



UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS
FUNDAÇÃO DE MEDICINA TROPICAL DR. HEITOR VIEIRA DOURADO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL
MESTRADO EM DOENÇAS TROPICAIS E INFECCIOSAS

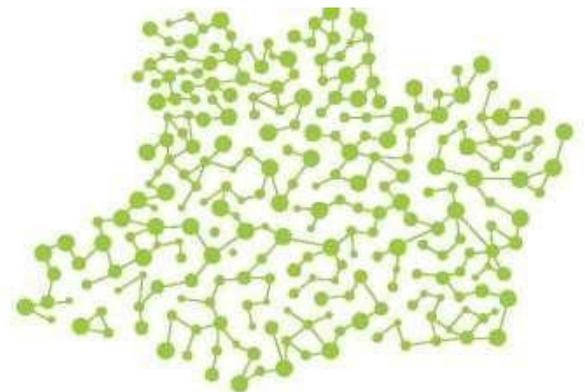


SUSCETIBILIDADE E RESPOSTA CELULAR DE *Rhodnius robustus* e *Rhodnius prolixus*
À INFECÇÃO POR LINHAGENS DE *Trypanosoma cruzi* TcI e TcIV CIRCULANTES NO
AMAZONAS

MATHEUS MARTINS MONTEIRO

MANAUS

2023



MATHEUS MARTINS MONTEIRO

**SUSCETIBILIDADE E RESPOSTA CELULAR DE *Rhodnius robustus* e *Rhodnius prolixus*
Á INFECÇÃO POR LINHAGENS DE *Trypanosoma cruzi* TcI E TcIV CIRCULANTES NO
AMAZONAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical da Universidade do Estado do Amazonas em Convênio com a Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado, para obtenção do grau de Mestre em *Doenças Tropicais e Infeciosas*.

Orientador: Prof^a. Dra. Maria das Graças Vale Barbosa Guerra

Coorientador: Prof^o. Dr^o. Jorge Augusto de Oliveira Guerra

MANAUS

2023

FICHA CATALOGRÁFICA

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a). **Sistema Integrado de Bibliotecas da Universidade do Estado do Amazonas.**

M775ss Monteiro, Matheus Martins

Suscetibilidade e resposta celular de *Rhodnius robustus* e *Rhodnius prolixus* à infecção por linhagem de *Trypanosoma cruzi* TcI e TcIV circulantes no Amazonas / Matheus Martins Monteiro. Manaus: [s.n], 2023.
66 f.: color.; 29 cm.

Dissertação - Programa de Pós Graduação em Medicina Tropical – Mestrado em Doenças Tropicais e Infecciosas - Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, 2023.
Inclui bibliografia
Orientador: Maria das Graça Vale Barbosa Guerra
Coorientador: Jorge Augusto de Oliveira Guerra

1. Triatomíneos. 2. Doença de chagas. 3. Amazônia. 4. Resposta imunológica celular. 5. Hemócitos.

I. Maria das Graça Vale Barbosa Guerra (Orient.).

II. Jorge Augusto de Oliveira Guerra (Coorient.).

III. Universidade do Estado do Amazonas.

IV. Suscetibilidade e resposta celular de *Rhodnius robustus* e *Rhodnius prolixus* à infecção por linhagem de *Trypanosoma cruzi* TcI e TcIV circulantes no Amazonas

FOLHA DE JULGAMENTO

SUSCETIBILIDADE E RESPOSTA CELULAR DE *Rhodnius robustus* e *Rhodnius prolixus* Á INFECÇÃO POR LINHAGENS DE *Trypanosoma cruzi* TcI E TcIV CIRCULANTES NO AMAZONAS

MATHEUS MARTINS MONTEIRO

“Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de Mestre em Doenças Tropicais e Infecciosas, aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical da Universidade do Estado do Amazonas em convênio com a Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado”.

Banca Julgadora:

Presidente

Membro

Membro

DEDICATÓRIA

Dedico a meu pai Carlos Alberto Monteiro Martins e minha mãe Magna Martins Pedrosa, por todo apoio e que graças aos seus esforços que hoje posso concluir o meu curso.

Dedico este trabalho de pesquisa a minha amada esposa Lilian Andrade cuja presença sempre afetou positivamente a minha vida, em todos os aspectos.

Dedico aos meus filhos, Laura (*in memoriam*) que sempre será minha anjinha e o João Pedro que são a minha razão de viver.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus e pela minha vida e da minha família, por me permitir ultrapassar todos os obstáculos encontrados ao longo da realização deste trabalho.

À minha família, pelo apoio constante nas minhas conquistas e por me incentivarem nos momentos difíceis e pelo apoio demonstrado ao longo de todo o período em que me dediquei a este trabalho.

Aos meus pais, por não terem medido esforços para me proporcionar um ensino de qualidade durante todo a minha vida.

À Lilian Andrade por sempre estar comigo em todos os momentos, sem ela por perto minha vida não seriam a mesma. Grato pela sua compreensão e presença, sempre torcendo pelo meu sucesso.

À professora Maria das Graças Vale Barbosa Guerra, por ter sido minha orientadora e minha mãe científica, por me apresentar o mundo da pesquisa, e por todas as correções e ensinamentos que me permitiram um melhor desempenho no meu processo de formação pessoal e profissional.

Ao meu co-orientador Dr. Jorge Guerra, agradeço a confiança e disposição em ajudar sempre e os vários momentos de descontração.

A todos os funcionários da Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado / Unidade de Entomologia Nelson Ferreira Fé, Silvana Arakian, Yolanda Noguth, Flávio Fé, Dra. Silvia Justiniano pelo suporte no desenvolvimento da pesquisa possibilitando a realização deste trabalho.

Ao seu Nelson Fé (*in memoriam*), por todos os ensinamentos na identificação dos triatomíneos, no compartilhamento de experiência e pelas broncas e brincadeiras ao longo de toda minha jornada Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado / Unidade de Entomologia Nelson Ferreira Fé.

A todos meus amigos da entomologia, que são minha família científica; Jessica Ortiz, Susan Smith, Denison Vital (*in memoriam*), Laylah Magalhães, Arinéia Soares, Debora Souza, Sabrina Brito, Rubens Andrade Junior, Emily Moura, Izabele Guimarães, Ademir Bentes e especialmente ao Lucas Ferreira que sempre acreditou e me incentivou na continuidade deste trabalho. Obrigado a todos pela companhia dentro do laboratório, pelas risadas e pelos momentos de descontração o que foi fundamental na elaboração e conclusão dessa etapa.

À Universidade do Estado do Amazonas e a FMT-HVD por oportunizar a formação de profissionais.

Aos professores e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical, pelos seus conhecimentos e experiências transmitidas. A Altariza que sempre esteve disposta a nos ajudar e tirar todas as dúvidas na secretaria.

Ao professor Dr. Wanderley de Souza e sua equipe do Laboratório de Ultraestrutura Celular Hertha Meyer (IBCCF, UFRJ) e do Centro Multiusuário para Análise de Fenômenos Biomédico (CMABio) da UEA, pela valiosa contribuição na área de microscopia eletrônica, que foram essenciais para o resultado alcançado.

Ao MSc. Yury Chaves responsável técnico pela Plataforma Citometria de Fluxo da Fundação Oswaldo Cruz-RJ, pelo esforço, dedicação e colaboração na execução deste trabalho proporcionando a possibilidade de um melhor resultado.

Aos colegas da Turma de Mestrado – 2020, pelo apoio, companheirismo, troca de experiências e o convívio ao longo dessa trajetória.

A todos que participaram, direta ou indiretamente do desenvolvimento deste trabalho de pesquisa, enriquecendo o meu processo de aprendizado.

RESUMO

Triatomíneos são insetos, de grande importância médica, por serem hematófagos, hábitos que os insere no ciclo biológico do *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico da doença de Chagas, definida primariamente como uma enzootia de animais silvestres. Devido ao seu ciclo de vida complexo, o *T. cruzi* é classificado em sete genótipos, a depender do local de ocorrência denominadas de linhagens. *Rhodnius prolixus* possui grande relevância epidemiológica por ser encontrada colonizando domicílios em países da América do Sul. *Rhodnius robustus* é espécie silvestre que no Amazonas, invade as residências próximas à áreas de floresta, com altas taxas de infecção natural pela linhagem de *T. cruzi* TcI. Os hemócitos são as células que circulam na hemocele dos insetos, responsável por desempenhar várias funções imunológicas. Poucos estudos relatam a resposta imunológica de triatomíneos à invasão pelo *T. cruzi*. Esse trabalho teve como objetivo avaliar a suscetibilidade e a resposta celular de *Rhodnius robustus* e *Rhodnius prolixus* frente às linhagens *Trypanosoma cruzi* TcI e TcIV circulantes no Amazonas. Foram utilizadas ninfas de 5º estágio proveniente da colônia de hemíptera, do laboratório de entomologia da FMT/HVD, alimentadas com sangue humano contaminado com linhagens de TcI e TcIV crio preservadas, por membrana artificial. Após infecção, a caracterização dos hemócitos e alterações dessas células em diferentes períodos de infecção foram realizadas por microscopia eletrônica de transmissão e citometria de fluxo. Observou-se que nas duas espécies houve maior suscetibilidade a linhagem de *T. cruzi* TcI, e em ambas foram encontrados cinco tipos de hemócitos, sendo eles: adipohémocitos, granulócitos, oenócitos, prohemócitos e plasmatócitos e não houve diferença significativa em relação a variação dessas células pós infecção.

Palavras-chave: Triatomíneos; Doença de chagas; Amazônia; resposta imunológica celular; Hemócitos.

ABSTRACT

Triatomines are insects of great medical importance because they are hematophagous habits that insert them into the biological cycle of *Trypanosoma cruzi*, the etiological agent of Chagas disease, defined primarily as an enzootic of wild animals. Due to its complex life cycle, *T. cruzi* is classified into seven genotypes depending on the place of occurrence, called lineages. *Rhodnius prolixus* has great epidemiological relevance because it is found colonizing homes in South American countries. *Rhodnius robustus* is a wild species that, in the Amazon, invades homes close to forest areas, with high rates of natural infection by the *T. cruzi* TcI lineage. Hemocytes are the cells that circulate in the hemocoel of insects, responsible for performing various immunological functions. Few studies report the immune response of triatomines to invasion by *T. cruzi*. This work aimed to evaluate the susceptibility and cellular response of *Rhodnius robustus* and *Rhodnius prolixus* against *T. cruzi* TcI and TcIV strains circulating in the Amazon. Fifth-stage nymphs from the hemiptera colony from the entomology laboratory of the FMT/HVD, were fed on human blood contaminated with cryopreserved TcI and TcIV strains using an artificial membrane. After infection, the characterization of hemocytes and alterations of these cells in different periods of infection were performed by transmission electron microscopy and flow cytometry. It was observed that in both species there was greater susceptibility to the *T. cruzi* TcI lineage, and in both five types of hemocytes were found namely: adipohemocytes, granulocytes, eonocytes, prohemocytes and plasmatocytes, and there was no significant difference in relation to the variation of these post infection cells.

Keywords: Triatomine; Chagas disease; immune response; Hemócitos.

RESUMO LEIGO

Os insetos conhecidos como barbeiros, se alimentam de sangue de vários animais entre eles o do homem, e isso faz com que eles sejam considerados vetores da doença de Chagas-DC. Na Amazônia brasileira os barbeiros vivem na floresta, sendo encontrado com frequência nas residências construídas próximas a essas áreas, atraídos principalmente pela luz. A transmissão da DC pode ocorrer pelo contato direto com as fezes do barbeiro e também pelo consumo de alimentos contaminados com o parasito denominado de *Trypanosoma cruzi*. Os barbeiros tais como os outros insetos ao se contaminarem desenvolvem uma resposta contra invasores, denominadas de resposta celular e humoral. Algumas células de nome hemócitos ajudam no combate e defesa aos invasores. Quanto menor for sua defesa, maior será a possibilidade de sua atuação como vetor. Existem poucos estudos, sobre a defesa do barbeiro contra agentes como, por exemplo, o *T. cruzi*. Assim esse trabalho estudou a defesa de duas espécies de barbeiros de nome *Rhodnius robustus* e *Rhodnius prolixus* que foram contaminados com *T. cruzi* que circulam em florestas. Se observou que os dois triatomíneos se contaminaram melhor a um tipo de forma do *Trypanosoma cruzi* e elas apresentaram cinco tipos de células, mas não houve diferença em relação a variação dessas células pós infecção.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1: Ciclo de desenvolvimento dos triatomíneos. Fonte: Celso 2019 | 18 |
| Figura 2: Imagem do <i>Trypanosoma cruzi</i> , agente etiológico da doença de Chagas, visto ao microscópio de luz. Aumento 100 X Fonte: Acervo pessoal 2021..... | 20 |
| Figura 3: Representação do desenvolvimento do T. cruzi no intestino do inseto vetor: (A) formas tripomastigotas sanguíneas (B) formas epimastigotas, (C) formas tripomastigotas metacíclicas, as quais são as formas infectantes ao hospedeiro vertebrado. (Garcia <i>et al.</i> , 2007)..... | 21 |
| Figura 4: Distribuição global de casos da DC em 2018. Fonte: WHO,2018 | 23 |
| Figura 5: Distribuição dos casos de DCA registrados no Amazonas entre 1977 a 2021. Fonte: Guerra e Guerra, 2021. | 25 |

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES DE MEDIDA

| | |
|-------------------------------|------------------------------------|
| CaCl ₂ : | Cloreto de cálcio |
| DC: | Doença de Chagas |
| DCA: | Doença de Chagas Aguda |
| DCC: | Doença de Chagas Crônica |
| DTU: | Unidade discreta de Tipagem |
| EDTA: | Ácido etilenodiamino tetra-acético |
| KCl: | Cloreto de potássio |
| ml: | mililitro |
| NaCl: | Cloreto de Sódio |
| NaOH: | Hidróxido de sódio |
| NO: | Oxido Nítrico |
| NO ₂ : | Nitrito |
| NOS: | Oxido Nítrico sintase |
| O ₂ ⁻ : | Ânions superóxidos |
| °C: | Grau Celsius |
| OH: | Radicais Hidroxi |
| OMS: | Organização Mundial da Saúde |
| OsO: | Ósmio |
| PAMs: | Peptídeos antimicrobianos |
| RNS: | Reativos de Nitrogênio |
| ROS: | Reativos de Oxigênio |
| Rpm: | Rotação por minuto |
| <i>Tc:</i> | <i>Trypanosoma cruzi</i> |
| μl: | microlitro |
| μg: | micrograma |

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| 1. INTRODUÇÃO | 14 |
| 1.1 Insetos | 14 |
| 1.1.1 Imunidade Humoral | 14 |
| 1.1.1.1 Peptídeos antimicrobianos e seu mecanismo de ação. | 14 |
| 1.1.1.2 Reativos de nitrogênio (RNS) e oxigênio (ROS) | 15 |
| 1.1.2 Imunidade celular | 16 |
| 1.2 Triatomíneos | 17 |
| 1.3 <i>Trypanosoma cruzi</i> | 19 |
| 1.3.1.1 Ciclo no hospedeiro vertebrado - mamífero | 20 |
| 1.3.1.2 Ciclo do <i>T. cruzi</i> no hospedeiro invertebrado – insetos triatomíneos | 20 |
| 1.4 Caracterização genética de <i>Trypanosoma cruzi</i> | 21 |
| 1.5 Interação parasito-vetor | 22 |
| 1.6 Doença de Chagas | 23 |
| 1.7 Doença de Chagas na Amazônia | 23 |
| 1.7.1 Doença de Chagas no Amazonas..... | 24 |
| 1.7.1.1 Vetores no Amazonas..... | 24 |
| 1.8 Relevância do estudo | 25 |
| 2. OBJETIVOS | 26 |
| 2.1 Geral | 26 |
| 2.2 Específicos | 26 |
| 3. PRODUTO DA DISSERTAÇÃO-MANUSCRITO..... | 27 |
| 4. LIMITAÇÃO E PERSPECTIVAS | 44 |
| 5. CONCLUSÃO..... | 45 |
| 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 46 |

| | |
|---|----|
| 7. ANEXOS | 54 |
| 7.1 Procedimentos Operacionais Padrão utilizados (POP)..... | 54 |
| 7.1.1 Procedimento para a preparação do meio MacNeal, Novy e Nicolle (NNN) para cultura de <i>Leishmania sp.</i> e <i>Trypanosoma cruzi</i> | 54 |
| 7.1.2 Procedimento para a obtenção de massa parasitaria de <i>Trypanosoma cruzi</i> | 56 |
| 7.1.3 Procedimento para a preparação de 1L de PBS 20x | 58 |
| 7.1.4 Procedimento para a contaminação do sangue com <i>Trypanosoma cruzi</i> para o Xenodiagnóstico indireto. | 60 |
| 7.1.5 Procedimento para preparo da amostra e obtenção das imagens de hemócitos de triatomíneos por microscopia eletrônica de transmissão | 62 |

1. INTRODUÇÃO

1.1 Insetos

O filo Arthropoda, é o grupo de invertebrados mais bem sucedido, encontrados em diversos ambientes, com exceção da Antártida, característica que os coloca em contato com diferentes microrganismos. Dentre as classes que compõem esse filo, Insecta detêm o maior número de espécies descritas (1).

