por se tratar de uma espécie que se apresenta altos índices de infecção naturalmente (Costa *et al.* 2003a; Silva *et al.* 2009).

Deve-se também levar em conta o ecótopo destes insetos, pois alguns estudos enfatizaram a superioridade de vetores silvestres sob os vetores domésticos à infecção por *T. cruzi* (Perlowagora-Swumlewicz *et al.* 1990). Silva & Salha (1994) também observaram que *T. infestans* e *R. neglectus* infectados com a cepa Y, apresentam infecção mais baixa do que a espécie tipicamente silvestre *D. maximus* e *Triatoma matogrossensis* Leite & Barbosa, 1953, espécie silvestre que invade domicílios.

Apesar de o papel funcional do ecótopo do vetor ainda não ter sido esclarecido, quanto à infecção, pode-se dizer que a baixa infecção por *T. cruzi* dos insetos domiciliados pode ser resultado de alterações metabólicas por residirem no ambiente doméstico (Perlowagora-Swumlewicz *et al.* 1990). Tanto *T. brasiliensis* quanto *T. juazeirensis* e *T. b. macromelasoma* são encontrados em ambiente silvestre e em ecótopos artificiais e, no entanto, a maioria dos espécimes dos recém-descritos fenótipos do complexo *T. brasiliensis* de Pernambuco foram encontrados no ambiente peridomiciliar e domiciliar. Os espécimes utilizados no presente estudo foram todos provenientes de colônias, já que a ocorrência de outros parasitos poderia alterar o resultado da suscetibilidade à cepa, como *Blastocritihidia* sp., tripanossomatídeo monogenético, que é morfológicamente muito similar ao parasito *T. cruzi* e que

interfere no desenvolvimento da cepa (Junqueira *et al.* 2011).

Um critério importante para analisar o desempenho da cepa 0354 nos grupos estudados é a população, pois as cepas dos dois grandes grupos de *T. cruzi* (Tcl e TcII) se desenvolvem de forma diferente no trato digestório dos insetos (Schaub 1989; Araújo *et al.* 2007). Os insetos foram infectados com a cepa de genótipo Tcl. Este genótipo apresenta-se amplamente distribuído na natureza, enquanto TcII predomina no ciclo doméstico da transmissão, sendo que um dos possíveis filtros seletivos naturais para esta distribuição seja o próprio vetor (Araújo *et al.* 2008).

6.2.3 Dinâmica da infecção nos híbridos

Gumiel, 2011 demonstrou por meio da técnica de compressão abdominal que os diferentes fenótipos de *T. brasiliensis*, encontrados na possível zona de hibridação natural, parecem apresentar pouca suscetibilidade à infecção por *T. cruzi*, sendo sugerido que estes espécimes podem ter uma interação ainda recente com o parasito e, portanto, estaria em processo de adaptação ao parasito. No entanto, não há muita sensibilidade nesta técnica para identificação de infecção nos insetos e, portanto, não foi possível afirmar com precisão o índice de infecção daqueles diferentes fenótipos.

Considerando que *T. b. brasiliensis*, apresenta índice de infecção natural bastante elevado (Costa *et al.* 2003a; Silva *et al.* 2009) seria possível supor que híbridos apresentassem um resultado similar, já que os espécimes com diferentes padrões de coloração fazem parte do complexo *T. brasiliensis*, como foi observado no presente trabalho.

Gumiel 2011 também relatou que a maioria dos espécimes destes fenótipos alimentavam-se em aves (galinhas) no ambiente peridomiciliar, sendo que muitos estavam em estado de desnutrição. Caso estes espécimes tivessem em uma relação direta com mamíferos silvestres e domésticos não refratários a *T. cruzi*, poderiam ter apresentado índice de infecção por *T. cruzi* mais alto (Nery-Guimarães *et al.* 1974). Adicionalmente, os espécimes dos fenótipos de *T. brasiliensis* encontravam-se em estado de desnutrição (Gumiel

2011) e sabe-se que a densidade parasitária decresce bruscamente em triatomíneos que ultrapassam longos períodos de jejum (Kollien & Schaub 1998). Todas estas condições podem ser a explicação de ter sido encontrada uma baixa taxa de infecção por *T. cruzi* nos diferentes fenótipos do complexo *T. brasiliensis* registrados no estado de Pernambuco (Gumiel 2011), enquanto que no presente trabalho os híbridos não são apresentaram alta porcentagem de infecção por *T. cruzi* durante toda a análise, como se destacaram entre as espécies parentais.

Estudos comparativos entre os diferentes níveis de infecção em híbridos com os de seus progenitores têm sido desenvolvidos para muitas espécies de animais e plantas para entender como ocorre a interação parasito-vetor, como por exemplo, *Culex* sp. e vírus do oeste do Nilo; o crustáceo *Daphnia* sp. e microparasitas *Caullerya mesnili*; o peixe *Phoxinus* sp. e ectoparasita *Gyrodactylus* sp.; as plantas *Quercus* sp. e *Cercidium* sp. e insetos parasitas e outros.

Acredita-se que os parasitos não apresentam interações “padronizadas” para cada determinado taxón, eles podem na verdade evoluir juntamente ao vetor, podendo impor uma força seletiva dinâmica. Neste caso, a co-evolução hospedeiro-parasito não é a única força que age nos diferentes padrões de infecção em comunidades híbridas, esta dinâmica talvez esteja atuando em conjunto com a arquitetura genética para ocorrer a infecção e o ambiente pode moldar a prevalência da infecção dentre os táxons. Isto é, quando há um determinado genótipo comum na população de hospedeiros, é esperado que este seja mais susceptível por parasitos em coevolução, enquanto que o genótipo não-infectado do hospedeiro passa a ter vantagem sobre fitness do comum, e eventualmente se tornaria o genótipo comum na população hospedeira. Sendo assim, o genótipo do parasito capaz de infectar este novo genótipo do hospedeiro prevaleceria sobre os demais. E assim, parasitos e hospedeiros estariam em constante reciclagem de genótipos. Desta forma, a seleção natural seria dependente da frequência de genótipos, que poderia levar a ciclagem e manutenção ao longo tempo da variação genética de ambas populações de hospedeiros e parasitos (Wolinska *et al.* 2007).

Neste trabalho foi possível identificar que a cepa 0354 foi capaz de se

desenvolver e manter seu ciclo no tubo digestório tanto em híbridos quanto em *T. juazeirensis* e *T. b. brasiliensis*, porém a densidade populacional do inseto e sua capacidade de invasão e colonização domiciliar são de extrema importância para determinar uma espécie como bom vetor e consequentemente o vetor primário em uma determinada área geográfica. Portanto, constatamos que apesar de *T. b. brasiliensis* ter apresentado menor porcentagem de infecção com a cepa 0354 de *T. cruzi*, Costa *et al.* (2014) demonstraram o grande potencial de distribuição geográfica dos membros do complexo *T. brasiliensis*, sendo *T. b. brasiliensis* o mais relevante no cenário epidemiológico nordestino com ampla distribuição e densidade populacional.

No presente estudo *T. juazeirensis* também apresentou baixo nível de infecção durante os períodos de observação, porém Costa *et al.* (2014) encontraram na região considerada como possível zona de hibridação a predominância de *T. b. macromelasoma* (com possível origem híbrida) tendo ao norte de sua distribuição *T. b. brasiliensis* e ao sul *T. juazeirensis* (no estado da Bahia). Sendo assim, é de extrema importância epidemiológica e de controle tanto de *T. b. macromelasoma* como de *T. juazeirensis*, pois podem se infectar e transmitir o parasito. Dada as constantes mudanças ambientais naqueles estados as referidas espécies poderiam vir a desempenhar papéis mais relevantes como transmissores nesta região.

