



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Câmpus de São José do Rio Preto

Ana Beatriz Bortolozo de Oliveira

Citotaxonomia de *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909) e influência desse agente etiológico nas células de *Triatoma infestans* (Klug, 1834)

São José do Rio Preto
2020

Ana Beatriz Bortolozo de Oliveira

Citotaxonomia de *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909) e influência desse agente etiológico nas células de *Triatoma infestans* (Klug, 1834)

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biociências, junto ao Programa de Pós-Graduação em Biociências, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto.

Financiadoras: CNPq – Processo nº 142426/2016-4
CAPES

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Tercília Vilela de Azeredo Oliveira

Coorientador: Prof. Dr. Kaio Cesar Chaboli Alevi

Coorientadora: Prof^a Dr^a Aline Rimoldi Ribeiro

São José do Rio Preto
2020

O48c

Oliveira, Ana Beatriz Bortolozo

Citotaxonomia de *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909) e influência desse agente etiológico nas células de *Triatoma infestans* (Klug, 1834) / Ana Beatriz Bortolozo Oliveira. -- São José do Rio Preto, 2020

78 f. : fotos

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto

Orientadora: Maria Tercília Vilela de Azeredo Oliveira

Coorientador: Kaio Cesar Chaboli Alevi

1. Doença de Chagas. 2. *Trypanosoma cruzi*. 3. Triatomíneos. 4. Interação parasito-vetor. I. Título.

Ana Beatriz Bortolozo de Oliveira

Citotaxonomia de *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909) e influência desse agente etiológico nas células de *Triatoma infestans* (Klug, 1834)

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biociências, junto ao Programa de Pós-Graduação em Biociências, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto.

Financiadoras: CNPq – Processo nº 142426/2016-4
CAPES

Comissão Examinadora

Prof^a. Dr^a. Maria Tercília Vilela de Azeredo Oliveira
UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto
Orientadora

Prof^a. Dr^a. Flávia Cristina Rodrigues Lisoni
UNESP – Câmpus Ilha Solteira

Prof. Dr. Luís Gustavo da Conceição Galego
UFTM – Câmpus de Uberaba

Prof. Dr. Luís Lênin Vicente Pereira
UNIJALES - Jales

Prof^a. Dr^a. Rita Luiza Peruquetti
UNISAGRADO - Bauru

São José do Rio Preto
28 de fevereiro de 2020

*A Deus e aos meus pais, Selma e Mario, por me fazerem
tão amada, por serem minha fonte inesgotável de
estímulo, por me edificarem e por serem luz nos meus
dias, dedico minha gratidão e a realização de mais essa
conquista.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pelo amor que me sustenta e que ilumina o meu caminho, por permitir experiências tão importantes para a minha e evolução pessoal e minha formação profissional, por pacientemente me ensinar a prosperar diante das dificuldades e por me mostrar diariamente a importância de ser grata e de estar atenta às inúmeras oportunidades de aprendizado. Obrigada por tanto carinho com a minha vida! Agradeço também à Nossa Senhora por receber minhas orações, me abrigar em seu manto de amor, me amparar, me inspirar e interceder por mim!

À minha orientadora, Profª Drª Maria Tercília Vilela de Azeredo Oliveira, pelo estágio oferecido ainda no início da minha graduação e por ter me recebido novamente no Laboratório de Biologia Celular para a realização de mais uma importante etapa da minha trajetória acadêmica. Serei sempre grata pelas oportunidades concedidas, pelos obstáculos vencidos, pelo incentivo constante e pelos aprendizados que me proporcionou!

Ao meu coorientador e amigo, Prof. Dr. Kaio Cesar Chaboli Alevi, pela inestimável ajuda do delineamento à execução desse trabalho, pelo exímio conhecimento compartilhado comigo e com os demais que o procuram, por ser exemplo de persistência e dedicação, por me inspirar com seu entusiasmo pela ciência, por confiar em mim, pelo apoio generoso nos momentos de incerteza e por alegrar os meus dias!

À minha coorientadora e admirável pesquisadora, Profª Drª Aline Rimoldi Ribeiro, pela colaboração e pelo auxílio oferecido durante o desenvolvimento do projeto, compartilhando seu conhecimento e contribuindo para a minha fundamentação científica.

Ao Prof. Dr. João Aristeu da Rosa, pela colaboração que permitiu a execução desse trabalho e por nos receber periodicamente no Laboratório de Parasitologia e no Insetário de Triatominae da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (FCFAR) – UNESP/Câmpus de Araraquara. Agradeço também ao valioso auxílio prestado pelo Prof. Dr. Jader de Oliveira durante as etapas realizadas na FCFAR e pelos divertidos momentos de descontração.

Às agências de fomento pelo imprescindível suporte financeiro recebido. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001. Agradeço também ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo auxílio concedido na forma de bolsa e taxa de bancada (Processo nº 142426/2016-4).

Aos membros da banca examinadora de qualificação, Profa. Dra. Lilian Castiglioni e Profª Drª Flávia Cristina Rodrigues Lisoni, pelo tempo disponibilizado e pelas contribuições para a redação da tese.

Aos membros da banca examinadora de defesa, Profº Drº Luís Gustavo da Conceição Galego, Profª Drª Flávia Cristina Rodrigues Lisoni, Profº Drº Luís Lênin Vicente Pereira e Profª Drª Rita Luiza Peruquetti, pela atenção e disponibilidade para lerem e enriquecerem a versão final do nosso trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Biologia Celular, Ana Letícia, Amanda, Ariane, Bianca, Emi, Fernanda, Giovana, Isadora, Luiza e Yago, pelo convívio durante esses quatro anos e pelos momentos compartilhados longe das bancadas do laboratório, proporcionando colaborações que contribuíram para o meu desenvolvimento científico e, principalmente, tornando meus dias divertidos. À Nat, colega de graduação que se tornou uma grande amiga durante o estágio que realizamos nesse mesmo laboratório no início da faculdade, agradeço por ter sido a melhor primeira companheira de experimentos que poderia ter tido e por toda a leveza que nossa amizade traz para a minha vida.

Ao Fernando, doutorando do Laboratório de Citogenética e Molecular de Insetos e amigo querido desde a graduação, pela companhia sempre prazerosa e por viver comigo os sentimentos de cada etapa dessa jornada, iniciando e finalizando esse ciclo juntos. Obrigada pela parceria!

Aos amigos que conheci no Laboratório de Estudos Genômicos e que tanto me ensinaram, agradeço por todas as vezes que gentilmente discutiram os resultados do meu trabalho, pela ajuda prática na bancada e por todo apoio que sempre me dedicaram. André, Bruna, Mariana, Marina, Mônica, Renata e Rodolfo, obrigada pela convivência durante aqueles anos e, principalmente, por ainda permanecerem comigo. Vocês são pessoas muito especiais!

À Priscila Paschetto Mendonça e Marina Curado Valsechi, minhas coorientadoras de estágio básico no Laboratório de Biologia Celular e no Laboratório de Estudos Genômicos, respectivamente, pelos valiosos ensinamentos na fase inicial da minha trajetória na pesquisa, pelos conselhos, pelo companheirismo e pelas risadas nos momentos de descontração.

À Prof^a Dr^a Paula Rahal, minha orientadora de iniciação científica e mestrado, pela contribuição inestimável para a minha formação, por ter confiado em mim e me proporcionado amadurecimento profissional e pessoal. Sempre grata!

Ao corpo docente do curso de graduação em Ciências Biológicas e do Programa de Pós-Graduação em Biociências da UNESP de São José do Rio Preto por todos os ensinamentos e por estimularem o desenvolvimento do meu pensamento científico.

Aos demais funcionários do IBILCE, agradeço pelos serviços que possibilitam, sob diferentes aspectos, a continuidade do ensino e da pesquisa no câmpus. Agradeço especialmente ao Mauro Miasaki da Seção de Pós-Graduação pelo grande auxílio e pela gentileza nas palavras de apoio e tranquilidade que foram estímulo nos momentos oportunos.

Ao IBILCE/UNESP agradeço pelas todas as experiências vividas durante os últimos onze anos, por me proporcionar a realização de tantas conquistas e por ter me dado a oportunidade de conhecer pessoas tão incríveis e de construir lembranças muito queridas.

Às minhas grandes amigas Ana Flávia, Ayla e Lara, pela amizade que nos uniu e que levamos da graduação para vida. Não há como colocar em palavras todo o companheirismo, carinho e confiança que compartilhamos durante esses onze anos. Obrigada por tudo que significam na minha vida, por sempre encontrarem uma forma de se fazerem presentes, por me lembrarem de valorizar cada pequena conquista, por me incentivarem constantemente e me inspirarem. Muito obrigada é pouco! Caminhar ao lado de vocês é um grande presente.

Aos meus amigos Gui e Also, por serem tão presentes, por trazerem leveza para os meus dias, por me amarem exatamente como sou e por sempre me renderem muitas e muitas risadas. Gui, obrigada pela parceria incrível, por sermos tão companheiros e sinceros um com o outro. Also, obrigada pela doçura que seu sorriso traz e pelo abraço que tantas vezes aqueceu a minha alma. Amo a amizade que construímos!

À Tati, minha amiga e irmã de coração, por estar ao meu lado há quinze anos, compartilhando a vida e somando momentos memoráveis de cumplicidade, superação e alegria. Obrigada por me ensinar tanto, por fazer questão de acompanhar cada fase da minha caminhada, por sorrir com as minhas conquistas, por abraçar os meus anseios, por me apoiar com todo amor e por me levar para mais perto de Deus.

A todos meus tão queridos amigos, pela prazerosa companhia, pelos momentos de descontração, pelos ensinamentos, por tudo que somam à minha vida, por me darem a chance de aprender com as coisas mais simples, por me incentivarem, por se orgulharem de mim, por me estenderem as mãos e por compreenderem a minha ausência em diversos momentos. Seria realmente injusto tentar colocar alguns nomes aqui, pois Deus, com sua infinita generosidade, me abençoa com muitas pessoas incríveis pelo caminho. Gratidão por esses felizes encontros, pelas valiosas experiências e por tanto amor!

À minha família que tanto amo, pelo encorajamento constante, por se orgulharem de mim e muitas vezes me inspirarem. Agradeço especialmente às minhas avós, Marly e Anésia, pelo amor que me mostram em cada pequeno detalhe, pelo carinho nas orações que me dedicam, por me ensinarem tanto e por serem minhas grandes incentivadoras. Aos meus amados avós, Walter e Mario, in memoriam, agradeço por todo afeto e carinho que me entregaram e por cada momento que compartilhamos. As lembranças que deixaram em mim enchem meu coração de amor, saudade e gratidão. Deus sabe o tanto que meu coração ama vocês quatro!

Aos meus amados pais, Selma e Mario, pelo amor genuíno e incondicional, por me estimularem a buscar a minha melhor versão e darem toda a estrutura e apoio para que eu realize cada conquista. Agradeço por tudo que me ensinam, por mostrarem que eu sempre tenho muito a agradecer, por todos os conselhos, por serem o meu porto seguro, por me corrigirem, por serem minha inspiração e por permitirem que todos os dias eu me sinta protegida, cuidada e abençoada. Amo muito vocês! Demais mesmo!

A todos que contribuíram direta e indiretamente para a realização desse trabalho e para o meu crescimento profissional e pessoal, obrigada!

“A humildade é o primeiro degrau para a sabedoria”

São Tomás de Aquino

*"Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é
senão uma gota de água no mar, mas o mar seria
menor se lhe faltasse uma gota"*

- Madre Teresa de Calcutá

RESUMO

O protozoário *Trypanosoma cruzi* é o agente etiológico da doença de Chagas, uma doença parasitária negligenciada e potencialmente fatal que apresenta grande importância para a saúde pública de diversos países. Atualmente, existem sete unidades discretas de tipagem (DTUs) de *T. cruzi* classificadas com base em diferentes marcadores moleculares, sendo TcI e TcII os mais importantes do ponto de vista epidemiológico. A transmissão desse protozoário ocorre principalmente por meio dos triatomíneos, no entanto, a relação entre o parasito e o vetor ainda é pouco explorada e alguns estudos relatam efeitos negativos causados pela infecção, o que ressalta a importância de aprofundar a compreensão dessa interação. Assim, objetivou-se: i) caracterizar citogeneticamente duas importantes cepas de *T. cruzi*, a saber, Bolívia e Y (representantes de TcI e TcII, respectivamente), a fim de estabelecer métodos mais acessíveis e efetivos para a identificação das DTUs e ii) aprofundar a compreensão sobre a interação parasito-vetor, por meio de análises citogenéticas e/ou estruturais de células de testículo (espermatogênese) e túbulos de Malpighi de *Triatoma infestans* infectado com a cepa Bolívia de *T. cruzi*. A análise citogenética das cepas de *T. cruzi* possibilitou diferenciar os grupos TcI e TcII, com base no grau de heteropicnose do núcleo. O estudo citogenético e estrutural dos insetos infectados permitiu observar que a espermatogênese de *T. infestans* ocorreu normalmente, sugerindo que as alterações inicialmente relatadas para os aspectos reprodutivos resultam da influência do protozoário sobre a gametogênese das fêmeas. Além disso, a caracterização citogenética das células dos túbulos de Malpighi de *T. infestans* demonstrou que a infecção também não altera a morfologia nuclear e o metabolismo celular, demonstrando que a presença do *T. cruzi* não acarreta em prejuízo para o órgão excretor. A diferenciação de TcI e TcII e o conhecimento da relação parasito-vetor mostraram-se importantes do ponto de vista entomopidemiológico. Ainda, a correta identificação das cepas, por meio da citogenética clássica, também pode auxiliar no diagnóstico clínico da doença de Chagas.

Palavras-chave: doença de Chagas; citotaxonomia; TcI; TcII; interação parasito-vetor

ABSTRACT

The protozoan *Trypanosoma cruzi* is the etiologic agent of Chagas disease, a neglected and potentially fatal parasitic disease that presents great importance for public health in several countries. There are currently seven discrete typing units (DTUs) of *T. cruzi* classified based on different molecular markers, being TcI and TcII the most important from the epidemiological point of view. The transmission of this protozoan occurs mainly through triatomines, however, the relationship between the parasite and the vector is still poorly explored and some studies report negative effects caused by the infection, which highlights the importance of deepening the understanding of this interaction. Thus, the objective was: i) characterize cytogenetically two important strains of *T. cruzi*, namely, Bolivia and Y (representatives of TcI and TcII, respectively), in order to establish more accessible and effective methods for the identification of DTUs and ii) deepen the understanding about the parasite-vector interaction, through cytogenetic and/or structural analysis of testis cells (spermatogenesis) and Malpighian tubules of *Triatoma infestans* infected with *T. cruzi* strain of Bolivia. Cytogenetic analysis of *T. cruzi* strains made it possible to differentiate the TcI and TcII groups, based on the pattern of heteropycnosis of the nucleus. The cytogenetic and structural study of the infected insects allowed to observe that the spermatogenesis of *T. infestans* occurred normally, suggesting that the alterations initially reported for the reproductive aspects result from the influence of the protozoan on the females gametogenesis. In addition, cytogenetic characterization of the Malpighian tubules cells of *T. infestans* demonstrated that the infection also does not change the nuclear morphology and cell metabolism, demonstrating that the presence of *T. cruzi* does not cause damage to the excretory organ. The differentiation of TcI and TcII and the knowledge of the parasite-vector relationship proved to be important from the entoepidemiological point of view. Still, the correct identification of the strains, through classic cytogenetics, can also help in the clinical diagnosis of Chagas disease.

