

RESSALVA

Atendendo solicitação da autora, o texto completo desta tese será disponibilizado somente a partir de 18/03/2012.



ROSANA SILISTINO DE SOUZA

**DOENÇA DE CHAGAS E BIOLOGIA DE TRIATOMÍNEOS
(HETEROPTERA, TRIATOMINAE), COM ÊNFASE AOS ASPECTOS DA
ESPERMATOGÊNESE**

**Tese apresentada para
obtenção do Título de
Doutor em Genética**

ROSANA SILISTINO DE SOUZA

**DOENÇA DE CHAGAS E BIOLOGIA DE TRIATOMÍNEOS
(HETEROPTERA, TRIATOMINAE), COM ÊNFASE AOS ASPECTOS DA
ESPERMATOGÊNESE**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Genética do Instituto de Biociências, Letras e
Ciências Exatas (IBILCE/UNESP) – São José do
Rio Preto, para obtenção do Título de Doutor em
Genética.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Tercília Vilela de Azeredo Oliveira

SÃO JOSÉ DO RIO PRETO – SP
2011

Souza, Rosana Silistino de.

Doença de Chagas e biologia de triatomíneos (Heteroptera, Triatominae), com ênfase aos aspectos da espermatogênese / Rosana Silistino de Souza. – São José do Rio Preto: [s.n.], 2011.

X f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Maria Tercília Vilela de Azeredo Oliveira

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Doença de Chagas. 2. Espermatogênese. 3. Triatomíneos. 4. Corpo cromatóide. 5. Proteína Fibrilarina. I. Azeredo- Oliveira, Maria Tercília Vilela de. II. Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. III. Título.

CDU - 591.463.1

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do IBILCE
Campus de São José do Rio Preto - UNESP

ROSANA SILISTINO DE SOUZA

**DOENÇA DE CHAGAS E BIOLOGIA DE TRIATOMÍNEOS
(HETEROPTERA, TRIATOMINAE), COM ÊNFASE AOS ASPECTOS DA
ESPERMATOGÊNESE**

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em Genética, área de Biologia Celular e Molecular junto ao Programa de Pós-Graduação em Genética do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto

BANCA EXAMINADORA

Titulares:

Profa. Dra. Maria Tercília Vilela de Azeredo Oliveira _____

(Presidente e Orientadora)

Prof. Dr. João Aristeu da Rosa _____

Profa. Dra. Hermione Elly Melara de Campos Bicudo _____

Profa. Dra. Fernanda Cristina Alcântara dos Santos _____

Profa. Dra. Patrícia Pasquale Parise Maltempi _____

Suplentes:

Prof. Dr. Ricardo Luís Dantas Machado _____

Profa. Dra. Grasiela Dias de Campos Severi Aguiar _____

Profa. Dra. Patrícia Simone Leite Vilamaior _____

São José do Rio Preto, 18/02/2011.

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Biologia Celular do Departamento de Biologia do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto, da Universidade Estadual Paulista (IBILCE/UNESP), com apoio financeiro do CNPq (Processo nº 302502/2007-6) e da FAPESP (Processos nº 2009/17816-8; nº 2010/01193-9).

DEDICO MAIS ESTA CONQUISTA:

AOS MEUS PAIS, ANTONIO (*in memorian*) E ROSINA, EXEMPLOS DE
LUTA INCANSÁVEL, ME DERM MUITO MAIS DO QUE EU MERE CIA. EU OS
AMO MUITO!

AOS MEUS QUERIDOS FILHOS, EMI E DAVI,
APRENDO SEMPRE COM VOCÊS!

AO JOAQUIM, COMPANHEIRO EVOLUTIVO, COM QUEM PARTILHO TODOS OS
MOMENTOS
E ESTANDO AO MEU LADO ME OFERECE O QUE TEM DE MAIS IMPORTANTE:
SUA COMPREENSÃO E O SEU AMOR...