Um dos fatores que possibilitou o grande sucesso evolutivo dos insetos foi a sua rápida e eficiente resposta imunológica contra potenciais invasores, através de mecanismos de defesa que funcionam de forma dependente, consistindo em barreiras físicas (tegumento), microbiota e imunidade inata que pode ser dividida em duas categorias: a imunidade humoral e a celular (2–5).

1.1.1 Imunidade Humoral

A imunidade humoral está baseada na secreção de moléculas efetoras as quais podem destruir ou suprimir o desenvolvimento de quaisquer invasores no organismo do inseto. Nesse mecanismo de defesa, inclui-se a ativação transcricional de um conjunto de genes pelas vias Toll, imd e JAK/STAT, as quais lideram a produção de diversas moléculas e a produção de peptídeo antimicrobianos (6,7).

1.1.1.1 Peptídeos antimicrobianos e seu mecanismo de ação.

Peptídeos antimicrobianos ou PAM's consistem nas principais moléculas efetoras estudadas contra microrganismos invasores em vetores de doenças. Essas moléculas apresentam baixo peso molecular, resistem a temperaturas altas, são tipicamente catiônicos e muitas vezes apresentam menos de 100 resíduos de aminoácidos em sua composição (8).

Os PAM's têm como principais alvos as membranas de microrganismos. Uma das diferenças mais marcantes em membranas de células eucarióticas e procarióticas é a sua composição e o arranjo da bicamada lipídica, por isso

peptídeos antimicrobianos possuem alto poder de seletividade. O corpo gorduroso dos insetos é o principal responsável pela produção de PAMs segundo Schmid-Hempel (9,10).

O principal mecanismo de ação dos peptídeos antimicrobianos é a possível interação com os lipopolissacarídeos, encontrado principalmente na membrana de bactérias Gram-negativas, criando uma via de transporte ou poro que gera desequilíbrio osmótico e o microrganismo morre por lise celular. São descritos quatro principais mecanismos de ação dos PAM's sobre a membrana celular. Eles podem se agregar formando canais, aumentando a permeabilidade da membrana, causando perda de parte do conteúdo intracelular, porém muitas vezes não sendo suficiente para levar a morte celular (11).

Outro mecanismo de ação é conhecido como modelo toroidal, onde os peptídeos formam um agregado, ligando-se as membranas lipídicas e levando-as a se curvarem continuamente, fazendo com que ambos os peptídeos e o lipídeo se alinhem para as porções hidrofílicas fiquem voltadas para o centro do poro formado (12).

Os PAM's também podem agir como carpete de ação detergente que recobre a superfície até uma concentração limiar, levando a formação de agregados lipídicos gerando ruptura da membrana, conduzindo à morte celular. Por fim, o modelo de barril (barrel-stave model), onde feixes de hélices anfipáticas se oligomerizam e formam poros transmembrana com seus resíduos hidrofílicos voltados para a luz do poro. Alguns peptídeos de alfa-hélice atuam nesse mecanismo. A morte do microrganismo se dá pela perda de polarização, por distúrbios na função de membrana na redistribuição de lipídeos, perda do conteúdo celular e ativação de enzimas hidrolases que podem destruir a parede celular (13–15).

1.1.1.2 Reativos de nitrogênio (RNS) e oxigênio (ROS)

Outro mecanismo de respostas humorais identificado em insetos está relacionado com a formação de radicais livres, como as espécies reativas de nitrogênio (RNS) e espécies reativas de oxigênio (ROS), que podem ser geradas

por diferentes processos metabólicos, como a ingestão e digestão de sangue em insetos hematófagos, respiração celular e ainda pela infecção por parasitas. Os radicais livres são moléculas que apresentam um elétron não pareado na última camada, o que define seu grande potencial oxidativo. ROS e RNS interagem com as membranas celulares dos microrganismos através da peroxidação de lipídeos, proteínas e DNA, desempenhando papel antimicrobiano que auxilia principalmente no combate as infecções. ROS são radicais livres derivados do metabolismo do oxigênio, formados durante o processo de respiração celular. Dentre os ROS estão os ânions superóxidos (O_2^-), radicais hidroxila (OH) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Estudos têm demonstrado a participação de ROS tanto na manutenção da microbiota intestinal do inseto bem como na infecção por parasitas (3,16–18).

1.1.2 Imunidade celular

Os insetos possuem na hemocele (cavidade do corpo), um fluido que permite o contato direto entre tecidos e órgãos denominado de hemolinfa, formado essencialmente por duas partes: uma líquida e outra sólida. A parte líquida é responsável por mudanças químicas entre órgãos, hormônios e enzimas, condução de nutrientes, iniciando pelo intestino. Também é responsável pela excreção de produtos residuais encontrados nos órgãos (19–22).

Na parte sólida são encontradas as células denominadas hemócitos responsáveis pelos principais mecanismos de defesa, fornecendo uma resposta ágil e eficiente contra os patógenos que atingem a hemocele. Produzidos a partir dos órgãos hematopoiéticos a classificação dos hemócitos leva em conta a funcionalidade e a morfologia, e dependendo da espécie induz variação da nomenclatura (17,18,23,24).

Na resposta celular, a defesa do organismo envolve hemócitos destacando-se os plasmatócitos e granulócitos. A fagocitose, encapsulação e a nodulação são as principais linhas de defesa do inseto (17,18,23,24).

A fagocitose se torna a primeira resposta dos hemócitos a partir da invasão e identificação da presença de um corpo estranho, tornando-se o mecanismo de imunidade celular mais conservado entre os seres vivos. No encapsulamento celular pode ocorrer ou não melanização do corpo estranho. Os hemócitos que predominam na fase fagocítica e em capsulação são os plasmatócitos e os granulócitos (22,25–27).

O Outro processo envolvendo a resposta celular é chamado de nodulação, responsável pela formação de nódulos composto por um ou mais tipos de células, com a função de agregar e reter invasores estranhos, sendo muito eficiente na contenção de patógenos e auxiliando na sua eliminação (28,29).

Em insetos hematófagos, moléculas com potencial para atividade biológica podem ser secretadas diretamente na hemocele e ser transportadas na hemolinfa ou dentro do lúmen do intestino, consideradas componentes da resposta imune para eliminar patógenos potenciais adquiridos durante o repasto sanguíneo (30).

1.2 Triatomíneos

Triatomíneos são insetos estritamente hematófagos, hábito que os insere no ciclo biológico do protozoário *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico da doença de Chagas, enfermidade endêmica na América Latina definida primariamente como uma enzootia de animais silvestre (31).

Conhecidos vulgarmente como barbeiros pertencem a ordem Hemiptera, família Reduviidae, subfamília Triatominae, onde estão agrupadas seis tribos, 18 gêneros e 154 espécies (incluindo três fósseis), amplamente distribuídas nas regiões Neotropical e Neártica (desde o sul dos Estados Unidos até a patagônia, na Argentina) (32,33).

1.2.1 Bio-ecologia de Triatomíneos

Quanto ao desenvolvimento triatomíneos são insetos classificados q de Hemimetábolo (Figura 1), apresentando seu ciclo de vida dividido em três estágios: ovo, ninfa (cinco fases) e adultos (31,34).

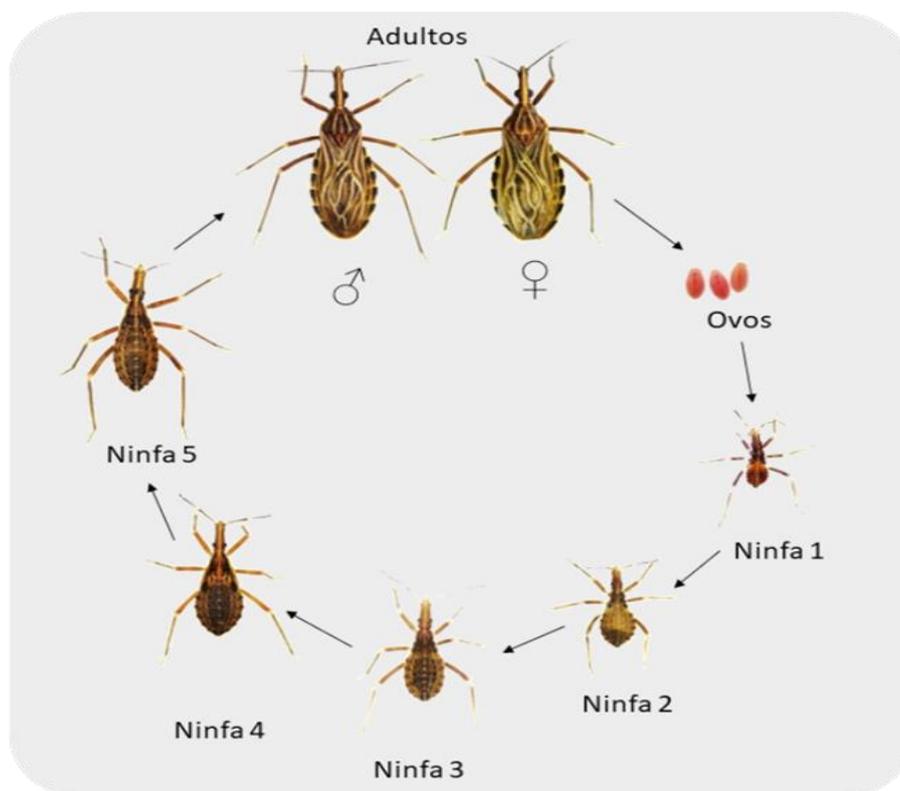


Figura 1: Ciclo de desenvolvimento dos triatomíneos. Fonte: Celso 2019

Vivem em colônias, e seus habitats preferenciais são locais próximos à sua fonte alimentar, primariamente, os ambientes silvestres, em ninhos de pássaros, de marsupiais (mucuras ou gambás), tocas de roedores, e dasipodídeos (tatus), abrigos sob pedras ou em palmeiras que propiciem ambientes para sua fonte de repasto sanguíneo, em todos os estágios do seu ciclo de vida. Algumas espécies por terem seus ecossistemas destruídos se adaptaram ao ambiente doméstico e peri doméstico estabelecendo colônias dentro ou próximo das residências, condição que os define como espécies domiciliadas. (33–36).

No Brasil são registradas aproximadamente 68 espécies, cinco têm ou tiveram participação mais relevante na transmissão domiciliar da doença de chagas (DC) (31,37).

Na Amazônia já foram registradas 25 espécies, onde, 12 são encontradas no Amazonas: *Cavernicola lenti*, *Cavernícola pilosa*, *Eratyrus mucronatus*, *Microtriatoma trinidadensis*, *Panstrongylus geniculatus*, *P. lignarius*, *P. rufotuberculatus*, *Rhodnius amazonicus*, *R. brethesi*, *R. paraensis*, *R. pictipes*, *R. robustus*. Três gêneros agrupam espécies de importância médica *Triatoma* Laporte, 1832, *Panstrongylus*, Berg, 1879 e o gênero *Rhodnius* criado por Stal em 1859 com base na espécie tipo *R. prolixus* (33). Essa espécie tem ampla distribuição, em países da América Central, e na Venezuela e Colômbia tem sido encontrada colonizando domicílio (38–40).

Rhodnius robustus, é uma espécie silvestre amplamente distribuída em estados brasileiros como Acre, Amapá, Amazonas, Maranhão, Mato Grosso, Pará, Piauí, Rondônia, Roraima e Tocantins, e em países vizinhos temos Bolívia, Colômbia, Equador, Guiana Francesa, Peru e Venezuela (34,41). Ocorre em toda Amazônia, associada à várias espécies de palmeiras tais como, *Schelea maracaibensis* e *Acrocomia sclerocarpa*, *Attalea phalerata*, *Oenocarpus bacaba*, *Mauritia flexuosa*. No Amazonas tem sido encontrada acidentalmente no peridomicílio e intradomicílio, de áreas rurais e urbanas com altas taxas infecção pelo *Trypanosoma cruzi* (41–44)(45).

1.3 *Trypanosoma cruzi*

O *Trypanosoma cruzi* é um protozoário do grupo Stercoraria, ordem Kinetoplastida e família Trypanosomatidae, caracterizado pela existência do cinetoplasto rico em DNA e um único flagelo (Figura 2) (46).

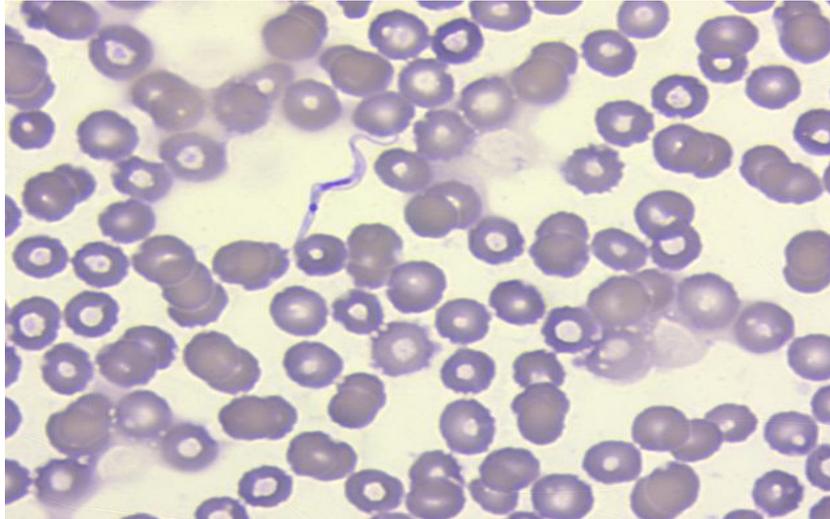


Figura 2: Imagem do *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico da doença de Chagas, visto ao microscópio de luz. Aumento 100 X Fonte: Acervo pessoal 2021.

1.3.1 Ciclo Biológico

O *T. cruzi* possui um ciclo de vida heteroxênico realizado em dezenas de hospedeiros vertebrados e invertebrados, descrito pela primeira vez por Carlos Chagas, médico brasileiro, responsável pela descoberta da Tripanossomíase Americana (31)(47,48).

1.3.1.1 Ciclo no hospedeiro vertebrado - mamífero

Na natureza mais de 100 espécies de mamíferos podem ser inseridas no ciclo de vida do *T. cruzi* que se inicia quando as formas tripomastigotas metacíclicas caem na corrente sanguínea e inicia um novo ciclo passando por um processo de diferenciação gerando formas amastigotas e tripomastigota sanguínea (49).

1.3.1.2 Ciclo do *T. cruzi* no hospedeiro invertebrado – insetos triatomíneos

Cerca de 150 espécies de triatomíneos podem ser inseridas no ciclo do *T. cruzi* ao realizarem seu repasto sanguíneo em algum animal contaminado. Ao ingerir as formas tripomastigotas sanguíneas, dependendo de vários fatores ocorrerá no seu intestino médio a diferenciação de formas evolutivas, esferomastigota e epimastigota que precisarão chegar até ampola retal do

vetor e passar por um processo denominado de metaciclo gerando as formas infectivas para o vertebrado as tripomastigotas metacíclicas, que em um novo repasto sanguíneo serão liberadas junto com as fezes e a urina (Figura 3) (46,50).

