



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
Centro de Ciências Biológicas
Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências

Abadio de Oliveira da Costa Júnior

Influência do bacterioma intestinal de *Triatoma infestans* no desenvolvimento de *Trypanosoma cruzi* no vetor e na infectividade do parasito ao modelo murino

Florianópolis
2019

Abadio de Oliveira da Costa Júnior

Influência do bacterioma intestinal de *Triatoma infestans* no desenvolvimento de *Trypanosoma cruzi* no vetor e na infectividade do parasito ao modelo murino

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências da Universidade Federal de Santa Catarina para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia e Biociências.

Orientador: Prof. Dr. Edmundo Carlos Grisard
Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Patrícia Hermes Stoco

Florianópolis
2019

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Costa-Junior, Abadio de Oliveira da
Influência do bacterioma intestinal de *Triatoma*
infestans no desenvolvimento de *Trypanosoma cruzi* no vetor
e na infectividade do parasito ao modelo murino / Abadio
de Oliveira da Costa-Junior ; orientador, Edmundo Carlos
Grisard, coorientador, Patrícia Hermes Stoco, 2019.
94 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós
Graduação em Biotecnologia e Biociências, Florianópolis,
2019.

Inclui referências.

1. Biotecnologia e Biociências. 2. Microbiota
intestinal. 3. *Trypanosoma cruzi*. 4. *Triatoma infestans*.
5. Bacterioma intestinal. I. Grisard, Edmundo Carlos. II.
Stoco, Patrícia Hermes. III. Universidade Federal de Santa
Catarina. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e
Biociências. IV. Título.

Abadio de Oliveira da Costa Júnior
**Influência do bacterioma intestinal de *Triatoma infestans* no desenvolvimento de
Trypanosoma cruzi no vetor e na infectividade do parasito ao modelo murino**

O presente trabalho em nível de doutorado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Helisson Faoro, Dr.
Fundação Oswaldo Cruz

Prof. Rubens Tadeu Delgado Duarte, Dr.
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.(a) Thais Criste Marques Sincero, Dr(a).
Universidade Federal de Santa Catarina

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de doutor em Biotecnologia e Biociências.

Prof. Dr.(a) Glauber Wagner
Coordenador do Programa

Prof. Dr. Edmundo Carlos Grisard
Orientador

Florianópolis, 07 de junho de 2019.

Este trabalho é dedicado ao Dr. Edmundo Carlos Grisard e à Dr^a. Patrícia Hermes Stoco por me tornar um ser humano melhor.

AGRADECIMENTOS

O homem nada seria não fossem àqueles que o cercam, que de maneira direta ou indireta contribuem para a formação do seu caráter. Há alguns anos me foi ensinado que gratidão pode ser o mais singelo reconhecimento de pessoas que realmente são importantes, e tem um efeito grandioso no emissor e receptor de tão pura expressão de carinho. E como seria possível que o menino que teve seus primeiros momentos escolares na zona rural de uma cidade no interior de Goiás pudesse chegar a obter um dos maiores títulos que se pode alcançar? O suporte, empenho e incentivo de muitas pessoas permitiu.

Aos orientadores, Dr. Edmundo Carlos Grisard e Patricia Hermes Stoco, por me acolher, orientar e confiar a mim a realização deste trabalho. Por me ensinar mais do que técnicas e conceitos científicos, me ensinar que resiliência é uma das maiores qualidades de um profissional de sucesso, por me ensinar que quando se é um time não existe insucesso. Por contribuírem para o meu crescimento profissional e científico, mas sobretudo por me tornarem uma ser humano melhor. Minhas experiências anteriores me fizeram desacreditar em bons professores/orientadores, mas vocês incitaram uma faísca que quase se apagava, a da certeza de que sim, é possível ser diferença em meio a mesmice. E mesmo correndo o risco de parecer “puxa-saco” não posso deixar de registrar que poucos doutores/mestres podem ter o prazer de dizer que teve excelentes orientadores, e eu felizmente sou um deles. Por tudo, muito obrigado.

Aos professores, Dr. Helisson Faoro, Dr. Rubens Duarte, Dr. Rafael Rosa e Dr^a Thais Sincero, por gentilmente aceitarem disponibilizar seu tempo e participar da banca de avaliação deste estudo, muito obrigado.

As fontes de fomento, a CAPES, o CNPq e a FINEP pelo financiamento do projeto e pela bolsa que foram importantes e decisivas para minha dedicação exclusiva para a realização deste trabalho com afinco, muito obrigado.

À Neoprospecta, Dr. Luiz Felipe Oliveira, Dr^a. Aline Sereia, Dr^a. Ana Paula Christoff, Msc Lais Yamanaka e Msc. Patrícia Cunha, pela amizade, parceria e suporte técnico-científico de importância imensurável sem o qual não teria sido possível realizar este trabalho, muito obrigado.

Aos colaboradores, Carime Pontes, Tatiany Soratto, Adriana Silva e Milene Hoehr, por terem contribuído com a construção desta tese, não apenas no desenvolvimento dos experimentos, mas também, na interpretação de resultados, nas discussões dos mesmos, e por terem sido apoio nos resultados falhos e mal sucedidos, muito obrigado. Especialmente aos professores Dr. Mário Steindel, Dr. Glauber Wagner, Dr. Helisson Faoro e Dr. Álvaro Menin, pelo suporte científico e por contribuírem para minha formação científica, muito obrigado.

Aos colegas de laboratórios, Amábili Rosar, Ana Paula Bastiani, Beatriz Figueiredo, Fabrício Luciani, Guilherme Maia, Gabriel Beltrão, Greicy Malaquias, Iasmin Carvalho, Isabela Bastos, João Guesser Tatiana Catecatti, Thais Silva, Vilmar Benedeti-Filho, Viviane Flores, pela convivência e companheirismo diário, muito obrigado. Especialmente a Nathália Gutierrez, Laryssa de Liz, Caibe Pereira e Vanessa Silva pela amizade, suporte técnico e por terem contribuído na construção da minha personalidade pessoal, profissional e científica, muito obrigado.

Aos amigos, Juliana Brasil, Joana Caldas, Aline Maquiavelli, Lucas Valadão, Livia Slabão, Jéssica Campestrini, Ana Clara Martins, Maria José Silva e Felipe Amaral, que foram decisivos para me fortalecer, continuar caminhando e chegar até aqui, muito obrigado. Especialmente as minhas parceiras, amigas, irmãs Dr^a. Bruna Daniella Silva, Dr^a. Monalisa Trentini e Dr^a. Duane Alves, que representam o elo de amizade mais forte construído em minha vida, que nunca se fizeram ausentes e sempre foram apoio científico e fraterno incondicional. Pelo suporte e amizade para viver os 4 anos mais difíceis da minha vida, muito obrigado.

Aos familiares, ao meu pai Abadio da Costa, por me ensinar a integridade, dignidade e princípios morais essenciais que me permitiram chegar aqui. Ao meu irmão Arthur Wilson da Costa, pela incondicional parceria, suporte científico e familiar. Ao meu irmão André Luiz Costa por compreender a minha ausência desde os seus primeiros anos de vida. Especialmente à minha Rainha Francisca Ângela Silva, por me ensinar a respeitar ao próximo, a ser empático e solícito, a importância do estudo como ferramenta de transformação, por alimentar e apoiar o meu sonho de ser doutor mesmo não entendendo bem do que se tratava. Vocês são o maior patrimônio que eu possuo. E por terem fornecido a base necessária para o meu voo, compreendido a minha ausência durante estes anos e suportado os quilômetros que nos separavam, muito obrigado.

“O primeiro passo para se fazer algo grande, é sonhar grande.”

Tábata Amaral

RESUMO

A doença de Chagas permanece como uma doença parasitária de alta incidência na América Latina e em outros países e é causada pelo *Trypanosoma cruzi* que se desenvolve no trato digestivo de triatomíneos. Alguns fatores como o status nutricional podem influenciar no desenvolvimento de *T. cruzi* em vetores, gerando diversas formas intermediárias, influenciando a metaciclogênese e conseqüentemente a transmissão da doença. Algumas evidências têm demonstrado que a infecção de triatomíneos pelo *T. cruzi* promove modificações no seu bacterioma intestinal, também conhecido como microbiota intestinal. Entretanto, existem poucos estudos avaliando a influência desta interação triatomíneo-microbiota-parasito no que diz respeito ao seu desenvolvimento e à capacidade infectiva do *T. cruzi*. O objetivo deste trabalho é avaliar o desenvolvimento da cepa Bol-5 de *T. cruzi* em uma microbiota intestinal de *T. infestans* perturbada e a infectividade de tripomastigotas metacíclicos oriundo de vetores com a microbiota alterada à mamíferos. A caracterização a microbiota intestinal de *T. infestans* mantido em colônia laboratorial foi realizada pelo sequenciamento do gene rRNA 16S de amostras das porções intestinais anterior, média e posterior. Foi observado o predomínio de *Arsenophonus* spp. e *Rhodococcus* spp. em todas as porções intestinais avaliadas. Além disso, a composição de bactérias intestinais na primeira quinzena pós repasto sanguíneo apresentou gêneros bacterianos diferentes da segunda quinzena em todas as porções intestinais avaliadas. O desequilíbrio desta microbiota intestinal promovido pelo repasto sanguíneo com coquetel de antibióticos apresentou uma abundância relativa de *Arsenophonus* spp. e *Rhodococcus* spp. mais evidente do que insetos controles nas porções anterior e média. O mesmo fenômeno não foi observado na porção posterior. Para avaliar o desenvolvimento do parasito em microbiota intestinal perturbada de *T. infestans*, dois grupos de ninfas de 5º estágio larval foram alimentadas com tripomastigotas sanguíneos da cepa Bol-5 de *T. cruzi* em sangue contendo coquetel de antibióticos ou não (Controle). O estabelecimento da infecção da cepa Bol-5 em todos os insetos do grupo Antibióticos ocorreu cerca de 30 dias mais cedo que no grupo Controle, com maior quantidade de parasitos nas fezes de *T. infestans* com a microbiota intestinal alterada quando comparado aos controles ($p < 0,05$). A infecção de camundongos, via intradérmica, utilizando fezes de *T. infestans* do grupo antibióticos apresentou menor parasitemia que camundongos infectados com fezes de insetos controles ($p = 0,0002$). O mesmo fenômeno não foi observado com infecção realizada via intraperitoneal. Além disso, a mortalidade de camundongos do grupo Antibióticos foi inferior (10%) aos do grupo Controle (60%). A avaliação histológica de órgãos dos camundongos infectados apresentou infiltrado inflamatório semelhante em todos os grupos experimentais. Este conjunto de resultados demonstram que a microbiota intestinal de *T. infestans* influencia negativamente o desenvolvimento da cepa Bol-5 de *T. cruzi* e que embora a microbiota intestinal inflencie na infectividade de tripomastigotas metacíclicos em camundongos, não interfere com patogenicidade da cepa Bol-5 de *T. cruzi*.

Palavras-chave: Triatomíneos, *T. infestans*, microbiota intestinal, *T. cruzi*, antibióticos.

ABSTRACT

Influence of *Triatoma infestans* intestinal bacterioma on *Trypanosoma cruzi* development in vector and parasite infectivity to murine model

Chagas disease remains a parasitic disease of high incidence in Latin America and other countries and is caused by *Trypanosoma cruzi* that develops in the digestive tract of triatomines. Some factors such as nutritional status may influence the development of *T. cruzi* in vectors, generating several intermediate forms, influencing metacyclogenesis and consequently the transmission of the disease. Some evidence has shown that *T. cruzi* infection of triatomines promotes changes in its intestinal bacterioma, also known as intestinal microbiota. However, few studies are evaluating the influence of this triatomine-microbiota-parasite interaction concerning its development and to the infective capacity of *T. cruzi*. This work aims to evaluate the Tc Bol-5 strain development in a *T. infestans* disturbed gut microbiota and the vector-derived metacyclic trypomastigotes infectivity to mammals. *T. infestans* gut microbiota (laboratory colony) evaluation was performed by 16S rRNA gene sequencing from samples of the anterior, middle and posterior gut portions. The predominance of *Arsenophonus* spp. and *Rhodococcus* spp. was observed in anterior, middle and posterior portions. Besides, the gut microbiota composition in the first fortnight after blood meal showed different bacterial genus from the second fortnight in anterior, middle and posterior portions. This gut microbiota unbalance promoted by blood meal with antibiotic cocktail showed a more evident relative abundance of *Arsenophonus* spp. and *Rhodococcus* spp. in the anterior and middle portions, than control insects. This phenomenon was not observed in the posterior portion. To evaluate parasite development in a *T. infestans* disturbed GM, two groups of stage 5 nymphs were fed with Bol-5 strain blood trypomastigotes in blood containing antibiotics cocktail or not. The Bol-5 strain infection establishment occurred about 30 days earlier in the antibiotics group. Also, the number of parasites in *T. infestans* faeces with altered GM was higher. Intradermal infection of mice with *T. infestans* faeces showed lower parasitemia in mice of the antibiotics group than the control group. Also, mice mortality of the antibiotic group was lower than the control group. Histological evaluation showed similar inflammatory infiltrate in all experimental groups. This set of results shows that the Ti GM negatively influences the development of the Bol-5 strain and although the GM influences the infectivity of metacyclic trypomastigotes to mice, it does not interfere with Bol-5 strain pathogenesis.

Keywords: Triatomines, *T. infestans*, intestinal microbiota, *T. cruzi*, antibiotics.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: O ciclo de vida do <i>Trypanosoma cruzi</i>	02
Figura 2: Estratégias para genotipagem de DTU de <i>Trypanosoma cruzi</i>	05
Figura 3: Estágios de desenvolvimento de <i>Trypanosoma cruzi</i> no intestino de triatomíneos	08
Figura 4: Morfologia das formas de <i>Trypanosoma cruzi</i> observadas no intestino de triatomíneos	09
Figura 5: O método DADA2 é capaz de identificar gêneros bacterianos menos abundantes	25
Figura 6: O bacterioma intestinal de <i>T. infestans</i> selvagens é diferente de <i>T. infestans</i> mantido em colônia laboratorial	27
Figura 7: Vancomicina promove uma disbiose qualitativa no bacterioma intestinal de <i>T. infestans</i> favorecendo o predomínio de <i>Arsenophonus</i> spp. e <i>Rhodococcus</i> spp.	29
Figura 8: A associação de Vancomicina e Gentamicina promove disbiose qualitativa no bacterioma intestinal de <i>T. infestans</i>	31
Figura 9: Vancomicina e Gentamicina aumenta o número de reads de <i>Rhodococcus</i> spp. no intestino de ninfas de <i>Triatoma infestans</i> de colônia após alimentação	33
Figura 10: A cepa Bol-5 de <i>T. cruzi</i> pertence a DTU TcI e apresenta parasitemia patente em camundongos BALB/c	50
Figura 11: A associação de Vancomicina com Gentamicina retarda o crescimento in vitro de formas epimastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i> , porém não possui ação em formas tripomastigotas presentes no sangue de camundongos infectados	52
Figura 12: O desenvolvimento da infecção da Bol-5 de <i>Trypanosoma cruzi</i> é mais rápida em <i>Triatoma infestans</i> alimentado com Vancomicina e Gentamicina	54
Figura 13: Ninfas de <i>Triatoma infestans</i> alimentadas com antibióticos apresentam formas tripomastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i> em tempo mais reduzido do que ninfas do grupo controle	56
Figura 14: A inoculação intradérmica de fezes de <i>Triatoma infestans</i> com menor quantidade de bactérias intestinais promove diminuir a infecção promovida por tripomastigotas metacíclicos da cepa Bol-5 de <i>Trypanosoma cruzi</i>	57
Figura 15: A infecção com tripomastigotas metacíclicos da cepa Bol-5 de <i>Trypanosoma cruzi</i> promove uma leucocitose em camundongos, com evidente neutrofilia pela inoculação via intraperitoneal e monocitose pela via intradérmica	59
Figura 16: O bacterioma intestinal de <i>Triatoma infestans</i> não interfere com a patogenicidade da cepa Bol-5 de <i>Trypanosoma</i> em infecção por via intradérmica	61
Figura 17: Comportamento da comunidade bacteriana intestinal de <i>Triatoma infestans</i> de colônia após alimentação de cada triplicata biológica	80

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Nomenclatura atual de DTU de <i>Trypanosoma cruzi</i>	04
Quadro 2: Características dos repastos sanguíneos ofertados aos diferentes grupos experimentais de <i>Triatoma infestans</i> de colônia laboratorial	19
Quadro 3: Número de sequências e OTU obtidas pelo sequenciamento do intestino inteiro de ninfas de <i>Triatoma infestans</i> , 10 dias após alimentação artificial	30

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ASV	do inglês, <i>Amplicon Sequence Variant</i>
BOD	Demanda Bioquímica de Oxigênio
CEUA	Comissão de Ética no Uso de animais (CEUA)
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
DC	Doença de Chagas
DTU	do inglês, <i>Discrete Typing Unit</i>
ERO	Espécimes Reativas do Oxigênio
LIT	do inglês, <i>Liver-infusion tryptose</i>
MTT	[3-(4,5-dimetil tiaxole-2-il)-2-5-difenil brometo de tetrazólio]
NTS	do inglês, <i>non-transcribed</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
OTU	do inglês, <i>operational taxonomic unit</i>
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
qPCR	Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa
RPMI	do inglês, <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SBF	Soro Bovino Fetal
RDP	do inglês, <i>Ribosomal Database Project</i>
UMSS	Do espanhol, <i>Universidad Mayor de San Simón</i>

Sumário

1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 A DOENÇA DE CHAGAS E <i>Trypanosoma cruzi</i>	1
1.1.1 Ciclo de vida do <i>Trypanosoma cruzi</i>	2
1.1.2 Diversidade genética do <i>T. cruzi</i>	3
1.2 TRIATOMÍNEOS (INSETOS VETORES).....	6
1.2.1 Fisiologia do sistema digestivo de triatomíneos.....	6
1.3 BIOLOGIA DA RELAÇÃO PARASITO-HOSPEDEIROS.....	7
1.3.1 Desenvolvimento de <i>Trypanosoma cruzi</i> em triatomíneos.....	7
1.3.2 Interação do <i>T. cruzi</i> com hospedeiro mamífero.....	10
1.3.3 O bacterioma intestinal de triatomíneos e a resposta imune do hospedeiro mamífero....	11
1.4 BACTERIOMA INTESTINAL DE TRIATOMÍNEOS.....	12
2 JUSTIFICATIVA.....	15
3 OBJETIVOS.....	16
3.1 OBJETIVO GERAL.....	16
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	16
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	18
4.1 MANUTENÇÃO E ALIMENTAÇÃO DE COLÔNIAS DE <i>Triatoma infestans</i>	18
4.1.1 Manutenção de colônias de vetores.....	18
4.1.2 Alimentação experimental de vetores.....	18
4.1.3 Coleta de intestino de <i>Triatoma infestans</i>	19
4.1.3.1 Experimentos “Piloto”.....	19
4.1.3.2 Experimentos “Alimento”.....	20
4.2 DETERMINAÇÃO DA CONSTITUIÇÃO DO BACTERIOMA INTESTINAL DE TRIATOMÍNEOS.....	20
4.2.1 Extração de DNA do conteúdo intestinal.....	20
4.2.2 Sequenciamento do rRNA 16S.....	20
4.2.3 Análises Metagenômicas.....	22
4.2.3.1 Método <i>Deblur</i>	22
4.2.3.2 Método <i>DADA2</i>	22
4.2.3.3 Método usando <i>VSEARCH</i>	23
4.2.4 Identificação das OTU e análises de diversidade.....	23
5 RESULTADOS.....	24
5.1 ANÁLISE COMPARATIVA DE MÉTODOS DE ANÁLISES DE SEQUÊNCIAS METAGENÔMICAS.....	24
5.2 COMPARAÇÃO DA DIVERSIDADE DO BACTERIOMA INTESTINAL DE <i>T. infestans</i> SELVAGENS E DE COLÔNIAS LABORATORIAIS.....	26
5.3 DISBIOSE INTESTINAL PROMOVIDA PELA ALIMENTAÇÃO COM COQUETEL DE ANTIBIÓTICOS.....	28
5.3.1 Disbiose intestinal promovida por Vancomicina.....	28

5.3.2 Disbiose intestinal de <i>T. infestans</i> promovida por Vancomicina associada a Gentamicina	30
5.4 COMPOSIÇÃO DO BACTERIOMA INTESTINAL DE <i>Triatoma infestans</i> APÓS O REPASTO SANGUÍNEO.....	32
5.4.1 Composição do bacterioma intestinal de ninfas de <i>Triatoma infestans</i> de colônia laboratorial após o repasto sanguíneo.....	34
5.4.2 Disbiose promovida por Vancomicina e Gentamicina no intestino de ninfas de <i>T. infestans</i> de colônia laboratorial.....	35
6 DISCUSSÃO.....	36
6.1.1 Métodos de análises metagenômicas.....	36
6.1.2 Composição e diversidade do bacterioma intestinal de triatomíneos selvagens e de colônias laboratoriais.....	37
6.1.3 Sucessão ecológica no bacterioma intestinal de ninfas de <i>T. infestans</i> após o repasto sanguíneo.....	39
6.1.4 Disbiose do bacterioma promovida por Vancomicina e Gentamicina no intestino de ninfas de <i>T. infestans</i> de colônia laboratorial.....	40
7 CONCLUSÕES.....	42
8 MATERIAIS E MÉTODOS.....	44
8.1 ISOLAMENTO E MANUTENÇÃO DE CEPA Bol-5 e Bol-33 DE <i>T. cruzi</i>	44
8.1.1 Caracterização genética das cepas Bol-5 e Bol-33 de <i>T. cruzi</i>	44
8.1.2 Experimentos de susceptibilidade da cepa Bol-5 de <i>T. cruzi</i> a coquetel de antibióticos.....	45
8.1.2.1 Curva de crescimento da cepa Bol-5 de <i>T. cruzi</i>	45
8.1.2.2 Teste de citotoxicidade em formas epimastigotas.....	45
8.1.2.3 Teste de susceptibilidade de formas tripomastigotas sanguíneas.....	45
8.2 MANUTENÇÃO E ALIMENTAÇÃO DE COLÔNIAS DE <i>Triatoma infestans</i>	46
8.2.1 Alimentação experimental de <i>T. infestans</i> com formas tripomastigotas de <i>T. cruzi</i>	46
8.2.2 Acompanhamento do desenvolvimento da cepa Bol-5 de <i>T. cruzi</i> em <i>T. infestans</i>	46
8.3 ASPECTOS ÉTICOS NO USO DE ANIMAIS.....	46
8.3.1 Manutenção de colônias de camundongos.....	47
8.4 AVALIAÇÃO DA INFECTIVIDADE DA CEPA Bol-5 de <i>T. cruzi</i> EM MODELO MURINO.....	47
8.4.1 Infecção de camundongos BALB/c.....	47
8.4.2 Quantificação de microbiota nas fezes utilizadas na infecção de camundongos.....	48
8.4.3 Contagem diferencial de leucócitos em sangue periférico.....	48
8.4.4 Avaliação histopatológica de camundongos infectados com fezes de <i>T. infestans</i> infectados com a cepa Bol-5 de <i>T. cruzi</i>	49
8.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	49
9 RESULTADOS.....	50
9.1 Caracterização genética e biológica da Cepa Bol-5 de <i>T. cruzi</i>	50
9.2 Comportamento <i>in vitro</i> de formas epimastigotas e tripomastigotas da Cepa Bol-5 de <i>T. cruzi</i> na presença de Vancomicina e Gentamicina.....	51
9.3 Desenvolvimento da infecção da cepa Bol-5 de <i>T. cruzi</i> em <i>T. infestans</i>	53
9.4 Infectividade, em modelo murinho, de tripomastigotas metacíclicos da cepa Bol-5 de <i>T. cruzi</i> desenvolvidos em <i>T. infestans</i> com e sem disbiose intestinal.....	57

10 DISCUSSÃO.....	63
10.1 Susceptibilidade da cepa Bol-5 de <i>T. cruzi</i> à Vancomicina e Gentamicina.....	63
10.2 Desenvolvimento da cepa Bol-5 de <i>T. cruzi</i> em <i>T. infestans</i>	65
10.3 Infectividade e patogenia em camundongos da cepa Bol-5 de <i>T. cruzi</i> desenvolvida em <i>T. infestans</i> com microbiota desequilibrada.....	66
11 CONCLUSÕES.....	69
12 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	70
13 REFERÊNCIAS.....	71
ANEXO 1.....	81

1 INTRODUÇÃO

1.1 A DOENÇA DE CHAGAS E *Trypanosoma cruzi*

A Doença de Chagas (DC) possui como agente etiológico o *Trypanosoma cruzi*, um protozoário hemoflagelado, pertencente a Ordem Kinetoplastida, Família Trypanosomatidae (REY, 2008). O *T. cruzi* possui ampla distribuição na América do Sul e sul dos Estados Unidos, sendo, portanto, considerada uma doença parasitária de alta incidência na América Latina (ALVAREZ et al., 2016). Transmitido principalmente por fezes de insetos hematófagos, pertencentes a Família Reduviidae, Subfamília Triatominae (triatomíneos), o *T. cruzi* é capaz de infectar mais de 100 espécies de mamíferos de diferentes ordens (REY, 2008; DEVERA; FERNANDES; COURA, 2003).

As incidência e prevalência da DC vêm diminuindo desde a década de 1980 (MONCAYO; SILVEIRA, 2009). Entretanto, a crescente mobilidade populacional de indivíduos entre os países endêmicos e não endêmicos, como os Estados Unidos e o Canadá, contribuíram para a difusão dessa infecção parasitária por todo o mundo (BERN et al., 2011; MONTGOMERY et al., 2014; GREENAWAY; CASTELLI, 2019). Neste contexto, embora inicialmente considerada uma doença negligenciada com implicações sociais e econômicas em países da América Latina, a DC tem se tornando um problema de saúde pública global (WHO, 2019).

Atualmente, estima-se que oito milhões de pessoas em todo o mundo estão infectadas pelo *T. cruzi* e que a DC é responsável por mais de dez mil mortes anualmente. O último relatório da Organização Mundial de Saúde (OMS) estimou que a Argentina, Brasil, México e Bolívia concentram a maior prevalência de pessoas infectadas pelo *T. cruzi* em 2010 (WHO, 2019).

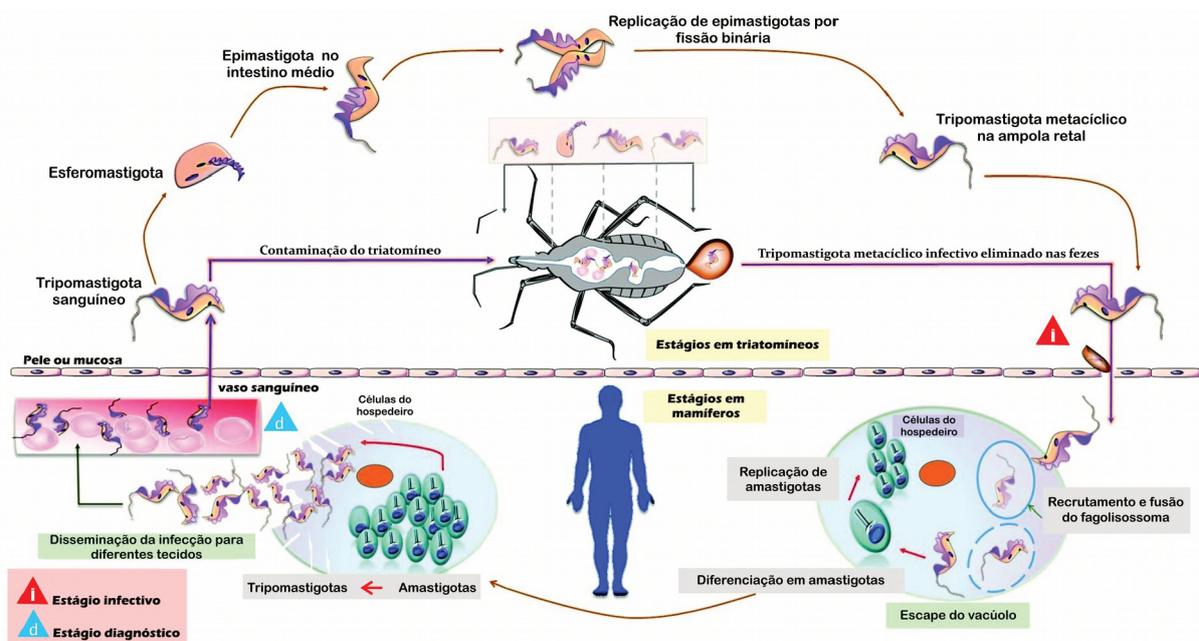
Embora o Brasil possua maior prevalência estimada (1.505.235) do que a Bolívia (607.186), esta representa uma região com alta incidência de infecção vetorial, sendo registrado cerca de mais de oito mil novos casos anualmente, e é responsável por 92,6% dos novos casos registrados na sub-região do Cone Sul. Ademais, Argentina e Bolívia respondem por 30,62% dos novos casos de DC na América Latina (WHO, 2019). A região de Cochabamba apresentou taxas de infestação doméstica por triatomíneos variando de 70 a 90% entre os anos de 2005 e 2011 (ESPINOZA; BORRÁS; ABAD-FRANCH, 2014). Dentre as espécies de triatomíneos, o *Triatoma infestans* é o principal vetor presente na região da Bolívia (PINTO et al., 2019) e é responsável quase exclusivamente pelas infecções vetoriais nesta região (ESPINOZA ECHEVERRIA et al., 2017).