Keywords: Chagas disease; cytotaxonomy; TcI; TcII; parasite-vector interaction

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 OBJETIVOS	20
2.1 Objetivo geral	20
2.2 Objetivos específicos	20
3 MATERIAL E MÉTODOS	21
3.1 Preparo do material para análise citogenética das cepas de <i>T. cruzi</i>	21
3.2 Preparo do material para análise citogenética e estrutural de células dos testículos e dos túbulos de Malpighi de <i>T. infestans</i> infectado com <i>T. cruzi</i>	21
3.2.1 Obtenção e procedência dos insetos	21
3.2.2 Manutenção dos insetos	21
3.2.3 Infecção dos insetos	22
3.2.4 Dissecção dos insetos e obtenção dos órgãos analisados	22
3.2.5 Fixação do material biológico para análise citogenética	23
3.2.6 Fixação do material biológico para estrutural	23
3.2.7 Preparação das lâminas para análises citogenéticas	23
3.2.8 Processamento do material biológico para análise estrutural	24
3.3 Colorações	24
3.3.1 Orceína lacto-acética	24
3.3.2 Acridine Orange	244
3.3.3 Azul de Toluidina	25
3.4 Análise e fotodocumentação das lâminas	25
4 CAPÍTULO I – Parasite-Vector Interaction of Chagas Disease: A mini-review	26
5 CAPÍTULO II – Cytotaxonomy of <i>Trypanosoma cruzi</i> (Chagas, 1909): differentiation of <i>T. cruzi</i> I (TcI) and <i>T. cruzi</i> II (TcII) genotypes using cytogenetic markers	39
6 CAPÍTULO III – Parasite x Chagas disease vectors relationship: does <i>Trypanosoma cruzi</i> (Chagas, 1909) infection affects the spermatogenesis of <i>Triatoma infestans</i> (Klug, 1834)?	49
7 CAPÍTULO IV – <i>Trypanosoma cruzi</i> (Chagas, 1909) x triatomines relationship: Is the infection by the etiologic agent of Chagas' disease capable of altering the nuclear morphology and composition of Malpighian tubule cells of <i>Triatoma infestans</i> (Klug, 1834)?	62
8 CONCLUSÕES	71
REFERÊNCIAS	72

1 INTRODUÇÃO

A doença de Chagas, descrita por Carlos Ribeiro Justiniano Chagas, em 1909, é uma enfermidade causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909) (Kinetoplastida, Trypanosomatidae) que representa um grande problema de saúde pública (NOUVELLET; CUCUNUBÁ; GOURBIÈRE, 2015). Essa doença é considerada potencialmente fatal (WHO, 2019) e pertence a um grupo de doenças negligenciadas que afetam, principalmente, pessoas que vivem em países em desenvolvimento (BERMUDEZ et al., 2016). Estima-se que oito milhões de pessoas no mundo estejam infectadas pelo *T. cruzi* e, embora a maioria dos casos ocorra na América Latina, a doença se espalhou para áreas não endêmicas (WHO, 2019), sendo relatada em diversos países, tais como Canadá, Estados Unidos, Japão, Austrália, Nova Zelândia, Suíça, Itália e Espanha (SORIANO-ARANDES et al., 2016). Nas Américas, cerca de 70 milhões de pessoas vivem em áreas de risco, sendo estimados, por ano, 30.000 novos casos de infecção e 14.000 mortes por complicações chagásicas (PAHO, 2017).

Ao se infectar pelo *T. cruzi*, inicia-se o período de incubação (uma a duas semanas) e, após esse tempo, entra-se na fase aguda da doença. Essa fase geralmente é assintomática ou apresenta sintomas inespecíficos como febre e mal estar, raramente acarretando ao aparecimento de chagoma (nódulo na pele) ou sinal de Romaña (edema na pálpebra) (BERN, 2015). Decorrido esse período, inicia-se a fase indeterminada que corresponde à fase crônica assintomática e na qual o indivíduo pode permanecer ao longo de toda sua vida ou por, pelo menos, um período de 10 anos, até que seja observada uma progressão da doença (STANAWAY; ROTH, 2015). Cerca de 60-70% dos indivíduos infectados pelo protozoário são assintomáticos e nunca desenvolvem

cl clinicamente a doença, enquanto 30-40% dos pacientes desenvolvem distúrbios cardíacos, gastrointestinais ou ambos (JR; RASSI; MARIN-NETO, 2010).

A transmissão do *T. cruzi* pode ocorrer de diversas maneiras como, por exemplo, por meio de transplante de órgão de doador infectado, acidentes laboratoriais ou ingestão de alimentos ou líquidos contaminados (cana-de-açúcar, açaí e carne crua). Além disso, é importante ressaltar que a transmissão também pode ser congênita (verticalmente entre a mãe e a criança) ou acontecer por meio de transfusão de sangue, sendo que essas duas formas são alvos de atenção para reduzir a disseminação da doença, visto que estão relacionadas com a infestação em áreas urbanas e não endêmicas (ANGHEBEN et al., 2015; HOWARD et al., 2015). No entanto, o principal modo de transmissão é o vetorial, o qual ocorre por meio dos triatomíneos (Hemiptera, Triatominae) (WHO, 2019), insetos popularmente chamados de “barbeiros” (DIAS; LARANJA; NOBREGA, 1945) devido ao hábito de picarem a face descoberta das pessoas enquanto estas estão dormindo (TARTAROTTI; AZEREDO-OLIVEIRA; CERON, 2004).

A contaminação dos triatomíneos e a transmissão do parasita ocorrem durante a alimentação desses insetos por meio da hematofagia, pois o sangue é altamente nutritivo e muitos animais desenvolveram o hábito de se alimentarem dessa fonte de nutrientes, o que acarretou na veiculação de muitas doenças parasitárias. Considerando que após a eclosão a hematofagia é obrigatória em todas as fases da vida dos triatomíneos [ninfas de primeiro (N1) a quinto instar (N5) e adultos de ambos os sexos], esses insetos podem se contaminar ao se alimentarem do sangue de vertebrados infectados pelo *T. cruzi* e veicular o parasito desde N1 até a fase adulta (SOARES et al., 2014; URDANETA-MORALES, 2014). Como possuem o hábito de defecar (Figura 1A, seta) e urinar (Figura 1B, seta) durante a alimentação, os insetos infectados podem transmitir

o protozoário a partir do contato das fezes e da urina contaminadas com a pele danificada do hospedeiro após a picada do inseto. A transmissão também pode se dar pelos os olhos, boca e eventuais rupturas presentes na pele do indivíduo quando o mesmo, instintivamente, coça e provoca o espalhamento das fezes e da urina contaminadas (WHO, 2019).

Figura 1. Exemplo de triatomíneo [*Triatoma sordida* (Stål, 1859)] defecando (A, seta) e urinando (B, seta) durante o repasto sanguíneo.



FONTE: Arquivo pessoal do Profº Drº Kaio Cesar Chaboli Alevi.

O ciclo de vida do *T. cruzi* é constituído por diferentes fases que acontecem tanto nos insetos (vetores) quanto nos mamíferos (hospedeiros). Ao se alimentar do sangue do hospedeiro infectado com a forma circulante do protozoário (tripomastigota), o inseto é contaminado. No intestino médio do invertebrado, as formas tripomastigotas se diferenciam em epimastigotas, reproduzem-se por meio de fissão binária e, ao

chegarem no intestino grosso, se transformam em tripomastigotas metacíclicas. Durante a hematofagia, as formas tripomastigotas metacíclicas são liberadas nas fezes do inseto e podem infectar, invadindo as células locais do vertebrado e se diferenciando em amastigotas (para se reproduzirem, novamente, por fissão binária). Ainda no interior das células, ocorre a transformação de amastigota para a forma tripomastigota que, por meio da lise celular, é liberada na circulação sanguínea do hospedeiro. Dessa forma, os tripomastigotas podem se espalhar para outros tecidos e infectar novas células. Além disso, as formas tripomastigotas circulantes podem infectar outros insetos, quando estes se alimentam do sangue do mamífero contaminado (CARREA; DIAMBRA, 2016).

Uma grande diversidade de vertebrados é suscetível a funcionar como reservatório do *T. cruzi* e, dessa forma, esse protozoário é capaz de infectar mais de 150 espécies de mamíferos pertencentes a oito diferentes ordens, sendo elas Chiroptera, Primates, Rodentia, Artiodactyla, Marsupialia, Cingulata, Pilosa e Carnivora (SANTOS et al., 2015, JANSEN, 2018). Dentre os vertebrados que podem servir de reservatório para o *T. cruzi* estão animais silvestres (como principalmente gambás, tatus e roedores) animais sinantrópicos (como roedores) e animais domésticos (como cães e gatos), sendo que essa ampla diversidade de mamíferos desempenha papel importante na amplificação das fontes desse protozoário (GÜRTLER; CARDINAL, 2015). Por outro lado, as aves e os vertebrados de sangue frio, que incluem os répteis e os anfíbios, são animais refratários à infecção pelo *T. cruzi* (RASSI; RASSI; MARCONDES DE REZENDE, 2012).

Os triatomíneos atuam na natureza como vetores há milhões de anos e a transmissão do protozoário causador da doença de Chagas para o homem aconteceu em decorrência da busca desses insetos por fontes alternativas de alimento após a invasão de ambientes silvestres pelo homem, processo que foi acompanhado pelo desmatamento

desses ecótopos, remoção de animais selvagens e prática da pecuária (COURA; BORGES-PEREIRA, 2010). Assim, embora o ciclo silvestre já exista há milhões de anos, com esse processo os triatomíneos passaram a infectar os humanos e penetraram progressivamente no ambiente doméstico, originando os ciclos peridomiciliar e domiciliar (COURA; VIÑAS; JUNQUEIRA, 2014). Como possuem hábito noturno, esses animais costumam se esconder em locais escuros durante o dia, como em frestas de parede e telhados (WHO, 2019).

Esses insetos pertencem à ordem Hemiptera, subordem Heteroptera, família Reduviidae e subfamília Triatominae (LENT; WYGODZINSKY, 1979), sendo conhecidas, até o momento, 154 espécies que são divididas em 19 gêneros e cinco tribos (OLIVEIRA e ALEVI, 2017; DORN et al., 2018; OLIVERA et al., 2018; LIMA-CORDÓN et al., 2019; POINAR, 2019; NASCIMENTO et al., 2019). Embora todas as espécies apresentem capacidade vetorial, os principais gêneros envolvidos com a transmissão do *T. cruzi* são *Triatoma* Laporte, 1832, *Panstrongylus* Berg, 1879 e *Rhodnius* Stål, 1859 (GALVÃO, 2014). No Brasil, as espécies *T. brasiliensis* Neiva, 1911, *T. infestans* (Klug, 1834), *T. pseudomaculata* Corrêa & Espínola, 1964, *T. sordida* e *P. megistus* (Burmeister, 1835) são de grande importância vetorial por habitarem regiões domiciliares e apresentarem ampla distribuição geográfica (SILVEIRA, 2011).

No entanto, ainda é bastante escasso o conhecimento sobre a relação parasito-vetor entre o *T. cruzi* e os triatomíneos e, embora seja considerado que esse parasito não apresenta patogenicidade aos hospedeiros invertebrados e que a relação entre esses organismos seja harmoniosa, efeitos negativos causados pela infecção tem sido relatados, como, por exemplo, prejuízos no desempenho reprodutivo, os quais podem reduzir o *fitness* do inseto e trazer consequências para a sua sobrevivência (FELLET et

al., 2014), alteração de aspectos comportamentais, tais como diminuição do tempo entre a alimentação e a defecação em *Mepraia spinolai* (Porter, 1934) (BOTTOMAHAN; CATTAN; MEDEL, 2006) e estruturais [asas maiores em *T. dimidiata* (Latreille, 1811) infectados, quando comparados ao grupo controle], sendo sugerida uma relação entre alteração na morfologia do hospedeiro invertebrado e o seu potencial de dispersão (NOUVELLET et al., 2011).

Nesse contexto, é importante ressaltar que é estabelecido que vetores são comumente explorados pelos parasitos e que conhecer a relação entre eles é um passo importante para a epidemiologia das doenças negligenciadas transmitidas por vetores (ELLIOT et al., 2015). Portanto, torna-se interessante investigar mais detalhadamente a interação entre *T. cruzi* e triatomíneos afim de avaliar, sob diferentes aspectos, a influência que a infecção pelo protozoário pode exercer sobre o inseto. Além disso, sabe-se que os efeitos da infecção pelo *T. cruzi* variam de acordo com diversos aspectos, os quais incluem as condições ambientais (tais como temperatura e alimentação), as diferentes espécies de vetor e as estirpes do parasito (GUARNERI; LORENZO, 2016), sendo descritas, atualmente, sete unidades discretas de tipagem (*discrete typing units* - DTUs) de *T. cruzi*, classificadas com base em diferentes marcadores moleculares (ZINGALES et al., 2012), a saber, TcI, TcII, TcIII, TcIV, TcV, TcVI e TcVII (MARCILI et al., 2009; ZINGALES et al., 2009).

A heterogeneidade genotípica desse protozoário implica, também, em uma consequente heterogeneidade fenotípica nos indivíduos infectados, ou seja, as diferentes cepas de *T. cruzi* estão associadas a diferentes manifestações clínicas nos pacientes, as quais envolvem síndromes cardíacas e/ou digestivas que podem, inclusive, resultar no óbito dessas pessoas. Dessa forma, considerando a relevante influência da genética do parasito para a epidemiologia da doença, a importância da compreensão dessa relação

para as pesquisas de intervenção e, sobretudo, a necessidade do emprego de ferramentas moleculares para diferenciar os sete DTUs, é de grande interesse para a saúde pública o desenvolvimento de estudos focados em desenvolver métodos simples que permitam facilitar a identificação das DTUS em amostras clínicas e biológicas (ZINGALES et al., 2012).

Reforçando a necessidade da busca alternativa por novas abordagens que facilitem o diagnóstico dos pacientes chagásicos, levando em consideração que o tratamento atualmente disponível é realizado por meio da administração de benznidazol e nifurtimox, mas a eficácia desses fármacos exige que a detecção da infecção seja precoce (ocorrendo ainda na fase aguda) e que quanto maior o tempo de infecção, menor é o sucesso no uso desses fármacos (WHO, 2019), aprofundar o conhecimento a respeito da biologia do *T. cruzi* (desenvolvendo ferramentas simples e eficazes que possibilitam diferenciar as DTUs) (ZINGALES et al., 2012) e da biologia dos vetores (proporcionando compreender a relação *T. cruzi* x triatomíneos), mostra-se como valiosa ferramenta para a descoberta de novos caminhos a serem seguidos no controle da doença de Chagas (GARCIA et al., 2010).

Portanto, levando em conta o interesse em estabelecer técnicas que tornem a identificação das DTUs um processo simples e acessível, a caracterização citogenética das cepas de *T. cruzi* constitui uma alternativa com potencial a ser considerado, tendo sido selecionadas para a análise de duas cepas (Bolívia e Y) pertencentes aos grupos TcI e TcII, os quais foram escolhidos para serem representados devido à relevância clínica que apresentam (MILES et al., 1981; ZINGALES et al., 1998; FREITAS et al., 2005; LAGES-SILVA et al., 2006; ZINGALES et al., 2012). Além disso, tendo em vista a necessidade de melhorar a compreensão sobre a relação entre *T. cruzi* e os triatomíneos e que alguns estudos indicam prejuízos sob o ponto de vista reprodutivo dos vetores,

torna-se importante avaliar a espermatogênese desses insetos quando infectados. Por fim, além de ser interessante avaliar a influência do parasito nas células do intestino desses insetos, considerando que Dias (1930) relatou a presença de *T. cruzi* na região do aparelho excretor próxima ao intestino, também é válido avaliar a influência do parasita sobre as células dos túbulos de Malpighi dos triatomíneos. Para tais análises, foi utilizada a espécie *T. infestans* devido a sua grande importância vetorial, uma vez que apresenta ampla distribuição geográfica e está adaptada a viver em regiões domiciliares, caracterizando-a, dessa forma, como uma das principais espécies vetoras de *T. cruzi* (GALVÃO,2014).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Caracterizar citogeneticamente duas importantes cepas de *T. cruzi* – Bolivia (TcI) e Y (TcII) – e avaliar a relação parasito-vetor entre *T. cruzi* e *T. infestans*, por meio de análises citogenéticas e/ou estruturais das células dos túbulos seminíferos e dos túbulos de Malpighi de *T. infestans* infectado.

