



UFRRJ

INSTITUTO DE BIOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL

TESE

**CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA, PERFIL PROTEÔMICO,
STATUS REDOX E EXPRESSÃO DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES
EM ISOLADOS DE *TRYPANOSOMA CRUZI* (Z3), PROVENIENTES
DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO, BRASIL**

CRISTINA SANTOS DA SILVA

Março

2016



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE BIOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL

CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA, PERFIL PROTEÔMICO, STATUS REDOX E
EXPRESSION DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES EM ISOLADOS DE TRYPANOSOMA
CRUZI (Z3), PROVENIENTES DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO, BRASIL

CRISTINA SANTOS DA SILVA

Prof. Dra Jacenir Reis dos Santos Mallet

Tese submetida como
requisito parcial para
obtenção do grau de
Doutor em Ciências, no
Programa de Pós-
Graduação em Biologia
Animal.

Seropédica, RJ

Março de 2016

571.994

S586c

T

Silva, Cristina Santos da, 1972-
Caracterização morfológica,
perfil proteômico, status redox e
expressão de enzimas antioxidantes
em isolados de Trypanosoma Cruzi
(Z3), provenientes do Estado do Rio
de Janeiro, Brasil / Cristina Santos
da Silva. - 2016.

103 f.: il.

Orientador: Jacenir Reis dos
Santos Mallet.

Tese (doutorado) - Universidade
Federal Rural do Rio de Janeiro,
Curso de Pós-Graduação em Biologia
Animal, 2016.

Bibliografia: f. 79-103.

1. Protozoário patogênico -
Teses. 2. Tripanossoma cruzi -
Morfologia - Teses. 3. Chagas,
Doença de - Teses. 4. Tripanossoma
cruzi - Rio de Janeiro (Estado) -
Teses. I. Mallet, Jacenir Reis dos
Santos, 1958- II. Universidade
Federal Rural do Rio de Janeiro.
Curso de Pós-Graduação em Biologia
Animal. III. Título.

Março de 2016

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE BIOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL**

CRISTINA SANTOS DA SILVA

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Ciências**, no Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, área de Concentração em Biologia Animal.

TESE APROVADA EM 31/03/2016



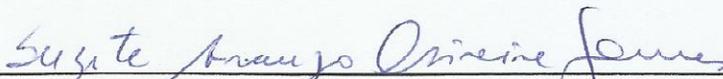
Dra. Jacenir Reis dos Santos Mallet (FIOCRUZ)



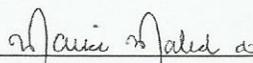
Dra. Celeste da Silva Freitas de Souza (FIOCRUZ)



Dra. Helena Keiko Toma (UFRJ)



Dra. Suzete Araújo Oliveira Gomes (UFJF)



Dra. Marise Maleck de Oliveira (USS)

Dedico à Deus.

*Aos meus pais, especialmente minha
mamãe Luzia Santos da Silva;*

*Aos meus irmãos, Cristiane Santos da
Silva e Júlio César Santos da Silva;*

*Aos meus sobrinhos Vitor Hugo e
Maria Luisa e ao meu amor maior, meu
filho Thiago por me apoiarem sempre
com muito amor e carinho em todos os
momentos de minha trajetória...*

*Dedico à Dra. Jacenir Reis
dos Santos Mallet, minha
orientadora pelo apoio,
ensinamentos, carinho e
paciência em todos esses anos*

AGRADECIMENTOS

À minha eterna orientadora Dra. Jacenir Reis dos Santos Mallet por todos os ensinamentos, incentivo e especialmente por acreditar e confiar em meu trabalho ao longo da minha carreira científica.

À Dra. Teresa Cristina Monte Gonçalves e Catarina Macedo Lopes pelo incentivo e ensinamentos e apoio constante desde o meu ingresso ao antigo Núcleo de Morfologia e Ultraestrutura de Artrópodes Vetores, ainda na Iniciação Científica, hoje LIVEDIH.

Aos integrantes o Laboratório de Biologia Molecular do Instituto Pasteur (UY), em especial ao Dr. Carlos Robello, Dra. Dolores Piñero e Dra. Adriana Parodi e a técnica María Paula Faral por toda atenção e ensinamentos sobre Biologia Molecular no período do estágio PDSE- CAPES. Muito obrigada.

Sou grato à CAPES pela concessão da bolsa, pois sem auxílio financeiro seria impossível desenvolver este trabalho.

À Agra e Janaína, secretárias da Pós-graduação em Biologia Animal da UFRRJ, que me ajudaram muito no decorrer do curso.

Ao programa de Pós-Graduação em Biologia Animal da UFRRJ, ao Prof. Dr. Gerson Araújo pela atenção e atendimento prestado.

Aos professores do Curso de Pós-Graduação em Biologia Animal da UFRRJ por todos os preciosos ensinamentos.

Agradeço a todos os integrantes do LIVEDIH em especial, a Dra. Ana Laura Carbajal de la Fuente, pelos ensinamentos, disponibilidade, apoio e amizade sempre. Ao biólogo Bento Mochcovitch, as mestras Aline Baffa, Ariane e Josiane. Às doutoras Cecilia Sthal e Simone Freitas aos doutorandos Nathanielly Rocha, Michele Serdeiro, William Marques, Juliana Santos, Simone Teves, aos mestrandos Amanda Queirós e Alexandre Araújo, à técnica Raquel, pela amizade, momentos de descontração e boas risadas, muito obrigada!

Ester Lucia e Carla Saldanha, secretárias do Departamento de Entomologia do Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz, pela atenção, e ajuda, meu muito obrigada.

Ao Serviço de Importação e Exportação da FIOCRUZ, em especial para Karla Fernandes e Marcelo Marques pelo apoio, responsabilidade e cuidado constante no envio das amostras.

Sou grata ao Instituto Oswaldo Cruz por me permitir utilizar seu espaço físico para realizar grande parte de meus experimentos

À minha amiga Sabina Victória por estar presente em todos os momentos, muito obrigada.

Aos integrantes do Laboratório de Ultraestrutura Celular IOC-FIOCRUZ, em especial à Dra Miriam Claudia Pereira, Renata e Liliane, Alanderson por todo apoio durante os experimentos realizados no laboratório.

E a todos aqueles que me ajudaram direta ou indiretamente que por ventura eu não tenha citado, meu muito obrigada.

RESUMO

Silva, Cristina Santos. **Caracterização Morfológica, Perfil Proteômico, Status Redox e Expressão de Enzimas Antioxidantes em Isolados de *Trypanosoma Cruzi* (Z3), provenientes do Estado do Rio de Janeiro, Brasil.** Tese (Doutorado em Biologia Animal). Instituto de Biologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica-RJ, 2016.

A doença de Chagas ou tripanossomíase americana é uma importante doença parasitária nas Américas e ainda hoje é considerada uma das principais doenças tropicais negligenciadas acometendo milhões de pessoas no mundo devido à falta de controle efetivo. Desta forma, apresenta um impacto significativo sobre a saúde humana. Esta enfermidade tem sua epidemiologia condicionada pelos triatomíneos e os mamíferos e tem como agente etiológico o protozoário *Trypanosoma cruzi*. Investigações sobre os mecanismos de adaptação, regulação gênica e interação parasito x vetor evoluíram, o que comprova a necessidade da utilização de ferramentas moleculares para o estudo e elucidações sobre as mudanças adaptativas ocorridas nestes parasitos. Recentemente evidências surgiram neste sentido, onde estudos indicam que a expressão de enzimas antioxidantes do *T. cruzi* tais como: peroxirredoxinas citosólica (TcCPx), mitocondriais (TcMPx), (TcAPX) e tripanotiona sintetase (TXNI, TXNII), superóxido dismutase (SOD A e SOD B) podem fazer parte do sistema protetivo do parasito e indicar fatores relacionados aos diferentes níveis de virulência deste agente etiológico. Desta forma, análises proteômica e avaliação da expressão de enzimas antioxidantes de diferentes compartimentos subcelulares podem corroborar para com os estudos relacionados aos índices de virulência e expressão de proteínas envolvidas neste processo. Neste sentido, os objetivos deste trabalho foram avaliar a morfologia dos isolados das amostras SMM98, 36 e 1, analisar além do perfil proteômico, a expressão de enzimas antioxidantes (TcCPx; TcMPx; TcAPx; TcTXNI; TcTXNII, SOD A e SOD B) e observar a expressão do status redox utilizando os isolados SMM36 e SMM98 em comparação com as cepas TCC, Silvio e DM28c. Os resultados obtidos demonstraram aspectos morfológicos diferenciados dentre os isolados, níveis de virulência elevados, perfil de proteínas variados quando comparados entre os isolados SMM98 e SMM36. E, quando tratados com Heme e NAC foram observadas alterações no desenvolvimento dos parasitos, denotando a participação do Status Redox frente aos isolados do Rio de Janeiro utilizados neste estudo.

Palavras-chave: *Trypanosoma cruzi*, enzimas antioxidantes, proteômica, status redox

ABSTRACT

Silva, Cristina Santos. **Morphological characterization, proteomic profile, redox status and expression of antioxidant enzymes in *Trypanosoma cruzi* isolates from the state of the Rio de Janeiro, Brazil.** Tese (Doutorado em Biologia Animal). Instituto de Biologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica-RJ, 2016.

Chagas' Disease or American trypanosomiasis is an important parasitic disease in the Americas and is still considered one of the major neglected tropical diseases affecting millions of people worldwide due to lack of effective control. Thus, it has a significant impact on human health. This disease has its epidemiology conditioned by triatomines and mammals and its etiological agent is the protozoan *Trypanosoma cruzi*. Investigations on the adaptation mechanisms, gene regulation and parasite interaction vs. vector evolved, which proves the need for the use of molecular tools for the study and elucidation on adaptive changes in these parasites. Recently, it was found evidence where studies indicate that the expression of *T. cruzi*'s antioxidant enzymes such as cytosolic peroxiredoxin (TcCPx), mitochondrial peroxiredoxin (TcMPx), (TcAPX) and trypanothione synthetase (TXNI, TXNII), superoxide dismutase (SOD A and SOD B) can be part of parasite's protective system and indicate factors related to different levels of virulence of the etiological agent. Thus, proteomics analysis and evaluation of the expression of antioxidant enzymes from different subcellular compartments can corroborate to the studies related to virulence indices and expression of proteins involved in this process. In this sense, the objectives of this study were to evaluate the morphology of the isolated samples SMM98, SMM36 and SMM1, analyze beyond the proteomic profile, the expression of antioxidant enzymes (TcCPx; TcMPx; TcAPx; TcTXNI; TcTXNII, SOD A and SOD B) and observe the redox status expression using isolates SMM36 and SMM98 in comparison with strains TCC, Silvio and DM28c. The results showed different morphology from the isolated, high levels of virulence, varied protein profile comparison between SMM98 isolated and SMM36, when treated with NAC and Heme changes were observed in the development of the parasites, indicating the participation of the Redox Status of the Rio de Janeiro used in this study.

