

CAPÍTULO 13

Interação Parasito-Vetor (Tripanossomatídeos).

Alessandra A. Guarneri¹, Livia Silva-Cardoso², Georgia Atella²

¹Centro de Pesquisas René Rachou, Av. Augusto de Lima, 1715, Barro Preto, Belo Horizonte, MG, Brasil.

²Instituto de Bioquímica Médica, Av. Carlos Chagas Filho, 373, Cidade Universitária, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

Considerações Iniciais.

A partir do momento em que um parasito é ingerido por um inseto vetor, juntamente com o repasto sanguíneo, uma série de interações são iniciadas. Algumas delas ocorrem na interface entre células ou tecidos, outras ocorrerão a partir de produtos secretados ou excretados pelo parasito, e outras ainda, se darão por respostas do vetor geradas a partir da chegada do parasito. Muitas dessas interações não apresentam efeitos a longo prazo na fisiologia do vetor ou na sua história de vida, mas algumas podem causar profundas mudanças que irão afetar inclusive, a sua sobrevivência.

As Interações entre Moscas Tsé-tsé e Tripanossomatídeos.

Moscas tsé-tsé são incluídas em um único gênero, *Glossina*, e estão restritas a região da África Subsaariana, exceto por duas localidades na península arábica. Vinte e três espécies e oito subespécies são atualmente identificadas (Leak, 1999; Krafsur, 2009), as quais estão divididas em 3 clados distintos dependendo do nicho ecológico que ocupam: *Morsitans* (savana), *Palpalis* (fluvial) e *Fusca* (floresta). Os grupos *Palpalis* e *Morsitans* são vetores de *T. brucei sp.*, parasito causador da tripanossomíase africana. Essa doença pode ser transmitida tanto por machos quanto por fêmeas de moscas tsé-tsé, uma vez que ambos são hematófagos obrigatórios. Algumas espécies de tsé-tsé são reconhecidas como vetores mais eficientes que outras, por razões comportamentais (preferências de habitat ou de hospedeiros) ou genéticas (resistência à infecção por tripanosomas) (Welburn e cols., 1989; Snow e cols., 1991; Welburn e Maudlin, 1999).

O gênero *Trypanosoma* abrange várias espécies responsáveis pelo complexo de doenças conhecidas como tripanossomíase africana (doença do sono em humanos e *nagana* em outros animais). Os tripanosomas patogênicos para mamíferos (*T. brucei*, *T. congolense*, *T. simae*, *T. gosfreyi* e *T. vivax*) são transmitidos através da saliva durante a alimentação de seu vetor, enquanto os parasitos com hospedeiros répteis (como *T. grayi*) são transmitidos por via fecal. Após a ingestão dos tripanosomas pela mosca, tem início o ciclo do parasito de desenvolvimento e multiplicação, que envolve diferentes partes do trato alimentar do vetor, dependendo da espécie de tripanosoma (Lloyd e Johnson, 1924). *T. vivax*, o qual se acredita ser o mais ancestral dentre os tripanosomas salivares, produz uma alta incidência de infecção na probóscide da mosca tsé-tsé (Haag e

cols., 1998) e é um patógeno grave do gado. *T. congolense* (Brodén, 1904), *T. simiae* (Bruce e cols., 1912) e *T. godfreyi* (McNamara e cols., 1994) também causam *nagana*, tendo mais relevância econômica o *T. congolense*, com ampla gama de hospedeiros e distribuição geográfica. O subgênero *Trypanozoon* contém os agentes etiológicos da tripanossomíase humana *T. brucei gambiense* e *T. brucei rhodesiense*. Apesar das subespécies de *T. brucei* serem morfologicamente idênticas, o outro membro do grupo, o *T. brucei brucei* não é infectivo para humanos, pois é sensível a um fator tripanolítico presente no soro humano (Oli e cols., 2006), sendo então restrito aos animais domésticos e silvestres.

O estágio inicial da doença, estabelecido quando um indivíduo é picado por uma mosca tsé-tsé infectada, gera gangrena no local que é seguida da proliferação do parasito na corrente sanguínea, resultando em febre e dor. Nesse estágio a doença geralmente não é diagnosticada, de maneira que o indivíduo não recebe tratamento adequado. Posteriormente, o parasito atravessa a barreira hematoencefálica do sistema nervoso central, causando distúrbios no ritmo circadiano, que culminam em desregulação no período de sono ou alerta, que pode ocorrer a qualquer hora do dia ou da noite, além de causar confusão mental e dificuldades de coordenação. Não obstante, sem tratamento, a infecção humana por tripanosomatídeos africanos é sempre fatal (Malvy e Chappuis, 2011; Brum e cols., 2010). Segundo estimativas da OMS (Organização Mundial da Saúde), há entre 50.000 e 70.000 pessoas infectadas nos 37 países da África subsaariana. Nessa mesma região morrem cerca de três milhões de cabeças de gado por ano. As perdas econômicas na produção de gado sozinha estão em torno de um bilhão de dólares, segundo dados da Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação. Nesses animais, os sinais observados são: aumento da temperatura corpórea e da taxa respiratória, inapetência, diarreia, anemia e lacrimejamento excessivo. Em estágio mais avançado o animal apresenta perda de peso, fraqueza e anemia grave, culminando em morte. Pequenos ruminantes, como ovelhas e cabras, podem também apresentar sintomas relacionados à infecção do sistema nervoso central, como paralisia (Grace, 2008).

Susceptibilidade e Transmissão de Tripanosomatídeos por Moscas Tsé-tsé.

De acordo com a literatura, todas as espécies de tsé-tsé são susceptíveis, ao menos em algum grau, a infecções por tripanosomatídeos. Em geral, as espécies do grupo *Palpalis* são vetores pouco competentes de *T. congolense*, quando

comparadas às moscas do grupo *Morsitans* (Harley e Wilson, 1968; Moloo e Kutuza, 1988, Ndegwa e cols., 1992). Contrariamente, moscas tsé-tsé do grupo *Morsitans* transmitem *T. brucei gambiense* de maneira menos eficaz que as do grupo *Palpalis* (Richner e cols., 1988). Dados de susceptibilidade devem ser analisados cuidadosamente, pois as moscas e as cepas de tripanosomas utilizadas nos experimentos são das mais variadas origens geográficas. Muitos fatores podem influenciar a susceptibilidade da mosca à infecção por tripanosoma, e a compreensão desses fatores ainda é uma linha de estudo incipiente. Fatores como sexo (os machos em geral são mais susceptíveis que as fêmeas), idade (nas infecções por *T. congolense* e *T. brucei* as moscas mais novas são mais propensas a desenvolverem a infecção), alimentação (o repasto sanguíneo diminui a susceptibilidade enquanto períodos de jejum aumentam) e a combinação de uma determinada espécie de tsé-tsé e uma espécie e/ou cepa de tripanosoma podem influenciar a susceptibilidade da mosca à infecção (Aksoy e cols., 2003).

Diferentes estudos têm demonstrado mudanças na capacidade de alimentação de moscas infectadas. *Glossina morsitans morsitans* infectada com *T. brucei* faz cerca de 3 vezes mais sondagens e se alimenta com mais voracidade que moscas não infectadas (Jenni e cols., 1980). Em um estudo mais recente foi demonstrado que moscas infectadas necessitam de um tempo mais prolongado para se alimentar, mas ingerem a mesma quantidade de sangue quando comparadas com moscas não infectadas (Van Den Abbeele e cols., 2010). No estudo há dados que sugerem que os parasitos induzem uma diminuição da transcrição gênica na glândula salivar, que resulta em uma diminuição de 70% na quantidade total de proteínas na saliva na mosca infectada. Além disso, proteínas relacionadas a atividades anti-hemostáticas estão reguladas negativamente, o que diminui sua atividade biológica, ou seja, a saliva das moscas infectadas possui uma menor atividade anticoagulante e menor capacidade de inibir a agregação plaquetária, o que poderia explicar o aumento no tempo de sondagem e alimentação (Van Den Abbeele e cols., 2010). Um prolongamento do período de contato vetor/hospedeiro poderia aumentar as chances de transmissão do parasito, uma vez que, na natureza, apenas 1-3% das moscas estão infectadas com um agente de tripanossomíase africana (Aksoy e cols., 2003).

Estabelecimento e Maturação da Infecção.

Diferentes espécies de tripanosomas se desenvolvem em diferentes órgãos na mosca: *T. vivax* se desenvolve exclusivamente nas peças bucais; em *T. brucei* e *T. congolense* o estabelecimento inicial da infecção ocorre no intestino médio e a subsequente maturação ocorre nas peças bucais e nas glândulas salivares, respectivamente. O ciclo de transmissão ocorre quando um animal infectado é picado por uma mosca susceptível. Diferentes formas de *T. brucei* (**Fig. 1**) são encontradas na corrente sanguínea de mamíferos, uma forma longa e delgada que pode se replicar por divisão binária e, uma forma não replicante curta. Quando esses parasitos são ingeridos durante a alimentação da mosca, as formas alongadas são rapidamente mortas pela ação de proteases, enquanto as formas curtas sobrevivem e se diferenciam em formas procíclicas (Sbicego e cols., 1999). Proteases são abundantes no intestino médio posterior da mosca, e podem prover pelo menos um sinal para a diferenciação do parasito, mas sinais adicionais podem contribuir para esse processo *in vivo*. Dentre esses estão o choque térmico, que sensibiliza o parasito para baixas concentrações de citrato ou cis-aconitato (Engstler e Boshart, 2004) e a inibição de uma proteína tirosina fosfatase (Szoor e cols., 2006). Após a colonização do espaço peritrófico, o tamanho da população de parasitos é aparentemente controlado (Welburn e cols., 1997; Van den Abbeele e cols., 1999). Para completar o ciclo de vida, o *T. brucei* precisa colonizar as glândulas salivares e gerar formas metacíclicas, as quais são infecciosas para os mamíferos. As formas migratórias encontradas no proventrículo incluem uma forma tripomastigota longa, a qual replica o DNA nuclear e reposiciona o cinetoplasto para se tornar uma forma epimastigota longa. A forma epimastigota longa então inicia uma divisão assimétrica e gera uma forma epimastigota curta, que se presume ser a forma que coloniza a glândula salivar (Welburn e cols., 1997; Van den Abbeele e cols., 1999). Até o presente momento, ainda não são conhecidos os sinais que promovem a diferenciação para formas epimastigotas, a migração para as glândulas salivares ou a diferenciação que resulta em formas metacíclicas (Van den Abbeele e cols., 1999; Peacock e cols., 2007).

T. brucei brucei

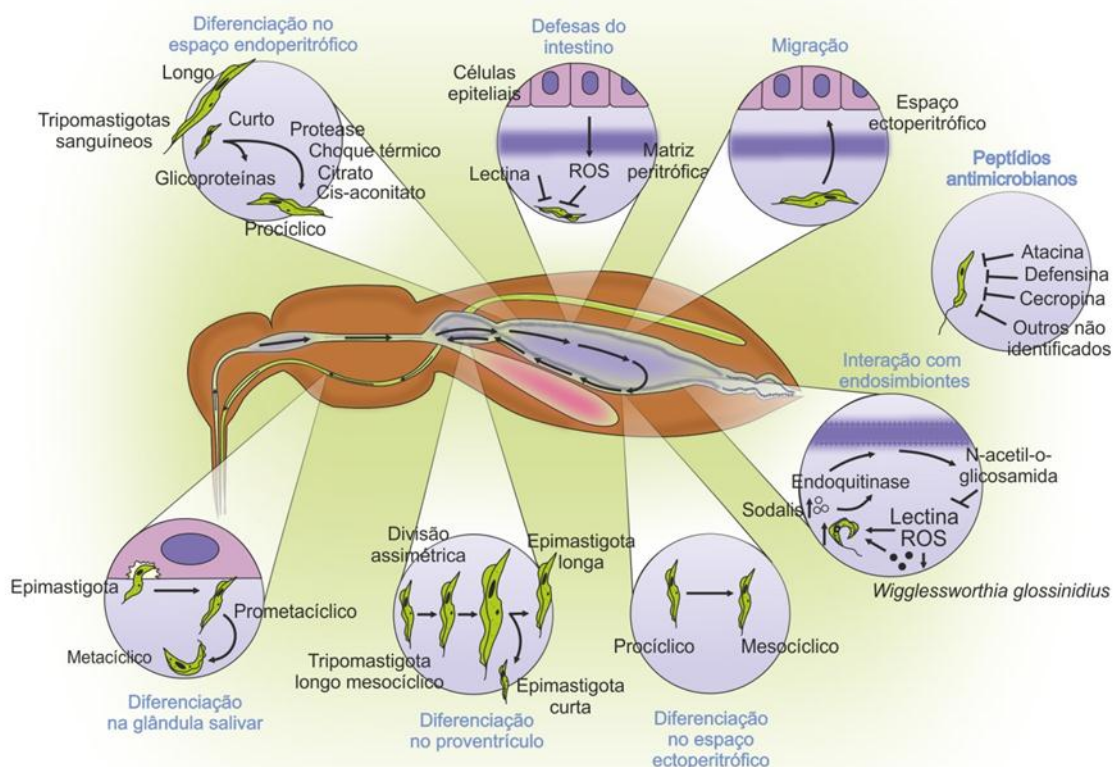


Figura 1: Interação entre *Trypanosoma brucei brucei* e *Glossina morsitans morsitans*. Durante o ciclo de vida do *T. brucei brucei*, os parasitos migram entre vários órgãos do inseto. Após o repasto sanguíneo, os tripomastigotas sanguíneos em suas formas longas e curtas são ingeridos pelo inseto. Devido à ação de proteases as formas longas são eliminadas, enquanto as formas curtas conseguem burlar esse primeiro mecanismo de defesa. Essas formas se diferenciam em formas procíclicas rapidamente, estimuladas por fatores como o choque-térmico, citrato, cis-aconitato e proteases. Além disso, há outras formas de defesa como as espécies reativas de oxigênio (ROS), lectinas e peptídeos antimicrobianos (atacina, defensina, cecropina e outros não identificados). De 3-5 dias após a infecção, ocorre a migração dos parasitos para o espaço ectoperitrófico, onde ocorre a diferenciação da forma procíclica para a mesocíclica. Os tripomastigotas procíclicos migram para o proventrículo, espaço no qual ocorre a diferenciação para tripomastigota longo, e em seguida a divisão assimétrica do tripomastigota em epimastigota longo e epimastigota curto. A infecção das glândulas salivares ocorre pelos epimastigotas curtos, os quais se acredita ligarem ao epitélio da glândula salivar através da interdigitação de suas membranas. Após a replicação, a forma epimastigota diferencia na forma metacíclica, a qual é uma forma livre e infectiva para hospedeiros vertebrados, transmitida através da saliva do vetor.

Papel das Moléculas de Superfície na Infecção.