2.2 Objetivos específicos

a) Analisar citogeneticamente a morfologia do núcleo das cepas Bolivia (TcI) e Y (TcII) de *T. cruzi*;

b) Analisar a influência da infecção pelo *T. cruzi* na morfologia nuclear de células da espermatogênese de *T. infestans*;

c) Analisar a influência da infecção pelo *T. cruzi* na morfologia e no metabolismo nuclear de células dos túbulos de Malpighi de *T. infestans*.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Preparo do material para análise citogenética das cepas de *T. cruzi*

Para a caracterização citogenética dos grupos TcI e TcII de *T. cruzi* foram preparadas lâminas de cultura das cepas Bolívia e Y no Laboratório de Parasitologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (FCFAR) localizado no câmpus da UNESP de Araraquara e supervisionado pelo Prof. Dr. João Aristeu da Rosa. A manipulação do material e a montagem das lâminas foram feitas próximas a um bico de Bunsen para evitar contaminação das culturas. Nesse processo, foram espalhados 100 µL de cultura em cada lâmina e a fixação do material foi feita utilizando metanol. Posteriormente, o material foi submetido à coloração com Orceína lacto-acética.

3.2 Preparo do material para análise citogenética e estrutural de células dos testículos e dos túbulos de Malpighi de *T. infestans* infectado com *T. cruzi*

3.2.1 Obtenção e procedência dos insetos

Para a realização dos experimentos, foram utilizados dez machos da espécie *T. infestans* fornecidos pelo “Insetário de Triatomíneos” instalado na Faculdade de Ciências Farmacêuticas (FCFAR) do câmpus da UNESP de Araraquara, sob a coordenação do Prof. Dr. João Aristeu da Rosa.

3.2.2 Manutenção dos insetos

No insetário da UNESP de Araraquara, as espécies são separadas em colônias de acordo com suas origens e os espécimes são mantidos em cristalizadores contendo repartições internas de papelão (para reduzir a luminosidade), fechados em sua parte superior com uma malha fina e guardados em estantes de madeira, cujos pés ficam imersos em vasilhas contendo óleo queimado para evitar o ataque de formigas e o

apodrecimento da madeira, em salas com pouca iluminação e com temperatura e umidade relativa do ar ambiente.

3.2.3 Infecção dos insetos

A infecção dos espécimes de *T. infestans* foi realizada no Laboratório de Parasitologia da UNESP Araraquara. Para isso, os insetos foram colocados para realizar hematofagia em ratos contaminados com a cepa Bolívia de *T. cruzi* e, posteriormente, foram submetidos à pressão abdominal a fim de coletar as fezes para observação em microscópio de luz e confirmação da infecção.

3.2.4 Dissecção dos insetos e obtenção dos órgãos analisados

No momento da utilização, os triatomíneos foram retirados dos respectivos frascos sob muito cuidado para não permitir a fuga dos mesmos. A dissecção foi realizada em local apropriado e utilizando as medidas de segurança necessárias para evitar acidentes laboratoriais.

Os insetos adultos foram eterizados e fixados com auxílio de alfinetes na região posterior do cefalotórax (escutelo) em placa de Petri contendo parafina sólida. Em seguida, asas e patas foram retiradas com o auxílio de uma pinça. Sob o microscópio estereoscópico (lupa), as laterais do abdome e os conexivos foram cortados com uma tesoura pontiaguda. Com a ponta dos estiletes, a região antero-dorsal do exoesqueleto abdominal foi aberta, rebatida e, posteriormente, presa com alfinete na placa, expondo o interior da região abdominal.

Neste momento, foi gotejada solução fisiológica (Demerec) sobre o abdome exposto e realizada a retirada dos testículos e dos túbulos de Malpighi, os quais ficam localizados na hemocele desses insetos.

3.2.5 Fixação do material biológico para análise citogenética

Após serem retirados e limpos, os túbulos seminíferos e os túbulos de Malpighi foram armazenados em frascos contendo metanol e ácido acético (3:1) para fixação, os quais foram mantidos em freezer -20°C até a utilização nos experimentos.

3.2.6 Fixação do material biológico para estrutural

Após serem retirados e limpos, os testículos foram armazenados e mantidos na geladeira por 24h em frascos contendo fixador preparado com 3% de glutaraldeído e solução de ácido tânico 0,25% em tampão Millonig (pH 7,3) contendo 0,54% de glucose.

3.2.7 Preparação das lâminas para análises citogenéticas

Para a preparação das lâminas, o material biológico mantido na solução fixadora foi colocado em uma lâmina limpa onde foram realizados dois banhos de água destilada de cinco minutos cada. Em seguida, toda a água foi retirada e foi acrescentada uma gota de ácido acético 45%, durante 10 minutos. Após esse período, o excesso de ácido acético foi retirado e, sob o auxílio de um microscópio estereoscópico, o material foi dilacerado utilizando estilete. Posteriormente, foi colocada uma lamínula sobre esse material para a realização do esmagamento celular. Por fim, a remoção da lamínula foi feita utilizando nitrogênio líquido e, após a secagem em temperatura ambiente, as lâminas seguiram para a realização das técnicas de coloração de Orceína lacto-acética e *Acridine Orange*.

3.2.8 Processamento do material biológico para análise estrutural

O material biológico fixado para análise estrutural foi submetido ao tratamento com tetróxido de ósmio 1% e tampão Millonig (1:3) e desidratado em uma sequência de soluções com concentrações crescentes de acetona (de 70 à 100%). Posteriormente, foram realizados os processos de pré-infiltração, infiltração e inclusão do material em araldite. Por fim, os blocos foram trimados para a obtenção de cortes semifinos, os quais foram submetidos à coloração de Azul de Toluidina.

3.3 Colorações

3.3.1 Orceína lacto-acética

Essa técnica tem como princípio a capacidade de diferenciar a eucromatina da heterocromatina, corando mais fracamente a primeira e mais fortemente a segunda em função da afinidade que o corante ácido orceína apresenta pelas proteínas relacionadas com a compactação do material genético. Assim, é uma coloração bastante usual e foi utilizada para caracterizar o núcleo das cepas Bolívia e Y de *T. cruzi*, bem como as fases da divisão meiótica e o núcleo das células dos túbulos de Malpighi dos espécimes de *T. infestans* infectados.

3.3.2 Acridine Orange

O fluorocromo *Acridine Orange* é um corante metacromático que fornece emissões fluorescentes de diferentes cores para DNA e RNA. Ao se ligar eletrostaticamente aos grupamentos fosfatos dos ácidos nucleicos (RNA ou DNA fita simples), esse fluorocromo produz uma coloração vermelha, mas quando intercalado com a dupla-hélice do DNA, gera uma coloração verde/amarela fluorescente quando excitado por luz azul. Assim, a coloração com esse fluorocromo foi utilizada para

analisar a influência da infecção na atividade transcricional das células de túbulos de Malpighi.

3.3.3 Azul de Toluidina

O Azul de Toluidina é um corante que se liga eletrostaticamente aos ácidos nucleicos e outras proteínas, corando o material em diferentes tons de azul de acordo com a elétron-densidade de cada componente a que se associa. É uma técnica comumente empregada para colorir cortes histológicos semi-finos de material incluído em resina, permitindo a análise a nível estrutural do tecido estudado devido à fina espessura dos cortes.

3.4 Análise e fotodocumentação das lâminas

O material submetido às colorações de Orceína Lacto-Acética e Azul de Toluidina foi analisado ao microscópio de luz Jenaval (Zeiss), acoplado à câmera digital e ao sistema analisador de imagens Axio Vision LE 4.8 (Copyright ©2006-2009 Carl Zeiss Imaging Solutions Gmb H). O material submetido à coloração de Acridine Orange foi analisado ao microscópio de fluorescência Olympus BX-FLA.

4 CAPÍTULO I

Artigo publicado na revista internacional *The American Journal of Tropical Medicine & Hygiene* (Fator de Impacto 2,31)

OLIVEIRA, A.B.B.; ALEVI, K.C.C.; IMPERADOR, C.H.L.; MADEIRA, F.F.; AZEREDO-OLIVEIRA, M. T. V. Parasite-Vector Interaction of Chagas Disease: A Mini-Review. THE AMERICAN JOURNAL OF TROPICAL MEDICINE AND HYGIENE, v. 98, p. 653-655, 2018.

MINI-REVIEW

Parasite-Vector Interaction of Chagas Disease: A mini-review

Ana Beatriz Bortolozo de Oliveira¹, Kaio Cesar Chaboli Alevi^{1*}, Carlos Henrique Lima Imperador¹, Fernanda Fernandez Madeira¹, Maria Tercília Vilela de Azeredo Oliveira¹

¹ Laboratório de Biologia Celular, Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, IBILCE/UNESP, Rua Cristóvão Colombo 2265, 15054-000, São José do Rio Preto, SP, Brasil

***Corresponding author:** Kaio Cesar Chaboli Alevi, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, IBILCE/UNESP, Rua Cristóvão Colombo 2265, 15054-000, São José do Rio Preto, SP, Brasil. E-mail: kaiochaboli@hotmail.com. Phone: +55-17-3221-2380.

Abstract

Trypanosoma cruzi is a protozoan of great importance to public health: it has infected millions of people in the world and is the etiologic agent of Chagas disease, which can cause cardiac and gastrointestinal disorders in patients and may even lead to death. The main vector of transmission of this parasite is triatomine bugs, which have a habit of defecating while feeding on blood and passing the parasite to their own hosts through their feces. Although it has been argued that *T. cruzi* is not pathogenic for this vector, other studies indicate that the success of the infection depends on several molecules and factors, including the insect's intestinal microbiota, which may experience changes as a result of infection that include decreased fitness. Moreover, the effects of infection depend on the insect species, the parasite strain, and environmental conditions involved. However, the parasite-vector interaction is still underexplored. A deeper understanding of this relationship is an important tool for discovering new approaches to *T. cruzi* transmission and Chagas disease.

Key Words: *Trypanosoma cruzi*; Triatominae; Chagas disease

Mini-Review

The *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909) protozoan is a parasite belonging to the order Kinetoplastida and the family Trypanosomatidae that acts as an etiologic agent of Chagas disease.¹ Also known as American trypanosomiasis, this disease is neglected² and potentially life-threatening;³ although most infected individuals are asymptomatic and do not exhibit clinical symptoms of the disease, 30 to 40% of patients develop cardiac diseases, gastrointestinal disorders, or both.⁴ The treatment available consists of benznidazole and nifurtimox, but the effectiveness of both drugs decreases as the time after infection increases; ideally, treatment is administered in the early acute phase. In

addition, these drugs cannot be used by pregnant women or patients with neurological or psychiatric disorders.³ Though there is still a considerable lack of interest among pharmaceutical companies to perform research and create programs to combat Chagas disease, this illness represents a major public health problem. It is the most prevalent parasitic disease in the Americas and makes an important contribution to morbidity and mortality rates in countries where it is endemic.⁵

It is estimated that approximately 6,000,000 to 7,000,000 people worldwide are infected with *T. cruzi*, and most cases are located in Latin America.³ However, Chagas disease has spread to non-endemic areas and has been reported in countries such as Canada, the United States, Japan, Australia, New Zealand, Switzerland, Italy, and Spain.⁶ This spread arises from the congenital transmission of the parasite or through contaminated blood transfusions. Although *T. cruzi* transmission can also occur during infected donor organ transplantation, laboratory accidents, or the ingestion of contaminated food, the main transmission pathway of this parasite is through a vector: triatomine insects^{7,8}. Triatomines have a habit of defecating while feeding on blood and, if they are infected with *T. cruzi*, the parasite is released through the feces in infectious form (trypomastigotes).⁹

Triatomines have hemimetabolous development, which includes an egg phase, five nymphal stages and, finally, the adult phase. Hematophagy occurs in all stages after hatching, and the insects usually bite at night.¹⁰ These bugs belong to the order Hemiptera, the suborder Heteroptera, the family Reduviidae, and the subfamily Triatominae. The 152 known species of triatomine bugs are divided into 18 genera and 5 tribes,^{11,12,13,14,15} all of which have the potential to act as *T. cruzi* vectors. Enhancing the knowledge on the relationship between the parasite and these vector species may aid in the creation of simple techniques for diagnosing triatomine infections, such as

xenodiagnosis. The rate of infectivity seems to vary between species of triatomine bugs, and it has been shown that, though the domestic species are of immense importance in the transmission of the parasite, it is the wild vectors which have higher levels of infectivity.¹⁶

There are seven discrete typing units (DTUs) classified based on different molecular markers¹⁷, namely TcI, TcII, TcIII, TcIV, TcV, TcVI and TcVII.^{18,19} This protozoan is known to be harmful to humans and other mammals. Though it has been argued that this species is not pathogenic for its triatomine hosts, small changes in insect fecundity can harm host fitness, as observed in a study on *Panstrongylus megistus* (Burmeister, 1835). The study found that development, mortality rates, and the time between molting periods in the infected group were similar to those of the control group; however, the number of eggs laid by infected females was 3.5 times lower, and the infected group exhibited a decrease in both the number of fertile eggs and the hatching rate.²⁰ However, knowledge on the parasite-vector relationship is still very scarce and some of the available information is poorly understood or conflicting.²¹ Though the relationship between these organisms is generally considered harmonious and although *T. cruzi* does not seem to be pathogenic to its invertebrate hosts, some studies have reported adverse effects of this infection,²¹ and this finding will be discussed in this mini-review.