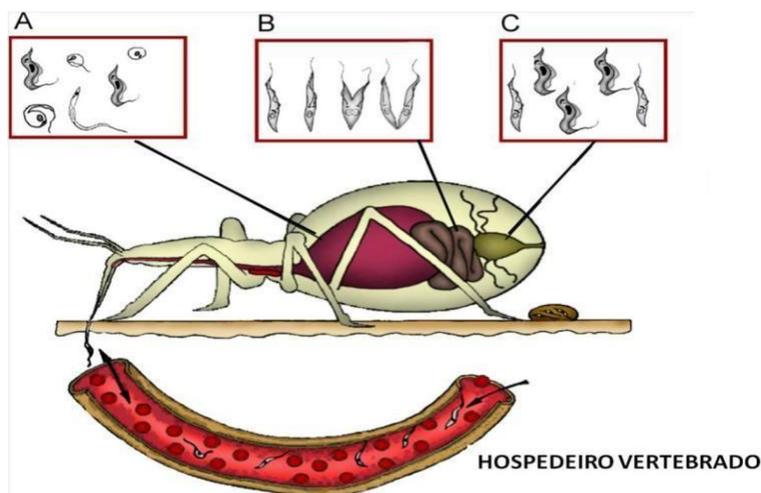


Figura 3: Representação do desenvolvimento do *T. cruzi* no intestino do inseto vetor: (A) formas tripomastigotas sanguíneas (B) formas epimastigotas, (C) formas tripomastigotas metacíclicas, as quais são as formas infectantes ao hospedeiro vertebrado. (Garcia *et al.*, 2007).

1.4 Caracterização genética de *Trypanosoma cruzi*

As alternâncias de hospedeiros durante o seu ciclo de vida obrigam o *T. cruzi* a constantes adaptações e conseqüentemente, modificações, resultando em variabilidade genética dependendo do local geográfico e ambiente (silvestre e/ou doméstico). Ao longo dos anos, diferentes classificações foram propostas, com base em caracteres biológicos, enzimáticos e genéticos. Em 2009, foi proposta uma classificação, baseada em genótipos nominando o *T. cruzi* que os agrupou em seis Unidades de Tipagens Discretas (DTUs) e atualmente são conhecidos sete linhagens (TcI-TcVI) e Tcbat (51–53). De maneira geral as linhagens TcII, TcV e TcVI estão associadas ao ciclo domiciliar enquanto que TcI, TcIII e TcIV tem sido relacionada ao ciclo silvestre e Tc Bat é uma linhagem detectada inicialmente em morcegos mas, já encontrada causando doença humana (54). Na tabela 1, são descritas características das DTUs:

Tabela 1: Descrição das características das linhagens (DTUs) de *Trypanosoma cruzi* de acordo com a distribuição geográfica, ciclo do parasito e manifestação clinicas da doença (51).

| Linhagens | Distribuição geográfica | Ciclo | Observação |
|-----------|---|-----------------------|---|
| TcI | Sul da bacia Amazônica. | Silvestre e doméstico | Manifestações cardíacas |
| TcII | Regiões sul e central da América do Sul | Doméstico | Manifestações cardíacas, síndromes do mega. |
| TcIII | Brasil e Venezuela | Silvestre | Comum em animais e vetores |
| TcIV | Apresenta padrões similares ao TcIII | Silvestre | Associado a transmissão oral DCA |
| TcV | Cone Sul | Doméstico e silvestre | Presente em humanos e em triatomíneos no cone Sul |
| TcVI | Cone Sul | Doméstico | Associadas a casos humanos e em triatomíneos domiciliados |
| TcBat | Regiões sul e central da América do Sul | Silvestre | Associada aos morcegos e registrada em humanos |

1.5 Interação parasito-vetor

Durante o ciclo evolutivo do *T. cruzi* no trato digestivo do triatomíneo, esse parasito enfrenta barreiras para seu desenvolvimento (55,56). Condições desfavoráveis nos microambientes intestinais, como, atividade de enzimas digestivas (lectinas e aglutininas), membrana perimicrobiana, fatores hemolíticos, adesão ao epitélio e temperatura, afetam diretamente a sobrevivência do parasito. (57,58). Outros fatores como a falta nutricional do inseto pode levar a redução da parasitemia e em casos extremos a perda da infecção (59).

O trato intestinal dos triatomíneos também pode ser considerado uma via de seleção de linhagens do protozoário, possuindo um papel decisivo na interação parasito-vetor, onde o destino da infecção depende da habilidade das formas tripomastigotas escaparem das enzimas digestivas. Assim, evolução do *T. cruzi* em vetores parece estar relacionada a vários fatores, incluindo: a

capacidade da cepa de se adaptar ao vetor, a suscetibilidade do vetor a uma determinada cepa ou a combinação de ambas (60). Isso reflete na busca de vetores padrões com alta capacidade de suscetibilidade e infectividade para as diferentes cepas encontradas nas áreas endêmicas da doença de Chagas (61–64).

1.6 Doença de Chagas

A doença de Chagas (DC) é uma antropozoonose causada pelo protozoário *T. cruzi*, descoberto em 1909, por Carlos Chagas. De acordo com a Organização Mundial de Saúde, estima-se que aproximadamente 7 a 9 milhões de pessoas sejam portadoras da doença em todo o mundo e aproximadamente 75 milhões estão sob risco de infecção. Endêmica das Américas, a DC se dispersou para outros continentes em razão do fluxo migratório (65,66)(Figura 4). O *T. cruzi* pode ser transmitido ao homem de forma vetorial, congênita transfusão de sangue, transplante de órgãos, acidentes em laboratórios ou oral (67,68).

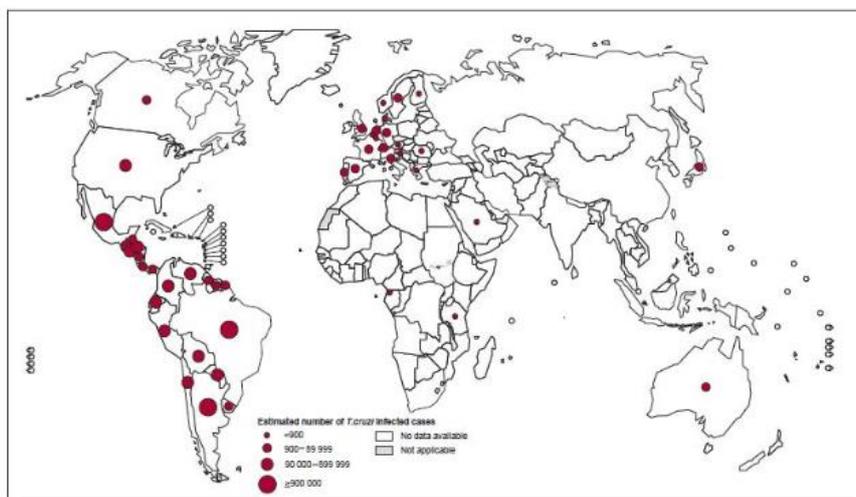


Figura 4: Distribuição global de casos da DC em 2018. Fonte: WHO,2018

1.7 Doença de Chagas na Amazônia

Na Amazônia os primeiros casos da DC foram registrados em 1969, Belém, estado do Pará, na forma aguda, onde se suspeitaram de transmissão oral, por terem sido diagnosticados quatro casos simultaneamente em uma

família, e não terem sido encontrados vetores nos arredores do domicílio. Nos anos seguintes foram registrados casos nos outros estados, classificando a região como uma área emergente para DC evidenciando um novo cenário para as ações de vigilância em razão da predominância de casos pela transmissão oral (69–71).

1.7.1 Doença de Chagas no Amazonas

No Amazonas os primeiros casos da infecção em humanos, foram relatados em 1977 no Município de Barcelos, através da sorologia em quatro casos, considerados portadores do DC crônica. O primeiro caso de DC aguda foi relatado em 1980 após o diagnóstico de uma criança, doo Município de São Paulo de Olivença (69,70). Em 2004 em Tefé foi registrado o primeiro surto da DCA por transmissão oral e desde então até 2022 foram notificados 10 surtos em nove municípios (69,72,73).

1.7.1.1 Vetores no Amazonas

No Amazonas, há registro da ocorrência de pelo menos 12 espécies de triatomíneos todos de hábito silvestre, sendo *Panstrongylus geniculatus*, *Rhodnius robustus* e *Rhodnius pictipes* as mais frequentes, e *Rhodnius brethesi* a espécie responsável pela transmissão do *T. cruzi* em piaçabeiros na região de Barcelos, no alto Rio Negro (74).

Embora não haja ocorrência de colonização de triatomíneos dentro das residências, têm sido frequentes os registros da invasão desses insetos, na fase adulta, em ambientes domiciliares (43,75). A grande maioria é detectada com altas taxas de infecção natural por *T. cruzi* principalmente com a linhagem TcI, a mesma registrada em casos isolados da DC aguda e casos crônicos (36). Entre os possíveis fatores que devem estar favorecendo essa dispersão do ambiente silvestre para o domiciliar, está a proximidade das residências com fragmentos de florestas (44,75).

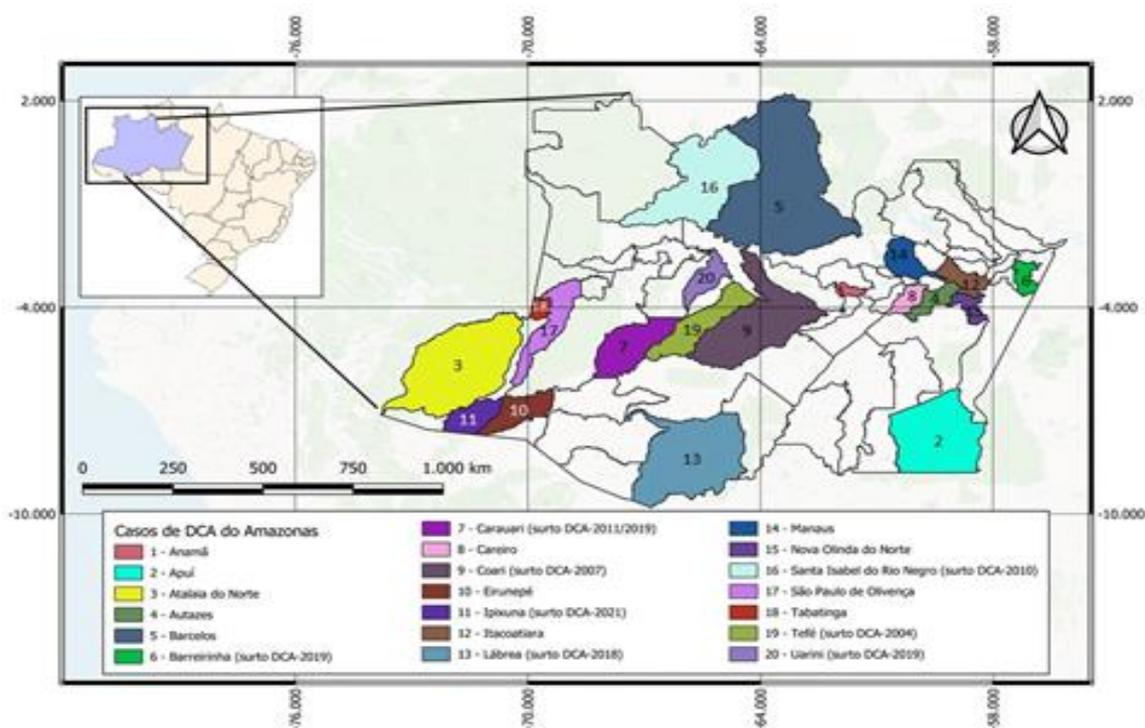


Figura 5: Distribuição dos casos de DCA registrados no Amazonas entre 1977 a 2021. Fonte: Guerra e Guerra, 2021.

1.8 Relevância do estudo

No Amazonas, a referência para o atendimento e cuidado de pacientes com a DC é a Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado-FMT-HVD, e vários estudos envolvendo aspectos clínicos, ecoepidemiológicos e de diagnóstico tem sido realizado. O suporte no diagnóstico parasitológico complementar, tais como: xenodiagnóstico, xenocultura, hemocultura e biomolecular é feito na Unidade de Entomologia Nelson Ferreira Fé local onde são armazenadas cepas de *T. cruzi* e estabelecidas colônias de triatomíneos. (44,72,73,75–80). Nesse contexto os estudos que investiguem a suscetibilidade e resposta imunológica dos triatomíneos frente às linhagens de *T. cruzi* circulantes na Amazônia, são relevantes, visando-se um melhor desempenho das espécies utilizadas no xenodiagnóstico.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Avaliar a suscetibilidade e resposta celular de *Rhodnius robustus* e *Rhodnius prolixus* à infecção por linhagens de *Trypanosoma cruzi* TcI e TcIV circulantes no Amazonas

2.2 Específicos

- Investigar a susceptibilidade das espécies *Rhodnius robustus* e *Rhodnius prolixus* à infecção pelas linhagens de *Trypanosoma cruzi* TcI e TcIV;
- Descrever as alterações da resposta celular durante a infecção
- Demonstrar os tipos de hemócitos expressados após infecção pelas linhagens de *T. cruzi* TcI e TcIV.

3. PRODUTO DA DISSERTAÇÃO-MANUSCRITO

Suscetibilidade e resposta celular de *Rhodnius robustus* e *Rhodnius prolixus* a infecção por linhagens de *Trypanosoma cruzi* TcI e TcIV circulante no Amazonas

Matheus Martins Monteiro¹, Lucas Silva Ferreira¹, Laylah Kelre Magalhães², Susan Smith Doria¹, Jessica Vanina Ortiz¹, Emily de Sousa Moura¹, Denison Vital de Jesus¹, Arinéia Soares da Silva¹, Débora Raysa T. de Sousa¹, Jander Matos Guimarães^{1,3}, Yury Oliveira Chaves⁴, Wanderley de Souza^{1,3}, Helena Corrêa de Araújo Gomes⁵, Jorge Augusto de Oliveira Guerra^{1,2}, Maria das Graças Vale Barbosa Guerra^{1,2*}

1. Universidade do Estado do Amazonas (UEA); 2. Fundação de Medicina Tropical do Amazonas. Dr. Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD) 3.- Centro Multiusuário para Análise de Fenômenos Biomédico (CMABio) 4. Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) – 5. Instituto de Pesquisas Tecnológicas (IPT)

[*matheussmartins.1996@gmail.com](mailto:matheussmartins.1996@gmail.com)

Resumo

Triatomíneos são insetos, de grande importância médica, por serem hematófagos, hábitos que os insere no ciclo biológico do *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico da doença de Chagas, definida primariamente como uma enzootia de animais silvestres. Devido ao seu ciclo de vida complexo, o *T. cruzi* é classificado em sete genótipos, a depender do local de ocorrência denominadas de linhagens. *Rhodnius prolixus* possui grande relevância epidemiológica por ser encontrada colonizando domicílios em países da América do Sul. *Rhodnius robustus* é espécie silvestre que no Amazonas, invade as residências próximas a áreas de floresta, com altas taxas de infecção natural pela linhagem de *T. cruzi* TcI. Os hemócitos são as células que circulam na hemocele dos insetos, responsável por desempenhar várias funções imunológicas. Poucos estudos relatam a resposta imunológica de triatomíneos à invasão pelo *T. cruzi*. Esse trabalho teve como objetivo avaliar a suscetibilidade e a resposta celular de *Rhodnius robustus* e *Rhodnius prolixus* frente às linhagens *Trypanosoma cruzi* TcI e TcIV circulantes no Amazonas. Foram utilizadas ninfas de 5º estágio proveniente da colônia de hemíptera, do laboratório de entomologia da FMT/HVD, alimentadas com sangue humano contaminado com linhagens de TcI e TcIV crio preservadas, por membrana artificial. Após infecção, a caracterização dos hemócitos e alterações dessas

células em diferentes períodos de infecção foram realizadas por microscopia eletrônica de transmissão e citometria de fluxo. Observou-se que nas duas espécies houve maior suscetibilidade a linhagem de *T. cruzi* TcI, e em ambas foram encontrados cinco tipos de hemócitos, sendo eles: adipohémocitos, granulócitos, eonócitos, prohemócitos e plasmatócitos e não houve diferença significativa em relação a variação dessas células pós infecção.

Palavras-chave: Triatomíneos; Doença de chagas; Amazônia; Resposta imunológica celular; Hemócitos.

Introdução

Triatomíneos são insetos estritamente hematófagos, hábito que os insere no ciclo biológico do *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico da doença de Chagas (1). Há Cerca de 150 espécies, a maioria de hábito silvestre, podem ser inseridas no ciclo de transmissão desse parasito, que também realiza parte do seu ciclo em mais de cem espécies de mamíferos (2,3).