Os tripanosomas são recobertos por diferentes moléculas de superfície durante seu desenvolvimento na mosca. A diferenciação de formas sanguíneas de *T. brucei* para formas procíclicas é marcada pela liberação de várias glicoproteínas de superfície e sua troca por prociclinas, uma família de glicoproteínas caracterizadas por repetições de Glu-Pro (EP) ou Gly-Pro-Glu-Glu-Thr (GPEET) (Roditi e Clayton, 1999). Ambos os tipos de repetição são resistentes às proteases presentes no intestino médio da mosca tsé-tsé (Acosta-Serrano e cols., 2001; Liniger e cols., 2003). Existem três isoformas de prociclinas EP (EP1, EP2 e EP3), as quais diferem no tamanho das repetições e na presença ou ausência de açúcares N-ligados. Todas as quatro prociclinas (as três isoformas de EP e a GPEET) são expressas em níveis similares com poucas horas de diferenciação (Vassella e cols., 2001), mas as formas procíclicas isoladas de tsé-tsé três dias após a infecção possuem como forma predominante GPEET e poucas EP (Vassella e cols., 2000; Acosta-Serrano e cols., 2001; Sharma e cols., 2007). Em contraste, formas procíclicas tardias presentes no espaço ectoperitrófico expressam EP1 e EP3, mas não GPEET (Acosta-Serrano e cols., 2001). No intestino médio, o N-terminal das prociclinas é clivado por proteases da mosca (Acosta-Serrano e cols., 2001; Liniger e cols., 2003) e a subsequente liberação de peptídeos, segundo sugestões prévias, teria influência na infecção. Entretanto, parasitos expressando prociclinas com a região N-terminal truncada são capazes de estabelecer infecção no intestino médio eficientemente (Liniger e cols., 2004). Vassella e cols. (2009) deletaram os quatro genes codificantes das prociclinas em *T. brucei* e infectaram moscas com uma mistura dos parasitos mutantes e selvagens. Foi observado que o mutante, apesar de ser capaz de completar todo o ciclo e gerar formas infectivas ao hospedeiro vertebrado, é sobreposto em crescimento pelo selvagem, o que pode refletir uma redução da aptidão de infecção *in vivo*.

Duas moléculas de superfície foram identificadas em formas procíclicas de *T. congolense*. Uma molécula de superfície resistente à protease que é expressa na fase inicial da infecção do intestino médio (Butikofer e cols., 2002), seguida de prociclinas espécie-específica na fase tardia (Utz e cols., 2006). As prociclinas de *T. congolense* contêm uma repetição de um heptapeptídeo que remete às prociclinas de *T. brucei*, sendo ricas em ácido glutâmico, prolina, glicina e treonina, mas diferem por serem altamente glicosiladas (Utz e cols., 2006). Assim, duas espécies que se desenvolvem no intestino da mosca aparentemente usam

estratégias similares de expressão temporal de diferentes moléculas de superfície para escapar das defesas do inseto e estabelecer a infecção. Apesar desses parasitos se desenvolverem em diferentes compartimentos na mosca (probóscide e glândulas salivares), formas epimastigotas de *T. congolense* e *T. brucei* expressam glicoproteínas de superfície relacionadas, conhecidas como proteínas ricas em ácido-glutâmico/alanina (GARP) e proteínas ricas em alanina de brucei (BARP), respectivamente. Entretanto, enquanto os genes que codificam GARPs são altamente conservados (Rangarajan e cols., 2000), existe uma considerável diversidade entre genes que codificam BARP (Berriman e cols., 2005), e mRNAs relacionados às diferentes isoformas de BARP podem ser detectados nas glândulas salivares (Urwyler e cols., 2007). Uma hipótese é que essa família de proteínas seja a responsável pelo tropismo tecidual de diferentes espécies, mas é extremamente difícil demonstrar isso experimentalmente. Em todas as espécies, as formas metacíclicas adquirem glicoproteínas de superfície variantes em uma preparação para a infecção do hospedeiro mamífero.

Barreiras Físicas, Lectinas e Antioxidantes.

O intestino médio da maioria dos insetos é protegido fisicamente por uma camada altamente organizada, rica em glicosaminoglicanos e quitina, conhecida como membrana peritrófica, que separa o lúmen do intestino em dois compartimentos, o endoperitrófico, que contém o alimento e o ectoperitrófico, que é o espaço entre a membrana peritrófica e o epitélio do intestino médio (Lehane, 1997). Os tripanosomas, ao estabelecerem a infecção no intestino, migram para o espaço ectoperitrófico entre os dias 3-5 pós-infecção (Gibson e Bailey, 2003). A membrana peritrófica tem então um papel central na competência do vetor, e isso foi demonstrado em especial para os parasitos da malária, os quais se encontram envolvidos em um saco quitinoso produzido no intestino médio (Miller e Lehane, 1993). Nas moscas tsé-tsé, a membrana peritrófica foi descrita como uma possível barreira para a infecção, o que poderia explicar a maior susceptibilidade em moscas recém-eclodidas, pois a completa formação da membrana peritrófica preveniria a infecção em moscas mais velhas. Entretanto, estudos de microscopia demonstraram que tripanosomas são capazes de atravessar a membrana peritrófica (Evans e Ellis, 1983) e que as moscas mais velhas alimentadas com açúcar podem ser tão susceptíveis quanto moscas recém-eclodidas (Welburn e cols., 1994). Uma vez ocupando o espaço ectoperitrófico, os parasitos seguem

para o extremo anterior do intestino médio, o proventrículo (Gibson e Bailey, 2003). Entre os dias 6-8 após a infecção, os tripanosomas cruzam a membrana peritrófica e seguem para o canal alimentar (Van den Abbeele e cols., 1999). O mecanismo utilizado pelos parasitos para cruzar a membrana peritrófica ainda é desconhecido, uma vez que nenhum gene que reporte a uma quitinase foi encontrado no seu genoma (Lehane e Msangi, 1991).

Outra barreira à infecção por patógenos presente no intestino de insetos são as espécies reativas de oxigênio (ROS) produzidas pelo epitélio (Ha e cols., 2005) que, aparentemente, poderiam atuar na proteção do intestino contra a infecção por tripanosomas (Hao e cols., 2003; Munks e cols., 2005). Recentes evidências experimentais suportam essa hipótese, pois a alimentação de moscas com moléculas antioxidantes aumenta a proporção de indivíduos nas quais o estabelecimento e a maturação dos tripanosomas ocorre com sucesso (Macleod e cols., 2007a, b). Esse mecanismo já foi demonstrado em outros modelos, como o aumento na produção de óxido nítrico (NO) em *Anopheles stephensi* e *Anopheles gambiae* após infecção por *Plasmodium berghei* (Luckhart e cols., 1998; Herrera-Ortiz e cols., 2004). O sistema produtor de NO de *Rhodnius prolixus* responde a presença de *Trypanosoma rangeli* e *Trypanosoma cruzi*, implicando no envolvimento da regulação da infecção (Whitten e cols., 2001, 2007). Um papel para transferrina na sinalização do sistema imune na regulação positiva da produção de NO em vertebrados foi sugerida (Stafford e Belosevic, 2003). Em moscas *G. m. morsitans* nocaute para o gene de transferrina foi demonstrado que essas tem quase o dobro de parasitos no intestino que as moscas controle (Lehane e cols., 2008). O mecanismo de envolvimento da transferrina na interação tripanosomatídeo-mosca tsé-tsé ainda é desconhecido, mas existe a intrigante possibilidade de que pode ser análogo à função em vertebrados.

Lectinas são proteínas presentes no intestino de *Glossina* e em sua maioria apresentam-se ligadas à membrana peritrófica (Lehane e Msangi, 1991). Sugere-se que um dos mecanismos pelos quais o número de tripanossomatídeos é regulado dentro do intestino médio seja a proto-apoptose (uma forma de morte celular), a qual seria desencadeada pelas lectinas presentes nesse órgão (Welburn e cols., 1996.; Murphy e Welburn, 1997; Welburn e Maudlin, 1997). Corroborando com essa hipótese, testes realizados com formas procíclicas de *T. b. brucei*, *T. b. rhodesiense* ou *T. congolense* demonstraram que a lectina vegetal Concaivalina A induz a paralização do crescimento e a morte dos flagelados, com muitas das

características de morte celular programada (Welburn e Maudlin, 1997; Murphy e Welburn, 1997).

Peptídeos Antimicrobianos.

Após a descoberta da atividade anti-tripanosomida do peptídeo antimicrobiano estomoxina da mosca *Stomoxys calcitrans* (Boulanger e cols., 2002a), houve um aumento no interesse em peptídeos antimicrobianos produzidos no intestino médio da mosca tsé-tsé, que incluem cecropina, atacina, dipterocina e defensina (Hao e cols., 2001; Hao e cols., 2003; Hu e Aksoy, 2005). No corpo gorduroso de moscas infectadas por tripanosomas, os níveis de transcritos de atacina e defensina aumentam no terceiro dia (Hao e cols., 2001). Na hemolinfa, os peptídeos atacina, cecropina e defensina são detectáveis no sexto dia, mas não no décimo quarto dia após a infecção. Além disso, dois peptídeos antimicrobianos não identificados aparecem após o sexto dia e estão presentes até o último dia da infecção (Boulanger e cols., 2002b). Essas descobertas sugerem que a mosca é capaz de detectar e responder à presença de tripanosomas procíclicos, mas possivelmente não é capaz de fazê-lo na presença de formas sanguíneas. Além disso, uma atacina recombinante apresentou efeitos inibitórios nas formas sanguíneas (menos sensíveis) e nas formas procíclicas (mais sensíveis) de tripanosomas em ensaios *in vitro* (Hu e Aksoy, 2005).

O papel da atacina na mediação da refratariedade foi demonstrado pelo silenciamento do gene da atacina, utilizando RNA de interferência. Moscas *Glossina pallidipes* com o gene da atacina silenciado tiveram uma taxa de infecção de 45% enquanto moscas não silenciadas apresentaram taxas de infecção de 11% (Naydush e Aksoy, 2007).

Simbiontes.

Vários simbiontes podem coexistir em um mesmo organismo, no caso das moscas, já foram descritos pelo menos três diferentes simbiontes. *Wigglesworthia glossinidius* reside no citoplasma de células epiteliais especiais presentes no intestino, as quais formam um órgão chamado bacterioma (Aksoy e cols., 1995; Aksoy, 1995). Essa bactéria, pertencente à família das Enterobacteriaceae, produz metabólitos que compensam os déficits nutricionais da dieta do hospedeiro hematófago e há indícios de que esteja associada ao metabolismo das vitaminas

do complexo B, as quais são essenciais para a sobrevivência das moscas tsé-tsé (Wigglesworth, 1929; Nogge, 1981; Akman e cols., 2002). A eliminação da *W. glossinidius* reduz a longevidade, a proporção de digestão de sangue e a fecundidade, o que torna as moscas inférteis (Nogge, 1976; Dale e Welbum, 2001; Pais e cols., 2008). Recentemente, estudos realizados por Pais e cols. (2008) demonstraram que a eliminação seletiva de simbiontes *W. glossinidius* pelo tratamento com ampicilina induz a uma maior suscetibilidade à infecção do intestino médio por tripanossomatídeos. Isto implica que a depuração do simbiote pode levar a uma diminuição na imunidade basal da mosca, afetando a resposta imune do hospedeiro à infecção. No entanto, as moscas com a população de *W. glossinidius* eliminada também apresentaram menor capacidade de digerir o sangue obtido durante o repasto e o aumento da susceptibilidade à infecção por tripanossoma foi observada somente em moscas mais velhas. Em estudo mais recente foi demonstrado que moscas que não entram em contato com *W. glossinidius* durante o estágio larval, não somente tornam-se adultos estéreis, mas também imuno-comprometidos e altamente suscetíveis à infecções por *Escherichia coli*, enquanto indivíduos selvagens são refratários. Esse fenótipo inclui redução da expressão de genes que codificam peptídeos antimicrobianos (cecropina e atacina), respostas mediadas por hemócitos e moléculas mediadoras de sinalização (como óxido nítrico sintase) (Weiss e cols., 2011).

Outro simbiote presente em moscas tsé-tsé é a *Sodalis glossinidius*, uma bactéria Gram-negativa da família Enterobacteriaceae (Dale e Maudlin 1999). A contribuição biológica, se houver, de *S. glossinidius* para a mosca tsé-tsé é desconhecida. Uma relação mutualística tem sido postulada (e geralmente aceita), corroborada pela presença de genes funcionais que codificam enzimas necessárias para a síntese de vitaminas (Akman e Aksoy, 2001; Akman e cols., 2002). Tal associação facultativa é apoiada por um estudo mostrando que a longevidade é reduzida em moscas tsé-tsé que não possuem bactérias do gênero *Sodalis* (Dale e Welburn, 2001). O exame dos intestinos de moscas tsé-tsé selvagens capturadas também revelou uma correlação direta entre as infecções por tripanossomas e a densidade de *Sodalis sp.* Foi observado que moscas selvagens carregando *Sodalis sp.* tinham seis vezes mais probabilidade de estarem infectadas com tripanossomas do que moscas cuja presença de *Sodalis sp.* não era detectada (Maudlin e cols., 1990). No entanto, outras populações de moscas selvagens não refletem uma relação tão direta entre a densidade de bactérias e refratariedade ou suscetibilidade da tsé-tsé (Moloo e Shaw, 1989; Geiger e cols., 2005).

As Interações entre Triatomíneos e Tripanosomas.

12

Triatomíneos são insetos hematófagos pertencentes à família Reduviidae, subfamília Triatominae (Lent e Wygodzinsky, 1979) cuja principal característica é a hematofagia presente em todas as espécies, sendo que as cinco fases ninfais e a fase adulta necessitam de repastos sanguíneos para completar o seu desenvolvimento. Os triatomíneos podem subsistir com alimentações sanguíneas abundantes e ocasionais, uma vez que entre os repastos podem permanecer por longos períodos de tempo sem desidratar-se (Friend e Smith, 1985). Isso é possível graças a sua capacidade de buscar ativamente por condições microclimáticas que levam a uma maior ou menor perda de água dependendo do seu estado fisiológico (Rocca e Lazzari, 1994; Schilman e Lazzari, 2004; Guarneri e cols., 2002, 2003; Xavier e cols., 2005). Os triatomíneos são primitivamente insetos silvestres, característica esta mantida ainda hoje pela maioria das espécies encontradas nos focos naturais, onde vivem associadas a animais silvestres (Lent e Wygodzinsky, 1979). Algumas espécies também invadem e colonizam ambientes peridomésticos como galinheiros e currais, e domicílios humanos, onde o homem passa a ser uma de suas fontes de alimentação (Schofield, 1994).

Além da espoliação sanguínea que causam, os triatomíneos são hospedeiros de algumas espécies de protozoários, dentre elas, o *Trypanosoma cruzi* e o *Trypanosoma rangeli*. O *T. cruzi* é um parasito heteroxênico que infecta triatomíneos e mamíferos nas Américas, sendo o agente etiológico da doença de Chagas, uma antropozoonose que afeta mais de 18 milhões de pessoas em todo o mundo (TDR diseases, 2005). Assim como o *T. cruzi*, o *T. rangeli* também tem triatomíneos e mamíferos como hospedeiros e, embora este protozoário não seja considerado patogênico para o homem, pode apresentar diferentes graus de patogenicidade para o inseto vetor (Brecher e Wigglesworth, 1944; Lake e Friend, 1967; D'Alessandro 1976; Eichler e Schaub, 1998).

O ciclo evolutivo do *T. cruzi* (**Fig. 2**) inicia-se quando o triatomíneo ingere formas tripomastigotas durante o repasto sanguíneo em mamíferos infectados. Poucas horas após a infecção, os tripomastigotas migram do intestino médio anterior para o médio posterior onde se diferenciam em formas epimastigotas (Ferreira e cols., 2011). O parasito se divide sob a forma epimastigota e se diferencia na ampola retal em formas tripomastigotas metacíclicas que poderão ser transmitidas a outros mamíferos no próximo repasto (Garcia e Azambuja, 1991). A transmissão acontece primariamente através da deposição de fezes e urina

infectadas nas mucosas ou em locais próximos ao da lesão tecidual causada pela picada. Entretanto, alguns estudos têm levantado a questão da importância da transmissão oral para a circulação do *T. cruzi* entre mamíferos, inclusive o homem (Barreto e cols., 1978, Calvo Mendes e cols., 1992, Roque e cols., 2008). A transmissão oral aparentemente explicaria melhor a infecção de predadores do que a contaminação por fezes na densa pelagem desses animais (Roque e cols., 2008). O aparecimento de surtos de transmissão oral do *T. cruzi* em humanos através da ingestão de alimentos contaminados com triatomíneos infectados corrobora a ideia da importância dessa rota de transmissão na evolução da interação do parasito com seus hospedeiros naturais (Barbosa, 2006; Steindel e cols., 2008). Uma vez no hospedeiro mamífero, as formas tripomastigotas são capazes de invadir diferentes tipos celulares onde se diferenciam em formas amastigotas que se dividem e vão gerar os tripomastigotas sanguíneos, que entram na circulação e são as formas infectantes para o triatomíneo (Brener, 1973; Zeledón, 1987).