O *T. cruzi* apresenta três formas principais morfologicamente distintas: a forma amastigota que é intracelular obrigatória, ovóide, sem flagelo livre e visível, com cinetoplasto em forma de disco convexo-côncavo e aparência de bastonete curto, curvado e localizado próximo ao núcleo ovóide e compacto; e as formas epimastigotas e tripomastigotas que são flageladas e que, apesar de semelhantes, podem ser diferenciadas por meio da posição do cinetoplasto em relação ao núcleo. As formas epimastigotas possuem dimensões e formas bastante variáveis, citoplasma abundante, cinetoplasto como nas formas amastigotas, situado próximo ao núcleo na região anterior à bolsa flagelar. As formas tripomastigotas são menores que as formas epimastigotas e apresentam cinetoplasto grande e redondo próximo a região posterior à bolsa flagelar flagelo (REY, 2008).

1.1.1 Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*

O *T. cruzi* apresenta ciclo de vida heteroxênico, com estágios morfológicos e funcionalmente distintos, de acordo com o ambiente no qual o parasito se encontra, alternando entre formas replicativas (epimastigotas e amastigotas) e não-replicativas (tripomastigotas). A forma tripomastigota sanguínea é infectiva para insetos vetores e a forma tripomastigota metacíclica é infectiva para hospedeiros mamíferos (Figura 1) (LIDANI et al., 2017).

Figura 1: O ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*



Adaptado de Lidani e colaboradores (2017)

A infecção do hospedeiro mamífero ocorre quando o triatomíneo, durante o repasto sanguíneo, libera juntamente as fezes e urina as formas tripomastigotas metacíclicas do *T.*

cruzi. Devido à sua incapacidade de penetrar na pele intacta de hospedeiros mamíferos, o *T. cruzi* usualmente infecta seus hospedeiros mamíferos por penetração de regiões de mucosa (ocular e oral) ou lesões cutâneas, incluindo-se as soluções de continuidade determinadas pela picada dos triatomíneos (BRENER, 1973; ZELEDON; RABINOVICH, 1981; KOLLIEN; SCHAUB, 2000; SCHUSTER; SCHAUB, 2000). Na sequência, as formas tripomastigotas metacíclicas penetram nas células do hospedeiro e se diferenciam em formas amastigotas. Estas formas se multiplicam no interior de células do hospedeiro, diferenciam-se em formas tripomastigotas não replicativas, que após a ruptura celular ganham a corrente sanguínea, podendo então, ser ingeridas por insetos vetores durante o repasto sanguíneo (SCHAUB; LÖSCH, 1988).

No lúmen intestinal dos vetores, as formas tripomastigotas ingeridas através do repasto sanguíneo podem se diferenciar em duas diferentes formas: os esferomastigotas que são formas não replicativas ou epimastigotas que são as formas replicativas nos vetores. As formas epimastigotas colonizam todo o trato intestinal do triatomíneo e na região da ampola retal se diferenciam em tripomastigotas metacíclicos, processo denominado de metaciclogênese (Figura 1) (SCHAUB; LÖSCH, 1988).

1.1.2 Diversidade genética do *T. cruzi*

As cepas de *T. cruzi* apresentam uma diversidade genética e uma multiplicidade de genótipos e fenótipos (MACEDO et al., 1992). Os primeiros sistemas de classificação de cepas de *T. cruzi* foram baseados na identificação de marcadores isoenzimáticos, que embora tenham se mostrado eficientes a priori, sugeriam que a estrutura populacional do *T. cruzi* teria origem em clones evolutivamente independentes. Com o advento de estudos genéticos baseados em marcadores multiloci (DNA *fingerprinting*, *Random Amplification of polymorphic DNA*, Reação em Cadeia da Polimerase de repetições de sequências simples, e cariotipagem molecular) se demonstrou existir uma maior variabilidade intraespecífica e foi sugerida uma individualidade genética absoluta entre as linhagens clonais (OLIVEIRA et al., 1998).

Ao longo dos anos, visando definir os subgrupos de *T. cruzi* relevantes, inúmeras abordagens metodológicas foram empregadas para caracterizar a sua estrutura populacional, que resultaram em diferentes designações: zimodemas, schizodemas, biodemas, clones, linhagens, clados e, mais recentemente, Unidades de Tipagem Discreta (DTU) e haplótipos

(INST OSWALDO CRUZ et al., 2009). Em 1999, as cepas de *T. cruzi* foram classificadas de acordo com suas características biológicas, bioquímicas e moleculares, em dois grupos principais *T. cruzi* I (TcI), associado ao ciclo silvestre, e *T. cruzi* II (TcII), associado ao ciclo doméstico (ANONYMOUS, 1999).

Com os avanços no conhecimento da diversidade do *T. cruzi*, a genotipagem multilocus revelou seis DTU distintas, agrupadas em duas divisões principais, a DTU I e a DTU II abrangendo cinco DTU (IIa-e) (BRISSE; DUJARDIN; TIBAYRENC, 2000). As DTU foram definidas como “conjuntos de ações que são geneticamente mais relacionadas entre si do que com qualquer outra ação e que são identificáveis por marcadores genéticos, moleculares ou imunológicos comuns” (TIBAYRENC et al., 1986). Em 2009, um consenso de especialistas, classificou as cepas de *T. cruzi* em seis DTU, *T. cruzi* I-VI (INST OSWALDO CRUZ et al., 2009) (Quadro 1).

Quadro 1: Nomenclatura atual de DTU de *Trypanosoma cruzi*

DTU	Abreviatura	Equivalência em classificações anteriores
<i>T. cruzi</i> I	TcI	<i>T. cruzi</i> I ^a e DTU I ^b
<i>T. cruzi</i> II	TcII	<i>T. cruzi</i> II ^a e DTU II ^b
<i>T. cruzi</i> III	TcIII	DTU IIc ^b
<i>T. cruzi</i> IV	TcIV	DTU IIa ^b
<i>T. cruzi</i> V	TcV	DTU IId ^b
<i>T. cruzi</i> VI	TcVI	DTU IIe ^b

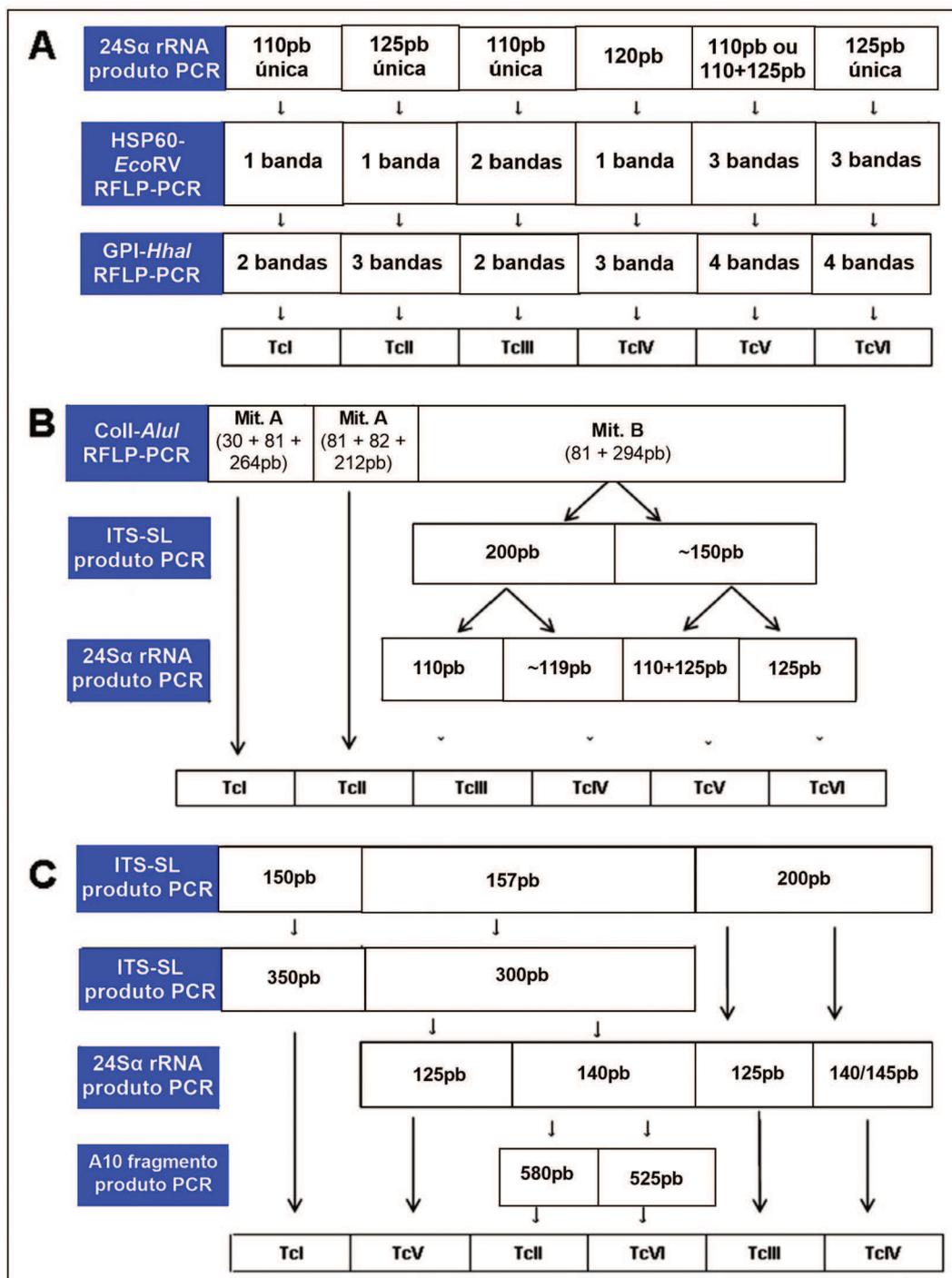
Legenda: a: (ANONYMOUS, 1999); b: (BRISSE; DUJARDIN; TIBAYRENC, 2000).

Inúmeras abordagens têm sido empregadas a fim de caracterizar a diversidade bioquímica e genética dos isolados de *T. cruzi*. Até o momento, nenhum alvo genético único permite a resolução completa da DTU, e a utilização de em um único alvo é desaconselhada devido à potencial influência da troca genética e à variabilidade intraespecífica (ZINGALES et al., 2012).

Lewis e colaboradores (2009) propuseram uma estratégia de tipificação sequencial de três marcadores (Figura 2A), consistindo na aplicação combinada de amplificação por PCR do rRNA de 24Sα e por PCR-RFLP (PCR seguido por análise do polimorfismo de tamanho dos fragmentos de restrição) dos genes que codificam a proteína de choque térmico 60 (HSP60) e da isomerase de glicose-6-fosfato (GPI). D'Avila e colaboradores (2009) propuseram a análise por PCR-RFLP do gene COII para discriminar TcI e TcII das outras DTU, seguida da amplificação do espaçador não transcrito (NTS) dos genes SL das cepas não classificadas para

definir dois *clusters* distintos, um formado por TcIII e TcIV e outro por TcV e TcVI, e a amplificação de 24Sα rRNA para resolver a diferença entre elas (Figura 2B). O terceiro esquema proposto permite a tipagem direta de DTU em amostras biológicas e clínicas, empregando ensaios sequenciais de multiplex PCR em tempo real (Figura 2C) (ZINGALES et al., 2012).

Figura 2: Estratégias para genotipagem de DTU de *Trypanosoma cruzi*



Adaptado de ZINGALES e colaboradores (2012).

1.2 TRIATOMÍNEOS (INSETOS VETORES)

A Subfamília Triatominae é constituída por aproximadamente 140 espécies, encontradas em países latino-americanos e constituem potenciais vetores para o *T. cruzi*. Embora a maioria destas espécies contribuam para o ciclo silvestre (ocorrido em ambiente silvestre), algumas delas possuem importância para o ciclo doméstico e, portanto, são consideradas importantes vetores da DC. Dentre elas se destacam o *T. infestans*, o *Panstrongylus megistus* e o *Rhodnius prolixus* (KOLLIEN; SCHAUB, 2000; SCHOFIELD; GALVÃO, 2009).

Em todos os seus cinco estágios de ninfas e também na fase adulta, os triatomíneos se alimentam de sangue, podendo ingerir entre 6-12 vezes o seu próprio tamanho. Usualmente, uma alimentação é suficiente para o desenvolvimento do próximo estágio larval, permanecendo apenas pequenos resíduos do alimento no estômago após a ecdise. Ao final da total digestão do sangue, inicia-se um período de fome que pode durar mais de 12 meses dependendo da espécie, das condições climáticas e do seu estágio de desenvolvimento (ninfas ou adulto) (KOLLIEN; SCHAUB, 2000; SCHAUB; LÖSCH, 1988).

1.2.1 Fisiologia do sistema digestivo de triatomíneos

Durante o repasto sanguíneo, os triatomíneos são capazes de ingerir uma enorme quantidade de sangue, seguida de imediata diurese. Além disso apresentam lenta digestão alimentar e capacidade de sobreviver a longos períodos de jejum (KOLLIEN; SCHAUB, 2000). Devido à ação de anticoagulantes, produzidos na glândula salivar destes insetos, o sangue ingerido não sofre processo de coagulação e permanece armazenado na porção anterior do trato digestivo (estômago). Ainda neste ambiente, sofre ação de hemolisinas e enzimas que atuam principalmente sobre carboidratos, permanecendo parcialmente digerido e conduzido em pequenas quantidades para o intestino médio (KOLLIEN; SCHAUB, 2000; LANGE et al., 1999).

Em mamíferos, a hemoglobina corresponde a aproximadamente 60% das proteínas sanguíneas, podendo chegar a concentrações superiores a 150 mg/ml. No intestino médio de insetos, a digestão da hemoglobina promove um aumento da quantidade de aminoácidos e do grupo prostético da hemoglobina (Heme), o qual promove a formação de espécies reativas de oxigênio (ERO) (DAVIES, 1989; VAN DER ZEE; BARR; MASON, 1996). Graça-Souza e colaboradores (2006) propuseram que a resistência ao estresse oxidativo induzido pelo

Heme, após a alimentação de hematófagos, seria um grande avanço na evolução destes insetos (GRACASOUZA et al., 2006).

Durante o repasto sanguíneo de triatomíneos, hormônios diuréticos são secretados no estômago, promovendo o transporte de água e íons para a ampola retal através dos túbulos de Malpighi, que são considerados órgão excretor de triatomíneos (ENGEL; MORAN, 2013). O transporte de líquidos induz a excreção do conteúdo retal (restos da digestão da alimentação anterior), contendo grande concentração de esferas de ácido úrico. Cerca de 24 horas após a alimentação o pH da ampola retal até então ligeiramente ácido torna-se mais alcalino (GARCIA et al., 2010).

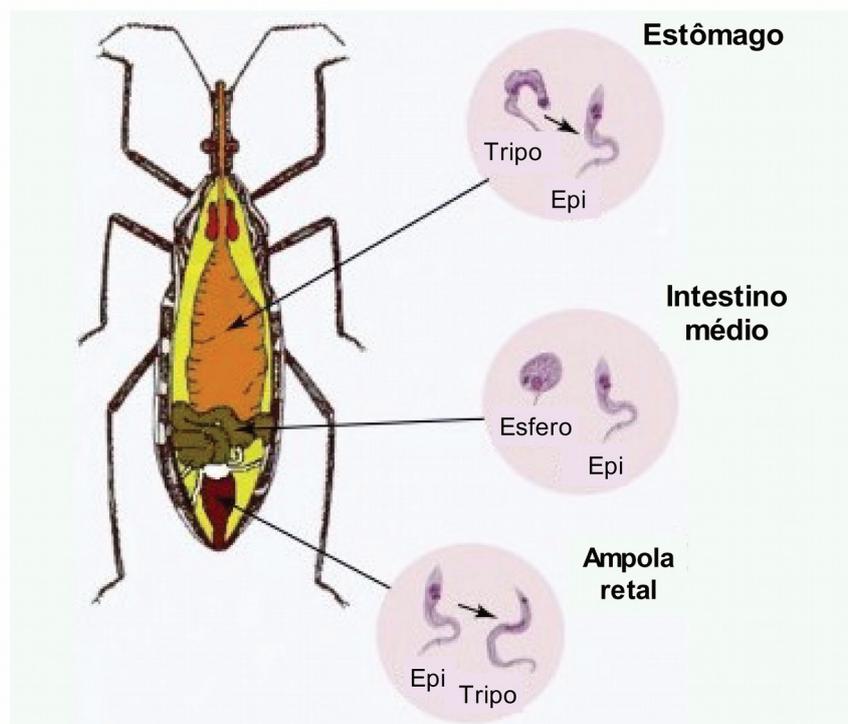
O processo de digestão e de absorção ocorre principalmente na região do intestino médio, pela ação de catepsinas que requerem acidificação do conteúdo intestinal (KOLLIEN; SCHAUB, 2000). Após aproximadamente 10 dias, novas fezes de coloração marrom-escura, oriundos da nova digestão, aparecem novamente no reto. Desta forma, a alimentação promove mudanças intestinais nos vetores, especialmente na ampola retal, e conseqüentemente nas condições ambientais para o desenvolvimento do parasito (GARCIA et al., 2010).

1.3 BIOLOGIA DA RELAÇÃO PARASITO-HOSPEDEIROS

1.3.1 Desenvolvimento de *Trypanosoma cruzi* em triatomíneos

O desenvolvimento do *T. cruzi* inicia após a alimentação do inseto com sangue do hospedeiro mamífero infectado. O trato intestinal dos triatomíneos apresenta três diferentes regiões importantes para o desenvolvimento de *T. cruzi*: o intestino anterior ou estômago, o intestino médio ou delgado e a ampola retal ou reto (Figura 3) (GARCIA et al., 2010). As mudanças no ambiente intestinal, após a alimentação, possuem relação com os diferentes estágios do desenvolvimento de *T. cruzi*, como a mudança entre as diferentes formas do parasito e a metaciclogênese (KOLLIEN; SCHAUB, 2000).

Figura 3: Estágios de desenvolvimento de *Trypanosoma cruzi* no intestino de triatomíneos



Adaptado de Garcia e colaboradores (2010).

No estômago, os tripomastigotas sanguíneos se diferenciam em epimastigotas (Figura 3) (BRENER, 1973). Ao chegarem ao estômago, junto ao alimento, os parasitos entram em contato com componentes da saliva, e/ou enzimas digestivas, além de fatores hemolíticos. Estes fatores promovem mudanças ambientais importantes na temperatura, osmolaridade e suplementação alimentar, e conseqüentemente afetam o parasito (KOLLIEN; SCHAUB, 2000).

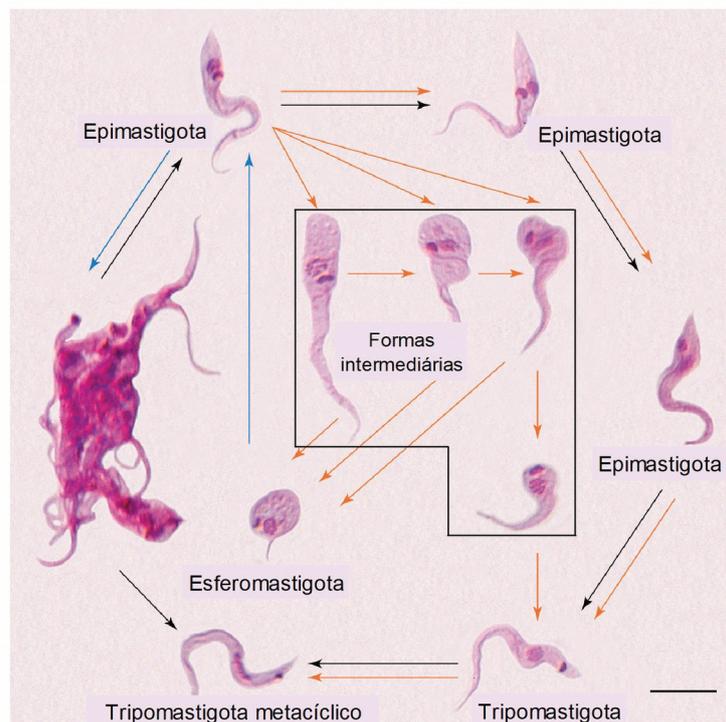
Após a passagem para a região do intestino médio, formas epimastigotas se dividem repetidamente e aderem à membrana perimicrovilar das células intestinais. Desta maneira, a medida que o tempo de infecção progride, ocorre um aumento do número de parasitos na região do intestino médio e da ampola retal (GARCIA; GONZALEZ; AZAMBUJA, 1999). Ainda no intestino médio, em períodos de jejum prolongado, formas epimastigotas podem sofrer mudanças para formas esferomastigotas como mecanismo de sobrevivência em ambientes com baixa disponibilidade nutricional (KOLLIEN; SCHAUB, 2000).

Após aderir à cutícula da ampola retal, por interações hidrofóbicas, os epimastigotas sofrem metaciclogênese (Figura 3) (GARCIA et al., 2010; KOLLIEN; SCHAUB, 2000). A metaciclogênese é o evento crucial no ciclo vital do *T. cruzi* (SCHAUB; LÖSCH, 1988), e

diversos fatores são considerados importantes para este processo como o pH, a osmolaridade, o soro de mamífero, os componentes hemolinfáticos e os extratos intestinais, dentre outros (GARCIA et al., 2010). Apesar de a metaciclogênese ter sido alvo de muitas investigações, a maioria dos estudos foram realizados empregando métodos *in vitro* de diferenciação de epimastigotas em tripomastigotas (SCHAUB; LÖSCH, 1988).

Outros estudos têm demonstrado que as variações nutricionais no trato intestinal de vetores podem contribuir para a geração de formas intermediárias do parasito no intestino de insetos vetores, bem como determinar o sucesso no desenvolvimento do parasito (Figura 4) (KOLLIEN; SCHAUB, 2000; PERLOWAGORA-SZUMLEWICZ et al., 1994).

Figura 4: Morfologia das formas de *Trypanosoma cruzi* observadas no intestino de triatomíneos



Legenda: Diferentes estágios de *T. cruzi* no intestino de *Triatoma infestans* após curto (setas azuis) ou longo (setas pretas) período após alimentação de insetos em jejum e durante longo período de fome (setas vermelhas). Adaptado de Kollien e Schaub (2000).

Triatomíneos submetidos a um período de fome apresentam uma grande quantidade de formas esferomastigotas e um número reduzido de epimastigotas e tripomastigotas metacíclicos. Neste contexto, a identificação de esferomastigotas indica seu importante papel no ciclo de vida do *T. cruzi* em condições de estresse ambiental (KOLLIEN; SCHAUB, 2000). Entretanto, poucas horas após a alimentação, a proporção de formas epimastigotas

aumenta e progridem para formas tripomastigotas, apresentando evidências de metaciclogênese pela urina (SCHAUB; LÖSCH, 1988).

Em situações de escassez nutricional (períodos de jejum dos triatomíneos) formas epimastigotas também se desenvolvem em esferomastigotas que posteriormente se diferenciam em células gigantes que após o fim do período de intenso jejum se diferenciam em epimastigotas novamente. A proporção de tripomastigotas aumenta à medida que este estágio de divisão múltipla ocorre (SCHAUB; LÖSCH, 1988).

A taxa de metaciclogênese também sofre influência do estado nutricional do vetor e pela quantidade de parasitos no lúmen intestinal. Um desenvolvimento mais lento aparentemente está associado a uma baixa proporção de tripomastigotas metacíclicos (DE LANA et al., 1998; SCHAUB, 1989). Ademais, em baixas temperaturas, a taxa de metaciclogênese também é reduzida (KOLLIEN; SCHAUB, 2000).

O estabelecimento de parasitos no trato digestivo de vetores é considerado cepa-dependente (GRISARD et al., 1999; MACHADO et al., 2001) e a porcentagem de insetos contendo parasitos nas diferentes porções intestinais após a infecção pode variar alguns dias (VIEIRA et al., 2015). Embora todas as formas intermediárias possam estar presentes no ambiente intestinal de triatomíneos e serem eliminadas em suas fezes/urina, somente a forma tripomastigota metacíclica é capaz de infectar o hospedeiro mamífero (SCHUSTER; SCHAUB, 2000).

1.3.2 Interação do *T. cruzi* com hospedeiro mamífero

Durante o processo de invasão celular que ocorre logo após a infecção do hospedeiro mamífero, o *T. cruzi* interage com moléculas e componentes presentes nas células hospedeiras e na matriz extracelular, promovendo a fagocitose, apesar de a fagocitose ser um importante mecanismo natural de resistência às infecções (DVORAK, 1984; DVORAK; HYDE, 1973). Embora muitos parasitos sejam destruídos no vacúolo fagocitário (fagolisossoma), o *T. cruzi* é capaz de escapar deste e atingir o citoplasma da célula hospedeira (TEIXEIRA et al., 2011). Além disso, alguns estudos demonstraram que macrófagos residentes não-ativados podem controlar uma infecção de razão parasito-célula hospedeira de 5:1, porém, macrófagos são destruídos se esta razão for de 10:1 (DVORAK, 1984; KRESS et al., 1975).

Um importante fator de sucesso do *T. cruzi* para sobreviver nos hospedeiros vertebrados é a evasão da resposta imune celular (ALBAREDA et al., 2013; GIGLEY et al., 2012). Alguns estudos têm demonstrado a existência de diferentes estratégias desenvolvidas pelo parasito para modular a resposta imune de mamíferos (CARDOSO; REIS-CUNHA; BARTHOLOMEU, 2015; DECOTE-RICARDO et al., 2017; LUNA-GOMES et al., 2014). Um dos mecanismos mais eficientes para o estabelecimento de uma infecção persistente é a indução de apoptose de células T e B, promovendo efeitos imunomodulatórios na resposta imune do hospedeiro (CARDOSO; REIS-CUNHA; BARTHOLOMEU, 2015; DOSREIS, 2011).

A inacessibilidade à componentes séricos da resposta imune humoral, devido sua rápida penetração em células não-fagocitárias como as células musculares, é considerado um dos mecanismos de escape do *T. cruzi*. Entretanto, a ação transitória de anticorpos humorais na infecção foi relatada em camundongos (TEIXEIRA et al., 2011), demonstrando que o pré-tratamento de camundongos com soro imune contendo altos títulos de anticorpos revelou que anticorpos IgG2b são protetores contra a infecção pelo *T. cruzi* e que IgM e IgG1 forneceram proteção mínima ou inexistente (TAKEHARA et al., 1981), sugerindo que a resposta de IgG ainda na fase aguda da infecção é importante para o controle da infecção (TEIXEIRA et al., 2011).

1.3.3 O bacterioma intestinal de triatomíneos e a resposta imune do hospedeiro mamífero

Durante o repasto sanguíneo, a saliva de triatomíneos eliminada no momento da picada possui moléculas bioativas (anticoagulantes, vasodilatadores, imunossupressor anti-histamínico, inibidor da agregação plaquetária induzida por colágeno e apirase) (RIBEIRO, 1995). Além disso, as fezes de triatomíneos eliminadas durante a alimentação são constituídas por elementos abióticos (restos da digestão do sangue) e bióticos (microbiota) (DA MOTA et al., 2012), sendo que a urina é composta de sulfato, fosfato, potássio, sódio e cloreto (KOLLIEN et al., 2001).

Estudos realizados em modelo murinho têm demonstrado que a saliva e as fezes são capazes de induzir quimiotaxia celular e abundante infiltração de neutrófilos e monócitos na região de contato dos mamíferos com estes elementos (MESQUITA et al., 2008; MONTEON et al., 2016; MONTEÓN et al., 2009, 1996). Porém, a composição da resposta inflamatória

dependerá do tipo de fluído inoculado. A saliva, imediatamente após a picada, promove um processo alérgico com infiltração de neutrófilos, eosinófilos e monócitos, acompanhada de intensa degranulação mastocitária e seguida de uma reação de hipersensibilidade tardia (MONTEON et al., 2016; MONTEÓN et al., 1996). A reação inflamatória induzida pelas fezes é marcada pelo predomínio de células neutrofílicas, seguida pela infiltração de células mononucleares (MONTEÓN et al., 2009). Ademais, exposições prévias sucessivas à microbiota intestinal de triatomíneos são capazes de reduzir a parasitemia de *T. cruzi* em camundongos experimentalmente infectados (MONTEON et al., 2016).