Os triatomíneos vivem em colônias, e seus habitats preferenciais são locais próximos à sua fonte alimentar. Algumas espécies por terem seus ecossistemas destruídos se adaptaram ao ambiente doméstico e peridoméstico estabelecendo colônias dentro ou próximo das residências, condição que os define como espécies domiciliadas, entre elas a espécie *Rhodnius prolixus* (4–7).

No trato digestivo do triatomíneo, o *T. cruzi* enfrenta barreiras para seu desenvolvimento (8,9), entre elas, atividade de enzimas digestivas (lectinas e aglutininas), membrana perimicrobiana, fatores hemolíticos, adesão ao epitélio e temperatura, que afetam diretamente a sobrevivência do parasito. (10,11), cuja evolução parece estar relacionada sua capacidade de se adaptar ao vetor, a suscetibilidade do vetor ao parasito ou a combinação de ambas (12). Isso reflete na busca de vetores padrões com alta capacidade de suscetibilidade e infectividade para as diferentes cepas (13–16).

As alternâncias de hospedeiros obrigam o *T. cruzi* á adaptações e modificações, resultando em variabilidade genética. Atualmente, com base em diferentes genótipos são conhecidas sete linhagens de *T. cruzi* (TcI-TcVI) e Tcbat (17–20).

Na Amazônia já foram registradas a ocorrência de 25 espécies de triatomíneos e no Amazonas, 12 espécies, todas de hábito silvestre, sendo *Panstrongylus geniculatus*, *Rhodnius robustus* e *Rhodnius pictipes* as mais frequentes, e *Rhodnius brethesi* a espécie responsável pela transmissão do *T. cruzi* em piaçabeiros na região de Barcelos, no alto Rio Negro (21). Nessa região não há domiciliação de vetores, mas frequentemente há invasão de adultos em ambientes domiciliares (22,23), com altas taxas de infecção natural por *T. cruzi* principalmente a linhagem TcI, a mesma registrada em casos isolados da DC aguda e casos crônicos (7). Este trabalho teve como objetivo avaliar suscetibilidade e a resposta celular de *Rhodnius robustus* e *Rhodnius prolixus* a infecção por linhagens de *Trypanosoma cruzi* TcI e TcIV circulantes no Amazonas.

Material e métodos

Local de estudo. Os experimentos e análises foram realizados na Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado e na Universidade do Estado do Amazonas.

Obtenção das ninfas de triatomíneos. Foram realizados experimentos utilizando ninfas 5^o. estádios de *R. robustus* e *R. prolixus* respectivamente, provenientes da colônia de triatomíneos do na Unidade Entomologia Nelson Ferreira Fé, FMT-HVD, criados sob temperatura média de 26°C e umidade relativa de 80 ± 5%.

Para a avaliação de suscetibilidade. Foram utilizadas 180 ninfas, distribuídas em dois grupos por espécie.

Grupo 1- *R. robustus*

- 30 ninfas alimentadas com TcI;
- 30 ninfas alimentadas com TcIV;
- 30 ninfas alimentadas não infectadas (controle);

Grupo 2 - *R. prolixus*

- 30 ninfas alimentadas com TcI;
- 30 ninfas alimentadas com TcIV;
- 30 ninfas alimentadas não infectadas (controle)

Foram utilizadas duas cepas de *T. cruzi*: 1) TcI – oriundas de casos humanos da DCA, isolados; 2) TcIV - de pacientes diagnosticados em surtos por transmissão oral. As cepas foram mantidas em nitrogênio, no laboratório de entomologia da FMT-HVD. Para o procedimento de cultura, foram descongeladas, e semeadas em garrafas, contendo meio MacNeal, Novy e Nicolle (NNN), cobertos por camada de solução salina a 0,9% suplementado com 140mg/ml de sulfato de gentamicina e são mantidas em estufa microbiológica a 28°C e monitoradas semanalmente para verificação do crescimento parasitário. Após o crescimento, as alíquotas da cultura foram transferidas para 10 ml de meio Schneider suplementado com soro fetal bovino para o aumento da massa parasitária. A contagem dos parasitas foi realizada em câmara de Neubauer utilizando a seguinte forma, contagem em 2 quadrante e dividido por 2 e multiplicados por 10⁵ para obter-se o número de parasito em 1ml.

Contaminação do sangue com *T. cruzi* para infecção experimental dos triatomíneos. Para a Infecção experimental foram utilizados tubos Falcon de 50mL, as amostras de 40mL de sangue humano foram centrifugadas a 4000 rpm por 15 minutos para a separação do soro e reservadas as hemácias em outro tubo para uso posterior.

Após a centrifugação, o soro foi separado com pipeta automática e colocado em um novo tubo Falcon 50 ml, e em seguida, submetido ao banho-maria a 52°C durante 60 minutos, para a inativação do sistema complemento. Após esse processo, foram adicionadas às formas parasitárias de *T. cruzi*, misturado com as hemácias reservadas reconstituindo desta forma o sangue total.

O processo de infecção experimental dos insetos foi realizado por meio de ensaios de alimentação indireta. O ensaio foi composto de um recipiente (alimentador) de vidro semelhante a um funil invertido com capacidade de 10 ml, revestido, na parte inferior, com membrana artificial, conectados a uma mangueira de borracha com 3cm diâmetro. O sangue contaminado com o parasito foi alocado no espaço entre o alimentador e a membrana artificial (Parafilm®).

Os alimentadores foram ligados a um sistema de água aquecida em um banho-maria que circula entre os recipientes, através de mangueiras, impulsionada por uma bomba hidráulica, mantidos numa temperatura que varia entre 37-38°. A infectividade dos

triatomíneos foi avaliada por exames de fezes à fresco, no período de 3, 7, 10, 12. e 15 dias, após a infecção em microscópio óptico.

Procedimentos para investigação de alterações na resposta celular após infecção pela expressão dos hemócitos

A ocorrência de resposta celular foi demonstrada pela expressão dos hemócitos, e as imagens foram captadas após infecções e coletada a hemolinfa, utilizando microscopia eletrônica de varredura e citometria de fluxo.

Microscopia Eletrônica de Transmissão - A hemolinfa foi retirada de uma das patas de 30 triatomíneos formando um pool fixadas em Karnovsky por 2h, centrifugada a 3500 x *rpm* por 5 min em temperatura ambiente para formação de pellet sem induzir danos celulares visíveis. Para isso foram utilizados tubos com as paredes siliconadas.

As células fixadas foram lavadas e tratadas com tetróxido de ósmio a 1%, e passada por uma série de desidratação utilizando acetona com concentrações crescentes de 70, 80, 90% por 15 minutos em cada concentração, finalizando com duas desidratações finais em acetona 100%, colocado em resina epon. Após 48 horas de polimerização. Por fim, cortes ultrafinos de 90 nm foram obtidos em ultramicrotomo JUM-7 (Jeol, Tóquio, Japão) e colocados em grades, pós-corados com soluções de acetato de uranila/citrato de chumbo, e examinados em microscópio eletrônico (Zeiss Leo 906-E, Oberkochen, Alemanha).

Citometria de fluxo. Após novas infecções em ninfas de 5 estadio, foram retirados o total de 10 µL de hemolinfa de um quantitativo de 2 triatomíneos, formando um pool. As amostras foram armazenadas em micro tubos estéreis e adicionados 100 µL de PBS 1x filtrado. Posterior a essa etapa ocorreram às análises morfométricas das populações celulares por citometria de fluxo, no período de 3, 7, 10 e 15 dias pós-infecção. O experimento foi realizado em replicata.

As análises por citometria de fluxo foram padronizadas através do uso do Laser Azul (488nm), as amostras foram analisadas utilizando equipamento FACScanto II da plataforma de citometria de fluxo - FIOCRUZ-AM, onde foram adquiridos 30.000 eventos com *flowrate* entre 1000 a 1500 eventos por segundo, levando em

consideração os ajustes dos parâmetros de tamanho (FSC) em 393 e complexidade (SSC) em 368 com threshold de 1.000, os dados gerados ao final das análises foram comparados com os achados na microscopia eletrônica (Figura 1).

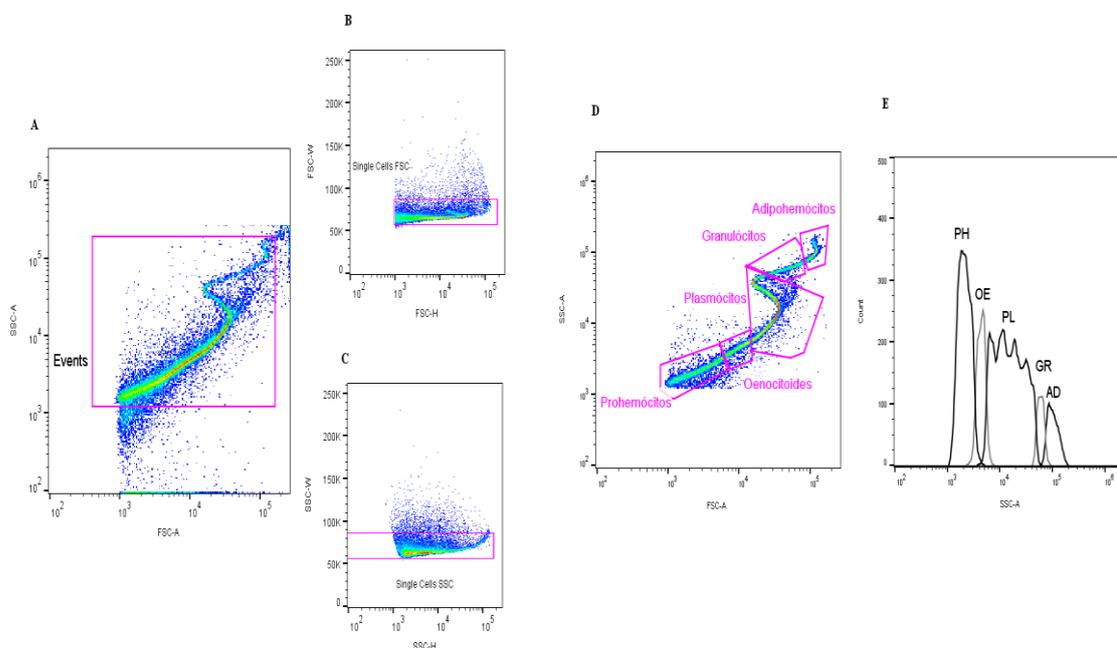


Figura 1: Análise morfométrica de hemócitos de triatomíneos por citometria de fluxo. (A) Análise de Tamanho (FSC-A) e Complexidade (SSC-A), (B) Análise de Células únicas por tamanho (FSC-H/FSC-W), (C) Análise de Células únicas por Complexidade (SSC-H/SSC-W), (D) Determinação de subpopulações de hemócitos por níveis de tamanho por complexidade, (E) Histograma de subpopulações de hemócitos por complexidade.

Análise de dados. Os dados foram tabulados em planilhas Excel e analisados através do programa estatístico Stata v.14 (StataCorp, USA). As variáveis qualitativas são apresentadas por suas frequências absolutas e relativas, e as variáveis quantitativas de distribuição paramétrica são apresentadas pela média \pm desvio padrão. Para a comparação das frequências foi realizado o teste Qui-quadrado de Pearson. Para a comparação das médias, inicialmente todos os dados foram submetidos ao teste de normalidade Shapiro-Wilk, e assim, realizados o teste t de Student (para comparação entre as linhagens e as espécies), o teste de variância ANOVA (para dados paramétricos) ou Kruskal-Wallis (para dados não paramétricos) a fim de comparar as médias entre as linhagens e o grupo controle.

Aspectos éticos. O projeto faz parte de um projeto maior sob título: Triatomíneos do estado do Amazonas: Distribuição espacial, bioecologia e importância epidemiológica, submetido e aprovado pelo CEP da FMT-HVD sob CAAE: 96950118.5.0000.0005.

Resultados

Suscetibilidade

Observou-se que 100 (83%) dos 120 espécimes de triatomíneos (60 de *R. robustus* e 60 *R. prolixus*) foram suscetíveis à infecção pelas linhagens TcI e TcIV. Quando comparados os resultados da positividade entre as duas espécies de triatomíneos pós-infecção, foi observado maior suscetibilidade em ambas as espécies (93,3%) por *T. cruzi* TcI, em relação as infectadas com TcIV (73,3%) com diferença significativa ($p=0.006$). Em relação ao tempo de detecção de infectividade ambas as espécies demonstram positividade aos 3 e 7 dias pós infecção com TcI com diferença significativa ($p<0.001$). Após o 7º dia de infecção ambas as espécies apresentaram dados semelhantes para infecção pelas duas linhagens (Tabela 1).

Tabela 1 – Resultados da suscetibilidade de *Rhodnius robustus* e *R. prolixus* à infecção com as linhagens de *Trypanosoma cruzi* TcI e TcIV (* Teste qui-quadrado de Pearson).

| Variáveis | <i>R. robustus</i> | | <i>R. prolixus</i> | | Total /% | | Total Geral/% | p-valor* |
|---------------------|--------------------|------------------|--------------------|------------------|-----------------|----------------|--------------------|----------|
| | TcI | TcIV | TcI | TcIV | TcI | TcIV | | |
| Positividade | 28/30 (93,3%) | 22/30 (73,3%) | 28/30 (93,3%) | 22/30 (73,3%) | 56/60 (93,3) | 44/60 (73%) | 100/120 (83,3%) | 0.006 |
| Leitura | | | | | | | | |
| 3 dias | 5 | 1 | 4 | 2 | 9 | 3 | 12 (50) | |
| 7 dias | 5 | 3 | 6 | 2 | 11 | 5 | 16 (66,6) | |
| 10 dias | 6 | 6 | 6 | 6 | 12 | 12 | 24 (100) | <0.001 |
| 12 dias | 6 | 6 | 6 | 6 | 12 | 12 | 24 (100) | |
| 15 dias | 6 | 6 | 6 | 6 | 12 | 12 | 24 (100) | |

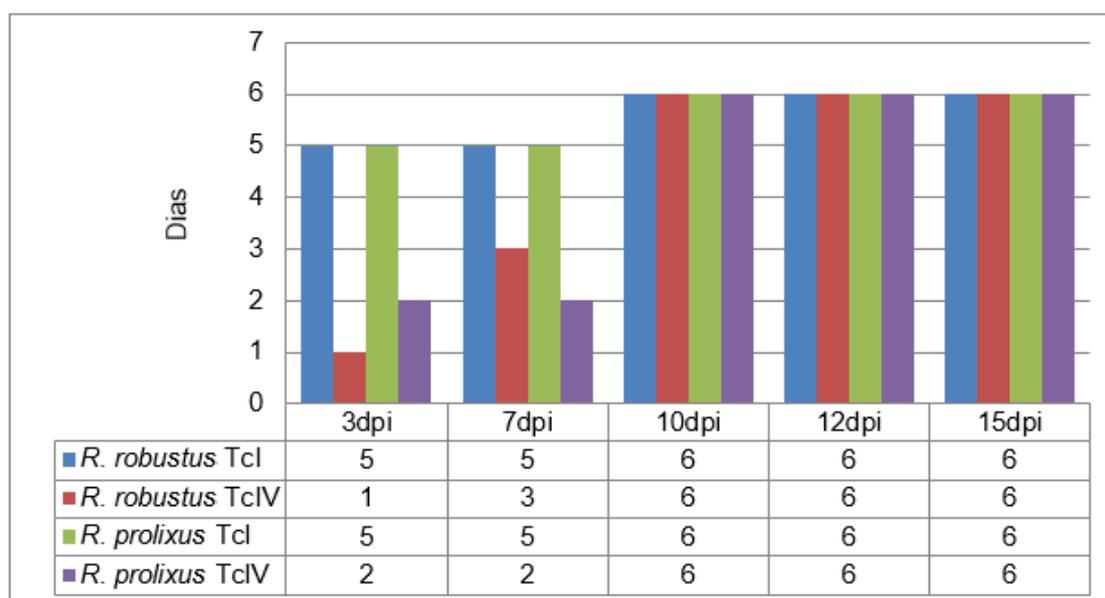


Figura 2: Resultado do tempo de observação (dpi= Dia pós infecção) de *R. robustus* e *R. prolixus* pós infecção com linhagens TcI e TcIV de *Trypanosoma cruzi*.

Resposta celular das espécies *Rhodnius robustus* e *Rhodnius prolixus* após infecção pelo *Trypanosoma cruzi* TcI e TcIV.