Segundo os resultados obtidos até 30 dias após a infecção, foi nos híbridos que a cepa 0354 apresentou-se de forma mais homogênea, porém em uma análise mais prolongada, *T. b. brasiliensis* poderia passar a apresentar mais formas infectantes no reto, apesar de seu desenvolvimento inicialmente ter sido mais lento, assim como foi visto por Perlowagora-Szumlewicz & Moreira (1994). A mesma tendência poderia ser apontada para *T. juazeirensis*, entretanto esta espécie apresentou mais exemplares negativos do que os demais, e, portanto, aparentemente sua competência vetorial parece ser inferior a de *T. b. brasiliensis* e seus respectivos híbridos.

Costa *et al.* (2015) realizaram a infecção experimental dos membros do complexo *T. brasiliensis* com a cepa 913 e apesar de terem observado que o desenvolvimento do parasito foi similar em todos os vetores, os camundongos infectados por *T. b. macromelosoma* apresentaram maiores taxas de infecção

no 20º dia após alimentação. O mesmo foi observado nos híbridos experimentais do presente trabalho, que após este período também apresentou queda da população parasitária.

Tanto a suscetibilidade desses insetos à cepa 0354, quanto o desenvolvimento dela no intestino destas 2 espécies de triatomíneos e seus híbridos, possibilitaram entender a dinâmica de alguns dos mecanismos que ocorrem e que são expressos pela manutenção desta cepa nos insetos. Uma análise mais aprofundada de como ocorre a suscetibilidade destes insetos à diferentes cepas de *T. cruzi* ainda precisa ser realizada.

6.3 Comportamento alimentar e de defecação

Ao longo dos anos os estudos sobre o comportamento alimentar e de defecação vem demonstrando diferenças significativas entre espécies de triatomíneos e mesmo entre os estádios ninfais da espécie.

6.3.1 Voracidade

A voracidade que um inseto apresenta na procura pelo alimento pode ser medida pelo registro do tempo decorrido entre o oferecimento da fonte alimentar e a picada do inseto (Dias *et al.* 1956; Galvão *et al.* 2001; Zeledón *et al.* 1977). Araújo *et al.* (2012) mostraram que a última fase ninfal do triatomíneo (N5) requer atividade nutricional intensa, sendo assim é geralmente nessa fase em que a maioria das espécies são mais ávidas para se alimentar e ingerem grandes quantidades de sangue. Almeida *et al.* (2003) observaram a rapidez com que as ninfas de 5º estágio de *T. rubrovaria* iniciam uma alimentação, em comparação as demais fases da espécie, e também permanecem se alimentando por mais tempo.

Na primeira semana de alimentação após um período de 15 dias de jejum, *T. juazeirensis* apresentou a menor média para iniciar a alimentação (55 segundos) e *T. b. brasiliensis* foi o que mais demorou, com média de 1min 53s. Almeida *et al.* (2003) verificaram que as ninfas de 5º estágio de *T. rubrovaria*, mantidas em jejum por 20 dias, apresentam maior avidez nutricional, pois seu

tempo médio para iniciar a alimentação foi mais curto (28 segundos). No estudo de Guarneri *et al.* (2000), as ninfas de *T. brasiliensis*, *T. infestans* e *T. pseudomaculata* foram mantidas em jejum por 30 dias e iniciaram o repasto em até 20 segundos. No presente estudo o tempo médio que os espécimes levaram para iniciar a alimentação foram maiores, porém o tempo que os espécimes foram mantidos em jejum também foi menor. São resultados comparáveis a outras espécies, como *T. dimidiata*, *T. infestans* e *R. prolixus* que Zeledón *et al.* (1977) consideraram ávidas por apresentarem médias para iniciar a alimentação de 3min20s, 3min25s e 5min35s, respectivamente. Porém o tempo mínimo que os insetos levaram para iniciar a alimentação foi o mesmo em todos os grupos estudados (menos de um segundo), e coincidindo com os demais estudos supracitados (Almeida *et al.* 2003; Guarneri *et al.* 2000).

Este período inicial de inserção das peças bucais na pele é o de maior percepção do hospedeiro, portanto insetos que apresentam dificuldades no tempo de sondagem, período em que o inseto realiza movimentos com as maxilas na busca do vaso sanguíneo da fonte alimentar, podem ter prejudicada capacidade de obter sangue do hospedeiro vertebrado dado o fato da probabilidade de ocorrerem danos no tecido do hospedeiro causado pela inserção do rostro que desencadeiam a hemostasia e a inflamação (Guarneri *et al.* 2012). Não foi o caso de nenhum dos grupos estudados, pois todos iniciaram a alimentação na média de 3 minutos.

Lima-Neiva (2014) observou que as ninfas de 5^o estágio de *T. sherlocki*, demoravam cerca de 9 minutos para iniciar o repasto sanguíneo, média muito maior do que as dos espécimes estudados no presente trabalho. Isto pode ser explicado pelo fato dos espécimes não terem passado por qualquer período de jejum, portanto ainda possuíam reservas nutritivas da última alimentação no estômago (Kollien & Schaub 2000).

Sabe-se da grande voracidade alimentar que *T. brasiliensis* apresenta no seu ambiente natural, sendo encontrado buscando a fonte alimentar e sugando sangue de humanos até mesmo durante o dia (Soares *et al.* 2000). Em ambiente laboratorial, esta espécie pode se alimentar por longos períodos, sem fazer muitas interrupções na alimentação, e com frequência defeca rapidamente ou mesmo durante a alimentação (Guarneri *et al.* 2000; Soares *et al.* 2000). Corroborando esses estudos sobre *T. brasiliensis*, os espécimes do

presente trabalho apresentaram as menores médias de tempo para se aproximar da fonte alimentar e iniciar a alimentação, e estes resultados não foram estatisticamente diferentes dos registrados para *T. juazeirensis*.

6.3.2 Duração da alimentação

Estudos já mostraram que a duração do repasto sanguíneo é variável de acordo dos estádios evolutivos e das diferentes espécies de triatomíneos. Há uma tendência de ser crescente com a evolução dos estádios, sendo que no 5º estágio é o período em que o inseto permanece por mais tempo se alimentando, devido à capacidade de ingestão de sangue e necessidade dessa alimentação para muda. A ecdise pode ser realizada após apenas uma alimentação, que geralmente ocorre entre seis e 30 dias, porém usualmente alimentam-se mais de uma vez (Galvão *et al.* 1995; Lima-Neiva 2014; Zeledón *et al.* 1977).

A duração da alimentação dos triatomíneos pode levar de poucos minutos até aproximadamente meia hora ou mais, dependendo da espécie de hospedeiro e de inseto, do estágio evolutivo e do volume de sangue ingerido (Araújo *et al.* 2012). Especialmente nas primeiras semanas de observação, alguns espécimes em todos os grupos permaneceram se alimentando por horas, sendo no caso de *T. juazeirensis* o maior tempo foi de 2h01min, *T. b. brasiliensis* por 2h36min, Hbj por 2h49min, Hjb por até 3h4min. *T. juazeirensis* também foi o primeiro a realizar a muda imaginal e o que mais realizou muda (60%), seguidos por *T. b. brasiliensis* (27%), Hbj (23%), Hjb (23%). Estes resultados indicam que *T. juazeirensis* precisa de menos tempo se alimentando, para ingerir quantidade suficiente de sangue para realizar a ecdise, que, portanto é realizada em curto espaço de tempo.

Soares *et al.* (2000) também verificaram que *T. brasiliensis* permanecia se alimentando por no máximo 2h09min e por um tempo médio de $\bar{X} = 42:00$, DP = 28:37, média de tempo similar ao que foi observada no presente trabalho ($\bar{X} = 41:00$, DP = 37:37). *T. juazeirensis* e o híbrido Hbj permaneceram se alimentando por uma média de tempo menor de 36 e 37 minutos, respectivamente. Estas médias de duração da alimentação se comparam a outras espécies de triatomíneo, como *T. rubrovaria* que chegou a permanecer

se alimentando por no máximo de 35min. (Almeida *et al.* 2003), espécie que parece não precisar de muito tempo para atingir a repleção. Hjb apresentou a maior média de duração da alimentação (48 minutos). Zeledón *et al.* (1977) também observaram que o índice de duração da alimentação de ninfas de 5º estágio de *T. dimidiata* (53:18) foi muito maior em comparação ao índice apresentado por *T. infestans* e *R. prolixus* (27:45; 26:42, respectivamente).