O ciclo de vida do *T. rangeli* no hospedeiro vertebrado é pouco conhecido, com algumas evidências de que sua proliferação possa ocorrer no interior de monócitos (Osório e cols., 1995; Eger-Mangrich e cols., 2001). No hospedeiro invertebrado (**Fig. 3**), o ciclo se inicia com a ingestão de formas tripomastigotas juntamente com o repasto sanguíneo. Dentro do intestino, os parasitos se diferenciam em formas epimastigotas longas e curtas que se dividem e atravessam o epitélio intestinal alcançando a cavidade celômica. Uma vez na hemocele, os parasitos se multiplicam e então migram para as glândulas salivares onde se diferenciam em tripomastigotas metacíclicos, que são transmitidos ao hospedeiro vertebrado no momento da picada (D'Alessandro, 1976; D'Alessandro-Bacigalupo e Saravia, 1992).

Interações entre *T. cruzi* e o Hospedeiro Vetor.

Estabelecimento da Infecção.

Uma vez que o *T. cruzi* entra no intestino do triatomíneo juntamente com o repasto sanguíneo, os parasitos são confrontados com componentes da saliva, enzimas digestivas e profundas mudanças no microambiente, como por exemplo, temperatura, osmolaridade, fatores nutricionais e pH. Alguns fatores produzidos pelo inseto, como lectinas e aglutininas, também podem interagir com o parasito e interferir na sua capacidade de colonização. Durante o processo de ingestão sanguínea, parte da saliva do triatomíneo que é injetada no hospedeiro vertebrado chega ao estômago juntamente com o repasto sanguíneo (Soares e cols., 2006). As glândulas salivares de *T. infestans* possuem uma proteína denominada de trialisina, que uma vez ativada, tem a capacidade de permeabilizar e lisar células procarióticas e eucarióticas. A trialisina induz lise de tripomastigotas de *T. cruzi* e poderia estar envolvida na eliminação de algumas cepas do parasito no início da infecção do triatomíneo (Amino e cols., 2002). Por outro lado, a saliva de *R. prolixus* produz uma molécula denominada de lisofosfatidilcolina (LPC) cuja função foi inicialmente relacionada a atividade anti-hemostática, uma vez que a molécula foi capaz de facilitar a alimentação do triatomíneo impedindo a agregação plaquetária e aumentando a vasodilatação através da produção de óxido nítrico (Golodne e cols., 2003). Além destas propriedades anti-hemostáticas, recentemente foi descrito que a LPC atenua as respostas imunes de macrófagos induzidas pelo *T. cruzi*. A LPC aumenta a concentração celular no local da picada e a associação entre os parasitos e macrófagos alvo, além de bloquear a produção de óxido nítrico, consequentemente aumentando a parasitemia sanguínea (Mesquita e cols., 2008).

Trato Intestinal.

O trato intestinal dos triatomíneos pode ser dividido em três regiões: intestino anterior, intestino médio (por sua vez dividido em médio anterior e médio posterior) e intestino posterior. As regiões do trato intestinal diferem na sua morfologia e funções e, portanto, nas condições microambientais a que os parasitos estarão expostos. Os triatomíneos concentram e estocam o sangue ingerido no intestino médio anterior, onde ele permanece virtualmente indigerido, exceto pela lise das células sanguíneas. A digestão começa no início do intestino médio posterior, a

região mais estreita do intestino médio (Billingsley e Downe, 1985, 1988; Schaub e Meiser, 1990). Em ambas as regiões do intestino médio, camadas de membranas extracelulares não quitinosas denominadas de membranas perimicrovilares (Terra, 1990) se desenvolvem poucas horas após a alimentação cobrindo as membranas microvilares e criando diferentes compartimentos para as enzimas digestivas (Billingsley e Downe, 1983, 1986; Terra e Ferreira 2005). No reto, cuja estrutura é formada por cutícula recoberta por hidrocarbonetos, os remanescentes da digestão e/ou excreção são estocados até a defecação. No intestino médio posterior, em infecções já estabelecidas e cerca de dois dias após a alimentação, o *T. cruzi* pode ser encontrado próximo às membranas extracelulares, sem, contudo, penetrá-las. Em regiões com poucas ou sem membranas extracelulares um número menor de parasitos é encontrado próximo às microvilosidades do intestino, sem que haja inserções profundas entre os microvilos (Kollien e cols., 1998). Aparentemente, os parasitos não parecem afetar a formação das microvilosidades e das membranas extracelulares. Neste mesmo período pós-alimentação, um número muito maior de parasitos pode ser encontrado na região do reto. Em áreas com altas densidades de flagelados, as superfícies dos corpos celulares dos flagelados podem estar corrugadas e interdigitadas. Além disso, alargamentos flagelares são formados nos pontos de ligação do parasito com a cutícula do reto (Kollien e cols., 1998). Acredita-se que as características da cutícula do reto favoreçam a adesão dos parasitos, fator que também favorece a metaciclogênese (Kollien e Schaub, 2000).

A adesão de epimastigotas de *T. cruzi* às membranas perimicrovilares parece ser importante para a divisão dos parasitos (Gonzalez e cols., 1999), uma vez que o tratamento do tecido intestinal de *Rhodnius prolixus* com antisoro produzido contra as membranas perimicrovilares reduz o desenvolvimento do parasito no vetor (Gonzalez e cols., 2006). Os epimastigotas permanecem aderidos às membranas perimicrovilares no intestino médio posterior através da ancoragem dos flagelos (Nogueira e cols., 2007). A superfície celular das formas epimastigotas de *T. cruzi* possui glicoinositolfosfolipídios que também têm sido associados à adesão dos parasitos às membranas perimicrovilares. Uma diminuição na expressão dessas moléculas na superfície das formas tripomastigotas (Golgher e cols., 1993; Zingales e cols., 1982; Pereira-Chiocola e cols., 2000) diminui sua capacidade de adesão, fazendo com que estas formas permaneçam livres na ampola retal do inseto (Nogueira e cols., 2007). Além dos glicoinositolfosfolipídios, proteínas hidrofóbicas presentes na superfície de formas epimastigotas, bem como resíduos de carboidratos de glicoproteínas (principalmente ácido siálico e D-

manose) das membranas perimicrovilares também parecem ser importantes fatores na interação parasito/vetor (Alves e cols., 2007). Foi demonstrado que tripanossomatídeos presentes no intestino de *R. prolixus* são capazes de incorporar os fosfolipídios presentes na membrana perimicrovilar (Folly e cols., 1999). Além disso, recentemente, cisteíno peptidases da família das calpaínas foram relacionadas ao processo de adesão de formas de epimastigotas de *T. cruzi* ao epitélio intestinal de *R. prolixus*, bem como do processo de metaciclogênese (Ennes-Vidal e cols., 2011).

Apesar de jamais deixar o tubo digestivo, o *T. cruzi* tem demonstrado ser capaz de manipular o metabolismo de seu hospedeiro invertebrado através de mecanismos pouco conhecidos. A infecção pelo *T. cruzi* promove um aumento do fluxo de ácidos graxos para o interior do tubo digestivo e um aumento da expressão da FABP (proteína transferidora de ácidos graxos) nesse tecido. Essa proteína é responsável pelo transporte de ácidos graxos, os quais são substrato para a síntese de lipídios e formação de membranas. Nos ovários e corpo gorduroso também foi observada uma mudança no metabolismo de lipídios e modulação da expressão da FABP (Bittencourt-Cunha, 2009).

Os triatomíneos ingerem grandes quantidades de sangue, que é continuamente digerido pela ação de proteases, liberando aminoácidos, peptídeos e heme. O heme é utilizado pelo *T. cruzi* como cofator nutricional e em várias hemeoproteínas essenciais para o seu metabolismo. Entretanto, o parasito não possui uma via de biossíntese completa da molécula (Salzman e cols., 1982; Lombardo e cols., 2003) precisando adquirir heme extracelular de seus hospedeiros. Lara e colaboradores (2007) demonstraram que o heme adquirido e incorporado da dieta sanguínea do vetor é necessário para a proliferação das formas epimastigotas do *T. cruzi*.

Uma vez que os triatomíneos são capazes de resistir ao jejum durante longos períodos, este fator também pode influenciar no desenvolvimento dos parasitos que acabam ficando sem aporte nutricional para o seu crescimento. A infecção pelo *T. cruzi* pode ou não ser perdida após longos períodos sem alimentação, e isso vai depender da espécie e do estágio de desenvolvimento do triatomíneo, da cepa do parasito, e da dose e duração da infecção (Schaub e Böker, 1986). Entretanto, os efeitos do jejum são evidentes sobre as densidades populacionais dos parasitos. Kollien e Schaub (1998), trabalhando com uma cepa isolada de *Triatoma infestans* observaram uma perda total de parasitos no intestino médio posterior de ninfas com jejuns superiores a 30 dias. Neste mesmo estudo, o número de parasitos mortos na região do reto cresceu com o aumento do período de jejum.

Como se alimentam exclusivamente de sangue, o desenvolvimento dos triatomíneos depende fortemente da presença de bactérias simbiotes, que são transmitidas dentro de uma população via coprofagia. Os simbiotes desenvolvem-se principalmente no esôfago e intestino médio anterior, aumentando cerca de 1000 vezes o tamanho de suas populações após a ingestão sanguínea pelo triatomíneo (Eichler e Schaub, 2002). A ausência dos simbiotes leva a vários efeitos deletérios no inseto, que incluem o atraso no desenvolvimento (Brecher e Wigglesworth, 1944; Lake e Friend, 1967) e aumento nas taxas de mortalidade ninfal (Half, 1956; Harrington, 1960), problemas durante a digestão sanguínea e excreção (Brecher e Wigglesworth, 1944; Eichler e Schaub, 1998) e reduções do sistema traqueal (Eichler e Schaub, 1998). A análise do desenvolvimento dos simbiotes *Nocardia sp.* e *Rhodococcus rhodnii* no intestino de *T. infestans* e *R. prolixus*, respectivamente, na presença do *T. cruzi*, mostrou que o parasito não afeta as taxas de crescimento das bactérias. Provavelmente, o crescimento dos simbiotes não é alterado devido à região do intestino em que o flagelado se desenvolve mais fortemente, o reto, não ser o sítio de colonização dos simbiotes (Eichler e Schaub, 2002).

A patogenicidade, normalmente medida de maneira direta como um aumento nas taxas de mortalidade e indução de castração do vetor, é um aspecto bastante relevante na interação entre tripanosomas e triatomíneos. *T. infestans* infectados por *T. cruzi* (cepa Chile 5), mantidos isoladamente ou em grupos, a 26°C, e acompanhados durante o período de muda do primeiro para o segundo estágio, não mostraram diferenças quanto ao tempo de desenvolvimento quando comparados a insetos controle (Schaub, 1988a). Vários outros trabalhos também reportam ausência de patogenicidade de *T. cruzi* para o hospedeiro invertebrado (Zeledón e cols., 1970; Juarez, 1970; Schaub, 1988b). Entretanto, parasitos podem também reduzir o fitness de seus hospedeiros indiretamente, através de sutis reduções na sua fecundidade (Ballabeni, 1995; Poulin, 1998). *Panstrongylus megistus* infectados por *T. cruzi* (cepa VLE-95) e mantidos a temperatura de 30°C, apresentaram um desenvolvimento de ninfas a adultos semelhante ao do grupo controle, incluindo taxas de mortalidade e período intermudas. Entretanto, as fêmeas provenientes do grupo infectado colocaram uma quantidade de ovos 3,5 vezes menor do que aquelas do grupo controle. Foram também observados para o grupo infectado, um menor número de ovos férteis e menores taxas de eclosão (Lima e cols., 1992). *Mepraia spinolai* alimentados repetidamente em camundongos infectados por *T. cruzi* tiveram um prolongamento do seu tempo de

desenvolvimento e apresentaram uma redução em diferentes variáveis relacionadas ao tamanho corpóreo, inclusive no tamanho das gônadas (Botto-Mahan e cols., 2008). Aparentemente, o *T. cruzi* parece competir com seu vetor por nutrientes, já que em situações de jejum, a resistência dos insetos é reduzida (Schaub, 1989).

Também têm sido observadas alterações comportamentais em triatomíneos infectados pelo *T. cruzi*. *M. spinolai* infectados e com jejuns superiores a 30 dias, aumentaram sua capacidade de detecção e orientação ao hospedeiro vertebrado em cerca de duas vezes em relação aos insetos não infectados, o que poderia ser consequência de um maior nível de jejum nos indivíduos infectados (Botto-Mahan e cols., 2006). Em associações parasito-vetor, como a de tripanosomas e insetos, dois mecanismos têm sido sugeridos para explicar o aumento do número de ataques de insetos hematófagos infectados aos hospedeiros vertebrados. Primeiro tripanosomatídeos e vetores competiriam pelos metabólitos no sangue ingerido, e a diminuição das reservas levaria a um número maior de tentativas de alimentação pelo inseto (Schaub, 1992; Kollien e Schaub, 2000). Segundo, tripanosomas poderiam interferir no processo de ingestão do inseto, causando distúrbios no trato digestivo, principalmente intestino médio anterior e posterior, levando a novas tentativas de alimentação (Schaub, 1992; Borges e cols., 2006).