Key words: *Trypanosoma cruzi*, antioxidant enzymes, proteomic, redox status

LISTA DE ABREVIATURAS

- ADNr-** DNAREcombinante
- ASC-** Ascorbato
- APS-** Persulfato e Amônio
- APX-** Ascorbato Peroxidase
- BHI-** Infusão de Cérebro e Coração
- BSA-** Soro de Albumina Bovino
- CHAPS- 3-** cholamidopropil-dimetil-amino-1-propano-sulfonato
- CTE-** Cadeia transportadora de elétrons
- DABCO-**Diazabicyclo[2.2.2]octano
- DAPI-** (4',6-diamidino-2phenilindol)
- DC-** Doença de Chagas
- DHA-** Dehidroascorbato
- DM28c-** Cepa de *Trypanosoma cruzi* isolada de *Didelphis marsupialis*
- DNA-** ÁcidoDesoxirribonucléico
- DTUs-** Unidades de Tipificação discreta
- DTT-**Ditiotreitol
- Fe-SOD-** Ferro superóxido Dismutase
- FRD-** Fumarato Redutase
- GSH-** Glutathiona
- GPX-** Glutathiona-dependente-peroxidase
- GRX-** Glutaredoxina
- HCl** – Ácido Clorídrico
- HRM-** Análise de Alta Resolução de Fusão
- HSPs-** Proteínas de Choque Térmico
- HZ** - Hemozoína
- H₂O-** Composição Química da Fórmula da Água
- H₂O₂.** Peróxido de Hidrogênio
- IEF-** Focalização Isoelétrica

IL-12- Interleucina
IPG – pH Imobilizado
LIT- Infusão de Fígado e Triptose
LOOH- Hidroperóxidos Orgânicos
mA- Mili amper
ml- Mililitro
MLMT- Tipificação por Microsatélite Multi Locus
MLEE- Técnica de Multilocus Enzimo Eletroforesis
mM- Milimolar
NAC N- Acetil Cisteína
NADH- Dinucleotídeo de Nicotinamina e Adenina
NF-KB- Fator nuclear Kappa B
NO-Óxido Nitrito
NNN- (Neal, Novy, Nicolle) meio de cultura, ágar-sangue
NRS- Espécies Nitroge-Reativas
°C- Graus Celsius
O₂⁻- Superóxido
ONOO- Peroxinitrito
PBS- Tampão Salina Fosfato
PCR – Reação em Cadeia Polimerase
PFA- Paraformaldeído
pH- Potencial Hidrogeniônico
pK- Cologarítimo da Constante Ionização
PPP- Pentose via Fosfato
Prxs- Peroxiredoxinas
RAPD-Polimorfismo do DNA Amplificado ao Acaso

RFLP- Polimorfismo no Comprimento de Fragmentos

ROS- Espécies Reativas de Oxigênio

SDS-PAGE

SFB- Soro Fetal Bovino

SL-IV Spliced Leader

SOD- Superóxido Dismutase

TBS- Tampão Salina TRIS

TCC- Cepa de *Trypanosoma cruzi* isolada de caso atenuado da (DC)

TR- Tripanotiona

TS – Tripanotiona Sintetase

Tc- *Trypanosoma cruzi*

TcCPX- Triparedoxina Citosólica

TcTXNPx- Tripanotiona Redutase

TcMPx- Triparedoxina Mitocondrial

TS₂-Tripanotiona Oxidada

T(SH)₂-Tripanotiona

TPX- Tripanoredoxina

TXN-Triparedoxina

V- Volts

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Mapa demonstrativo: Estimativa de casos de infecção por <i>T. cruzi</i>	1
Figura 2	Distribuição epidemiológica- DTUs	5
Figura 3	Ciclo de vida de <i>Trypanosoma cruzi</i>	6
Figura 4	Estrutura do grupo prostético do Heme	8
Figura 5	Distribuição subcelular da rede antioxidante em <i>T. cruzi</i>	11
Figura 6	Áreas de captura de <i>Triatoma vitticeps</i> (Google maps)	22
Figura 7	Mapa com áreas de captura de <i>Triatoma vitticeps</i>	23
Figura 8	Parâmetros avaliados para realização do estudo morfométrico	24
Figura 9	Alimentação Artificial	26
Figura 10	Os insetos tratados com HEME e NAC	27
Figura 11	Regressão linear com média das duplicatas	30
Figura 12	Análise dos Componentes Principais (PCA) - epimastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i>	39
Figura 13	Status Redox-Metaciclo gênese <i>in vitro</i> - formas epimastigotas: NAC (SMM98-área A)	42
Figura 14	Status Redox-Metaciclo gênese <i>in vitro</i> -formas tripomastigotas: NAC (SMM98-área A)	43
Figura 15	Status Redox-Metaciclo gênese <i>in vitro</i> - formas epimastigotas: NAC (SMM36-área B)	47
Figura 16	Status Redox-Metaciclo gênese <i>in vitro</i> - formas tripomastigotas: Heme e NAC SMM36-área B)	48
Figura 17	Gel com Proteínas totais 1 Marcador molecular; 2 SMM36; 3 TCC; 4 Silvio -Gel SDS 10% - coloração em Comassie blue	49
Figura 18	Quantificação das proteínas expressas no gel SDS Page	50
Figura 19	Proteínas identificadas 7 cm (Corado por Prata) pH 3-10; 23b- Proteínas ampliadas pH 4-7 (17 cm) - SMM 98 (área A) epimastigotas	51
Figura 20	Quantificação das proteínas (SMM98- área A) expressadas por análise proteômica	52
Figura 21	Proteínas identificadas 7 cm (Corado por Prata) pH 3-10; 25b: proteínas ampliadas pH 4-7 (17 cm) - SMM 36 (área B) epimastigotas	53
Figura 22	Quantificação das proteínas (SMM36)- área B expressadas por análise proteômica	54
Figura 23	Análise Proteômica Comparativa A e B de proteínas expressas em SMM98 (área A) e SMM36 (area B)	55
Figura 24	Western Blotting – Expressão de APX em epimastigotas; 28a e b Ampliação da dos spots	56
Figura 25	Normalização com Tubulina -Anticorpo: APX Ascorbato Peroxidase	57
Figura 26	Western Blotting – 30a Expressão de TcCPX em epimastigotas; 30b Ampliação da dos spots	58
Figura 27	Normalização com Tubulina -Anticorpo: TcCPX – Triparedoxina peroxidase citosólica	58
Figura 28	Western Blotting – Expressão de TcMPX em epimastigotas; 18b	59

	Ampliação da dos spots	
Figura 29	Normalização com Tubulina-Anticorpo: TcMPX - Triparedoxina peroxidase mitocondrial	59
Figura 30	Western Blotting – Expressão de SOD A em epimastigotas; 34b Ampliação da dos spots	60
Figura 31	Normalização com Tubulina (55KDa) -Anticorpo: Superóxido dismutase- SOD A	61
Figura 32	Western Blotting – Expressão de SOD B em epimastigotas; 36b Ampliação da dos spots	62
Figura 33	Normalização com Tubulina (55KDa) -Anticorpo: Superóxido dismutase- SOD B	63
Figura 34	Western Blotting – Expressão de APX em epimastigotas; 38b Ampliação da dos spots	64
Figura 35	Normalização com Tubulina (55KDa)-Anticorpo: Tripanoredoxina	64
Figura 36	Normalização com Tubulina -Anticorpo: TcCPX – Triparedoxina peroxidase citosólica	65
Figura 37	Imunofluorescência: TcCPX- SMM36	67
Figura 38	Imunofluorescência DAPI+ Rodamina: TcCPX- SMM36	67
Figura 39	Imunofluorescência: TcMPX- SMM36	68
Figura 40	Imunofluorescência: TcMPX- Dm28c	69
Figura 41	Imunofluorescência: TcCPX- DM28c	70
Figura 42	Análise Ultraestrutural da Triparedoxina Peroxidase Citosólica (TcCPX) e Mitocondrial (TcMPX) peroxiredoxinas in <i>T. cruzi</i> .	71

LISTA DE TABELAS

Tabela I: Soluções para preparar o gel de separação para SDS-PAGE.....	31
Tabela II: Medidas das formas epimastigotas (μm) de <i>Trypanosoma cruzi</i> encontradas no 10º dia da curva de crescimento.....	37
Tabela III: Medidas das formas tripomastigotas (μm) de <i>Trypanosoma cruzi</i> encontradas no 17º ao 20º dia da curva de crescimento.....	38
Tabela IV: SMM 98(A): Metaciclogênese e Status Redox no Intestino de <i>Rhodnius prolixus</i>	41
Tabela V: SMM 36(B): Metaciclogênese e Status Redox no Intestino de <i>Rhodnius prolixus</i>	46

SUMÁRIO

1	Introdução	1
1.1	Doença de Chagas.....	1
1.2	Aspectos Morfológicos de <i>Trypanosoma cruzi</i>	2
1.3	Manifestações clínicas da doença de Chagas.....	2
1.4	Caracterização de <i>T. cruzi</i> através de DTUs.....	3
1.5	Proliferação e diferenciação de <i>T. cruzi</i> no inseto vetor	5
1.6	Expressão Proteômica de parasitos.....	6
1.7	Interação parasito-vetor: Participação do Heme.....	7
1.8	O papel do Sistema Redox em <i>Trypanosoma cruzi</i>	8
1.9	Função das Peroxiredoxinas.....	10
1.10	Isolados silvestres de <i>Trypanosoma cruzi</i> obtidos no estado do Rio de Janeiro.....	11
2	Objetivos	13
3	Revisão da Literatura	14
4	Material e Métodos	21
4.1	Desenho Experimental	21
4.2	Procedência dos isolados.....	22
4.3	Cultivo dos parasitos	23
4.4	Morfometria Clássica	24
4.4.1	Mensuração das formas epi e tripomastigotas das amostras SMM98, SMM 36 e SMM1.....	24
4.4.2	Análise estatística.....	25
4.5	Status Redox durante a metaciclo-gênese <i>in vivo</i>	25
4.5.1	Alimentação e Infecção oral em <i>Rhodnius prolixus</i>	25
4.5.2	Dissecção e separação dos compartimentos do intestino: Anterior, médio e posterior.....	27
4.6	Eletroforese- SDS Page.....	28
4.6.1	Obtenção de extrato de proteínas totais e Eletroforese em gel de poliacrilamida.....	29
4.6.2	Quantificação através do método de Bradford.....	29
4.6.3	SDS Page.....	30
4.6.4	Coloração para gel de SDS PAGE.....	31
4.7	Análise Proteômica.....	31
4.7.1	Eletroforese Unidimensional.....	32
4.7.2	Eletroforese Bidimensional.....	32
4.8	Western Blotting.....	33
4.9	Imunofluorescência Direta.....	34
4.9.1	Preparação e incubação com os anticorpos primários.....	34
4.9.2	Pós incubação e pré incubação com o anticorpo secundário..	35
4.9.3	Anticorpo Secundário.....	35
4.9.4	Montagem em Diazabicyclo[2.2.2]octane (DABCO).....	35
4.10	Imunocitoquímica das amostras SMM 36 e Dm28c.....	35