Após o máximo de duas semanas sem se alimentar, as ninfas de *T. b. brasiliensis* e *T. juazeirensis* que ainda não tinham realizado a muda imaginal, voltaram a procurar a fonte alimentar, pois após a muda os insetos permanecem um período sem procurar alimento, por ainda terem a reserva nutritiva. Os híbridos não apresentaram o mesmo comportamento, permanecendo sem retornar a se alimentar por um longo período. Este comportamento é muito importante para a manutenção do parasito, pois quando o inseto encontra-se infectado, a taxa de densidade parasitária decresce drasticamente ao longo do tempo que o triatomíneo passa por um período de jejum prolongado e sabe-se que após três meses em jejum mais de 90% dos parasitos morrem no tubo digestório do inseto, sendo que uma nova alimentação promoverá a recuperação da população de parasitos (Kollien & Schaub 1998).

6.3.3 Ingestão de sangue

Diferenças na taxa de ingestão (quantidade de sangue ingerida por minuto) e ingurgitamento (quantidade de sangue total) são importantes porque determinam o tempo de contato do inseto com o hospedeiro e, conseqüentemente, a sobrevivência da espécie, já que esses insetos necessitam de uma quantidade considerável de sangue para completar seu ciclo (Guarneri *et al.* 2000). Esses autores encontraram uma correlação entre a taxa de ingurgitamento e a densidade populacional dos vetores em habitações humanas, sendo *T. infestans*, o que se alimenta mais rapidamente, seguido por *T. brasiliensis* em comparação à *T. pseudomaculata* que apresentou a menor taxa de ingurgitamento (Gonçalves *et al.* 1997). Essa última espécie é conhecida por apresentar baixa capacidade de colonizar habitações humanas. No entanto, não foi encontrada tal relação no presente estudo, pois *T. b.*

brasiliensis, que apresenta índices de domiciliação mais altos do que *T. juazeirensis* (Costa *et al.* 2003) apresentou média de ingestão de sangue menor, porém com duração da alimentação mais prolongada do que este último. Provavelmente a idade da colônia fundadora possa ser um dado diferencial, em que espécimes de laboratório poderiam apresentar comportamentos diferentes em relação aos insetos na natureza (Gonçalves *et al.* 1997; Santos *et al.* 2006).

Pereira *et al.* (2006) observaram outro fator importante relacionado às altas taxas ingestão de sangue de *T. infestans* que se alimentaram por mais tempo e ingeriram mais sangue do que *R. prolixus*, alcançando altas densidades populacionais no interior das habitações humanas. Este padrão de alimentação pode influenciar diretamente na dinâmica de dejeções e, conseqüentemente, na transmissão de *T. cruzi*, pois insetos que ingerem maiores quantidades de sangue tendem a defecar mais rapidamente (Guarneri *et al.* 2012).

Diferentes fontes alimentares e condições ambientais podem influenciar na quantidade de sangue ingerida e conseqüentemente no desenvolvimento e na taxa reprodutiva do inseto. Guarneri *et al.* (2000) observaram que *T. brasiliensis* e *T. sordida* alimentados em camundongos apresentaram maior produção de ovos daqueles alimentados em pombos. Isto pode ser um dado importante para os fenótipos de *T. brasiliensis* que têm sido encontrados geralmente no peridomicílio se alimentando primordialmente em galinhas, que de acordo com os resultados prévios, poderia afetar negativamente o seu desenvolvimento (Gumiel 2011). Não há muitos estudos sobre as fontes alimentares de *T. b. macromelasoma*, mas sabe-se que este se encontra com distribuição restrita em Pernambuco e com a menor taxa de domiciliação do complexo *T. brasiliensis* (Costa *et al.* 1998, 2003a).

Como os triatomíneos necessitam do repasto sanguíneo para se desenvolverem, quando realizam uma alimentação insuficiente culminam em retardo no desenvolvimento. Quando mal alimentadas, as ninfas vivem por vários meses, mas não conseguem realizar as mudas. O mesmo efeito pode ocorrer devido à má formação no intestino do inseto (Dias *et al.* 2013). Este fato foi observado no presente trabalho, quando algumas ninfas selecionadas

aleatoriamente apresentaram dificuldades na alimentação. No momento em que se aproximavam da fonte alimentar, podiam ficar por mais de duas horas e em contato com essa, e não chegavam ao ingurgitamento ou se quer apresentavam alteração no peso. Em contraste, outros espécimes atingiram a repleção após duas horas sugando a fonte alimentar, assim como Soares *et al.* (2000) observaram com ninfas de *T. brasiliensis* e *T. pseudomaculata*.

Híbridos de ♀ *T. b. brasiliensis* x ♂ *T. juazeirensis* (Hbj) e *T. juazeirensis* apresentaram média de peso adquirido após o repasto sanguíneo significativamente maior, logo na primeira semana. E ao longo das primeiras cinco semanas esse comportamento continuou se confirmando. Gonçalves *et al.* (1997) observaram que *T. pseudomaculata* ingere menor quantidade de sangue, sendo assim os autores determinaram que não demonstrou características de uma espécie espoliativa, isto é, que apresenta dificuldades para absorver o sangue do hospedeiro, podendo até deixar pontos hemorrágicos no local de sucção.

O local do hospedeiro onde a hematofagia é realizada também interfere no desempenho alimentar dos insetos. Quando analisado o comportamento alimentar de ninfas de várias espécies foi observado que regiões, como a cauda do camundongo é onde os triatomíneos mais conseguiram ingerir sangue, isto porque o diâmetro do vaso sanguíneo é um fator importante (Araújo *et al.* 2012). No presente estudo, as ninfas foram apresentadas à fonte alimentar na região do dorso, porém ao interromper a alimentação as ninfas saíam da região e retornavam a alimentação em diferentes áreas, como cauda, ventre, cabeça, orelha, e patas.

Ao se alimentarem, os triatomíneos podem ingerir grandes quantidades de sangue, aumentando drasticamente o seu próprio peso. Em uma única alimentação, podem atingir de 6 à 12 vezes seu peso original, e isso acarreta numa influência direta no seu desenvolvimento em novas ecdises, na fecundidade das fêmeas, logo no sucesso reprodutivo das espécies, correlacionados também a densidade populacional (Kollien & Schaub 2000; Jurberg & Costa 1989). Este aumento do peso pode se tornar um problema para a locomoção ou o voo do inseto. As espécies que são altamente eficientes no seu processo diurético solucionam este problema, além de eliminar

rapidamente as formas infectantes de *T. cruzi*. Ninfas de *Rhodnius*, por exemplo, podem eliminar seis vezes a sua massa corporal em seis horas (Silva *et al.* 2012).

6.3.4 Tempo de defecação e comportamento

A frequência com que ocorre a defecação, durante e após a alimentação, varia de acordo com a espécie de triatomíneo, o estágio de desenvolvimento e o gênero, sendo que este comportamento é crucial para que ocorra a transmissão de *T. cruzi* (Reisenman *et al.* 2011). Wood (1951) foi o primeiro a estudar o comportamento de alimentação e defecação das espécies *T. protracta*, *Triatoma rubida* (Uhler, 1894) e *Paratriatoma hirsuta* Barber, 1938 encontradas no continente norte-americano, e observou que estas espécies não defecavam imediatamente após o repasto. Em outro estudo foi visto que apenas fêmeas de *T. rubida* conseguem defecar durante a alimentação (Reisenman *et al.* 2011). Dias (1956) observou que algumas espécies sul-americanas (*R. prolixus*, *T. infestans*, *P. megistus* e *T. sordida*) foram mais eficientes, pois defecavam logo após o repasto. Portanto, espécies que defecam mais rapidamente, isto é, durante o repasto sanguíneo ou logo após o término do repasto, seriam espécies mais eficazes na transmissão do parasito (Galvão *et al.* 1995).