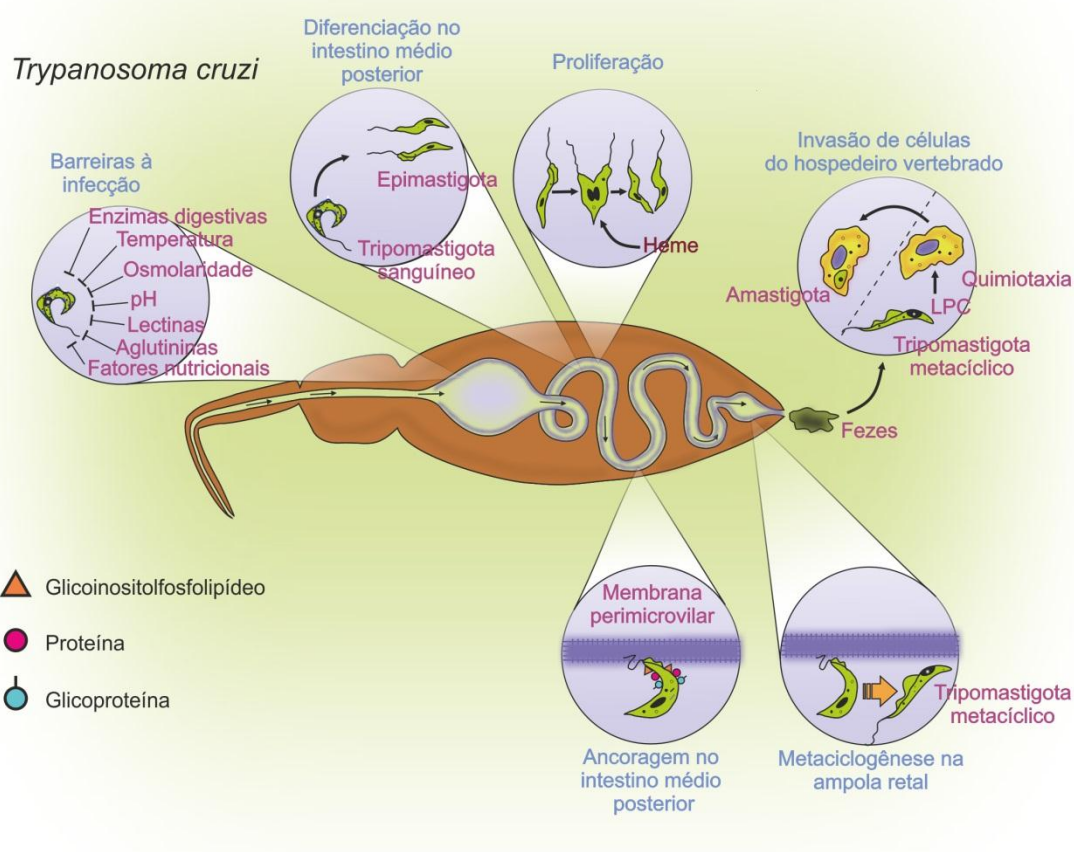


Figura 2: Interação entre *Trypanosoma cruzi* e triatomíneos. A ingestão de formas tripomastigotas sanguíneas durante a alimentação do triatomíneo é o ponto inicial do ciclo de vida do *T. cruzi* no hospedeiro invertebrado. Enzimas digestivas, temperatura, osmolaridade, pH, lectinas, aglutininas e fatores nutricionais são capazes de causar a morte dos parasitos. Os parasitos capazes de transpor essas barreiras se diferenciam em epimastigotas no intestino médio posterior, onde também ocorre a ancoragem dos parasitos à membrana perimicrovilar, o que acontece através da interação com glicoinositolfosfolipídios, proteínas e glicoproteínas presentes na membrana do parasito. As formas epimastigotas se proliferam no intestino, sendo um dos sinais conhecidos para essa diferenciação a presença de heme. Ocorre também a migração para a porção final do intestino, conhecida como ampola retal, onde ocorre a metaciclogênese, havendo por fim, formas tripomastigotas metacíclicas livres. Essas formas são eliminadas pelas fezes do e ao coçar o local da picada, o hospedeiro vertebrado transporta os parasitos para a ferida aberta pela probóscide do triatomíneo, e esses invadem células nucleadas, nas quais se diferenciam em formas amastigotas. Essa invasão é facilitada pela quimiotaxia de células imunes, como macrófagos, para a porta de entrada da infecção pela LPC.

As Relações do *T. rangeli* com o seu Hospedeiro Vetor.

Trato Intestinal.

Diferentemente do *T. cruzi*, a transmissão do *T. rangeli* ao hospedeiro vertebrado ocorre durante a alimentação do vetor, quando o inseto injeta formas tripomastigotas metacíclicas juntamente com a saliva (**Fig. 3**). Entretanto, em infecções naturais, a porcentagem de insetos com parasitos presentes no trato intestinal, e que também apresentam hemolinfa e glândulas salivares positivas, varia de 2 a 50% (Añez e cols., 1987; Groot, 1954; Hecker e cols., 1990; Marinkelle, 1968; Tobie, 1965, 1970; Ferreira e cols., 2010). Ainda não são conhecidos os fatores que levam ao desenvolvimento de infecções completas. Pequenas modificações como alterações nos resíduos de açúcar em glicoproteínas de superfície poderiam contribuir para o aumento ou diminuição nas taxas de penetração do epitélio intestinal. Aparentemente, o sexo dos insetos também parece influenciar nas taxas de positividade de glândulas salivares, sendo que ninfas destinadas a serem machos apresentam significativamente mais infecções completas do que aquelas destinadas a serem fêmeas (Tobie, 1965).

A dinâmica de estabelecimento desigual do parasito provavelmente leva aos diferentes níveis de patologia observados no hospedeiro invertebrado. Em infecções massivas, principalmente na hemolinfa, um grande número de insetos morre, e os que sobrevivem prolongam o período intermudas, além de apresentarem diferentes alterações morfológicas (Grewal, 1957; Tobie, 1961; Añez, 1984). Outra característica da infecção observada em um número considerável de indivíduos infectados é a elevada taxa de mortalidade durante a ecdise, quando os insetos morrem ao não conseguirem sair da antiga cutícula (Añez, 1984).

A infecção pelo *T. rangeli* no trato intestinal pode persistir pela vida toda do inseto, sendo que parasitos podem ser encontrados nas fezes de 31 a 70% dos insetos infectados (Pifano e cols., 1948; D'Alessandro, 1976; Cuba, 1975; Hecker e cols., 1990). Apesar de parasitos serem eliminados juntamente com as fezes do vetor, os mesmos não parecem ser infectivos, fazendo com que a transmissão contaminativa, característica no caso de infecções por *T. cruzi*, não ocorra (Rentifo e cols., 1950; D'Alessandro, 1976; Tobie, 1964; Hecker e cols., 1990).

Diferentemente do *T. cruzi* que é capaz de se desenvolver em diferentes gêneros de triatomíneos, o desenvolvimento completo do ciclo biológico do *T. rangeli* ocorre preferencialmente em triatomíneos do gênero *Rhodnius*. O intestino

de *T. infestans*, em comparação ao de *R. prolixus*, possui níveis mais altos de aglutininas contra *T. rangeli*, e embora não tenham sido encontradas evidências de atividade lítica contra o parasito, as aglutininas poderiam, juntamente com outras moléculas, conferir uma maior resistência ao desenvolvimento do *T. rangeli* no intestino do *T. infestans* (Gregório e Ratcliffe, 1991). Além disso, a saliva de *T. infestans* apresenta atividade lítica contra *T. rangeli*, e uma vez que parte da saliva é ingerida pelo inseto durante o repasto sanguíneo, esta atividade poderia também estar relacionada com o baixo grau de desenvolvimento do parasito no intestino de *T. infestans* (Gregório e Ratcliffe, 1991).

No trato digestivo de *R. prolixus*, a diferenciação das formas tripomastigotas ingeridas durante o repasto sanguíneo dá origem a formas epimastigotas curtas e longas que se dividem, colonizam o intestino, e são as responsáveis pela invasão da hemocele do inseto. No trato intestinal, os parasitos são sempre observados livres no lúmen, nunca aderidos ao epitélio (Hecker e cols., 1990).

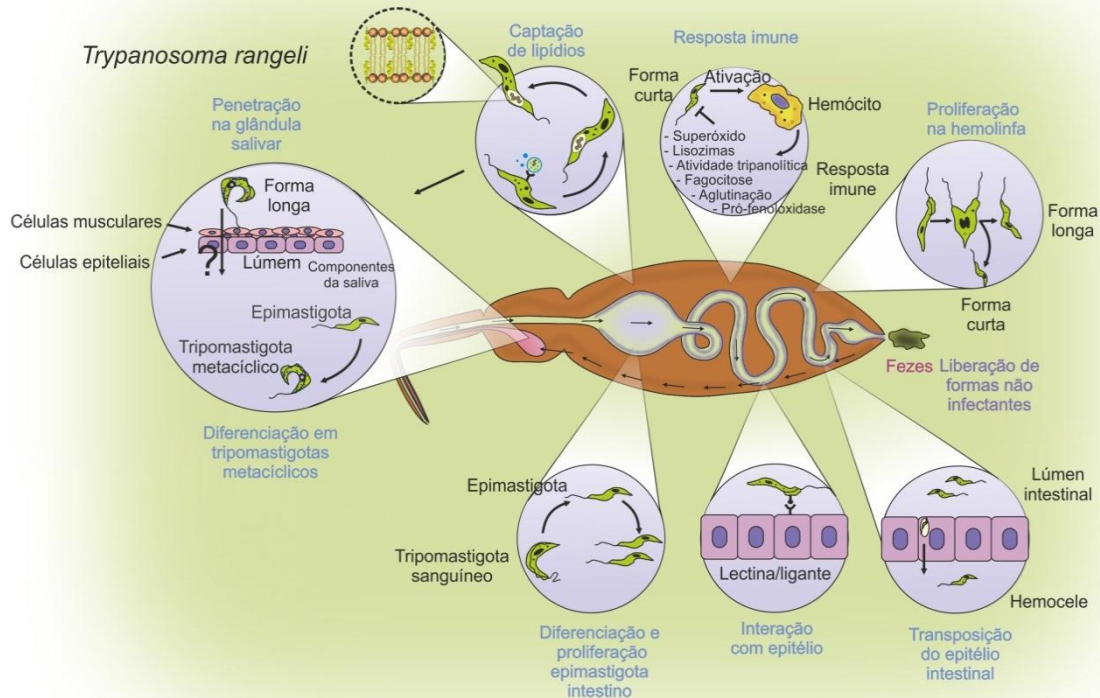


Figura 3: Interação entre *Trypanosoma rangeli* e triatómeos. Tripomastigotas sanguíneos são ingeridos por triatómeos durante o repasto sanguíneo, os quais se diferenciam a epimastigotas. Após a diferenciação, as formas epimastigotas se proliferam, culminando no estabelecimento da infecção. Isso promove a inibição do crescimento de endossimbiontes, os quais são de grande importância para o triatómeo, inclusive no processo digestivo. Após a proliferação, os parasitos interagem com a membrana do epitélio intestinal através de lectinas e seus respectivos ligantes e então cruzam o epitélio para alcançar a hemocele. Uma vez na hemolinfa os parasitos precisam transpor a resposta imune do inseto e obter nutrientes a fim de sobreviver e se multiplicar. Uma forma de consegui-los é a captação de lipoproteínas, como a lipoforina, a qual é metabolizada e os lipídios presentes são incorporados à membrana do parasito. A migração culmina no alcance da glândula salivar pelas formas epimastigotas longas, as quais atravessam o epitélio da glândula, chegando ao lúmen. Essa interação pode refletir em uma diminuição de componentes salivares essenciais para a alimentação adequada do inseto. E é no momento da alimentação, mais precisamente, da injeção da saliva em que os parasitos serão transmitidos, na forma de tripomastigotas metacíclicos.

Uma importante descoberta na interação do *T. rangeli* com o hospedeiro invertebrado foi a influência que a infecção pelo parasito tem sobre as populações de simbioses do intestino de *R. prolixus* (Eichler e Schaub, 2002). Como já citado anteriormente, os organismos simbioses sintetizam nutrientes essenciais ausentes na dieta sanguínea dos triatomíneos e a sua ausência leva a uma série de efeitos deletérios que incluem o retardo do desenvolvimento ninfal, aumento nas taxas de mortalidade, distúrbios na digestão e excreção e reduções do sistema traqueal. A infecção de *R. prolixus* pelo *T. rangeli* retardou o desenvolvimento de *R. rhodnii* presentes nos conteúdos intestinais do inseto (Eichler e Schaub, 2002) e também reduziu a densidade dos simbioses no intestino de insetos infectados (Watkins, 1969). Além disso, foi também demonstrado que formas de cultura de *T. rangeli* são capazes de inibir o crescimento dos simbioses em placas de ágar (Watkins 1971).

Apesar de estarem normalmente livres no lúmen do intestino, para alcançarem a hemocele do inseto os epimastigotas de *T. rangeli* realizam uma série de interações com o epitélio intestinal mediadas, provavelmente, por lectinas/ligantes presentes na superfície do parasito e nas células epiteliais do inseto. A aderência do *T. rangeli* às células epiteliais se dá aparentemente pelo seu flagelo ou região posterior (Oliveira e Souza, 2001).

Resíduos de açúcar e de proteínas expostos em superfícies de interação parecem ser importantes para a habilidade dos parasitos em atravessar o epitélio intestinal. Conforme a infecção progride, os tripanosomas atravessam os diferentes microambientes dentro do inseto vetor e vão mudando açúcares de sua superfície em determinados estágios do ciclo de vida, para manter as interações com os tecidos do inseto. Rudin e colaboradores (1989) demonstraram que as formas epimastigotas encontradas na hemolinfa adquirem reatividade para a lectina Concanavalina A durante a passagem pelo epitélio intestinal. Isso indica a existência de modificações na superfície dos parasitos, como a expressão de novas moléculas de superfície, o que poderia ser importante em relação a mecanismos de reconhecimento entre o parasito e as células do sistema imunológico.

Estudos utilizando animais irradiados sugerem que as membranas perimicrovilares que revestem o intestino representam uma estrutura essencial no controle da invasão da hemocele pelo *T. rangeli* e que alterações nessas membranas podem facilitar a penetração do parasito na hemocele do vetor (Gomes e cols., 2002). A irradiação gama em *R. prolixus* provocou o agrupamento de

microvilos e desorganização das membranas perimicrovillares das células epiteliais do intestino dos insetos, o que acelerou a invasão da hemolinfa pelo *T. rangeli*. Assim, as membranas perimicrovillares devem funcionar como uma primeira barreira de defesa do inseto contra a invasão da hemolinfa o que reflete no número baixo de insetos infectados que também apresentam parasitos na hemolinfa e glândulas salivares.

A penetração do epitélio do intestino médio pelo *T. rangeli* é bastante baixa, e aparentemente não está relacionada com a duração da infecção, nem com combinações entre cepas de parasitos e vetores. Hecker e colaboradores (1990) registraram a passagem do parasito pelo epitélio intestinal através de uma rota intracelular. Neste caso, os parasitos dentro das células epiteliais sempre foram vistos contidos dentro de vacúolos, que podiam ser individuais ou conter vários tripanosomas. As células infectadas não apresentaram mudanças estruturais mesmo com vários parasitos presentes no seu interior. Para alcançar a hemolinfa, após passarem pela lâmina basal, os parasitos deixaram os vacúolos celulares. Oliveira e Souza (2001), através de estudos de microscopia eletrônica, mostraram alterações morfológicas e citoplasma menos denso nas células invadidas pelos parasitos durante a passagem pelo epitélio intestinal. Neste estudo não foi observada a presença de vacúolos envolvendo os parasitos durante a passagem pelas células intestinais.

Hemolinfa.

A infecção na hemolinfa ocorre quando os parasitos ingeridos durante uma alimentação infectiva penetram a parede do intestino e alcançam a cavidade corporal dos triatomíneos. O tempo que o *T. rangeli* demora em fazer a passagem de um ambiente ao outro é imprevisível. Normalmente, a invasão da hemolinfa acontece semanas após a colonização do intestino, quando os parasitos já estão estabelecidos e com populações numerosas (Groot, 1954; Grewal, 1957; D'Alessandro, 1976). Entretanto, a presença do parasito na hemolinfa já foi registrada em até 24 horas após a alimentação infectiva (Añez, 1980).

Uma vez que o *T. rangeli* consegue alcançar a hemolinfa, inicia-se um período de intensa multiplicação. Em infecções iniciadas através do inóculo de epimastigotas da cepa CHOACHI diretamente na hemocele do inseto, se observa

que as formas epimastigotas iniciais são predominantemente curtas apresentando um alto grau de multiplicação (**Fig. 4A**). Estas formas vão dando lugar a epimastigotas longas que também se multiplicam intensamente e logo passam a predominar na hemolinfa (**Fig. 4B**). Parasitos são encontrados dentro de hemócitos e a interiorização do *T. rangeli* está normalmente associada ao predomínio de formas epimastigotas curtas na hemolinfa (**Fig. 4C e D**).

Os estudos clássicos sobre a interação *T. rangeli*/*R. prolixus* afirmavam que o parasito era capaz de escapar das respostas humorais e celulares do inseto e ainda, que era capaz de se dividir dentro das células fagocíticas (Tobie 1968, 1970; Takle, 1988). Estudos mais recentes demonstraram, entretanto, que uma vez na hemolinfa, o *T. rangeli* é reconhecido e ativa o sistema de defesa do seu inseto vetor. Vários mecanismos humorais e celulares atuam como fatores limitantes para o desenvolvimento do parasito, incluindo lisozimas e atividade tripanolítica (Mello e cols., 1995; Gomes e cols., 1999), ativação do sistema pró-fenoloxidase (Mello e cols., 1995; Gomes e cols., 1999; 2003), fagocitose e microagregação de hemócitos (Takle, 1988; Mello e cols., 1995), aglutinação (Pereira e cols., 1981; Mello e cols., 1995; Ratcliffe e cols., 1996) e produção de ânions superóxido (Whiten e cols., 2001).