5	Resultados	
5.1	Morfometria Clássica.....		36
5.2	Avaliação do Status Redox no trato digestivo de <i>Rhodnius prolixus</i> submetidos a tratamento com NAC: SMM 98 (área A).....		39
5.2.1	Avaliação do Status Redox no trato digestivo de <i>Rhodnius prolixus</i> submetidos a tratamento com NAC: SMM 36 (área B).....		44
5.3	Perfil de Proteínas - SDS PAGE.....		49
5.4	Análise Proteômica dos isolados do RJ: SMM 98 e SMM36		51
5.5	Perfil proteômico comparativo dos isolados do estado do Rio de Janeiro.....		55
5.6	Western blotting da amostra SMM 36.....		56
5.7	Normalização com Tubulina.....		65
5.8	Imunofluorescência Direta TcCPX -Marcação utilizando os Anticorpos TcCPX e TcMPX (SMM 36 e Dm28c).....		66
5.9	Imunocitoquímica das formas epimastigotas e tripomastigotas da amostra SMM36.....		70
6	Discussão	72
7	Conclusões	77
8	Considerações finais	78
9	Referências	79

1. INTRODUÇÃO

1.1 Doença de Chagas

A doença de Chagas (DC) ou tripanossomíase americana é uma das 17 doenças tropicais negligenciadas listadas pela Organização Mundial da Saúde (OMS). Atualmente, na América Latina há entre 5 e 7 milhões de pessoas infectadas e calcula-se que 70 milhões de pessoas estejam em risco de contrair a doença que tem sido causa de 7.000 mortes por ano na região (WHO, 2015). Esta infecção é causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, descrito por CHAGAS, (1909) e apresenta endemia em 21 países das Américas.

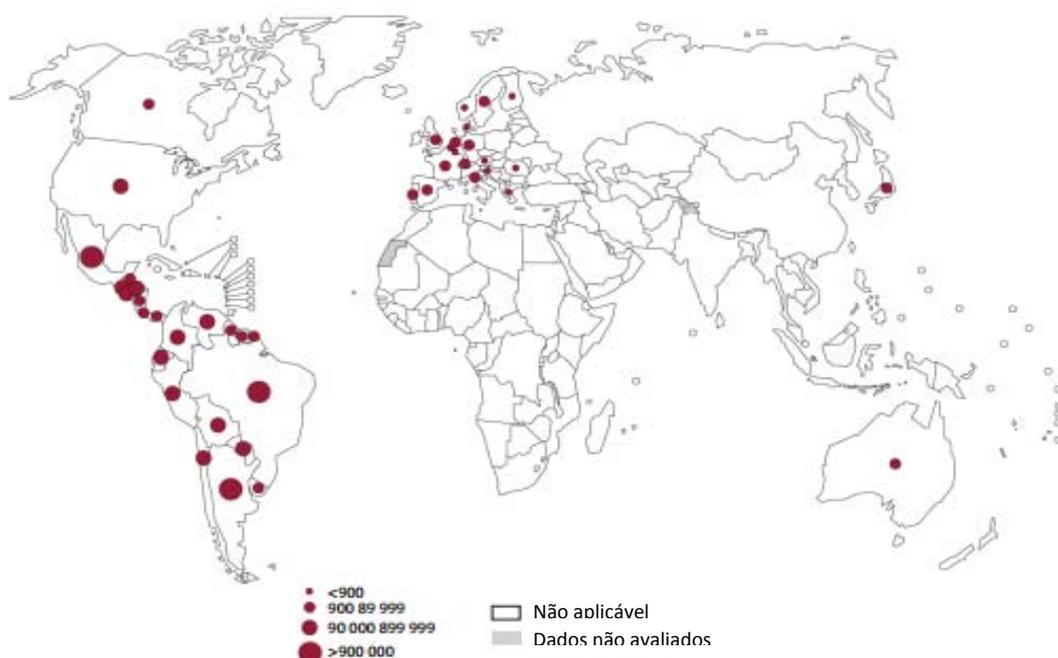


Figura 1: Mapa demonstrativo: Estimativa de casos de infecção por *T. cruzi*
http://www.dndial.org/images/stories/pdf/Newsletter_3_ESP.pdf

Esta enfermidade, considerada uma das principais doenças tropicais negligenciadas, tem sua epidemiologia condicionada pelos vetores, mamíferos e pelos reservatórios silvestres e sinantrópicos. Fatores sociais associados aos fatores econômicos, tais como desenvolvimento industrial, crescimento populacional e a colonização de áreas rurais, que atuam diretamente no equilíbrio ecológico, proporcionam condições favoráveis para o estabelecimento da doença, pois facilita a invasão dos vetores silvestres aos ambientes peridomiciliares e domiciliares (WHO 2016).

Atualmente, segundo WHO (2016), além da transmissão vetorial, este protozoário pode ser transmitido pelo consumo de alimentos contaminados pelo *T. cruzi*, ao entrar em contato com fezes infectadas de triatomíneos; transfusão sanguínea através sangue infectado; transmissão vertical, decorrente da passagem de uma mãe infectada ao recém-nascido durante a gravidez ou o parto; transplantes de órgãos utilizando órgãos de doadores infectados e acidentes laboratoriais.

1.2 Aspectos Morfológicos

As populações de *T. cruzi* apresentam grande variabilidade intraespecífica em sua morfologia, virulência e patogenicidade na resposta imune do hospedeiro e em sua constituição antigênica. Essa diversidade pode estar associada à sua adaptação e sobrevivência em diferentes hospedeiros (VILLA *et al.*, 2013). Assim como as diferentes formas de manifestações clínicas da doença no homem podem ser associadas com cepas específicas ou a marcadores genéticos do hospedeiro, muito embora ambos possam influenciar o curso da infecção.

Sua morfologia, comportamento, biologia e os aspectos clínicos que envolvem esta doença tem sido razão de inúmeros questionamentos, pois apresentam características morfológicas, assim como variações em sua estrutura de acordo com sua localização no organismo do hospedeiro vertebrado ou invertebrado (HERNÁNDEZ-OSORIO *et al.*, 2010). Seu polimorfismo foi objeto de estudo desde a sua descoberta por Chagas (1909) quando este assinalou e atribuiu o dimorfismo sexual e ou se reflete apenas a existência de um “complexo” morfológico, as diferentes formas encontradas nos diversos hospedeiros vertebrados e invertebrados e nos meios de cultura.

A aplicação da microscopia eletrônica tem trazido inúmeras contribuições ao estudo dos protozoários patogênicos utilizando também técnicas como a criofatura, citoquímica, imunocitoquímica, reconstrução tridimensional e microanálise de raios-X, dentre outras. Nos últimos 25 anos, os estudos têm sido direcionados principalmente para o conhecimento da superfície celular analisando o glicocálice, a bicamada lipídica e os microtúbulos subpeculiares (DE SOUZA 2010). Embora estas abordagens tenham sido amplamente investigadas em cepas padrão, cultivadas em diversos meios de cultura, pouco se conhece sobre parasitos isolados de triatomíneos silvestres.

A caracterização desses parasitas, procedentes de diferentes hospedeiros, através de técnicas morfológicas, biológicas, bioquímicas e moleculares (LAINSON *et al.*, 1979) denotam enorme contribuição para o desenvolvimento de métodos imunoproláticos e terapêuticos.

1.3 Manifestações clínicas

A (DC) apresenta dois tipos importantes de fases clínicas no homem: aguda e crônica. O curso da infecção e as características de cada fase dependem de diversos fatores ligados ao parasito e ao hospedeiro. Dentre estes, destaca-se a variabilidade genética das cepas, o número de formas de *T. cruzi* inoculadas e a virulência. Com relação ao hospedeiro, é importante observar a via de transmissão, status imunológico, sexo, idade e ambiente. (WHO 2015, ANDRADE *et al.*, 2002) (figura 3).

O processo de desenvolvimento da fase aguda ocorre quando o parasito entra no hospedeiro mamífero, iniciando a parasitemia patente, como presença geralmente de infecção assintomática. Em alguns casos sintomáticos, podem ser observados, dor de cabeça, febre, enfartamento ganglionar, edema e sinais da porta de entrada (sinal de Romaña e o Chagoma). Em alguns casos, podem ser observados miocardite e alterações neurológicas, e, ainda, os casos mais graves podem levar ao óbito do indivíduo infectado (PUNUKOLLU *et al.*, 2007).

Na fase crônica podem ser encontradas as formas: cardíaca (cardiopatia chagásica crônica), digestiva e assintomática. A forma assintomática ou indeterminada caracteriza-se pela ausência de lesões ou debilidade de órgãos. Essa forma pode durar por vários meses, anos ou até por toda a vida do portador. Em caso de lesões teciduais ou danos aos órgãos pode ser observada: Miocardite crônica que leva à cardiomegalia, insuficiência cardíaca, tromboembolismos e arritmias (PINTO DIAS, 1990; PRATA, 1994). Ainda na fase crônica, pode ocorrer a forma digestiva, onde ocorre a dilatação do esôfago e/ou cólon, conhecido como megaesôfago e/ou megacólon. E aproximadamente cerca de 70% dos hospedeiros infectados apresentam a forma crônica indeterminada, já os 30% restantes desenvolvem as formas sintomáticas da doença (cardíaca e digestiva), que podem levar a morte do indivíduo. Entretanto, a maioria dos humanos infectados permanecem assintomáticos ao longo da vida (ORTIZ YANINE *et al.*, 2006; BOSCARDIN *et al.*, 2010).

Importantes estudos têm sido realizados no controle transfusional e vetorial para a eliminação da transmissão da (DC), porém mesmo após um século de sua descoberta, são detectadas limitações no diagnóstico e tratamentos quimioterápicos, o que tornam a (DC) ainda hoje um importante problema de saúde pública nas Américas, o que denota a necessidade de continuidade dos estudos que visem alternativas para a melhoria dos diagnósticos, vacinas e terapêuticas mais eficientes (DIAS 2006, 2009 REITHINGER *et al.*, 2009).

1.4 Caracterização de *T. cruzi* através de DTUs

A heterogeneidade dos isolados de *T. cruzi*, a genética, assim como sua morfologia, DNA, virulência, patogenicidade, susceptibilidade a drogas, e outros parâmetros, estão hoje amplamente descritos na literatura. Muitos estudos foram realizados na busca de marcadores moleculares que pudessem correlacionar o genótipo do parasito com os vários tipos de manifestações clínicas desta enfermidade. Porém, diversos trabalhos ainda tentam esclarecer os múltiplos fatores relacionados à epidemiologia e à genética de população (ZINGALES *et al.*, 2011, SOUTO *et al.*, 1996).