Estas diferenças podem começar a explicar a melhor efetividade apresentada por algumas espécies e demonstra a capacidade vetorial da espécie na transmissão da doença de Chagas de acordo com a região em que se encontram (Galvão *et al.* 2001).

Ninfas de 5º estágio de *T. rubrovaria* se destacam dos demais estágios de desenvolvimento, quando analisado o parâmetro de defecação, pois estes apresentam maior índice de defecação (60%) em menor tempo após o término da alimentação (~0 segundo à 2min30s) (Almeida *et al.* 2003). Esta espécie parece defecar mais rápido do que os espécimes analisados no presente estudo, pois ambos *T. b. brasiliensis* e híbridos “Hbj” defecaram durante a alimentação entre 1 segundo e 6min31s, e *T. juazeirensis* e “Hjb” foram mais rápidos, mínimo de 1 segundo e o máximo de 3min14s e 1 segundo e máximo

3min26s, respectivamente.

Dentre as espécies estudadas por Dias (1956), que se mostraram vetores potenciais na transmissão do parasito, *T. infestans* se destacou por defecar ainda mais rapidamente do que as demais, pois todos os espécimes defecaram em menos de 10 minutos. Apesar de nem todos os espécimes dos grupos estudados terem defecado em menos de 10 minutos, a maioria dos que defecaram, até este período durante a alimentação, realizaram em até 30 segundos, *T. juazeirensis* (82%), híbridos “Hbj” (81%), *T. b. brasiliensis* (78%) e “Hjb” (60%).

Zeledón *et al.* (1977) observaram que as ninfas de *R. prolixus* defecaram mais rapidamente do que *T. infestans* e *T. dimidiata*, em apenas 1 minuto (70-90%). No presente estudo, *T. b. brasiliensis* foi a espécie que mais defecou entre 0-1 minuto.

Muitos insetos defecaram mais de uma vez na mesma alimentação, principalmente na primeira semana, sendo que um espécime de *T. juazeirensis* interrompeu a alimentação para defecar quatro vezes, com o tempo mínimo de <1 segundo. Fêmeas de *T. rubrovaria* se mostraram as mais eficientes para defecar mais rapidamente, sendo que Almeida *et al.* (2003) também observaram uma fêmea que chegou a defecar três vezes durante a alimentação e outra após alimentação dentro de 40 segundos.

Diferente de alguns insetos, os triatomíneos podem eliminar urina e fezes separadamente ou misturadas, sendo que sua eliminação varia de acordo com a dieta alimentar do inseto (Piesman & Sherlock 1983). Todas as dejeções dos triatomíneos, tanto urina quanto fezes, podem conter a forma infectante do parasito. A urina não só apresenta predominância de formas tripomastigotas como é praticamente livre de contaminação por fungos e bactérias, fator importante para exames diretos (Silva *et al.* 1993). A partir da segunda semana os híbridos e parentais eliminaram mais urina, e também urina junto com fezes. Após um período sem se alimentar, quando se alimentavam novamente e defecavam, geralmente eliminavam fezes ou urina com fezes. Crocco *et al.* (1996) observaram que durante os primeiros 10 minutos após a alimentação as fêmeas de *T. sordida* eliminavam mais

frequentemente urina e mais rápido do que machos e ninfas. Comportamentos indicativos do processo de diurese profusa que ocorre após a alimentação (Pietrokovsky *et al.* 1996).

Heitzmann-Fontenelle (1972) verificou que *T. pseudomaculata* só defecava sobre o hospedeiro quando atingia a repleção; girando o corpo em 80°, eliminando as fezes próximas ao local da picada e aumentando a chance de transmissão do parasito *T. cruzi*. Para realizar a defecação *T. sherlocki*, também membro do complexo *T. brasiliensis*, de maneira geral gira o corpo (giros de 90°, 160°, 170° e 180°) posicionando o ápice do abdômen próximo ou na região da picada e defeca, sendo que o 5º estágio foi o que apresentou a maior porcentagem de espécimes com esse comportamento (Lima-Neiva 2014). Os híbridos e parentais também apresentaram o este comportamento de virar 180° ou 170° e defecar próximo à área da picada, arrastando o abdômen na superfície (fundo do pote).

Os espécimes estudados apresentaram um comportamento para defecar ainda próximo da fonte alimentar, sendo que muitos foram registrados defecando em cima do camundongo ou se distanciando no mínimo 0,5 cm e no máximo de 7 cm da fonte alimentar, sendo que a maioria que defecava de 0,5 à 3 cm de distância eram *T. b. brasiliensis* e *T. juazeirensis*. Almeida *et al.* (2003) também verificaram que a maioria dos espécimes (69%) de *T. rubrovaria* defecaram numa distância de menos de 3 cm do local da picada e em menos de 1 minuto.

Como foi possível acompanhar o comportamento alimentar e de defecação de alguns espécimes por mais tempo foi possível verificar que *T. juazeirensis* voltou a defecar depois da 6ª semana, quando os demais grupos estudados somente realizavam alimentação. Também foi visto que esta espécie consegue realizar a muda mais rápido do que os demais grupos estudados. Talvez esse comportamento possa ser explicado pela rapidez com que acontece a muda da última fase ninfal para a fase adulta nesta espécie, sendo assim essa espécie procura mais avidamente se nutrir talvez por apresentar um metabolismo mais rápido (Guarneri *et al.* 2012).

O fato dos insetos híbridos demorarem mais para defecar do que os

seus parentais, pode comprometer as chances que estes espécimes apresentam para realizar a transmissão do parasito a um hospedeiro suscetível com sucesso, apesar de ter sido observado que alguns espécimes conseguiam defecar em poucos segundos.

Gumiel (2011) demonstrou que os fenótipos de *T. brasiliensis* poderiam migrar durante a noite para dentro das casas à procura de alimento, encontrando assim outras fontes de alimentação como roedores, cabras, cachorros e principalmente os humanos. Foi possível identificar no presente trabalho que os híbridos não só podem se infectar e manter a infecção de *T. cruzi* como podem potencialmente defecar ainda em contato com o hospedeiro, apesar de que não seriam vetores tão competentes quanto seus parentais.

Entretanto, as questões relacionadas à capacidade e à competência vetorial são bastante complexas, envolvendo muitas variáveis que atuam concomitantemente e determinam se uma espécie de triatomíneo é um vetor eficaz. Sendo assim, estas avaliações experimentais são sempre relativas, sendo necessário uma análise combinada de vários fatores além dos parâmetros já estudados: de suscetibilidade do inseto ao parasito; o seu comportamento alimentar permitindo a rápida eliminação das fezes; taxa de ingestão de sangue e de defecação com excretas contaminadas ainda em contato direto com a pele do hospedeiro; número de repastos sanguíneos realizados (Galvão *et al.* 1995). Além destes aspectos, existem ainda outros fatores relevantes, tais como: a densidade domiciliar; a afinidade com o hospedeiro e o grau de adaptação ao domicílio humano (Gonçalves *et al.* 1997; Piesman & Sherlock 1983).

7 CONCLUSÕES

- Os dois grupos de híbridos experimentais resultantes entre os cruzamentos de *T. b. brasiliensis* e *T. juazeirensis* foram considerados como um só grupo de insetos híbridos, pois não foram encontradas diferenças significativas entre eles.
- Todos os grupos estudados foram suscetíveis à infecção pela cepa 0354 de *T. cruzi*, entretanto os híbridos parecem ser os mais suscetíveis à infecção do que as espécies parentais, porque mantiveram a infecção de forma mais estável e apresentaram maior número de formas tripomastigotas metacíclicas na ampola retal ao longo de todo experimento.
- Apesar de *T. juazeirensis* ter apresentado no 30º dia após a infecção a população parasitária elevada, nas primeiras fases de observação foi verificado um maior número de exemplares negativos, para esta espécie. Isto pode ser correlacionado à sua baixa infecção natural
- A competência e capacidade vetoriais ficaram bem caracterizadas tanto para *T. b. brasiliensis* quanto *T. juazeirensis* e seus híbridos experimentais.
- Todos os grupos estudados apresentaram voracidade alimentar e rápida defecação, porém *T. b. brasiliensis* apresentou maior número de defecações em menos de um minuto, demonstrando uma característica bionômica relevante quanto a sua capacidade vetorial de *T. cruzi*.