Studies indicate that bacteria play a protective role against *T. cruzi* in triatomines. Intestinal microbiota composition can interfere with infection effectiveness, and a test showed that use of antibiotics made it easier for the parasite to increase its competence in the intestine of *Rhodnius prolixus* Stål, 1859.²² The success of the infection appears to depend on a balance between the microorganism and protozoan populations, since both compete for resources in the intestine; furthermore, microbiota

can indirectly increase the expression of antiparasitic molecules and induce immune response in the insect.²³ However, sequencing and analysis of the *R. prolixus* genome suggest that either the insect immune system is not affected by *T. cruzi*, or the parasite is not affected by antimicrobial peptides produced as a consequence of the infection. These findings indicate that *T. cruzi* developed avoidance or tolerance mechanisms against invertebrate host defenses.²⁴

Additionally, the dynamic control of epimastigote and trypomastigote populations is crucial for the parasite to be able to colonize the insect gut, since *T. cruzi* is exposed to different environments during its life cycle, including different digestive tracts and different invertebrate hosts.²⁵ For the parasite to adapt to different parts of the insect and for infection to be achieved, several factors and molecules are necessary. Evidence indicates that physiological molecules with antagonistic redox status assist in the proliferation and differentiation of *T. cruzi*.²⁶ Oxidant molecules such as heme stimulate the proliferation of non-infective epimastigotes,^{27,28} and antioxidant molecules such as urate promote metacyclogenesis, an event in which epimastigotes create infective and non-proliferative trypomastigote forms.²⁹ Thus, a clearer understanding of the role of these molecules in the interaction between these organisms is an important target for the development of strategies for treating Chagas disease.²⁶

In a study comparing *Triatoma infestans* (Klug, 1834) specimens infected with *T. cruzi* in the first feeding after hatching to uninfected triatomines used as control, there was no significant increase in mortality rates or any developmental delays in the insects.³⁰ Another study found that, in the same triatomine species, colonization by the parasite does not cause harmful changes to the intestinal tissue.³¹ On the other hand, numerous physiological, morphological and behavioral factors of an organism can be modified when it hosts a parasite. For example, infection by *T. cruzi* increases the

ability of *Mepraia spinolai* (Porter, 1934) hosts to detect vertebrate and decreases their time between feeding and defecation. These changes are likely to enhance parasite transmission and, consequently, reflect the epidemiological importance of this vector in Chagas disease.³²

Furthermore, Fellet et al.²¹ observed losses in reproductive performance in a study on *R. prolixus*. The parasite may reduce insect fitness and effect host survival.^{21, 33, 34} In addition, studies have found that infection by *T. cruzi* increased the mortality rate of *M. spinolai*, reduced the oviposition and hatching rate of *P. megistus* eggs, decreased reproductive fitness of *R. prolixus* under temperature conditions similar to those of the natural environment in which this species is found, and in the case of some strains, may have extended the molting period and reduced insect longevity.³³ In another study, infected *T. dimidiata* (Latreille, 1811) specimens were found to have larger wings than uninfected insects; these findings suggest a possible relationship between this difference in morphology and host dispersion potential, which could contribute to the protozoan transmission.³⁴

Thus, the effects of *T. cruzi* on triatomines vary depending on different factors, including the parasite strain, the triatomine species, and the environmental conditions involved (including temperature and nutritional status). Therefore, the adverse effects described previously and on the limited amount of research specifically focused on the interactions between triatomines and *T. cruzi* show this is an area that can be studied in greater detail.³³ Moreover, the best way to intervene in the transmission of this parasite is through its vector. Other studies, for example, have confirmed that treatment with azadirachtin decreases the total number of flagella and blocks metacyclogenesis,³⁵ and there is evidence that this tetranortriterpenoid has different effects on different triatomine species and *T. cruzi* strains.³⁶ Thus, research into the interactions between

these organisms are likely to increase in the future, and a better understanding of different species' interactions with this parasite can provide important information for the development of new approaches for the control of Chagas disease.³⁷

Because metabolic interaction between an intracellular parasite and host cell is essential for colonization to be successful,³⁸ and because the relationship between parasites and vectors results in two-way interactions that impact other members of the vectors' community, it is important to improve our knowledge and understanding of the influence of *T. cruzi* infection on triatomines.³⁹ This parasite-vector relationship is relevant and should be explored further to increase the knowledge on the consequences of infection by this parasite, which is of great importance to public health in many countries.

Acknowledgments

We appreciate the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brazil) by the granted resources.

References

1. 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.
2. Liñares GEG, Ravaschino EL, Rodriguez JB, 2006. Progresses in the field of drug design to combat tropical protozoan parasitic diseases. *Curr Med Chem* 13: 335–360.
3. World Health Organization, 2015. Chagas disease (American trypanosomiasis). *Wkly Epidemiol Rec* 90: 33–44.

4. Jr AR, Rassi A, Marin-Neto JA, 2010. Chagas disease. *Lancet* 375: 1388–1402.
5. Rodriguez JB, Falcone BN, Szajnman SH, 2016. Detection and treatment of *Trypanosoma cruzi* : a patent review (2011-2015). *Expert Opin Ther Pat* 26: 993–1015.
6. Soriano-Arandes A, Angheben A, Serre-Delcor N, Treviño-Maruri B, Gomez i Prat J, Jackson Y, 2016. Control and management of congenital Chagas disease in Europe and other non-endemic countries : current policies and practices. *Trop Med Int Heal* 21: 590–596.
7. Angheben A, Boix L, Buonfrate D, Gobbi F, Bisoffi Z, Pupella S, Gandini G, Aprili G, 2015. Chagas disease and transfusion medicine: A perspective from non-endemic countries. *Blood Transfus* 13: 540–550.
8. Howard EJ, Xiong X, Carlier Y, Sosa-Estani S, Buekens P, 2014. Frequency of the congenital transmission of *Trypanosoma cruzi*: A systematic review and meta-analysis. *BJOG An Int J Obstet Gynaecol* 121: 22–33.
9. Feder D, Gomes SAO, Freitas SC, Santos-Machado G, Santos-Mallet JR, 2014. The ultrastructural studies in parasite-vectors interactions. Méndez-Vilas A, ed. *Microscopy: advances in scientific research and education*. Australia: Formatex Research Center, 564–569.
10. Jurberg J, Galvão C, 2006. Biology, ecology, and systematics of Triatominae (Heteroptera, Reduviidae), vectors of Chagas disease, and implications for human health. *Biol Linz* 50: 1096–1116.
11. Galvão C, 2014. *Vetores Da Doença de Chagas No Brasil*. Curitiba: Sociedade Brasileira de Zoologia.
12. Alevi KCC, Reis YV, Guerra AL, Imperador CHL, Banho CA, Moreira FFF, Azeredo-Oliveira MTV, 2016. Would *Nesotriatoma bruneri* usinger, 1944 be a

- valid species?. *Zootaxa* 4103: 396–400.
13. Mendonça VJ, Alevi KCC, Pinotti H, Gurgel-Goncalves R, Pita S, Guerra AL, Panzera F, Araujo RF, Azeredo-Oliveira MTV, Da Rosa JA, 2016. Revalidation of *Triatoma bahiensis* Sherlock & Serafim, 1967 (Hemiptera: Reduviidae) and phylogeny of the *T. brasiliensis* species complex. *Zootaxa* 4107: 239–254.
 14. Souza ES, Von Atzingen NCB, Furtado MB, Oliveira J, Nascimento JD, Vendrami DP, Gardim S, Rosa JA, 2016. Description of *Rhodnius marabaensis* sp. n. (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) from Pará State, Brazil. *Zookeys* 621: 45–62.
 15. Rosa JA, Justino HHG, Nascimento JD, Mendonça VJ, Rocha CS, de Carvalho DB, Falcone R, Oliveira MTVA, Alevi KCC, de Oliveira J, 2017. A new species of *Rhodnius* from Brazil (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). *Zookeys* 675: 1–25.
 16. 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 Saude Publica* 24: 165–177.
 17. Zingales B, Miles MA, Campbell DA, Tibayrenc M, Macedo AM, Teixeira MM, Schijman AG, Llewellyn MS, Lages-Silva E, Machado CR, Andrade SG, Sturm NR, 2012. The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: rationale, epidemiological relevance and research applications. *Infect Genet Evol* 12: 240–253.
 18. Marcili A, Lima L, Cavazzana M, Junqueira AC, Veludo HH, Maia Da Silva F, Campaner M, Paiva F, Nunes VL, Teixeira MM, 2009. A new genotype of

- Trypanosoma cruzi* associated with bats evidenced by phylogenetic analyses using SSU rDNA, cytochrome b and Histone H2B genes and genotyping based on ITS1 rDNA. *Parasitology* 136: 641–655.
19. Zingales B, Andrade SG, Briones MR, Campbell DA, Chiari E, Fernandes O, Guhl F, Lages-Silva E, Macedo AM, Machado CR, Miles MA, Romanha AJ, Sturm NR, Tibayrenc M, Schijman AG, 2009. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104: 1051–1054.
 20. Lima MM, Pereira JB, Santos JAA, Pinto ZT, Braga MV, 1992. Development and reproduction of *Panstrongylus megistus* (Hemiptera: Reduviidae) infected with *Trypanosoma cruzi*, under laboratory conditions. *Ann Entomol Soc Am* 85: 458–461.
 21. Fellet MR, Lorenzo MG, Elliot SL, Carrasco D, Guarneri AA, 2014. Effects of Infection by *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* on the Reproductive Performance of the Vector *Rhodnius prolixus*. *PLoS ONE* 9: 26–32.
 22. Gumiel M, Mota FF, Rizzo VS, Sarquis O, Castro DP, Lima MM, Garcia ES, Carels N, Azambuja P, 2015. Characterization of the microbiota in the guts of *Triatoma brasiliensis* and *Triatoma pseudomaculata* infected by *Trypanosoma cruzi* in natural conditions using culture independent methods. *Parasit Vectors* 8: 1–17.
 23. Buarque DS, Gomes CM, Araújo RN, Pereira MH, Ferreira RC, Guarneri AA, Tanaka AS, 2016. A new antimicrobial protein from the anterior midgut of *Triatoma infestans* mediates *Trypanosoma cruzi* establishment by controlling the microbiota. *Biochimie* 123: 138–143.
 24. Mesquita RD, Vionette RJ, Lowenberger C, Rivera-Pomar R, Monteiro A, Minx

- P, Spieth J, Carvalho AB, Panzera F, Lawson D, Torres AQ, Jose MC, Sorgine MHF, Waterhouse RM, Michael J, Abad-Franch F, Alves-Bezerra M, Amaral LR, Araujo HM, Araujo RN, Aravind L, Atella GC, Azambuja P, Berni M, Bittencourt-Cunha PR, Braz GRC, Calderón G, Carareto CMA, Christensen MB, Igor R, Costa SG, Dansa M, Daumas CRO, De Paula IF, Dias FA, Dimopoulos G, Emrich SJ, Esponda-Behrens N, Fampa P, Fonseca RN, Fontenele M, Fronick C, Fulton LA, Gandara AC, Garcia S, Genta FA, Giraldo-Calderón GI, Gondim KC, Granzotto A, Alessandra A, Guigó R, Harry M, Hughes DST, Jablonka W, Jacquin-Joly E, Juárez MP, Koerich LB, Latorre-Estivalis JM, Lawrence GG, Lazoski C, Lazzari CR, Lopes RR, Lorenzo MG, Lugon MD, Marcet PL, Mariotti M, Megy K, Melo ACA, Missirlis F, Noriega FG, Nouzova M, Rodrigo D, Oliveira RLL, Oliveira-Silveira G, Pagola L, Paiva-Silva GO, Pascual A, Pavan MG, Pedrini N, Peixoto AA, Pereira H, Pike A, Polycarpo C, Prosdocimi F, Ribeiro-Rodrigues R, Robertson HM, Paula A, Salmon D, Santesmasses D, Schama R, Seabra-Junior ES, Silva-Cardoso L, Silva MAC, Souza-Gomes M, Sterkel M, Taracena ML, Tojo M, Tu ZJ, 2016. Genome of *Rhodnius prolixus*, an insect vector of Chagas disease, reveals unique adaptations to hematophagy and parasite infection. *Proc Natl Acad Sci* 113: 14936–14941.
25. Dias FA, Guerra B, Vieira LR, Perdomo HD, Gandara ACP, Amaral RJV, Vollú RE, Gomes SAO, Lara FA, Sorgine MHF, Medei E, de Oliveira PL, Salmon D, 2015. Monitoring of the Parasite Load in the Digestive Tract of *Rhodnius prolixus* by Combined qPCR Analysis and Imaging Techniques Provides New Insights into the Trypanosome Life Cycle. *PLoS Negl Trop Dis* 9: 1–23.
 26. Nogueira NP, Saraiva FMS, Sultano PE, Cunha PRBB, Laranja GAT, Justo GA, Sabino KCC, Coelho MGP, Rossini A, Atella GC, Paes MC, 2015. Proliferation

- and differentiation of *Trypanosoma cruzi* inside its vector have a new trigger: Redox status. *PLoS One* 10: 1–16.
27. Lara FA, Sant'anna C, Lemos D, Laranja GA, Coelho MG, Reis Salles I, Michel A, Oliveira PL, Cunha-E-Silva N, Salmon D, Paes MC, 2007. Heme requirement and intracellular trafficking in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *Biochem Biophys Res Commun* 355: 16–22.
 28. Paes MC1, Cosentino-Gomes D, de Souza CF, Nogueira NP, Meyer-Fernandes JR, 2011. The Role of Heme and Reactive Oxygen Species in Proliferation and Survival of *Trypanosoma cruzi*. *J Parasitol Res* 2011: 1–8.
 29. Schaub GA, Lösch P, 1988. *Trypanosoma cruzi*: origin of metacyclic trypomastigotes in the urine of the vector *Triatoma infestans*. *Exp Parasitol* 65: 174–186.
 30. Schaub GA, 1988. Developmental time and mortality with *Trypanosoma cruzi* of larvae of *Triatoma infestans* infected. *Trans R Soc Med Hyg* 82: 94–96.
 31. Kollien AH, Schmidt J, Schaub GA, 1998. Modes of association of *Trypanosoma cruzi* with the intestinal tract of the vector *Triatoma infestans*. *Acta Trop* 70: 127–141.
 32. Botto-Mahan C, Cattán PE, Medel R, 2006. Chagas disease parasite induces behavioural changes in the kissing bug *Mepraia spinolai*. *Acta Trop* 98: 219–223.
 33. Guarneri AA, Lorenzo MG, 2016. Triatomine physiology in the context of trypanosome infection. *J Insect Physiol*, in press, doi: 10.1016/j.jinsphys.2016.07.005.
 34. Nouvellet P, Ramirez-Sierra MJ, Dumonteil E, Gourbière S, 2011. Effects of genetic factors and infection status on wing morphology of *Triatoma dimidiata* species complex in the Yucatán peninsula, Mexico. *Infect Genet Evol* 11: 1243–

- 1249.
35. Cortez MR, Provençano A, Silva CE, Mello CB, Zimmermann LT, Schaub GA, Garcia ES, Azambuja P, Gonzalez MS, 2012. *Trypanosoma cruzi*: Effects of azadirachtin and ecdysone on the dynamic development in *Rhodnius prolixus* larvae. *Exp Parasitol* 131: 363–371.
 36. Azambuja P, Garcia ES, 1992. Effects of azadirachtin on *Rhodnius prolixus*: immunity and *Trypanosoma* interaction. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 87: 69–72.
 37. Garcia ES, Genta FA, Azambuja P, Schaub GA, 2010. Interactions between intestinal compounds of triatomines and *Trypanosoma cruzi*. *Trends Parasitol* 26: 499–505.
 38. Caradonna KL, Engel JC, Jacobi D, Lee CH, Burleigh, BA, 2013. Host metabolism regulates intracellular growth of *Trypanosoma cruzi*. *Cell Host Microbe* 13: 108–117.
 39. Gourbière S, Dorn P, Tripet F, Dumonteil E, 2012. Genetics and evolution of triatomines: from phylogeny to vector control. *Heredity* 108: 190–202.

5 CAPÍTULO II

Artigo publicado na revista internacional *The American Journal of Tropical Medicine & Hygiene* (Fator de Impacto 2,31)

OLIVEIRA, A.B.B.; RIBEIRO, A.R.; MADEIRA, F.F.; CESARETTO, N.R.; ROSA, J.A.; AZEREDO-OLIVEIRA, M.T.V.; ALEVI, K.C.C. Cytotaxonomy of *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909): Differentiation of *T. cruzi* I (TcI) and *T. cruzi* II (TcII) Genotypes Using Cytogenetic Markers. THE AMERICAN JOURNAL OF TROPICAL MEDICINE AND HYGIENE, v. 101, p. 605-607, 2019.

Cytotaxonomy of *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909): differentiation of *T. cruzi* I (TcI) and *T. cruzi* II (TcII) genotypes using cytogenetic markers

Ana Beatriz Bortolozo de Oliveira¹, Aline Rimoldi Ribeiro², Fernanda Fernandez Madeira¹, Natália Regina Cesaretto³, João Aristeu da Rosa⁴, Maria Tercília Vilela de Azeredo-Oliveira¹, Kaio Cesar Chaboli Alevi^{1,3,4*}

¹ Laboratório de Biologia Celular, Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, IBILCE/UNESP, Rua Cristóvão Colombo 2265, 15054-000, São José do Rio Preto, SP, Brasil.