O perfil celular da hemolinfa de *R. prolixus* se modifica na presença do *T. rangeli* após o primeiro dia de infecção (Oliveira e Souza, 2003). Estudos utilizando microscopia eletrônica mostraram um aumento no número de plasmatócitos e oenócitos, e um decréscimo de prohemócitos, células granulares e adipócitos. Os nódulos foram compostos predominantemente por plasmatócitos e células granulares sendo que o seu número decresceu ao longo da infecção. Um grande número de flagelados foi encontrado dentro de plasmatócitos em vacúolos citoplasmáticos que continham atividade de fosfatase ácida e não foram observados parasitos em divisão. Aparentemente, os plasmatócitos são capazes de interiorizar e destruir formas epimastigotas de *T. rangeli* dentro de vacúolos (Oliveira e Souza, 2003).

No decorrer da infecção da hemolinfa ocorre uma diminuição da atividade tanto de mecanismos humorais quanto celulares de *R. prolixus* infectados por *T. rangeli* que coincide com o desaparecimento das formas curtas do parasito (Feder e cols., 1999; Gomes e cols., 2003; Garcia e cols., 2004). Vários trabalhos têm demonstrado que a resposta imune do inseto é voltada preferencialmente às formas curtas enquanto que as formas longas teriam a capacidade de evadir-se e seriam responsáveis pela manutenção da infecção bem como, pela invasão das

glândulas salivares (Mello e cols., 1995, 1999; Gomes e cols., 1999, 2003). Aparentemente, as formas epimastigotas longas do *T. rangeli* estariam funcionando como o escape do parasito frente às respostas imunológicas do inseto.

Um aumento no volume de hemolinfa de triatomíneos infectados pelo *T. rangeli* tem sido registrado por diferentes autores (Grewal, 1957; Tobie, 1965; Watkins, 1971). Watkins (1971) relacionou este aumento a uma redução nas taxas de excreção nas três primeiras horas após a alimentação. Ferreira e colaboradores (2010) mediram as taxas de excreção e de perda de água em ninfas infectadas que apresentaram aumento de volume de hemolinfa e não observaram alterações em relação a insetos controle. Entretanto, os insetos infectados apresentaram um aumento na quantidade de lipídios e de corpos gordurosos. Como citado anteriormente, o sangue ingerido pelos triatomíneos é estocado no intestino médio anterior e digerido no intestino médio posterior (Billingsley, 1988, 1990). Após um repasto sanguíneo, moléculas de diacilglicerol e fosfolipídios são transferidas do intestino para uma proteína carreadora na hemolinfa, denominada de lipoforina (Atella e cols. 1995; Coelho e cols., 1997). A lipoforina é a principal lipoproteína hemolinfática responsável pelo transporte de lipídios dos sítios de síntese e estocagem para os sítios de utilização. Nestes tecidos a transferência de lipídios envolve interações com receptores específicos presentes nas superfícies celulares (Machado e cols., 1996; Pontes e cols., 2002; Grillo e cols., 2007). Logo após a alimentação, a lipoforina é abastecida com lipídios no intestino e pode transportá-los para os ovários em desenvolvimento, assim como para o corpo gorduroso, onde serão estocados. Com o decorrer do processo digestivo, por volta do 10^o dia após o repasto sanguíneo, o corpo gorduroso se torna o principal tecido responsável pelo abastecimento de lipídios da lipoforina (Atella e cols., 1992; Atella e cols., 1995; Coelho e cols., 1997). Estudos de fluxo de lipídios em hospedeiros vertebrados têm demonstrado que membros da família *Trypanosomatidae* não possuem vias de síntese completa para alguns esteróis e ácidos graxos, o que faz com que essas moléculas precisem ser adquiridas dos fluidos do hospedeiro (Dixon e cols., 1971; Coppens e Coutoy, 1995; Coppens e cols., 1995; Vial e cols., 2003). Folly e colaboradores (2003) demonstraram que o *T. rangeli* é capaz de endocitar moléculas de lipoforina, através de receptores específicos presentes na superfície do parasito, e metabolizar os lipídios presentes na lipoproteína. Assim, o aumento na quantidade de lipídios em insetos infectados observado por Ferreira e cols. (2010) poderia estar relacionado a um desequilíbrio entre lipoforinas e lipídios causado pela incorporação da proteína pelo parasito. Em adição, tripanosomas são

também capazes de incorporar alguns lipídios diretamente do meio (Morita e Englund, 2001; Paul e cols., 2001). Sendo assim, o *T. rangeli* também poderia ser capaz de modular a nutrição do inseto para um aumento na produção de lipídios.

Nem todos os triatomíneos que apresentam parasitos no trato intestinal e hemolinfa, desenvolvem glândulas salivares positivas. Um fator que pode interferir nas taxas de infecção é a identidade da cepa de *T. rangeli* e da espécie de *Rhodnius* utilizada. Isolados de *T. rangeli* de distintas origens geográficas mostram comportamentos variáveis em diferentes espécies do gênero *Rhodnius*, e a transmissão pela picada é mais restrita a espécies vetoras locais, sugerindo uma íntima relação evolucionária entre cepas de *T. rangeli* e seus vetores simpátricos (D'Alessandro e Saraiva, 1999; Grisard e cols., 1999; Machado e cols., 2001; Guhl e Vallejo, 2003; Vallejo e cols., 2003; De Stefani Marquez e cols., 2006). Através da comparação da filogenia das espécies de *Rhodnius* com a inferida para isolados de *T. rangeli*, bem como da distribuição geográfica dos isolados, Maia da Silva e colaboradores (2007) demonstraram a existência de uma sobreposição bastante significativa das espécies de *Rhodnius* e as linhagens de *T. rangeli*. Esse encontro foi consistente com a hipótese de uma longa coexistência dos parasitos e seus vetores. A separação de isolados de *T. rangeli* de vetores de distintos complexos vivendo em simpatria favorece a ausência de fluxo gênico entre as linhagens e sugere evolução das linhagens de *T. rangeli* em ciclos de transmissão independentes, provavelmente associados a ecótopos específicos de *Rhodnius spp.*

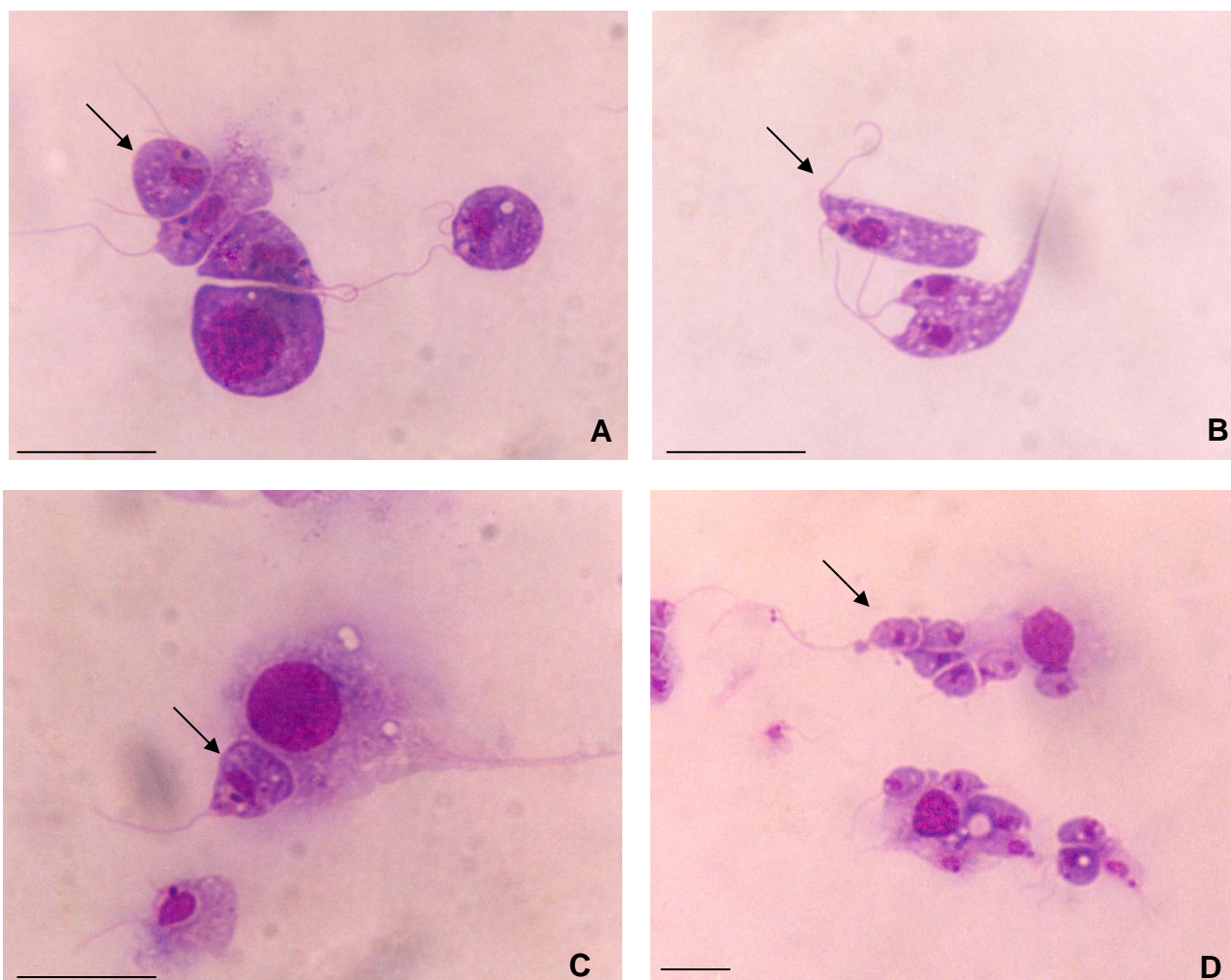


Figura 4. Microscopia de luz de diferentes estágios da infecção da hemolinfa de *Rhodnius prolixus* pelo *Trypanosoma rangeli*. (A) Formas epimastigotas curtas em divisão, 72h p.i. (B) Formas epimastigotas longas em divisão, 96h p.i. (C e D) Interiorização por hemócitos de formas epimastigotas curtas, 120h p.i. Barras = 20 μm (Setas, parasitos).

Glândula Salivar.

A transmissão do *T. rangeli* é feita via saliva durante a picada do triatomíneo e para isso o tripanosoma precisa penetrar nas glândulas salivares do inseto (**Fig. 3**). Sete dias após a infecção intracelomática de *R. prolixus* com o *T. rangeli*, formas epimastigotas longas já podem ser encontradas aderidas pelos flagelos à superfície externa das glândulas salivares. O mecanismo pelo qual os epimastigotas invadem as células das glândulas salivares ainda não está completamente esclarecido, embora tenha sido encontrada em *T. rangeli* uma proteína formadora de poros que poderia estar envolvida na penetração da glândula pelos parasitos (Meirelles e

cols., 2005). As glândulas salivares de *R. prolixus* são altamente glicosiladas, com diversos tipos de resíduos de carboidratos presentes na lâmina basal, músculos e células epiteliais. A entrada do parasito nas glândulas salivares do triatomíneo é mediada pela interação inicial de lectinas/carboidratos presentes na superfície do parasito e na parede da glândula salivar (Basseri e cols., 2002). N-acetil-D-glucosamina (GlcNAc) está presente em grandes quantidades na superfície das glândulas salivares de *R. prolixus* e parece ser importante para a adesão de formas epimastigotas longas de *T. rangeli*, uma vez que a incubação prévia destas formas com GlcNAc impede a adesão dos parasitos (Basseri e cols., 2002). Segundo estudos de Ellis e colaboradores (1980), os parasitos penetram a glândula através da inserção inicial de seus flagelos e então corpos celulares, passando entre as células musculares com diferentes graus de distorção. A penetração da membrana basal também é iniciada pelos flagelos que se invaginam pela membrana celular das células da glândula salivar até que o parasito inteiro esteja envelopado. Os tripanosomas cruzam as células das glândulas salivares dentro desses vacúolos, sendo que a maioria deles perde seus vacúolos antes de alcançar o lúmen da glândula. Hecker e colaboradores (1990) também demonstraram passagens intracelulares com os parasitos inseridos dentro de vacúolos.

Uma vez dentro da glândula salivar, os epimastigotas se diferenciam em tripomastigotas metacíclicos que nadam livremente na saliva. Segundo Meirelles e colaboradores (2005) as formas epimastigotas iniciam a diferenciação enquanto ainda aderidos pelos flagelos aos microvilos das células glandulares. Não foram descritos até o momento mecanismos de defesa que sejam desencadeados pela presença do *T. rangeli* nas glândulas salivares, apesar dos efeitos deletérios que o parasito causa. A infecção das glândulas salivares de *R. prolixus* pelo *T. rangeli* prejudica a função das glândulas salivares do inseto impedindo a expressão completa de seu maquinário anti-hemostático (Garcia e cols., 1994). Isso afeta o comportamento alimentar do inseto induzindo a um aumento significativo no número de picadas e na duração dos períodos de sondagem e reduzindo a habilidade do inseto em ingerir sangue de um hospedeiro vertebrado e consequentemente aumentando as chances de transmissão pelo *T. rangeli* (Añez e East, 1984). Além disso, foi demonstrado que a infecção por *T. rangeli* promove a inibição da atividade de uma tirosina fosfatase que por sua vez leva a uma redução da atividade da enzima óxido nítrico sintase, responsável pela produção de óxido nítrico (Gazos-Lopes e cols., 2012). A redução na produção de óxido nítrico,

potente vasodilatador, provavelmente contribui para o aumento nos tempos de ingestão sanguínea.

Considerações Finais.

Os insetos vetores são um fator determinante na transmissão e disseminação de diversas doenças que afetam o homem e seus animais domésticos. O estudo da interação destes com seus parasitos naturais não só contribui para ampliar o conhecimento sobre a importância das associações parasito-hospedeiro no desenvolvimento de vetores, como também proporciona informações relevantes para o desenvolvimento e melhoramento de ferramentas de controle do parasito, e consequentemente, da doença por ele transmitida.

Referências Bibliográficas.

Acosta-Serrano, A., Vassella, E., Liniger, M., Kunz, C., Renggli, C., Brun, R., Roditi, I., Englund, P.T. 2001. The surface coat of procyclic *Trypanosoma brucei*: programmed expression and proteolytic cleavage of procyclin in the tsetse fly. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98, 1513-1518.

Akman, L., Aksoy, S. 2001. A novel application of gene arrays: *Escherichia coli* array provides insight into the biology of the obligate endosymbiont of tsetse flies. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98, 7546–7551.

Aksoy, S. 1995. *Wigglesworthia* gen. nov. and *Wigglesworthia glossinidia* sp. nov., taxa consisting of the mycetocyte-associated, primary endosymbionts of tsetse flies. Int. J. Syst. Bacteriol. 45, 848–851.

Aksoy, S., Gibson, W.C., Lehane, M.J. 2003. Interactions between tsetse and trypanosomes with implications for the control of trypanosomiasis. Adv. Parasitol. 53, 1-83.

Aksoy, S., Pourhosseini, A. A., Chow, A. 1995. Mycetome endosymbionts of tsetse flies constitute a distinct lineage related to Enterobacteriaceae. Insect Mol. Biol. 4, 15–22.