8 PERSPECTIVAS

- Estudo da eliminação e quantificação das formas tripomastigotas metacíclicas;
- Estudo com outras linhagens de *T. cruzi*, inclusive com as cepas encontradas nesta área de possível hibridação;
- Análise por um período mais longo de como ocorre a suscetibilidade à infecção por *T. cruzi* nessas espécies e seus híbridos, para observação do desenvolvimento da forma tripomastigota metacíclica.
- Estudo dos componentes da saliva destes insetos em relação à patogenia, pois os estudos sobre moléculas salivares e intestinais que facilitam a ingestão de sangue em determinados hospedeiros podem ajudar no melhor entendimento dos processos envolvidos na interação vetor-hospedeiro.
- Estudo do comportamento alimentar e defecação dos fenótipos de *T. brasiliensis* (possíveis híbridos naturais) em comparação aos membros do complexo *T. brasiliensis*.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Almeida CE, Folly-Ramos E, Peterson AT, Lima-Neiva V, Gumiel M, Duarte R, Lima MM, Locks M, Beltrão M, Costa J 2009. Could the bug *Triatoma sherlocki* be vectoring Chagas disease in small mining communities in Bahia, Brazil? *Med Vet Entomol* 23: 410–417.

Almeida CE, Francischetti CN, Pacheco RS, Costa J 2003. *Triatoma rubrovaria* (Blanchard, 1843) (Hemiptera-Reduviidae-Triatominae) III: patterns of feeding, defecation and resistance to starvation. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 98: 367-372.

Almeida CE, Oliveira HL, Correia N, Dornak LL, Gumiel M, Neiva VL, Harry M, Mendonça VJ, Costa J, Galvão C 2012. Dispersion capacity of *Triatoma sherlocki*, *Triatoma juazeirensis* and laboratory-bred hybrids. *Acta Trop* 122: 71-79.

Alvarenga NJ, Bronfen E 1997. Metaciclogênese do *Trypanosoma cruzi* como parâmetro de interação do parasita com o triatomíneo vetor. *Rev Soc Bras Med Trop* 30: 247-250.

Araújo CAC, Cabello PH, Jansen AM 2007. Growth behaviour of two *Trypanosoma cruzi* strains in single and mixed infections: *In vitro* and in the intestinal tract of the blood-sucking bug, *Triatoma brasiliensis*. *Acta Trop* 101: 225-231.

Araújo CAC, Waniek PJ, Jansen AM 2008. Development of a *Trypanosoma cruzi* (Tcl) isolate in the digestive tract of an unfamiliar vector, *Triatoma brasiliensis* (Hemiptera, Reduviidae). *Acta Trop* 107: 195–199.

Araújo RN, Gontijo NF, Lazzari CR, Pereira MH 2012. Interação entre os Insetos Hematófagos e seus Hospedeiros Vertebrados. In: MAC Silva-Neto, CE Winter, C Termignoni. Tópicos Avançados em Entomologia Molecular. 1. ed. Rio de Janeiro: INCT - Entomologia Molecular, v. 1. 582 p.

Arnold ML, Hodges SA 1995. Are natural hybrids fit or unfit relative to their

parents? *Trends Ecol Evol* 10: 67-71.

Azambuja P, Feder D, Garcia ES 1993. Effects of erythrocyte component diets on ecdysteroid production and ecdysis of *Rhodnius prolixus* larvae. *J Insect Physiol* 39: 13-16.

Barrett TV 1991. Advances in Triatominae bug ecology in relation to Chagas disease. In *Advances in Disease Vector Research*, Springer-Verlag, New York, p. 143-176.

Braga MV, Lima MM 1999. Feeding and Defecation Patterns of Nymphs of *Triatoma rubrofasciata* (De Geer, 1773) (Hemiptera: Reduviidae), and its Potential Role as Vector for *Trypanosoma cruzi*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 94: 127-129.

Braz SCM, Melo MFAD, Lorena VMB, Souza WV, Gomes YM 2011. Chagas disease in the State of Pernambuco, Brazil: analysis of admissions and mortality time series. *Rev Soc Bras Med Trop* 44: 318-323.

Brazil RP, Silva ARD, Albarelli A, Vale JF 1985. Distribuição e infecção de triatomíneos por *Trypanosoma* do tipo cruzi na Ilha de São Luís-Maranhão. *Rev Soc Bras Med Trop* 18: 257-260.

Bos R 1998. The importance of peridomestic environmental management for the control of the vectors of Chagas' disease. *Rev Argent Microbiol* 20: 58-62.

Brener Z 1977. *Trypanosoma cruzi*: morfologia e ciclo evolutivo. In: DIAS JCP, COURA JR. Clínica e terapêutica da doença de Chagas: uma abordagem prática para o clínico geral [online]. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ. 486 p.

Bronfen E, Dias JCP, Gouveia SC 1984. Infecção experimental de *Triatoma infestans* e *Panstrongylus megistus* pela cepa Y do *Trypanosoma cruzi* (Silva e Nussenzweig, 1953). *Rev Patol Trop* 13: 1-7.

Burgos MH, Gutierrez LS 1976. The intestine of *Triatoma infestans*. I. Citology of the midgut. *J Ultrastr Mol Structr Res* 57: 1-9.

Burke JM, Arnold ML 2001. Genetics and the fitness of hybrids. *Annu Rev Genet* 35: 31–52.

Carcavallo R, Galíndez Girón I, Jurberg J, Galvão C, Lent H 1997. Pictorial keys for tribes, genera and species of the subfamily Triatominae. Chaves gráficas para as tribos, gêneros e espécies da subfamília Triatominae, p. 107-244. In Atlas of Chagas' Disease Vectors in the Americas. Atlas dos Vetores da Doença de Chagas nas Américas, Vol. I, Editora Fiocruz, Rio de Janeiro.

Carvalho-Moreira CJ, Spata MC, Coura JR, Garcia ES, Azambuja P, Gonzalez MS, Mello CB 2003. In vivo and in vitro metacyclogenesis tests of two strains of *Trypanosoma cruzi* in the triatomines vectors *Triatoma pseudomaculata* and *Rhodnius neglectus*: short/long-term and comparative study. *Exp Parasitol* 103: 102–111.

Chagas C 1909. Nova tripanozomíaze humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp. agente etiológico de nova entidade morbida do homem. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1: 159–218.

Correia N, Almeida CE, Lima-Neiva V, Gumiel M, Dornak LL, Lima MM, Costa J 2013. Cross-mating experiments detect reproductive compatibility between *Triatoma sherlocki* and other members of the *Triatoma brasiliensis* species complex. *Acta tropica*, 128, 162-167.

Costa-Lima A 1940. Capítulo XXII – Hemípteros. Em Insetos do Brasil 2º Tomo Escola Nacional de Agronomia Série Didática n. 3, Rio de Janeiro, 18-19.

Costa J, Almeida CE, Donston E, Lins A, Vinhaes MC, Silveira AC, Beard CB 2003a. The epidemiologic importance of *Triatoma brasiliensis* as a Chagas disease vector in Brazil: a revision of domiciliary captures during 1993–1999. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 98: 443–449.

Costa J, Almeida CE, Dujardin JP, Beard CB 2003b. Crossing experiments detect genetic incompatibility among populations of *Triatoma brasiliensis* Neiva, 1911 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 98: 637–639.

Costa J, Almeida JR, Britto C, Duarte R, Marchon-Silva V, Pacheco R 1998. Ecotopes, natural infection and trophic resources of *Triatoma brasiliensis* (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). *Mem do Inst Oswaldo Cruz* 93: 7–13.

Costa J, Araújo CAC, Freitas CAV, Borges-Pereira J 2015. Are Members of the *Triatoma brasiliensis* (Hemiptera, Reduviidae) Species Complex Able to Alter the Biology and Virulence of a *Trypanosoma cruzi* Strain? *Neotrop Entomol* artigo aceito para publicação.