² Departamento de Parasitologia, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP - Avenida Bertrand Russel, 13083-865 Campinas, SP, Brasil.

³ Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, IBB/UNESP, Rua Dr. Antônio Celso Wagner Zanin, 250, Distrito de Rubião Junior, 18618-689, Botucatu, SP, Brasil.

⁴ Laboratório de Parasitologia, Departamento de Ciências Biológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, FCFAR/UNESP, Rodovia Araraquara-Jaú km 1, 14801-902, Araraquara, SP, Brasil.

***Corresponding author:** Ana Beatriz Bortolozo de Oliveira Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, IBILCE/UNESP, Rua Cristóvão Colombo 2265, 15054-000, São José do Rio Preto, SP, Brasil. E-mail: anabbortolozo@gmail.com.

Abstract

Chagas disease is a public health problem caused by the *Trypanosoma cruzi* and the TcI and TcII groups are considered important genotypes from the clinical point of view. Currently, the groups need to be molecularly analyzed for their identification, thus we analyzed cytogenetically these groups with the objective of developing more accessible techniques for the characterization of these parasites. TcI and TcII groups were differentiated by the nucleus characterization with Lacto-acetic Orcein (TcI – nucleus with positive heteropicnosis and TcII – nucleus with negative heteropicnosis), emphasizing the importance of the application of this technique for epidemiological and clinical studies of Chagas disease.

Key words: *Trypanosoma cruzi*; cytogenetics; protozoan; Chagas disease

Short reports

Chagas disease is caused by protozoan *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909) and represents a serious public health problem¹. It is estimated that 8 million people worldwide are infected by *T. cruzi*² and about 70 million people are living in areas with contamination risk³.

Transmission of *T. cruzi* can occur, for example, through organ transplantation of an infected donor, laboratory accidents or ingestion of contaminated food or liquids (sugarcane, acai and raw meat). In addition, it is important to note that the transmission can be also congenital (vertically between mother and child) or can happen through blood transfusion. The latter two forms lead to infections in urban and non-endemic areas and are targeted by control measures in an attempt to reduce disease^{5,6}. However, despite of non-vector forms, the main mechanism of transmission of *T. cruzi* is through triatomines⁷.

There are seven discrete typing units (DTUs) for *T. cruzi*, classified based on different molecular markers⁸, namely TcI, TcII, TcIII, TcIV, TcV, TcVI and TcVII^{9,10}. TcI and TcII groups are important DTUs from the clinical point of view, since TcI is associated with chronic cases of cardiomyopathy and severe meningoencephalitis and TcII is related to chronic forms of Chagas disease that cause cardiac and digestive manifestations^{8,11,12,13}.

TcI has a wide geographic distribution in the American continent (South, Central and North America)⁸ and has been reported as the most frequently isolated of all mammalian taxa throughout the geographic range of the parasite, in a wide variety of biomes and habitats^{8,14}. TcII has a more restricted distribution [Southern Cone and North (sporadic)]⁸ that, although initially was mainly associated with human infection¹⁵, more recently has been isolated from a wide range of mammalian species in various

biomes.^{8,14,16,17} However, when compared to the number of TcI reservoirs, it has been proposed that this DTU occurs in more focal cycles.¹⁸

Methods that are currently to determine *T. cruzi* DTUs require isolation and molecularly analysis for their identification⁸, it is important to develop more accessible techniques for the identification of DTUs. Based on this priority, the present work aimed to cytogenetically analyze the TcI and TcII groups of *T. cruzi*.

As a representative of TcI group, we used the Bolivia strain, isolated from feces from specimens of *Triatoma infestans* (Klug, 1834) captured in Vitichi, Bolivia¹⁹. As a representative of TcII we used the Y strain, isolated from a human case¹⁵. The maintenance of populations of *T. cruzi* may be related to intrinsic characteristics of the parasite, such as its infection ability.²⁰ To minimize this potential confounding factor, the strains used in the study were cryopreserved at -80 degrees and then grown in LIT medium.

TcI and TcII strains were cultured in LIT medium in the epimastigote form of the parasite, and slides were prepared with 100µL of culture spread. After drying, the material was fixed with methanol. Subsequently, the slides were stained by Lacto-acetic Orcein²¹, with modifications described by Alevi et al.²² and analyzed using the Jenaval light microscope (Zeiss), coupled with a digital camera and an image analyzer system *Axio Vision LE 4.8* (Copyright ©2006-2009 Carl Zeiss Imaging Solutions Gmb H). The images were magnified by a factor of 1000.

Cytogenetic analyses allowed us to differentiate TcI and TcII groups of *T. cruzi* by characterization of the protozoan nucleus, since TcI presented as a nucleus with positive heteropicnosis (Figure 1A, arrow), while TcII showed the nucleus with negative heteropicnosis (Figure 1B, arrow).

Currently *T. cruzi* DTUs cannot be differentiated by classic analyses with Giemsa, which only allow to evaluate the presence/absence of this protozoan in biological material samples²³, and the molecular analyses are necessary for the classification of DTUs⁸. Based on current findings, the cytogenetic characterization by Orcein may help in entoepidemiological studies, allowing investigators to evaluate if the triatomines are infected by *T. cruzi* and, above all, the type of DTU that is present in these vectors. Furthermore, may help too in the clinical diagnosis of Chagas disease.

Although *T. cruzi* DTUs share a common ancestry, TcI and TcII are distant from the phylogenetic point of view.^{9,10,24} The dates of divergence date between TcI and TcII has been estimated between 88 and 37 million years ago (based on small subunit rDNA)²⁵ or between 16 and 3 million years ago (based on dihydrofolate reductase-thymidylate synthase and trypanothione reductase genes)²⁶. These estimates support the nuclear divergences observed in for the analyzed strains.

By means of the cytogenetic characterization of the parasite nucleus, the Lacto-acetic Orcein stain was shown to be an efficient technique for the differentiation of *T. cruzi* belonging to the TcI and TcII DTUs. These results may complement epidemiological studies and help in the clinical diagnosis of Chagas disease.

Acknowledgments

This work was supported by the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (Process number 2017/05015-7) and the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

References

1. Nouvellet P, Cucunubá ZM, Gourbière S, 2015. Ecology, evolution and control of Chagas Disease: a century of neglected modelling and a promising future. *Adv Parasitol* 87, 135–191.
2. World Health Organization, 2018. Chagas Disease (American Trypanosomiasis). Available at: <http://www.who.int/chagas/en/>. Accessed August 08, 2018.
3. Pan American Health Organization, 2017. Chagas in the Americas for the General Available at: https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=13566&Itemid=40721&lang=pt. Accessed August 08, 2018.
5. Angheben A, Boix L, Buonfrate D, Gobbi F, Bisoffi Z, Pupella S, Gandini G, Aprili G, 2015. Chagas disease and transfusion medicine: A perspective from non-endemic countries. *Blood Transfus* 13, 540–550.
6. Howard EJ, Xiong X, Carlier Y, Sosa-Estani S, Buekens P, 2015. Frequency of the Congenital Transmission of *Trypanosoma cruzi*: A Systematic Review and Meta-Analysis. *BJOG* 121, 22–33.
7. World Health Organization, 2017. Chagas disease (American trypanosomiasis). Available at: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>. Accessed August 08, 2018.
8. Zingales B, Miles MA, Campbell DA, Tibayrenc M, Macedo AM, Teixeira MM, Schiiman AG, Llewellyn MS, Lages-Silva E, Machado CR, Andrade SG, Sturm NR, 2012. The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: rationale, epidemiological relevance and research applications. *Inf Gen Evol* 12, 240–253.

9. Marcili A, Lima L, Cavazzana M, Junqueira AC, Veludo HH, Maia da Silva F, Campaner M, Paiva F, Nunes VL, Teixeira MM, 2009. A new genotype of *Trypanosoma cruzi* associated with bats evidenced by phylogenetic analyses using SSU rDNA, cytochrome b and histone H2B genes and genotyping based on ITS1 rDNA. *Parasitology* 136, 641–655.
10. Zingales B, Andrade SG, Briones MR, Campbell DA, Chiari E, Fernandes O, Guhl F, Lages-Silva E, Macedo AM, Machado CR, Miles MA, Romanha AJ, Sturm NR, Tibayrenc M, Schiiman AG, 2009. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104, 1051–1054.
11. Miles MA, Cedillos RA, Póvoa MM, Souza AA, Prata A, Macedo V, 1981. Do radically dissimilar *Trypanosoma cruzi* strains (zymodemes) cause Venezuelan and Brazilian forms of Chagas' disease? *Lancet* 1, 1338–1340.
12. Freitas JM, Lages-Silva E, Crème E, Pena SD, Macedo AM, 2005. Real time PCR strategy for the identification of major lineages of *Trypanosoma cruzi* directly in chronically infected human tissues. *Int J Parasitol* 35, 411–417.
13. Lages-Silva E, Ramírez LE, Pedrosa AL, Crema E, Cunha Galvão LM, Pena SD, Macedo AM, Chiari E, 2006. Variability of kinetoplast DNA gene signatures of *Trypanosoma cruzi* II strains from patients with different clinical forms of Chagas disease in Brazil. *J Clin Microbiol* 44, 2167–2171.
14. Lima VS, Xavier SC, Maldonado IF, Roque AL, Vicente AC, Jansen AM, 2014. Expanding the knowledge of the geographic distribution of *Trypanosoma cruzi* TcII and TcV/TcVI genotypes in the Brazilian Amazon. *PLoS One* 9, e116137.
15. Silva LHP, Nussenzweig V, 1953. Sobre uma cepa de *Trypanosoma cruzi* altamente virulenta para o camundongo branco. *Folia Clin Biol* 20, 191–203.

16. Pennington PM, Paiz C, Grajeda LM, Córdón-Rosales C, 2009. Concurrent detection of *Trypanosoma cruzi* lineages I and II in domestic *Triatoma dimidiata* from Guatemala. *Am J Trop Med Hyg* 80, 239–241.
17. Rocha FL, Roque AL, Arrais RC, Santos JP, Lima VS, Xavier SC, Cordeir-Estrela P, D’Andrea PS, Jansen AM, 2013. *Trypanosoma cruzi* TcI and TcII transmission among wild carnivores, small mammals and dogs in a conservation unit and surrounding areas, Brazil. *Parasitology* 140, 160–170.
18. Lisboa CV, Dietz J, Baker AJ, Russel NN, Jansen AM, 2000. *Trypanosoma cruzi* infection in *Leontopithecus rosalia* at the Reserva Biológica de Poco das Antas, Rio de Janeiro, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 95, 445–452.
19. Funayama GK, Prado Junior JC, 1974. Estudo sobre os caracteres de una amostra boliviana do *Trypanosoma cruzi* . *Rev Soc Bras Med Trop* 8, 75–81.
20. Ribeiro AR, Lima L, Almeida LA, Monteiro J, Moreno CJG, Nascimento JD, Araújo RF, Mello F, Martins LPA, Graminha MAS, Teixeira MMG, Silva MS, Steindel M, Rosa JA, 2018. Biological and molecular characterization of *Trypanosoma cruzi* strains from four states of Brazil. *Am J Trop Med Hyg* 98, 453–463.
21. De Vaio ES, Grucci B, Castagnino AM, Franca ME, Martínez ME, 1985. Meiotic differences between three triatomine species (Heteroptera, Reduviidae). *Genetica* 67, 185–191.
22. Alevi KCC, Mendonça PP, Pereira NP, Rosa JA, Azeredo-Oliveira MTV, 2012. Karyotype of *Triatoma melanocephala* Neiva and Pinto (1923). Does this species fit in the Brasiliensis subcomplex? *Infect Genet Evol* 12, 16520–1653.
23. Yasukawa K, Patel SM, Flash CA, Stager CE, Goodman JC, Woc-Colburn L, 2014. *Trypanosoma cruzi* meningoencephalitis in a patient with acquired immunodeficiency syndrome. *Am J Trop Med Hyg* 91, 84–85.

24. Tomasini N, Diosque P, 2015. Evolution of: clarifying hybridisations, mitochondrial introgressions and phylogenetic relationships between major lineages. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 110, 403–413.
25. Kawashita SY, Sanson GFO, Fernandes O, Zingales B, Briones MRS, 2001. Maximum-likelihood divergence date estimates based on rRNA gene sequences suggest two scenarios of *Trypanosoma cruzi* intraspecific evolution. *Mol Biol Evol* 18, 2250–2259.
26. Machado CA, Ayala FJ, 2002. Sequence variation in the dihydrofolate reductasethymidylate synthase (DHFR-TS) and trypanothione reductase (TR) genes of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol* 121, 33–47.

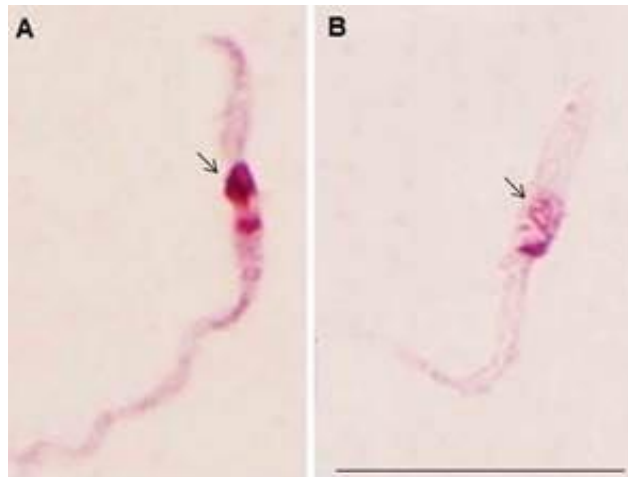


Figure 1: TcI (A) and TcII (B) groups of *T. cruzi* in epimastigote form stained with orcein. Note the difference in the protozoa nuclei: TcI presented the nucleus with positive heteropiconosis (A, arrow) e TcII presented the nucleus with negative heteropiconosis (B, arrow). Bar: 10 μ m.

6 CAPÍTULO III

Artigo publicado na revista internacional *Parasitology Research* (Fator de Impacto 2,06)

Running title: **Parasite x Chagas disease vectors relationship**

Parasite x Chagas disease vectors relationship: does *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909) infection affects the spermatogenesis of *Triatoma infestans* (Klug, 1834)?

Ana Beatriz Bortolozo de Oliveira^{1*}, Kaio Cesar Chaboli Alevi², Bianca Barbério Bogdan Tedeschi¹, Jader de Oliveira², Fernanda Fernandez Madeira¹, Luiz Roberto Falleiros Junior³, Fernando César Silva Junior⁴, João Aristeu da Rosa² and Maria Tercília Vilela de Azeredo-Oliveira¹

¹ Laboratório de Biologia Celular, Departamento de Biologia, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, Rua Cristóvão Colombo 2265, 15054-000, São José do Rio Preto, SP, Brasil.

² Laboratório de Parasitologia, Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Rodovia Araraquara-Jaú km 1, 14801-902, Araraquara, SP, Brasil.

³ Laboratório Multiusuário de Microscopia e Microanálise, Departamento de Biologia, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, Rua Cristóvão Colombo 2265, 15054-000, São José do Rio Preto, SP, Brasil.

⁴ Laboratório de Citogenética e Molecular de Insetos, Departamento de Biologia, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Rua Cristóvão Colombo 2265, 15054-000, São José do Rio Preto, SP, Brasil.

***Corresponding author:** Kaio Cesar Chaboli Alevi, Laboratório de Parasitologia, Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Rodovia Araraquara-Jaú km 1, 14801-902, Araraquara, SP, Brasil. E-mail: kaiochaboli@hotmail.com
Telephone number: +55 (17) 991026770.