"A CONSCIÊNCIA EXISTE E NÃO PODE SER DESTRUÍDA, NÃO PÁRA E NÃO
PODE SER PARADA, NÃO SILENCIA E NÃO PODE SER SILENCIADA,
MANIFESTA-SE E NÃO PODE SER ISOLADA. SUA MERA EXISTÊNCIA, POR
MAIS LIMITADA E AUTISTA QUE SEJA, PERTURBA O UNIVERSO E AS
OUTRAS CONSCIÊNCIAS, CRIANDO E MANTENDO LAÇOS ENERGÉTICOS COM
TUDO E TODOS. SÓ POR EXISTIR A CONSCIÊNCIA AGE.

COMO SERES CONSCIENTES, PERTURBAMOS SIGNIFICATIVAMENTE O
OCEANO DE ENERGIAS IMANENTES NO QUAL ESTAMOS IMERSOS, CRIANDO
ONDAS E PROPAGANDO INFORMAÇÕES. DEIXAMOS O RASTRO PENSÊNICO DE
NOSSA PERSONALIDADE AO LONGO DE NOSSAS EXISTÊNCIAS POR TODOS
OS LUGARES OU DIMENSÕES ONDE PASSAMOS"

Wagner Alegretti

AGRADECIMENTOS

Considero um grande privilégio deixar gravado o agradecimento sincero e especial àqueles que nos auxiliaram, de uma forma ou de outra e compartilharam de diferentes formas do desenvolvimento deste trabalho.

Este projeto é o resultado da confiança e, principalmente, da força e compreensão, sem igual, da minha orientadora, Profa. Dra. Maria Tercília, que abriu novos caminhos para iniciar a pesquisa com triatomíneos. Deu-me a liberdade para pesquisar e mais do que isso me incentivou durante todo este processo. O respeito por nossas opiniões e por nossa forma de trabalhar, além da amizade constante tornou a convivência durante todo este tempo, um marco em minha vida. Seu jeito de ser e experiência nos ensinam muito. Obrigada pela oportunidade única que me proporcionou na docência e neste processo de aprendizagem na Biologia Celular. Agradeço imensamente estarmos neste caminho evolutivo.

Agradeço ao Prof. Dr. Sebastião R. Taboga, que foi fundamental em minha formação acadêmica em Histologia e em todo o conhecimento em microscopia. Ele soube como ninguém ser exemplo de competência como pesquisador e de demonstrar amar o que faz.

Aos membros da Banca Examinadora, Prof. Dr. João Aristeu da Rosa, Profa. Dra. Hermione Elly Melara de Campos Bicudo, Profa. Dra. Fernanda Cristina de Alcântara Santos e Profa. Dra. Patrícia Pasquale Parise Maltempi pela aceitação e disponibilidade em avaliar o trabalho.

À Direção do IBILCE/UNESP e ao Departamento de Biologia, que possibilitaram a realização deste trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Genética, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas (IBILCE/UNESP) e à Profa. Dra. Lilian Madi Ravazzi, coordenadora do programa. Agradeço a todos os funcionários da Seção de Pós-Graduação, deste Instituto, que gentilmente nos atendem.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP, e ao Conselho Nacional de Pesquisa, CNPq, pelo suporte financeiro.

Aos pacientes portadores da Doença de Chagas, que fizeram parte desta pesquisa, gentilmente cedida pelo Dr. Reinaldo B. Bestetti.

À Dra. Sirle A. S. Scandar, responsável pela SUCEN (regional 8) e Marcelo Papa, que disponibilizaram os dados dos triatomíneos.

Ao Prof. Dr. João Aristeu da Rosa, coordenador do Insetário de Triatomíneo, que disponibilizou os insetos para a realização deste projeto científico.

Ào Ricardo Alexandre Fochi pelo auxílio na produção dos esquemas.

À Simone Carvalho Fernandes, secretária do Departamento de Biologia e Luíz Roberto Faleiros Júnior, do Laboratório de Microscopia e Microanálise, IBILCE-UNESP, pela amizade de tantos anos.

À Rita Luíza Peruquetti, pela disponibilização do anticorpo e sugestões para o artigo científico.

À Profa. Dra. Lucilene Regina Maschio, pela presença amiga, incentivo, alegria e amizade

À MSc. Vanessa Bellini Bardella, ex-aluna do Laboratório de Biologia Celular, pelo auxílio laboratorial no início do projeto e, em especial a aluna de pós-graduação MSc. Priscila Pasquetto Mendonça, pelo apoio em todos os momentos, convivência e amizade durante estes anos.