Estudos iniciais sobre a genética populacional do *T. cruzi* basearam-se na análise do perfil eletroforético de isoenzimas e técnicas utilizadas para explorar a diversidade genética de microorganismos. Estes estudos demonstraram a presença de três grupos principais, denominados zimodemas (MILES *et al.*, 1978; 1980). TIBAYRENC & AYALA, 1988 encontraram em sua análise subsequente um número maior de loci genéticos em um número maior de isolados e ampliaram a diversidade para 43 zimodemas. Estes estudos forneceram fortes evidências de que *T. cruzi* é um parasito diplóide, que a reprodução sexual é inexistente e que sua estrutura populacional é clonal. A diversidade genética do parasito foi corroborada por análises de *Randomly*

Amplified Polymorphic DNA (RAPD) e *Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)*, impressões digitais de DNA (*DNA Fingerprinting*), microsátélites e cariótipo molecular (ZINGALES *et al.*, 1999). Por outro lado, não foram capazes de definir agrupamentos que permitissem sua associação com características epidemiológicas (ZINGALES, 2011). A análise de sequências genéticas com menor taxa evolutiva, tais como genes de RNA ribossômico, marcadores clássicos de evolução e genes de mini-exon, indicou dimorfismo nos isolados de *T. cruzi*, definindo-os em dois grupos: *T. cruzi* I e *T. cruzi* II (SOUTO *et al.*, 1996, ZINGALES, 2011). Foram padronizados ensaios de amplificação por PCR, permitindo a rápida tipagem molecular, que passou a ser amplamente utilizada.

Visando padronização de duplas linhagens e de isolados híbridos, um comitê decidiu que as linhagens fossem denominadas “grupos” *T. cruzi* I e *T. cruzi* II (ANÔNIMO, 1999; ZINGALES *et al.*, 1999).

STURM & CAMPBELL, 2009 dando continuidade aos estudos com estes parasitos, verificaram que na análise de sequências gênicas de isolados híbridos ocorrem dois eventos de trocas genéticas que originaram quatro grupos distintos de isolados.

FREITAS *et al.*, 2006, através da utilização de marcadores *Multilocus Enzyme Electrophoresis (MLEE)* e de RAPD sugeriram a divisão do grupo *T. cruzi* II em cinco subgrupos que incluem os quatro grupos híbridos (BRISSE *et al.*, 2000). E, *T. cruzi* III em um terceiro grupo ancestral proposto a partir da análise de microsátélites e DNA mitocondrial.

Em 2009, a comunidade científica sentiu necessidade de padronizar mais uma vez a nomenclatura dos grupos de *T. cruzi*, visando o entendimento de questões sobre a biologia, eco-epidemiologia e patogenicidade. Neste sentido, recomendaram que *T. cruzi* fosse classificado em seis grupos (*T. cruzi*: I; II; III; IV; V e VI); e que cada grupo fosse denominado DTU, *Discrete Typing Unit (DTU)* definido como grupo de isolados geneticamente semelhantes e que pudessem ser identificados através de marcadores moleculares ou imunológicos (TIBAYRENC, 1998; ANÔNIMO, 1999; ZINGALES 2011).

A distribuição das DTUs na América do Sul em humanos indicou a prevalência das manifestações cardíacas e digestivas (CARRANZA *et al.*, 2009; MILES *et al.* 2009). Entretanto, todas as DTUs foram capazes de promover a doença de Chagas, embora haja pouquíssimos relatos da DTU IV em humanos (SOUTO *et al.*, 1996).

A distribuição de haplótipos de cinco genes nucleares e de um DNA satélite foi analisada em isolados representantes das seis DTUs por genealogias nas redes de filogenia Bayesianas. Estes dados indicam que as DTUs *T. cruzi* I e *T. cruzi* II são monofiléticas e que as demais DTUs apresentam diferentes combinações dos haplótipos *T. cruzi* I e *T. cruzi* II e haplótipos DTU-específicos (TOMAZI *et al.*, 2009; IENNE *et al.*, 2010). Uma das interpretações para esta observação foi que *T. cruzi* I e *T. cruzi* II seriam duas espécies distintas e que as DTUs II-IV seriam híbridas resultantes de eventos independentes de hibridização/recombinação genômica (ZINGALES, 2011).

Segundo ZINGALES (2011), é fundamental desenvolver uma metodologia simples e direta para a tipagem das DTUs, que permita estabelecer as características epidemiológicas e clínicas dos isolados, e possível aplicação de prognóstico da evolução da doença de Chagas, assim como seu tratamento (figura 2).



Figura 2: Distribuição epidemiológica das DTUs em humanos da América do Sul, Prevalência das formas cardíaca e assintomática nos países ao Norte da linha pontilhada e das formas cardíaca, digestiva e assintomática, ao Sul, (ZINGALES *et al.*, 2011).

1.5 Proliferação e diferenciação de *T. cruzi* no inseto vetor

O estabelecimento de *T. cruzi* no inseto vetor deve possivelmente ser regulado por uma variedade de fatores bioquímicos e fisiológicos. Alguns destes fatores de indução de diferentes estágios de desenvolvimento de *T. cruzi* já foram identificados e correlacionados a mudanças no ambiente intestinal de triatomíneos (GARCIA *et al.*, 2007). Ao entrar no intestino pelo sangue da alimentação do hospedeiro vertebrado, os parasitos confrontam-se com componentes do sangue que irão influenciar em seu desenvolvimento tais como: fator hemolítico, peptídeos derivados de α -D-globina e lectinas. Dentre tantos fatores, esses exemplos podem modular a proliferação e diferenciação de *T. cruzi* no intestino dos vetores (KOLLIEN & SCHAUB, 2000; AZAMBUJA *et al.*, 2005).

Estes insetos hematófagos ingerem em cada repasto sanguíneo de três a dez vezes seu peso corporal. E nessas condições ocorre a liberação de altas concentrações de hemoglobina (Hb), que no ser humano constitui cerca de 60% do conteúdo protéico. E, como consequência desse processo, ocorre a degradação da (Hb) no trato digestivo desses insetos, assim como a liberação de grandes concentrações de Heme. Esta Heme proteína (Fe-Protoporfirina IX), é responsável pela catalisação de boa parte dos processos de oxidação nos diversos sistemas biológicos e apresenta um papel muito importante nas funções celulares e homeostase dos organismos (KOLLIEN & SCHAUB 2000; LARA *et al.*, 2007; NOGUEIRA *et al.*, 2015).

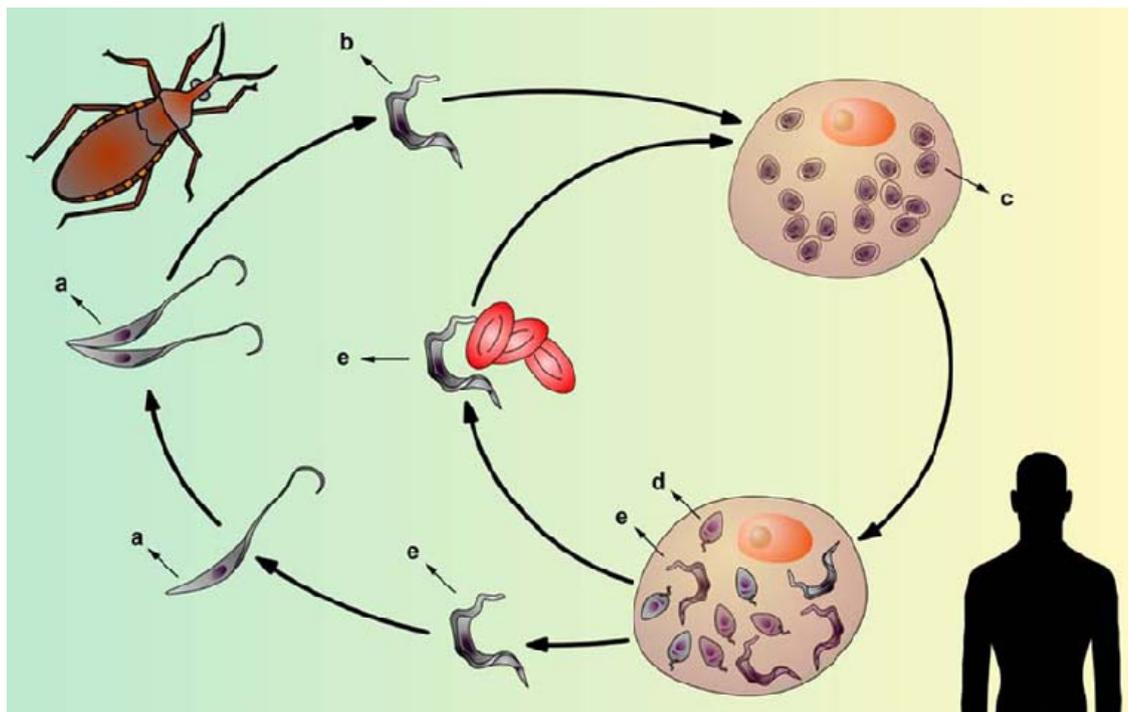


Figura 3: Esquema do ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*. (a) Formas epimastigotas replicativas, presentes no triatomíneo. (b) Formas tripomastigotas metacíclicas infectivas, eliminadas nas fezes e urina do inseto. (c) Formas infectivas invadem células do hospedeiro vertebrado e diferenciam-se em formas amastigotas. (d) Formas amastigotas originam o estágio denominado epimastigotas intracelulares e se diferenciam em tripomastigotas (e). O ciclo se completa quando as formas tripomastigotas se diferenciam novamente em epimastigotas e colonizam o tubo digestivo de um novo inseto durante a ingestão sanguínea. Fonte: BOSCARDIN *et al.*, (2010).

1.6 Expressão Proteômica de parasitos

O estudo do proteoma, é considerado uma das estratégias mais utilizadas e que tem demonstrado ser eficiente e, trata-se da combinação de eletroforese bidimensional (2D) com a espectrometria de massa. A eletroforese 2D permite a separação de proteínas de um dado sistema biológico com alta resolução e reprodutibilidade, enquanto que a espectrometria de massa permite, através de alta demanda e sensibilidade, a identificação de proteínas presente em um *spot* (ponto) do gel com o auxílio da espectrometria de massa (DOWSEY *et al.*, 2003; GARRELS, 1989).

A eletroforese 2D, comumente aplicada em análises proteômicas, consiste em separar as proteínas combinando-se duas técnicas: a focalização isoeletrica (IEF), seguida da separação segundo a massa molecular da proteína. Os fundamentos desta técnica foram primeiramente apresentados por O'FARELL, 1975; KLOSE, 1975). Desde então, inúmeras modificações e melhorias foram adicionadas a eletroforese 2D original, que incluem o uso de múltiplas faixas de pH (WILDGRUBER *et al.*, 2000), uso de anfólitos nas faixas de pH entre 9-12, 10-12 ou 7-17 (GÖRG *et al.*, 2000) e a escolha de detergentes adequados. Um dos maiores avanços desta técnica se deve à possibilidade de se criar um gradiente de pH imobilizado (IPG) no gel utilizado para a focalização isoeletrica (GÖRG *et al.*, 2000; KIKUCHI *et al.*, 2010; PINEYRO *et al.*, 2011; BRUNORO-FLOR *et al.*, 2015).