Abstract

The parasite-vector interaction of Chagas disease is still poorly understood and the knowledge about this relationship can help in the development of new strategies to control of *Trypanosoma cruzi* transmission, which is the etiological agent of this disease. Considering the need to know if *T. cruzi* can cause some pathology in the reproductive system of the Chagas disease vectors, we investigated the spermatogenesis of *Triatoma infestans* infected by *T. cruzi* through histological and cytogenetic analysis. *T. cruzi* infection was not pathogenic for the reproductive aspects of *T. infestans*, because all the analyzed males had normal spermatogenesis, with all phases (spermatocytogenesis, meiosis and spermiogenesis) happening without any change. Thus, we demonstrated that the presence of *T. cruzi* does not have influence in the spermatogenesis of *T. infestans* and we suggest that the influence on reproductive aspects observed for other species were resulting of the action of the parasite on gametogenesis of females.

Key words: reproduction; triatomines; Chagas disease; vector-parasite relationship

Short communication

The triatomines (Hemiptera, Triatominae) are hematophagous insects of great importance for public health, because they are vectors of Chagas disease (WHO 2019). This neglected disease caused by the protozoan *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909) (Kinetoplastida, Trypanosomatidae) affects about eight million people worldwide, being the vector control considered the main way to minimize the incidence of new infections (WHO 2019).

The parasite-vector interaction is still underexplored and the understanding of this relationship is considered an important tool for discovering new approaches to *T. cruzi* transmission (Oliveira 2018). Among the few studies that analyze the parasite x Chagas disease vectors relationship, there is no consensus, because some authors show that *T. cruzi* influences the physiological, morphological and behavioral factors of triatomines (Lima et al. 1992; Botto-Mahan et al. 2006; Nouvellet et al. 2011; Fellet et al. 2014), while others do not observe any recurrent pathology of infection (Schaub 1988; Kollien et al. 1998).

From the reproductive point of view, the studies are also extremely limited: Lima et al. (1992) observed small changes in the fecundity of females of *Panstrongylus megistus* (Burmeister, 1835), because the authors reported that the number of eggs placed by infected females was 3.5 times smaller and the infected group exhibited a decrease in the number of fertile eggs and in the rate of hatching; and Fellet et al. (2014) observed losses in reproductive performance (pre-oviposition time, reproductive cycles and fertility) of *Rhodnius prolixus* (Stål, 1859) infected with *T. cruzi* and submitted to different temperatures.

Triatoma infestans (Klug, 1834) is one of the most important species of global importance in the transmission of Chagas disease (Galvão 2014), since it has a wide

geographical distribution (Argentina, Bolivia, Brazil, Chile, Ecuador, Mexico, Paraguay, Peru and Uruguay) (Galvão et al. 2003) and, mainly, is adapted to live in domiciliary regions (Galvão 2014). Considering the epidemiological importance of this species and, especially, the need to know if *T. cruzi* can cause some pathology in the reproductive system of these insects, we analyzed the spermatogenesis of *T. infestans* infected by *T. cruzi*.

Ten adults male of *T. infestans* were infected with *T. cruzi* Bolivia strain (TcI group) isolated from feces of *T. infestans* from Vitichi (Funayama and Prado Junior 1974). The infection occurred during the insects blood repast performed in contaminated rats. After confirmation of *T. cruzi* infection, the testicles were dissected, the seminiferous tubules were separated and fixed 24h by immersion with 3% glutaraldehyde plus 0.25% tannic acid solution in Millonig's buffer (pH 7.3) containing 0.54% glucose for the histological study or fixed in methanol: acetic acid (3:1) for the cytogenetic study. The seminiferous tubules used in the histological analysis were washed with Millonig's buffer, post-fixed with 1% osmium tetroxide in the same buffer for 2h, washed again, dehydrated in a graded acetone series and embedded in Araldite resin. Semi-thin sections were cut to 0.5 mm thick, and, after this procedure, 1% toluidine blue was used to stain the material (Alevi et al. 2015). The biological material used in the cytogenetic analysis was torn and slides were assembled by cellular crushing and stained with Lacto-acetic orcein (De Vaio et al. 1985; Alevi et al. 2012). The analysis and image capture were performed using a Jenaval light microscope (Zeiss) with an Axio Vision LE 4.8 image analyzer.

T. cruzi infection was not pathogenic for the reproductive aspects of *T. infestans*, because all the analyzed males had normal spermatogenesis (Figures 1-3), with all phases happening without any change: spermatocytogenesis, represented by

spermatogonia (Figures 1B and 2A), meiosis (Figures 1C and 2B-F) and spermiogenesis (Figures 1C and 3A-E).

Spermatogenesis of triatomines is a phenomenon well known (De Vaio et al. 1985; Alevi et al. 2012; Alevi et al. 2014; Alevi et al. 2015; Madeira et al. 2016; Reis et al. 2016). However, the influence of *T. cruzi* in the reproductive physiology of these vectors had never been analyzed, since all the studies that analyzed the influence of the parasite in the reproductive aspects of triatomines focused mainly on fertility, fecundity, oviposition rate and hatching rate (Lima et al. 1992; Fellet et al. 2014). Unlike the authors who observed the influence of the infection on the reproductive aspects of *R. prolixus* and *P. megistus*, our results demonstrated that the presence of the parasite does not affect the spermatogenesis of triatomines, which leads us to suggest that *T. cruzi* can influence in a different way in the gametogenesis of males and females, being the alterations reported by Lima et al. (1992) and Fellet et al. (2014) due to the influence of the parasite in the females.

Fellet et al. (2014) analyzed the influence of *T. rangeli* (Tejera, 1920) (Kinetoplastida, Trypanosomatidae) on the reproductive aspects of *R. prolixus* and suggested that this parasite decreases the amount of lipids associated with lipoforins [lipoprotein responsible for transporting the lipids from the fatty body to the ovaries, allowing its incorporation by the oocytes] (Gondim et al. 1989) of the hemolymph of triatomines [because trypanosomes do not have the complete synthetic pathways for some fundamental lipids] (Coppens and Courtoy 1995; Coppens et al. 1995) directly affecting oogenesis. Although *T. cruzi* cannot develop itself in the hemolymph of triatomines (Alvarenga and Bronfen 1982), being found only in the digestive tract of these insects (Fellet et al. 2014), Fellet et al. (2014) also suggest that large populations

of *T. rangeli* found in the intestine could also decrease the nutritional resources of the insects and directly affect their fecundity and fertility.

Insects possess mechanisms to control reproductive effort in response to environmental and physiological conditions such as food supply and mating status: reproduction regulators, such as antgonadotropins, neuropeptides, ecdysteroides and juvenile hormone, for example, control different aspects of insect's vitellogenesis and oogenesis (Hurd 2001). Although few studies have been done about the effect of infection by parasites on these regulators, Webb and Hurd (1999) demonstrated that females of *Tenebrio molitor* (Linnaeus, 1758) (Coleoptera: Tenebrionidae) infected with *Hymenolepis nana* (Siebold, 1852) (Cestoda: Hymenolepididae) produced a circulating antgonadotrophin that reduced the ovarian protein content.

Thus, we demonstrated that the presence of *T. cruzi* does not influence in the spermatogenesis of *T. infestans* and although further studies must be carried out, we suggest that the influence on reproductive aspects observed for *R. prolixus* (Fellet et al. 2014) and *P. megistus* (Lima et al. 1992) were resulting from the action of the parasite on gametogenesis of females.

Acknowledgments

This work was supported by the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) and the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Compliance with ethical standards

Conflict of interest

The authors declare that there is no conflict of interest.

References

Alevi KCC, Castro NFC, Oliveira J, Rosa JA, Azeredo-Oliveira MTV (2015) Cystic spermatogenesis in three species of the *prolixus* complex (Hemiptera: Triatominae). Ital J Zool 82: 1–7. [https:// doi.org/10.1080/11250003.2015.1020347](https://doi.org/10.1080/11250003.2015.1020347)

Alevi KCC, Mendonça PP, Pereira NP, Rosa JA, Azeredo-Oliveira MTV (2012) Karyotype of *Triatoma melanocephala* Neiva and Pinto (1923). Does this species fit in the Brasiliensis subcomplex?. Inf Gen Evol 12: 1652–1653. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2012.06.011>

Alevi KCC, Rosa JA, Azeredo-Oliveira MTV (2014) Spermatogenesis in *Triatoma melanica* Neiva and Lent, 1941 (Hemiptera, Triatominae). J Vec Ecol 39: 231–233. <https://doi.org/10.1111/j.1948-7134.2014.12094.x>

Alvarenga NJ, Bronfen E (1982) Incapacity of the evolution of *Trypanosoma cruzi* in the hemocele of triatomids. Mem Inst Oswaldo Cruz 77: 431–436. <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02761982000400010>

Botto-Mahan C, Cattán PE, Medel R (2006) Chagas disease parasite induces behavioural changes in the kissing bug *Mepraia spinolai*. Acta Trop 98: 219–223. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2006.05.005>

Coppens I, Courtoy PJ (1995) Exogenous and endogenous sources of sterols in the culture-adapted procyclic trypomastigotes of *Trypanosoma brucei*. Mol Biochem Parasitol 73: 179–188. [https://doi.org/10.1016/0166-6851\(95\)00114-G](https://doi.org/10.1016/0166-6851(95)00114-G)

Coppens I, Levade T, Courtoy PJ (1995) Host plasma low density lipoprotein particles as an essential source of lipids for the bloodstream forms of *Trypanosoma brucei*. *J Biol Chem* 270: 5736–5741. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.11.5736>

De Vaio ES, Grucci B, Castagnino AM, Franca ME, Martinez ME (1985) Meiotic differences between three triatomine species (Hemiptera:Reduviidae). *Genetica* 67: 185–191. <https://doi.org/10.1007/BF02424489>

Fellet MR, Lorenzo MG, Elliot SL, Carrasco D, Guarneri AA (2014) Effects of infection by *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* on the reproductive performance of the vector *Rhodnius prolixus*. *PLoS One* 9: 26–32. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0105255>

Funayama GK, Prado Junior JC (1974) Estudo sobre os caracteres de uma amostra boliviana do *Trypanosoma cruzi*. *Rev Soc Bras Med Trop* 8: 75–81. <http://dx.doi.org/10.1590/S0037-86821974000200002>

Galvão C (2014) Vetores da Doença de Chagas no Brasil. Sociedade Brasileira de Zoologia, Curitiba, Brazil.

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. <http://dx.doi.org/10.11646/zootaxa.202.1.1>

Gondim KC, Oliveira PL, Masuda H (1989) Lipophorin and oogenesis in *Rhodnius prolixus*: Transfer of phospholipids. J Insect Physiol 35: 19–27.
[https://doi.org/10.1016/0022-1910\(89\)90032-2](https://doi.org/10.1016/0022-1910(89)90032-2)

Hurd H (2001) Host fecundity reduction: a strategy for damage limitation?. Trends Parasitol 17: 363–368. [https://doi.org/10.1016/S1471-4922\(01\)01927-4](https://doi.org/10.1016/S1471-4922(01)01927-4)

Kollien AH, Schmidt J, Schaub GA (1998) Modes of association of *Trypanosoma cruzi* with the intestinal tract of the vector *Triatoma infestans*. Acta Trop 70: 127–141.
[https://doi.org/10.1016/S0001-706X\(97\)00117-4](https://doi.org/10.1016/S0001-706X(97)00117-4)

Lima MM, Pereira JB, Santos JAA, Pinto ZT, Braga MV (1992) Development and reproduction of *Panstrongylus megistus* (Hemiptera: Reduviidae) infected with *Trypanosoma cruzi*, under laboratory conditions. Ann Entomol Soc Am 85: 458–461.
<https://doi.org/10.1093/aesa/85.4.458>

Madeira FF, Borsatto KC, Lima ACC, Ravazi A, Oliveira J, Rosa JA, Azeredo-Oliveira MTV, Alevi KCC (2016) Nucleolar Persistence: Peculiar Characteristic of Spermatogenesis of the Vectors of Chagas Disease (Hemiptera, Triatominae). Am J Trop Med Hyg 95: 1118–1120. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.16-0149>

Nouvellet P, Ramirez-Sierra MJ, Dumonteil E, Gourbiere S (2011) Effects of genetic factors and infection status on wing morphology of *Triatoma dimidiata* species complex in the Yucatán peninsula, Mexico. Infect Genet Evol 11: 1243–1249.
<https://doi.org/10.1016/j.meegid.2011.04.008>

Oliveira ABB, Alevi KCC, Imperador CHL, Madeira FF, Azeredo-Oliveira MTV (2018) Parasite-Vector Interaction of Chagas Disease: A Mini-Review. Am J Trop Med Hyg 98: 653–655. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.17-0657>

Reis YV, Alevi KCC, Moreira FF, Azeredo-Oliveira MTV (2016) Spermatogenesis in *Nesotriatoma bruneri* (Usinger 1944) (Hemiptera, Triatominae). Gen Mol Res 15: 1–5. <https://doi.org/10.4238/gmr.15038286>

Schaub GA (1988) Developmental time and mortality of larvae of *Triatoma infestans* infected with *Trypanosoma cruzi*. Trans R Soc Med Hyg 82: 94–96. [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(88\)90273-8](https://doi.org/10.1016/0035-9203(88)90273-8)

Webb TJ, Hurd H (1999) Direct manipulation of insect reproduction by agents of parasite origin. Proc Biol Sci 266: 1537–1541. <https://doi.org/10.1098/rspb.1999.0812>

WHO (World Health Organization) (2019) Chagas disease (American trypanosomiasis). [http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis)). Accessed 10 June 2019

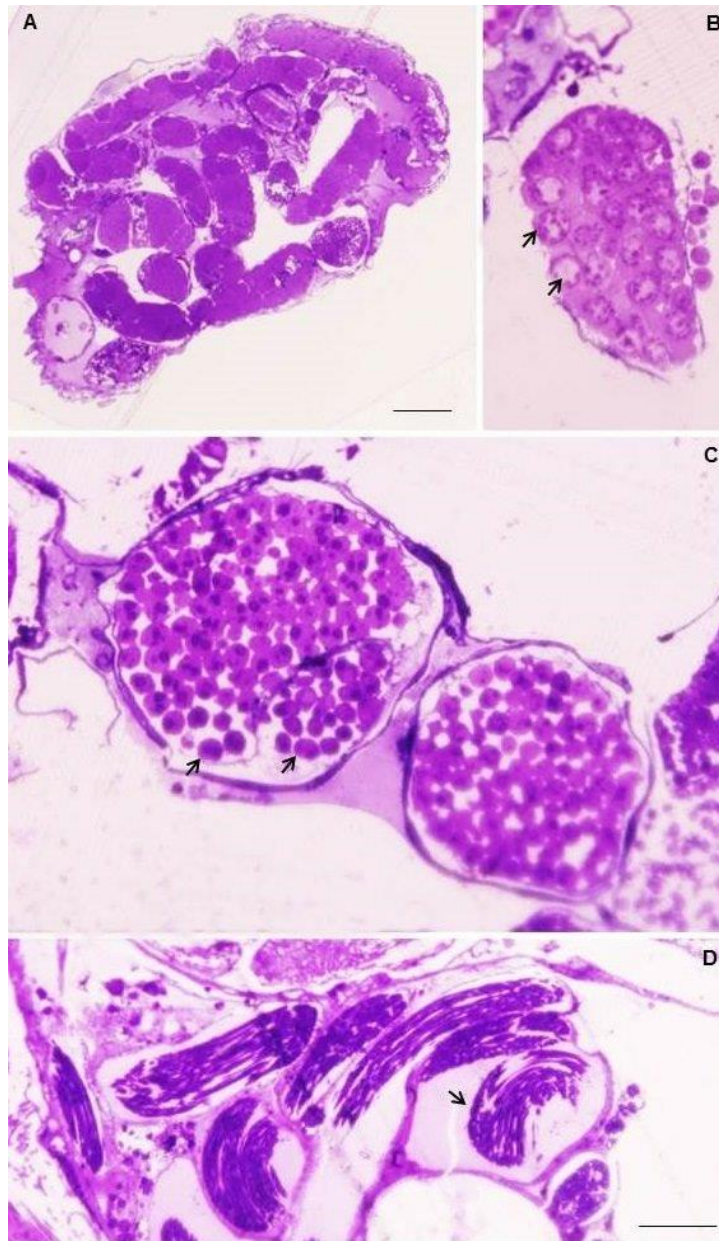


Figure 1. Spermatogenesis of *T. infestans* infected with *T. cruzi*. **a** transverse section of the testicular follicle, **b** Proliferation phase. Note the spermatogonia (arrows), **c** Meiosis. Note the spermatocytes (arrows), **d** Differentiation stage. Note the spermatids (arrow). Bar: 10 μ m.