Costa J, Barth OM, Marchon-Silva V, Almeida CE, Freitas-Sibajev MG, Panzera F 1997b. Morphological studies on the *Triatoma brasiliensis* Neiva, 1911 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) — Genital structures and eggs of different chromatic forms. *Mem do Inst Oswaldo Cruz* 92: 493–498.

Costa J, Correia NC, Neiva VL, Goncalves TCM, Felix M 2013. Revalidation and redescription of *Triatoma brasiliensis macromelasoma* Galvão, 1956 and an identification key for the *Triatoma brasiliensis* complex (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Mem do Inst Oswaldo Cruz* 108: 785-789.

Costa J, Cunha V, Jurberg J 1992. Estudos bionômicos de *Dipetalogaster maximus* (Uhler, 1894) (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae): III. Dinâmica populacional. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 87: 73-80.

Costa J, Dornak LL, Almeida CE, Peterson AT 2014. Distributional potential of the *Triatoma brasiliensis* species complex at present and under scenarios of future climate conditions. *Parasit Vectors*: 7-238.

Costa J, Felix M 2007. *Triatoma juazeirensis* sp. nov. from Bahia state,

northeastern Brazil (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Mem do Inst Oswaldo Cruz* 102: 87–90.

Costa J, Freitas-Sibajev MG, Marchon-Silva V, Pires MQ, Pacheco R 1997a. Isoenzymes detect variation in populations of *Triatoma brasiliensis* (Hemiptera-Reduviidae-Triatominae). *Mem do Inst Oswaldo Cruz* 92: 459–464.

Costa JM, Jurberg J, Almeida, JR 1987. Estudos bionômicos de *Dipetalogaster maximus* (Uhler, 1894) (Hemiptera, Triatominae). II Influência da dieta sobre o ciclo biológico e resistência ao jejum. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 82: 111-118.

Costa J, Lorenzo M 2009. Biology, diversity and strategies for the monitoring and control of triatomines-Chagas disease vectors. *Mem do Inst Oswaldo Cruz* 104: 46-51.

Costa J, Marchon-Silva V 1998. Período de intermuda e resistência ao jejum de diferentes populações de *Triatoma brasiliensis* (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). *Entomología y Vectores* 5: 23–34.

Costa J, Peterson AT, Beard CB 2002. Ecologic niche modeling and differentiation of populations of *Triatoma brasiliensis* Neiva, 1911, the most important Chagas' disease vector in northeastern Brazil (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). *Am J Trop Med Hyg* 67: 516–520.

Costa J, Peterson AT, Dujardin JP 2009. Morphological evidence suggests homoploid hybridization as a possible mode of speciation in the Triatominae (Hemiptera, Heteroptera, Reduviidae). *Infect Genet Evol* 9: 263-70.

Coura JR 2007. Chagas disease: what is known and what is needed – A background article. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 102: 113-122.

Coura JR 2009. Present situation and new strategies for Chagas disease chemotherapy - a proposal. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104(4): 549-554.

Coura JR, Viñas PA 2010. Chagas disease: a new worldwide challenge. *Nature* 465: S6-S7.

Crocco LB, Catalá SS (1996). Feeding and defaecation patterns in *Triatoma sordida*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 91: 409-413.

DATASUS, Ministério da Saúde/SVS - Sistema de Informação de Agravos de Notificação – Sinan (2006).
<http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/tabnet/dh?sinan/chagas/bases/chagasbr.def>

Dias E 1939. Chagas disease: A comparative study of the susceptibility of four natural vectors to the experimental development of *Schizotrypanum cruzi*. In Proc. of the 3rd International. Congress of Microbiology, New York Abstracts communications 421-422.

Dias E 1956. Observações sobre eliminação de dejeções e tempo de sucção em alguns triatomíneos sul-americanos. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 54: 115-124.

Dias JCP 1986. Perspectivas de controle da doença de Chagas no Brasil. *Cad Saúde Pública* 2: 84-103.

DIAS JCP 1994. Ecological Aspects of The Vectorial Control of Chagas' Disease in Brazil. *Cad Saúde Públ* 10: 352-358.

Dias JCP 2006. Notas sobre o *Trypanosoma cruzi* e suas características bioecológicas, como agente de enfermidades transmitidas por alimentos. *Rev Soc Bras Med Trop* 39: 370-375.

Dias JCP 2007. Southern Cone Initiative for the elimination of domestic populations of *Triatoma infestans* and the interruption of transfusional Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 102: 11-18.

Dias JCP, Dessoy MA, Silva JJ, Thiemann OH, Oliva G, Andricopulo AD 2009.

Quimioterapia da doença de Chagas: estado da arte e perspectivas no desenvolvimento de novos fármacos. *Quim. Nova* 32: 2444-2457.

Dias JCP, Machado EMM, Fernandes AL, Vinhaes MC 2000. Esboço geral e perspectivas da doença de Chagas no Nordeste do Brasil. *Cad Saúde Pública* 16: 13-34.

Dias JCP, Borges-Pereira J, Macedo VL 2013. Doença de Chagas. In JR Coura, *Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias*, Rio de Janeiro, p. 606-641.

Dias-Lima AG, Sherlock IA 2000. Sylvatic Vectors Invading Houses and the Risk of Emergence of Cases of Chagas Disease in Salvador, State of Bahia, Northeast Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 95: 611-613.

Diotaiuti L, Filho OFF, Carneiro FCF, Dias JCP, Pires HHR, Schofield CJ 2000. Aspectos operacionais do controle do *Triatoma brasiliensis*. *Cad Saúde Pública* 16:61-67.

Forattini OP 1980. Biogeografia, origem e distribuição da domiciliação de triatomíneos no Brasil. *Rev Saúde Públ* 14: 265-269.

FUNASA 2006. Manual para elaboração de projeto de melhoria habitacional para o controle da doença de Chagas, 1ª reimpressão, Brasília, 54 pp.

Galvão AB 1956. *Triatoma brasiliensis macromelasoma* n. subsp. (Reduviidae, Hemiptera). *R Br Malar* 7: 455-457.

Galvão C, Carcavallo R, Rocha DS, Jurberg J 2003. A checklist of the current valid species of the subfamily Triatominae Jeannel, 1919 (Hemiptera: Reduviidae) and their geographical distribution with nomenclatural and taxonomic notes. *Zootaxa* 202: 1-36.

Galvão C, Jurberg J, Cunha V, De Mello RP 1995. Biologia do *Triatoma nitida*

Usinger 1939 em Laboratorio (Hemiptera: Reduviidae). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 90: 657-663.

Galvão C, Rocha DS, Cunha V, Jurberg J 2001. Tempo de alimentação e defecação das ninfas de *Triatoma melanosoma* Martínez, Olmedo & Carcavallo (Hemiptera, Reduviidae) em diferentes condições de temperatura e umidade. *Rev Bras Zool* 18: 233-242.

Garcia ES, Genta FA, Azambuja P, Schaub GA 2010. Interactions between intestinal compounds of triatomines and *Trypanosoma cruzi*. *Trends Parasitol* 26: 499-505.

Garcia ES, Ratcliffe NA, Whitten MM, Gonzalez MS, Azambuja P 2007. Exploring the role of insect host factors in the dynamics of *Trypanosoma cruzi*-*Rhodnius prolixus* interactions. *J Invertebr Pathol* 53: 11-21.

Garcia ES, Vieira E, Gomes JEPL, Gonçalves AM 1984. Molecular biology of the interaction *Trypanosoma cruzi* invertebrate host. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 79: 33-37.

Gonçalves TCM, Cunha V, Oliveira ED, Jurberg J 1997. Alguns aspectos da biologia de *Triatoma pseudomaculata* Corrêa & Espínola, 1964, em condições de laboratório (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 92: 275-280.

Gonçalves TCM, Victório VMN, Juberb J, Cunha V 1988. Biology of *Triatoma vitticeps* (Stål, 1859) under laboratory conditions (Hemiptera: Reduvidae: Triatominae): I. Evolutive cycle. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 83: 519-523.