Alves, C.R., Albuquerque-Cunha, J.M., Mello, C.B., Garcia, E.S., Nogueira, N.F., Bourguignon, S.C., Souza, W., Azambuja, P., Gonzalez, M.S., 2007. *Trypanosoma cruzi*: Attachment to perimicrovillar membrane glycoproteins of *Rhodnius prolixus*. Exp. Parasitol. 116, 44-52.

Amino, R., Martins, R.M., Procopio, J., Hirata, I.Y., Juliano, M.A., Schenkman, S., 2002. Trialysin, a novel pore-forming protein from saliva of hematophagous insects activated by limited proteolysis. J. Biol. Chem. 277, 6207-6213.

- Añez, N., 1980. Early invasion of *Trypanosoma rangeli* into the haemolymph of *Rhodnius prolixus*. T. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 74, 422-423.
- Añez, N., 1984. Studies on *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920. VII – Its effect on the survival of infected triatomine bugs. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 79, 249-255.
- Añez, N., East, J.S., 1984. Studies on *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920 II. Its effect on feeding behaviour of triatomine bugs. Acta Trop. 47, 93-95.
- Añez, N., Nieves, E., Cazorla, D., 1987. Studies on *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920. IX. Course of infection in different stages of *Rhodnius prolixus*. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 82, 1-6.
- Atella, G.C., Gondim, K.C., Masuda, H., 1992. Transfer of phospholipids from the fat body to lipophorin in *Rhodnius prolixus*. Arch. Insect Biochem. Physiol. 19, 133–144.
- Atella, G.C., Gondim, K.C., Masuda, H., 1995. Loading of lipophorin particles with phospholipids at the midgut of *Rhodnius prolixus*. Arch. Insect Biochem. Physiol. 30, 337–350.
- Ballabeni, P., 1995. Parasite-induced gigantism in a snail: a host adaptation? Funct. Ecol. 9, 887– 893.
- Barbosa, P.R.B., 2006. The oral transmission of Chagas disease: an acute form of infection responsible for regional outbreaks. Int. J. Cardiol. 112, 132–133.
- Barretto, M.P., Ribeiro, R.D., Belda Neto, F.M., 1978. Estudos sobre reservatórios e vetores silvestres do *Trypanosoma cruzi*. LXVIII: Infecção de mamíferos pela via oral. Rev. Bras. Biol. 38, 455–459.
- Basseri, H.R., Tew, I.F., Ratcliffe, N.A., 2002. Identification and distribution of carbohydrate moieties on the salivary glands of *Rhodnius prolixus* and their possible involvement in attachment/invasion by *Trypanosoma rangeli*. Exp. Parasitol. 100, 226-234.
- Berriman, M., Ghedin, E., Hertz-Fowler, C., Blandin, G., Renauld, H., Bartholomeu, D.C., Lennard, N.J., Caler, E., Hamlin, N.E., Haas, B. 2005. The genome of the African trypanosome *Trypanosoma brucei*. Science 309, 416-422.
- Billingsley, P.F., 1990. The midgut ultrastructure of hematophagous insects. Annu. Rev. Entomol. 35, 219–248.
- Billingsley, P.F., Downe, A.E.R., 1983. Ultrastructural changes in posterior midgut cells associated with blood feeding in adult female *Rhodnius prolixus* Stal (Heteroptera: Reduviidae). Can. J. Zool. 61, 2574-2586.
- Billingsley, P.F., Downe, A.E.R., 1985. Cellular localization of aminopeptidase in the midgut of *Rhodnius prolixus* Stal (Hemiptera: Reduviidae) during blood digestion. Cell Tissue Res. 241, 421-428.
- Billingsley, P.F., Downe, A.E.R., 1986. The surface morphology of the midgut cells of *Rhodnius prolixus* Stal (Hemiptera: Reduviidae) during blood digestion. Acta Trop. 43, 355-366.

Billingsley, P.F., Downe, A.E.R., 1988. Ultrastructural localization of cathepsin B in the midgut of *Rhodnius prolixus* Stal (Hemiptera: Reduviidae) during blood digestion. *Int. J. Insect Morphol. Embryol.* 17, 295-302.

Bittencourt-Cunha, P.R.B. Uma proteína ligadora de ácidos graxos (FABP) do *Rhodnius prolixus*. 2009. Dissertação (Mestrado em Química Biológica) – Instituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Borges, E.C., Machado, E.M.M., Garcia, E.S., Azambuja, P., 2006. *Trypanosoma cruzi*: effects of infection on cathepsin D activity in the midgut of *Rhodnius prolixus*. *Exp. Parasitol.* 112, 130–133.

Botto-Mahan, C., Cattan, P.E., Medel, R., 2006. Chagas disease parasite induces behavioural changes in the kissing bug *Mepraia spinolai*. *Acta Trop.* 98, 219–223.

Botto-Mahan, C., Ossa, C.G., Medel, R., 2008. Direct and indirect pathways of fitness-impact in a protozoan-infected kissing bug. *Physiol. Entomol.* 33, 25–30.

Boulanger, N., Brun, R., Ehret-Sabatier, L., Kunz, C., Bulet, P., 2002b. Immunopeptides in the defense reactions of *Glossina morsitans* to bacterial and *Trypanosoma brucei brucei* infections. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 32, 369-375.

Boulanger, N., Munks, R.J., Hamilton, J.V., Vovelle, F., Brun, R., Lehane, M.J., Bulet, P., 2002a. Epithelial innate immunity. A novel antimicrobial peptide with antiparasitic activity in the blood-sucking insect *Stomoxys calcitrans*. *J Biol Chem.*, 277, 49921-49926.

Brecher, G., Wigglesworth, V.B., 1944. The transmission of *Actinomyces rhodnii* Erikson in *Rhodnius prolixus* Stal (Hemiptera) and its influence on the growth of the host. *Parasitology* 35, 220-224.

Brener, Z., 1973. Biology of *Trypanosoma cruzi*. *Annu. Rev. Microbiol.* 27, 347-382.

Bruce, D., Harvey, A.E., Hamerton, J.B., Davey, L.B., 1912. Trypanosomes causing disease in man and domestic animals in Central Africa (the Croonian lectures). *Lancet* 423–433.

Brun, R., Blum, J., Chappuis, F., Burri, C. 2010. Human African trypanosomiasis. *Lancet* 375,148–159.

Butikofer, P., Vassella, E., Boschung, M., Renggli, C.K., Brun, R., Pearson, T.W., Roditi, I. 2002. Glycosylphosphatidylinositol-anchored surface molecules of *Trypanosoma congolense* insect forms are developmentally regulated in the tsetse fly. *Mol. Biochem. Parasitol.* 119, 7-16.

Calvo Mendez, M.L., Noguera Torres, B., Alexandre Aguilar, R., 1992. The oral route: an access port for *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Latinoam. Microbiol.* 34, 39–42.

Coelho, H.S.L., Atella, G.C., Moreira, M.F., Gondim, K.C., Masuda, H., 1997. Lipophorin density variation during oogenesis on *Rhodnius prolixus*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 35, 301–313.

Coppens, I., Coutoy, P.J., 1995. Exogenous and endogenous sources of sterols in the culture-adapted procyclic trypomastigotes of *Trypanosoma brucei*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 73, 179–188.

Coppens, I., Levade, T., Courtoy, P.J., 1995. Host plasma low density lipoprotein particles as an essential source of lipids for the bloodstream forms of *Trypanosoma brucei*. *J. Biol. Chem.* 270, 5736–5741.

Cuba, C.A., 1975. Estudo de uma cepa peruana de *Trypanosoma rangeli*. VI – Observações sobre sua evolução e morfogênese na hemocele e nas glândulas salivares de *Rhodnius ecuadoriensis*. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo* 17, 283-297.

D'Alessandro, A., 1976. Biology of *Trypanosoma (Herpetosoma) rangeli* Tejera, 1920, in: Lumsden, W.H.R. e Evans, D.A. (eds.), *Biology of Kinetoplastida*. vol. 1, Academic Press, London, pp. 328-403.

D'Alessandro, A., Saravia, N.G., 1999. *Trypanosoma rangeli*, in: Gilles, H.M. (Ed.), *Protozoal Diseases*, Arnold, London, pp. 398–412.

D'Alessandro-Bacigalupo, A., Saraiva, N.G., 1992 *Trypanosoma rangeli*, in: Kreir, J.P. e Baker, J. (eds.), *Parasitic Protozoa*. vol. 2, Academic Press, London, pp. 1-54.

Dale, C., Maudlin, I. 1999. *Sodalis* gen. nov. and *Sodalis glossinidius* sp. nov., a microaerophilic secondary endosymbiont of the tsetse fly *Glossina morsitans morsitans*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49, 267–275.

Dale, C., Welburn, S. C. 2001. The endosymbionts of tsetse flies: manipulating host-parasite interactions. *Int. J. Parasitol.* 31, 628–631.

De Stefani Marquez, D., Rodrigues-Ottaiano, C., Monica Oliveira, R., Pedrosa, A.L., Cabrine-Santos, M., Lages-Silva, E., Ramirez, L.E., 2006. Susceptibility of different triatomine species to *Trypanosoma rangeli* experimental infection. *Vector-Borne Zoonot.*, 6, 50–56.

Dixon, H., Ginger, C.D., Williamson, J., 1972. Trypanosome sterols and their metabolic origins. *Comp. Biochem. Physiol.*, 41B:1-18.

Eger-Mangrich, I., Oliveira, M.A., Grisard, E.C., De Souza, W., Steindel, M., 2001. Interaction of *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920 with different cells line in vitro. *Parasitol. Res.* 87, 505-509.

Eichler, S., Schaub, G.A., 1998. The effects of aposymbiosis and of an infection with *Blastocrithidia triatomae* (Trypanosomatidae) on the tracheal system of the reduviid bugs *Rhodnius prolixus* and *Triatoma infestans*. *J. Insect Physiol.* 44, 131-140.

Eichler, S., Schaub, G.A., 2002. Development of symbionts in triatomine bugs and the effects of infections with trypanosomatids. *Exp. Parasitol.* 100, 17-27.

Ellis, D.S., Evans, D.A., Stamford, S., 1980. The penetration of the salivary glands of *Rhodnius prolixus* by *Trypanosoma rangeli*. *Z. Parasitenkd.* 62, 63-74.

Engstler, M., Boshart, M. 2004. Cold shock and regulation of surface protein trafficking convey sensitization to inducers of stage differentiation in *Trypanosoma brucei*. *Genes Dev.* 18, 2798-2811.

Ennes-Vidal, V., Menna-Barreto, R.F.S., Santos, A.L.S., Branquinha, M.H., d'Avila-Levy, C.M., 2011. MDL28170, a Calpain inhibitor, affects *Trypanosoma cruzi*

metacyclogenesis, ultrastructure and attachment to *Rhodnius prolixus* midgut. PLoS ONE 6, e18371. doi:10.1371/journal.pone.0018371.

Evans, D.A., Ellis, D.S. 1983. Recent observations on the behavior of certain trypanosomes within their insect hosts. Adv. Parasitol. 22, 1–42.

Feder, D., Gomes, S.A.O., Garcia, E.S. e Azambuja, P., 1999. Metalloproteases in *Trypanosoma rangeli*-infected *Rhodnius prolixus*. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 94, 771-777.

Ferreira, L.L., Lorenzo, M.G., Elliot, S.L., Guarneri, A.A., 2010. A standardizable protocol for infection of *Rhodnius prolixus* with *Trypanosoma rangeli*, which mimics natural infections and reveals physiological effects of infection upon the insect. J. Invert. Pathol. 105, 91-97.

Ferreira, R.C., Ferreira, A.M., Guarneri, A.A. 2011. Triatomine-trypanosoma interaction: Do *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* colonize the *Rhodnius prolixus* anterior midgut? In: XXVII Annual Meeting of the Brazilian Society of Protozoology; XXXVIII Annual Meeting on Basic Research on Chagas Disease, Foz do Iguaçu. p. 211-211.

Folly, E. Dutra, P.M.L., Lopes, A.H.C.S., Oliveira, H.M., Atella, G.C. 1999. *Trypanosoma cruzi* incorporates phospholipids from *Rhodnius prolixus* midgut. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 94, suppl. II, 55.

Folly, E., Cunha e Silva, N., Lopes, A.C.S., Silva-Neto, M., Atella, G.C., 2003. *Trypanosoma rangeli* uptakes the main lipoprotein from the hemolymph of its invertebrate host. Biochem. Biophys. Res. Commun. 310, 555–561.

Friend, W.G., Smith, J.J.B., 1985. Factores biológicos y ecológicos en la enfermedad de Chagas, in: R.U. Carcavallo, J.E. Rabinovich, R.J. (eds.), Epidemiología. Vetores. Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud OPS, OMS, Argentina, pp. 55-72.

Garcia, E.S., Azambuja, P., 1991. Development and interaction of *Trypanosoma cruzi* within the insect vector. Parasitol. Today 7, 240-244.

Garcia, E.S., Machado, E.M.M., Azambuja, P., 2004. Inhibition of hemocyte microaggregation reactions in *Rhodnius prolixus* larvae orally infected with *Trypanosoma rangeli*. Exp. Parasitol. 107, 31-38.

Garcia, E.S., Mello, C.B., Azambuja, P., Ribeiro, J.M., 1994. *Rhodnius prolixus*: Salivary antihemostatic components decrease with *Trypanosoma rangeli* infection. Exp. Parasitol. 78, 287-293.

Gazos-Lopes, F., Mesquita, R. D., Silva-Cardoso, L., Senna, R., Silveira, A.B., Jablonka, W., Cudishevitch, C. O., Carneiro, A.B., Machado, E. A., Lima, L. G., Monteiro, R. Q., Nussenzveig, R. H., Folly, E., Romeiro, A., Previato, L., Oswaldo-Previato, J., Valenzuela, J. , Ribeiro, J. M. C., Atella, G. C., Silva-Neto, M. A. C. Glycoinositolphospholipids from trypanosomatids subvert nitric oxide production in bug salivary glands. Accepted to publication on Plos One, 2012.

Geiger, A., Ravel, S., Frutos, R., Cuny, G. 2005. *Sodalis glossinidius* (Enterobacteriaceae) and vectorial competence of *Glossina palpalis gambiense* and *Glossina morsitans morsitans* for *Trypanosoma congolense* savannah type. Curr. Microbiol. 51, 35–40.

Gibson, W., Bailey, M., 2003. The development of *Trypanosoma brucei* within the tsetse fly midgut observed using green fluorescent trypanosomes. *Kinetoplastid Biol Dis* 2, 1-13.

Golgher, D.B., Colli, W., Souto-Padron, T., Zingales, B., 1993. Galactofuranose-containing glycoconjugates of epimastigote and trypomastigote forms of *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasit.* 60, 249–264.

Golodne, D.M., Monteiro, R.Q., Graca-Souza, A.V., Silva-Neto, M.A., Atella, G.C., 2003. Lysophosphatidylcholine acts as an anti-hemostatic molecule in the saliva of the blood-sucking bug *Rhodnius prolixus*. *J. Biol. Chem.* 278, 27766-27771.

Gomes, S.A.O., Feder, D., Garcia, E.S., Azambuja, P., 2003. Suppression of the prophenoloxidase system in *Rhodnius prolixus* orally infected with *Trypanosoma rangeli*. *J. Insect Physiol.* 49, 829-837.

Gomes, S.A.O., Feder, D., Thomas, N.E.S., Garcia, E.S., Azambuja, P., 1999. *Rhodnius prolixus* infected with *Trypanosoma rangeli*: *in vivo* and *in vitro* experiments. *J. Inverteb. Pathol.* 73, 289-293.