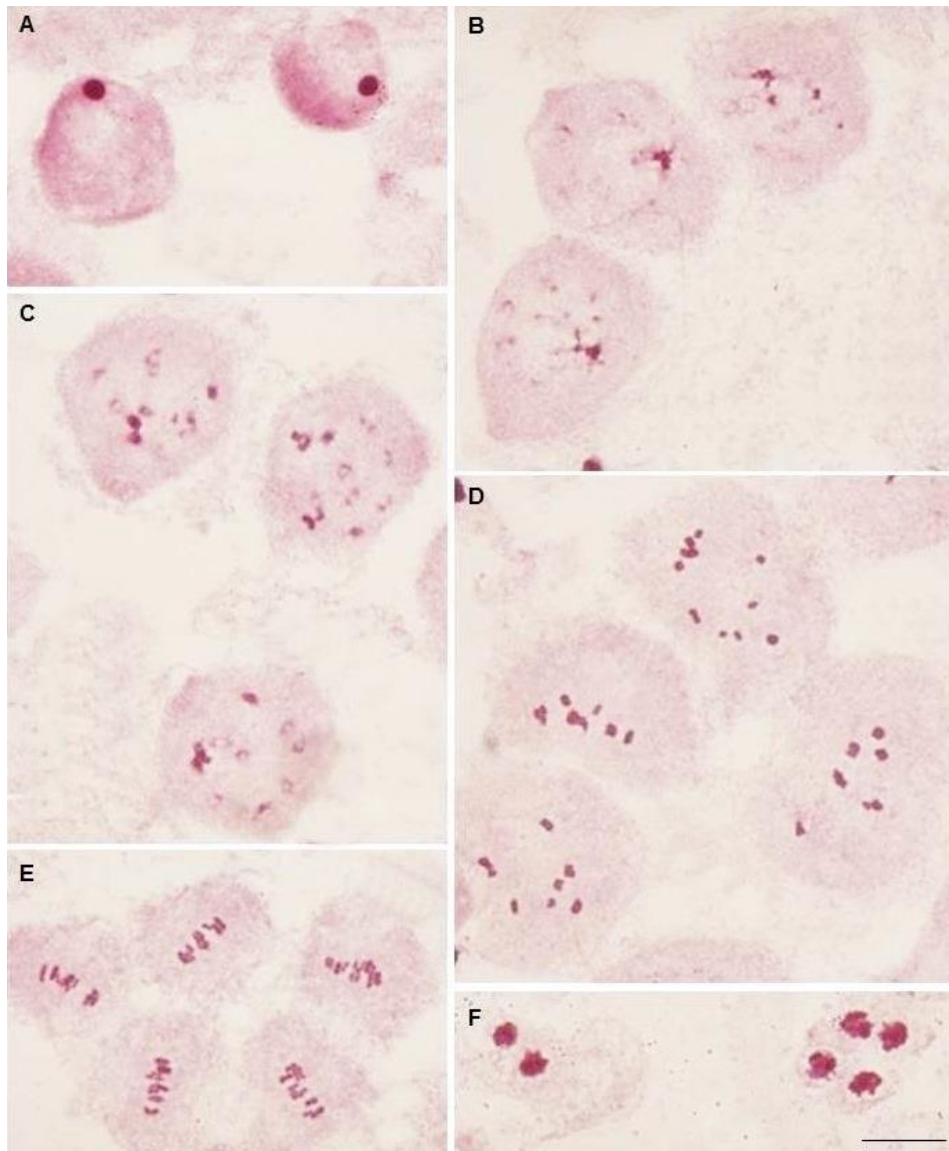


Figure 2. Spermatogenesis of *T. infestans* infected with *T. cruzi*. **a** spermatogonia, **b** initial diffuse stage of the prophase, **c** intermediate diffuse Stage of the prophase, **d** final diffuse stage of the prophase, **e** metaphase, **f** anaphase and telophase. Bar: 10 μm .

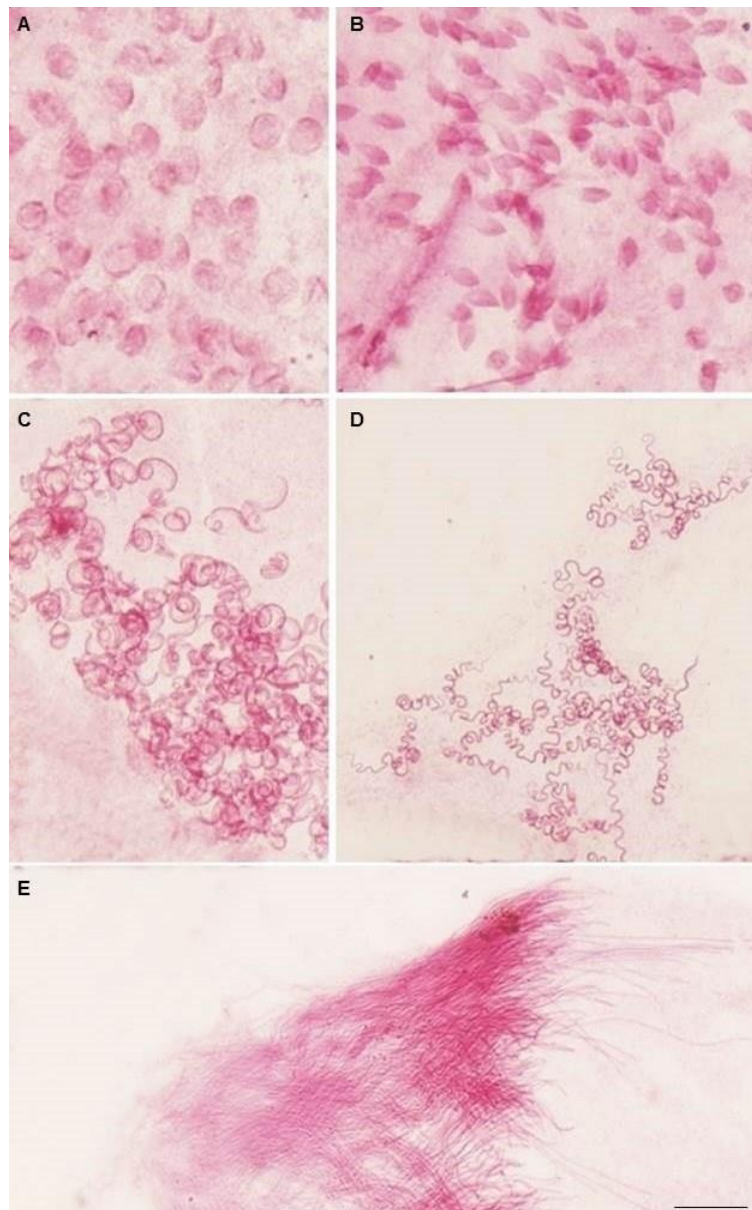


Figure 3. Spermiogenesis of *T. infestans* infected with *T. cruzi*. **a** initial spermatid, **b-d**: spermatids elongating, **e** sperm. Bar: 10 μ m.

7 CAPÍTULO IV

Artigo em fase de submissão para publicação em revista internacional.

Running title: *Trypanosoma cruzi* x triatomines relationship

***Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909) x triatomines relationship: Is the infection by the etiologic agent of Chagas' disease capable of altering the nuclear morphology and composition of Malpighian tubule cells of *Triatoma infestans* (Klug, 1834)?**

Ana Beatriz Bortolozo de Oliveira^a, Kaio Cesar Chaboli Alevi^{b*}, Fernanda Fernandez Madeira^a, Jader de Oliveira^b, João Aristeu da Rosa^b, Maria Tercília Vilela de Azeredo-Oliveira^a

^a Laboratório de Biologia Celular, Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, IBILCE/UNESP, Rua Cristóvão Colombo 2265, 15054-000, São José do Rio Preto, SP, Brasil.

^b Laboratório de Parasitologia, Departamento de Ciências Biológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, FCFAR/UNESP, Rodovia Araraquara-Jaú km 1, 14801-902, Araraquara, SP, Brasil.

***Corresponding author:** Kaio Cesar Chaboli Alevi, FCFAR/UNESP, Rodovia Araraquara-Jaú km 1, 14801-902, Araraquara, SP, Brasil. Telephone: (17) 99102-6770. E-mail: kaiochaboli@hotmail.com.

Abstract

Triatomines are insects of great importance for public health, once all species are able to transmit *Trypanosoma cruzi*, the etiologic agent of Chagas disease. *Triatoma infestans* is one of the main vector species, because presents wide geographical distribution and is adapted to the household environment. The relationship between triatomines and *T. cruzi* is poorly understood, being the increase of this knowledge a potent tool for the discovery of new approaches concerning this protozoan. Considering the necessity to deepen the understanding of the *T. cruzi* × triatomine relationship, we evaluated cytogenetically the morphology and nucleus composition of Malpighian tubules cells of *T. infestans* infected with *T. cruzi* from TcI group (Bolivia strain). Cytogenetic analyzes with Lacto-Acetic Orcein and Acridine Orange showed the presence of *T. cruzi* in the Malpighian tubule cells of *T. infestans* did not result in changes in morphology and metabolism of these cells, demonstrating that the parasite presence does not cause damage to the analyzed excretory organ.

Key words: cytogenetics; vector-parasite relationship; Chagas disease vectors

Short Communication

Introduction

Triatomines (Hemiptera, Triatominae) are insects of great importance for public health, once they act as vectors of protozoan *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909) (Kinetoplastida, Trypanosomatidae), the etiologic agent of Chagas disease (WHO, 2019). This disease affects around eight million people worldwide, causing approximately 10,000 deaths per year (WHO, 2019).

All species of triatomines are able to transmit *T. cruzi*, with emphasis for *Triatoma infestans* Klug, 1834, *Rhodnius prolixus* Stål, 1859, *T. dimidiata* (Latreille, 1811), *Panstrongylus megistus* (Burmeister, 1835) and *T. brasiliensis* Neiva, 1911, that have a worldwide importance for the disease transmission (Galvão, 2014). *T. infestans* relevance is based mainly on the wide geographical distribution and its adaptation to the household environment (Galvão, 2014).

Currently, there are seven discrete typing units (DTUs) of *T. cruzi* recognized, which are related to different phenotypic manifestations, being the TcI group very important from the clinical point of view because it is associated with chronic cases of cardiomyopathy and severe meningoencephalitis (Marcili et al., 2009; Zingales et al., 2009, 2012).

The relationship between triatomines and *T. cruzi* is poorly understood, being the increase of this knowledge a potent tool for the discovery of new approaches concerning this protozoan (Oliveira et al., 2018), since vectors are commonly explored by parasites (Elliot et al., 2015) and the interaction between them has an impact on the other members of the communities that they belong (Gourbière et al., 2012).

In this context, although Oliveira et al. (2018) has already highlighted the importance of analysis of the effects by *T. cruzi* infection on the digestive system organs of triatomines, the parasite is also found in the excretory organs of these insects (Dias, 1930), which makes relevant to evaluate the influence of *T. cruzi* presence in the Malpighian tubules of these vectors.

Considering the necessity to deepen the understanding of the *T. cruzi* × triatomine relationship, we evaluated cytogenetically the morphology and nucleus composition of Malpighian tubules cells of *T. infestans* infected with *T. cruzi* from TcI group.

Materials and methods

Ten adult males of *T. infestans* were infected with *T. cruzi* through hematophagy in rats contaminated with the Bolivia strain (belonging to TcI group). Posteriorly, feces from these triatomines were collected by abdominal pressure to confirm the infection success by light microscope. The contaminated insects were dissected to remove the Malpighian tubules located in the hemocele and the biological material was fixed in flasks containing methanol and acetic acid (3: 1).

Slides were prepared by cellular smashing (Alevi et al., 2012), stained with the cytogenetic technique of Lacto-Acetic Orcein (De Vaio et al., 1985, with modifications according to Alevi et al., 2012) (to evaluate the nucleus morphology) and Acridine Orange (Vidal, 1987) (to evaluate the cell metabolism, through the DNA and RNA composition in the nucleus of Malpighian tubule cells) and analyzed under a Zeiss Jena light microscope with an Axiovision Rel 4.8 image analyzer and Olympus BX-FLA fluorescence microscope, respectively.

Results and Discussion

Cytogenetic analyzes showed the presence of *T. cruzi* (Figure 1A) in the Malpighian tubule cells of *T. infestans* did not result in changes in morphology (Figure 1B) and metabolism (Figures 1C and 1D) of these cells.

Garcia et al. (2011) analyzed the prevalence and intensity of infection with Y strain of *T. cruzi* (TcII group) as well as the incidence of metacyclogenesis and the nuclear phenotypes frequency in Malpighian tubules of *P. megistus*. However, unlike what was observed for *T. infestans*, the authors reported changes in the nuclear phenotypes of Malpighi tubule cells of *P. megistus* infected. It is known the infection effects may vary according to the parasite strains and the vector species and environmental conditions (Guarneri; Lorenzo, 2017).

In addition to parasite infection, Garcia et al. (2011) subjected infected and uninfected triatomines to heat shock and observed a significant increase in heterochromatin decondensation in the nucleus of the Malpighian tubule cells for both conditions. Considering that heat shock leads to chromatin decondensation in these blood-sucking insects (Casseb-Hassan; Azeredo-Oliveira, 2001), the absence of changes in the nucleus morphology and metabolism of *T. infestans* infected suggests that the phenotypic changes described by Garcia et al. (2011) were allowed only by heat shock and were not caused by *T. cruzi* infection.

Conclusion

Based on the exposed above, cytogenetic characterization revealed that infection by the Bolivia strain of *T. cruzi* did not influence the nuclear morphology and metabolism in Malpighian tubule cells of *T. infestans*, demonstrating that the parasite presence does not cause damage to the analyzed organ.

Acknowledgments

This work was financed by the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (Process number 2019/01197-9), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001.

Ethical standards

The experiments comply with the current laws of the country in which they were performed.

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

References

- Alevi KCC, Mendonça PP, Succi M, Pereira NP, Rosa JA, Azeredo-Oliveira MTV, (2012) Karyotype of *Triatoma melanocephala* Neiva and Pinto (1923) Does this species fit in the Brasiliensis subcomplex?. Infect Genet Evol 12: 1652–1653.
- Casseb-Hassan PM, Azeredo-Oliveira MTV (2001) Nucleolar Changes in Hematophagous Insect Submitted to Temperature Shock. Cytologia 66: 279–285.
- De Vaio ES, Grucci B, Castagnino AM, Franca ME, Martinez ME (1985) Meiotic differences between three triatomine species (Hemiptera: Reduviidae). Genetica 67: 185-191.
- Dias E (1930) Da presença de formas de evolução do *Trypanosoma cruzi* Chagas, nos tubos de Malpighi do barbeiro. Mem Inst Oswaldo Cruz 24: 183–188.