Estas evidências recentes incitam a existência de uma possível resposta imune do hospedeiro contra o bacterioma intestinal dos triatomíneos, que possivelmente explicaria o fato de que em zonas muito endêmicas para DC, com abundância de triatomíneos, apenas um terço das pessoas está infectada pelo *T. cruzi* (MONTEON et al., 2016).

1.4 BACTERIOMA INTESTINAL DE TRIATOMÍNEOS

Desde os primeiros trabalhos utilizando *R. prolixus* e *P. megistus* tem sido reportada a colonização do intestino de triatomíneos por bactérias (DIAS, 1934). Ademais, o desenvolvimento dos triatomíneos depende fortemente de sua comunidade bacteriana simbiote, adquirida a partir da própria população de insetos por coprofagia. Efeitos biológicos prejudiciais significativos em triatomíneos infectados com microrganismos não simbiotes no trato intestinal foram relatados, dentre eles: retardo no desenvolvimento de estágios ninfais (BRECHER; WIGGLESWORTH, 1944), aumento na mortalidade dos insetos (HARRINGTON, 1960), redução do sistema traqueal (SCHAUB; EICHLER, 1998), distúrbios de digestão e excreção (BRECHER; WIGGLESWORTH, 1944; SCHAUB; EICHLER, 1998). Estes efeitos patológicos foram revertidos quando os insetos foram novamente colonizados por microrganismos simbiotes ou com alimentação enriquecida de vitamina B (LAKE; FRIEND, 1968; SCHAUB; EICHLER, 1998). Estas evidências foram confirmadas por diferentes estudos posteriormente, demonstrando a importância dos simbiotes intestinais para o desenvolvimento e manutenção fisiológica de triatomíneos (EICHLER; SCHAUB, 2002).

Bactérias intestinais são adquiridas principalmente durante a alimentação, na qual bactérias comensais da pele do hospedeiro podem ser ingeridas, ou ainda por coprofagia e/ou canibalismo. Desta forma, a composição por algumas espécies de bactérias dominantes é

bastante comum e influenciada basicamente por características do hospedeiro (JURBERG E GALVÃO, 2006). Também por esta via, o sistema digestivo de vetores pode ser invadido por parasitos exógenos que competem com o bacterioma local, na qual predominam as espécies mais resistentes ou favoráveis, seja as bactérias invasoras, seja o bacterioma simbiote e consequentemente o hospedeiro (VIEIRA et al., 2014).

Empregando metodologias baseadas em cultivo de microrganismos, o primeiro simbiote bacteriano em triatomíneos descrito foi o *Rhodococcus rhodnii* isolado no intestino de *R. prolixus*, e posteriormente também relatada em outras espécies de triatomíneos, incluindo *T. infestans*. Posteriormente, foi demonstrado que outras bactérias tais como *Nocardia* spp., *Gordonia* spp. e *Rhodococcus equi-like* também constituíam o bacterioma intestinal de triatomíneos (EICHLER; SCHAUB, 2002).

Estudos recentes vêm constantemente descrevendo a existência de outras espécies de simbiotes intestinais em triatomíneos. Entretanto, consensualmente têm sido demonstrado que o bacterioma intestinal de triatomíneos é constituída por uma baixa diversidade (DA MOTA et al., 2012; DÍAZ et al., 2016; GUMIEL et al., 2015; MONTOYA-PORRAS et al., 2018). Muito embora triatomíneos selvagens apresentem um número maior de espécies compondo o bacterioma do que triatomíneos mantidos em colônias laboratoriais (DA MOTA et al., 2012), independentemente destas condições, a diversidade desta comunidade bacteriana é menor do que a relatada em outros organismos, como camundongos e humanos por exemplo (KENNEDY, KING E BALDRIDGE, 2018; WANG et al., 2017), incluindo outros insetos não hematófagos (BRAUMAN et al., 2001; ENGEL; MORAN, 2013; MONTOYA-PORRAS et al., 2018).

Alguns estudos demonstram possíveis associações entre as diferentes composições de simbiotes intestinais com os diferentes gêneros de triatomíneos (DÍAZ et al., 2016), o habitat natural desses insetos (bioma) e sua origem (se são mantidos em colônias laboratoriais ou coletados na natureza) (DA MOTA et al., 2012; DÍAZ et al., 2016; GUMIEL et al., 2015). Ademais, alguns simbiotes apesar de não obrigatórios contribuem para a fisiologia do vetor (CASTRO et al., 2012b; EICHLER; SCHAUB, 2002).

Contudo, microrganismos vivendo em ambientes intestinais de insetos vetores de doenças apresentam importante papel na habilidade destes vetores em adquirir, manter e transmitir patógenos, seja pela competição direta por nutrientes presentes no ambiente

intestinal, pela produção de fatores ou componentes antiparasitários ou mesmo pela estimulação de uma resposta imune do vetor contra o parasito (AZAMBUJA; GARCIA; RATCLIFFE, 2005; CASTRO et al., 2007; DILLON; DILLON, 2004; WEISS; AKSOY, 2011).

2 JUSTIFICATIVA

Apesar do recente aumento de estudos de simbioses intestinais de insetos, o conhecimento geral sobre como essas comunidades bacterianas estão organizadas apenas começa a surgir. Muito embora existam evidências de que o *T. cruzi* seja capaz de induzir a produção de fatores imunológicos no vetor e desta forma reduzir o bacterioma intestinal de triatomíneos (DÍAZ et al., 2016). Este fenômeno ainda não foi demonstrado em um modelo de infecção semelhante ao natural e também não foi avaliado o desenvolvimento do parasito ao longo do tempo e, portanto, apenas retratam momentos pontuais após o repasto sanguíneo.

Além disso, em mamíferos, os fenômenos envolvidos no momento da infecção podem ser essenciais para o sucesso da disseminação do parasito, replicação e instalação da infecção (MONTEÓN et al., 2009). Até o momento, os estudos experimentais avaliando a possível contribuição do bacterioma intestinal dos triatomíneos na capacidade do *T. cruzi* de infectar hospedeiros mamíferos são escassos e fornecem poucas evidências da influência do bacterioma intestinal na infecção de triatomíneos.

Neste contexto, a investigação da influência que bactérias intestinais possuem sobre o processo de infecção do *T. cruzi*, bem como sua relação na interação parasito-hospedeiro pode representar uma chave para a identificação de componentes a serem empregados no desenvolvimento de novas estratégias ou ferramentas para o controle da transmissão da DC. Portanto, nossa hipótese é de que o bacterioma intestinal de *T. infestans* influencia no desenvolvimento e na infectividade do *T. cruzi*.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a influência do bacterioma intestinal de *T. infestans* no desenvolvimento de *T. cruzi* no vetor e na infectividade do parasito no modelo murino.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar o bacterioma intestinal de *T. infestans* selvagens e de colônia laboratorial;
- Validar um modelo de análise de desequilíbrio do bacterioma intestinal de *T. infestans* de colônia laboratorial;
- Compreender a dinâmica do bacterioma intestinal de *T. infestans* durante o processo de hematofagia de *T. infestans* de colônia;
- Caracterizar a cepa Bol-5 de *T. cruzi* isolada de *T. infestans*;
- Analisar comparativamente o desenvolvimento da cepa Bol-5 de *T. cruzi* em *T. infestans* submetido ou não a um desequilíbrio do bacterioma intestinal;
- Avaliar o envolvimento do bacterioma intestinal do vetor na infectividade e patogenicidade da cepa Bol-5 de *T. cruzi* ao modelo murino.

CAPÍTULO I
Estudo comparativo (qualitativo) do bacterioma intestinal de *Triatoma*
infestans selvagens e de colônias laboratoriais

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MANUTENÇÃO E ALIMENTAÇÃO DE COLÔNIAS DE *Triatoma infestans*

4.1.1 Manutenção de colônias de vetores

A colônia de *T. infestans* utilizada neste trabalho foi originalmente obtida da região de Cochabamba na Bolívia, com o auxílio da Dr^a. Nora Medrano-Mercado (*Universidad Mayor de San Simón* – UMSS). Os insetos são mantidos no insetário do Laboratório de Protozoologia do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia (MIP) Localizado no Centro de Ciências Biológicas (CCB) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), em estufa BOD a uma umidade relativa de 75% e temperatura de 25 °C. Semanalmente, as colônias recebem alimentação natural diretamente em camundongos e/ou ratos, os quais são previamente sedados com Cetamina (100 mg/kg) e Xilazina (10 mg/kg). Os animais utilizados para a alimentação dos insetos foram fornecidos pelo Biotério Central da UFSC e foram manipulados de acordo com as normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). O uso de animais no presente projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de animais (CEUA) sob protocolo número 9923170516.

4.1.2 Alimentação experimental de vetores

Para os experimentos, insetos adultos e/ou ninfas de 4^o e 5^o estágios permaneceram em jejum por no mínimo 21 dias, sendo então separados em diferentes grupos experimentais (Quadro 2). Os insetos foram alimentados artificialmente com sangue humano obtido por punção venosa com citrato a 3,8% e inativado a 56 °C, em banho-maria, por 30 minutos. Cada grupo experimental, recebeu sangue acrescido ou não de coquetel de antibióticos contendo Vancomicina e/ou Gentamicina nas concentrações descritas no quadro 2.

Quadro 2: Características dos repastos sanguíneos ofertados aos diferentes grupos experimentais de *T. infestans* de colônia laboratorial

Experimento	Grupo	Estágio (n)	Tratamento
Piloto I	Controle	Adultos (3)	Sangue
	Controle	Ninfas (3)	Sangue
	Vanco_0,5mg	Adulto (1)	Sangue + Vanco 0,5mg/ml
	Vanco_0,5mg	Ninfas (2)	Sangue + Vanco 0,5mg/ml
	Vanco_1mg	Adulto (1)	Sangue + Vanco 1,0mg/ml
	Vanco_1mg	Ninfas (2)	Sangue + Vanco 1,0mg/ml
Piloto II	Controle	Ninfas (3)	Sangue
	Antibiótico	Ninfas (3)	Sangue + Vanco 1,0mg/ml + Genta 1,0mg/ml
Alimento	Controle	Ninfas (81)	Sangue
	Antibiótico	Ninfas (81)	Sangue + Vanco 1,0mg/ml + Genta1,0mg/ml

Legenda: Vanco = Vancomicina e Genta = Gentamicina

As diferentes preparações de repastos sanguíneos foram adicionadas em alimentadores artificiais e mantidos a 37° C por circulação de água aquecida (GARCIA et al., 1989). O conteúdo dos alimentadores foi homogeneizado a cada 15 minutos a fim de evitar sedimentação de células e ou parasitos. Os insetos foram pesados antes e após a alimentação para estimar o volume de sangue ingerido e apenas ninfas totalmente ingurgitadas foram utilizadas nos experimentos e mantidas em BOD com temperatura e umidade do ar controladas.

4.1.3 Coleta de intestino de *Triatoma infestans*

4.1.3.1 Experimentos “Piloto”

Nos dois experimentos piloto realizados, denominados “Piloto I” e “Piloto II”, as amostras intestinais de *T. infestans* foram obtidas no 10º dia após o repasto sanguíneo. No Piloto I foi realizada coleta de intestino inteiro e no Piloto II a porção anterior (estômago), o intestino médio e a ampola retal foram coletados separadamente. Em ambos os experimentos, a cavidade abdominal dos insetos foi exposta após remoção do dorso (pronoto, escutelo e hemiélitro) com auxílio de pinças e tesoura cirúrgicas esterilizadas em álcool 70%. Em seguida, o tecido intestinal foi minuciosamente coletado, depositado sobre lâmina de vidro estéril, e após ser transferido para tubo de polipropileno de 1,5 ml, foi congelado a -80 °C. A separação das porções intestinais do Piloto II foi realizada sobre lâminas de vidro estéreis, com auxílio de lâmina de bisturi descartável e, posteriormente congeladas separadamente em tubo de polipropileno de 1,5 ml a -80 °C. Todas as amostras foram descongeladas uma única vez no momento da extração de DNA.

4.1.3.2 Experimentos “Alimento”

Aproximadamente 166 ninfas de 5º estágio, divididas em dois grupos, foram alimentadas com sangue (controle) ou sangue contendo Vancomicina (1 mg/ml) e Gentamicina (1 mg/ml). A cada três dias, foram realizadas coletas do intestino fragmentado (anterior, médio e ampola) de nove ninfas de cada grupo, que após a secção, os fragmentos iguais de três ninfas foram inseridos no mesmo tubo de polipropileno (triplicata biológica) em triplicata técnica.

4.2 DETERMINAÇÃO DA CONSTITUIÇÃO DO BACTERIOMA INTESTINAL DE TRIATOMÍNEOS

4.2.1 Extração de DNA do conteúdo intestinal

O DNA genômico das amostras de tecido intestinal de todos os experimentos foi extraído utilizando o *DNeasy PowerSoil kit* (QIAGEN), de acordo com as orientações do fabricante. As amostras extraídas foram submetidas a quantificação e avaliação de qualidade e pureza por espectrofotometria em um aparelho *Picodrop P100* (Picodrop) e armazenados a -20 °C. A fim de confirmar a presença de DNA microbiano (rRNA 16S), 2 µl de DNA genômico de todas as amostras foram submetidos a PCR, utilizando 10 pmol/µl dos iniciadores 341F (5'-CCT ACG GGR SGC AGC AG-3') e 806R (5'-GGA CTA CHV GGG TWT CTA AT-3') (WANG E QIAN, 2009), 200 µM de dNTP e 1 unidade de *GoTaq* DNA polimerase (Promega) em tampão fornecido pelo fabricante.

As reações foram realizadas em termociclador *Veriti 96-well Thermal Cycler* (Applied Biosystems), iniciando com etapa de desnaturação do DNA a 95 °C por cinco minutos, seguida de 35 ciclos com desnaturação a 95 °C por 45 segundos, ligação de iniciadores a 55 °C por 30 segundos e alongamento a 72 °C por 45 segundos. Os produtos das reações foram resolvidos em géis de poliacrilamida a 10% e corados por brometo de etídio (1 mg/ml). As amostras apresentando produto de amplificação de aproximadamente 465 pares de bases (pb) foram encaminhadas para o sequenciamento em larga escala.

4.2.2 Sequenciamento do rRNA 16S

O sequenciamento do rRNA 16S das amostras obtidas foi realizado na plataforma *MiSeq Sequencing System* (Illumina Inc.) pela empresa Neopropecta Microbiome Technologies, seguindo protocolo proprietário (Neopropecta Microbiome Technologies, Florianópolis, Brasil).

Para as amostras dos experimentos “Piloto I” e “Piloto II”, as bibliotecas foram produzidas, através de amplificação por PCR, utilizando 2 µl de DNA genômico das amostras para produção das bibliotecas, empregando os iniciadores 341F e 806R, específicos para região V3-V4 de rRNA 16S, e adicionando os adaptadores Illumina para o sequenciamento. Após a purificação das bibliotecas para remoção de componentes da PCR, as bibliotecas foram sequenciadas utilizando-se o kit de sequenciamento *MiSeq Reagent Kit V2*, com 300 ciclos, cobertura de 60.000 *reads* por amostra e abordagem de “*single-end reads*”.

Para as amostras do experimento “Alimento”, as bibliotecas foram produzidas, através de amplificação por PCR, utilizando volume igual (2 µl) de DNA genômico das amostras e os iniciadores 341F e 806R, específicos para região V3-V4 de rRNA 16S, adicionando os adaptadores Illumina para o sequenciamento. Após a purificação das bibliotecas para remoção de componentes da PCR, foi realizada uma normalização das bibliotecas por PCR quantitativa em tempo real (qPCR) utilizando iniciadores específicos para os adaptadores Illumina, senso (5'-AAT GAT ACG GCG ACC ACC GAG AT-3') e antissenso (5'-CAA GCA GAA GAC GGC ATA CGA-3'). As reações de qPCR para normalização das bibliotecas foram realizadas em placas de 96 poços em volume final de 10 µl contendo: 1µl do produto da biblioteca diluída 1:200 em água livre de nuclease, 10 pmol/µl dos iniciadores e o reagente *GoTaq qPCR Master Mix* (Promega), de acordo com as especificações do fabricante. As placas foram seladas com *MicroAmp Optical Adhesive Film* (Applied Biosystems) e analisadas em equipamento *ABI Prism 7900HT Sequence Detection System* (Applied Biosystems). A amplificação foi realizada com etapa inicial de desnaturação do DNA a 95 °C por cinco minutos, seguida de 35 ciclos com desnaturação a 95 °C por 30 segundos, ligação de iniciadores a 55 °C por 30 segundos e alongamento a 72 °C por 45 segundos. Após os ciclos de amplificação, a curva de dissociação foi obtida com ciclo único de 95 °C por 15 segundos, 60 °C por 15 segundos e, novamente 95 °C por 15 segundos. As reações foram feitas em triplicata técnica e um pool de bibliotecas de amostras controles foi empregado como normalizador para todas as placas. Finalmente, com o resultado obtido, uma diluição equimolar das bibliotecas foi realizada para o sequenciamento. Estas bibliotecas normalizadas foram sequenciadas utilizando-se o kit de sequenciamento *MiSeq Reagent Kit V2*, com 300 ciclos, cobertura de 60.000 *reads* por amostra e abordagem de “*single-end reads*”.

4.2.3 Análises Metagenômicas

Após a recepção das sequências da empresa Neoprosecta já com os adaptadores removidos, as mesmas foram submetidas a uma análise primária utilizando o programa FastQC (versão 0.11.5) para verificação da qualidade e confirmação da remoção dos adaptadores. As sequências das amostras de triatomíneos selvagens foram submetidas a uma abordagem *Denoising* para avaliação de qualidade, remoção de sequências de baixa qualidade e remoção de quimeras, utilizando três diferentes métodos de análise. Os métodos *Deblur* e *DADA2*, utilizando-se o programa Qiime™ 2 versão 2019.1 (BOLYEN et al., 2018) e o terceiro método de análise foi baseado em um *pipeline* no programa VSEARCH versão 2.7.1 (ROGNES et al., 2016), conforme detalhamos a seguir.

4.2.3.1 Método *Deblur*

Nesta análise, as sequências foram submetidas a um filtro inicial de qualidade com um escore PHRED ≥ 20 para avaliação da qualidade dos nucleotídeos das sequências, removendo bases ambíguas, sequências quiméricas e sequências com tamanho menor que 225 pb. Posteriormente, foi realizada um corte das amostras em 260 pb, mantendo as sequências únicas e identificando sequências de DNA eucarioto (DNA mitocondrial, cloroplastos e de Archaea) utilizando como parâmetro de referência 88% das Unidades Taxonômicas Operacionais (OTU) da base de dados GreenGenes (versão 13_8), para exclusão de DNA diferentes ao 16S rRNA. As variações de amplificação de sequência (ASV) foram identificadas e realizado o agrupamento das sequências em OTU, empregando uma similaridade de 97% com a sequência mais próxima. Finalmente, foi realizada uma remoção de OTUS com uma única sequências (*singletons*) e OTU com frequência inferior a duas repetições em uma mesma amostra.

4.2.3.2 Método *DADA2*

As sequências foram submetidas a uma avaliação da qualidade dos nucleotídeos das sequências aplicando um escore PHRED ≥ 20 , realizada a remoção de bases ambíguas e sequências quiméricas. Devido ao início de todas as sequências ter apresentado alta qualidade na análise inicial de FastQC, esta etapa foi ignorada (--p-trim-left 0) e a truncagem/corte das amostras foi determinada em 260 pb, assim como no método *Deblur*. As variações de amplificação de sequência (ASV) foram identificadas e obtidas as OTU, empregando uma

similaridade de 97% com a sequência mais próxima. Posteriormente, foi realizada a remoção de ASV raras (frequência menor que 0,1% da frequência média da amostra).

4.2.3.3 Método usando *VSEARCH*

As análises utilizando este pipeline foram realizadas submetendo as sequências a um filtro de qualidade utilizando software *Trimmomatic* versão 0.38 (BOLGER; LOHSE; USADEL, 2014), com um escore PHRED ≥ 20 para avaliação da qualidade dos nucleotídeos das sequências, removendo bases ambíguas, sequências quiméricas e sequências com tamanho menor que 225 pb. Posteriormente, sequências não bacterianas e sequências quiméricas foram removidas empregando banco de dados do *Ribosomal Database Project* (RDP) (COLE et al., 2014). As OTU foram identificadas utilizando Software *Qiime*, empregando uma similaridade de 97% com a sequência mais próxima, removendo OTU com frequência menor que 10 sequências.

4.2.4 Identificação das OTU e análises de diversidade

Após a obtenção de OTU das amostras utilizando qualquer uma das metodologias anteriormente detalhadas, a identificação destas foi obtida classificando as sequências com correspondência de 97% com os bancos de dados SILVA versão 132, utilizando o *Qiime 2* ou o *VSEARCH*, de acordo com a metodologia empregada. Os gráficos de abundância relativa, curvas de rarefação e análises de alfa e de beta diversidade foram realizadas utilizando o R, versão 3.5.3 (<https://www.R-project.org/>).

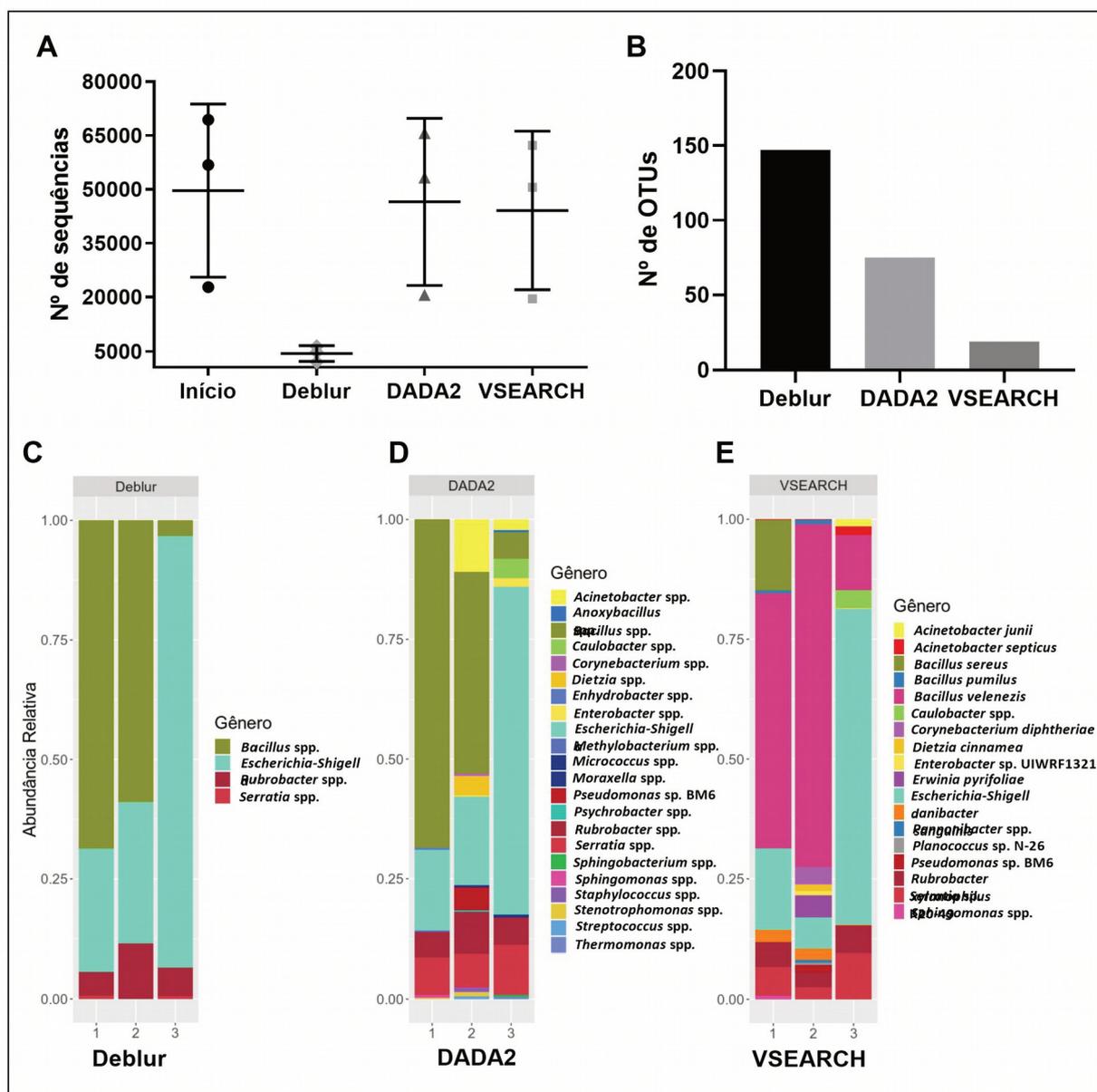
5 RESULTADOS

5.1 ANÁLISE COMPARATIVA DE MÉTODOS DE ANÁLISES DE SEQUÊNCIAS METAGENÔMICAS

A análise comparativa dos diferentes métodos de análise de sequências metagenômicas visou determinar o método mais adequado para as amostras deste estudo e foi realizada submetendo o resultado do sequenciamento do rRNA 16S de intestino inteiro de três espécimes de *T. infestans* selvagens, coletados na região de Cochabamba (Bolívia), aos três diferentes métodos descritos nos tópicos anteriores (*Deblur*, *DADA2* e pipeline utilizando o programa *VSEARCH*).

O número total de sequências obtidas a partir do sequenciamento do gene rRNA 16S das amostras de triatomíneos selvagens ($49.628,3 \pm 19.700,7$) foi reduzido durante a análise pelo método *Deblur* ($4.326,0 \pm 1.842,4$) (Figura 5A). Por outro lado, as análises utilizando o método *DADA2* ($46.487,0 \pm 19.027,0$) e *VSEARCH* ($44.076,6 \pm 18.029,6$) não apresentaram perdas de sequências. No entanto, o número de OTU identificadas utilizando o método *Deblur* (147) foi maior que utilizando os métodos *DADA2* e *VSEARCH* (75 e 19, respectivamente) (Figura 5B).

Figura 5: O método DADA2 é capaz de identificar gêneros bacterianos menos abundantes



Legenda: Comparação entre os métodos de análises metagenômicas utilizando Qiime (*Deblur* e *DADA2*) e *VSEARCH*, utilizando sequências de bacterioma intestinal de *T. infestans* selvagens (n=3). **(A)** Número de sequências antes e após as análises com os diferentes métodos. **(B)** Número de OTU identificadas. Abundância relativa de gêneros bacterianos identificados pelas OTU obtidas por cada um dos métodos utilizados: **(C)** *Deblur*; **(D)** *DADA2*; **(E)** *VSEARCH*.