A dificuldade em detectar complexos protéicos, proteínas hidrofóbicas, proteínas muito básicas ou muito ácidas, proteínas pouco abundantes e a possibilidade de analisar somente uma única amostra por gel, são algumas das limitações encontradas na eletroforese 2D. Em contra partida, a fácil manipulação, a reprodutibilidade e a alta resolução alcançada por esta metodologia são pontos fundamentais quando se pretende estudar, de forma sistemática e em larga escala, uma mistura complexa de proteínas (BISCH, 2004).

1.7 Interação parasito-vetor: Participação do Heme

O Heme faz parte do grupamento prostético de diversas proteínas envolvidas no transporte de oxigênio, na respiração celular (citocromo C, citocromo C oxidase, e citocromo redutase), na detoxificação de drogas (enzima P450) e em defesas antioxidantes (catalases e peroxidases) (MENSE & ZHANG, 2006) (Figura 4). Estas Hemoproteínas estão envolvidas em funções básicas como sensibilidade a oxigênio, respiração celular, metabolismo, crescimento, renovação e diferenciação celular, todos necessários para sobrevivência de organismos (MENSE & ZHANG, 2006). No intestino anterior dos triatomíneos os parasitos entram em contato com componentes e moléculas da saliva, dos intestinos anterior e médio, além de produtos da digestão (BARROS *et al.*, 2009. Nesse sentido, vários autores estudam a influência de enzimas digestivas, fatores hemolíticos, lectinas e peptídeos derivados da globina, todos capazes de promover a modulação dos processos de diferenciação e proliferação do *T. cruzi* (GARCIA, 1987; GARCIA & AZAMBUJA, 1991; KOLLIEN & SCHAUB, 2000; AZAMBUJA *et al.*, 2005b). Entretanto, e apesar dos esforços em busca da complexa interação entre o parasito e o vetor, algumas moléculas presentes no vetor, tais como: o Heme também um subproduto da digestão da hemoglobina, a hemozoína, um agregado de Heme abundante nas fezes dos triatomíneos (OLIVEIRA *et al.*, 2000) e o urato, rico na urina desses insetos (WIGGLESWORTH, 1931) permanecem pouco estudadas (figura 4).

Através da conversão do Heme em hemozoína, esses parasitos protegem-se da grande concentração de Heme e estresse oxidativo. A agregação de Heme tem representando uma eficiente via de detoxificação e de proteção ao estresse oxidativo nos organismos hematófagos (GRAÇA-SOUZA *et al.*, 2006). Sendo assim provavelmente, a hemozoína estaria envolvida também com a proteção e/ou manutenção do patógeno no trato digestivo do vetor.

Poucos são os estudos sobre o metabolismo do Heme nos tripanosomatídeos, apesar das formas epimastigotas se desenvolverem num ambiente rico em Heme (SALZMAN & BATTLE, 1986, KELLY *et al.*, 2003 e CICCARELLI *et al.*, 2007). É descrito na literatura que *T. cruzi* necessita desta molécula como nutriente porque sua biossíntese é deficiente (LOMBARDO *et al.*, 2003). EL-SAYED *et al.*, (2005) corroboraram com o sequenciamento do genoma de *T. cruzi*, onde oito enzimas da via clássica de biossíntese de Heme, a partir da glicina, estão ausentes nesse organismo. LARA *et al.*, (2007), demonstraram em seus estudos que o Heme é de extrema importância para as formas epimastigotas destes parasitos.

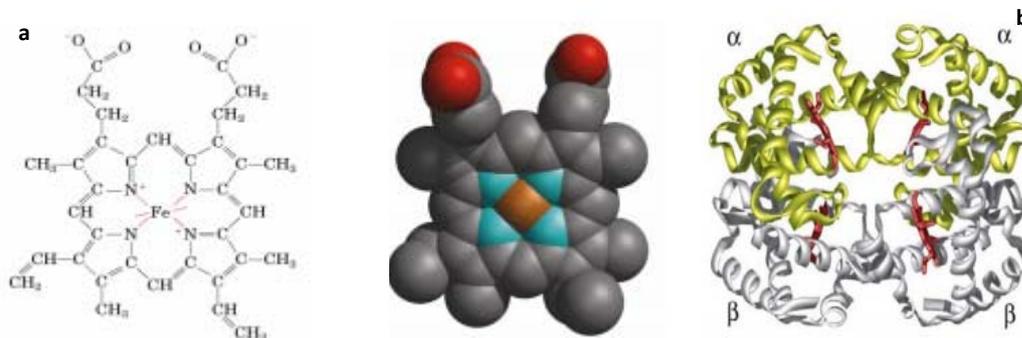


Figura 4: (a) Representações da estrutura do grupo prostético Heme (Fe-protoporfirina IX). (Adaptado de Nelson e Cox, 2004); (b) Estrutura tridimensional da hemoglobina. Proteína formada por quatro cadeias polipeptídicas, duas cadeias α representadas em amarelo e duas cadeias β representadas em cinza. Cada cadeia possui um grupo prostético Heme representado em vermelho (Adaptado de LODISH *et al.*, 2004).

1.8 O papel do Sistema Redox em *Trypanosoma cruzi*

Trypanosoma cruzi passa pelos mais variados ambientes, desde o intestino dos insetos à invasão celular no hospedeiro vertebrado enfrentando diferenças de temperatura, alteração do pH, de nutrientes e do redox. Em resposta às mudanças ambientais, os parasitos também sofrem transformações em sua morfologia além de mudanças bioquímicas. Essas também encadeiam variações que levam à transdução de sinais deflagradas nos processos de proliferação e diferenciação de *T. cruzi*. Desta forma, a formação de espécies reativas de oxigênio é um mecanismo importante para a adaptação e interação de tripanosomatídeos com seu ambiente (STEENKAMP, 2002)

Na fase intracelular, o *T. cruzi* entra em contato com espécies reativas de oxigênio provenientes de diferentes mecanismos, incluindo espécies geradas por seu próprio metabolismo aeróbico e também pela resposta imune do hospedeiro vertebrado (DOCAMPO, 1990). Neste processo, os protozoários apresentam diferenças importantes no que diz respeito ao metabolismo redox entre si e com seus hospedeiros (TURRENS, 2004; IRIGOÍN *et al.*, 2008, PIACENZA *et al.*, 2009).

Segundo BRINGAUD *et al.*, 2006, no que diz respeito ao metabolismo intermediário, o *T. cruzi* consome glicose a outras fontes de carbono, mesmo quando ambas estão disponíveis. A cadeia transportadora de elétrons (CTE) dos kinetoplastídeos apresenta diferenças importantes quando comparada com a CTE dos mamíferos. Por muitos anos a funcionalidade de um complexo I nos tripanossomatídeos tem sido alvo de controvérsias (TURRENS, 2004). Estudos tem demonstrado que o complexo I do *T. cruzi* apesar de apresentar todas as subunidades responsáveis pela transferência de elétrons, quatro subunidades membranares envolvidas na extrusão de prótons não estão presentes (OPPERDOES & MICHELS, 2008). Além disso, estudos realizados por

CARRANZA *et al.*, (2009) utilizando diferentes cepas demonstraram que o complexo I do *T. cruzi* é de fato não funcional na oxidação de NADH, não estando envolvida na transdução de energia nesses parasitos. Desta forma, devido a não funcionalidade deste complexo, a maioria dos tripanossomatídeos utiliza o succinato como principal produto do metabolismo de glicose. O succinato em tripanossomatídeos, pode ser produzido pela enzima fumarato redutase NADH-dependente (FRD) presente tanto no glicossoma quanto na mitocôndria. Essas enzimas oxidam NADH para produzir succinato (BOVERIS *et al.*, 1986; BESTEIRO *et al.* 2002; COUSTOU *et al.* 2005; 2006).

Os parasitos apresentam diferenças também em relação às defesas antioxidantes, não apenas quando comparados com o hospedeiro, bem como quando se comparados a diferentes parasitos, tais como: tripanossomatídeos do gênero *Leishmania* e *Trypanosoma*, assim como *Plasmodium* que apresenta em seu citoplasma uma isoforma superóxido dismutase (SOD) dependente de ferro (Fe-SOD), encontrada apenas em bactérias e ausente em outras células eucarióticas e a isoforma dependente de ferro (Fe-SOD) na mitocôndria e no glicossoma (WILKINSON *et al.*, 2006; GETACHEW & GEDAMU, 2007).

Estes protozoários transformam boa parte de sua glutatona em tripanotiona (TR), que em pH fisiológico, são mais reativos que a glutatona devido a valores de proteína Kinase (pK) menores. Portanto, a tripanotiona parece apropriada para a redução de hidroperóxidos (FLOHÉ *et al.*, 2003). Um estudo utilizando *Trypanosoma brucei* como modelo, demonstrou que a diminuição da expressão da enzima (TR) diminui sua infectividade e decréscimo em torno de 10% da atividade enzimática, e, também, é capaz de cessar seu crescimento celular (KRIEGER *et al.*, 2000). Apesar do papel da tripanotiona na proliferação ter sido demonstrada apenas para *T. brucei*, as proteínas envolvidas também estão presentes em *T. cruzi* (EL-SAYED *et al.*, 2005), o que demonstra uma via em comum. Outras peroxidases foram identificadas em *T. cruzi*: a peroxiredoxina citosólica, a peroxidase triparedoxina citosólica e outra localizada na mitocôndria. Estas enzimas são responsáveis pela detoxificação de H₂O₂ e hidroperóxidos orgânicos de cadeia curta (WILKINSON *et al.*, 2000). Estes parasitos apresentam também duas peroxidases dependentes de glutatona envolvidas na detoxificação de ácidos graxos e hidroperóxidos de fosfolipídeos, mas não de H₂O₂ (WILKINSON *et al.*, 2002). Além disso, foi descrita uma enzima Hemeperoxidase ascorbato-dependente que parece depender de glutatona como fonte de redutores, localizada no retículo endoplasmático e com pouca habilidade para metabolizar hidroperóxidos de ácidos graxos de cadeia longa e fosfolipídeos e resultados de peroxidação lipídica (WILKINSON *et al.*, 2002).

A superexpressão da triparedoxina (TcTXN) leva à resistência ao peroxinitrito tanto endógeno como exógeno (Piacenza *et al.*, 2008). Além disso, esses parasitos também se tornaram mais infectantes quando comparados ao controle. Segundo IYER *et al.*, (2008), um efeito similar foi observado em *Leishmania donovani* que superexpressavam triparedoxina peroxidase citosólica (TcCPX), os parasitos se tornaram mais resistentes aos oxidantes e mais virulentos contra macrófagos quando comparados com as células controle.

T. cruzi é capaz de se adaptar ao estresse oxidativo. E essa adaptação pode ser observada quando os parasitos são pré-tratados com concentrações não-tóxicas de H₂O₂ e então submetidos a concentrações maiores. Além disso, a incubação de formas epimastigotas com diferentes concentrações de H₂O₂ induzem o aumento da expressão da enzima (TcCPX) (FINZI *et al.*, 2004).