De maneira geral após a infecção das duas espécies de triatomíneos pelas linhagens de *T. cruzi* ao longo do período de observação, foram registradas a ocorrência de cinco tipos de células morfologicamente distintas: prohemócitos, plasmatócitos, granulócitos, adipohemócitos e oenócitos (Figura 3), caracterizados por tamanho (FSC) e complexidade (SSC). Observou-se uma heterogeneidade de hemócitos, mas não houve diferença significativa em relação às médias da quantidade de células encontradas, exceto para os prohemócitos ($p= 0.048$) (Tabela 2).

Tabela 2 – Análise de expressão de hemócitos entre as espécies *R. prolixus* e *R. robustus*

| Variáveis | <i>Rhodnius prolixus</i> n = 16 | <i>Rhodnius robustus</i> n = 16 | p-valor |
|-----------------------|------------------------------------|------------------------------------|---------|
| Hemócitos | | | |
| Prohemócitos | 31.2 ± 7.2 | 36.2±6.4 | 0.048 |
| Plasmatócitos | 37.4 ± 8.5 | 32.7±5.7 | 0.078 |
| Granulócitos | 5.0 ± 1.7 | 3.0 ±1.4 | 0.084 |
| Adipohemócitos | 5.2 ± 3.1 | 3.3 ± 2.2 | 0.057 |
| Oenócitos | 13.0 ± 2.3 | 13.5±2.9 | 0.574 |

* Teste t de Student (para comparação entre as espécies)

Em relação à expressão das células entre as infecções com as linhagens *T. cruzi* e o grupo controle, também não houve diferença significativa, embora tenha sido observada maior expressão de prohemócitos nos insetos com infecção (Tabela 3). Em relação à variação das células e o período das infecções, não se observaram diferenças entre as duas espécies de triatomíneos, exceto em *R. robustus* no 3º dia pós-infecção com as duas linhagens com diferença significativa ($p=0.020$) na expressão de oenócitos (Figura 3).

Tabela 3 – Análise de expressão de hemócitos entre as infecções pelas linhagens TcI e TcIV.

| Variáveis | Controle n= 8 | TcI n = 16 | TcIV n = 16 | p-valor |
|-----------------------|---------------------|------------------|---------------------|---------|
| Hemócitos | | | | |
| Prohemócitos | 29.5 ± 9.5 | 33.6 ± 7.6 | 33.7 ± 6.9 | 0.618 |
| Plasmatócitos | 39.2 ± 9.9 | 35.1 ± 7.9 | 35.0 ± 7.3 | 0.638 |
| Granulócitos | 5.2 ± 2.7 | 4.3 ± 1.5 | 4.7 ± 1.7 | 0.180 |
| Adipohemócitos | 4.9 ± 2.2 | 4.2 ± 2.4 | 4.3 ± 3.3 | 0.356 |
| Oenócitos | 11.6[10.9- 15.0] | 13.8 [12.8-15.9] | 12.9[12.0- 13.6] | 0.210* |

Teste anova. *Teste de kruskall Wallis .

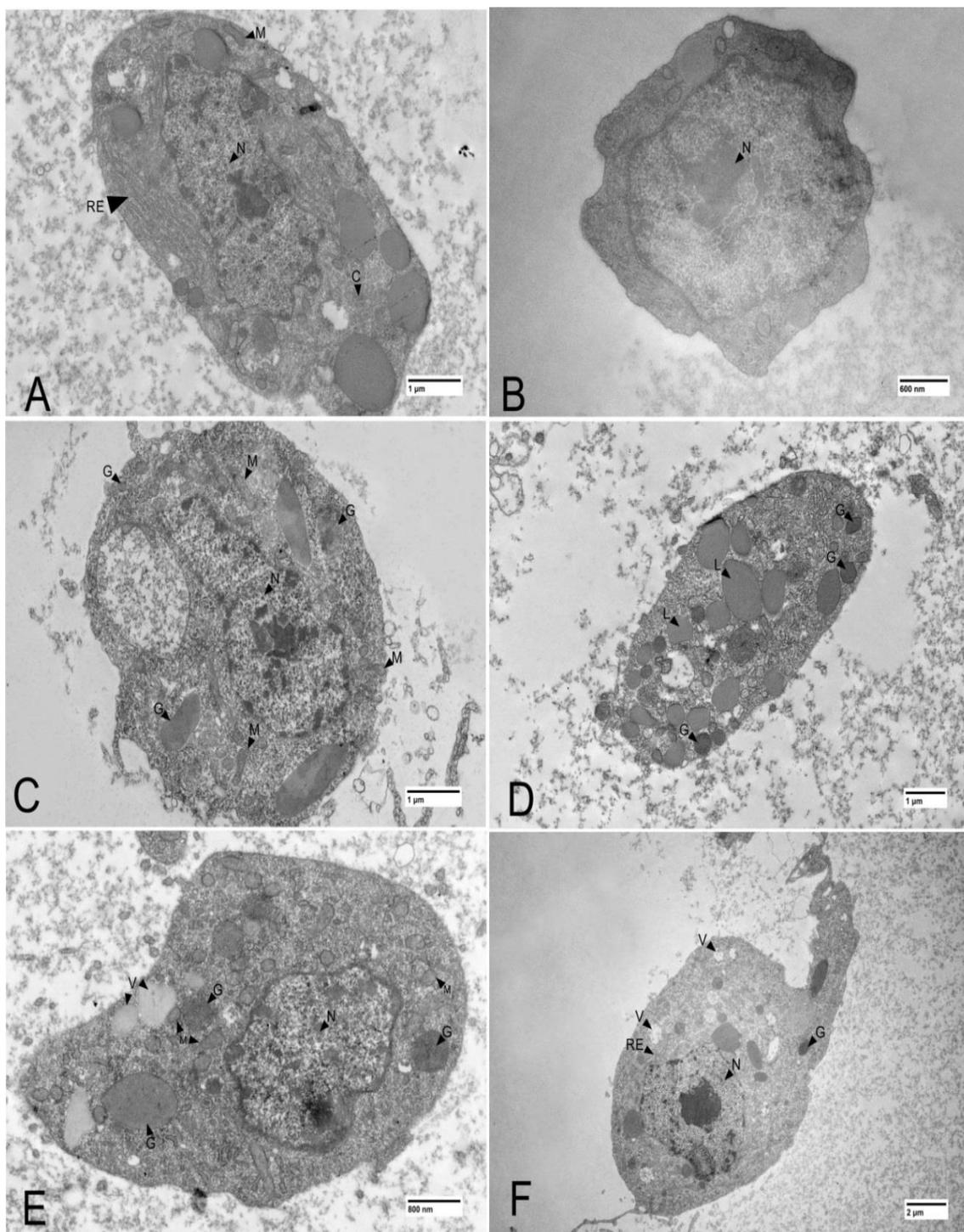


Figura 3: (A) Plasmatócitos, (B) Prohemócitos, (C e E) Granulócitos, (D) Adipohemócitos, (F) Oenócitos As setas indicam M, mitocôndrias; N, núcleo; V, vesículas; L, gotícula lipídica; RE, retículo endoplasmático; G, grânulo

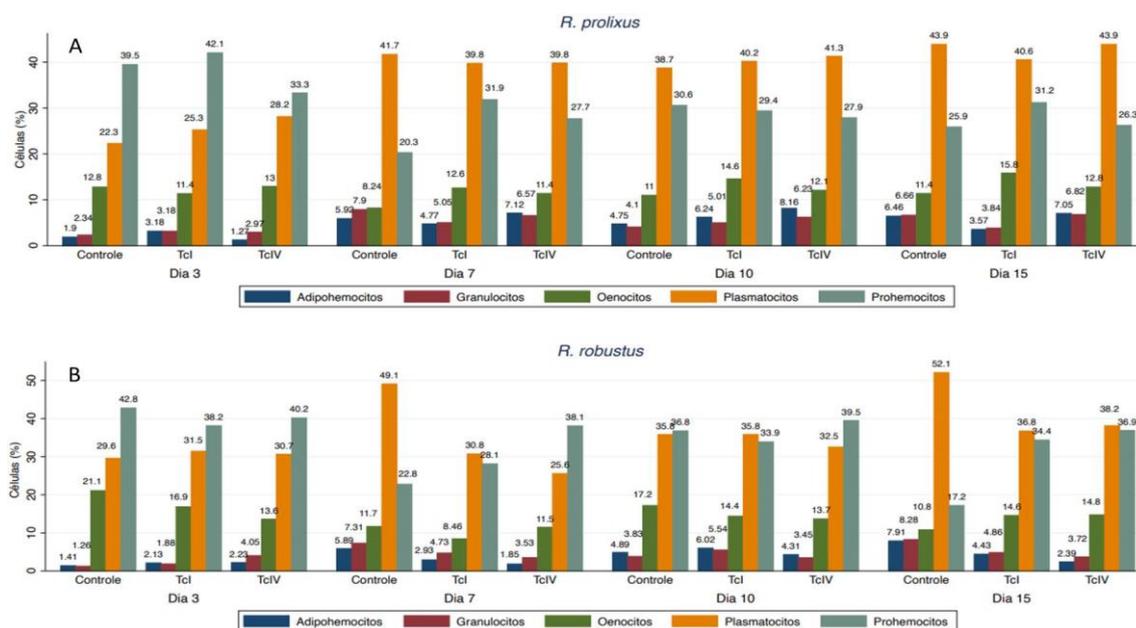


Figura 4: (A) Percentual de hemócitos expressos no período pós-infecção pelas linhagens TcI e TcIV em triatomíneos das espécies *R. prolixus*. (B) Percentual de hemócitos expressos no período pós-infecção pelas linhagens TcI e TcIV em triatomíneos das espécies *R. robustus*.

Discussão

No Brasil são registradas 68 das 150 espécies de triatomíneos conhecidas (4,24), e destas, 25 espécies já foram registradas na Amazônia, todas de hábito silvestre, sendo 12 delas encontradas no Amazonas (25–27). Nesse estudo apresenta-se pela primeira vez observações sobre a suscetibilidade de duas espécies de triatomíneos, *R. robustus* encontrada em ambiente silvestre no Amazonas e *R. prolixus* oriunda de países vizinhos com hábitos domiciliares, frente a linhagens silvestres de *Trypanosoma cruzi* - TcI e TcIV circulantes no Amazonas. Os dados observados sugerem que ambas as espécies apresentaram baixa capacidade de resposta a invasão do parasito em seu organismo após infecção, evidenciando sua importância na manutenção do ciclo de *T. cruzi*.

Na Amazônia, *R. robustus* é uma espécie estritamente silvestre, que vem sendo encontrada dentro dos domicílios de forma isolada, com altas taxas de infecção natural pelo *T. cruzi* (23), principalmente com a linhagem TcI, que de forma geral tem sido registrada em reservatórios silvestres e em casos humanos isolados, da DC

aguda, demonstrando a vulnerabilidade da população ao ciclo de transmissão da doença de Chagas uma vez que esses registros ocorrem em residências construídas próximo às áreas de floresta (7).

Embora as espécies de triatomíneos tenham apresentado menor suscetibilidade ao *T. cruzi* TcIV nas primeiras horas de observação pós infecção, o resultado final foi semelhante, ou seja ambas espécies são suscetíveis as duas linhagens encontradas nessa região, onde atualmente ocorre o maior número de casos da doença de Chagas na fase aguda seja de forma isolada, onde tem sido associada a infecção por *T. cruzi* TcI (28) ou em surtos por transmissão oral após o consumo de alimentos contaminados, predominando nessas situações a linhagem TcIV (29,30). Ressalta-se que *R. prolixus* é considerada uma importante espécie vetora de doença de Chagas na Venezuela e na Colômbia, por ser encontrada colonizando residências, particularmente em áreas rurais (15).

Com relação a resposta celular das duas espécies de triatomíneos infectadas com as duas linhagens de *T. cruzi*, neste estudo não se observou nenhum achado que caracterize maior ou menor resposta celular após invasão do parasito. De acordo com a literatura disponível, ficou evidente que não houve diferença entre a expressão das células, caracterizadas pelos cinco tipos de hemócitos quando comparadas a estudos realizados com outras espécies de triatomíneos, alimentadas com sangue sem infecção, cujos resultados foram semelhantes na expressão de hemócitos como, por exemplo, *Dipetalogaster maxima* (31) *Panstrongylus megistus* (32) e *Rhodnius neglectus*, *Triatoma infestans* (33), inclusive estudo com *Rhodnius prolixus* (34).

Ressalta-se, no entanto, que este estudo apresenta pela primeira vez a avaliação da resposta celular de uma espécie de triatomíneos silvestre e uma espécie considerada domiciliada em países vizinhos, infectados com linhagens de *T. cruzi* circulante no Amazonas. O uso da citometria de fluxo para estudar a resposta celular de triatomíneos da espécie *D. máxima* foi realizado por Moyetta e colaboradores (31) com objetivo semelhante em relação a morfometria, entretanto com os procedimentos metodológicos diferentes dos aqui utilizados. O fato do *T. cruzi* realizar seu ciclo na luz do intestino do inseto, sem contato com a hemocele, reflete na inexistência de diferenciação de hemócitos entre insetos infectados ou não.

De maneira geral a descrição da morfometria de hemócitos em triatomíneos, não segue uma padronização na metodologia utilizada. Nesse estudo, a descrição morfométrica dos hemócitos, foi feita usando ferramentas metodológicas de alta resolução e precisão como a MET e Citometria de fluxo, permitindo o registro das variações morfológicas fornecendo parâmetros para trabalhos futuros (31).

Referências

1. Chagas C. Nova tripanozomíase humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. Vol. 1, Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. 1909. p. 159–218.
2. Azambuja P, Ratcliffe NA, Garcia ES. Towards an understanding of the interactions of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* within the reduviid insect host *Rhodnius prolixus*. *An Acad Bras Cienc*. 2005;77(3):397–404.
3. Garcia ES, Genta FA, De Azambuja P, Schaub GA. Interactions between intestinal compounds of triatomines and *Trypanosoma cruzi*. *Trends Parasitol*. 2010;26(10):499–505.
4. Galvão C, Paula AS de. Sistemática e evolução dos vetores. *Vetores da doença de Chagas no Brasil*. 2014. 26–32 p.
5. Jurberg J, Rodrigues JMS, Moreira FFF, Dale C, Cordeiro IRS, Lamas Jr VD, et al. Atlas Iconográfico dos Triatomíneos do Brasil (Vetores da Doença de Chagas). 2014;58.
6. Buxton PA. The biology of a blood-sucking bug, *Rhodnius prolixus*. London Sch Hyg Trop Med. 1930;
7. Santana RAG, Magalhães LKC, Magalhães LKC, Prestes SR, Maciel MG, Da Silva GAV, et al. *Trypanosoma cruzi* strain Tc1 is associated with chronic Chagas disease in the Brazilian Amazon. *Parasites and Vectors*. 2014;7(1):1–7.
8. Garcia ES, Azambuja P. Development and interactions of *Trypanosoma cruzi* within the insect vector. *Parasitol Today*. 1991 Jan;7(9):240–4.