Gonzalez MS, Nogueira NFS, Mello CB, De Souza W, Schaub GA, Azambuja P, Garcia ES 1999. Influence of brain and azadirachtin on *Trypanosoma cruzi* development in the vector, *Rhodnius prolixus*. *Expl parasitol* 92: 100-108.

Guarneri AA, Diotaiuti L, Gontijo NF, Gontijo AF, Pereira MH 2000. Comparison

of feeding behaviour of *Triatoma infestans*, *Triatoma brasiliensis* and *Triatoma pseudomaculata* in different hosts by electronic monitoring of the cibarial pump. *J Insect Physiol* 46: 1121-1127.

Guarneri AA, Silva-Cardoso L, Atella G 2012. Interação Parasito-Vetor (Tripanossomatídeos). In: MAC Silva-Neto, CE Winter, C Termignoni. Tópicos Avançados em Entomologia Molecular. 1. ed. Rio de Janeiro: INCT - Entomologia Molecular, v. 1. 582 p.

Gumiel M 2011. *Estudo da variabilidade morfológica e do perfil isoenzimático em triatomíneos do complexo Triatoma brasiliensis do Estado de Pernambuco, Brasil*, Dissertação de Mestrado, Instituto Oswaldo Cruz-Fiocruz, Rio de Janeiro, 117 pp.

Heitzmann-Fontenelle T 1972. Bionomia de *Triatoma pseudomaculata* Correa & Espinola, 1964, em laboratório. *Mem Inst Butantan* 36: 251-262.

Herrera-Aguilar M, Be-Barragán LA, Ramirez-Sierra MJ, Tripet F, Dorn P, Dumonteil E 2009. Identification of a large hybrid zone between sympatric sibling species of *Triatoma dimidiata* in the Yucatan peninsula, Mexico, and its epidemiological importance. *Infection Genetics Evol* 9: 1345-1351.

Hotez PJ, Bottazzi ME, Franco-Paredes C, Ault SK, Periago MR 2008. The Neglected Tropical Diseases of Latin America and the Caribbean: A Review of Disease Burden and Distribution and a Roadmap for Control and Elimination. *PLoS Negl Trop Dis* 2: e300.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística 2010. <http://www.censo2010.ibge.gov.br/>

Jurberg J, Costa JM 1989. The resistance of fasting and nutritional aspects of *Triatoma lecticularia* (Stål, 1859) (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 84: 393-399.

Jurberg J, Rodrigues JM, Moreira FF, Dale C, Cordeiro IR, Lamas VDJ, Rocha DS 2014. Atlas Iconográfico Dos Triatomíneos Do Brasil (Vetores da Doença de Chagas). Instituto Oswaldo Cruz – Rio de Janeiro 52 pp.

Junqueira ACV, Gonçalves TCM, Moreira CJC 2011. Manual de capacitação na detecção de *Trypanosoma cruzi* para microscopistas de malária e laboratoristas da rede pública, 2ª ed., Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro xii + 300 pp.

Kollien AH, Schaub GA 1998. The Development of *Trypanosoma cruzi* (Trypanosomatidae) in the Reduviid Bug *Triatoma infestans* (Insecta): Influence of Starvation. *J. Euk. Microbiol* 45: 59-63.

Kollien AH, Schaub GA 2000. The Development of *Trypanosoma cruzi* in Triatominae. *Parasitol Today* 16: 381-387.

Kropf SP 2009. Carlos Chagas e os debates e controvérsias sobre a doença do Brasil (1909-1923). *Hist Cienc Saúde-Manguinhos* 16: 205-227.

Lazzari CR 1992. Circadian organization of locomotion activity in the haematophagous bug *Triatoma infestans*. *Jf Insect Physiol* 38: 895-903.

Lent H 1999. Evolução dos Conhecimentos sobre Vetores da Doença de Chagas 90 Anos após sua Descoberta. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 94: 89-92.

Lent H & Wygodzinsky P 1979. Revision of the Triatominae (Hemiptera, Reduviidae), and their significance as vectors of Chagas' disease. *Bull Am Mus Nat Hist* 163: 125–520.

Lima-Neiva V 2014. *Aspectos biológicos e potencial vetorial de Triatoma sherlocki* Papa, Jurberg Carcavallo, Cerqueira & Barata, 2002 (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) em condições de laboratório. Dissertação de Mestrado, Instituto Oswaldo Cruz-Fiocruz, Rio de Janeiro, 94 pp.

Martínez-Hernandez F, Martínez-Ibarra JA, Catalá S, Villalobos G, Torre P,

Laclette JP, Alexandre-Aguilar R, Espinoza-Gutiérrez B 2010. Natural crossbreeding between sympatric species of the *Phyllosoma* complex (Insecta: Hemiptera: Reduviidae) indicate the existence of only one species with morphologic and genetic variations. *Am J Trop Med Hyg* 82: 74–82.

Martínez-Ibarra JA, Ventura-Rodríguez LV, Meillon-Isais K, Barajas-Martínez H, Alexandre-Aguilar R, Lupercio-Coronel P, Rocha-Chávez G, Noguera-Torres B 2008. Biological and genetic aspects of experimental hybrids from species of the *Phyllosoma* complex (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 103: 236-243.

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

Mas-Coma S, Bargues MD 2009. Populations, hybrids and the systematic concepts of species and subspecies in Chagas disease triatomine vectors inferred from nuclear ribosomal and mitochondrial DNA. *Acta tropica*, 110: 112-136.

Mello CB, Azambuja P, Garcia ES, Ratcliffe NA 1996. Differential *in Vitro* and *in Vivo* Behavior of Three Strains of *Trypanosoma cruzi* in the Gut and Hemolymph of *Rhodnius prolixus*. *Exp Parasitol* 82: 112–121.

Melo AS, Lorena VMB, Moraes AB, Pinto MBA, Leão SC, Soares AKA, Gadelha MFS, Gomes YM 2009. Prevalência de infecção chagásica em doadores de sangue no estado de Pernambuco, Brasil. *Rev Bras Hematol Hemoter* 31: 69-73

Mendonça VJ, Alevi KCC, Medeiros LMDO, Nascimento JD, Azeredo-Oliveira MTV, Rosa JA 2014. Cytogenetic and morphologic approaches of hybrids from experimental crosses between *Triatoma lenti* Sherlock & Serafim, 1967 and *T.*

sherlocki Papa et al., 2002 (Hemiptera: Reduviidae). *Infect Genet Evol* 26: 123-131.

Mendonça VJ, Silva MTA, Araújo RF, Júnior JM, Júnior MB, Almeida CE, Costa J, Graminha MAS, Cicarelli RMB, Rosa JA 2009. Phylogeny of *Triatoma sherlocki* (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) inferred from two mitochondrial genes suggests its location within the *Triatoma brasiliensis* complex. *Am J Trop Med Hyg* 81: 858–864.

Monteiro FA, Donnelly MJ, Beard CB, Costa J 2004. Nested clade and phylogeographic analyses of the Chagas disease vector *Triatoma brasiliensis* in Northeast Brazil. *Mol Phylogenet Evol* 32: 46–56.

Neiva A, Lent H 1941. Sinopse dos Triatomídeos. *Revista de Entomologia* 12: 61–92.

Nery-Guimarães F, Venâncio I, Grynberg N 1974. Refratariedade das galinhas ao “*Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*” III – Dissociação dos fenômenos da refratariedade e da lise dos epimastigotas pelo soro das aves. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 72: 131-136.

Noireau F, Gutierrez T, Zegarra M, Flores R, Brenière F, Cardozo L, Dujardin JP 1998. Cryptic speciation in *Triatoma sordida* (Hemiptera: Reduviidae) from the bolivian Chaco. *Trop Med Int Health* 3: 364-372.

Oliveira RL 2013. Principais insetos vetores e mecanismos de transmissão das doenças infecciosas e parasitárias. In JR Coura, *Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias*, Rio de Janeiro, p. 108-130.