1.9 Função das Peroxiredoxinas

No decorrer do seu ciclo de vida, *T. cruzi* passa por uma série de modificações morfológicas e bioquímicas proporcionando em cada fase a capacidade para sobreviver em um ambiente novo e adequado a seu crescimento e sobrevivência (DOCAMPO, 1990; DIAZ *et al.*, 2011). Sua capacidade de evadir a resposta oxidativa do hospedeiro está correlacionada diretamente à sua infectividade (PIACENZA *et al.*, 2009). Este estresse oxidativo é provocado por danos celulares associados a presença de altas pressões ou tensões de oxigênio e outras moléculas que são derivadas fundamentalmente de superóxidos, hidroxilas: O_2^- , e o peróxido de hidrogênio, H_2O_2 (SIES, 1985).

O sistema de defesa antioxidante nos tripanosomatídeos é baseado no tiol de baixa massa molecular “tripanotiona”, que mantém o ambiente intracelular reduzido pela ação da (TR). São responsáveis por este processo vias que metabolizam o peróxido de hidrogênio em moléculas de água através da ativação das enzimas (TcCPX) e triparedoxina peroxidase mitocondrial (TcMPX) e a ascorbato peroxidase (APX). A ascorbato peroxidase (APX) também desintoxica H_2O_2 e se encontra localizada no retículo endoplasmático (WILKINSON *et al.*, 2000). Foram identificados cinco distintas peroxidases em *T. cruzi*, cada uma diferindo em sua especificidade de substrato e localização intracelular (WILKINSON & KELLY, 2003). A (TcCPX,) está localizada no citoplasma e a (TcMPX) na mitocôndria com baixa similaridade entre si (WILKINSON *et al.* 2000), desintoxicação de H_2O_2 , hidroperóxidos orgânicos de pequena cadeia (WILKINSON *et al.* 2000) e peroxinitrito (PIACENZA *et al.*, 2008; PIÑEYRO *et al.* 2011). A TcMPX, está localizada ao redor do cinetoplasto, o que sugere sua possível participação na proteção contra os possíveis danos mediados pelo peróxido no DNA mitocondrial.

Estudos demonstram que determinadas cepas de *T. cruzi* que superexpressavam TcCPx ou TcMPx foram capazes de infectar e se multiplicar de forma mais eficientemente em experimentos de infectividade (PIACENZA *et al.*, 2008; 2009; PIÑEYRO *et al.*, 2008). A superexpressão de TcCPX ou TcMPX confere nível elevado de proteção das formas epimastigotas de *T. cruzi* contra uma ampla concentração peroxinitrito para células que superexpressam TcMPX ou TcCPX, respectivamente (PIACENZA *et al.*, 2008; PIÑEYRO *et al.*, 2011, ARIAS *et al.*, 2015). PIACENZA *et al.* (2012) demonstraram que parasitos super-expressos com TcCPX apresentaram resistência quanto à morte de macrófagos devido a desintoxicação por peroxinitrito. Além disso, a superexpressão de TcCPX nas formas tripomastigotas aumentaram sua virulência, o que pôde ser evidenciado através do aumento em três vezes sua parasitemia com a presença de alto índice de infiltrados inflamatórios no coração e músculo esquelético quando em comparação com a cepa silvestre DM28c. Neste sentido, experimentos realizados com parasitos geneticamente modificados corroboraram plenamente à associação observada entre a virulência e cepas de *T. cruzi* silvestres contendo enzimas antioxidantes (PIÑEYRO *et al.*, 2008; PIACENZA *et al.*, 2009) (figura 5).

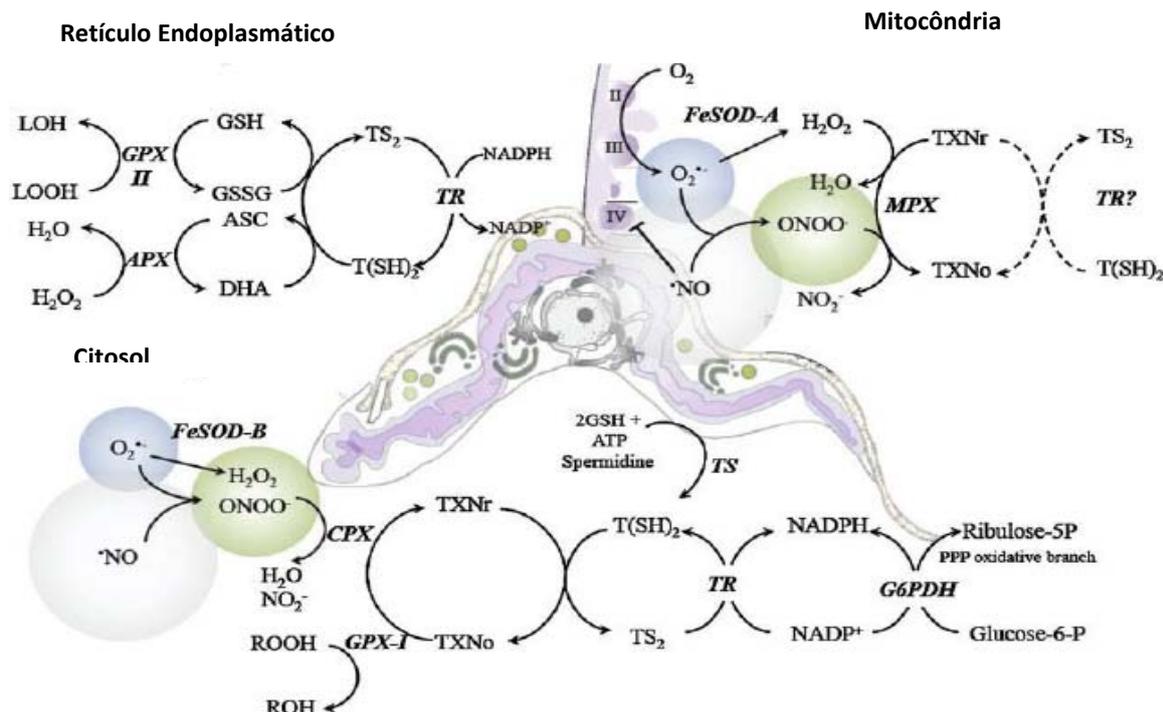


Figura 5- Distribuição subcelular da rede antioxidante em *T. cruzi*. A rede antioxidante de *T. cruzi* é formada por um número de enzimas e moléculas redox-ativas não enzimáticas distribuídas no retículo endoplasmático, glicosomos, mitocôndria e citosol. O doador de elétrons final para todos os sistemas enzimáticos é o NADPH derivado da pentose via fosfato (PPP). Os equivalentes redutores são canalizados através da tripanotona [T(SH)₂], glutationa (GSH), ascorbato (ASC), e/ou triparedoxina (TXN) sistemas redox. Retículo endoplasmático: O peróxido de hidrogênio (H₂O₂) é metabolizado por um hemoperoxidase dependente de ascorbato (APX) usando ASC como o doador de elétrons. Dehidroascorbato (DHA) que reduz a reação direta com T(SH)₂. H₂O₂ na presença de metais redox-ativos pode iniciar lipoperoxidação, reações que geram hidroperóxidos orgânicos (LOOH), que são substratos de GSH peroxidase II dependente (GPX-II) que utiliza GSH. T(SH)₂ reduz a glutationa oxidada (GSSG) para GSH, enquanto tripanotona redutase (TR) reduz tripanotona oxidada (TS₂). Mitocôndria: a cadeia de transporte de elétrons (Complexo II: succinato desidrogenase, CII; Complexo III: ubiquinol-citocromo C redutase, CIII e Complexo IV: Citocromo C oxidase, CIV) é o principal sítio de captação do superóxido (O₂^{•-}, Esfera azul) formação, principalmente no CIII. A isoforma mitocondrial de FeSODA catalisa a dismutação de O₂^{•-} à H₂O₂. Quando derivada do hospedeiro [•]NO (esfera cinza) atinge a mitocôndria, que inibe a respiração mitocondrial no CIV (com um aumento da produção de O₂^{•-} por CIII) sem competição por FeSODA para O₂^{•-} por ONOO⁻ (esfera verde). Peroxiredoxina mitocondrial (MPX) cataliticamente decompõe H₂O₂ e/ou ONOO⁻. Citosol: As enzimas antioxidantes no citosol incluem peroxiredoxina citosólica (CPX), FeSOD-B, e GPX-I. T(SH)₂ é sintetizado a partir de duas moléculas de GSH e um espermidina em uma reação catalisada pela enzima tripanotona sintetase (TS). O ramo do PPP oxidativo é induzida no trypanomastigote metacíclica, garantindo o fornecimento de equivalentes redutores de NADPH. O tamanho das esferas de [•]NO, ONOO⁻, e O₂^{•-} ilustra a capacidade de difusão dos oxidantes. (Adaptado de PIACENZA *et al.*, 2009).

1.10 Isolados silvestres de *Trypanosoma cruzi* obtidos no estado do Rio de Janeiro

Nos estados de Minas Gerais e Espírito Santo, triatomíneos da espécie *Triatoma vitticeps* vem invadindo o domicílio, sendo encontrado algumas vezes domiciliado e, apresentando frequentemente alta taxa de infecção por *T. cruzi* (LENT 1942, GONÇALVES *et al.*, 1998, SANTOS *et al.*, 2006, SILVA 2006; SOUZA *et al.*, 2011). Recentemente foi comprovado por SANGENIS *et al.*, (2015) casos da doença de

Chagas no estado do Rio de Janeiro. *T. vitticeps* (STÅL 1859) incriminado como vetor responsável por esse caso recente de transmissão, é uma espécie silvestre, encontrada no domicílio esporadicamente, este triatomíneo apresenta distribuição geográfica restrita aos estados do Rio de Janeiro, Espírito Santo, Minas Gerais e Bahia.

No estado do Rio de Janeiro, além dos estudos com os vetores, estudos de casos autóctones da doença de Chagas no Rio de Janeiro vêm sendo realizados desde a década de 40, onde foram evidenciados reservatórios silvestres e vetores infectados por *T. cruzi* (GUIMARÃES *et al.*, 1943). Alguns estudos documentaram através da realização de sorologia casos positivos da doença, mas não investigaram outras possíveis vias de transmissão (COURA *et al.* 1966, 1983; GONÇALVES *et al.*, 1998). Ao longo dos últimos anos, o cenário vem se modificando, casos de doença de Chagas foram identificados nesses locais, chamando a atenção para a transmissão vetorial da doença no Rio de Janeiro (LOROSA *et al.*, 2003, 2008).

Nas regiões Norte e Noroeste fluminense do estado do Rio de Janeiro, tem aumentado as notificações de ocorrência de formas adultas de triatomíneos, principalmente de *Triatoma vitticeps*, apresentando elevadas taxas de infecção por *T. cruzi* e foi relatada também a invasão e colonização do ambiente domiciliar. Com isso, após dois anos de coletas realizadas no município de Santa Maria Madalena, demos início a uma série de estudos com isolados de *T. cruzi* obtidos destes triatomíneos. Nossos resultados apontaram uma heterogeneidade destes isolados de *T. cruzi* relacionados à biologia, histopatogenia, expressão diferencial de enzimas de superfície e resposta ao tratamento com benznidazol. A diversidade encontrada entre os isolados, bem como entre estes e cepas já estabelecidas nos leva a indagações sobre as moléculas de superfície destas populações e de que forma estas poderiam influenciar na interação parasito-hospedeiro, (GONÇALVES *et al.*, 1998; SILVA 2006).