9. Lehane MJ. The Biology of Blood-Sucking in Insects [Internet]. Cambridge: Cambridge University Press; 2005. Available from: <http://ebooks.cambridge.org/ref/id/CBO9780511610493>
10. Pereira ME, Andrade AFB, Ribeiro JMC. Lectins of Distinct Specificity in *Rhodnius prolixus* Interact Selectively with *Trypanosoma cruzi*. *Science* (80-) [Internet]. 1981 Feb 6;211(4482):597–600. Available from: <https://www.science.org/doi/10.1126/science.7006082>
11. Mello CB, Azambuja P, Garcia ES, Ratcliffe NA. Differential in Vitro and in Vivo Behavior of Three Strains of *Trypanosoma cruzi* in the Gut and Hemolymph of *Rhodnius prolixus*. *Exp Parasitol* [Internet]. 1996 Mar;82(2):112–21. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0014489496900156>
12. de Fuentes-Vicente JA, Gutiérrez-Cabrera AE, Flores-Villegas AL, Lowenberger C, Benelli G, Salazar-Schettino PM, et al. What makes an effective Chagas disease vector? Factors underlying *Trypanosoma cruzi*-triatomine interactions. *Acta Trop* [Internet]. 2018 Jul;183:23–31. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0001706X17314158>
13. Dias E. Técnica do xenodiagnóstico na moléstia de Chagas. *Mem Inst Oswaldo Cruz* [Internet]. 1940;35(2):335–42. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-02761940000200006&lng=pt&tlng=pt
14. Alvarenga NJ, Bronfen E. Interação do *Trypanosoma cruzi* com diferentes vetores: uso para o xenodiagnóstico. *Rev Soc Bras Med Trop* [Internet]. 1984 Sep;17(3):145–9. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0037-86821984000300007&lng=pt&tlng=pt
15. Silva IG da, Luquetti AO, Silva HHG da. Importância do método de obtenção das dejeções dos triatomíneos na avaliação da suscetibilidade triatomínica para *Trypanosoma cruzi*. *Rev Soc Bras Med Trop*. 1993 Mar;26(1):19–24.
16. Martins LP, da Rosa JA, Castanho RE, Sauniti GL, Medeiros H. Susceptibilidade de *Rhodnius neglectus*, *Rhodnius robustus* et *Triatoma infestans* (Hemiptera,

- Reduviidae, Triatominae) à infecção por duas cepas de *Trypanosoma cruzi* (Kinetoplastidae, Trypanosomatidae) utilizando xenodiagnóstico artificial. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2000;33(6):559–63.
17. Zingales B. *Trypanosoma cruzi* genetic diversity: Something new for something known about Chagas disease manifestations, serodiagnosis and drug sensitivity. *Acta Trop* [Internet]. 2018;184(September 2017):38–52. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.09.017>
 18. Monteiro WM, Kelre L, Magalhães C, Regina A, Sá N De, Gomes ML. *Trypanosoma cruzi* IV Causando Surto de Doença de Chagas Aguda e Infecções por Diferentes Haplótipos na Amazônia Ocidental Brasileira. 2012;(October 2010):1–10.
 19. Zingales B, Miles MA, Campbell DA, Tibayrenc M, Macedo AM, Teixeira MMG, et al. The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: Rationale, epidemiological relevance and research applications. *Infect Genet Evol* [Internet]. 2012 Mar;12(2):240–53. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1567134811004564>
 20. Brenière SF, Waleckx E, Barnabé C. Over Six Thousand *Trypanosoma cruzi* Strains Classified into Discrete Typing Units (DTUs): Attempt at an Inventory. Debrabant A, editor. *PLoS Negl Trop Dis* [Internet]. 2016 Aug 29;10(8):e0004792. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pntd.0004792>
 21. Coura JR, Junqueira ACV, Fernandes O, Valente SAS, Miles MA. Emerging Chagas disease in Amazonian Brazil. *Trends Parasitol* [Internet]. 2002 Apr;18(4):171–6. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1471492201022000>
 22. Fé NF, Magalhães LK, Fé FA, Arakian SK, Monteiro WM, Barbosa MDGV. Ocorrência de triatomíneos em ambientes silvestres e domiciliares do município de Manaus, Estado do Amazonas. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2009;42(6):642–6.
 23. Rubens Celso Anrade da Silva Junior. Triatomíneos do Amazonas: Invasão de domicílios, infecção natural por *Trypanosoma cruzi* TcI, TcII, TcIII e TcIV e

- percepção da população sobre a infecção chagásica. 2019.
24. Tartarotti E, Oliveira-Azereado MT, Ceron CR. Problemática vetorial da doença de chagas. *Arq Ciênc Saúde*. 2004;11(1):44–7.
 25. Guhl F. Chagas disease in Andean countries. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2007;102(SUPPL. 1):29–37.
 26. Alzogaray RA, Zerba EN. *Rhodnius prolixus* intoxicated. *J Insect Physiol*. 2017;97:93–113.
 27. Santos VRC dos, Meis J de, Savino W, Andrade JAA, Vieira JR dos S, Coura JR, et al. Acute Chagas disease in the state of Pará, Amazon Region: is it increasing? *Mem Inst Oswaldo Cruz* [Internet]. 2018 May 7;113(5). Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-02762018000500306&lng=en&tlng=en
 28. Barbosa M das GV, Ferreira JM BB, Arcanjo ARL, Santana RAG, Magalhães LKC, Magalhães LKC, et al. Chagas disease in the state of Amazonas: History, epidemiological evolution, risks of endemicity and future perspectives. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2015;48(September 2014):27–33.
 29. Monteiro WM, Magalhães LK, Santana Filho FS, Borborema M, Silveira H, Barbosa MDG V. *Trypanosoma cruzi* TcIII/Z3 genotype as agent of an outbreak of Chagas disease in the Brazilian Western Amazonia: Short Communication. *Trop Med Int Heal*. 2010;15(9):1049–51.
 30. Magalhães L, Silveira H, Prestes S, Costa Magalhães LK, Santana RA, Ramasawmy R, et al. Bioecological aspects of triatomines and marsupials as wild *Trypanosoma cruzi* reservoirs in urban, peri-urban and rural areas in the Western Brazilian Amazon. *Med Vet Entomol*. 2021;35(3):389–99.
 31. Reduviidae H, Moyetta NR, Ramos O, Leyria J, Canavoso E. Morphological and Ultrastructural Characterization of Hemocytes in an Insect Model, the Hematophagous *Dipetalogaster maxima* (Hemiptera: Reduviidae). 2021;
 32. Barracco MA, Oliveira R de, Schlemper Junior B. The hemocytes of

- Panstrogylus Megistus (Hemiptera: Reduviidae). Mem Inst Oswaldo Cruz. 1987 Sep;82(3):431–8.
33. Azambuja P de, Garcia ES, Ratcliffe NA. Aspects of classification of Hemiptera hemocytes from six triatomine species. Mem Inst Oswaldo Cruz [Internet]. 1991 Mar;86(1):1–10. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-02761991000100002&lng=en&tlng=en
34. Borges AR. Estudo ultraestrutural da resposta imunecelular em *Rhodnius prolixus* (Hemiptera; Reduviidae; Triatominae). 2006;105.

4. LIMITAÇÃO E PERSPECTIVAS

A principal limitação foi a o cenário da pandemia pelo COVID-19 que atrasou a execução do estudo e impossibilitou a realização do trabalho inicialmente desenhado.

Entre as perspectivas, está à experiência com a Citometria de fluxo, ferramenta que pode ser utilizada em estudos futuros.

5. CONCLUSÃO

- A espécies *Rhodnius robustus* e *Rhodnius prolixus* mostraram-se suscetíveis à infecção experimental em laboratório com as linhagens de *Trypanosoma cruzi* TcI e TcIV, sendo maior para linhagem TcI.

- Foram encontrados cinco tipos de hemócitos expressados por *Rhodnius robustus* e *Rhodnius prolixus* após infecção pelas linhagens de *T. cruzi* TcI e TcIV, sendo eles: prohemócitos, plasmatócitos, granulócitos, adipohémocitos e os oenócitos

- Demonstrar a ocorrência de alterações na resposta celular durante a infecção

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Stork NE. How Many Species of Insects and Other Terrestrial Arthropods Are There on Earth? *Annu Rev Entomol.* 2018;63(September 2017):31–45.
2. Azambuja P, Feder D, Mello CB, Gomes SAO, Garcia ES. Immunity in *Rhodnius prolixus*: Trypanosomatid-vector Interactions. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1999;94(SUPPL. 1):219–22.
3. Ratcliffe NA, Rowley AF, Fitzgerald SW, Rhodes CP. Invertebrate Immunity: Basic Concepts and Recent Advances. *Int Rev Cytol.* 1985;97(C):183–350.
4. Mwangi VI, Martinez EG, Leda RL, Catunda MESLA, Dias A de S, Padron Antonio Y, et al. Resisting an invasion: A review of the triatomine vector (Kissing bug) defense strategies against a *Trypanosoma* sp infection. *Acta Trop.* 2023 Feb;238:106745.
5. Lavine MD, Strand MR. Insect hemocytes and their role in immunity. *Insect Biochem Mol Biol [Internet].* 2002 Oct;32(10):1295–309. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0965174802000929>
6. Jules A. Hoffmann and Jean-Marc Reichhart. *Drosophila* innate immunity: an evolutionary perspective. *Drug Dev Deliv.* 2002;26–31.
7. Brennan CA, Anderson K V. *Drosophila*: The genetics of innate immune recognition and response. *Annu Rev Immunol.* 2004;22:457–83.
8. Wang YP, Lai R. Insect antimicrobial peptides: structures, properties and gene regulation. *Dong wu xue yan jiu = Zool Res / “Dong wu xue yan jiu” bian ji we yuan hui bian ji.* 2010;31(1):27–34.
9. Cartwright IJ. Separation and analysis of phospholipids by thin layer chromatography. *Methods Mol Biol.* 1993;19:153–67.
10. Schmid-Hempel P. Evolutionary ecology of insect immune defenses. *Annu Rev Entomol.* 2005;50(22):529–51.
11. Li Y, Xiang Q, Zhang Q, Huang Y, Su Z. Overview on the recent study of antimicrobial peptides: Origins, functions, relative mechanisms and application. *Peptides [Internet].* 2012;37(2):207–15. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.peptides.2012.07.001>
12. Mihajlovic M, Lazaridis T. Antimicrobial peptides bind more strongly to membrane pores. *Biochim Biophys Acta - Biomembr [Internet].* 2010;1798(8):1494–502. Available from:

- <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamem.2010.02.023>
13. Jean-François F, Elezgaray J, Berson P, Vacher P, Dufourc EJ. Pore formation induced by an antimicrobial peptide: Electrostatic effects. *Biophys J*. 2008;95(12):5748–56.
 14. Thevissen K, Kristensen HH, Thomma BPHJ, Cammue BPA, François IEJA. Therapeutic potential of antifungal plant and insect defensins. *Drug Discov Today*. 2007;12(21–22):966–71.
 15. Wua G, Wub H, Li L, Fan X, Ding J, Li X, et al. Membrane aggregation and perturbation induced by antimicrobial peptide of S-thanatin. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. 2010;395(1):31–5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.03.107>
 16. Cooper D, Eleftherianos I. Memory and specificity in the insect immune system: Current perspectives and future challenges. *Front Immunol*. 2017;8(MAY).
 17. C.B. Mello, E.S. Garcia, N.A. Ratcliffe PA. T. cruzi and T. rangeli interplay with hemolymph components of R. prolixus.pdf. *Journal of invertebrate pathology*. 1995. p. 261–8.
 18. Garcia ES, Machado EMM, Azambuja P. Inhibition of hemocyte microaggregation reactions in *Rhodnius prolixus* larvae orally infected with *Trypanosoma rangeli*. *Exp Parasitol*. 2004;107(1–2):31–8.
 19. Strand MR. Insect Hemocytes and Their Role in Immunity. *Insect Immunol*. 2008;32:25–47.
 20. Blow F, Douglas AE. The hemolymph microbiome of insects. *J Insect Physiol* [Internet]. 2019;115(October 2018):33–9. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2019.04.002>
 21. Canavoso LE, Rubiolo ER. Metabolic Post-feeding Changes in Fat Body and Hemolymph of *Dipetalogaster maximus* (Hemiptera:Reduviidae). *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1998;93(2):225–30.
 22. Dubovskiy IM, Kryukova NA, Glupov V V., Ratcliffe NA. Encapsulation and nodulation in insects. *Invertebr Surviv J*. 2016;13(July):229–46.
 23. GOMES KKDSB. Resposta imune de *rhodnius prolixus* frente á infecção por *trypanosoma cruzi*:funções de espécies reativas de nitrogênio na interação parasita, vetor e microbiota. 2016;
 24. Reduviidae H, Moyetta NR, Ramos O, Leyria J, Canavoso E. Morphological and Ultrastructural Characterization of Hemocytes in an Insect Model, the

- Hematophagous *Dipetalogaster maxima* (Hemiptera: Reduviidae). 2021;
25. Hillyer JF. Insect immunology and hematopoiesis. *Dev Comp Immunol* [Internet]. 2016;58:102–18. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.dci.2015.12.006>
 26. Salcedo-Porras N, Lowenberger C. The innate immune system of kissing bugs, vectors of chagas disease. *Dev Comp Immunol* [Internet]. 2019;98(April):119–28. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.dci.2019.04.007>
 27. Borges AR, Santos PN, Furtado AF, Figueiredo RCBQ. Phagocytosis of latex beads and bacteria by hemocytes of the triatomine bug *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae). *Micron*. 2008;39(4):486–94.
 28. Satyavathi V V., Minz A, Nagaraju J. Nodulation: An unexplored cellular defense mechanism in insects. *Cell Signal* [Internet]. 2014;26(8):1753–63. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cellsig.2014.02.024>
 29. Ratcliffe NA, Gagen SJ. Studies on the in vivo cellular reactions of insects: An ultrastructural analysis of nodule formation in *Galleria mellonella*. *Tissue Cell*. 1977;9(1):73–85.
 30. Garcia ES, Castro DP, Figueiredo MB, Azambuja P. Immune homeostasis to microorganisms in the guts of triatomines (Reduviidae) - A review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2010;105(5):605–10.
 31. Chagas C. 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. Vol. 1, Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. 1909. p. 159–218.
 32. Poinar G. A primitive triatomine bug, *Paleotriatoma metaxytaxa* gen. et sp. nov. (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae), in mid-Cretaceous amber from northern Myanmar. *Cretac Res* [Internet]. 2019;93:90–7. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.cretres.2018.09.004>
 33. Galvão C, Paula AS de. Sistemática e evolução dos vetores. *Vetores da doença de Chagas no Brasil*. 2014. 26–32 p.
 34. Jurberg J, Rodrigues JMS, Moreira FFF, Dale C, Cordeiro IRS, Lamas Jr VD, et al. Atlas Iconográfico dos Triatomíneos do Brasil (Vetores da Doença de Chagas). 2014;58.
 35. Buxton PA. The biology of a blood-sucking bug, *Rhodnius prolixus*. *London Sch Hyg Trop Med*. 1930;
 36. Santana RAG, Magalhães LKC, Magalhães LKC, Prestes SR, Maciel MG, Da

- Silva GAV, et al. Trypanosoma cruzi strain TcI is associated with chronic Chagas disease in the Brazilian Amazon. Parasites and Vectors. 2014;7(1):1–7.
37. Tartarotti E, Oliveira-Azeredo MT, Ceron CR. Problemática vetorial da doença de chagas. Arq Ciênc Saúde. 2004;11(1):44–7.
 38. Guhl F. Chagas disease in Andean countries. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2007;102(SUPPL. 1):29–37.
 39. Alzogaray RA, Zerba EN. Rhodnius prolixus intoxicated. J Insect Physiol. 2017;97:93–113.
 40. Santos VRC dos, Meis J de, Savino W, Andrade JAA, Vieira JR dos S, Coura JR, et al. Acute Chagas disease in the state of Pará, Amazon Region: is it increasing? Mem Inst Oswaldo Cruz [Internet]. 2018 May 7;113(5). Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-02762018000500306&lng=en&tlng=en
 41. Rocha D da S, Jurberg J, Galvão C. Atividade de Voo de Rhodnius robustus Larrousse em Laboratório (Hemiptera:Reduviidae). EntomoBrasilis. 2014;7(1):16–9.
 42. Rocha S, Jurberg J, Carcavallo RU, Af O. Influência da temperatura e umidade no desenvolvimento ninfal de Rhodnius robustus * Influence of temperature and humidity on the nymphal development of Rhodnius robustus. 2001;35(4):400–6.
 43. Fé NF, Magalhães LK, Fé FA, Arakian SK, Monteiro WM, Barbosa MDGV. Ocorrência de triatomíneos em ambientes silvestres e domiciliares do município de Manaus, Estado do Amazonas. Rev Soc Bras Med Trop. 2009;42(6):642–6.
 44. Magalhães L, Silveira H, Prestes S, Costa Magalhães LK, Santana RA, Ramasawmy R, et al. Bioecological aspects of triatomines and marsupials as wild Trypanosoma cruzi reservoirs in urban, peri-urban and rural areas in the Western Brazilian Amazon. Med Vet Entomol. 2021;35(3):389–99.
 45. Gurgel-Gonçalves R, Abad-Franch F, Ferreira JBC, Santana DB, Cuba CAC. Is Rhodnius prolixus (Triatominae) invading houses in central Brazil? Acta Trop. 2008;107(2):90–8.
 46. Azambuja P, Ratcliffe NA, Garcia ES. Towards an understanding of the interactions of Trypanosoma cruzi and Trypanosoma rangeli within the reduviid insect host Rhodnius prolixus. An Acad Bras Cienc. 2005;77(3):397–404.
 47. Tyler KM, Engman DM. The life cycle of Trypanosoma cruzi revisited. Int J Parasitol. 2001;31(5–6):472–81.