Elliot SL, Rodrigues JO, Lorenzo MG, Martins-Filho OA, Guarneri AA (2015) *Trypanosoma cruzi*, Etiological Agent of Chagas Disease, Is Virulent to Its Triatomine Vector *Rhodnius prolixus* in a Temperature-Dependent Manner. PLoS Negl Trop Dis 9: 1–14.

Galvão C (2014) *Vetores Da Doença de Chagas No Brasil*. Curitiba, PR: Sociedade Brasileira de Zoologia.

Garcia SL, Rodrigues, VLCC, Garcia, NL, Mello MLS (2011) Prevalence and intensity of infection, metacyclogenesis and nuclear phenotypes in *Panstrongylus megistus* (Burmeister, 1835) after ingestion of *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909) II and subjection to heat shock. Braz J Biol 71: 491–500.

Gourbière S, Dorn P, Tripet F, Dumonteil E (2012) Genetics and evolution of triatomines: from phylogeny to vector control. Heredity 108: 190–202.

Guarneri AA, Lorenzo MG (2017) Triatomine physiology in the context of trypanosome infection. J Insect Physiol 97: 66–76.

Marcili A, Lima L, Cavazzana M, Junqueira AC, Veludo HH, Maia Da Silva F, Campaner M, Paiva F, Nunes VL, Teixeira MM (2009) A new genotype of *Trypanosoma cruzi* associated with bats evidenced by phylogenetic analyses using SSU rDNA, cytochrome b and histone H2B genes and genotyping based on ITS1 rDNA. Parasitology 136: 641–655.

Oliveira ABB, Alevi KCC, Imperador CHL, Madeira FF, Azeredo-Oliveira, MTV (2018) Parasite-Vector Interaction of Chagas Disease: A Mini-Review. Am J Trop Med Hyg 98: 653–655.

Vidal BC (1987) *Métodos em Biologia Celular*. In: *Biologia Celular* (Vidal, B. C. e Mello, M. L. S., eds.). Rio de Janeiro, RJ: Edições Atheneu.

WHO (World Health Organization), 2019. Chagas disease (American trypanosomiasis). World Health Organization. <https://www.who.int/chagas/disease/en/> (accessed 10 December 2019).

Zingales B, Andrade SG, Briones MR, Campbell DA, Chiari E, Fernandes O, Guhl F, Lages-Silva E, Macedo AM, Machado CR, Miles MA, Romanha AJ, Sturm NR, Tibayrenc M, Schijman AG (2009) A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. Mem Inst Oswaldo Cruz 104: 1051–1054.

Zingales B, Miles MA, Campbell DA, Tibayrenc M, Macedo AM, Teixeira MM, Schijman AG, Llewellyn MS, Lages-Silva E, Machado CR, Andrade SG, Sturm NR (2012) The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: rationale, epidemiological relevance and research applications. Infect Genet Evol 12: 240–253.

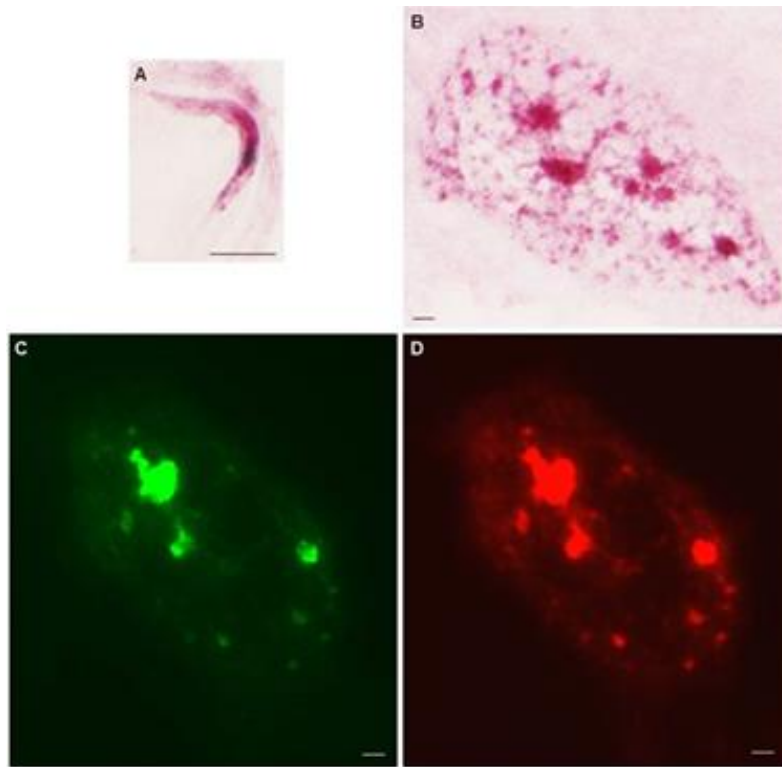


Figure 1. Malpighian tubules of *T. infestans* infected with *T. cruzi*. **A:** *T. cruzi* found between the tubule cells, **B-D:** nuclear morphology and normal metabolism observed, respectively, by staining with lacto-acetic Orcein (**B**) and Acridine orange (**C and D**). Bar: 10 μm .

8 CONCLUSÕES

a) A caracterização citogenética do núcleo de *T. cruzi* (cepas Bolívia e Y) permite diferenciar os grupos TcI e TcII, por meio do grau de heteropicnose (TcI com heteropicnose positiva e TcII com heteropicnose negativa), evidenciando a importância dessa técnica clássica como um método alternativo para auxiliar os estudos entoepidemiológicos e no diagnóstico clínico da doença de Chagas;

b) A presença de *T. cruzi* (cepa Bolívia) não afeta a espermatogênese de *T. infestans*, sugerindo que o parasito possa atuar de maneira diferente sobre a gametogênese de machos e fêmeas, de forma que as alterações dos aspectos reprodutivos sinalizadas em outros estudos sejam resultado da influência do protozoário sobre a gametogênese das fêmeas.

c) A infecção por *T. cruzi* (cepa Bolívia) não acarreta em alterações na morfologia nuclear e no metabolismo das células dos túbulos de Malpighi de *T. infestans*, indicando que, embora possa ser constatada a presença do parasito nos órgãos excretores dos triatomíneos, a infecção não resulta em prejuízos a nível celular.

REFERÊNCIAS

ANGHEBEN, A. et al. Chagas disease and transfusion medicine: A perspective from non-endemic countries. **Blood Transfusion**, v. 13, n. 4, p. 540–550, 2015.

BERMUDEZ, J. et al. Current drug therapy and pharmaceutical challenges for Chagas disease. **Acta Tropica**, v. 156, p. 1–16, 2016.

BERN, C. Chagas' Disease. **New England Journal of Medicine**, v. 373, n. 5, p. 456–466, 2015.

BOTTO-MAHAN, C.; CATTAN, P. E.; MEDEL, R. Chagas disease parasite induces behavioural changes in the kissing bug *Mepraia spinolai*. **Acta Tropica**, v. 98, n. 3, p. 219–223, 2006.

CALCUTÁ, M. T. “Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar, mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”. **Projetando Pessoas**, 03 de Janeiro de 2017. Disponível em: <<https://projetandopessoas.com.br/gota-dagua-no-oceano/>>. Acesso em: 23 de Fevereiro de 2020.

CARREA, A.; DIAMBRA, L. Systems Biology Approach to Model the Life Cycle of *Trypanosoma cruzi*. **PLoS One**, v. 11, n. 1, p. 1–20, 2016.

COURA, J. R.; BORGES-PEREIRA, J. Chagas disease: 100 years after its discovery. A systemic review. **Acta Tropica**, v. 115, n. 1-2, p. 5–13, 2010.

COURA, J. R.; VIÑAS, P. A.; JUNQUEIRA, A. C. V. Ecoepidemiology, short history and control of Chagas disease in the endemic countries and the new challenge for nonendemic countries. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 109, n. 7, p. 856–862, 2014.

DIAS, E. Da presença de formas de evolução do *Trypanosoma cruzi* Chagas, nos tubos de Malpighi do barbeiro. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 24, n. 3, p. 183–188, 1930.

DIAS, E.; LARANJA, F. S.; NOBREGA, G. Doença de Chagas. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 42, n. 3, p. 495–581, 1945.

DORN, P. L.; JUST, S. A.; DALE, C.; STEVENS, L.; GALVÃO, C.; CORDON, R. L.; MONROY, C. Description of *Triatoma mopan* sp. n. (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) from a cave in Belize. **Zookeys**, v. 775, p. 69-95, 2018.

ELLIOT, S. L. et al. *Trypanosoma cruzi*, Etiological Agent of Chagas Disease, Is Virulent to Its Triatomine Vector *Rhodnius prolixus* in a Temperature-Dependent Manner. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 3, p. 1–14, 2015.

FELLET, M. R. et al. Effects of Infection by *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* on the Reproductive Performance of the Vector *Rhodnius prolixus*. **PLoS One**, v. 9, n. 8, p. 26–32, 2014.

FREITAS, J.M. et al. Real time PCR strategy for the identification of major lineages of *Trypanosoma cruzi* directly in chronically infected human tissues. **International Journal for Parasitology**, v. 35, n. 4, p. 411–417, 2005.

GALVÃO, C. **Vetores Da Doença de Chagas No Brasil**. Sociedade Brasileira de Zoologia, Curitiba, Brasil, 2014.

GARCIA, E. S. et al. Interactions between intestinal compounds of triatomines and *Trypanosoma cruzi*. **Trends in Parasitology**, v. 26, n. 10, p. 499–505, 2010.

GUARNERI, A. A.; LORENZO, M. G. Triatomine physiology in the context of trypanosome infection. **Journal of Insect Physiology**, p. 1–11, 2016.

GÜRTLER, R. E.; CARDINAL, M. V. Reservoir host competence and the role of domestic and commensal hosts in the transmission of *Trypanosoma cruzi*. **Acta Tropica**, v. 151, n. 1, p. 32–50, 2015.

HOWARD, E. J. et al. Frequency of the Congenital Transmission of *Trypanosoma cruzi*: A Systematic Review and Meta-Analysis. **BJOG**, v. 121, n. 1, p. 22–33, 2015.

JANSEN, A.M.; XAVIER, S.C.C.; ROQUE, A.L.R. *Trypanosoma cruzi* transmission in the wild and its most important reservoir hosts in Brazil. **Parasites & Vectors**, v. 11, p. 502, 2018.

JR, A. R.; RASSI, A.; MARIN-NETO, J. A. Chagas disease. **The Lancet**, v. 375, n. 9723, p. 1388–1402, 2010.

LAGES-SILVA, E. et al. Variability of kinetoplast DNA gene signatures of *Trypanosoma cruzi* II strains from patients with different clinical forms of Chagas disease in Brazil. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 6, p. 2167–2171, 2006.

LENT, H.; WYGODZINSKY, P. Revision of the Triatominae (Hemiptera: Reduviidae) and their significance as vector of Chagas's disease. **Bulletin of the American Museum of Natural History**, v. 163, p. 123–520, 1979.

LIMA-CORDÓN, R. A.; MONROY, M. C.; STEVENS, L.; RODAS, A.; RODAS, G. A.; DORN, P. L.; JUSTI, S. A. Description of *Triatoma huehuetenanguensis* sp. n., a potential Chagas disease vector (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). **ZooKeys**, v. 820, p. 51–70, 2019.

MARCILI, A. et al. A new genotype of *Trypanosoma cruzi* associated with bats evidenced by phylogenetic analyses using SSU rDNA, cytochrome b and histone H2B genes and genotyping based on ITS1 rDNA. **Parasitology**, v. 136, n. 6, p. 641–655, 2009.

MILES, M.A. et al. Do radically dissimilar *Trypanosoma cruzi* strains (zymodemes) cause Venezuelan and Brazilian forms of Chagas' disease?. **Lancet**, v. 1, p. 1338–1340, 1981.

NASCIMENTO, J. D.; DA ROSA, J. A.; SALGADO-ROA, F. C.; HERNÁNDEZ, C.; PARDO-DIAZ, C.; ALEVI, K. C. C. et al. Taxonomical over splitting in the *Rhodnius prolixus* (Insecta: Hemiptera: Reduviidae) clade: Are *R. taquarussuensis* (da Rosa et al.,

2017) and *R. neglectus* (Lent, 1954) the same species?. **PLoS One**, v. 14, e0211285, 2019.

NOUVELLET, P. et al. Effects of genetic factors and infection status on wing morphology of *Triatoma dimidiata* species complex in the Yucatán peninsula, Mexico. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 11, n. 6, p. 1243–1249, 2011.

NOUVELLET, P.; CUCUNUBÁ, Z. M.; GOURBIÈRE, S. Ecology , Evolution and Control of Chagas Disease : A Century of Neglected Modelling and a Promising Future. **Advances in Parasitology**, v. 87, p. 135–191, 2015.

OLIVEIRA, J.; ALEVI, K. C. C. Taxonomic status of *Panstrongylus herreri* Wygodzinsky, 1948 and the number of Chagas disease vectors. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 50, p. 434-435, 2017.

OLIVEIRA, J.; AYALA, J.M.; JUSTI, S. A.; ROSA, J. A.; GALVÃO, C. Description of a new species of *Nesotriatoma* Usinger, 1944 from Cuba and revalidation of synonymy between *Nesotriatoma bruneri* (Usinger, 1944) and *N. flavida* (Neiva, 1911) (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). **Journal of Vector Ecology**, v. 43, p. 148-157, 2018.

PAHO. Pan American Health Organization. **Chagas in the Americas**. Updated August 2017.

Disponível

em

https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=13566:chagas-in-americas&Itemid=40721&lang=pt. Acesso em 05/08/2019.

POINAR, G. A primitive triatomine bug, *Paleotriatoma metaxytaxa* gen. et sp. nov. (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae), in mid-Cretaceous amber from northern Myanmar. **Cretaceous Research**, v. 93, p. 90–97, 2019.

RASSI, A.; RASSI, A.; MARCONDES DE REZENDE, J. American Trypanosomiasis (Chagas Disease). **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 26, n. 2, p. 275–291, 2012.

SANTOS, F. M. et al. Triatominae (Hemiptera , Reduviidae) in the Pantanal region : association with *Trypanosoma cruzi* , different habitats and vertebrate hosts. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 48, n. 5, p. 532–538, 2015.

SILVEIRA, A. C. Entomological survey (1975-1983). **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, suppl. 2, p. 26–32, 2011.

SOARES, A. C. et al. Intravital microscopy and image analysis of *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae) hematophagy: The challenge of blood intake from mouse skin. **Parasitology International**, v. 63, n. 1, p. 229–236, 2014.

SORIANO-ARANDES, A. et al. Control and management of congenital Chagas disease in Europe and other non-endemic countries: current policies and practices. **Tropical Medicine and International Health**, v. 21, n. 5, p. 590–596, 2016.

STANAWAY, J. D.; ROTH, G. The Burden of Chagas Disease. **Global Heart**, v. 10, n.3, p. 139–144, 2015.

TARTAROTTI, E.; AZEREDO-OLIVEIRA, M. T. V.; CERON, C. R. Vectorial problematic of the Chagas disease. **Arquivos de Ciências da Saúde**, v. 11, n. 1, p. 44–47, 2004.

URDANETA-MORALES, S. Chagas' disease: an emergent urban zoonosis. The caracas valley (Venezuela) as an epidemiological model. **Frontiers in Public Health**, v. 2, n. December, p. 265, 2014.

WHO. World Health Organization. **Chagas disease (American trypanosomiasis)**. Updated April 2019. Disponível em [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis)). Acesso em 05/08/2019.

ZINGALES, B. et al. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 7, p. 1051–1054, 2009.

ZINGALES, B. et al. The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: rationale, epidemiological relevance and research applications. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 12, n. 2, p. 240–253, 2012.