Visando buscar um entendimento do comportamento desses isolados de Z3 caracterizados como isolados de Santa Maria Madalena (SMM) (SANTOS-MALLET *et al.*, 2008), foram realizados por nosso grupo estudos de interação *in vivo*, onde os isolados apresentaram perfis diferenciados de infecção (SILVA, 2006). Ao realizar os inóculos em camundongos, com os isolados (SMM36), cerca de 80% dos animais foram a óbito em até 10 dias. Entretanto, ao utilizar o isolado (SMM98), somente levou ao óbito 10% dos camundongos. E ainda, pudemos observar que tanto os camundongos inoculados com SMM36 e SMM98 apresentaram processos inflamatórios nos exames histopatológicos. Assim como nos estudos realizados por GOMES *et al.*, 2009, foram verificadas expressões diferenciadas de cruzipaina, protease associada à virulência e a patogenicidade de *T. cruzi*.

Diante do exposto, e a fim de estudar a diversidade de amostras silvestres de *T. cruzi* isoladas no estado do Rio de Janeiro, este trabalho teve como principal objetivo: (i) analisar os aspectos morfológicos dos isolados SMM98, SMM36 e SMM1; (ii) investigar a influência do Status Redox na infecção *in vivo* após infecção experimental nos triatomíneos com os isolados SMM98 e SMM 36; (iii) verificar o perfil proteômico comparativo dos isolados SMM98 e SMM36; (iv) a análise da expressão de moléculas antioxidantes nos isolados SMM36 e DM28 através da microscopia ótica e eletrônica.

2. OBJETIVOS

Objetivo Geral

Estudar a morfologia, o Status Redox durante a proliferação e diferenciação, a expressão de proteínas e os níveis de virulência *in vivo* de formas epimastigotas e tripomastigotas metacíclicas de isolados silvestres.

Objetivos específicos

- Realizar a caracterização morfométrica clássica e a análise através da microscopia ótica, dos isolados silvestres SMM98, SMM36 e SMM1 de *T. cruzi*, obtidos de triatomíneos silvestres no estado do Rio de Janeiro;

- Estudar a influência de moléculas pró-oxidantes como Heme e H₂O₂ e N-acetil cisteína no trato digestivo de triatomíneos (*Rhodnius prolixus*) durante a proliferação e metaciclogênese dos isolados SMM98 e SMM36;

- Analisar comparativamente a expressão de proteínas chaves nos processos de virulência em cepas de referência e cepas silvestres SMM98 e SMM36;

- Verificar os níveis de virulência das cepas silvestres SMM36 e DM28c através da utilização de enzimas antioxidantes TcCPX; TcMPX; APX; SOD A e SOD B; e TNII;

- Visualizar através da imunofluorescência direta (SMM 36 e Dm28c) e imunocitoquímica (SMM36) a localização das peroxidases estudadas em cepas silvestres.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Doença de Chagas

A doença de Chagas era considerada uma enzootia entre os animais silvestres (CARCAVELLA *et al.*, 1998). Entretanto, diversas espécies de triatomíneos silvestres possuíam capacidade de transmitir o *T. cruzi*, agente etiológico da Doença de Chagas, promovendo o ciclo silvestre de transmissão entre eles. O processo de adaptação dos triatomíneos ao domicílio depende de fatores importantes para sua adaptação ao ambiente domiciliar, tais como: a fonte de alimentação do triatomíneo e suas contínuas mutações genéticas (FORATTINI, 1980; ARAGÃO, 1983). A distribuição geográfica da doença de Chagas (DIAS *et al.*, 2000), descrita por Carlos Chagas, em 1909, ocorre em todas as áreas onde há triatomíneos provenientes do México ao sul da Argentina. Desta forma, a circulação do *T. cruzi* compreende apenas a América, em especial a América Latina (DIAS, 2000).

Esta enfermidade, apresenta diferentes aspectos quanto a sua morbidade e mortalidade em diferentes regiões geográficas devido à suas formas clínicas: digestiva e cardíacas que levam ao impacto econômico muito elevado (WHO, 2002).

Atualmente no Brasil (PAHO/WHO 2015), ainda são registrados anualmente entre 150 e 200 novos casos. Destacamos dentre os estados: A região Amazônica, onde as principais formas de transmissão são: oral, domiciliar e vetorial extradomiciliar. (SILVEIRA 2006). Surtos de Doença de Chagas (DC) aguda ocorreram no município de Catolé do Rocha, na região Nordeste, em Teutônia, na região Sul, e mais recentemente casos relatados em Santa Catarina através da ingestão de caldo de cana contaminado pela presença de vetores infectados, ou por excretas destes, ou ainda por secreções de gambás, além dos casos relatados na Amazônia através da contaminação pelo suco de açaí (NERY-GUIMARÃES *et al.*, 1968; SHIKANAI-YASUDA *et al.*, 1991; PINTO *et al.*, 2001; VALENTE *et al.*, 2001; MARCILI *et al.*, 2009; MATOS *et al.*, 2015).

Entre tais registros, NEIVA (1914), cita a ocorrência de triatomíneos da espécie *T. vitticeps* na localidade de Conceição de Macabu, distrito do Município de Macaé, hoje Município de Conceição de Macabu. LENT (1942) sugeriu que esta fosse considerada a localidade “tipo” para *T.vitticeps*. Em outro estudo realizado por PINTO (1931 apud LENT 1942) assinalou sua presença em Magé e LENT (1942) em Nova Friburgo. No estado de Minas Gerais, foi encontrada por MARTINS *et al.*, (1940) e no Espírito Santo citado por (LENT, 1942). E, ainda, associado a presença de *T. vitticeps* SANGENIS *et al.*, (2015) relata 15 casos autóctones da transmissão doença de Chagas na área rural do estado do Rio de Janeiro.

Devido as notificações sobre a ocorrência de triatomíneos infectados, especialmente de *Triatoma vitticeps*, se faz importante a vigilância entomológica/epidemiológica no estado do Rio de Janeiro (STAL, 1959; DIAS (DIOTAIUTI *et al.* 1987; GONÇALVES *et al.* 1988; SANGENIS *et al.*, 2015) E nos estados de Minas Gerais, Espírito Santo e Bahia (SILVEIRA *et al.*, 1984; CORRÊA, 1986; SANTOS *et al.*, 2006; SILVA 2006; SOUZA *et al.*, 2011).

3.2 Aspectos Morfológicos de *Trypanosoma cruzi*

De acordo com o polimorfismo, diferenças nas formas encontradas nos diversos hospedeiros e dimorfismo sexual encontrado nas formas de *T. cruzi* cultivadas em meio de cultura, DIAS (1940), baseado no estudo biométrico e comportamental de parasitos isolados de morcegos, observou uma semelhança de outros tripanosomatídeos com *T. cruzi* e sugeriu a existência do grupo *cruzi*. A partir de então, o termo “*Trypanosoma cruzi* – like” passou a ser usado para identificar os parasitos aparentemente indistinguíveis morfológicamente de *T. cruzi*, encontrados em animais provenientes ou não de áreas endêmicas. Entretanto, BARRETTO (1965) considerou que alguns ítems seriam importantes para o diagnóstico de *T. cruzi*, sugerindo os seguintes parâmetros para caracterização: 1) semelhança morfológica; 2) coincidência dos dados biométricos, particularmente o comprimento total médio e o índice nuclear médio; 3) cultivabilidade em meio ágar-sangue; 4) evolução no tubo digestivo de triatomíneos com desenvolvimento de tripanosomos metacíclicos no intestino posterior; 5) infectividade para animais de laboratório; 6) multiplicação natural ou experimental nos tecidos do hospedeiro vertebrado; 7) desenvolvimento de imunidade contra amostras virulentas de origem humana.

Segundo BRENER (1969), através da morfologia, ou seja, os tipos de formas encontradas, finas ou largas, podem ter maior ou menor afinidade celular, dependendo de sua espessura, onde as mais delgadas seriam capazes de penetrar mais rapidamente nas células dos vertebrados do que as formas mais largas. A ação patogênica do parasito para o hospedeiro também seria muito variável e segundo ANDRADE (1970), isso deve a diversos fatores, dentre eles as características morfológicas (NAVARRO *et al.*, 2003; HERNÁNDEZ-OSORIO *et al.*, 2010).

Além das abordagens citadas, a aplicação da microscopia eletrônica tem trazido inúmeras contribuições ao estudo dos protozoários patogênicos utilizando também técnicas como a criofratura, citoquímica, imunocitoquímica, reconstrução tridimensional e microanálise de raios-X, dentre outras. Nos últimos 25 anos, os estudos têm sido direcionados principalmente para o conhecimento da superfície celular analisando o glicocálice, a bicamada lipídica e os microtúbulos sub-peliculares (DE SOUZA, 2002; 2010; 2014; VILLA *et al.*, 2013).

Estudos sobre a organização tridimensional dos parasitos, revelados através de réplicas de células submetidas à técnica de criofratura e o uso de lectinas conjugadas a ouro coloidal demonstraram a composição dos glicoconjugados distribuídos na membrana do corpo e do flagelo (PIMENTA *et al.*, 1989; DE SOUZA 2010).

Do ponto de vista morfológico, a superfície celular pode ser considerada como composta de três estruturas: glicocálice, microtúbulos subpeculiares e bicamada lipídica. O glicocálice de *T. cruzi* mostra-se como um revestimento muito delgado nas formas epimastigotas e amastigotas, enquanto que nas formas tripomastigotas são mais evidentes, segundo (DE SOUZA, 1999; HERNÁNDEZ-OSORIO *et al.* 2010).

A invasão de *Trypanosoma cruzi* em macrófagos e células musculares por endocitose, através de adesão e internalização mediados por diferentes componentes capazes de reconhecer especificamente formas epi ou tripomastigotas, vem sendo intensamente analisada sob o ponto de vista morfológico e citoquímico da interação parasito-célula hospedeira (ARAÚJO-JORGE *et al.*, 1992; DE SOUZA 2010; 2014; BARRIAS *et al.*, 2013).

Entretanto, têm sido escassos os estudos em busca de resultados que promovam um melhor entendimento à cerca da correlação entre o polimorfismo e o comportamento biológico por *T. cruzi*. Essas dificuldades aumentam ainda mais quando se tenta correlacionar os aspectos patogênicos aos morfológicos, como também os respectivos casos clínicos, tanto no homem como em animais experimentais (FERRIOLLI-FILHO et al., 1968; ANDRADE et al., 1970; BELDA-NETO, 1974; SILVA, 2006).