48. Kessler RL, Contreras VT, Marlière NP, Aparecida Guarneri A, Villamizar Silva LH, Mazzarotto GACA, et al. Recently differentiated epimastigotes from *Trypanosoma cruzi* are infective to the mammalian host. *Mol Microbiol*. 2017;104(5):712–36.
49. Ana Paula Machado do Nascimento. Estudo da dinamica da co-infecção por *Trypanosoma cruzi* e *trypanosoma rangeli* no hospedeiro invertebrado e no hospedeiro mamífero. 2015;37–40.
50. Garcia ES, Genta FA, De Azambuja P, Schaub GA. Interactions between intestinal compounds of triatomines and *Trypanosoma cruzi*. *Trends Parasitol*. 2010;26(10):499–505.
51. Zingales B. *Trypanosoma cruzi* genetic diversity: Something new for something known about Chagas disease manifestations, serodiagnosis and drug sensitivity. *Acta Trop* [Internet]. 2018;184(September 2017):38–52. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.09.017>
52. Monteiro WM, Kelre L, Magalhães C, Regina A, Sá N De, Gomes ML. *Trypanosoma cruzi* IV Causando Surto de Doença de Chagas Aguda e Infecções por Diferentes Haplótipos na Amazônia Ocidental Brasileira. 2012;(October 2010):1–10.
53. Zingales B, Miles MA, Campbell DA, Tibayrenc M, Macedo AM, Teixeira MMG, et al. The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: Rationale, epidemiological relevance and research applications. *Infect Genet Evol* [Internet]. 2012 Mar;12(2):240–53. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1567134811004564>
54. Brenière SF, Waleckx E, Barnabé C. Over Six Thousand *Trypanosoma cruzi* Strains Classified into Discrete Typing Units (DTUs): Attempt at an Inventory. Debrabant A, editor. *PLoS Negl Trop Dis* [Internet]. 2016 Aug 29;10(8):e0004792. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pntd.0004792>
55. Garcia ES, Azambuja P. Development and interactions of *Trypanosoma cruzi* within the insect vector. *Parasitol Today*. 1991 Jan;7(9):240–4.
56. Lehane MJ. *The Biology of Blood-Sucking in Insects* [Internet]. Cambridge: Cambridge University Press; 2005. Available from: <http://ebooks.cambridge.org/ref/id/CBO9780511610493>
57. Pereira ME, Andrade AFB, Ribeiro JMC. Lectins of Distinct Specificity in

- Rhodnius prolixus Interact Selectively with Trypanosoma cruzi. Science (80-) [Internet]. 1981 Feb 6;211(4482):597–600. Available from: <https://www.science.org/doi/10.1126/science.7006082>
58. Mello CB, Azambuja P, Garcia ES, Ratcliffe NA. Differential in Vitro and in Vivo Behavior of Three Strains of Trypanosoma cruzi in the Gut and Hemolymph of Rhodnius prolixus. Exp Parasitol [Internet]. 1996 Mar;82(2):112–21. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0014489496900156>
 59. Kollien AH, Schaub GA. Development of Trypanosoma cruzi after starvation and feeding of the vector - a review. Tokai J Exp Clin Med [Internet]. 1998 Dec;23(6):335–40. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10622631>
 60. de Fuentes-Vicente JA, Gutiérrez-Cabrera AE, Flores-Villegas AL, Lowenberger C, Benelli G, Salazar-Schettino PM, et al. What makes an effective Chagas disease vector? Factors underlying Trypanosoma cruzi-triatomine interactions. Acta Trop [Internet]. 2018 Jul;183:23–31. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0001706X17314158>
 61. Dias E. Técnica do xenodiagnóstico na molestia de Chagas. Mem Inst Oswaldo Cruz [Internet]. 1940;35(2):335–42. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-02761940000200006&lng=pt&tlng=pt
 62. Alvarenga NJ, Bronfen E. Interação do Trypanosoma cruzi com diferentes vetores: uso para o xenodiagnóstico. Rev Soc Bras Med Trop [Internet]. 1984 Sep;17(3):145–9. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0037-86821984000300007&lng=pt&tlng=pt
 63. Silva IG da, Luquetti AO, Silva HHG da. Importância do método de obtenção das dejeções dos triatomíneos na avaliação da suscetibilidade triatomínica para Trypanosoma cruzi. Rev Soc Bras Med Trop. 1993 Mar;26(1):19–24.
 64. Martins LP, da Rosa JA, Castanho RE, Sauniti GL, Medeiros H. Susceptibilidade de Rhodnius neglectus, Rhodnius robustus et Triatoma infestans (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) à infecção por duas cepas de Trypanosoma cruzi (Kinetoplastidae, Trypanosomatidae) utilizando xenodiagnóstico artificial. Rev Soc Bras Med Trop. 2000;33(6):559–63.
 65. Malafaia G, de Lima Rodrigues AS. Centenário do descobrimento da doença de

- chagas: Desafios e perspectivas. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2010;43(5):483–5.
66. World Health Organization (WHO). Integrating neglected tropical diseases into global health and development: fourth WHO report on neglected tropical diseases. [Internet]. World Health Organization. 2017. 270 p. Available from: https://unitingtocombatntds.org/wp-content/uploads/2017/11/4th_who_ntd_report.pdf
67. Basile L, Jansà JM, Carlier Y, Salamanca DD, Angheben A, Bartoloni A, et al. Chagas disease in european countries: The challenge of a surveillance system. *Eurosurveillance*. 2011;16(37):3.
68. Urbina JA. Etiologic Treatment of Chagas Disease: Old Drugs, New Insights, Challenges, and Perspectives. *Chagas Disease*. 2020. 123–144 p.
69. Barbosa M das GV, Ferreira JMBB, Arcanjo ARL, Santana RAG, Magalhães LKC, Magalhães LKC, et al. Chagas disease in the state of amazonas: History, epidemiological evolution, risks of endemicity and future perspectives. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2015;48(September 2014):27–33.
70. França MS, Frade JM, Konasugawa K, Almeida FB de. Doença de Chagas - primeiro caso autóctone na Amazônia Ocidental - Amazonas - Brasil. *Acta Amaz*. 1980;10(4):759–62.
71. Dias JCP, Ramos AN, Gontijo ED, Luquetti A, Shikanai-Yasuda MA, Coura JR, et al. Aspectos Gerais da Epidemiologia da Doença de Chagas com Especial Atenção ao Brasil. *Epidemiol e Serv saude Rev do Sist Unico Saude do Bras*. 2016;25:7–86.
72. Guerra, Maria das Graças Vale Barbosa Guerra JA de OG. E-book Aspecto gerais, emergência na amazônia e orientações sobre atendimento de pacientes no estado do Amazonas ,Brasil.pdf. 2021. 1–112 p.
73. Karoline A, Barros S, Raysa D, Sousa T De, Ortiz JV, Brito SS De, et al. Short Communication Acute micro-outbreak of Chagas disease in the southeastern Amazon : a report of five cases. 2022;(June):1–4.
74. Coura JR, Junqueira ACV, Fernandes O, Valente SAS, Miles MA. Emerging Chagas disease in Amazonian Brazil. *Trends Parasitol* [Internet]. 2002 Apr;18(4):171–6. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1471492201022000>
75. Rubens Celso Anrade da Silva Junior. Triatomíneos do Amazonas: Invasão de domicílios, infecção natural por *Trypanosoma cruzi* TcI, TcII, TcIII e TcIV e

- percepção da população sobre a infecção chagásica. 2019.
76. Monteiro WM, Magalhães LK, Santana Filho FS, Borborema M, Silveira H, Barbosa MDG V. Trypanosoma cruzi TcIII/Z3 genotype as agent of an outbreak of Chagas disease in the Brazilian Western Amazonia: Short Communication. Trop Med Int Heal. 2010;15(9):1049–51.
 77. Ortiz JV, Pereira BVM, Couceiro KDN, E Silva MRH da S, Doria SS, da Silva PRL, et al. Cardiac evaluation in the acute phase of chagas' disease with post-treatment evolution in patients attended in the state of Amazonas, Brazil. Arq Bras Cardiol. 2019;112(3):240–6.
 78. Ortiz JV, Couceiro K do N, Doria SS, Sousa DRT de, Silveira HMC da, Kesper N, et al. Cardiomiopatia Chagásica Na Amazônia Brasileira: Baixa Prevalência Ou Subdiagnóstico? Arq Bras Cardiol [Internet]. 2021 Oct 7;117(4):770–4. Available from: <https://abccardiol.org/article/cardiomiopatia-chagastica-na-amazonia-brasileira-baixa-prevalencia-ou-subdiagnostico/>
 79. Santana RAG, Guerra MGVB, Sousa DR, Couceiro K, Ortiz J V., Oliveira M, et al. Oral Transmission of Trypanosoma cruzi, Brazilian Amazon. Emerg Infect Dis [Internet]. 2018 Jan;25(1):132–5. Available from: http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/25/1/18-0646_article.htm
 80. do Nascimento Couceiro K, Ortiz JV, do Nascimento Correia M, da Silva e Silva MRH, Brandão AR, da Silva PRL, et al. The Selvester QRS score as an estimative of myocardial injury in acute chagasic patients from the Brazilian Amazon. BMC Infect Dis [Internet]. 2021 Dec 29;21(1):396. Available from: <https://bmcinfectdis.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12879-021-06083-x>

7. ANEXOS

7.1 Procedimentos Operacionais Padrão utilizados (POP)

7.1.1 Procedimento para a preparação do meio MacNeal, Novy e Nicolle (NNN) para cultura de *Leishmania sp.* e *Trypanosoma cruzi*

| | | |
|--|--|--|
|  | <p>FUNDAÇÃO DE MEDICINA TROPICAL DOUTOR HEITOR VIEIRA DOURADO Centro de Entomologia Médica Av. Pedro Teixeira, 25 - Dom Pedro, Manaus - AM, 69040-000 Tel.: (92) 2127-3518/2127-3525</p> |  |
| PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO – POP POP_ENT_LB_001 | | |
| TÍTULO: Procedimento para a preparação do meio MacNeal, Novy e Nicolle (NNN) para cultura de <i>Leishmania sp.</i> e <i>Trypanosoma cruzi</i> | | |
| Elaborado por: Wuelton M. Monteiro Modificado por: Yolanda Noguth Jessica V. Ortiz Susan Smith Doria | Revisado e aprovado por: Maria das Graças Vale Barbosa Guerra | Data de aplicação Agosto de 2022 Data da próxima revisão Agosto de 2023 |

1. OBJETIVO

Descrever o procedimento para a preparação do meio MacNeal, Novy e Nicolle (NNN) para cultura de *Leishmania sp.* e *Trypanosoma cruzi*.

2. DEFINIÇÕES

Não se aplica

3. CAMPO DE APLICAÇÃO

O procedimento se aplica à pesquisa e diagnóstico laboratorial de rotina

4. RESPONSABILIDADES

Gerente da unidade, responsável pela subunidade e pessoal técnico

5. POP'S RELACIONADOS

Não se aplica

6. RECURSOS NECESSÁRIOS

6.1 Materiais:

- 6.1.1 Pipetas sorológicas de 10mL
- 6.1.2 Tubos de ensaio com tampa de rosca
- 6.1.3 Balão de fundo chato
- 6.1.4 Proveta graduada de 1L
- 6.1.5 Erlenmeyer de 125mL
- 6.1.6 Pérolas de vidro
- 6.1.7 Dispensador automático

6.2 Equipamentos

- 6.2.1 Destilador
- 6.2.2 Câmara de fluxo laminar
- 6.2.3 Banho-maria
- 6.2.4 Geladeira

| Código | TÍTULO | Revisão | Página |
|----------------|---|---------|--------|
| POP_ENT_LB_001 | Procedimento para a preparação do meio MacNeal, Novy e Nicolle (NNN) para cultura de <i>Leishmania</i> sp. e <i>Trypanosoma cruzi</i> | 01 | 2 |

6.2.5 Autoclave

6.2.6 Balança de Precisão

6.2.7 Agitador magnético

6.2.8 Estufa

6.3 Reagentes, meios e soluções:

6.3.1 BHI (Brain and Infusion Agar) ágar (Sigma P7278)

6.3.2 Gentamicina (10uL/mL)

6.3.3 Ágar destilada q.s.p. 1L

6.3.4 Sangue estéril e desfibrilado de coelho.

7 PROCEDIMENTOS

7.1 Preparo das vidrarias

7.1.1 Esterilizar os tubos de ensaio com tampas rosqueáveis, erlenmeyer e as provetas em autoclavagem por 30 min a 121°C.

7.1.2 Secar a vidraria por dois dias na estufa.

7.2 Preparo do sangue de coelho

7.2.1 Cobrir o fundo de um Erlenmeyer de 125mL com pérolas de vidro com 2 a 3mm de diâmetro.

7.2.2 Autoclavar por 30min a 121°C e secar em estufa.

7.2.3 Colher assepticamente por punção cardíaca o sangue do coelho.

7.2.4 Transferir imediatamente o sangue para um erlenmeyer estéril com as pérolas de vidro.

7.2.5 Desfibrilar por 10min o sangue pela agitação contínua por meio de movimentos circulares.

7.3 Meio básico

7.3.1 Pesar 52g de BHI

7.3.2 Colocar o BHI em um balão de fundo chato.

7.3.3 Adicionar 1L de água destilada

7.3.4 Autoclavar por 15min a 121°C.

7.3.5 Resfriar em banho-maria a 40°C

7.3.6 Adicionar 100mL de sangue de coelho desfibrilado e estéril.

7.3.7 Manter o meio a 40°C em banho-maria controlado

7.3.8 Transferir o meio para os tubos de ensaio com tampa de rosca com o auxílio dispensador automático

7.3.9 Manter os tubos inclinados a 45 graus até a solidificação do meio

7.3.10 Deixar em teste de esterilidade por 2 dias

7.3.11 Armazenar na geladeira a 4°C por até 30 dias

7.3.12 Quando pronto, colocar por 30min a 37°C no banho-maria para criar o líquido de condensação.

7.4 Meio completo

7.4.1 No momento do uso, deixar os tubos com ágar (meio básico) á temperatura ambiente até a estabilização da

| Código | TÍTULO | Revisão | Página |
|----------------|---|---------|--------|
| POP_ENT_LB_001 | Procedimento para a preparação do meio MacNeal, Novy e Nicolle (NNN) para cultura de <i>Leishmania</i> sp. e <i>Trypanosoma cruzi</i> | 01 | 3 |

temperatura

7.4.2 Adicionar aos tubos com NNN suficiente quando de meio Schneider contendo 1% de soro fetal bovino e 80mg/mL de gentamicina para cobrir o bisel de ágar sangue.

7.1.2 Procedimento para a obtenção de massa parasitaria de *Trypanosoma cruzi*.

| | | |
|---|--|---|
|  | <p>FUNDAÇÃO DE MEDICINA TROPICAL DOUTOR HEITOR VIEIRA DOURADO Centro de Entomologia Médica Av. Pedro Teixeira, 25 - Dom Pedro, Manaus - AM, 69040-000 Tel.: (92) 2127-3518/2127-3525</p> |  |
| <p align="center">PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO – POP POP_ENT_LB_002 TÍTULO: Procedimento para a obtenção de massa parasitária de <i>Trypanosoma cruzi</i></p> | | |
| <p>Elaborado por: Susan Smith Doria</p> | <p>Revisado e aprovado por: Maria das Graças Vale Barbosa Guerra</p> | <p>Data de aplicação Agosto de 2022</p> |
| | | <p>Data da próxima revisão Agosto de 2023</p> |

1. OBJETIVO

Descrever a obtenção da massa parasitária a partir de amostras crio preservadas em nitrogênio líquido de amostra de *Trypanosoma cruzi*.

2. DEFINIÇÕES

Não se aplica.

3. CAMPO DE APLICAÇÃO

O procedimento se aplica à pesquisa.