Aos alunos do curso de Engenharia de Alimentos, turma 2010, por ter aprendido muito com vocês. Em especial, agradeço à minha co-orientada Lorena Andrade Perandim, pelo carinho e incentivo, o que me faz ver a importância da orientação.

Aos amigos Amanda Maria de Assunção Miranda e Flávio Rodrigo Masson Carvalho que fazem parte desta minha existência, com quem compartilhei momentos felizes e me ajudaram em decisões difíceis, mas que valeram a pena para meu crescimento!

Aos meus pais, Antonio Silistino (*in memorian*) e Rosina Rosa Silistino, por tanto esforço e dedicação em minha educação. Pais maravilhosos, exemplos de vida e que deixam marcados em mim a sua doce presença.

Aos meus irmãos Geni (*in memorian*), Eduardo, Maria Aparecida, Sonia e José Antonio, por aprender e aprender sempre mais com cada um. Vocês são muito importantes em minha vida, cada um com sua riqueza especial...

Aos sobrinhos queridos, Ellen Cristina, André Luiz (*in memorian*), Marcelo, Andreza, Maiara, Giovana, Diego e Henrique por tanto carinho...

Aos meus filhos, Emi (futura bióloga) e Davi (graduando no curso de Letras), eternos críticos de nosso trabalho, pela compreensão e ajuda em todos os momentos. Vocês souberam como ninguém preencher minha existência. Obrigada!

Meu agradecimento especial, ao Grande Filósofo Prof. MSc. Joaquim Célio de Souza, educador incansável, cujo exemplo de força e persistência tanto me encorajou... A Filosofia realmente abre caminhos e mentes e torna os homens gigantes de uma época...

É BOM LEMBRAR, DE TEMPOS EM TEMPOS, QUE "ÉTICA" É APENAS OUTRA
PALAVRA PARA "JUSTIÇA", PARA A QUAL MUITOS HOMENS E MULHERES
DE TODAS AS GERAÇÕES TÊM FOME E SEDE, E SEM O QUAL A VIDA SE
TORNA SEM SENTIDO.

JANE ADDAMS

"NÃO VAI DEMORAR QUE PASSEMOS ADIANTE
UMA FORTE E BELA CIÊNCIA, QUE FAZ ARTE EM DEFESA DA VIDA".

CARLOS CHAGAS

Um século após a descoberta da Doença de Chagas, essa doença ainda representa uma das mais importantes enfermidades parasitárias que afetam o ser humano. A subfamília dos Triatomíneos tem uma importância médico sanitária, uma vez que estes insetos são vetores do *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico da Doença de Chagas e, também, uma relevância citológica por apresentar características celulares específicas, tais como a “persistência do material nucleolar” na espermatogênese. As células germinativas do reino animal apresentam em seu citoplasma corpos cromatóides, cujo termo em inglês é *chromatoid body* (CB), que podem se originar de material nucleolar que se fragmenta nas etapas iniciais da espermatogênese e exercem função importante na comunicação celular entre as espermátides durante o processo de espermiogênese. Atualmente, existem poucos estudos sobre o processo de nucleologênese e da formação de CBs, especialmente com ênfase à ultraestrutura das células envolvidas na espermatogênese de triatomíneos. Considerando a importância da Doença de Chagas e do conhecimento da fauna triatomínea, realizamos um levantamento dos pacientes chagásicos e um estudo sobre a biogeografia e as notificações dos triatomíneos da região Noroeste do Estado de São Paulo. Os dados coletados de 1995 a 2009 indicaram 700 indivíduos chagásicos demonstrando a faixa de 0 a 40 anos o que demonstra que a doença pode estar ativa nesta região. Além disso, dos pacientes atendidos com cardiomiopatia 44% eram portadores da Doença de Chagas. Em relação aos triatomíneos notificados e capturados no período de 2004 a 2009, as espécies observadas foram o *Triatoma sordida* e *Rhodnius neglectus*, sendo o *T. sordida* o mais abundante. Além disso, alguns triatomíneos estavam infectados pelo *T. cruzi* em vários estágios de desenvolvimento. Também analisamos o ciclo nucleolar e a expressão da proteína nucleolar fibrilarina nos CBs das células espermatogênicas de *Triatoma infestans* e *Triatoma sordida*, por meio de análises histológicas, ultraestruturais e de imunocitoquímica. Os resultados revelaram a expressão da proteína nucleolar fibrilarina no núcleo e no citoplasma das células germinativas durante a espermatogênese em triatomíneos. Estes dados sugerem que a fibrilarina pode ser um constituinte do CB e derivado da fragmentação nucleolar. Esta é a primeira vez que a proteína fibrilarina é marcada em CBs durante a espermatogênese de triatomíneos. No presente estudo ampliamos o conhecimento sobre a biologia dos triatomíneos, com ênfase aos aspectos morfológicos, estruturais e ultraestruturais da espermatogênese dos triatomíneos. Este estudo mostrou que a doença de Chagas pode estar ativa na região Noroeste do Estado de São Paulo ampliando, assim, o conhecimento da biologia dos triatomíneos, principais transmissores da Doença de Chagas.