A identificação das OTU obtidas pelo método *Deblur*, utilizando o banco de dados Silva identificou a presença de Proteobactérias (gêneros *Serratia* e *Escherichia-Shiguel*), Firmicutis (gênero *Bacillus*) e Actinobacteria (gênero *Rubrobacter*) (Figura 5C). Além destes gêneros, a análise utilizando o método *DADA2* identificou a presença de Proteobactérias (gêneros *Acinetobacter*, *Caulobacter*, *Enhydrobacter*, *Enterobacter*, *Methylobacterium*, *Moraxella*, *Pseudomonas*, *Psychrobacter*, *Sphingomonas*, *Stenotrophomonas* e

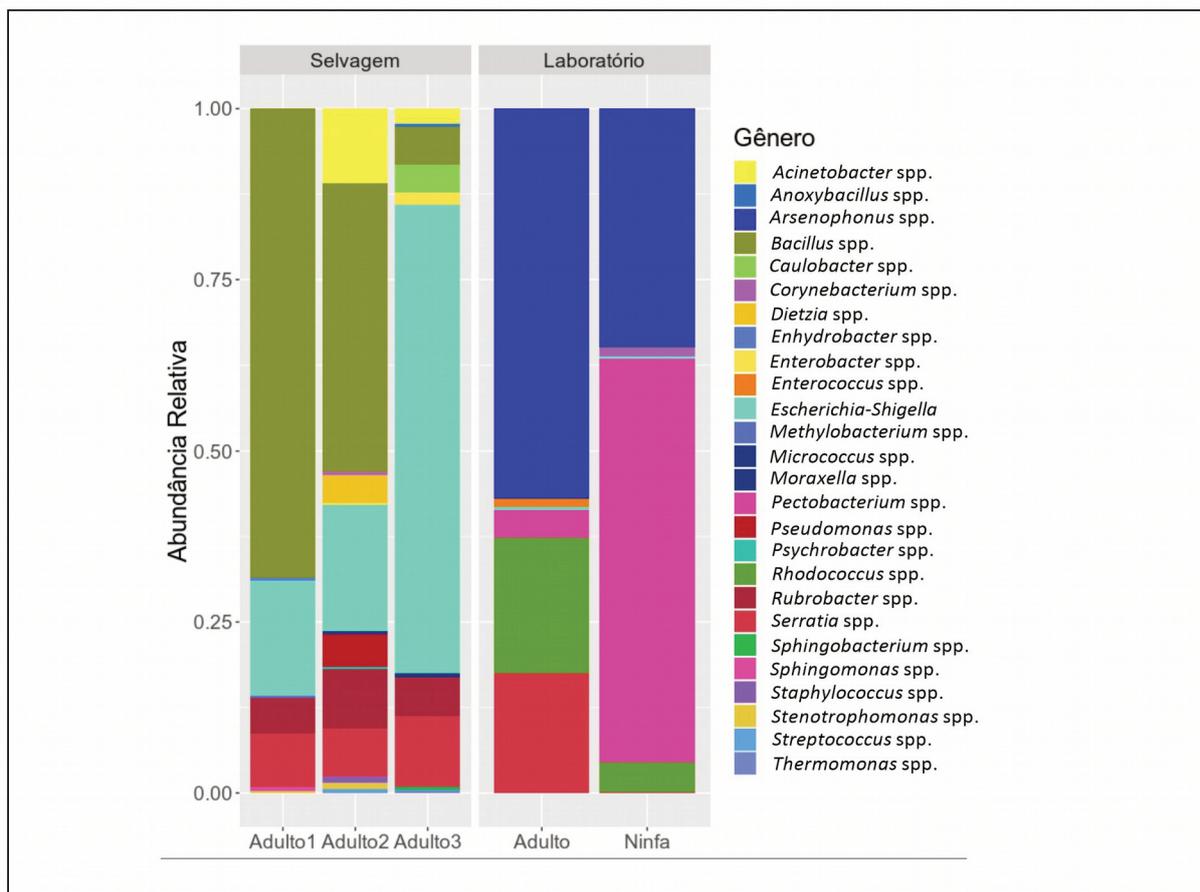
Thermomonas), Firmicutes (gêneros *Anoxybacillus*, *Staphylococcus* e *Streptococcus*), Actinobacterias (gêneros *Corynebacterium*, *Dietzia*, e *Micrococcus*) e Bacteroidetes (*Sphingobacterium*) (Figura 5D). O método utilizando o VSEARCH identificou a presença de Proteobactérias (gêneros *Acinetobacter*, *Caulobacter*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Escherichia-Shigella*, *Pannonibacter*, *Pseudomonas*, *Serratia* e *Sphingomonas*), Firmicutes (gêneros *Bacillus*, *Planococcus*), Actinobacterias (gêneros *Corynebacterium*, *Dietzia*, *Janibacter* e *Rubrobacter*) (Figura 5E).

Os gêneros *Anoxybacillus*, *Enhydrobacter*, *Methylobacterium*, *Micrococcus*, *Moraxella*, *Psychrobacter*, *Sphingobacterium*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*. e *Thermomonas* foram identificados exclusivamente pelo método DADA2. O método VSEARCH identificou exclusivamente *Erwinia* spp., *Pannonibacter* spp., *Planococcus* spp. e *Janibacter* spp.

5.2 COMPARAÇÃO DA DIVERSIDADE DO BACTERIOMA INTESTINAL DE *T. infestans* SELVAGENS E DE COLÔNIAS LABORATORIAIS

A diferença de diversidade e a composição do bacterioma intestinal de triatomíneos selvagens e de triatomíneos mantidos em nossa colônia laboratorial foi avaliada comparando o sequenciamento da região V3-V4 do gene rRNA 16S de três *T. infestans* (adultos) selvagens com o sequenciamento de *T. infestans* (pool de três adultos e pool de três ninfas) da colônia mantida em nosso laboratório, sendo as amostras dos insetos de laboratório obtidas 10 dias após a alimentação com sangue humano. O número de sequências obtidas pelo sequenciamento de intestino de *T. infestans* selvagens ($46.487,0 \pm 23.303,2$) foi maior do que o de *T. infestans* de colônias ($58.740 \pm 8.387,7$). Entretanto, o número de OTUs em *T. infestans* de selvagens (75) foi próximo ao de colônias laboratoriais (70).

Figura 6: O bacterioma intestinal de *Triatoma infestans* selvagens é diferente de *Triatoma infestans* mantido em colônia laboratorial



Legenda: Abundância relativa de gêneros identificados a partir das OTU idnetificadas no bacterioma de *Triatoma infestans* selvagens (n=3) com os insetos adultos (*pool de 3*) e ninfas (*pool de 3*) de colônia laboratorial após 10 da alimentação..

A identificação de OTU das amostras do conjunto de *T. infestans* selvagens foi constituído por *Acinetobacter* spp., *Anoxybacillus* spp., *Bacillus* spp., *Caulobacter* spp., *Corynebacterium* spp., *Dietzia* spp., *Enhydrobacter* spp., *Enterobacter* spp., *Escherichia-Shigella* spp., *Methylobacterium* spp., *Micrococcus* spp., *Moraxella* spp., *Pseudomonas* spp., *Psychrobacter* spp., *Rubrobacter* spp., *Serratia* spp., *Sphingobacterium* spp., *Sphingomonas* spp., *Sthaphylococcus* spp., *Stenotrophomonas* spp., *Streptococcus* spp. e *Thermomonas* spp. (Figura 6C, Selvagem). Embora a maioria destes gêneros bacterianos estejam presentes em todas as amostras analisadas, a distribuição foi bastante diversa nas diferentes amostras, sendo que duas delas apresentam predomínio do Filo Proteobacteria e apenas uma foi predominantemente constituída por Firmicuitis. Por outro lado, a identificação de OTU das amostras do conjunto de triatomíneos de laboratório identificou a presença de *Arsenophonus* spp., *Corynebacterium* spp., *Enterobacter* spp., *Enterococcus* spp., *Escherichia-Shigella* spp.,

Pectobacterium spp., *Rhodococcus* spp. e *Serratia* spp. (Figura 6C, Laboratório). Ou seja, apenas alguns gêneros em comum foram identificados nos dois grupos: *Corynebacterium* spp., *Enterobacter* spp., *Escherichia-Shigella* spp. e *Serratia* spp.

Ademais, a abundância relativa identificada em *T. infestans* adultos e ninfas de 5º estágio foram diferentes entre si. Embora tenham sido identificados os gêneros *Arsenophonus*, *Enterococcus*, *Pectobacterium* e *Rhodococcus* em ambos os estágios de vida, no bacterioma intestinal de ninfas foi identificado, além dos gêneros anteriormente mencionados, *Corynebacterium* spp. e no bacterioma de adultos foram identificados também *Moraxella* spp. e *Serratia* spp. Ademais, a abundância relativa de *Arsenophonus* spp., *Enterococcus* spp. e *Rhodococcus* spp. foram diferentes entre os distintos estágios de vida avaliados (Figura 6C, Laboratório).

5.3 DISBIOSE INTESTINAL PROMOVIDA PELA ALIMENTAÇÃO COM COQUETEL DE ANTIBIÓTICOS

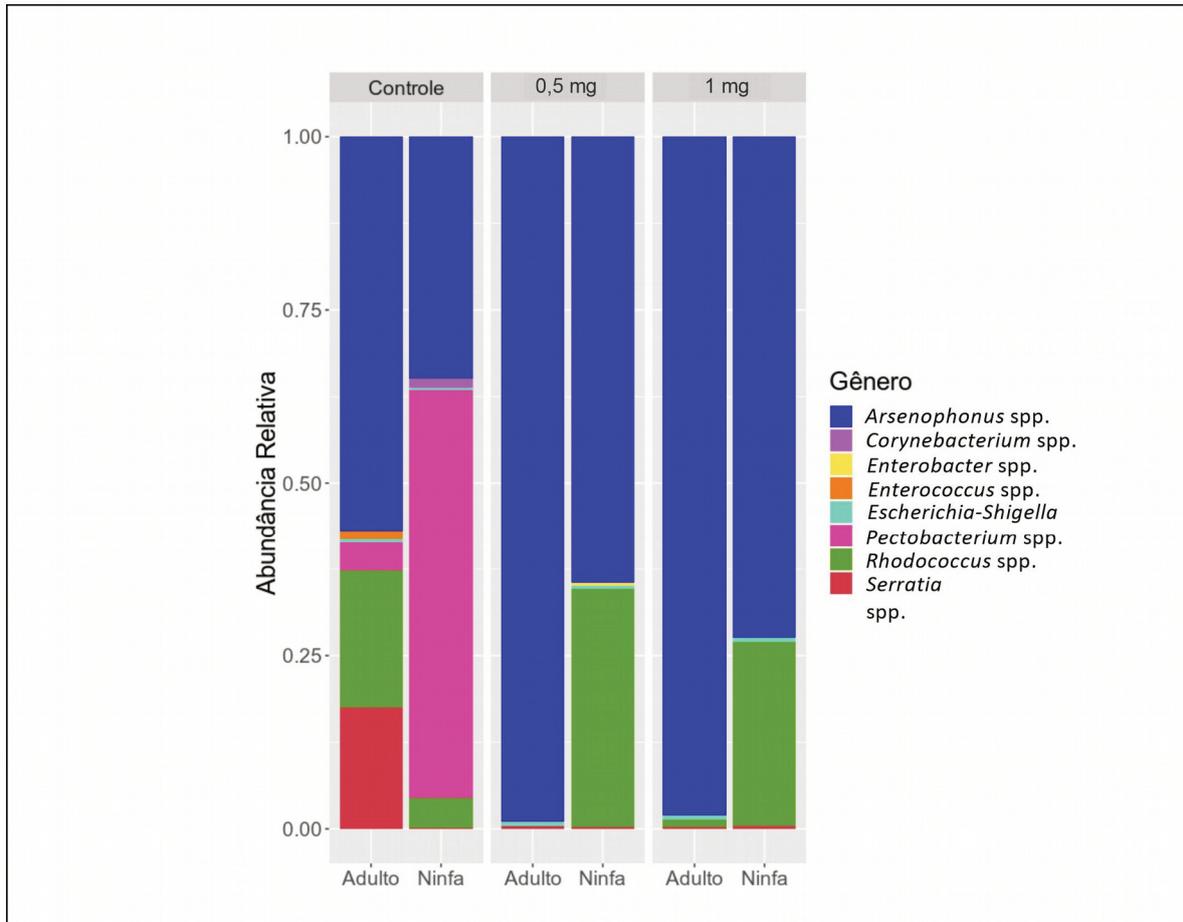
Duas estratégias diferentes foram empregadas a fim de promover alterações no bacterioma intestinal de *T. infestans*, sendo ambas baseadas na ingestão de antibióticos associados ao repasto sanguíneo.

5.3.1 Disbiose intestinal promovida por Vancomicina

A comunidade bacteriana do intestino inteiro de triatomíneos adultos e ninfas de 5º estágio, alimentadas com Vancomicina a 0,5 mg/ml (n= 1 e 2, respectivamente) ou Vancomicina a 1 mg/ml (n = 1 e 2, respectivamente) foi comparada à de triatomíneos controle (3 adultos e 3 ninfas) 10 dias após o repasto sanguíneo.

A identificação de OTU dos triatomíneos adultos e ninfas controles, 10 dias após a alimentação, identificou uma composição bacteriana constituída por *Arsenophonus* spp., *Corynebacterium* spp., *Enterobacter* spp., *Enterococcus* spp., *Escherichia-Shigella* spp., *Pectobacterium* spp., *Rhodococcus* spp. e *Serratia* spp. (Figura 7). A abundância relativa destes gêneros variou entre os diferentes estágios de desenvolvimento, com exceção de *Corynebacterium* spp. que foi identificado apenas em ninfas e *Enterococcus* spp. e *Serratia* spp. que foram identificados somente em adultos.

Figura 7: Vancomicina promove uma disbiose qualitativa no bacterioma intestinal de *Triatoma infestans* favorecendo o predomínio de *Arsenophonus* spp. e *Rhodococcus* spp.



Legenda: Composição do bacterioma após sequenciamento do intestino inteiro de ninfas (n=3) e de adultos (n=3) de *T. infestans*, 10 dias após alimentação artificial com sangue (controle) ou de ninfas (n=2) e de adultos (n=1) alimentadas com sangue humano inativado suplementado com Vancomicina a 0,5 mg/ml ou 1 mg/ml.

A alimentação dos triatomíneos adultos com Vancomicina a 0,5 mg/ml ou 1 mg/ml identificou uma abundância relativa predominante de *Arsenophonus* spp. (Figura 7). Entretanto as ninfas alimentadas com as mesmas concentrações de Vancomicina apresentaram uma abundância relativa constituída em sua maioria por *Arsenophonus* spp. e *Rhodococcus* spp. (Figura 7). Foram detectadas poucas seqüências de *Enterobacter* spp., *Escherichia-Shigella* spp. e *Serratia* spp. nos triatomíneos alimentados com Vancomicina em ambos os estágios de desenvolvimento (adulto e ninfa) dos triatomíneos. Entretanto, o número de seqüências não foi diferente nos grupos analisados (Quadro 3).

Quadro 3: Número de sequências e OTU obtidas pelo sequenciamento do intestino inteiro de ninfas e de adultos de *T. infestans*, 10 dias após alimentação artificial.

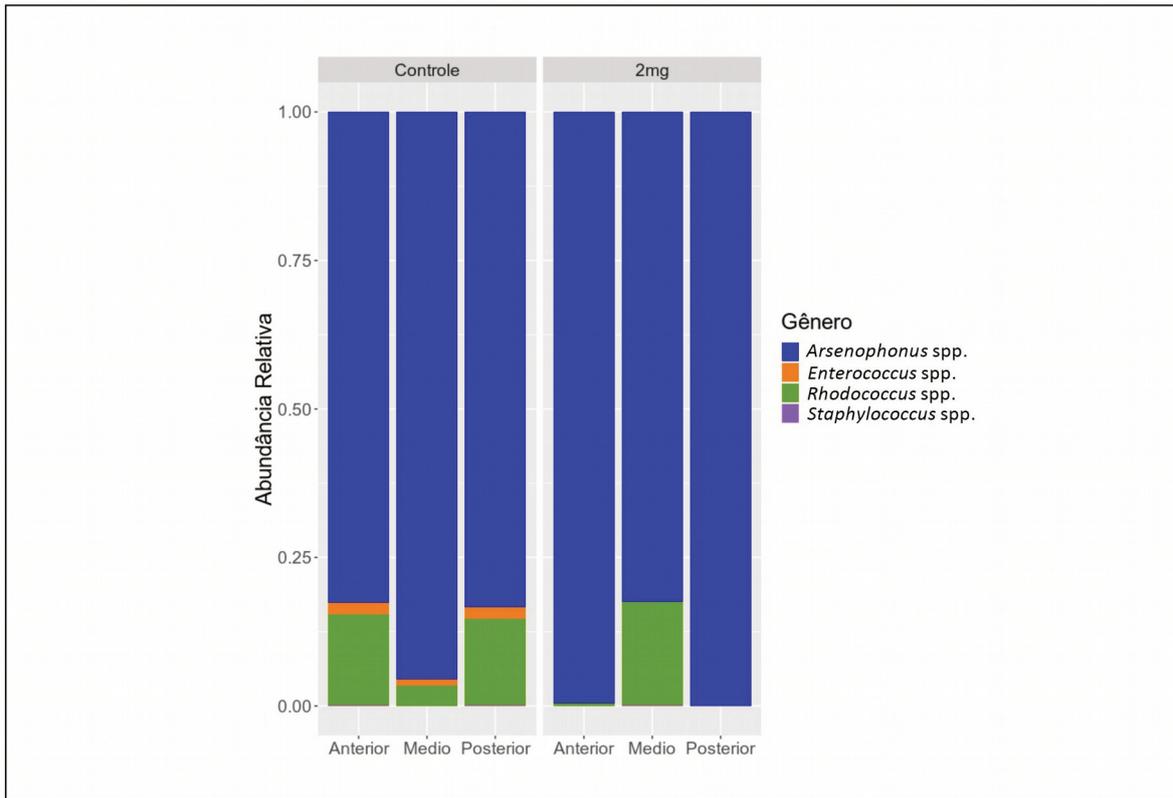
Estágio	Intestino	Tratamento	N de Sequências	N de OTU
Adulto	Inteiro	Controle	57012	10
Ninfa	Inteiro	Controle	48732	9
Adulto	Inteiro	Vanco 0,5 mg/ml	58311	4
Ninfa	Inteiro	Vanco 0,5 mg/ml	97709	10
Adulto	Inteiro	Vanco 1 mg/ml	46521	5
Ninfa	Inteiro	Vanco 1 mg/ml	43409	5
Ninfa	Anterior	Controle	46774	7
Ninfa	Médio	Controle	62814	4
Ninfa	Posterior	Controle	41762	6
Ninfa	Anterior	Vanco+Genta 2 mg/ml	2780	2
Ninfa	Médio	Vanco+Genta 2 mg/ml	45653	6
Ninfa	Posterior	Vanco+Genta 2 mg/ml	303	1

Legenda: Vanco = Vancomicina e Genta = Gentamicina

5.3.2 Disbiose intestinal de *T. infestans* promovida por Vancomicina associada a Gentamicina

A Gentamicina foi associada à Vancomicina para a alimentação de ninfas a fim de potencializar a disbiose promovida pela Vancomicina. O impacto da associação destes antibióticos no bacterioma presente nas três diferentes porções intestinais (anterior, médio e posterior) foi avaliado em um *pool* de ninfas (n=3) alimentadas com Vancomicina (1 mg/ml) + Gentamicina (1 mg/ml) comparando com um *pool* de ninfas (n=3) controles, 10 dias após o repasto sanguíneo (Figura 8).

Figura 8: A associação de Vancomicina e Gentamicina promove disbiose qualitativa no bacterioma intestinal de *Triatoma infestans*



Legenda: Composição do bacterioma após sequenciamento de porções intestinais (anterior, médio e posterior) de ninfas de *T. infestans* (pool de 3), 10 dias após alimentação artificial com sangue (controle) ou sangue contendo Vancomicina a 1 mg/ml e Gentamicina a 1 mg/ml (2mg).

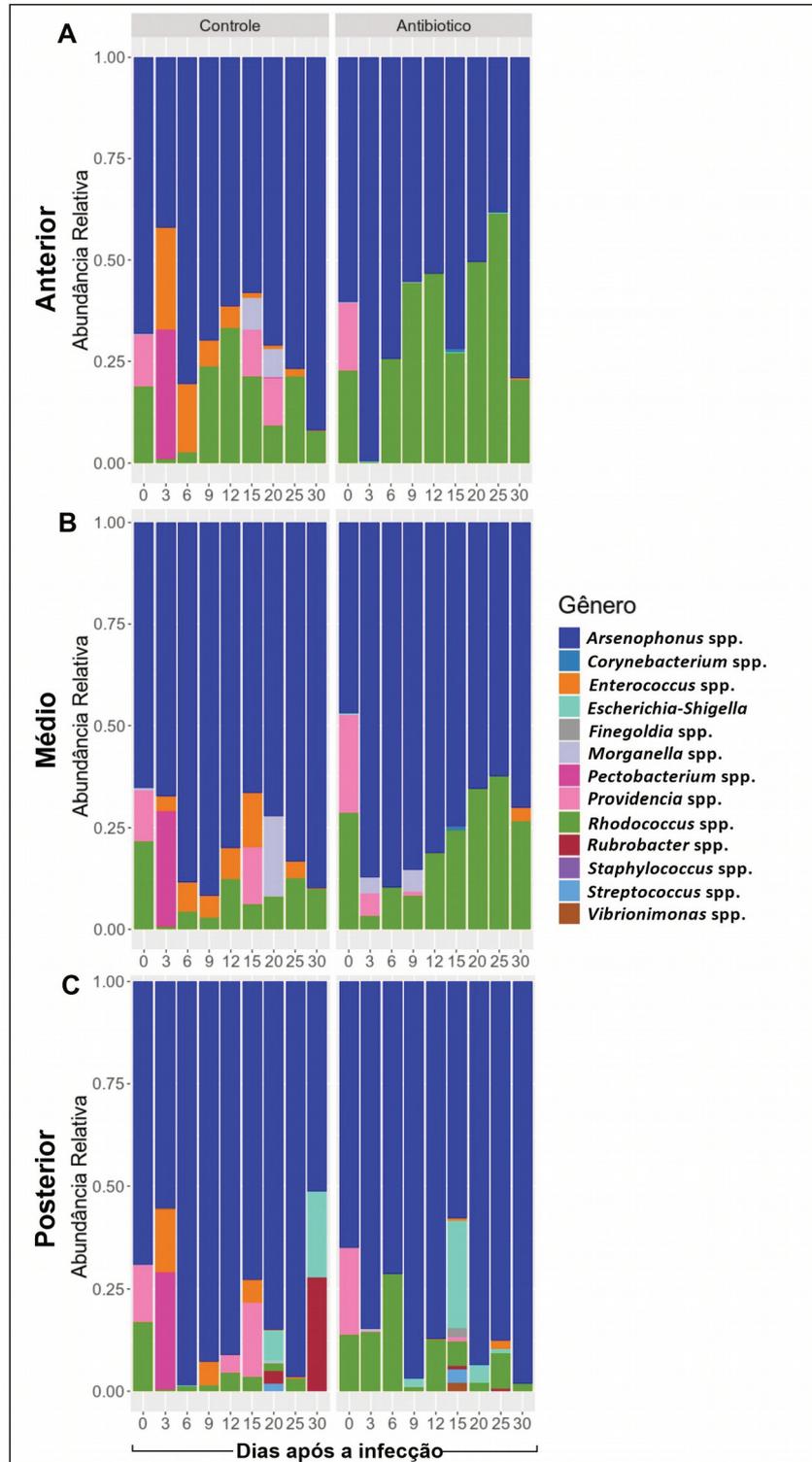
A identificação de OTU das três diferentes porções intestinais de ninfas controle (n=3) identificou uma composição bacteriana constituída por *Arsenophonus* spp., *Enterococcus* spp., *Rhodococcus* spp. e *Staphylococcus* spp., com abundância relativa destas espécies similar nas três porções intestinais avaliadas (Figura 8, Controle). Por outro lado, embora a alimentação com o coquetel de antibióticos tenha promovido uma diminuição significativa da abundância relativa de *Enterococcus* spp. e *Rhodococcus* spp. nas porções anterior e posterior do intestino em comparação com as ninfas controle, o mesmo fenômeno não foi observado na porção média do intestino (Figura 8, 2 mg).

5.4 COMPOSIÇÃO DO BACTERIOMA INTESTINAL DE *Triatoma infestans* APÓS O REPASTO SANGUÍNEO

A variação da composição do bacterioma intestinal de ninfas (n=162) de *T. infestans* foi acompanhada durante o período de 30 dias pós repasto sanguíneo com sangue humano (n=81) ou com sangue humano suplementado com Vancomicina (1 mg/ml) e Gentamicina (0,5 mg/ml) (n=81), coletadas em intervalos de 3 ou 5 dias para realização de sequenciamento do gene de rRNA 16S. Todos os resultados apresentados são referentes a triplicatas técnicas de *pool* de três ninfas em cada triplicata (n=9 ninfas por ponto experimental). A abundância relativa das triplicatas técnicas, em cada ponto experimental, está representada na figura 9 e cada uma das triplicatas biológicas está disponível no anexo 1.

Durante o período de jejum (dia 0), o bacterioma intestinal de ninfas dos dois grupos experimentais (controle e antibiótico) foi constituída basicamente pelos gêneros *Arsenophonus*, *Rhodococcus* e *Providencia* (Figura 9A, B e C). Apenas uma pequena quantidade de *Morganella* spp. foi observada na porção do intestino médio (Figura 9B).

Figura 9: Vancomicina e Gentamicina aumenta *Rhodococcus* spp. no intestino de ninfas de *Triatoma infestans* de colônia após alimentação



Legenda: Acompanhamento da composição do bacterioma intestinal de ninfas de *T. infestans* pelo sequenciamento de porções intestinais (anterior, médio e posterior) nos 30 dias seguintes à alimentação artificial com sangue (controle) (n=81) ou sangue contendo Vancomicina (1 mg/ml) e Gentamicina (0,5 mg/ml) (n=81). Abundância relativa de OTU identificadas nas porções anterior (A), médio (B) e posterior (C). Os dados representam a soma de três triplicatas técnicas de triplicatas biológicas, n=9 ninfas por ponto experimental.

5.4.1 Composição do bacterioma intestinal de ninfas de *Triatoma infestans* de colônia laboratorial após o repasto sanguíneo

A identificação de OTU presentes no bacterioma intestinal de ninfas controles demonstrou uma composição predominante de *Arsenophonus* spp. e *Rhodococcus* spp. em todas as diferentes porções intestinais e durante todo o período avaliado (Figura 9, controle). Entretanto, os gêneros *Enterococcus*, *Pectobacterium*, *Providencia*. e *Morganella* também foram observados nas porções anterior e médio em alguns dos pontos avaliados. Apenas a porção posterior apresentou uma abundância relativa mais diversa do que as demais porções a partir do 20º dia após o repasto sanguíneo, com a presença de OTU correspondentes aos gêneros *Escherichia-Shigella*, *Rubrobacter* e *Streptococcus* (Figura 9C, controle).

O bacterioma intestinal das ninfas controle apresentou uma composição diferente entre a primeira e a segunda quinzena após o repasto sanguíneo, nas três porções intestinais avaliadas. Na porção anterior, no início da digestão, foi observada uma abundância relativa de *Enterococcus* spp. que diminuiu de acordo com a passagem dos dias (Figura 9A, controle), e foi sucedida pelo aumento na abundância relativa de *Rhodococcus* spp. e pela presença de *Providencia* spp. e *Morganella* spp. (Figura 9A, controle). Em todas as porções intestinais avaliada foi identificado o gênero *Pectobacterium* em apenas uma das triplicatas no terceiro dia após a alimentação (Anexo 1).

Na porção medial do intestino de ninfas do grupo controle foi observada, em todos os pontos experimentais, uma abundância relativa de *Rhodococcus* spp. inferior à observada na porção anterior (Figura 9B, controle). Ademais, semelhante a porção anterior, a abundância relativa de *Enterococcus* spp. manteve-se evidente apenas durante a primeira quinzena após a alimentação (Figura 9A e B, controle). Nos 15º e 20º dia após a alimentação foi observada uma abundância relativa proporcional de *Providencia* spp. e *Morganella* spp., respectivamente (Figura 9B, controle).

No intestino posterior de ninfas controle a abundância relativa de *Rhodococcus* spp. foi menor que nas porções anterior e médio (Figura 9C, controle). A sucessão dos gêneros *Enterococcus* e *Providencia* apresentaram comportamento similar aos apresentados nas porções anterior e posterior. Entretanto, após 20 dias foi observada uma composição bacteriana diferente dos primeiros dias seguintes ao repasto sanguíneo (Figura 9C, controle).

5.4.2 Disbiose promovida por Vancomicina e Gentamicina no intestino de ninfas de *T. infestans* de colônia laboratorial

A alimentação das ninfas com Vancomicina e Gentamicina também apresentou predominância de *Arsenophonus* spp. e *Rhodococcus* spp em todas as diferentes porções intestinais e durante todo o período avaliado (Figura 9, antibiótico). Entretanto, outros gêneros bacterianos, tais como *Enterococcus*, *Providencia*, *Morganella*, *Escherichia-Shigella*, *Rubrobacter*, *Streptococcus*, e *Vibrionimonas*, estiveram presentes em alguns pontos avaliados (Figura 9, antibiótico).

Nas porções anterior *Arsenophonus* spp. e *Rhodococcus* spp. foram os gêneros predominantes em todos os pontos avaliados e, o aumento gradual da abundância relativa de *Rhodococcus* spp., com a passagem do tempo pós repasto sanguíneo, foi bastante evidente (Figura 9A, antibiótico).