Gomes, S.A.O., Graciano, G.L., Nogueira, N.F.S., Souza, W., Garcia, E.S., Azambuja, P., 2002. Effects of gamma irradiation on the development of *Trypanosoma rangeli* in the vector *Rhodnius prolixus*. *J. Invertebr. Pathol.* 79, 86-92.

Gonzalez, M.S., Hamedi, A., Albuquerque-Cunha, J.M., Nogueira, N.F.S., De Souza, W., Ratcliffe, N.A., Azambuja, P., Garcia, E.S., Mello, C.B., 2006. Antiserum against perimicrovillar membranes and midgut tissue reduces the development of *Trypanosoma cruzi* in the insect vector, *Rhodnius prolixus*. *Exp. Parasitol.* 114, 297–304.

Gonzalez, M.S., Nogueira, N.F.S., Mello, C.B., de Souza, W., Schaub, G.A., Azambuja, P., Garcia, E.S., 1999. Influence of the brain and azadirachtin on *Trypanosoma cruzi* development in the vector, *Rhodnius prolixus*. *Exp. Parasitol.* 92, 100–108.

Grace, D., Randolph, T., Dially, O., Clausen, P. H. 2008. Training farmers in rational drug-use improves their management of cattle trypanosomosis: a cluster-randomised trial in south Mali. *Prev. Vet. Med.* 83, 83–97.

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

Grewal, M.S., 1957. Pathogenicity of *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920 in the invertebrate host. *Exp. Parasitol.* 6, 123-130.

Grillo, L.A.M., Majerowicz, D., Gondim, K.C., 2007. Lipid metabolism in *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae): role of a midgut triacylglycerol-lipase. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 37, 579–588.

Grisard, E.C., Campbell, D.A., Romanha, A.J., 1999. Mini-exon gene sequence polymorphism among *Trypanosoma rangeli* Strains isolated from distinct geographical regions. *Parasitology*, 118, 375–382.

Groot, H., 1954. Estudios sobre los trypanosomas humanos (*T. rangeli* y *T. ariarii*). *Ann. Soc. biol. Bogotá* 6, 109-126.

Guarneri, A.A., Lazzari, C., Diotaiuti, L., Lorenzo, M., 2002. The effect of relative humidity on the behaviour and development of *Triatoma brasiliensis*. *Physiol. Entomol.* 27, 142-147.

Guarneri, A.A., Lazzari, C., Xavier, A.A.P., Diotaiuti, L., Lorenzo, M., 2003. The effect of temperature on the behaviour and development of *Triatoma brasiliensis*. *Physiol. Entomol.* 28, 185-191.

Guhl, F., Vallejo, G.A., 2003. *Trypanosoma* (Herpetosoma) *rangeli* Tejera, 1920: an updated review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 98, 435-442.

Ha, E.M., Oh, C.T., Bae, Y.S., Lee, W.J., 2005. A direct role for dual oxidase in *Drosophila* gut immunity. *Science* 310, 847-850.

Hao, Z., Kasumba, I., Lehane, M.J., Gibson, W.C., Kwon, J., Aksoy, S., 2001. Tsetse immune responses and trypanosome transmission: implications for the development of tsetse-based strategies to reduce trypanosomiasis. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 98, 12648-12653.

Hao, Z.G., Kasumba, I., Aksoy, S., 2003. Proventriculus (cardia) plays a crucial role in immunity in tsetse fly (Diptera: Glossinidae). *Insect Biochem. Mol. Biol.* 33, 1155-1164.

Harington, J.S., 1960. Studies in *Rhodnius prolixus*: growth and development of normal and sterile bugs, and the symbiotic relationship. *Parasitology* 50, 279-286.

Harley, J.M., Wilson, A.J., 1968. Comparison between *Glossina morsitans*, *G. pallidipes* and *G. fuscipes* as vectors of trypanosomes of the *Trypanosoma congolense* group: the proportions infected experimentally and the numbers of infective organisms extruded during feeding. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 62, 178-187.

Hecker, H., Schwarzenbach, M., Rudin, W., 1990. Development and interactions of *Trypanosoma rangeli* in and with the reduviid bug *Rhodnius prolixus*. *Parasitol. Res.* 76, 311-318.

Herrera-Ortiz, A., Lanz-Mendoza, H., Martinez-Barnette, J., Hernandez-Martinez, S., Villarreal-Trevino, C., Aguilar-Marcelino, L., Rodriguez, M. H. 2004. *Plasmodium berghei* ookinetes induce nitric oxide production in *Anopheles pseudopunctipennis* midguts cultured in vitro. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 34, 893-901.

Hu, C., Aksoy, S. 2006. Innate immune responses regulate trypanosome parasite infection of the tsetse fly *Glossina morsitans morsitans*. *Mol. Microbiol.* 60, 1194-1204.

Hu, C.Y., Aksoy, S., 2006. Innate immune responses regulate trypanosome parasite infection of the tsetse fly *Glossina morsitans morsitans*. *Mol. Microbiol.* 60, 1194-1204.

Hu, Y.J., Aksoy, S., 2005. An antimicrobial peptide with trypanocidal activity characterized from *Glossina morsitans morsitans*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 35, 105-115.

Juarez, E., 1970. Comportamento do *Triatoma infestans* sob várias condições de laboratório. *Rev. Saúde Publ.* 4, 147-166.

Kollien, A.H., Schaub, G.A., 1998. The development of *Trypanosoma cruzi* (Trypanosomatidae) in the reduviid bug *Triatoma infestans* (Insecta): Influence of starvation. J. Euk. Microbiol. 45, 59-63.

Kollien, A.H., Schaub, G.A., 2000. The development of *Trypanosoma cruzi* in triatominae. Parasitol. Today 16, 381-387.

Kollien, A.H., Schmidt, J., Schaub, G.A., 1998. Modes of association of *Trypanosoma cruzi* with the intestinal tract of the vector *Triatoma infestans*. Acta Trop. 70, 127-141.

Krafsur, E. S., 2009. Tsetse flies: genetics, evolution, and role as vectors. Infect. Genet. Evol. 9, 124-141.

Lake, P., Friend, W.G., 1967. A monoxenic relationship, *Nocardia rhodnii* Erikson in the gut of *Rhodnius prolixus* Stal (Hemiptera: Reduviidae). P. Entomol. Soc. Ontario 98, 53-57.

Lara, F.A., C. Sant'Anna, C., Lemos, D., Laranja, G.A.T., Coelho, M.G.P., Reis Salles, I., Michel, A., Oliveira, P.L., Cunha-e-Silva, N., Salmon, D., Paes, M.C., 2007. Heme requirement and intracellular trafficking in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. Biochem. Bioph. Res. Co. 355, 16-22.

Leak, S.G.A., 1999. Tsetse Biology and Ecology: Their Role in the Epidemiology and Control of Trypanosomosis. Wallingford: CABI International.

Lehane, M. J., Gibson, W., Lehane, S. M. 2008. Differential expression of fat body genes in *Glossina morsitans morsitans* following infection with *Trypanosoma brucei brucei*. Int. J. Parasitol. 38, 93-101.

Lehane, M. J., Msangi, A. R. 1991. Lectin and peritrophic membrane development in the gut of *Glossina m. morsitans* and a discussion of their role in protecting the fly against trypanosome infection. Med. Vet. Entomol. 5, 495-501.

Lehane, M.J., 1997. Peritrophic matrix structure and function. Annu. Rev. Entomol. 42, 525-550.

Lehane, M.J., Msangi, A.R., 1991. Lectin and peritrophic membrane development in the gut of *Glossina m. morsitans* and a discussion of their role in protecting the fly against trypanosome infection. Med. Vet. Entomol. 5, 495-501.

Lent, H., Wygodzinsky, M., 1979. Revision of the Triatominae (Hemiptera, Reduviidae) and their significance as vector of Chagas disease. Bull. Am. Mus. Nat. Hist. 163, 123-520.

Lima, M.M., Pereira, J.B., Santos, J.A.A., Pinto, Z.T., Braga, M.V., 1992. Development and reproduction of *Panstrongylus megistus* (Hemiptera: Reduviidae) infected with *Trypanosoma cruzi*, under laboratory conditions. Ann. Entomol. Soc. Am. 85, 458-461.

Liniger, M., Acosta-Serrano, A., Van Den Abbeele, J., Renggli, C.K., Brun, R., Englund, P.T., Roditi, I., 2003. Cleavage of trypanosome surface glycoproteins by alkaline trypsin-like enzyme(s) in the midgut of *Glossina morsitans*. Inter. J. Parasitol. 33, 1319-1328.

Liniger, M., Urwyler, S., Studer, E., Oberle, M., Renggli, C.K., Roditi, I., 2004. Role of the N-terminal domains of EP and GPEET procyclins in membrane targeting and the establishment of midgut infections by *Trypanosoma brucei*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 137, 247-251.

Lloyd, L. Johnson W.B., 1924. The trypanosome infections of tsetse flies in Northern Nigeria and a new method of estimation. *Bull. Ent. Res.*, 14, 265–288.

Lombardo, M.E., Araujo, L.S., Batlle, A., 2003. 5-Aminolevulinic acid synthesis in epimastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 35, 1263–1271.

Luckhart, S., Vodovotz, Y., Cui, L. W., Rosenberg, R. 1998. The mosquito *Anopheles stephensi* limits malaria parasite development with inducible synthesis of nitric oxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 5700–5705.

Machado, E.A., Atella, G.C., Gondim, K.C., de Souza, W., Masuda, H., 1996. Characterization and immunocytochemical localization of lipophorin binding sites in the oocytes of *Rhodnius prolixus*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 31, 185–196.

Machado, P.E., Eger-Mangrich, I., Rosa, R., Koerich, L.B., Grisard, E.C., Steindel, M., 2001. Differential susceptibility of triatomines of the genus *Rhodnius* to *Trypanosoma rangeli* strains from different geographical origins. *Internat. J. Parasitol.* 31, 632-634.

Macleod, E.T., Darby, A.C., Maudlin, I., Welburn, S.C., 2007. Factors affecting trypanosome maturation in tsetse flies. *PLoS ONE* 2, e239. (b)

Macleod, E.T., Maudlin, I., Darby, A.C., Welburn, S.C., 2007. Antioxidants promote establishment of trypanosome infections in tsetse. *Parasitology* 134, 827-831. (a)

Maia da Silva, F., Junqueira, A.C.V., Campaner, M., Rodrigues, A. C., Crisante, G., Ramirez, L.E., Caballero, Z.C.E., Monteiro, F.A., Coura, J.R., Añez, N., Teixeira, M.G., 2007. Comparative phylogeography of *Trypanosoma rangeli* and *Rhodnius* (Hemiptera: Reduviidae) supports a long coexistence of parasite lineages and their sympatric vectors. *Mol. Ecol.* 16, 3361–3373.

Malvy, D., Chappuis, F., 2011. Sleeping sickness. *Clin. Microbiol. Infect.* 17, 986–995.

Marinkelle, C.J., 1968. Pathogenicity of *Trypanosoma rangeli* for *Rhodnius prolixus* Stal in nature (Hemiptera: Reduviidae) (Kinetoplastida: Trypanosomatidae). *J. Med. Entomol.* 5, 497-499.

Maudlin, I., Welburn, S.C., Mehlitz, D., 1990. The relationship between rickettsia-like-organisms and trypanosome infections in natural populations of tsetse in Liberia. *Trop. Med. Parasitol.* 41, 265-267.

McNamara, J.J., Mohammed, G., Gibson, W.C., 1994. *Trypanosoma (Nannomonas) godfreyi* sp. nov. from tsetse flies in The Gambia: biological and biochemical characterization. *Parasitology* 109, 497-509. Erratum in: *Parasitology* 110, 113. 1995.

Meirelles, R.M.S., Henriques-Pons, A., Soares, M.J., Steindel, M., 2005. Penetration of the salivary glands of *Rhodnius domesticus* Neiva & Pinto, 1923 (Hemiptera: Reduviidae) by *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920 (Protozoa: Kinetoplastida). *Parasitol. Res.* 97, 259-269.

Mello, C.B., Garcia, E.S., Ratcliffe, N.A., Azambuja, P., 1995. *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli*: Interplay with hemolymph components of *Rhodnius prolixus*. J. Inverteb. Pathol. 65, 261-268.

Mello, C.B., Nigam, Garcia, E.S., Azambuja, P., Newton, R.P., Ratcliffe, N.A., 1999. Studies on a Haemolymph Lectin Isolated from *Rhodnius prolixus* and Its Interaction with *Trypanosoma rangeli*. Exp. Parasitol. 91, 289–296.

Mesquita, R.D., Carneiro, A.B., Bafica, A., Gazos-Lopes, F., Takiya, C.M., Souto-Padron, T., Vieira, D.P., Ferreira-Pereira, A., Almeida, I.C., Figueiredo, R.T., Porto, B.N., Bozza, M.T., Graça-Souza, A.V., Lopes, A.H.C.S., Atella, G.C., Silva-Neto, M.A.C., 2008. *Trypanosoma cruzi* infection is enhanced by vector saliva through immunosuppressant mechanisms mediated by lysophosphatidylcholine. Infect. Immun. 76, 5543–5552.

Miller, N. and Lehane, M.J., 1993. Peritrophic membranes, cell surface molecules and arbovirus tropisms within arthropod vectors. Parasitol. Today 9, 45–50.

Moloo, S. K., Kutuza, S. B., 1988. Comparative study on the susceptibility of different *Glossina* species to *Trypanosoma brucei brucei* infection. Trop. Med. Parasitol. 39, 211-213.

Moloo, S. K., Shaw, M. K. 1989. Rickettsial infection of midgut cells are not associated with susceptibility of *Glossina morsitans centralis* to *Trypanosoma congolense* infection. Acta Trop. 46, 223–227.

Morita, Y.S., Englund, P.T., 2001. Fatty acid remodeling of glycosyl phosphatidylinositol anchors in *Trypanosoma brucei*: incorporation of fatty acids other than myristate. Mol. Biochem. Parasitol. 115, 157–164.

Munks, R.J.L., Sant'Anna, M.R.V., Grail, W., Gibson, W., Igglesden, T., Yoshiyama, M., Lehane, S.M., Lehane, M.J., 2005. Antioxidant gene expression in the blood-feeding fly *Glossina morsitans morsitans*. Insect Mol. Biol. 14, 483-491.

Murphy, N.B., Welburn, S.C., 1997. Programmed cell death in procyclic *Trypanosoma brucei rhodesiense* is associated with differential expression of mRNAs. Cell Death Differ. 4, 365-370.

Ndegwa, P.N., Irungu, L.W., Moloo, S.K., 1992. Effect of puparia incubation temperature: increased infection rates of *Trypanosoma congolense* in *Glossina morsitans centralis*, *G. fuscipes fuscipes* and *G. brevipalpis*. Med. Vet. Entomol. 6, 127-30.

Nogge, G. 1976. Sterility in tsetse flies (*Glossina morsitans westwood*) caused by loss of symbionts. Experientia 32, 995–996.

Nogge, G. 1981. Significance of symbionts for the maintenance of an optimal nutritional state for successful reproduction in hematophagous arthropods. Parasitology 82, 101–104.

Nogueira, N.F.S., Gonzalez, M.S., Gomes, J.E., Souza, W., Garcia, E.S., Azambuja, P., Nohara, L.L., Almeida, I.C., Zingales, B., Colli, W., 2007. *Trypanosoma cruzi*: Involvement of glycoinositolphospholipids in the attachment to the luminal midgut surface of *Rhodnius prolixus*. Exp. Parasitol. 116, 120-128.

Oli, M.W., Cotlin, L.F., Shiflett, A.M., Hajduk, S.L., 2006. Serum resistance-associated protein blocks lysosomal targeting of trypanosome lytic factor in *Trypanosoma brucei*. *Eukaryot Cell*. 5, 132-9.