A century after the discovery of Chagas Disease, it is still one of the most important parasitic diseases affecting humans. The subfamily Triatominae is important for medical health, because these insects are vectors of *Trypanosoma cruzi*, the etiologic agent of Chagas Disease and also an important cytological relevance because they have specific cell characteristics, such as "persistence of nucleolar material" in spermatogenesis. The germ cells of the animal kingdom have chromatoid bodies (CBs) in their cytoplasm that can originate from nucleolar material that is fragmented in the early stages of spermatogenesis and play an important role in cellular communication between the spermatids during spermiogenesis. Currently there are few studies on the process and formation of the nucleologenesis CB, especially with emphasis on the ultrastructure of the cells involved in spermatogenesis of insects. Considering the importance of knowledge about the triatomine fauna, we conducted a study on the biogeography and insect reports and a survey of patients with Chagas Disease in the northwestern region of São Paulo state. Data collected from 1995 to 2009 indicated 700 individuals, with Chagas Disease demonstrating a range of 0 to 40 years that shows that the disease may be active in this region. Moreover, the 1150 patients treated with cardiomyopathy 44% are chagasic. Regarding the triatomine noted and captured in the period from 2004 to 2009, the species were *Triatoma sordida* and *Rhodnius neglectus*, with *T. sordida* being the most abundant. In addition, some triatomine were infected by *T. cruzi* in several developmental stages. We also analyzed the nucleolar cycle and fibrillarin nucleolar protein expression in CB of spermatogenic cells of *Triatoma infestans* and *Triatoma sordida*, using histological, ultrastructural and immunocytochemistry. The results revealed fibrillarin nucleolar protein expression in the nucleus and in some cytoplasmic spots of germ cells during spermatogenesis in triatomines. These data suggest that fibrillarin could be a constituent of the CB that was most likely derived from nucleolar fragmentation. This is the first time that fibrillarin protein expression has been shown in the CB during spermatogenesis progression in triatomines. Knowledge about the biology of triatomines was deepened in this study and, in particular, the structural and ultrastructural aspects of spermatogenesis in triatomines. This study showed that the disease can be active in the northwestern region of São Paulo and expanded knowledge of the biology of the triatomines, the main vectors of Chagas Disease.

1.1. *Doença de Chagas: uma afecção ainda sem cura*

Um século após a descoberta da Doença de Chagas, essa enfermidade ainda constitui um dos maiores problemas de saúde, causando mais mortes nas Américas do que outras doenças parasitárias (GUERRI-GUTTEMBERG et al., 2008; BENCHIMOL-BARBOSA, 2010), além de estar se propagando pela América do Norte e Europa, devido à intensa migração (GUERRI-GUTTEMBERG et al., 2008; DEVELOUX et al., 2009). Estima-se que existam cerca de 15 milhões de infectados no mundo e uma incidência de 50 a 200 mil novos casos por ano (TARLETON et al., 2007). No Brasil, o número de infectados já atinge cerca de dois milhões e meio de indivíduos (NETO; PASTERNAK, 2009). Um grande número de pessoas em idade produtiva morre prematuramente, por que as drogas disponíveis apenas matam os parasitas extracelulares, não existindo tratamento efetivo para a doença. É importante ressaltar que os danos causados pelo parasita são irreversíveis, deixando sequelas que, muitas vezes, impossibilitam o homem de exercer suas atividades normais (BRENER, 1986). Estes dados demonstram a grande necessidade de investimento no controle da Doença de Chagas.