A porção medial do intestino de ninfas alimentadas com antibióticos apresentou a presença de *Pectobacterium* spp. e *Morganella* spp. nos primeiros 10 dias pós alimentação (Figura 9B, antibiótico), entretanto, o aumento gradual da abundância relativa de *Rhodococcus* spp. com a passagem do tempo foi bastante evidente (Figura 9B, antibiótico). Na porção posterior foi identificado um aumento da abundância relativa de *Rhodococcus* spp. na primeira semana após a alimentação, com um aumento na diversidade da comunidade bacteriana a partir do 15º dia após a ingestão do coquetel de antibióticos (Figura 9C, antibiótico). É importante ressaltar que a redução no número de sequências observado pode ser subestimada tendo em vista que a presença do DNA de microrganismos presentes não necessariamente representa a presença de bactérias vivas.

6 DISCUSSÃO

Vários países da América-latina apresentam-se como regiões de alta prevalência de pessoas infectadas pelo *T. cruzi*, possivelmente devido as altas taxas de infestação por insetos vetores (triatomíneos) nestes locais. A Bolívia representa uma região com alta incidência de infecção humana por via vetorial, especificamente a região do Cochabamba apresenta altas taxas de infestação doméstica por triatomíneos e, portanto, esta região constitui uma importante fonte para a realização de estudos biológicos objetivando compreender a dinâmica e os fatores que contribuem para a infecção pelo *T. cruzi*, que por sua vez, podem favorecer a identificação de estratégias que diminuam a incidência de reservatórios do parasito reduzindo as taxas de infecção vetorial ou mesmo auxiliar no desenvolvimento de ferramentas de profilaxia eficazes.

6.1.1 Métodos de análises metagenômicas

Diversos métodos são empregados para análises de sequenciamento de fragmentos do gene rRNA 16S, obtidos de amostras coletadas em diferentes fontes (THOMAS; GILBERT; MEYER, 2012). A maioria dos estudos publicados até o momento, tradicionalmente tem utilizado em seus *pipelines* de análises, métodos baseados no agrupamento de sequências com similaridade de 97% para identificação de OTUs. Entretanto, este tipo de abordagem pode incorrer no descarte de sequências com menor abundância nas amostras, e portanto, comprometer os resultados obtidos e levar à inferências errôneas (NEARING et al., 2018). Os métodos de análise *Denoising* foram desenvolvidos como ferramentas para identificar e remover “ruídos” antes da etapa de agrupamentos das sequências e, assim, minimizar as possíveis perdas de sequências (CALLAHAN et al., 2016).

O sequenciamento do bacterioma intestinal de *T. infestans* selvagens foi submetido a comparação utilizando dois métodos empregando a estratégia *Denoising* (*Deblur* e *DADA2*) e o *pipeline* utilizando o programa *VSEARCH*, este sem a realização de *Denoising*, a fim de determinar qual delas seria mais indicado para a realização das análises dos sequenciamentos das amostras deste estudo.

A redução do número de sequências obtidas pela análise empregando o método *Deblur*, associado a identificação de poucos gêneros de bactérias em amostras de *T. infestans* selvagens (Figura 5A), foi decisivo para a exclusão deste método para as análises deste

estudo. Portanto, devido o número de sequências semelhante entre os métodos *DADA2* e *VSEARCH*, e a identificação de gêneros ter sido maior utilizando o método *DADA2* que o *VSEARCH* (Figura 5B, C e D), foi determinado o uso de *DADA2* para a realização das análises metagenômicas destes estudo.

6.1.2 Composição e diversidade do bacterioma intestinal de triatomíneos selvagens e de colônias laboratoriais

O ambiente intestinal de triatomíneos constitui um ambiente de contínua interação entre microrganismos, no qual, bactérias e parasitos inter-relacionam-se compartilhando nutrientes e sendo exposto a mecanismos de seleção natural. Algumas evidências têm demonstrado que o bacterioma intestinal é capaz de interferir com o estabelecimento da infecção de triatomíneos pelo *T. cruzi* e, ao mesmo tempo, o parasito é capaz de modular esta comunidade bacteriana e estabelecer a infecção (DÍAZ et al., 2016; VIEIRA et al., 2014, 2015). Estudos avaliando a dinâmica da interação parasito-microbiota-vetor podem ser importantes para a compreensão dos mecanismos de transmissão da DC aos hospedeiros mamíferos e fornecer evidências para esclarecer porque em regiões com infestação por insetos vetores exacerbada a incidência de pessoas infectadas, ainda que elevada, não seja proporcional (MONTEON et al., 2016).

Ao longo da história, diferentes tecnologias foram empregadas objetivando caracterizar o bacterioma intestinal de triatomíneos. Embora os métodos baseados em cultivo de bactérias tenham sido importantes para fornecer as primeiras evidências da relação microbiota-vetor-parasito (EICHLER; SCHAUB, 2002; SOARES et al., 2015), o advento dos métodos de análise independentes de cultivo, como o sequenciamento por NGS de metagenomas, foram decisivos para permitir a avaliação mais detalhada destas comunidades e fornecer evidências mais robustas sobre sua composição e sua dinâmica durante a infecção pelo *T. cruzi* (DA MOTA et al., 2012; DÍAZ et al., 2016; MONTOYA-PORRAS et al., 2018; VIEIRA et al., 2015).

Conforme o esperado, o sequenciamento do gene rRNA 16S a partir de amostras do intestino de triatomíneos selvagens da região de Cochabamba na Bolívia demonstrou um bacterioma intestinal mais diverso que o de *T. infestans* mantidos em laboratório (Figura 6). Este fenômeno possui relação direta com as diferentes fontes de alimentação disponíveis para os triatomíneos no ambiente silvestre onde se alimentam do sangue de diferentes espécies de

mamíferos domésticos e selvagens e realizar coprofagia ou canibalismo (JURBERG & GALVAO, 2006). Além disso, existem relatos demonstrando que a diversidade do bacterioma intestinal de insetos em geral, é menor quando comparado a outros organismos (ENGEL; MORAN, 2013).

Embora triatomíneos de colônias laboratoriais tenham sua diversidade bacteriana menor que triatomíneos selvagens e não seja possível inferir a microbiota de *T. infestans* selvagens através da amostragem de *T. infestans* mantidos em laboratório. Diversos estudos têm demonstrado que a utilização de vetores de colônias são importantes devido ao fato de permitirem a manipulação do bacterioma intestinal dos vetores e conseqüentemente fornecerem evidências de possíveis fatores e mecanismos envolvidos na infecção de mamíferos pelo *T. cruzi* (AZAMBUJA; GARCIA; RATCLIFFE, 2005; CASTRO et al., 2012a; WEISS; AKSOY, 2011). O bacterioma intestinal de indivíduos originados na colônia de *T. infestans* do Laboratório de Protozoologia da UFSC é constituído basicamente por *Arsenophonus* spp., *Rhodococcus* spp., *Pectobacteria* spp., e *Serratia* spp., além de outros gêneros menos abundantes. Portanto, este bacterioma é semelhante ao de *Panstrongylus megistus*, *Triatoma brasiliensis*, *Triatoma juazeirensis*, *Triatoma sherlocki* e *R. prolixus* de diferentes colônias laboratoriais relatados na literatura. Reforçando a hipótese existente de que estes microrganismos constituem o cerne do rol de simbiontes intestinais cruciais ao desenvolvimento destes triatomíneos, sendo detectados em colônias mantidas em colônias.

Outra característica demonstrada pelo presente estudo é que embora a predominância dos gêneros *Arsenophonus* spp. e *Rhodococcus* spp. aparentemente seja independente do estágio de vida de *T. infestans*, as ninfas de 5º estágio apresentam um bacterioma menos diverso que os insetos adultos (Figura 6 e 7). Ao passo que seja tentador apontar que o isolamento e o confinamento destes triatomíneos em condições laboratoriais sejam efetores de tal seleção, acreditamos que estudos mais elaborados com o emprego de um maior número de indivíduos sejam necessários a fim de confirmar estas evidências preliminares. Vale ressaltar ainda, a existência de poucos relatos na literatura demonstrando a diferença entre o bacterioma de insetos adultos comparando os diferentes estágios de desenvolvimento (RODRÍGUEZ-RUANO et al., 2018). Portanto, esta característica pode ser melhor explorada em estudos futuros, tendo em vista a existência de relatos demonstrando este fenômeno em outros organismos.

É importante ressaltar ainda, a inexistência do gênero *Nocardia* observado no bacterioma intestinal de *T. infestans* selvagens e de colônias laboratoriais deste estudo. Esta evidência também foi observada por outros estudos utilizando sequenciamento de larga escala (DA MOTA et al., 2012; DÍAZ et al., 2016; VIEIRA et al., 2015). Estes resultados contradizem os estudos realizados utilizando métodos dependentes de cultivo, os quais demonstram a importância de bactérias deste gênero para o desenvolvimento de triatomíneos (Wigglesworth, 1936; Goodchild, 1955; Erikson, 1935). Entretanto, é difícil afirmar que *Nocardia* spp. não constitui um componente do bacterioma intestinal de triatomíneos tendo em vista que alguns trabalhos utilizando sequenciamento identificaram a presença deste gênero bacteriano em insetos selvagens (MONTROYA-PORRAS et al., 2018; OLIVEIRA et al., 2018).

6.1.3 Sucessão ecológica no bacterioma intestinal de ninfas de *T. infestans* após o repasto sanguíneo

O sequenciamento do gene rRNA 16S do bacterioma de diferentes porções intestinais de *T. infestans* de colônia não demonstrou diferença relevantes entre as porções anterior e média (Figuras 8 e 9), entretanto, a composição apresentada pelo bacterioma intestinal da porção posterior, de ninfas de 5º estágio, aparentemente é maior na segunda quinzena após a alimentação (Figura 9). Diversas evidências relatadas podem explicar estes achados. Alguns estudos têm demonstrado a ocorrência de um aumento de bactérias na porção anterior do trato intestinal de triatomíneos logo após o repasto sanguíneo (EICHLER; SCHAUB, 2002; HILL; CAMPBELL; PETRIE, 1976; WIGGLESWORTH, 1931). Estas bactérias ingeridas no momento da picada do vetor encontram ambientes favoráveis para seu crescimento, sendo controladas pela explosão de radicais livres, como produto da degradação de hemoglobina, e outros componentes sanguíneos (DAVIES, 1989; VAN DER ZEE; BARR; MASON, 1996). Além disso fatores associados a imunidade dos triatomíneos, como a produção de peptídeos antimicrobianos, também contribuem para o controle desse crescimento bacteriano (DÍAZ et al., 2016).

Entretanto, existem poucos relatos na literatura avaliando diferentes porções intestinais de triatomíneos, e todos eles utilizaram formas epimastigotas para a realização da infecção dos triatomíneos (EICHLER; SCHAUB, 2002; HILL; CAMPBELL; PETRIE, 1976) o que dificulta a inferência concreta de mecanismos envolvidos no controle do bacterioma intestinal na porção medial destes insetos. Porém, os mesmos fatores envolvidos no controle bacteriano

na porção anterior também estão presentes no intestino médio, embora em menor intensidade tendo em vista que o alimento chega a esta porção em processo de digestão mais avançado (DÍAZ et al., 2016). Além disso, muitos dos componentes solúveis produzidos na porção anterior são drenados pelos túbulos de Malpighi e acumulados na ampola retal onde serão eliminados junto as fezes durante o próximo repasto sanguíneo (WIGGLESWORTH, 1931).

O bacterioma da ampola retal dos triatomíneos sofre influência do acúmulo do produto da digestão na porção anterior, além dos fatores imunes dos insetos apresentados anteriormente, o que muito pode ter associação com o aumento da diversidade das bactérias intestinais observado na porção posterior das ninfas avaliadas na segunda quinzena após o repasto sanguíneo. Entretanto, este fenômeno precisa ser melhor investigado, em outras espécies de triatomíneos de laboratórios em geral e principalmente de triatomíneos selvagens.

Este conjunto de dados, possibilita hipotetizar que a variabilidade encontrada no bacterioma de insetos selvagens pode ser em influenciada não apenas pela exposição a diferentes bactérias oriundas da alimentação, mas também sofre influência do acúmulo de produtos da digestão na ampola retal. Pois, devido a escassez de nutrientes dificultar o crescimento bacteriano nestas regiões, associado a formação de um ambiente mais hostil, com presença de radicais livres, acidificação do pH, e altas concentrações de sais, promova a seleção de bactérias capazes de resistir nestes ambientes. Por outro lado, insetos mantidos em laboratório acabam por perder sua diversidade nestas regiões devido a exposição a poucos microrganismos diferentes presentes nos ambientes laboratoriais.

Possivelmente, esta hipótese poderia ser melhor esclarecida comparando o sequenciamento de todo o DNA (*shotgun*) presente nas diferentes porções intestinais de triatomíneos selvagens e de colônias de diferentes laboratórios.

6.1.4 Disbiose do bacterioma promovida por Vancomicina e Gentamicina no intestino de ninfas de *T. infestans* de colônia laboratorial

A administração de coquetel de antibióticos foi a estratégia empregada para desenvolver um modelo de desequilíbrio no bacterioma intestinal dos triatomíneos. Aparentemente, os antibióticos não comprometeram a fisiologia dos triatomíneos, pois, embora tenhamos utilizados altas concentrações de Vancomicina e Gentamicina durante os experimentos, foram observadas taxas de ecdises de ninfas e oviposição de adultos semelhantes o grupo de ninfas alimentadas com antibióticos e o grupo controle (dados não mostrados). Além disso, a morte

de insetos no grupo de ninfas alimentadas com antibióticos foi proporcional ao grupo controle. O uso de antibióticos em estudos avaliando o bacterioma intestinal de triatomíneos e outros insetos foi previamente relatado por Castro e colaboradores (2012a), entretanto nenhuma observação de variações biológicas das ninfas foi mencionada (CASTRO et al., 2012a)

A associação de Gentamicina à Vancomicina promoveu a disbiose qualitativa do bacterioma intestinal de triatomíneos (Figura 7 e 8), comprovando a potencialização do espectro de ação da Vancomicina quando associada a Gentamicina (COTTAGNOUD; COTTAGNOUD; TÄUBER, 2003; LOWY; CHANG; LASH, 1983; WATANAKUNAKORN; BAKIE, 1973).

A associação de Vancomicina e Gentamicina promoveu uma seleção de bactérias dos gêneros *Arsenophonus* e *Rhodococcus*, aparentemente favorecendo a identificação de maior número de *reads* de *Rhodococcus* spp. em relação a insetos controle (Figura 9). Sugerindo o crescimento da população de *Rhodococcus* spp no ambiente intestinal. Este fenômeno pode ocorrer devido ao *Rhodococcus* spp. apresentar um único envelope celular rico em lipoarabdomanana (LAM) e completamente diferente de bactérias Gram positivas e negativas (MEIJER; PRESCOTT, 2004). Portanto, por não sofrerem ação do coquetel de antibióticos utilizado, que possuem como mecanismo de ação a interferência com a síntese da parede celular e alteração da permeabilidade da membrana citoplasmática bacteriana, bem como inibição da síntese protéica, e devido à pouca competição por nutrientes se construiu um ambiente favorável a seu crescimento.

Embora o crescimento de *Rhodococcus* spp. tenha ocorrido nas três porções intestinais avaliadas nas ninfas alimentadas com Vancomicina e Gentamicina, este fenômeno foi mais evidente na porção anterior (Figura 9 e Anexo 1), que foi o primeiro ambiente a sofrer ação dos antibióticos, reforçando a hipótese de que estas bactérias são mais resistentes ao coquetel de antibióticos empregados.

7 CONCLUSÕES

O bacterioma intestinal de *T. infestans* selvagens é mais diverso quando comparado a *T. infestans* mantidos em condições laboratoriais. Ademais, *T. infestans* mantidos em laboratório apresentam o predomínio de *Arsenophonus* spp., *Rhodococcus* spp. e *Enterococcus* spp.

O desequilíbrio promovido por Vancomicina e Gentamicina reduz a presença de outras espécies de microrganismos menos abundantes, favorecendo a identificação de mais *reads* de *Rhodococcus* spp. no intestino anterior e médio de *T. infestans*.

CAPÍTULO II
Estudo da interação bacterioma-parasito-hospedeiros

8 MATERIAIS E MÉTODOS

8.1 ISOLAMENTO E MANUTENÇÃO DE CEPA Bol-5 e Bol-33 DE *T. cruzi*

Duas cepas de *T. cruzi* (Bol-5 e Bol-33) utilizadas neste estudo foram previamente isoladas de *T. infestans* oriundos da região de Cochabamba na Bolívia, em parceria com a Dr^a. Nora Medrano-Mercado (UMSS). As formas epimastigotas, de ambas as cepas, foram mantidas em nitrogênio líquido desde seu isolamento em meados de 1999 até o início deste estudo. Após o descongelamento, as formas epimastigotas foram mantidas a 27,5 °C, em meio de cultura LIT (*Liver-infusion tryptose*) suplementado 10% de soro bovino fetal (SBF), através de repiques semanais.

As formas tripomastigotas destas cepas foram obtidas a partir de cultura em meio LIT mantidas sem repique por 15 dias. A diferença dos parasitos foi verificada por contagem diferencial em lâmina corada por Giemsa, sendo utilizadas as culturas que apresentaram aproximadamente 15% de formas tripomastigotas. Em seguida, a cultura foi concentrada por centrifugação a 2.000 x *g* durante 10 minutos a temperatura ambiente (TA). Após o descarte do sobrenadante, os parasitos foram suspensos em PBS, pH 7,2, e então realizada infecção de dois camundongos BALB/c, um para cada cepa isolada. Após a verificação de parasitemia detectável (1×10^6), foi realizada uma segunda passagem da cepa Bol-5 para novos camundongos BALB/c, a partir da transferência de sangue do camundongo previamente infectado. Simultaneamente, o sangue do mesmo animal infectado foi usado para realizar a infecção de cultura de fibroblastos murinos (L929, ATCC CCL-1) que foram mantidos por meio de repiques semanais utilizando meio de cultura “*Roswell Park Memorial Institute*” (RPMI) suplementado com 10% de SBF a 37 °C e 5% de CO₂ para realização dos experimentos.

8.1.1 Caracterização genética das cepas Bol-5 e Bol-33 de *T. cruzi*

DNA genômico de formas epimastigotas foi extraído através do método de fenol-clorofórmio (SAMBROOK, J; FRITSCH, E.F.; AND MANIATIS, 2001). As amostras foram submetidas a quantificação e determinação de pureza por espectrofotometria (*BioPhotometer*, Eppendorf), sendo então armazenada a -20°C. A determinação da DTU a qual pertence as cepas Bol-5 e Bol-33 foi confirmada por PCR do gene COII, seguida de RFLP usando a enzima *AluI*. Posteriormente foi realizada amplificação do espaçador não transcrito (NTS) do gene mini-exon e amplificação de 24S α rRNA por PCR de acordo com D’Avila e colaboradores (2009).

8.1.2 Experimentos de susceptibilidade da cepa Bol-5 de *T. cruzi* a coquetel de antibióticos

8.1.2.1 Curva de crescimento da cepa Bol-5 de *T. cruzi*

As curvas de crescimento de formas epimastigotas foram avaliadas a partir de um inóculo de 4×10^5 epimastigotas/ml, em volume final de 4 ml de meio LIT suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF), sem a presença de antibióticos (controle), contendo Vancomicina (1 mg/ml) ou Gentamicina (1 mg/ml) ou coquetel de Vancomicina (1 mg/ml) e Gentamicina (0,5mg/ml). As culturas foram mantidas em incubadora a 27,5 °C e a contagem de parasitos foi realizada em câmara de Neubauer a cada 48 h pelo período de aproximadamente duas semanas.

8.1.2.2 Teste de citotoxicidade em formas epimastigotas

As culturas de formas epimastigotas das cepas Bol-5 e Y de *T. cruzi* foram mantidas nas mesmas condições descritas no item 8.1.2.1 utilizando Vancomicina (1 mg/ml) ou Gentamicina (1 mg/ml) ou Vancomicina (1 mg/ml) e Gentamicina (0,5mg/ml), em triplicatas técnicas. A viabilidade dos parasitos foi avaliada por microscopia óptica, para verificação da densidade e motilidade dos parasitos e em seguida foi realizado o experimento colorimétrico de MTT ([3-(4,5-dimetil tiaxole-2-il)-2-5-difenil brometo de tetrazólio]), conforme descrito por Loosdrecht e colaboradores (1991) e modificado por Sieuwerts e colaboradores (1995).

8.1.2.3 Teste de susceptibilidade de formas tripomastigotas sanguíneas

O sangue periférico obtido de camundongo infectado com a cepa Bol-5 de *T. cruzi*, em terceira passagem, foi dividido em dois tubos de polipropileno e teve determinada a concentração de formas tripomastigotas sanguíneas de cada um dos tubos por contagem em câmara de Neubauer. Adicionamos, em um dos tubos Vancomicina (1 mg/ml) e Gentamicina (0,5 mg/ml) e no outro volume igual de PBS (controle). Ambos os tubos foram submetidos a incubação a 37 °C por aproximadamente 48 horas. Procedemos com a determinação da concentração de parasitos às 3 h e 24 h de incubação.

8.2 MANUTENÇÃO E ALIMENTAÇÃO DE COLÔNIAS DE *Triatoma infestans*

8.2.1 Alimentação experimental de *T. infestans* com formas tripomastigotas de *T. cruzi*

Ninfas de 4º e 5º estágios permaneceram em jejum por aproximadamente 21 dias, foram separadas em dois grupos experimentais (n= 81 ninfas/grupo), sendo alimentadas artificialmente com sangue humano obtido por punção venosa com citrato 3,8%, inativado em banho-maria a 56 °C por 30 minutos e acrescido de formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Bol-5 de *T. cruzi* (2×10^4 parasitos/ml de sangue) oriundas de camundongos previamente infectados.

O grupo controle foi alimentado apenas com sangue inativado contendo parasitos e o grupo experimental recebeu sangue inativado contendo parasitos e acrescido de Vancomicina (1 mg/ml) e Gentamicina (0,5 mg/ml). Estes repastos foram adicionados em alimentadores artificiais e mantidos a 37 °C pela passagem de água aquecida. O conteúdo dos alimentadores foi homogeneizado a cada 15 minutos a fim de evitar sedimentação de células e ou parasitos.

Os insetos foram pesados antes e após a alimentação para estimativa de volume de sangue ingerido e apenas ninfas totalmente ingurgitadas foram mantidas em BOD com temperatura e umidade controladas. Novas alimentações foram realizadas na 5ª e 9ª semana após a infecção com sangue humano obtido por punção venosa com citrato 3,8%, inativado em banho-maria a 56 °C por 30 minutos em ambos os grupos.

8.2.2 Acompanhamento do desenvolvimento da cepa Bol-5 de *T. cruzi* em *T. infestans*

Fezes frescas de ninfas infectadas com formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Bol-5 de *T. cruzi*, alimentadas com e sem antibióticos, foram semanalmente obtidas em tubos de polipropileno de 0,6 ml contendo 10 µl de PBS e imediatamente observadas por microscopia óptica a fim de identificar a presença de formas tripomastigotas metacíclicas. Em seguida foram produzidos esfregaços permanentes que, após coloração pelo método de Giemsa, foram avaliados por microscopia óptica para realização da contagem diferencial de formas epimastigotas e tripomastigotas.

8.3 ASPECTOS ÉTICOS NO USO DE ANIMAIS

O presente estudo foi desenvolvido de acordo com as orientações da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório – SBCAL/COBEA (Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório/Colégio Brasileiro de Experimentação Animal) e do

National Institutes of Health Guide para o Cuidado e Utilização de Animais de Laboratório. O estudo possui aprovação CEUA da Universidade Federal de Santa Catarina sob número de registro 9923170516. Todos os critérios para a criação, manejo e manutenção dos camundongos e ratos foram rigorosamente seguidos a fim de garantir um tratamento cuidadoso e ético com os animais.

8.3.1 Manutenção de colônias de camundongos

Os camundongos isogênicos da linhagem BALB/c foram oriundos do Biotério Setorial do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia do CCB/UFSC onde permaneceram durante todo o período de experimentação. Os camundongos foram mantidos em microisoladores acoplados à estante ventilada contendo filtros HEPA para controle de entrada e saída de ar (Alesco), com oferta de água e dieta com ração irradiada *ad libitum*. A temperatura ambiente foi mantida entre 20-22°C, com umidade relativa entre 40-70% com ciclos de claro/escuro de 12 h.

8.4 AVALIAÇÃO DA INFECTIVIDADE DA CEPA Bol-5 de *T. cruzi* EM MODELO MURINO

8.4.1 Infecção de camundongos BALB/c

Fezes de *T. infestans* alimentados com Vancomicina (1 mg/ml) e Gentamicina (0.5 mg/ml) e com sangue sem antibióticos (controle), ambos infectados com a cepa Bol-5 de *T. cruzi* foram coletadas em PBS pH 7,2 suplementado com 10% de glicose. Após a determinação da concentração de formas tripomastigotas a partir de contagem em câmara de Neubauer, ambas as amostras foram diluídas em PBS suplementado com 10% de glicose e ajustadas para a concentração de 10^4 tripomastigotas por ml. Alíquotas foram separadas para realização de extração de DNA genômico e posterior quantificação do bacterioma por PCR quantitativa em tempo real (qPCR).

Camundongos BALB/c machos e fêmeas de 6-8 semanas foram separados em cinco grupos experimentais (n=8/grupo) sendo infectados com 50 µl de fezes preparadas conforme descrito previamente; Grupo 1. inoculação via intraperitoneal de fezes de *T. infestans* infectados e alimentados com sangue; Grupo 2. inoculação via intraperitoneal de fezes de *T. infestans* infectados e alimentados com sangue contendo antibióticos; Grupo 3. inoculação via intradérmica de fezes de *T. infestans* infectados e alimentados com sangue; Grupo 4.

inoculação via intradérmica de fezes de *T. infestans* infectados e alimentados com sangue contendo antibióticos; Grupo 5. inoculação via intradérmica de PBS suplementado com 10% de glicose (controle sem infecção). Para a inoculação intradérmica, os camundongos foram previamente tricotomizados para maior precisão na inoculação.

A parasitemia sanguínea foi avaliada por aproximadamente 30 dias após a inoculação, em intervalos de dois ou três dias, por meio da técnica de Brener (1962). Os dados médios associados ao desvio padrão da média de cada dia contado foi utilizado para determinação da curva de parasitemia. Sangue periférico foi coletado 15, 25 e 45 dias após infecção, por punção cardíaca de camundongos sedados com Cetamina (100 mg/kg) e Xilazina (10 mg/kg), para obtenção de soro para avaliação de anticorpos séricos específicos para a cepa Bol-5 de *T. cruzi*.

8.4.2 Quantificação de microbiota nas fezes utilizadas na infecção de camundongos

A quantificação do bacterioma intestinal presente nas amostras de fezes inoculadas nos camundongos foi realizada por PCR quantitativa em tempo real (qPCR), em placa de 96 poços em volume final de 10 µl contendo: devido a grande diferença na quantidade de DNA obtido nas duas amostras, 2 µl do DNA genômico de ambas as amostras (fezes de triatomíneos infectados com sangue contendo ou não antibióticos), 10 pmol/µl dos iniciadores 341F (5'-CCT ACG GGR SFC AGC AG-3') e 806R (5'-GGA CTA CHV GGG TWT CTA AT-3') (WANG E QIAN, 2009) e o reagente *GoTaq qPCR Master Mix* (Promega), de acordo com as especificações do fabricante. As placas foram seladas com *MicroAmp Optical Adhesive Film* (Applied Biosystems) e analisadas em equipamento *ABI Prism 7900HT Sequence Detection System* (Applied Biosystems). A amplificação foi realizada com etapa inicial de desnaturação do DNA a 95 °C por cinco minutos, seguida de 35 ciclos com desnaturação a 95 °C por 45 segundos, ligação de iniciadores a 55 °C por 30 segundos e alongamento a 72 °C por 45 segundos. Após os ciclos de amplificação, a curva de dissociação foi obtida com ciclo único de 95 °C por 15 segundos, 60 °C por 15 segundos e, novamente 95 °C por 15 segundos. As reações foram feitas em triplicata técnica.

8.4.3 Contagem diferencial de leucócitos em sangue periférico

A contagem diferencial de leucócitos foi realizada 30 dias após a infecção dos camundongos inoculados conforme descrito no item 8.4.1, em esfregaços de sangue preparados imediatamente após a coleta das amostras e corados pelo método de May-

Grunwald-Giemsa, modificado (ROSENFELD, 1947). As lâminas foram analisadas por microscopia de luz e realizada a contagem cega de no mínimo 100 leucócitos.