Pereira MH, Gontijo NF, Guarneri AA, Sant’Anna MR, Diotaiuti L 2006. Competitive displacement in Triatominae: the *Triatoma infestans* success. *Trends Parasitol* 22: 516-520.

Perlowagora-Szumlewicz A, Correia MV 1972. Introduction of male sterility

though manipulation of genetic mechanisms present in vector species of Chagas' disease. *Rev Inst Med Trop* 14: 360-371.

Perlowagora-Szumlewicz A, Moreira CJC 1994. In vivo differentiation of *Trypanosoma cruzi* – 1. Experimental evidence of the influence of vector species on metacyclogenesis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 89: 603-618.

Perlowagora-Szumlewicz A, Muller CA, Moreira CJC 1990. Studies in search of a suitable experimental insect model for xenodiagnosis of hosts with Chagas' disease. 4- The reflection of parasite stock in the responsiveness of different vector species to chronic infection with different *Trypanosoma cruzi* stocks. *Rev Saúde Públ* 24: 165-177.

Ramírez-Pérez J 1969. Estudio sobre la anatomía de *Rhodnius prolixus*. *Rev Venez Sanid Asist Soc* 34: 9-98.

Pérez R, Hernández M, Quintero O, Scvortzoff E, Canale D, Méndez L, Cohanoff C, Martino M, Panzera F 2005. Cytogenetic analysis of experimental hybrids in species of Triatominae (Hemiptera-Reduviidae). *Genetica* 125: 261-270.

Phillips NR, Bertram DS 1967. Laboratory studies of *Trypanosoma cruzi* infections. *Journal of Medical Entomology* 4: 168-174.

Piesman J, Sherlock IA 1983. Factors controlling the volume of feces produced by triatomine vectors of Chagas' disease. *Acta Trop*, 40: 351-358.

Pietrokovsky S, Bottazzi V, Schweigmann N, Haedo A, Wisnivesky-Colli C 1996. Comparison of the blood meal size among *Triatoma infestans*, *T. guasayana* and *T. sordida* (Hemiptera: Reduviidae) of Argentina under laboratory conditions. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 91: 241-242.

Rabinovich JE 1972. Vital statistics of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae) under laboratory conditions. I. *Triatoma infestans* Klug. *J Med Entomol* 9: 351-

370.

Rabinovich JE, Leal JA, Piñero DF 1979. Domiciliary biting frequency and blood ingestion of the Chagas disease vector *Rhodnius prolixus*, Stål (Hemiptera: Reduviidae), in Venezuela. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 73: 272-283.

Reisenman CE, Gregory T, Guerenstein PG, Hildebrand JG 2011. Feeding and defecation behavior of *Triatoma rubida* (Uhler, 1894) (Hemiptera: Reduviidae) under laboratory conditions, and its potential role as a vector of Chagas disease in Arizona, USA. *Am J Trop Med Hyg* 85: 648-656.

Rey L 2002. Bases da Parasitologia Médica. Ed. Guanabara Koogan, 2ª edição, Rio de Janeiro, 329p.

Rocha DDS, Galvão C, Jurberg J 1994. Biology of *Rhodnius pictipes* Stål, 1872 under laboratory conditions (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 89: 265-270.

Rodrigues VLCC, Ferraz-Filho AN, Ishihata GK, Silva EOR 1995. *Triatoma brasiliensis* (Neiva, 1911) (Hemiptera, Reduviidae): Observações Sobre seu Comportamento em Relação à Fonte Alimentar em Galinheiro Experimental. *Cad Saúde Públ* 11: 266-270.

Sangenis L, Saraiva R, Georg I, de Castro L, Lima V, Roque A, Xavier S, Santos L, Fernandes FA, Sarquis O, Lima M, Carvalho-Costa F, Bóia M 2015. Autochthonous transmission of Chagas disease in Rio de Janeiro State, Brazil: a clinical and eco-epidemiological study. *BMC Infect Dis* 15: 4.

Santos CBD, Leite GR, Sessa PA, Falqueto A 2006. Dynamics of feeding and defecation in *Triatoma vitticeps* (Stål, 1859) (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) and its potential in the transmission of *Trypanosoma cruzi*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 101: 543-546.

Schaub GA 1989. *Trypanosoma cruzi*: Quantitative studies of development of

two strains in small intestine and rectum of the vector *Triatoma infestans*. *Exp Parasitol* 68: 260-273.

Schmunis G 1991. *Trypanosoma cruzi*, the etiologic agent of Chagas' disease: status in the blood supply in endemic and nonendemic countries. *Transfusion* 31: 547-552.

Schofield CJ 1994. Triatominae: Biología y Control, *Eurocommunica Publications, West Sussex*, 80 pp.

Silva CP, Lemos FJA, Silva JR 2012. Digestão em Insetos. In: MAC Silva-Neto, CE Winter, C Termignoni. Tópicos Avançados em Entomologia Molecular. 1. ed. Rio de Janeiro: INCT - Entomologia Molecular, v. 1. 582 p.

Silva FS 2009. A importância hematofágica e parasitológica da saliva dos insetos Hematófagos. *R Trop Ci Agr Biol* 3: 3-19.

Silva IG, Salha LA 1994. Aspectos da suscetibilidade dos triatomíneos ao *Trypanosoma cruzi* na busca de um modelo experimental. *Rev Pat Trop* 23: 93-100.

Silva IG, Santos LGP, Nakano R, Badauy RC 1994. Capacidade de replicação da cepa Y *Trypanosoma cruzi* em diferentes espécies de triatomíneos. *Rev Pat Trop* 23: 197-204.

Silva IG, Luquetti AO, Silva HHGD 1993. Importância do método de obtenção das dejeções de triatomíneos na avaliação da suscetibilidade triatomínica para *Trypanosoma cruzi*. *Rev Soc Bras Med Trop* 26: 19-24.

Silva MBA, Barreto AVMS, Silva HA, Galvão C, Rocha D, Jurberg J, Gurgel-Gonçalves R 2012. Synanthropic triatomines (Hemiptera, Reduviidae) in the state of Pernambuco, Brazil: geographical distribution and natural *Trypanosoma* infection rates between 2006 and 2007. *Rev Soc Bras Med Trop* 45: 60-65.

Silveira AC 2011. Os novos desafios e perspectivas futuras do controle. *Rev Soc Bras Med Trop* 44: 122-124.

Silveira AC, Vinhaes MC 1999. Elimination of vector-borne transmission of Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 94: 405-411.

Siqueira-Batista R, Moraes HP, Hanh MD 2007. Patogenia e Patologia. In R Siqueira-Batista, *Molétia de Chagas*, Rio de Janeiro, p. 57-74.

Soares RPP, Evangelista LG, Laranja LS, Diotaiuti L 2000. Population Dynamics and Feeding Behavior of *Triatoma brasiliensis* and *Triatoma pseudomaculata*, Main Vectors of Chagas Disease in Northeastern Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 95(2): 151-155.

Usinger RL, Wygodzinsky P, Ryckman RE 1966. The biosystematics of Triatominae. *Ann Rev Entomol* 11: 309-330.

Vinhaes MC, Dias LC 2000. Doença de Chagas no Brasil. *Cad Saúde Pública* 16: 7-12.

WHO – World Health Organization 2014. Chagas disease (American trypanosomiasis). <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>.

Wolinska J, Lively CM, Spaak P 2007. Parasites in hybridizing communities: the Red Queen again? *Trends Parasitol* 24: 121-126.

Wood SF 1951. Importance of feeding and defecation times of insect vectors in transmission of Chagas diseases. *J Economic Entomol* 44: 52-54.

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

Zeledón R, Vieto PL 1957. Susceptibilidad de varias especies de triatóminos a

una cepa costarricense de *Schizotrypanum cruzi* Chagas, 1909. *Rev Bio Trop* 5: 195-199.

Zingales B 2011. *Trypanosoma cruzi*: um parasita, dois parasitas ou vários parasitas da doença de Chagas. *Rev Biol* 19: 44-48.

Zingales B, Andrade SG, Briones MRS, Campbell DA, Chiari E, Fernandes O, Schijman AG 2009. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104: 1051-1054.