4. RESPONSABILIDADES

Gerente da unidade, responsável pela subunidade e pessoal técnico

5. POP'S RELACIONADOS

Não se aplica

6. RECURSOS NECESSÁRIOS

6.1 Materiais:

- 6.1.1 Seringa de 1mL
- 6.1.2 Pipeta de 10mL
- 6.1.3 Garrafa de cultura de 50mL
- 6.1.4 Algodão embebido em álcool a 70%
- 6.1.5 Pipetas tipo Pasteur de vidro
- 6.1.6 Dispensador automático
- 6.1.7 Caixa de material com solução desinfetante
- 6.1.8 Frasco com álcool 70%

6.2 Equipamentos

- 6.2.1 Câmara de fluxo laminar
- 6.2.2 Estufa incubadora B.O.D (biochemical oxygen demand) a 28°C

| Código | TÍTULO | Revisão | Página |
|----------------|---|---------|--------|
| POP_ENT_LB_002 | Procedimento para a obtenção de massa parasitária de <i>Trypanosoma cruzi</i> | 01 | 2 |

6.2.3 Microscópio de câmara invertida

6.2.4 Centrifuga para tubos Falcon 50mL

6.3 Reagentes, meios e soluções:

6.3.1 Meio MacNeal, Novy e Nicolle (NNN)

6.3.2 Meio Schneider

6.3.3 Soro Fetal Bovino

7 PROCEDIMENTOS

Devem ser seguidas as normas de biossegurança do trabalho com *Trypanosoma cruzi* para realizar os seguintes procedimentos.

Deve ser usada uma capela de fluxo laminar para evitar contaminação.

7.1 Descongelamento das amostras

7.1.1 Descongelar as amostras de interesse e inocular em tubos contendo o meio NNN.

7.1.2 Transferir os tubos semeados para uma estufa B.O.D regulada a 26°C.

7.1.3 Observar seu crescimento em Microscópio de câmara invertida

7.2 Repique ao meio Schneider

7.2.1 Quando se observar um bom crescimento, realizar o repique em garrafas de cultura contendo 80% meio Schneider e 20% SFB.

7.2.2 Transferir as garrafas para uma estufa B.O.D regulada a 26°C.

7.2.3 Observar seu crescimento em microscópio de câmara invertida.

7.3 Massa parasitária

7.3.1 Quando se observar um bom crescimento, realizar o repique novamente para garrafas de cultura contendo 80% meio Schneider e 20% SFB. Este passo vai ser repetido até ter uma quantidade necessária para a experimentação correspondente.

7.3.2 No momento de ter a quantidade precisa, transferir o total para tubos falcon e centrifugar a 4,000g por 10min a 4°C

7.3.3 Descartar o sobrenadante para posteriormente utilização da massa a experimentação correspondente.

7.1.3 Procedimento para a preparação de 1L de PBS 20x

| | | |
|---|--|---|
|  | <p align="center">FUNDAÇÃO DE MEDICINA TROPICAL DOUTOR HEITOR VIEIRA DOURADO Centro de Entomologia Médica Av. Pedro Teixeira, 25 - Dom Pedro, Manaus - AM, 69040-000 Tel.: (92) 2127-3515/2127-3525</p> |  |
| <p align="center">PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO – POP POP_ENT_LB_004</p> | | |
| <p>TÍTULO: Procedimento para a preparação de 1L de PBS 20x</p> | | |
| <p>Elaborado por: Susan Smith Doria</p> | <p>Revisado e aprovado por: Maria das Graças Vale Barbosa Guerra</p> | <p>Data de aplicação Julho de 2022</p> |
| | | <p>Data da próxima revisão Julho de 2023</p> |

1. OBJETIVO

Descrever o procedimento para a preparação de PBS para uso em técnicas sorológicas e moleculares.

2. DEFINIÇÕES

PBS: Tampão fosfato-salino. PBS é a abreviatura do inglês de Phosphate buffered saline

3. CAMPO DE APLICAÇÃO

Pesquisa e diagnóstico laboratorial de rotina

4. RESPONSABILIDADES

Gerente da unidade, responsável pela subunidade e pessoal técnico

5. POP'S RELACIONADOS

Não se aplica

6. RECURSOS NECESSÁRIOS

6.1 Materiais:

6.1.1 Provera 1000mL

6.1.2 Garrafa de vidro limpa e seca para estocar reagentes de 1000mL

6.1.3 Bécker

6.1.4 Magneto

6.2 Equipamentos

6.2.1 Medidor de pH

6.2.2 Agitador magnético

6.2.3 Balança

6.3 Reagentes, meios e soluções:

6.3.1 água tipo I ou II

6.3.2 NaH₂PO₄ 24g

| Código | TÍTULO | Revisão | Página |
|----------------|---|---------|--------|
| POP_ENT_LB_004 | Procedimento para a preparação de 1L de PBS 20x | 01 | 2 |

6.3.3 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 4.423g

6.3.4 NaCl 170g

7 PROCEDIMENTOS

7.1 Preparação de PBS 20x

- 7.1.1 Utilizar a proveta para medir o volume de 500mL e transferir para o becker
- 7.1.2 Colocar no Becker uma barra magnética e colocar o Becker numa agitadora sem aquecimento
- 7.1.3 Acrescentar os sais pesados anteriormente, deixar em agitação até estar completamente dissolvidos
- 7.1.4 Colocar no Becker o volume restante de 500mL
- 7.1.5 Deixar agitar por alguns minutos
- 7.1.6 Transferir o PBS 20x para garrafa. Etiquetar e aguardar na geladeira

NOTA: Para uma solução de PBS 1x é preciso 50mL de PBS 20x e 950mL

7.1.4 Procedimento para a contaminação do sangue com *Trypanosoma cruzi* para o Xenodiagnóstico indireto.

| | | |
|---|--|---|
|  | <p>FUNDAÇÃO DE MEDICINA TROPICAL DOUTOR HEITOR VIEIRA DOURADO Centro de Entomologia Médica Av. Pedro Teixeira, 25 - Dom Pedro, Manaus - AM, 69040-000 Tel.: (92) 2127-3518/2127-3525</p> |  |
| <p>PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO – POP POP_ENT_LB_005</p> <p>TÍTULO: Procedimento para a contaminação do sangue com <i>Trypanosoma cruzi</i> para o xenodiagnóstico Indireto.</p> | | |
| <p>Elaborado por: Ademir Bentes</p> <p>Modificado por: Matheus Martins Monteiro Lucas Silva Ferreira</p> | <p>Revisado e aprovado por: Maria das Graças Vale Barbosa Guerra</p> | <p>Data de aplicação Agosto de 2022</p> <p>Data da próxima revisão Agosto de 2023</p> |

1. OBJETIVO

Descrever o procedimento para a contaminação do sangue com *Trypanosoma cruzi* para o xenodiagnóstico Indireto.

2. DEFINIÇÕES

Não se aplica

3. CAMPO DE APLICAÇÃO

O procedimento se aplica à pesquisa e diagnóstico laboratorial de rotina

4. RESPONSABILIDADES

Gerente da unidade, responsável pela subunidade e pessoal técnico

5. POP'S RELACIONADOS

Não se aplica

6. RECURSOS NECESSÁRIOS

6.1 Materiais:

- 6.1.1 triatomíneos
- 6.1.2 Tubos contendo anticoagulante (Heparina, EDTA e citrato de sódio)
- 6.1.3 Tubo do tipo falcon 50 mL
- 6.1.4 Solução PBS 1x
- 6.1.5 Alimentadores de vidro
- 6.1.6 Mangueiras
- 6.1.7 Parafilm®

6.2 Equipamentos

- 6.2.1 Centrífuga
- 6.2.2 Banho-maria
- 6.2.3 Geladeira

| | | | |
|--------------------------|---|---------------|-------------|
| Código POP_ENT_LB_005 | TÍTULO Procedimento para a contaminação do sangue com <i>Trypanosoma cruzi</i> para o xenodiagnóstico Indireto | Revisão 01 | Página 2 |
|--------------------------|---|---------------|-------------|

7 PROCEDIMENTOS

7.1 Preparo do sangue para contaminação

- 7.1.1 Para o procedimento de infecção experimental, deve-se coletar sangue em tubos contendo anticoagulante.
- 7.1.2 Após coleta, centrifugar o sangue a 4500 rpm por 10 minutos; após esse processo transferir o soro para tubo do tipo falcon e inativar o sistema complemento em banho-maria a 56°C durante 60 minutos.
- 7.1.3 Lavar as hemácias 3x com solução PBS, centrifugando-as a 3500 rpm por 5 minutos em cada lavagem. Manter a 4°C em banho de gelo até o momento do uso na infecção dos insetos.
- 7.1.4 Transferir imediatamente o sangue para um erlenmeyer estéril com as pérolas de vidro.
- 7.1.5 Desfibrilar por 10min o sangue pela agitação contínua por meio de movimentos circulares.

7.2 Montagem do circuito para alimentação indireta

- 7.2.1 Montar circuito utilizando alimentadores de vidro interligados por mangueiras a um banho-maria na temperatura de 37° C
- 7.2.2 Os alimentadores devem ser revestidos com membrana artificial de Parafilm® na parte inferior de modo que esta membrana esteja na espessura adequada para o estágio ninfal e quantidade de triatomíneos utilizados
- 7.2.3 Antes de colocar o sangue no alimentador, verificar se as mangueiras estão bem seguras e sem vazamento.
- 7.2.4 Preencher o interior do alimentador com quantidade adequada de sangue infectado
- 7.2.5 Colocar os triatomíneos para a alimentação por aproximadamente 40 minutos. O ambiente deve estar com pouca iluminação.
- 7.2.6 Após a alimentação, levar os espécimes para a colônia de hemíptera e separar os triatomíneos alimentados dos não alimentados.
- 7.2.7 Aguardar os dias para a realização das leituras

7.1.5 Procedimento para preparo da amostra e obtenção das imagens de hemócitos de triatomíneos por microscopia eletrônica de transmissão

| | | |
|--|--|--|
|  | <p>FUNDAÇÃO DE MEDICINA TROPICAL DOUTOR HEITOR VIEIRA DOURADO Centro de Entomologia Médica Av. Pedro Teixeira, 25 - Dom Pedro, Manaus - AM, 69040-000 Tel.: (92) 2127-3518/2127-3525</p> |  |
| PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO – POP POP_ENT_LB_006 | | |
| TÍTULO: Procedimento para preparo de amostra e obtenção das imagens de hemócitos de triatomíneos por microscopia eletrônica de transmissão. | | |
| Elaborado por: Wanderley de Souza Modificado por: Matheus Martins Monteiro Jander Matos | Revisado e aprovado por: Maria das Graças Vale Barbosa Guerra | Data de aplicação Agosto de 2022 Data da próxima revisão Agosto de 2023 |

1. OBJETIVO

Obter imagens de hemócitos de triatomíneos por microscopia eletrônica de transmissão.

2. DEFINIÇÕES

Não se aplica

3. CAMPO DE APLICAÇÃO

O procedimento se aplica à pesquisa.

4. RESPONSABILIDADES

Gerente da unidade, responsável pela subunidade e pessoal técnico

5. POP'S RELACIONADOS

Não se aplica

6. RECURSOS NECESSÁRIOS

6.1 Materiais:

- 6.1.1 triatomíneos
- 6.1.2 Pipetas
- 6.1.3 Eppendorf
- 6.1.4 Resina Epon
- 6.1.5 navalhas
- 6.1.6 Grids

6.2 Equipamentos

- 6.2.1 Centrífuga
- 6.2.2 Banho-maria
- 6.2.3 Geladeira
- 6.2.4 Estufa
- 6.2.5 Ultramicrotomo Leica UC7
- 6.2.6 Microscópio eletrônico

| | | | |
|--------------------------|--|---------------|-------------|
| Código POP_ENT_LB_008 | TÍTULO Procedimento para preparo de amostra e obtenção das imagens de hemócitos de triatomíneos por microscopia eletrônica de | Revisão 01 | Página 2 |
|--------------------------|--|---------------|-------------|

6.3 Reagentes, meios e soluções:

- 6.3.1 PBS 1x
- 6.3.2 Solução de Karnovsky
- 6.3.3 Tampão de cacodilato de sódio 0,1 M
- 6.3.4 Tetróxido de ósmio
- 6.3.5 Ferrocianeto de potássio
- 6.3.6 Acetona.
- 6.3.7 Uranila
- 6.3.8 Citrato de chumbo

7 PROCEDIMENTOS

7.1 Coleta inicial/Fixação

- 7.1.1 Coleta um pool de hemolinfa de 30 triatomíneos.
- 7.1.2 Considerando uma visualização padrão em MET, fixação da amostra será realizado utilizando fixador formaldeído a 4% e glutaraldeído a 2,5% em tampão cacodilato de sódio a 0,1 M com pH 7.2. Onde permanecerá pelo período de 2 hrs.
- 7.1.3 Após o período de fixação, a amostra será centrifugada com o ângulo de 90 graus a 3.500 rpm x 5 min para que ocorra a formação do pellet.

7.2 Lavagem da amostra

- 7.2.1 A fim de preservar a osmolaridade da amostra e evitar artefato nas células em decorrência da mudança de meio onde o tecido estava imerso, ele deve ser lavado com o mesmo tampão que foi fixado, no caso, tampão cacodilato 0,1 M, pH 7.2. Manter os fragmentos de tecido imerso no tampão por 5 minutos, repetindo esse processo três vezes, secando levemente os grids em papel filtro.

7.3 Pós-fixação amostra

- 7.3.1 A pós-fixação ocorrerá com tetróxido de ósmio a 1 % em proporção 1:1 com solução de ferrocianeto de potássio a 2,5 %, diluído em cloreto de cálcio a 10 mM. O tetróxido de ósmio marca as lipoproteínas e outros lipídios, contrastando principalmente a membranas celulares, e o ferrocianeto de potássio, junto com o tetróxido de ósmio, reduz o tetróxido de ósmio, reforçando o contraste.]
- 7.3.2 Após a pós-fixação, serão realizadas três lavagens em tampão cacodilato sódio a 0.1 M e pH a 7.2, mantendo-o imerso no tampão por cinco minutos em cada lavagem.

7.4 Pós-fixação amostra

| Código | TÍTULO | Revisão | Página |
|----------------|--|---------|--------|
| POP_ENT_LB_008 | Procedimento para preparo de amostra e obtenção das imagens de hemócitos de triatomíneos por microscopia eletrônica de | 01 | 3 |

7.4.1 Em decorrência da resina utilizada na microscopia eletrônica não ser miscível em água é necessário fazer a substituição dela do interior dos tecidos e células a fim de permitir a perfeita infiltração da resina, mantendo os tecidos e células estabilizadas para os cortes em ultramicrotomo.

7.4.1 A retirada da água das células com muita rapidez pode levar a deformação das células e tecidos e, a fim de evitar esses artefatos da desidratação, a água deve ser retirada de forma lenta e gradual. Será empregada uma série de desidratação utilizando acetona com concentrações crescentes de 70, 80, 90 % por 15 minutos em cada concentração, finalizando com duas desidratações finais em acetona 100 %.

7.5 Infiltração em resina e embocamento.

7.5.1 Para a infiltração ocorre a utilização da resina tipo Epon

7.5.2 A fim de que seja feita a substituição gradual da acetona pela resina, serão feitas imersões em concentração crescente da resina Epon diluída em acetona. As concentrações de infiltração serão realizadas nas proporções de 2:1 por 4 hr, 1:1 Overnight, 1:2 por 2 horas de acetona/resina e duas trocas em resina Epon 100 % 6 horas de intervalo em cada.

7.5.3 Após as amostras estarem devidamente infiltradas, os fragmentos de tecido serão colocados em formas de silicone e imersos com a resina Epon previamente misturada com catalizador, em quantidade suficiente para formar uma camada de resina acima da borda da forma. Os blocos contendo os tecidos e a resina serão levados para estufa a 60 °C por dois a três dias para polimerização.

7.6 Obtenção de cortes ultrafinos e imagens

7.6.1 Após os blocos estarem devidamente polimerizados, o mesmo deve ser preso em suporte adequado para ser fixado no ultramicrotomo para a região onde contém o tecido ser previamente trimado com o uso de uma navalha.

7.6.2 Após o bloco ser trimado a sua superfície será previamente cortada e acertada a posição de corte com a navalha de vidro e, após essa etapa de ajuste inicial, o bloco seguirá para o corte ultrafino com uso de navalha de diamante.

7.6.3 Os cortes ultrafinos serão feitos na espessura de 50 a 70 nanômetros, devendo as fatias na banheira de água da navalha de diamante ter coloração metálica/prateada clara

7.6.4 Os cortes de interesse devem ser capturados utilizando grades de cobre. Caso o interesse seja observar ultraestrutura, grades de 200 a 300 mesh serão suficientes para a visualização, entretanto se for necessário observar estruturas maiores em baixa magnificação, uma grade de 100 a 150 mesh pode ser melhor empregada.

7.6.5 As imagens serão capturas com o microscópio eletrônico (Zeiss Leo 906-E, Oberkochen, Alemanha).