8.4.4 Avaliação histopatológica de camundongos infectados com fezes de *T. infestans* infectados com a cepa Bol-5 de *T. cruzi*

Aos 60 dias de infecção, os camundongos foram eutanasiados por deslocamento cervical e em seguida foram coletados fragmentos de esôfago, estômago, reto, fígado, coração, músculo esquelético, baço, linfonodos inguinais e peritônio dos animais infectados via intraperitoneal ou pele dos camundongos infectados via intradérmica. Os fragmentos foram fixados em formalina tamponada (10%) e processados através da técnica de histologia convencional. Para tanto, cortes seriados de 5µm de espessura foram corados com hematoxilina-eosina e examinados em microscópio óptico em toda sua extensão. A análise das lâminas foi realizada por método adaptado de Talvani e colaboradores (2000). Brevemente, a intensidade de inflamação foi determinada pela identificação de focos de infiltrado inflamatório com número maior ou igual a 15 leucócitos avaliados em 50 campos (100x) e classificado como: ausentes (escore=1), leve/discreto (≥ 25 focos, escore 2), moderado (26-50 focos, escore 3) e intenso (> 50 focos, escore 4). As características do infiltrado inflamatório foram classificados como: ausente (escore 0), local (escore 1), difuso (escore 2) ou multifocal (escore 3). A presença de parasitos foi avaliada pela contagem de ninhos de parasitos, classificados como: ausentes (escore 0), leve (5 ninhos, escore 1), moderada ($> 5-15$ ninhos, escore 2) e intenso (≥ 16 ninhos, escore 3), seguida da contagem de amastigotas em cada ninho. O escore final foi obtido pela soma dos escores nas características previamente descritas. (TALVANI et al., 2000).

8.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

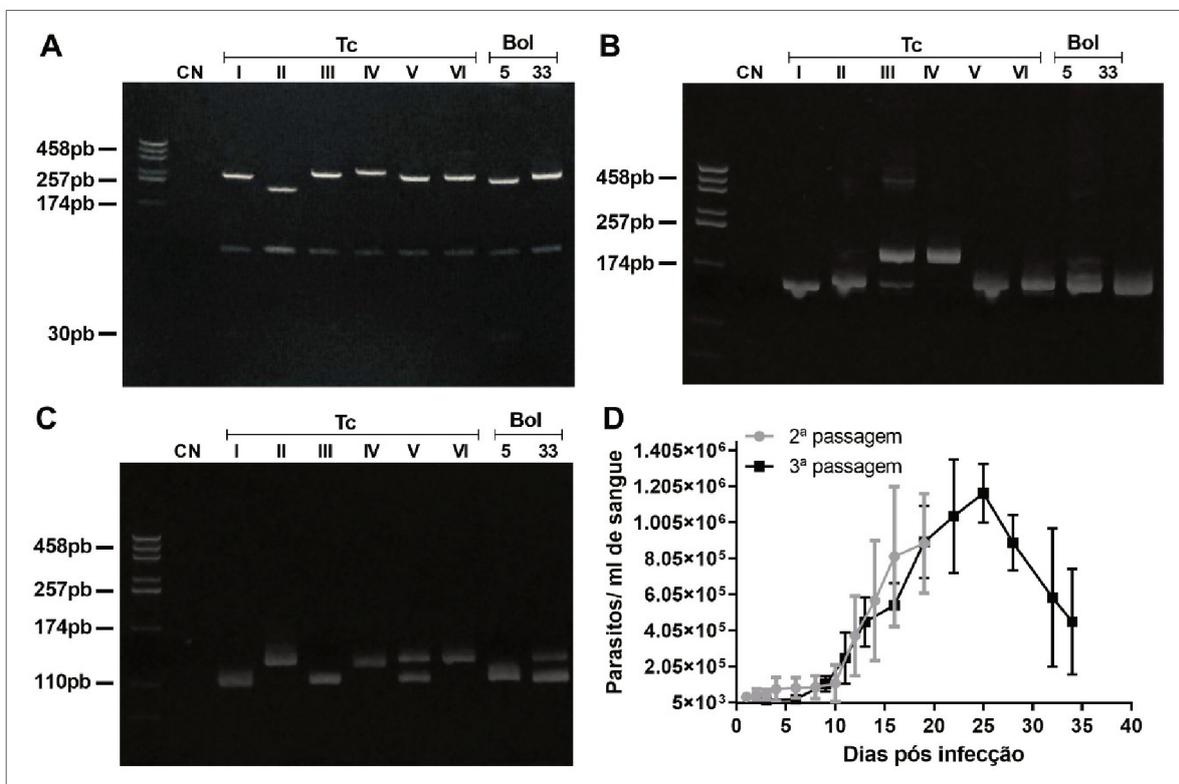
Os resultados obtidos foram tabulados usando o Microsoft Office Excel 2018 e analisados em Software Prism (versão 6.0, GraphPad), expressos como média e o desvio padrão da média. A comparação entre os grupos foi dada pela análise de teste t *student* e/ou variância (ANOVA) utilizada para avaliar as possíveis diferenças entre os grupos. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

9 RESULTADOS

9.1 Caracterização genética e biológica da Cepa Bol-5 de *T. cruzi*

A genotipagem foi realizada empregando a abordagem de D'Avila e colaboradores (2009) para determinar a DTU a qual pertencem as cepas Bol-5 e Bol-33 de *T. cruzi*. A PCR-RFLP do gene COII apresentou padrão de bandas que excluiu a possibilidade de ambas as cepas pertencerem a DTU TcII (Figura 10A). Porém, na amplificação do espaçador não transcrito (NTS) dos genes SL, ambas as cepas apresentaram padrão de bandas excluindo a possibilidade de pertencerem as DTU TcIII e TcIV (Figura 10B). Por fim, a amplificação do gene 24S α rRNA confirmou que as cepas Bol-5 e Bol-33 pertencem às DTU TcI e TcV, respectivamente (Figura 10C).

Figura 10: A cepa Bol-5 de *Trypanosoma cruzi* pertence a DTU TcI e apresenta parasitemia patente em camundongos BALB/c.



Legenda: Determinação da DTU das cepas Bol-5 e Bol-33 de *T. cruzi*: **(A)** eletroforese de produto de PCR-RFLP do gene COII (entre 30pb e 294pb); **(B)** eletroforese de produto de amplificação do gene NTS-SL (entre 15pb e 200pb); **(C)** eletroforese de produto de amplificação do gene 24S α rRNA (entre 110pb e 125pb). A primeira coluna de cada gel apresenta o padrão de massa molecular – pUC18 digerido com *HaeIII* (11 pb – 587 pb). As colunas identificadas por Tc representam cepas controles de cada DTU. **(D)** Cinética de parasitemia de duas passagens sucessivas da cepa Bol-5 em camundongos BALB/c.

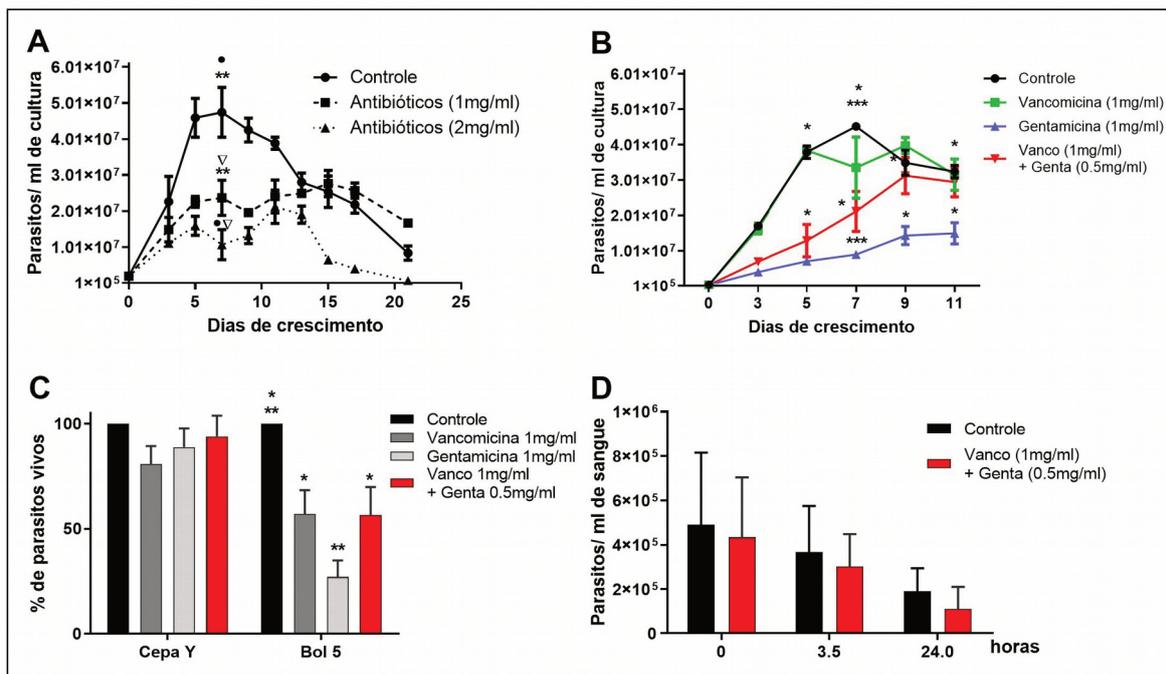
A infecção intraperitoneal de camundongos BALB/c (n=2) com formas tripomastigotas obtidas de culturas de epimastigotas envelhecidas de ambas as cepas Bol-5 e Bol33, foram acompanhadas até o 19º dia de infecção. A cepa Bol-5 promoveu nesta 1ª passagem uma infecção detectável (patente), com aproximadamente 7×10^5 tripomastigotas/ml de sangue (dados não mostrados). A cepa Bol-33 apresentou parasitemia indetectável (subpatente) (dados não mostrados).

Sucessivas passagens da cepa Bol-5 foram realizadas em camundongos para manutenção de características biológicas da cepa, tais como infectividade e replicação em hospedeiros mamíferos. Na segunda passagem em camundongos (n=3), a parasitemia foi acompanhada até o 19º dia de infecção e apresentou média de $8,1 \times 10^5$ parasitos por ml de sangue ($815.000,0 \pm 388.973,0$) (Figura 10D). Parasitemia semelhante foi observada na 3ª passagem com pico de parasitos apresentando média de $1,1 \times 10^6$ parasitos por ml de sangue ($1.166.667,0 \pm 163.299,3$) no 25º de infecção e sucedido pela queda da parasitemia (Figura 10D).

9.2 Comportamento *in vitro* de formas epimastigotas e tripomastigotas da Cepa Bol-5 de *T. cruzi* na presença de Vancomicina e Gentamicina

O comportamento da cepa Bol-5 de *T. cruzi* na presença de Vancomicina e Gentamicina foi primeiramente avaliado pela curva de crescimento *in vitro* de formas epimastigotas. O pico de crescimento de culturas de formas epimastigotas sem a presença de antibióticos foi atingido no 7º dia de cultivo ($47.500.000,0 \pm 6.905.614,0$). Entretanto, culturas de epimastigotas contendo Vancomicina (1 mg/ml) e Gentamicina (1 mg/ml) apresentaram crescimento comprometido ($23.750.000,0 \pm 4.879.805,0$) quando comparado as culturas controle ($p=0.0083$). Esse efeito foi ainda mais evidente na concentração de Vancomicina (2 mg/ml) e Gentamicina (2 mg/ml) ($10.750.000,0 \pm 4.160.829,0$) quando comparado ao controle ($p=0.0014$) e a cultura com antibióticos à 1 mg/ml ($p=0.0246$) no sétimo dia de crescimento (Figura 11A).

Figura 11: A associação de Vancomicina com Gentamicina retarda o crescimento *in vitro* de formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*, porém não possui ação em formas tripomastigotas presentes no sangue de camundongos infectados.



Legenda: Avaliação do comportamento *in vitro* da cepa Bol-5 de *T. cruzi* na presença de Vancomicina e Gentamicina: Curva de crescimento de epimastigotas sem a presença de antibióticos (controle), e com antibióticos associados (A), cada um a 1 mg/ml ou 2 mg/ml; (B) com antibióticos separados, cada um a 1 mg/ml ou associados (V = 1 mg/ml e G = 0,5 mg/ml); (C) Teste de viabilidade celular de epimastigotas das cepas Y e Bol-5, cultivados sem antibióticos (controle), com antibióticos separados (cada uma a 1 mg/ml) ou associados (V = 1 mg/ml e G = 0,5 mg/ml); (D) Contagem de formas tripomastigotas sanguíneas vivas em sangue (controle) e sangue acrescido de V=1 mg/ml e G=0,5mg/ml com 0, 3,5 e 24 horas de incubação a 37 °C. Os resultados foram comparados utilizando teste *t student* considerando o nível de significante $p < 0,05$.

O crescimento de epimastigotas da cepa Bol-5 com Vancomicina (1 mg/ml) não diferiu do crescimento dos parasitos em cultura sem a presença de antibióticos ($p = 0,1984$) (Figura 11B). Por outro lado, o crescimento *in vitro* de epimastigotas contendo Gentamicina (1 mg/ml) foi significativamente menor do que o observado para a cultura controle em todos os pontos avaliados ($p < 0,022$) (Figura 11B). Entretanto, culturas crescidas com a associação de Vancomicina (1 mg/ml) e Gentamicina (0,5 mg/ml) não diferiram das culturas controle ($p = 0,4969$) após nove dias de crescimento, embora tenham apresentado início de crescimento significativamente inferior ($p = 0,0189$) (Figura 11B).

A viabilidade celular de formas epimastigotas da cepa Bol-5 na presença de Gentamicina (1 mg/ml) foi significativamente menor do que o controle sem antibióticos

($p=0,0011$) (Figura 11C). Esta menor viabilidade também foi observada nos parasitos mantidos com concentração reduzida de Gentamicina (0,5 mg/ml) associada à Vancomicina (1 mg/ml), não diferindo à porcentagem de parasitos cultivados com Vancomicina (1 mg/ml) ($p= 0,9617$). Nenhuma alteração de viabilidade celular de epimastigotas da cepa Y de *T. cruzi* foi verificada utilizando os mesmos tratamentos (Figura 11C).

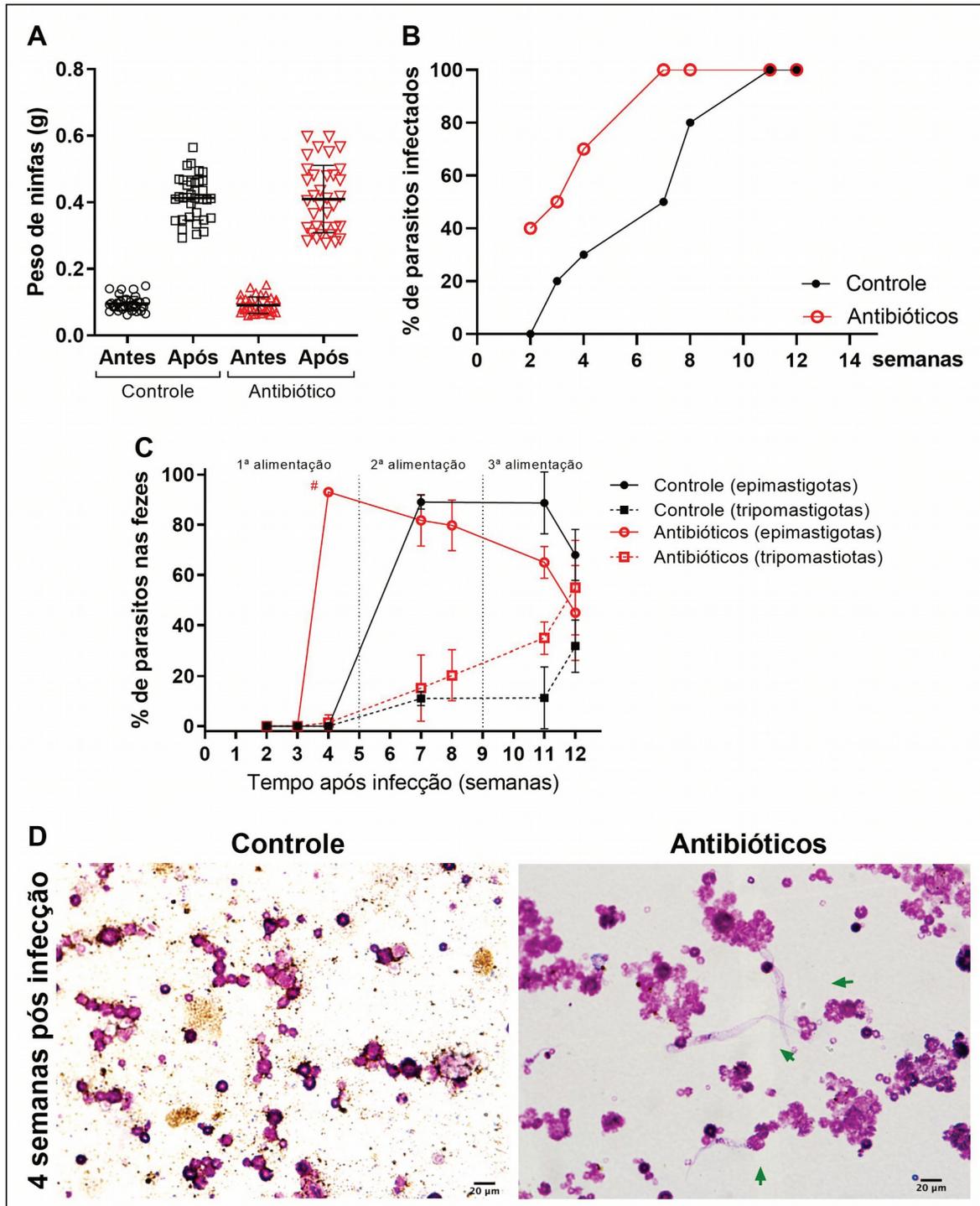
Os efeitos dos antibióticos sobre as formas tripomastigotas sanguíneas foram avaliados em três momentos após a adição da combinação de Vancomicina (1 mg/ml) e Gentamicina (0,5 mg/ml). Não foram observadas diferenças entre o controle e as culturas de parasitos adicionadas de antibióticos, apenas uma redução no número de parasitos nos dois grupos com o passar do tempo (Figura 11D).

9.3 Desenvolvimento da infecção da cepa Bol-5 de *T. cruzi* em *T. infestans*

A infecção da cepa Bol-5 de *T. cruzi* foi avaliada em ninfas de 5º estágio larval de *T. infestans*. Em um primeiro experimento, as ninfas foram divididas em dois grupos (**Controle** – sem antibióticos e **Antibióticos** – Vancomicina 1 mg/ml e Gentamicina 0,5 mg/ml) e alimentadas com sangue contendo 1×10^5 parasitos/ml adicionado ou não dos antibióticos. Neste experimento, o grupo Antibióticos apresentou mortalidade maior que 80% ($n= 64$ de 80 ninfas) entre o 12º e o 15º dia após a alimentação (dados não mostrados).

A partir deste resultado, o desenvolvimento da infecção da Bol-5 de *T. cruzi* foi acompanhado após alimentação dos dois grupos de ninfas de *T. infestans* (Controle e Antibióticos) com sangue contendo 1×10^4 parasitos/ml, sendo o grupo Antibióticos adicionado de Vancomicina 0,5 mg/ml e Gentamicina a 0,25 mg/ml (Figura 12). A ingestão de sangue pelas ninfas dos dois grupos foi semelhante ($p= 0,8748$), ou seja, cada inseto de ambos os grupos se alimentaram em média com 400 mg de sangue (Figura 12A).

Figura 12: O desenvolvimento da infecção da Bol-5 de *Trypanosoma cruzi* é mais rápida em *Triatoma infestans* alimentado com Vancomicina e Gentamicina



Legenda: Avaliação do desenvolvimento da infecção da cepa Bol-5 de *T. cruzi* em *Triatoma infestans* alimentados com apenas sangue (Controle) (n=40) ou sangue contendo Vancomicina a 0.5mg/ml e Gentamicina a 0.25mg/ml (Antibióticos) (n=40). **(A)** Peso das ninfas antes e após a infecção; **(B)** Percentual de ninfas contendo parasitos em fezes frescas (10 ninfas avaliadas); **(C)** Contagem relativa diferencial entre formas epimastigotas e tripomastigotas, em ambos os grupos experimentais, durante as 12 semanas seguintes a infecção. **(D)** Microscopia óptica representativa de fezes coletadas 4 semanas após a infecção. Epimastigotas (setas verdes) e tripomastigotas (setas azuis).

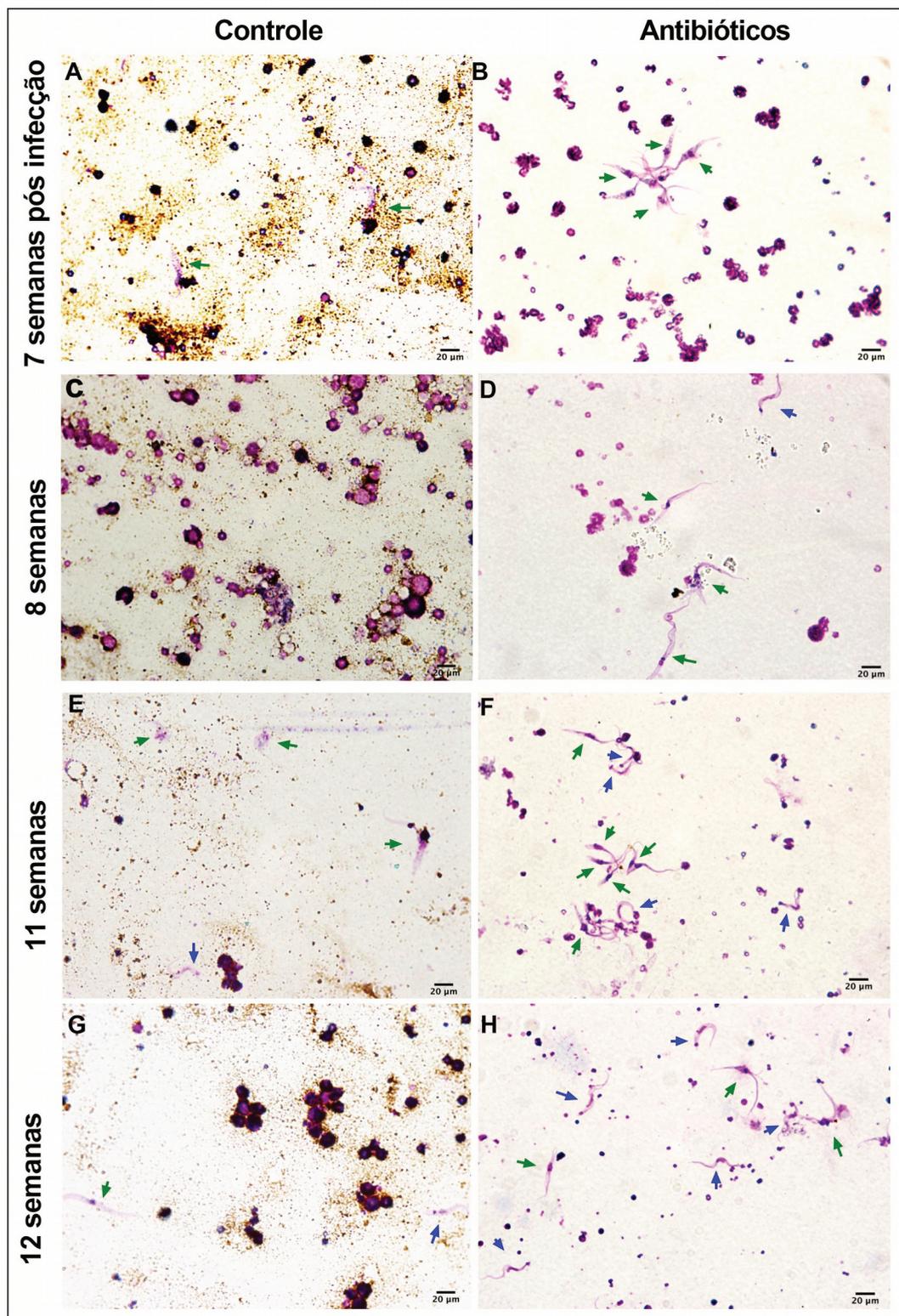
Parasitos só foram identificados nas fezes de ninfas do grupo Controle após a terceira semana de infecção, enquanto que no grupo Antibióticos as primeiras ninfas com fezes positivas foram identificadas na segunda semana pós infecção (Figura 12B). Além disso, todas as ninfas do grupo Antibiótico apresentaram parasitos nas fezes na sétima semana pós infecção, diferente do grupo Controle que teve todas as ninfas com fezes positivas apenas na décima primeira semana pós infecção (Figura 12B).

A contagem diferencial de formas epimastigotas e tripomastigotas presentes nas fezes só foi possível após a quarta semana pós infecção, sendo que uma ninfa do grupo Antibióticos possuía um grande número de parasitos, dos quais 90% foram epimastigotas e 10% tripomastigotas (Figuras 12B e 12C). Neste ponto experimental, no grupo Controle não foi possível realizar a quantificação dos parasitos (Figura 12D).

Na sétima semana pós infecção, após todas as ninfas serem novamente alimentadas apenas com sangue, o grupo Antibióticos apresentou proporções de epimastigotas e tripomastigotas semelhantes ao grupo controle ($p>0,42$) (Figuras 12C, 13 A e 13B). A contagem diferencial do grupo controle foi comprometida na oitava semana após a infecção devido terem sido identificados parasitos apenas nas lâminas do grupo Antibióticos (Figura 12C, 13C e 13D).

Na nona semana pós infecção uma terceira alimentação das ninfas, de ambos os grupos com sangue sem adição de antibióticos foi realizada. Na décima primeira e décima segunda semana após infecção, as fezes de ninfas do grupo Antibióticos apresentaram maior contagem relativa de tripomastigotas do que ninfas do grupo Controle ($p= 0,0051$ e $p=0,0422$) (Figura 12C). Além disso, na décima segunda semana pós infecção no grupo Antibióticos houve uma inversão na proporção de epimastigotas e tripomastigotas, havendo maior proporção das formas infectantes (45.018 ± 18.821 e 54.982 ± 18.821 , respectivamente) (Figura 12C e 13).

Figura 13: Ninfas de *Triatoma infestans* alimentadas com antibióticos apresentam formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* em tempo mais reduzido do que ninfas do grupo controle

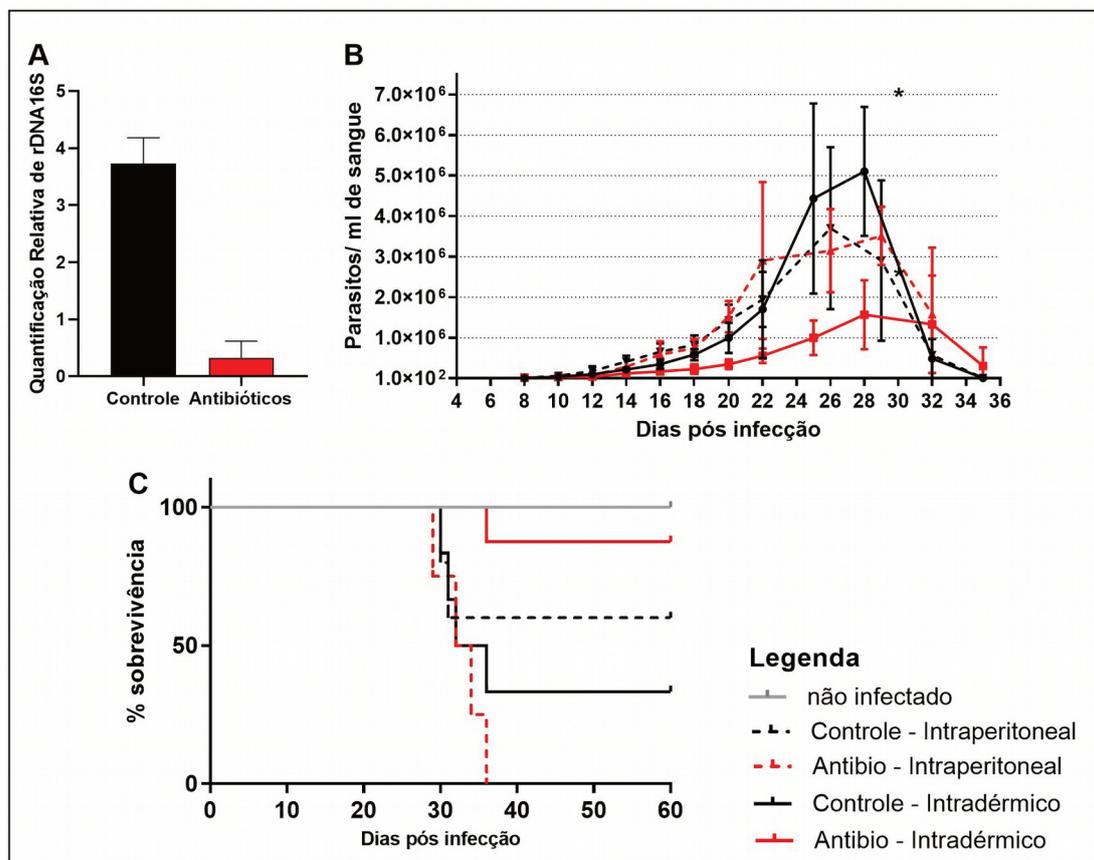


Legenda: Fotos de microscopia óptica representativas de esfregaços de fezes de ninfas infectadas com tripomastigotas sanguíneos via alimentação contendo apenas sangue (Controle) (n=40) ou sangue contendo Vancomicina 0,5 mg/ml e Gentamicina 0,25 mg/ml (Antibióticos) (n=40). Imagens representativas de ambos os grupos em 7 semanas (A e B), 8 semanas (C e D), 11 semanas (E e F) e 12 semanas (G e H) pós infecção. Epimastigotas (setas verdes) e tripomastigotas (setas azuis).