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

Oliveira, M.A., Souza, W., 2003. Further morphological studies on the behavior of *Trypanosoma rangeli* in the hemocytes of *Rhodnius prolixus*. *Parasitol. Internat.* 52, 299-307.

Osorio, Y., Travi, B.L., Palma, G., Saravia, N.G., 1995. Infectivity of *Trypanosoma rangeli* in a promonocytic mammalian cell line. *J. Parasitol.* 81, 687-693.

Pais, R., Lohs, C., Wu, Y. N., Wang, J. W., Aksoy, S. 2008. The obligate mutualist *Wigglesworthia glossinidia* influences reproduction, digestion, and immunity processes of its host, the tsetse fly. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 5965–5974.

Paul, K.S., Jiang, D., Morita, Y.S., Englund, P.T., 2001. Fatty acid synthesis in African trypanosomes: a solution to the myristate mystery. *Trends Parasitol.* 17, 381–387.

Peacock, L., Ferris, V., Bailey, M., Gibson, W., 2007. Dynamics of infection and competition between two strains of *Trypanosoma brucei brucei* in the tsetse fly observed using fluorescent markers. *Kinetoplastid Biol. Dis.* 6, 4.

Pereira, M.E.A., Andrade, A.F.B., Ribeiro, J.M.C., 1981. Lectins of distinct specificity in *Rhodnius prolixus* interact selectively with *Trypanosoma cruzi*. *Science* 211, 597-600.

Pereira-Chioccola, V.L., Acosta-Serrano, A., Correia de Almeida, I., Ferguson, M.A., Souto-Padron, T., Rodrigues, M.M., Travassos, L.R., Schenkman, S., 2000. Mucin-like molecules form a negatively charged coat that protects *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes from killing by human anti-alpha-galactosyl antibodies. *J. Cell Sci.* 113 (Pt 7), 1299–1307.

Pifano, C.F., Mayer, M., Medina, R., Benaim Pinto, E., 1948. Primera comprobacion de *Trypanosoma rangeli* en el organismo humano por cultivo de sangre periferica. *Arc. Ven. Patol. Trop. Parasitol. Méd.* 1, 1-31.

Pontes, E.G., Grillo, L.A.M., Gondim, K.C., 2002. Characterization of lipophorin binding to the fat body of *Rhodnius prolixus*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 32, 1409–1417.

Poulin, R., 1998. *Evolutionary Ecology of Parasites: From Individuals to Communities*. Chapman & Hall, U.K.

Rangarajan, D., Harvey, T.I., Barry, J.D., 2000. Characterisation of the loci encoding the glutamic acid and alanine rich protein of *Trypanosoma congolense*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 105, 281-290.

Ratcliffe, N.A., Nigam, Y., Mello, C.B., Garcia, E., Azambuja, P., 1996. *Trypanosoma cruzi* and erythrocyte agglutinins: A comparative study of occurrence and properties in the gut and hemolymph of *Rhodnius prolixus*. *Exp. Parasitol.* 83, 83-93.

- Rentifo, S., Groot, H., Uribe, C., 1950. Contribución al estudio de tripanosomas humanos y de animales en Colombia. *Rev. Hyg.* 24, 4-12.
- Richner, D., Brun, R., Jenni, L., 1988. Production of metacyclic forms by cyclical transmission of west African *Trypanosoma (T.) brucei* isolates from man and animals. *Acta Trop.* 45, 309-319.
- Robertson, T. B., Burnett, T. C., 1913. The influence of lecithin and cholesterin upon the growth of tumors. *J. Exp. Med.* 17, 344-52.
- Roca, M., Lazzari, C.R., 1994. Effects of the relative humidity on the haematophagous bug *Triatoma infestans*. Higr preference and eclosion success. *J. Insect Physiol.* 40, 901-907.
- Roditi, I., Clayton, C., 1999. An unambiguous nomenclature for the major surface glycoproteins of the procyclic form of *Trypanosoma brucei*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 103, 99-100.
- Roque, A.L.R., Xavier, S.C.C., Rocha, M.G., Duarte, A.C.M., D'Andrea, P.S., Jansen, A.M., 2008. *Trypanosoma cruzi* transmission cycle among wild and domestic mammals in three areas of orally transmitted Chagas Disease outbreaks. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 79, 742-749.
- Rudin, W., Schwarzenbach, M., Hecker, H., 1989. Binding of lectins to culture and vectors forms of *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920 (Protozoa, Kinetoplastida) and to structures of the vector gut. *J. Protozool.* 36, 532-538.
- Salzman, T.A., Stella, A.M., Xifra, W., Batlle, A.M., Docampo, R., Stoppani, A.O., 1982. Porphyrin biosynthesis in parasitic hemoflagellates: functional and defective enzymes in *Trypanosoma cruzi*. *Comp. Biochem. Physiol. B* 72, 663-667.
- Sbicego, S., Vassella, E., Kurath, U., Blum, B., Roditi, I., 1999. The use of transgenic *Trypanosoma brucei* to identify compounds inducing the differentiation of bloodstream forms to procyclic forms. *Mol. Biochem. Parasitol.* 104, 311-322.
- Schaub, G.A., 1988a. Development of isolated and group-reared first instars of *Triatoma infestans* infected with *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol. Res.* 74, 593-594.
- Schaub, G.A., 1988b. Developmental time and mortality of larvae of *Triatoma infestans* infected with *Trypanosoma cruzi*. *T. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 82, 94-97.
- Schaub, G.A., 1989. Does *Trypanosoma cruzi* stress its vectors? *Parasitol. Today* 5, 185-188.
- Schaub, G.A., 1992. The effects of trypanosomatids on insects. *Adv. Parasitol.* 31, 255-319.
- Schaub, G.A., Böker, C.A., 1986. Colonization of the rectum of *Triatoma infestans* by *Trypanosoma cruzi*: influence of starvation studied by scanning electron microscopy. *Acta Trop.* 43, 349-354.
- Schaub, G.A., Meiser, A., 1990. Presence of undigested haemoglobin in the small intestine and haemolymph of *Triatoma infestans* (Reduviidae) infected with *Blastocrithidia triatomae* (Trypanosomatidae). *Parasitol. Res.* 76, 724-725.

- Schilman, P.E., Lazzari, C.R., 2004. Temperature preference in *Rhodnius prolixus*, effects and possible consequences. *Acta Trop.* 90, 115-122.
- Schofield, C.J., 1994. *Triatominae: Biología y control*, Eurocommunica Publications, West Sussex.
- Sharma, R., Peacock, L., Gluenz, E., Gull, K., Gibson, W., Carrington, M., 2007. Asymmetric cell division as a route to reduction in cell length and change in cell morphology in trypanosomes. *Protist.* 159, 137-151.
- Snow, W.F., Declercq, J. van Nieuwenhove, S. 1991. Watering sites in *Glossina fuscipes* habitat as the major foci for the transmission of Gambiense sleeping sickness in an endemic area of southern Sudan. *Ann. Soc. Belge Méd. Trop.* 71, 27-38.
- Soares, A.C., Carvalho-Tavares, J., Gontijo, N.F., Santos, V.C., Teixeira, M.M., Pereira, M.H., 2006. Salivation pattern of *Rhodnius prolixus* (Reduviidae; Triatominae) in mouse skin. *J. Insect Physiol.* 52, 468-472.
- Stafford, J. L., Belosevic, M. 2003. Transferrin and the innate immune response of fish: identification of a novel mechanism of macrophage activation. *Dev. Comp. Immunol.* 27, 539-554.
- Steindel, M., Kramer Pacheco, L., Scholl, D., Soares, M., de Moraes, M.H., Eger, I., Kosmann, C., Sincero, T.C., Stoco, P.H., Murta, S.M., de Carvalho-Pinto, C.J., Grisard, E.C., 2008. Characterization of *Trypanosoma cruzi* isolated from humans, vectors, and animal reservoirs following an outbreak of acute human Chagas disease in Santa Catarina State, Brazil. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 60, 25-32.
- Steverding, D. 2008. The history of African trypanosomiasis. *Parasit. Vectors* 1, 3.
- Szoor, B., Wilson, J., McElhinney, H., Taberner, L., Matthews, K.R., 2006. Protein tyrosine phosphatase TbPTP1: a molecular switch controlling life cycle differentiation in trypanosomes. *J. Cell Biol.* 175, 293-303.
- Takle, G.B., 1988. Studies on the cellular immune responses of insects toward the insect pathogen *Trypanosoma rangeli*. *J. Inverteb. Pathol.* 51, 64-72.
- TDR diseases (2005) Report of the Scientific Working Group on Chagas disease Buenos Aires, Argentina 17-20 April. http://www.who.int/tdr/diseases/chagas/swg_chagas.htm. Ref Type: Internet Communication
- Terra, W.R., 1990. Evolution of digestive systems of insects. *Ann. Rev. Entomol.* 35, 181-200.
- Terra, W.R., Ferreira, C. 2005. Biochemistry of digestion. In: Gilbert L.I., Iatrou, K., Gill, S.S. (Eds), *Comprehensive Molecular Insect Science*, Oxford: Elsevier 4: 171-224.
- Tobie, E.J., 1961. Experimental transmission and biological comparison of strains of *Trypanosoma rangeli*. *Exp. Parasitol.* 11, 1-9.

Tobie, E.J., 1964 Increased infectivity of a cyclically maintained strain of *Trypanosoma rangeli* to *Rhodnius prolixus* and mode of transmission by invertebrate host. *J. Parasitol.* 50, 593-598.

Tobie, E.J., 1965. Biological factors influencing transmission of *Trypanosoma rangeli* by *Rhodnius prolixus*. *J. Parasitol.* 51, 837-841.

Tobie, E.J., 1968. Fate of some culture flagellates in the haemocoel of *Rhodnius prolixus*. *J. Parasitol.* 54, 1040-1046.

Tobie, E.J., 1970. Observations on the development of *Trypanosoma rangeli* in the hemocoel of *Rhodnius prolixus*. *J. Invertebrate Pathol.* 15, 118-125.

Urwyler, S., Studer, E., Renggli, C.K., Roditi, I., 2007. A family of stagespecific alanine-rich proteins on the surface of epimastigote forms of *Trypanosoma brucei*. *Mol. Microbiol.* 63, 218-228.

Utz, S., Roditi, I., Renggli, C.K., Almeida, I.C., Acosta-Serrano, A., Bütikofer, P., 2006. *Trypanosoma congolense* procyclins: unmasking cryptic major surface glycoproteins in procyclic forms. *Eukaryotic Cell* 5, 1430-1440.

Vallejo, G.A., Guhl, F., Carranza, J.C. Lozano L.E., Sánchez, J.L., Jaramillo, J.C., Gualtero, D., Castañeda, N., Silva, J.C., Steindel, M., 2003. Parity between kinetoplast DNA and mini-exon gene sequences supports either clonal evolution or speciation in *Trypanosoma rangeli* strains isolated from *Rhodnius colombiensis*, *R. pallescens* and *R. prolixus* in Colombia. *Infect. Genet. Evol.* 3, 39–45.

Van Den Abbeele, J., Caljon, G., De Ridder, K., De Baetselier, P., Coosemans, M. 2010. *Trypanosoma brucei* modifies the tsetse salivary composition, altering the fly feeding behavior that favors parasite transmission. *PLoS Pathog.* 6, e1000926.

Van den Abbeele, J., Claes, Y., van Bockstaele, D., Le Ray, D., Coosemans, M., 1999. *Trypanosoma brucei* spp. development in the tsetse fly: characterization of the post-mesocyclic stages in the foregut and proboscis. *Parasitology* 118, 469-478.

Vassella, E., Oberle, M., Urwyler, S., Renggli, C. K., Studer, E., Hemphill, A., Fragoso, C., Butikofer, P., Brun, R., Roditi, I. 2009. Major surface glycoproteins of insect forms of *Trypanosoma brucei* are not essential for cyclical transmission by tsetse. *PLoS ONE* 4, e4493.

Vassella, E., van Den Abbeele, J.V., Bütikofer, P., Renggli, C.K., Furger, A., Brun, R., Roditi, I., 2000. A major surface glycoprotein of *Trypanosoma brucei* is expressed transiently during development and can be regulated post-transcriptionally by glycerol or hypoxia. *Genes Dev.* 14, 615-626.

Vial, H.J., Eldin, P., Tielens, A.G.M., van Hellemond, J.J., 2003. Phospholipids in parasitic protozoa. *Mol. Biochem. Parasitol.* 126, 143-54.

Watkins, R., 1969. Host-parasite Interaction between *Trypanosoma* species and *Rhodnius prolixus* Stal (Hemiptera, Reduviidae). PhD thesis, University of California, Berkeley.

Watkins, R., 1971. *Trypanosoma rangeli*: Effect on excretion in *Rhodnius prolixus*. *J. Inverteb. Pathol.* 17, 67-71.

Weiss, B.L., Wang, J., Aksoy, S. 2011. Tsetse immune system maturation requires the presence of obligate symbionts in larvae. *PLoS Biol.* 9, e1000619.

Welburn, S. C., Dale, C., Ellis, D., Beecroft, R., Pearson, T. W. 1996. Apoptosis in procyclic *Trypanosoma brucei rhodesiense* *in vitro*. *Cell Death Diff.* 3, 229–236.

Welburn, S. C., Maudlin, I. and Molyneux, D. H., 1994. Midgut lectin activity and sugar specificity in teneral and fed tsetse. *Med. Vet. Entomol.* 8, 81–87.

Welburn, S. C., Maudlin, I., Ellis, D.S. 1989. Rate of trypanosome killing by lectins in midguts of different species and strains of *Glossina*. *Med. Vet. Entomol.* 3, 77-82.

Welburn, S.C. and Maudlin, I., 1999. Tsetse–trypanosome interactions: rites of passage. *Parasitol. Today* 15, 399–403.

Welburn, S.C., Maudlin, I., 1997. Control of *Trypanosoma brucei brucei* infections in tsetse, *Glossina morsitans*. *Med. Vet. Entomol.* 11, 286-289.

Whitten, M.M.A., Mello, C.B., Gomes, S.A.O, Nigam, Y., Azambuja, P., Garcia, E.S., Ratcliffe, N.A., 2001. Role of superoxide and reactive nitrogen intermediates in *Rhodnius prolixus* (Reduviidae)/ *Trypanosoma rangeli* interactions. *Exp. Parasitol.* 98, 44-57.

WHO. 2006. Human African trypanosomiasis (sleeping sickness): epidemiological update. *Wkly Epidemiol Rec* 8, 71–80.

Wigglesworth, V. B. 1929. Digestion in the tsetse fly: a study of structure and function. *Parasitology* 21, 288–321.

Xavier, A.A.P., Lorenzo, M.G., Lazzari, C.R., Diotaiuti, L., Guarneri, A.A., 2005. Relative humidity and water loss in *Triatoma brasiliensis*. *Physiol. Entomol.* 30, 1–5.

Zeledón, R., 1987. Life cycle of *Trypanosoma cruzi* in the insect vector, in: Brenner, R.R., Stoka, A.M. (eds.), *Chagas Disease Vectors (Anatomical and Physiological Aspects)*, vol. 2, Miami, CRC Press, pp. 59-75.

Zeledón, R., Guardia, V.M., Zúñiga, A., Swartzwelde, J.C., 1970. Biology and ethology of *Triatoma dimidiata* (Latreille, 1811). II. Life span of adults and fecundity and fertility of females. *J. Med. Entomol.* 7, 462-469.

Zingales, B., Martin, N.F., de Lederkremer, R.M., Colli, W., 1982. Endogenous and surface labeling of glycoconjugates from the three differentiation stages of *Trypanosoma cruzi*. *FEBS Letters* 142, 238–242.