Esta doença é causada pelo parasita *Trypanosoma cruzi* que infecta o homem por meio das fezes e urina do inseto triatomíneo, cuja importância em parasitologia humana deve-se ao fato de ser o seu principal transmissor. A transmissão ocorre pela picada do inseto e por outras vias, tais como a transfusão de sangue, via oral por meio de alimento contaminado pelo protozoário, congênita, manuseio de animais silvestres e domésticos, transplantes de órgãos e acidentes em laboratórios e hospitais (MASSAD, 2008; SOUZA; CHAVES, 2009). Os triatomíneos são insetos hematófagos pertencentes à ordem Heteroptera, família Reduviidae e subfamília Triatominae. Atualmente, há 143 espécies descritas e distribuídas em 18 gêneros (SHOFIELD; GALVÃO, 2009; VALLEJO et al., 2009). No Brasil, existem 61 espécies de triatomíneos (GALVÃO et al., 2003), sendo que todas as espécies desta subfamília são potencialmente transmissoras do *T. cruzi* (LENT; WYGODZINSKY, 1979; GALVÃO et al., 2003). Segundo Vinhaes e Dias (2000), o *T. cruzi* vivia restrito ao ambiente silvestre, circulando somente entre mamíferos. O homem, então, provocando o desmatamento e invadindo esses ecótopos se fez incluir no ciclo epidemiológico da doença, oferecendo abrigos propícios à instalação desses hemípteros, como exemplo as casas de pau-a-pique e lugares de criação de animais. Esses insetos migram para o ambiente doméstico provocando um risco à saúde de seus moradores. Dessa forma, se não forem erradicados os focos

remanescentes em vários Estados brasileiros, a doença pode voltar como aconteceu com a Dengue e a Malária, invalidando o que já se fez em termos de campanhas nacionais de erradicação (DIAS et al., 2002).

No Estado de São Paulo, embora controlada, a Doença de Chagas ainda é motivo de preocupação aos órgãos de saúde, principalmente na região Noroeste do Estado de São Paulo que, apesar de ser uma região urbanizada, apresenta um crescimento da agricultura, com grandes pastagens e aproveitamento do solo. A região apresenta um monitoramento sistemático de triatomíneos, realizado pela Superintendência de Controle de Endemias (SUCEN), em todos os 31 municípios que compõem a área sob responsabilidade deste órgão. Entretanto, a participação efetiva da população na detecção e no controle dos triatomíneos é extremamente importante, pois a diminuição na vigilância pode provocar novos casos da doença.

3. CONCLUSÕES GERAIS

- A região Noroeste do Estado de São Paulo apresenta um alto índice de portadores da Doença de Chagas, com pouca idade, na faixa de 0 a 30 anos e apresentando cardiomiopatia.
- A biogeografia dos triatomíneos na região Noroeste do Estado de São Paulo mostra uma ocorrência de *Triatoma sordida* e *Rhodnius neglectus*, nos estágios de desenvolvimento, colonizando vários ecótopos e alguns apresentando-se infectados pelo protozoário *T. cruzi*.
- Nos triatomíneos, durante o processo da espermatogênese, as células apresentam corpos cromatóides, com exceção dos espermatozóides maduros.
- A espermatogênese dos triatomíneos é cística, com divisões celulares sincrônicas, apresentando corpúsculos nucleolares nas células espermatogoniais e espermátides.
- Os corpos cromatóides apresentam-se constituídos pela proteína nucleolar fibrilarina, demonstrando uma provável fragmentação nucleolar e participação na formação dos acrossomos.