9.4 Infectividade, em modelo murinho, de tripomastigotas metacíclicos da cepa Bol-5 de *T. cruzi* desenvolvidos em *T. infestans* com e sem disbiose intestinal

A infectividade da cepa Bol-5 de *T. cruzi* para camundongos BALB/c foi avaliada a partir da inoculação intradérmica ou intraperitoneal de fezes dos grupos de *T. infestans* Controle e Antibióticos, contendo 1×10^4 parasitos por camundongo. A quantificação de bactérias totais por PCR quantitativa em tempo real (qPCR) realizada em fração de fezes removida antes da inoculação nos camundongos demonstrou que o inóculo referente ao grupo Antibióticos possuía aproximadamente quatro vezes menos bactérias que o grupo Controle (Figura 14A).

Figura 14: A inoculação intradérmica de fezes de *Triatoma infestans* com menor quantidade de bactérias intestinais promoveu diminuição da infecção promovida por tripomastigotas metacíclicos da cepa Bol-5 de *Trypanosoma cruzi*



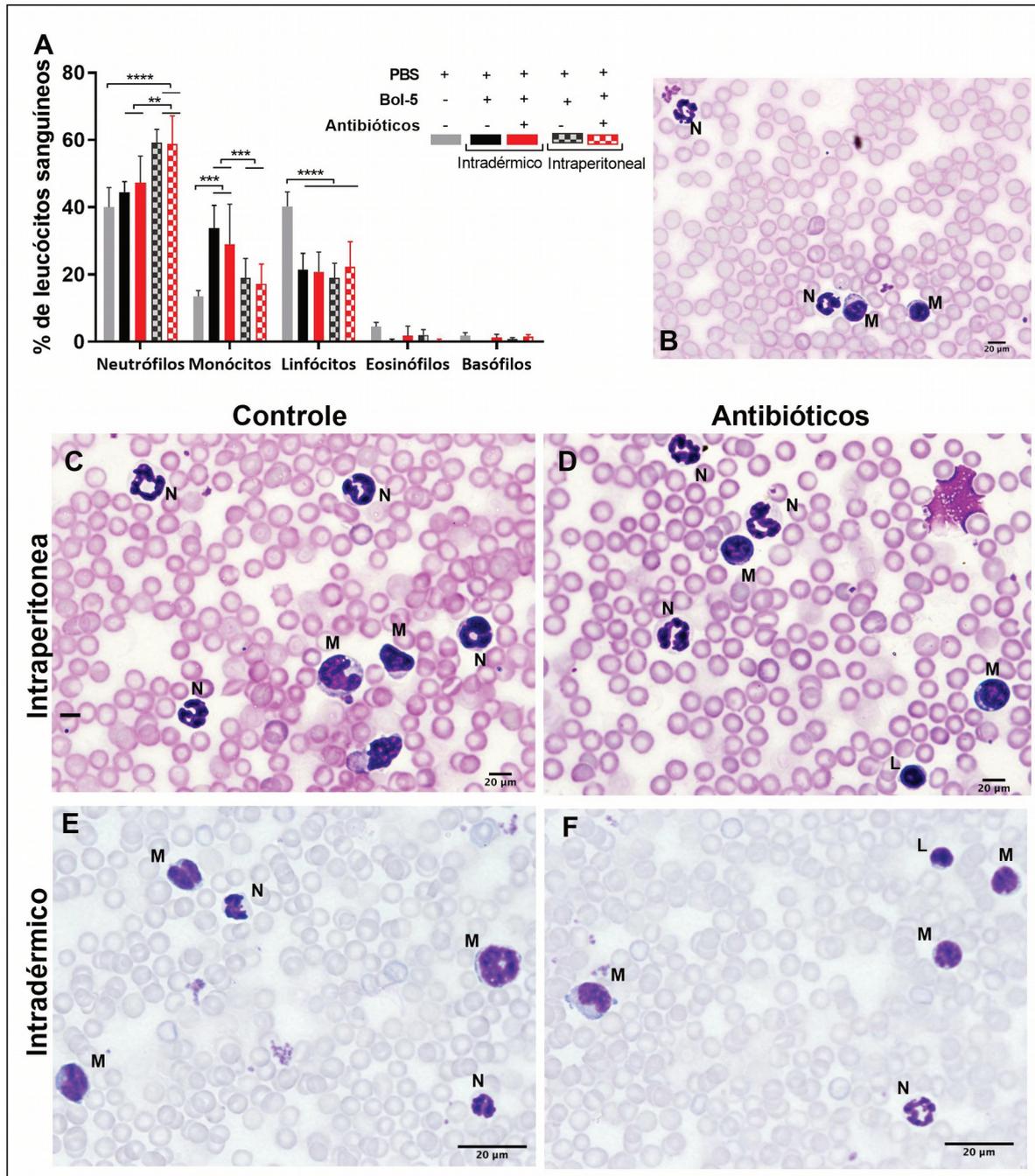
Legenda: Avaliação da infecção de camundongos ($n = 40$) a partir da inoculação de fezes contendo tripomastigotas metacíclicos desenvolvidos em *T. infestans* artificialmente alimentados com sangue (Controle) ou com Vancomicina 0,5 mg/ml e Gentamicina 0,25 mg/ml (Antibióticos). **(A)** Quantificação relativa do gene rRNA 16S por qPCR de alíquota de *pool* de fezes utilizados nas inoculações. **(B)** Parasitemia promovida pela inoculação por vias intradérmica e intraperitoneal de *pool* de fezes de ambos os grupos de *T. infestans*. **(C)** Curva de sobrevivência dos camundongos infectados com as fezes de *T. infestans* dos dois grupos e pelas duas formas. Os resultados foram comparados utilizando teste *t student* considerando significativo $p < 0,05$.

Os camundongos infectados por via intradérmica com fezes de *T. infestans* do grupo Antibióticos apresentaram pico de parasitemia no 28º dia de infecção, sendo estatisticamente inferior ao grupo Controle ($p= 0,0002$) (Figura 14B). O pico de parasitemia promovido pela inoculação, via intraperitoneal ocorreu no 26º dia de infecção e não foi estatisticamente diferente entre os dois grupos ($p= 0.6788$). Além do mais, a parasitemia apresentada pelo grupo controle por via intradérmica foi estatisticamente semelhante aos grupos que receberam fezes por via intraperitoneal de ambos os grupos de *T. infestans* ($p= 0,0982$) (Figura 14B).

Os camundongos infectados de todos os grupos experimentais exceto os infectados via intradérmica com fezes de insetos do grupo Antibiótico, começaram a morrer no 30º dia pós infecção (Figura 14C). Na inoculação intradérmica, o grupo de camundongos infectados com fezes de *T. infestans* do grupo Antibióticos apresentou taxa de sobrevivência de 90%, enquanto que o grupo infectado com fezes Controle apresentou taxa de sobrevivência de 40% (Figura 14C). Na inoculação intraperitoneal, a taxa de sobrevivência dos camundongos infectados com fezes de *T. infestans* do grupo Controle foi de 60%, enquanto o grupo infectado com fezes de *T. infestans* do grupo Antibióticos apresentou 10% de sobrevivência (Figura 14C).

A avaliação diferencial de leucócitos no sangue periférico de camundongos inoculados com fezes de *T. infestans* alimentados ou não com antibióticos demonstrou um valor relativo de neutrófilos em camundongos inoculados via intraperitoneal foi maior que o de camundongos inoculados por via intradérmica ($p=0,0135$) e camundongos não infectados ($p<0,0001$). Em contrapartida, a inoculação das fezes por via intradérmica apresentou valor relativo de monócitos maior ($p= 0,0085$) que a inoculação via intraperitoneal e que camundongos não infectados ($p=0,0036$). Além disso, todos os camundongos que receberam fezes contendo parasitos, independente da via de inoculação, apresentaram menor número relativo de linfócitos do que camundongos controles ($p<0,0001$) (Figura 15A).

Figura 15: A infecção com tripomastigotas metacíclicos da cepa Bol-5 de *Trypanosoma cruzi* promove uma leucocitose em camundongos, com evidente neutrofilia pela inoculação via intraperitoneal e monocitose pela via intradérmica.



Legenda: Avaliação da leucocitose no 30º dia após a inoculação de tripomastigotas metacíclicos desenvolvidos em *T. infestans* artificialmente alimentados, no momento da infecção, com sangue (Controle) ou com Vancomicina a 0,5 mg/ml e Gentamicina a 0,25 mg/ml (Antibióticos). **(A)** Contagem diferencial de leucócitos sanguíneos. **(B)** Microscopia representativa de esfregaço sanguíneo de camundongos inoculados com PBS via intradérmica; inoculados com fezes de *T. infestans* “Controle” **(C)** ou “Antibióticos” **(D)** por via intradérmica; e via intraperitoneal **(E e F)** respectivamente. (L = linfócito, M = monócito, N = neutrófilo).

A análise histopatológica de fragmentos de tecidos hepático, retal, muscular esquelético e cardíaco não apresentaram diferença no escore empregado para avaliação da intensidade da inflamação (Figura 16A). Entretanto, na avaliação do tecido muscular estriado cardíaco de camundongos infectados via intradérmica, identificou-se focos inflamatórios mononucleares multifocal leve, predominantemente perivascular e focos inflamatórios linfohistioplasmocitário multifocal leve no pericárdio de camundongos do grupo Antibióticos (Figuras 16C e E) e do grupo Controle foram identificados infiltrado inflamatório mononuclear, moderado, focalmente extenso com dois ninhos apresentando mais de 20 parasitos em apenas um dos camundongos (figura 16B, D e F). Além disso, a inflamação observada no tecido cardíaco de camundongos infectados via intraperitoneal apresentou apenas focos inflamatórios mononucleares intensos e difusos com áreas de necrose associada ao pericárdio (Dados não mostrados).

Os fragmentos de tecidos de órgãos linfóides secundários (baço e linfonodos inguinais) avaliados apresentam apenas hiperplasia da polpa branca e congestão moderada nos tecidos do baço. Os linfonodos inguinais não apresentaram achados histomorfológicos atípicos (dados não mostrados).

10 DISCUSSÃO

Diferentes combinações experimentais de espécies de triatomíneos e/ou cepas de parasito demonstram uma tendência de vetores locais serem mais suscetíveis a cepas de *T. cruzi* das mesmas áreas geográficas (PERLOWAGORA-SZUMLEWICZ et al., 1994). Em nosso cenário de infecção experimental, utilizamos inicialmente duas cepas (Bol-5 e Bol-33) isoladas de *T. infestans* coletado na região de Cochabamba na Bolívia, mesma região de origem da nossa colônia de *T. infestans*. Além disso, todos os experimentos foram realizados buscando reduzir artificialidades experimentais e desta forma, mimetizar o ciclo biológico do parasito.

A avaliação da infecção promovida pelas cepas Bol-5 e Bol-33 foi realizada e apenas a cepa Bol-5 apresentou parasitemia patente em camundongos BALB/c, com pico no 25º dia de infecção e comportamento semelhante a cepas previamente isoladas caracterizadas como apresentando virulência moderada (STEINDEL, 1993). A cepa Bol-33 (Tc V) apresentou uma parasitemia subpatente (dados não mostrados) e por este motivo apenas a cepa Bol-5 foi utilizada em todos os experimentos deste capítulo, devido à necessidade de mensurar a parasitemia promovida nos dois grupos de *T. infestans* alimentados com e sem antibióticos.

10.1 Susceptibilidade da cepa Bol-5 de *T. cruzi* à Vancomicina e Gentamicina

O uso de antibióticos para manipulação de microbiota intestinal tem sido empregado em diversos experimentos utilizando camundongos (KENNEDY; KING; BALDRIDGE, 2018) e insetos, incluindo triatomíneos (VIEIRA et al., 2016). Nossos primeiros resultados demonstraram que a Vancomicina e Gentamicina possuem forte ação sobre epimastigotas em cultura (Figura 11 A, B e C) e que aparentemente a Gentamicina contribui significativamente para este fenômeno, pois a redução de sua concentração diminui o impacto destes antibióticos em epimastigotas. Porém, a susceptibilidade *in vitro* de formas epimastigotas de *T. cruzi* a antibióticos ainda não foi demonstrada em outros trabalhos até o momento.

Conhecidamente, em bactérias, a Gentamicina se liga a subunidades ribossômicas da célula bacteriana, induzindo a produção de proteínas anormais e possui espectro de ação amplo sobre bactérias gram-negativas. Ao contrário da Vancomicina que possui espectro de ação à bactérias gram-positivas e interfere com a síntese de parede bloqueando a incorporação

no peptidoglicano das subunidades ácido N-acetilmuramico e N-acetilglucosamina, ao se ligar a estas moléculas (WATANAKUNAKORN; BAKIE, 1973).

Muito embora a curva de crescimento não tenha demonstrado uma ação da Vancomicina sobre epimastigotas, o experimento de viabilidade celular confirmou a morte de aproximadamente 50% dos parasitos de culturas com este antibiótico. Esta divergência de resultados pode ser explicada por questões metodológicas, devido a contagem de parasitos na curva de crescimento ser realizada em microscopia utilizando critérios morfológicos e, portanto, dificultar a identificação de parasitos mortos. A viabilidade celular dos parasitos de cultura foi obtida empregando ensaio bioquímico, o qual depende da permeabilidade da membrana celular dos parasitos e, portanto, constitui um método mais preciso de avaliar a morte dos parasitos.

O experimento de viabilidade também utilizou a cepa Y de *T. cruzi*, e não foi observada toxicidade, o que sugere que a susceptibilidade a Vancomicina e Gentamicina pode ser cepa dependente. Antibióticos (Penicilina e Ampicilina) foram utilizados para avaliar a resposta imune de triatomíneos e a interação do *T. cruzi* com o bacterioma intestinal destes insetos (CASTRO et al., 2012a), no entanto nenhum efeito negativo dos antibióticos foi avaliado sobre as cepas utilizadas. Ademais, experimento realizado com a cepa Y de *T. cruzi*, utilizada em diversos estudos da literatura (AMATO NETO, 2010), não demonstrou o mesmo fenômeno que foi observado pela cepa Bol-5, o que nos permitiu inferir que esta susceptibilidade a Vancomicina e Gentamicina pode ser cepa dependente. Estas evidências de susceptibilidade da cepa Bol-5 de *T. cruzi* precisam ser melhor investigadas em estudos empregando diversas cepas diferentes e realizando cinética de concentrações destes e de outros antibióticos.

Apesar de epimastigotas serem aparentemente susceptíveis a Vancomicina e Gentamicina, os tripomastigotas sanguíneos não foram susceptíveis aos antibióticos em análise *ex vivo* (Figura 11D). Isso se deve, possivelmente devido à existência de outros componentes celulares e moleculares presentes no sangue dos camundongos. Uma vez que a infecção dos triatomíneos foi realizada com tripomastigotas sanguíneos prosseguimos com o experimento.

A associação destas evidências contribuíram para nossa decisão de não investigar a fundo a ação destes antibióticos em epimastigotas, considerando nosso objetivo principal de

promover um desequilíbrio no bacterioma intestinal do *T. infestans* e permitir o desenvolvimento do parasito *in vivo*.

10.2 Desenvolvimento da cepa Bol-5 de *T. cruzi* em *T. infestans*

A associação de formas tripomastigotas sanguíneas (10^5 parasitos/ml) com Vancomicina (1 mg/ml) e Gentamicina (0,5 mg/ml) resultou na morte da maioria das ninfas no primeiro experimento realizado (dados não mostrados). Embora não tivéssemos um grupo de insetos alimentados com antibióticos sem parasitos, para excluir completamente esta possibilidade, acreditamos que a morte das ninfas não tenha acontecido devido a alimentação com antibióticos, pois a taxa de mortalidade, em experimentos prévios (capítulo 1), neste grupo experimental foi igual a grupo controle, mesmo empregando concentrações maiores dos mesmos antibióticos.

Considerando que o bacterioma intestinal de insetos hematófagos possui um importante papel no processo de digestão do alimento (GAIO et al., 2011), fenômeno observado nas fezes de ninfas deste estudo alimentadas com antibióticos. Nas quais observamos claramente a baixa quantidade de bactérias intestinais (Figuras 12 e 13) que foi confirmada pela quantificação de rRNA 16S de amostras de fezes dos insetos (Figura 14A) e uma redução do processo de digestão observado nos esfregaços corados pelo Giemsa. Nós acreditamos que possivelmente a redução da digestão alimentar promovida pela redução do bacterioma, tenha sido agravado pela carga parasitária administrada e sua movimentação na luz do intestino tenha levado ao rompimento da membrana perimicrovilar produzida após a alimentação de triatomíneos (DUARTE; MACEDO; LUZ, 2017), que se apresentava frágil nos primeiros dias após a alimentação das ninfas em todos os experimentos realizados (dados não mostrados).

Devido a estas observações realizamos outro experimento, no qual a concentração de tripomastigotas sanguíneas foi reduzido para 10^4 parasitos/ml, e as concentrações de Vancomicina e Gentamicina também foram reduzidas para 0,5 mg/ml e 0,25 mg/ml, respectivamente. O qual apresentou semelhante taxa de mortalidade das ninfas nos dois grupos experimentais (Antibióticos e Controle).

O estabelecimento da infecção em ninfas de *T. infestans* alimentadas com tripomastigotas sanguíneas da cepa Bol-5 de *T. cruzi* ocorreu um mês antes em ninfas do

grupo antibióticos do que ninfas controle. Além disso, no grupo Antibióticos foi observada uma maior quantidade de parasitos nas fezes de ninfas do que no controle (Figuras 12 e 13). Confirmando as primeiras evidências deste estudo que demonstraram, na análise a fresco, que o número de ninfas com fezes positivas para a infecção foram maiores no grupo Antibióticos do que no grupo controle. Ademais, no grupo antibióticos houve uma inversão da relação tripomastigotas e epimastigotas que não foi observada no grupo Controle (Figura 12). Todos estes achados reforçam a hipótese de que o *T. cruzi* necessita do controle do crescimento bacteriano no lúmen do intestino destes triatomíneos para se desenvolver.

Embora, estes achados não sejam suficientes para fornecer subsídios para confirmar a hipótese de que o bacterioma intestinal contribui negativamente para o estabelecimento da infecção pelo *T. cruzi*. A associação dos nossos resultados com outras evidências da literatura (CASTRO et al., 2012a; DÍAZ et al., 2016) reforçam que o *T. cruzi* induz a produção de fatores imunes em triatomíneos (peptídeos antimicrobianos, por exemplo) que agem controlando o crescimento bacteriano e favorecem o estabelecimento da infecção pelo *T. cruzi* e pelo *T. rangeli*, parasito hemoflagelado patogênico para triatomíneos (VIEIRA et al., 2016).

Porém, faz-se necessária a realização de repetições destes experimentos empregando um número maior de insetos, com grupos experimentais alimentados com antibióticos ou não porém sem a presença da infecção a fim de confirmar estes achados. Além disso, outros estudos empregando diferentes espécies de triatomíneos e cepas de *T. cruzi* podem contribuir para confirmar a universalização destes fenômenos a todos os triatomíneos ou determinar se esta dinâmica bacterioma-vetor-parasito limita-se ao contexto cepa-triatomíneo.

10.3 Infectividade e patogenicidade em camundongos da cepa Bol-5 de *T. cruzi* desenvolvida em *T. infestans* com microbiota desequilibrada

O sucesso da infecção, replicação e instalação do *T. cruzi* sofre influência de fenômenos envolvidos no momento do primeiro contato parasito-hospedeiro (MCMENIMAN et al., 2009; MONTEÓN et al., 2009). Entretanto, até o momento, existem poucos estudos experimentais avaliando a contribuição do bacterioma intestinal de triatomíneos na infectividade do *T. cruzi*.

O curso da infecção do *T. cruzi* em hospedeiros mamíferos é variável, sofrendo influência de inúmeros fatores ligados ao hospedeiro, ao ambiente e à cepa do parasita (PINTO et al., 1986). A parasitemia produzida pela infecção por via intradérmica e intraperitoneal com fezes de *T. infestans* do grupo Controle foram iguais (Figura 14), demonstrando que na infecção pela cepa Bol-5, assim como a cepa Y (PINTO et al., 1986), a via de inoculação não contribui ou interfere com o estabelecimento da infecção, embora infecções mais uniformes e virulentas sejam obtidas após inoculações intradérmica (NEAL; MCHARDY, 1977). Porém isto não pode ser generalizado para todas as cepas de *T. cruzi*, considerando o relato de outras cepas em que a via de inoculação pode influenciar na parasitemia observada (PINTO et al., 1986; SANTANA; HAGSTROM; HECHT, 2015).

Devido a semelhante parasitemia apresentada pela infecção intraperitoneal utilizando fezes de triatomíneos infectados do grupo Antibióticos, ou seja, apresentando menor quantidade de bactérias, com a parasitemia promovida com as fezes do grupo Controle independente da via (Figura 14), sugere que possivelmente bactérias intestinais não possuem influência sobre o estabelecimento da infecção pela cepa Bol-5 quando inoculada via intraperitoneal. Este fenômeno pode se explicado devido o peritônio ser um tecido rico em macrófagos residentes (CASSADO; D'IMPERIO LIMA; BORTOLUCI, 2015) e estas células serem parasitadas pelo *T. cruzi* em vertebrados, propiciando um ambiente adequado para o estabelecimento da infecção, embora a destruição de parasito por restas células seja possível através da fagocitose (PINTO et al., 1986). Por outro lado, bactérias comensais podem ser mais suscetíveis a estas populações celulares e ainda podem ser eliminadas por outros mecanismos da imunidade como por exemplo lise pelo complemento (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2017).

Em contrapartida, a redução da parasitemia e da mortalidade dos camundongos infectados por via intradérmica com fezes de *T. infestans* com menor quantidade de bactérias (Figura 14) pode estar associada a uma menor abundância de macrófagos nestes ambientes quando comparado ao peritônio e pela inflamação e resposta imune específica induzida pelas fezes de triatomíneos no local da infecção (MONTEON et al., 2016, 2018).

Embora a infecção intradérmica de camundongos com fezes de *T. infestans* com bacterioma perturbado tenha promovido uma redução na parasitemia destes animais comparado aos camundongos infectados com fezes do grupo Controle (Figura 15), a patogenia promovida pela cepa Bol-5 não foi diferente nos camundongos de ambos o grupos.

Sugerindo que possivelmente o bacterioma intestinal contribua para à infecção apenas na fase aguda da doença.

Este conjunto de dados, associados a evidências demonstrando que a pré-exposição a fezes de triatomíneos reduz a parasitemia em camundongos (MONTEON et al., 2016) sugerem que as bactérias nas fezes podem influenciar o estabelecimento da infecção pelo *T. cruzi*. E que a ação da imunidade inata no momento da infecção tem papel crucial no estabelecimento da infecção pelo *T. cruzi*.

A leucocitose observada nos camundongos infectados, no 30º dia de infecção, demonstrou o estabelecimento de uma inflamação crônica. O aumento de monócitos na corrente sanguínea de camundongos inoculados, via intradérmica, com fezes de *T. infestans* infectados com a cepa Bol-5 de *T. cruzi*, associado a neutrofilia promovida pela inoculação via intraperitoneal (Figura 16) sugerem que o *T. cruzi* interage com a imunidade inata do hospedeiro de maneira diferente dependendo da via de infecção. Além disso, estes achados podem ser um indício de que a transmissão vetorial do *T. cruzi* é capaz de induzir o recrutamento de monócitos para o sítio de infecção, considerando evidências na literatura demonstrando a presença de 70-80% de macrófagos no sítio de infecção pelo *T. cruzi* 50 dias após a infecção (MONTEON et al., 2018).

Portanto, o bacterioma intestinal pode representar uma importante chave para compreendermos melhor a relação parasito-hospedeiro. Porém estes achados precisam ser melhor investigados, realizando experimentos avaliando a resposta imune inata e adaptativa (humoral e celular), inclusive nos contextos de maior e menor quantidade de bactérias, afim de se obter mais evidências e esclarecer melhor os fenômenos envolvidos nestes fenômenos.

11 CONCLUSÕES

O desequilíbrio qualitativo do bacterioma intestinal, promovido por Vancomicina e Gentamicina, reduz o tempo de desenvolvimento da cepa Bol-5 de *T. cruzi* em *T. infestans*.

O bacterioma intestinal de *T. infestans* influencia o estabelecimento da infecção pela cepa Bol-5 de *T. cruzi* em camundongos BALB/c dependendo da via de infecção utilizada.

O desequilíbrio do bacterioma intestinal de *T. infestans* não teve influencia na patogenia da cepa Bol-5 de *T. cruzi*.

12 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Durante este estudo foi realizado uma caracterização do bacterioma intestinal de *T. infestans* mantidos em colônias no laboratório de Protozoologia da UFSC e foram analisados aspectos relacionados à interação deste bacterioma com o *T. cruzi*, tais como o desenvolvimento do parasito no vetor e sua infectividade em camundongos BALB/c.

Os resultados apresentados neste estudo associados com outras evidências relatadas contribuem para demonstrar que o bacterioma intestinal influencia negativamente o desenvolvimento do *T. cruzi* no ambiente intestinal de *T. infestans*. E também que a presença de bactérias no momento da infecção por este parasito pode ser decisivo para o estabelecimento da infecção.

Algumas limitações contribuíram para que alguns resultados que necessitavam de melhor investigação não tenham sido explorados com maior propriedade e reconhecemos que esta é uma das limitações deste estudo. Uma das limitações biológicas foi relacionada ao número de insetos disponíveis em colônia e o tempo de desenvolvimento dos triatomíneos. O tempo experimental longo foi também um fator limitante importante, considerando que dispúnhamos de apenas dois anos e meio para a realização e conclusão do estudo.

Embora alguns experimentos tenham sido repetidos, como por exemplo o experimento de infectividade da cepa Bol-5 de *T. cruzi* desenvolvida em *T. infestans* com bacterioma intestinal com e sem desequilíbrio, e tiveram seus resultados confirmados demonstrando uma redução da parasitemia pela infecção via intradérmica de fezes *T. infestans* contendo menor quantidade de bactérias, reconhecemos a importância da repetição de todos os experimentos e os realizaremos para a realização da publicação destes resultados.

13 REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H. H.; PILLAI, A. **Cellular and Molecular Immunology**. 9ª edition, 2017.
- ALBAREDA, M. C. et al. Polyfunctional T Cell Responses in Children in Early Stages of Chronic *Trypanosoma cruzi* Infection Contrast with Monofunctional Responses of Long-term Infected Adults. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 12, p. e2575, 12 dez. 2013.
- ALVAREZ, M. G. et al. Treatment Success in *Trypanosoma cruzi* Infection Is Predicted by Early Changes in Serially Monitored Parasite-Specific T and B Cell Responses. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 4, p. e0004657, 29 abr. 2016.
- AMATO NETO, V. Origin of the “Y strain” of *Trypanosoma cruzi*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 52, n. 3, p. 171–171, jun. 2010.
- ANONYMOUS. **Recommendations from a Satellite Meeting**. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/mioc/v94s1/satmet.pdf>>. Acesso em: 19 mar. 2019.
- AZAMBUJA, P.; GARCIA, E. S.; RATCLIFFE, N. A. Gut microbiota and parasite transmission by insect vectors. **Trends in Parasitology**, v. 21, n. 12, p. 568–572, dez. 2005.
- BERN, C. et al. *Trypanosoma cruzi* and Chagas’ Disease in the United States. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 24, n. 4, p. 655–681, 1 out. 2011.
- BOLGER, A. M.; LOHSE, M.; USADEL, B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. **Bioinformatics**, v. 30, n. 15, p. 2114–2120, 1 ago. 2014.
- BOLYEN, E. et al. Qiime 2: Reproducible, interactive, scalable, and extensible microbiome data science. **PeerJ Preprints**, 6:e27295v2, 2018.
- BRAUMAN, A. et al. Molecular phylogenetic profiling of prokaryotic communities in guts of termites with different feeding habits. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 35, n. 1, p. 27–36, mar. 2001.
- BRECHER, G.; WIGGLESWORTH, V. B. The transmission of *Actinomyces rhodnii* Erikson in *Rhodnius prolixus* (hemiptera) and its influence on the growth of the host. **Parasitology**, v. 35, n. 04, p. 220, 6 mar. 1944.
- BRENER, Z. Biology of *Trypanosoma cruzi*. **Annual Review of Microbiology**, v. 27, n. 1, p. 347–382, out. 1973.
- BRENER Z. Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. **Rev Inst Med Trop São Paulo**, 4, 389-96, 1962.

- BRISSE, S.; DUJARDIN, J. C.; TIBAYRENC, M. Identification of six *Trypanosoma cruzi* lineages by sequence-characterised amplified region markers. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 111, n. 1, p. 95–105, nov. 2000.
- CALLAHAN, B. J. et al. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. **Nature Methods**, v. 13, n. 7, p. 581–583, 23 jul. 2016.
- CARDOSO, M. S.; REIS-CUNHA, J. L.; BARTHOLOMEU, D. C. Evasion of the Immune Response by *Trypanosoma cruzi* during Acute Infection. **Frontiers in immunology**, v. 6, p. 659, 2015.
- CARRASCO, H. J. et al. Genotyping of *Trypanosoma cruzi*: Systematic Selection of Assays Allowing Rapid and Accurate Discrimination of All Known Lineages. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 81, n. 6, p. 1041–1049, 1 dez. 2009.
- CASSADO, A. DOS A.; D'IMPERIO LIMA, M. R.; BORTOLUCI, K. R. Revisiting Mouse Peritoneal Macrophages: Heterogeneity, Development, and Function. **Frontiers in Immunology**, v. 6, 19 maio 2015.
- CASTRO, D. P. et al. *Trypanosoma cruzi*: Ultrastructural studies of adhesion, lysis and biofilm formation by *Serratia marcescens*. **Experimental Parasitology**, v. 117, n. 2, p. 201–207, out. 2007.
- CASTRO, D. P. et al. *Trypanosoma cruzi* Immune Response Modulation Decreases Microbiota in *Rhodnius prolixus* Gut and Is Crucial for Parasite Survival and Development. **PLoS ONE**, v. 7, n. 5, p. e36591, 4 maio 2012a.
- CASTRO, D. P. et al. Physalin B inhibits *Trypanosoma cruzi* infection in the gut of *Rhodnius prolixus* by affecting the immune system and microbiota. **Journal of Insect Physiology**, v. 58, n. 12, p. 1620–1625, dez. 2012b.
- CHOUAIA, B. et al. Delayed larval development in Anopheles mosquitoes deprived of Asaia bacterial symbionts. **BMC Microbiology**, v. 12, n. Suppl 1, p. S2, 18 jan. 2012.
- COLE, J. R. et al. Ribosomal Database Project: data and tools for high throughput rRNA analysis. **Nucleic Acids Research**, v. 42, n. D1, p. D633–D642, jan. 2014.
- COTTAGNOUD, P.; COTTAGNOUD, M.; TÄUBER, M. G. Vancomycin acts synergistically with gentamicin against penicillin-resistant pneumococci by increasing the intracellular penetration of gentamicin. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 47, n. 1, p. 144–7, jan. 2003.
- D'AVILA, D. A. et al. Probing Population Dynamics of *Trypanosoma cruzi* during Progression of the Chronic Phase in Chagasic Patients. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 47, n. 6, p. 1718–1725, 1 jun. 2009.

DA MOTA, F. F. et al. Cultivation-Independent Methods Reveal Differences among Bacterial Gut Microbiota in Triatomine Vectors of Chagas Disease. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 5, p. e1631, 1 maio 2012.

DAVIES, M. J. Detection of peroxy and alkoxy radicals produced by reaction of hydroperoxides with rat liver microsomal fractions. **The Biochemical journal**, v. 257, n. 2, p. 603–6, 15 jan. 1989.

DE LANA, M. et al. *Trypanosoma cruzi*: compared vectorial transmissibility of three major clonal genotypes by *Triatoma infestans*. **Experimental parasitology**, v. 90, n. 1, p. 20–5, set. 1998.

DECOTE-RICARDO, D. et al. Implication of Apoptosis for the Pathogenesis of *Trypanosoma cruzi* Infection. **Frontiers in Immunology**, v. 8, p. 518, 9 maio 2017.

DEVERA, R.; FERNANDES, O.; COURA, J. R. Should *Trypanosoma cruzi* be called “cruzi” complex? A review of the parasite diversity and the potential of selecting population after in Vitro culturing and mice infection. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, n. 1, p. 1–12, jan. 2003.

DIAS, E. Estudos sobre o *Schizotrypanum cruzi*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 28, n. 1, p. 1–110, fev. 1934.

DÍAZ, S. et al. Triatomine bugs, their microbiota and *Trypanosoma cruzi*: asymmetric responses of bacteria to an infected blood meal. **Parasites & vectors**, v. 9, n. 1, p. 636, 2016.

DILLON, R. J.; DILLON, V. M. THE GUT BACTERIA OF INSECTS : Nonpathogenic Interactions. **Annual Review of Entomology**, v. 49, n. 1, p. 71–92, 7 jan. 2004.

DOSREIS, G. A. Evasion of immune responses by *Trypanosoma cruzi*, the etiological agent of Chagas disease. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 44, n. 2, p. 84–90, fev. 2011.

DUARTE, G. F.; MACEDO, D. B.; LUZ, C. Simplified membrane feeding of bloodsucking triatomines (Hemiptera: Reduviidae). **Acta Tropica**, v. 174, p. 130–131, out. 2017.

DVORAK, J. A. The natural heterogeneity of *Trypanosoma cruzi*: Biological and medical implications. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 24, n. 4, p. 357–371, 1984.

DVORAK, J. A.; HYDE, T. P. *Trypanosoma cruzi*: Interaction with vertebrate cells in vitro: I. Individual interactions at the cellular and subcellular levels. **Experimental Parasitology**, v. 34, n. 2, p. 268–283, 1 out. 1973.

EICHLER, S.; SCHAUB, G. A. Development of Symbionts in Triatomine Bugs and the Effects of Infections with Trypanosomatids. **Experimental Parasitology**, v. 100, n. 1, p. 17–27, jan. 2002.

- ENGEL, P.; MORAN, N. A. The gut microbiota of insects – diversity in structure and function. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 37, n. 5, p. 699–735, set. 2013.
- ESPINOZA ECHEVERRIA, J. et al. Spatial and temporal distribution of house infestation by *Triatoma infestans* in the Toro Toro municipality, Potosi, Bolivia. **Parasites & Vectors**, v. 10, n. 1, p. 58, 2 dez. 2017.
- ESPINOZA, N.; BORRÁS, R.; ABAD-FRANCH, F. Chagas Disease Vector Control in a Hyperendemic Setting: The First 11 Years of Intervention in Cochabamba, Bolivia. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 4, p. e2782, 3 abr. 2014.
- GAIO, A. DE O. et al. Contribution of midgut bacteria to blood digestion and egg production in *Aedes aegypti* (diptera: culicidae) (L.). **Parasites & Vectors**, v. 4, n. 1, p. 105, 14 jun. 2011.
- GARCIA, E.; GONZALEZ, M.; AZAMBUJA, P. Biological factors involving *Trypanosoma cruzi* life cycle in the invertebrate vector, *Rhodnius prolixus*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94, n. suppl 1, p. 213–216, set. 1999.
- GARCIA, E. S. et al. Absorption, storage, organ distribution, and excretion of dietary [22,23-3H2]dihydroazadirachtin A in the blood-feeding bug, *Rhodnius prolixus*. **Journal of Insect Physiology**, v. 35, n. 10, p. 743–749, 1 jan. 1989.
- GARCIA, E. S. et al. Interactions between intestinal compounds of triatomines and *Trypanosoma cruzi*. **Trends in Parasitology**, v. 26, n. 10, p. 499–505, out. 2010.
- GIGLEY, J. P. et al. T cell exhaustion in protozoan disease. **Trends in Parasitology**, v. 28, n. 9, p. 377–384, set. 2012.
- GRACASOUZA, A. et al. Adaptations against heme toxicity in blood-feeding arthropods. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 36, n. 4, p. 322–335, abr. 2006.
- GREENAWAY, C.; CASTELLI, F. Infectious diseases at different stages of migration: an expert review. **Journal of Travel Medicine**, v. 26, n. 2, 1 fev. 2019.
- GRISARD, E. C. et al. Characterization of *Trypanosoma rangeli* Strains Isolated in Central and South America: an Overview. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94, n. 2, p. 203–209, mar. 1999.
- GUMIEL, M. et al. Characterization of the microbiota in the guts of *Triatoma brasiliensis* and *Triatoma pseudomaculata* infected by *Trypanosoma cruzi* in natural conditions using culture independent methods. **Parasites & Vectors**, v. 8, n. 1, p. 245, 24 dez. 2015.
- HARRINGTON, J. S. Studies on *Rhodnius prolixus*: growth and development of normal and sterile bugs, and the symbiotic relationship. **Parasitology**, v. 50, p. 279–86, maio 1960.
- HILL, P.; CAMPBELL, J. A.; PETRIE, I. A. *Rhodnius prolixus* and its symbiotic actinomycete: a microbiological, physiological and behavioural study. **Proceedings of the**

Royal Society of London. Series B. Biological Sciences, v. 194, n. 1117, p. 501–525, 12 nov. 1976.

INST OSWALDO CRUZ, M. et al. **A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/mioc/v104n7/21.pdf>>. Acesso em: 19 mar. 2019.

JURBERG, J.; GALVÃO, C. Biology, ecology and systematics of Triatominae (Heteroptera, Reduviidae) vectors of Chagas’ disease and implications for human health. *Denisia*, v. 19, p. 1096-1116, 2006.

KENNEDY, E. A.; KING, K. Y.; BALDRIDGE, M. T. Mouse Microbiota Models: Comparing Germ-Free Mice and Antibiotics Treatment as Tools for Modifying Gut Bacteria. **Frontiers in Physiology**, v. 9, p. 1534, 31 out. 2018.

KOLLIEN, A. H. et al. Ionic composition of the rectal contents and excreta of the reduviid bug *Triatoma infestans*. **Journal of insect physiology**, v. 47, n. 7, p. 739–747, jul. 2001.

KOLLIEN, A. H.; SCHAUB, G. A. The development of *Trypanosoma cruzi* in triatominae. **Parasitology today (Personal ed.)**, v. 16, n. 9, p. 381–7, set. 2000.

KRESS, Y. et al. Resistance of *Trypanosoma cruzi* to killing by macrophages. **Nature**, v. 257, n. 5525, p. 394–396, out. 1975.

LAKE, P.; FRIEND, W. G. The use of artificial diets to determine some of the effects of *Nocardia rhodnii* on the development of *Rhodnius prolixus*. **Journal of insect physiology**, v. 14, n. 4, p. 543–62, abr. 1968.

LANGE, U. et al. Biochemical Characterization of a Thrombin Inhibitor from the Bloodsucking Bug “*Dipetalogaster maximus*”; **Pathophysiology of Haemostasis and Thrombosis**, v. 29, n. 4, p. 204–211, 1999.

LEE, Y. K.; MAZMANIAN, S. K. Has the Microbiota Played a Critical Role in the Evolution of the Adaptive Immune System? **Science**, v. 330, n. 6012, p. 1768–1773, 24 dez. 2010.

LIDANI, K. C. F. et al. The Complement System: A Prey of *Trypanosoma cruzi*. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 607, 20 abr. 2017.

LOWY, F. D.; CHANG, D. S.; LASH, P. R. Synergy of combinations of vancomycin, gentamicin, and rifampin against methicillin-resistant, coagulase-negative *staphylococci*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 23, n. 6, p. 932–4, jun. 1983.

LUNA-GOMES, T. et al. Neutrophils Increase or Reduce Parasite Burden in *Trypanosoma cruzi*-Infected Macrophages, Depending on Host Strain: Role of Neutrophil Elastase. **PLoS ONE**, v. 9, n. 3, p. e90582, 5 mar. 2014.

- MACEDO, A. M. et al. DNA fingerprinting of *Trypanosoma cruzi*: A new tool for characterization of strains and clones. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 55, n. 1–2, p. 147–153, 1 out. 1992.
- MACHADO, P. E. et al. Differential susceptibility of triatomines of the genus *Rhodnius* to *Trypanosoma rangeli* strains from different geographical origins. **International journal for parasitology**, v. 31, n. 5–6, p. 632–4, 1 maio 2001.
- MCMENIMAN, C. J. et al. Stable Introduction of a Life-Shortening *Wolbachia* Infection into the Mosquito *Aedes aegypti*. **Science**, v. 323, n. 5910, p. 141–144, 2 jan. 2009.
- MEIJER, W. G.; PRESCOTT, J. F. *Rhodococcus equi*. **Veterinary Research**, v. 35, n. 4, p. 383–396, jul. 2004.
- MESQUITA, R. D. et al. *Trypanosoma cruzi* Infection Is Enhanced by Vector Saliva through Immunosuppressant Mechanisms Mediated by Lysophosphatidylcholine. **Infection and Immunity**, v. 76, n. 12, p. 5543–5552, 1 dez. 2008.
- MONCAYO, A.; SILVEIRA, A. C. Current epidemiological trends for Chagas disease in Latin America and future challenges in epidemiology, surveillance and health policy. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104 Suppl 1, p. 17–30, jul. 2009.
- MONTEON, V. et al. Pre-exposure to faeces or saliva of *Triatoma dimidiata* decreases parasitemia in mice challenged with *Trypanosoma cruzi*: a description of the inflammatory reaction at the inoculation site. **Annals of parasitology**, v. 62, n. 3, p. 209–219, 2016.
- MONTEON, V. et al. Feces from wild *Triatoma dimidiata* induces local inflammation and specific immune response in a murine model. **Annals of parasitology**, v. 64, n. 4, p. 367–377, 2018.
- MONTEÓN, V. et al. Cytokine Expression at the Inoculation Site and Nearby Tissues in an Animal Model Infected with Metacyclic Trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. **Tropical Medicine and Health**, v. 37, n. 4, p. 141–147, 2009.
- MONTEÓN, V. M. et al. American Trypanosomosis: In Situ and Generalized Features of Parasitism and Inflammation Kinetics in a Murine Model. **Experimental Parasitology**, v. 83, n. 3, p. 267–274, ago. 1996.
- MONTGOMERY, S. P. et al. Neglected Parasitic Infections in the United States: Chagas Disease. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 90, n. 5, p. 814–818, 7 maio 2014.
- MONTOYA-PORRAS, L. M. et al. 16S rRNA gene amplicon sequencing reveals dominance of Actinobacteria in *Rhodnius pallescens* compared to *Triatoma maculata* midgut microbiota in natural populations of vector insects from Colombia. **Acta Tropica**, v. 178, p. 327–332, fev. 2018.

NEAL, R. A.; MCHARDY, N. Comparison of infectivity of *Trypanosoma cruzi* blood stream trypomastigotes and metacyclic trypomastigotes from *Rhodnius prolixus*. **Acta tropica**, v. 34, n. 1, p. 79–85, mar. 1977.

NEARING, J. T. et al. Denoising the Denoisers: an independent evaluation of microbiome sequence error-correction approaches. **PeerJ**, v. 6, p. e5364, 8 ago. 2018.

O'TOOLE, P.; FLEMER, B. Studying the Microbiome: “Omics” Made Accessible. **Seminars in Liver Disease**, v. 36, n. 04, p. 306–311, 20 dez. 2016.

OLIVEIRA, R. P. et al. **Probing the genetic population structure of *Trypanosoma cruzi* with polymorphic microsatellites** *Genetics*. Disponível em: <www.pnas.org.>. Acesso em: 19 mar. 2019.

PERLOWAGORA-SZUMLEWICZ, A. et al. In vivo differentiation of *Trypanosoma cruzi* - 1. Experimental evidence of the influence of vector species on metacyclogenesis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 89, n. 4, p. 603–618, dez. 1994.

PINTO, F. H. et al. Estudo comparativo do comportamento da infecção de camundongos, através da inoculação subcutânea e intraperitoneal, utilizando-se duas cepas do *Trypanosona cruzi*. **Revista de Saúde Pública**, v. 20, n. 2, p. 133–140, abr. 1986.

PINTO, J.-J. et al. Characterization of digestive disorders of patients with chronic Chagas disease in Cochabamba, Bolivia. **Heliyon**, v. 5, n. 2, p. e01206, fev. 2019.

REY, L. **Parasitologia: parasitos e doenças parasitárias do homem nos trópicos ocidentais**. [s.l.] Guanabara Koogan, 2008.

RIBEIRO, J. M. Blood-feeding arthropods: live syringes or invertebrate pharmacologists? **Infectious agents and disease**, v. 4, n. 3, p. 143–52, set. 1995.

RODRÍGUEZ-RUANO, S. M. et al. Microbiomes of North American Triatominae: The Grounds for Chagas Disease Epidemiology. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 1167, 13 jun. 2018.

ROGNES, T. et al. VSEARCH: a versatile open source tool for metagenomics. **PeerJ**, v. 4, p. e2584, 18 out. 2016.

ROSENFELD, G. Corante pancrômico para hematologia e citologia clínica. Nova combinação dos componentes do may-grunwald e do giemsa num só corante de emprego rápido. **Mem. Inst. Butantan**, v. 20, p. 329–335, 1947.

SAMBROOK, J; FRITSCH, E.F.; AND MANIATIS, T. **Molecular Cloning: A laboratory manual**. Third Edit ed. [s.l: s.n.].

SANTANA, C. A.; HAGSTROM, L.; HECHT, M. M. **Influência da via de transmissão do *Trypanosoma cruzi* na carga parasitária e produção de anticorpos específicos**. Universidade de Brasília, 2015.

SCHAUB, G. A. *Trypanosoma cruzi*: quantitative studies of development of two strains in small intestine and rectum of the vector *Triatoma infestans*. **Experimental parasitology**, v. 68, n. 3, p. 260–73, abr. 1989.

SCHAUB, G. A.; EICHLER, S. The effects of aposymbiosis and of an infection with *Blastocrithidia triatoma* (Trypanosomatidae) on the tracheal system of the reduviid bugs *Rhodnius prolixus* and *Triatoma infestans*. **Journal of insect physiology**, v. 44, n. 2, p. 131–140, fev. 1998.

SCHAUB, G. A.; LÖSCH, P. *Trypanosoma cruzi*: origin of metacyclic trypomastigotes in the urine of the vector *Triatoma infestans*. **Experimental parasitology**, v. 65, n. 2, p. 174–86, abr. 1988.

SCHOFIELD, C. J.; GALVÃO, C. Classification, evolution, and species groups within the Triatominae. **Acta tropica**, v. 110, n. 2–3, p. 88–100, 2009.

SCHUSTER, J. P.; SCHAUB, G. A. *Trypanosoma cruzi*: skin-penetration kinetics of vector-derived metacyclic trypomastigotes. **International journal for parasitology**, v. 30, n. 14, p. 1475–9, dez. 2000.

SIEUWERTS, A. M. et al. The MTT tetrazolium salt assay scrutinized: how to use this assay reliably to measure metabolic activity of cell cultures in vitro for the assessment of growth characteristics, IC50-values and cell survival. **European journal of clinical chemistry and clinical biochemistry: journal of the Forum of European Clinical Chemistry Societies**, v. 33, n. 11, p. 813–23, nov. 1995.

SOARES, T. S. et al. A Kazal-type inhibitor is modulated by *Trypanosoma cruzi* to control microbiota inside the anterior midgut of *Rhodnius prolixus*. **Biochimie**, v. 112, p. 41–48, maio 2015.

STEINDEL, M. **Caracterização de cepas de *Trypanosoma cruzi* e *Trypanosoma rangeli* isoladas de reservatórios e vetores silvestres naturalmente infectados de Santa Catarina**. Universidade Federal de Santa Catarina, 1993.

STURM, N. R.; CAMPBELL, D. A. Alternative lifestyles: The population structure of *Trypanosoma cruzi*. **Acta Tropica**, v. 115, n. 1–2, p. 35–43, jul. 2010.

SUÁREZ MOYA, A. **Microbiome and next generation sequencing Microbioma y secuenciación masiva** *Secuenciación masiva Rev Esp Quimioter*. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<https://seq.es/seq/0214-3429/30/5/suarez17jul2017.pdf>>. Acesso em: 19 mar. 2019.

TAKEHARA, H. A. et al. *Trypanosoma cruzi*: Role of different antibody classes in protection against infection in the mouse. **Experimental Parasitology**, v. 52, n. 1, p. 137–146, 1 ago. 1981.

TALVANI, A. et al. Kinetics of cytokine gene expression in experimental chagasic cardiomyopathy: tissue parasitism and endogenous IFN-gamma as important determinants

of chemokine mRNA expression during infection with *Trypanosoma cruzi*. **Microbes and infection**, v. 2, n. 8, p. 851–66, jul. 2000.

TEIXEIRA, A. R. L. et al. Pathogenesis of Chagas' Disease: Parasite Persistence and Autoimmunity. **CLINICAL MICROBIOLOGY REVIEWS**, v. 24, n. 3, p. 592–630, 2011.

THOMAS, T.; GILBERT, J.; MEYER, F. Metagenomics - a guide from sampling to data analysis. **Microbial informatics and experimentation**, v. 2, n. 1, p. 3, 9 fev. 2012.

TIBAYRENC, M. et al. Natural populations of *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease, have a complex multiclonal structure. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 83, n. 1, p. 115–9, jan. 1986.

VAN DE LOOSDRECHT, A. A. et al. Cell mediated cytotoxicity against U 937 cells by human monocytes and macrophages in a modified colorimetric MTT assay. A methodological study. **Journal of immunological methods**, v. 141, n. 1, p. 15–22, 26 jul. 1991.

VAN DER ZEE, J.; BARR, D. P.; MASON, R. P. ESR spin trapping investigation of radical formation from the reaction between hematin and tert-Butyl hydroperoxide. **Free radical biology & medicine**, v. 20, n. 2, p. 199–206, 1996.

VIEIRA, C. et al. Humoral responses in *Rhodnius prolixus*: bacterial feeding induces differential patterns of antibacterial activity and enhances mRNA levels of antimicrobial peptides in the midgut. **Parasites & Vectors**, v. 7, n. 1, p. 232, 20 maio 2014.

VIEIRA, C. et al. Impact of *Trypanosoma cruzi* on antimicrobial peptide gene expression and activity in the fat body and midgut of *Rhodnius prolixus*. **Parasites & Vectors**, v. 9, n. 1, p. 119, 1 dez. 2016.

VIEIRA, C. S. et al. *Rhodnius prolixus* interaction with *Trypanosoma rangeli*: modulation of the immune system and microbiota population. **Parasites & Vectors**, v. 8, n. 1, p. 135, 1 mar. 2015.

WANG, B.; YAO, M.; LV, L.; LING, Z.; LI, L. The Human Microbiota in Health and Disease. **Engineering**, v 3, 71-82, 12 jan 2017.

WANG, Y.; QIAN, PY. Conservative fragments in bacterial 16S rRNA genes and primer design for 16S ribosomal DNA amplicons in metagenomic studies. **Plos One**, v. 4, n 10, e7401, oct. 2009.

WATANAKUNAKORN, C.; BAKIE, C. Synergism of vancomycin-gentamicin and vancomycin-streptomycin against enterococci. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 4, n. 2, p. 120–4, ago. 1973.

WEISS, B.; AKSOY, S. Microbiome influences on insect host vector competence. **Trends in Parasitology**, v. 27, n. 11, p. 514–522, nov. 2011.

WHO *data sheet*, 2019. Disponível em: <https://www.who.int/chagas/epidemiology/en/>

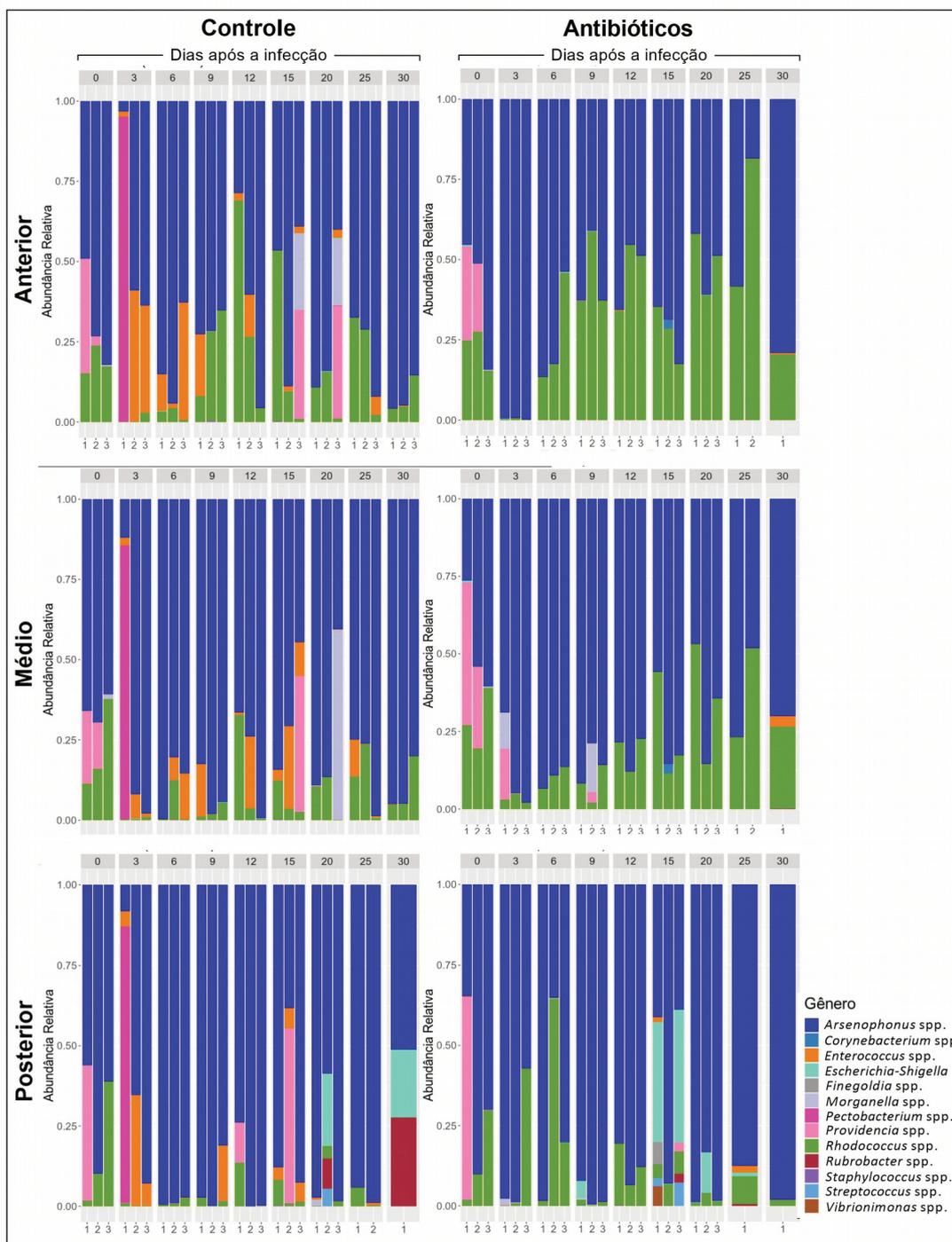
WIGGLESWORTH, V. B. The physiology of excretion in a blood sucking insect, *Rhodnius prolixus* (Hemiptera, Reduviidae) I. Composition of the urine. **J. exp.**, v. 8, p. 411–427, 1931.

ZELEDON, R.; RABINOVICH, J. E. Chagas Disease: an Ecological Appraisal With Special Emphasis on its Insect Vectors. **Annual Review of Entomology**, v. 26, n. 1, p. 101–133, jan. 1981.

ZINGALES, B. et al. The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: Rationale, epidemiological relevance and research applications. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 12, n. 2, p. 240–253, 1 mar. 2012.

ANEXO 1

Figura 17: Comportamento da comunidade bacteriana intestinal de *Triatoma infestans* de colônia após alimentação de cada triplicata biológica.



Legenda: Abundância relativa de OTU em cada triplicata nas diferentes porções intestinais durante 30 dias após alimentação artificial com sangue murino contendo 1 mg/ml de vancomicina e 1 mg/ml de gentamicina (Antibióticos) ou não (Controle). Foram avaliadas as porções anterior (A), média (B) e posterior (C). N igual a 3 ninfas de 5º estágio larval por triplicata em ponto experimental.