3.3 Caracterização de *Trypanosoma cruzi*: Aspectos Moleculares

Estudos realizados por LAURIA-PIRES et al., (1997), mostraram que linhagens clonais derivadas de estoques de parasitos, podem ter características biológicas diferentes às apresentadas do isolado original de paciente chagásico, e que marcadores moleculares, como também estudos em níveis moleculares adicionais podem ser utilizados para a caracterização de estoques de *T. cruzi*, a fim de identificar se possível, suas correlações com a patologia.

A análise gênica de *T. cruzi* em estágios específicos, contribuem com a avaliação crítica dos mecanismos envolvidos na regulação da expressão gênica em tripanossomatídeos (ÁVILA et al., 2003; MILES et al., 2003; MINNING et al., 2003; TAYLOR et al., 2011; RAMÍREZ et al., 2013). O Aumento do número de cópias dos genes devido à sua amplificação, contribuem para alterações na expressão, o que representa uma estratégia crucial para parasitas que dependem principalmente dos mecanismos pós-transcricionais para controlar a expressão dos genes (REIS-CUNHA et al., 2015).

A análise de isoenzimas tem sido largamente empregada em estudos taxonômicos e de caracterização de *T. cruzi*, constituindo-se em um bom marcador epidemiológico da doença de Chagas. A primeira abordagem sobre a heterogeneidade de *T. cruzi* foi feita por MILES *et al.* (1977) quando distinguiram dois grupos enzimáticos, um relacionado com o habitat silvestre, e outro com o habitat domiciliar, ambos definidos posteriormente como tipo I e tipo II, respectivamente. Associando os isolados de diferentes habitats, MILES *et al.* (1980) distinguiram três padrões denominando-os de Z1, Z2 e Z3, sendo Z1 e Z3 referentes ao habitat silvestre e Z2 ao domicílio.

Entretanto, PINHO *et al.* (1996) ao encontrarem os zimodemas (Z1 e Z2) no habitat silvestre demonstraram a complexidade do ciclo silvestre, tornando-se questionável a padronização estabelecida por (MILES *et al.*, 1977; 1980; 1981).

A definição destes padrões vem possibilitando o esclarecimento da dinâmica deste parasito entre os habitats silvestre e domiciliar, associada aos hospedeiros (vertebrados e invertebrados), contribuindo desta forma, para uma melhor compreensão epidemiológica da área estudada (STEINDEL *et al.*, 1995; PINHO *et al.*, 1996; FERNANDES *et al.*, 1997).

FERNANDES *et al.* (1994), mostraram a importância da investigação acerca da presença de triatomíneos passíveis de infecção por *T. cruzi* que circulam no peridomicílio e intradomicílio, representando assim, um elo importante na transmissão da doença de Chagas.

A evidenciação de novos zimodemas, além dos clássicos Z1, Z2 e Z3, vêm

demonstrando a heterogeneidade nos perfis isoenzimáticos de isolados de *T. cruzi* (LÓPEZ-OLMOS *et al.*, 1998). A dificuldade de correlacionar os padrões isoenzimáticos com os aspectos biológicos, podem ser explicadas pela influência que os parasitos sofrem em decorrência da dispersão do vetor, da migração do hospedeiro vertebrado e das próprias características geográficas (altitude/clima), assim como do processo de seleção entre as cepas (TIBAYRENC *et al.*, 1986; TIBAYRENC & AYALA, 1988).

T. cruzi possui alta variabilidade genética com evidências de seis tipos de Unidades Discretas (DTU): *T. cruzi* I (TcI), *T. cruzi* II (Tc II), *T. cruzi* III (TcIII), *T. cruzi* IV (TcIV), *T. cruzi* V (TcV), e *T. cruzi* VI (TcVI), e cada um dos tipos apresenta características baseadas em sua distribuição geográfica, associações eco-epidemiológicas e manifestações clínicas da doença (ZINGALES *et al.*, 2011; 2012, HIGUERA *et al.*, 2013, PEREZ-MOLINA *et al.*, 2014; COSTALES *et al.*, 2015; CRUZ *et al.*, 2015). Atualmente, vários questionamentos foram feitos com relação aos métodos para a caracterização e genotipagem de populações de *T. cruzi*, incluindo a amplificação por PCR da SL-IV (*Spliced Leader* da região intergênica e do gene de mini-exon), 18S e 24S α , e regiões de genes de DNAr. O critério de comparação para esta técnica baseia-se nas diferenças de tamanho das ampliações resultantes (SOUTO *et al.*, 1996, BRISSE *et al.*, 2001). No entanto, a caracterização obtida utilizando esta técnica é limitada pela ausência de amplificação dos produtos ou a necessidade de múltiplas ampliações-PCR Multiplex (BURGOS *et al.*, 2010, ZINGALES *et al.*, 2011; 2012, PEREZ-MOLINA *et al.*, 2014, COSTALES *et al.*, 2015, CRUZ *et al.*, 2015). Outra metodologia proposta foi baseada na análise de polimorfismo genético utilizando multi-locos através da PCR-RFLP também utilizado por JANSEN *et al.*, (2015); no entanto, esta técnica requer o desenvolvimento e combinações de vários ensaios, aumentando a sua complexidade e limitando seu uso (ROZAS *et al.*, 2007; LEWIS *et al.*, 2009). LLEWELLYN *et al.*, (2009) implementaram uma abordagem baseada no *Typing Microsatellite Multi-locus* (MLMT) a partir de 48 marcadores de microssatélites polimórficos. Esta técnica trata-se de uma alternativa rápida e viável, mas requer a inclusão de procedimentos de sequenciamento que levam a um aumento dos custos. Recentemente, a análise dos polimorfismos do 24s α gene de DNAr, a subunidade II da citocromo-oxidase, e quatro loci microssatélites foram mostrados como sendo uma alternativa do método (VALADARES *et al.*, 2012). Desta forma, uma técnica de genotipagem de baixo custo com confiança e resultados robustos para a identificação genética dos seis grupos em um único ensaio é necessária para facilitar a caracterização de parasitos específicos e circulantes numa área geográfica (HIGUERA *et al.*, 2013). Algumas técnicas, tais como, *High resolution melting* (HRM) oferece uma alternativa viável para genotipagem de *T. cruzi* dada a sua robustez, velocidade no sequenciamento (SCHÜTZ *et al* 2009). Esta análise molecular foi recentemente usada para genotipar diferentes populações de microorganismos parasitas (COSTA *et al.*, 2011; ZHANG *et al.*, 2012). A utilização da PCR em tempo real juntamente com HRM foi proposta para a genotipagem do DTUs de 18 cepas de *T. cruzi* que exigiu a genotipagem das cepas circulantes, pois forneceu de forma fácil, rápida e de baixo custo (NGUI *et al* 2012; HIGUERA *et al.*, 2013; CURA *et al.*, 2015).

3.4 Expressão Proteômica de *Trypanosoma cruzi*

O complemento total de proteínas de um determinado genoma o Proteoma (WASINGER *et al.*, 1995) foi um termo utilizado para fazer analogia com o termo genoma (WASINGER *et al.*, 1995; WILKINS *et al.*, 1996). Hoje, sabe-se que a análise proteômica consiste no estudo de proteínas expressas a partir de um genoma. A análise proteômica permite apreciar o efeito da regulação da expressão gênica que ocorre pós-transcrição e pós-tradução e fornece subsídios quanto à sua função e envolvimento nos processos biológicos (SANTOS *et al.*, 2004, PARODI-TALICE *et al.*, 2004, 2007). Tais informações não podem ser previstas com precisão a partir das seqüências dos ácidos nucléicos (BANKS *et al.*, 2000). Assim, os diversos mapas de proteoma refletem a dinâmica dos sistemas biológicos e possibilitam analisar diferenças na expressão gênica frente, por exemplo, a uma dada situação fisiológica ou em um mecanismo de resposta a drogas (KOPEC *et al.*, 2005, LYRIS *et al.*, 2012, FERRÃO *et al.*, 2012, BAYER-SANTOS *et al.* 2013).

A eletroforese bidimensional, comumente aplicada em análises proteômicas, consiste em separar as proteínas combinando-se duas técnicas: a focalização isoeletrica (IEF), seguida da separação segundo a massa molecular da proteína. Ao final, obtém-se um gel de poliacrilamida contendo numerosos pontos (*spots*), cada um teoricamente correspondendo a uma proteína (SANTOS *et al.*, 2004, PARODI-TALICE, *et al.* 2004, 2005, DÍAZ *et al.*, 2011).

Estudos realizados por Atwood *et al.*, (2005) demonstraram que o proteoma do *T. cruzi* possibilitou um maior esclarecimento sobre esse processo de diferenciação. E, com o uso de LC-MS/MS, os autores afirmaram que a metaciclogênese resultava numa maior expressão de proteínas envolvidas nas defesas antioxidantes e diminuição da produção de proteínas ribossomais.

Através da eletroforese 2D e espectrometria de massas foram identificadas cerca de 50% de proteínas diferentes expressas em epimastigotas e tripomastigotas. Assim como, enzimas envolvidas na manutenção do status redox que apresentaram aumento da regulação, estes autores, sugeriram a modulação do estresse nutricional para a manutenção do status redox do parasito, através da ativação e possivelmente da inativação de vias metabólicas (Parodi-Talice *et al.*, 2007).

Em *T. cruzi*, os estudos proteômicos comparativos tem corroborado com a identificação de proteínas expressas entre cepas (KIKUCHI *et al.*, 2010; PARODI-TALICE *et al.*, 2007; DE GODOY *et al.*, 2012), assim como a identificação de proteínas associadas a resistência ao benznidazol, (ANDRADE *et al.*, 2008) e na identificação de antígenos candidatos a vacinas ou para diagnósticos imunológicos (NAKAYASU *et al.*, 2012).

3.5 Status Redox

Todas as células dos organismos se desenvolvem em um ambiente em mudança contínua. A natureza, magnitude e duração de tais alterações determinam o tipo de respostas celulares que devem desenvolver, a fim de lidar com tais desafios. O destino do organismo, quer uni ou multicelular, irá resultar do equilíbrio entre fatores estressantes e mecanismos de compensação. Quando forças ambientais induzem o dano em macromoléculas, a resposta celular ao estresse é posta em movimento. Isto inclui a alteração da expressão do gene, mecanismos de reparação do DNA, modificações

protéicas, volume e restauração do equilíbrio redox. A falta de reparação danos ou exposição prolongada a condições de estresse poderia terminar em morte celular, quer por necrose ou apoptose (KULTZ et al., 2005, JIMENEZ 2014). Quando ocorrem alterações transitórias no meio ambiente, estímulos específicos ou não, resultam em danos permanentes a macromoléculas (KULTZ et al., 2005).

Ambos os tipos de respostas são importantes em *T. cruzi*, protozoário causador da doença de Chagas. *T. cruzi* tem um ciclo de vida complexo, que inclui a transmissão por um inseto vetor e invasão do hospedeiro vertebrado, onde o parasita é capaz de estabelecer infecções crônicas. Ao longo de seu ciclo de desenvolvimento, o parasita encontra condições ambientais diversificadas a que se adaptou com sucesso a fim de manter a sua transmissão e infectividade (JIMENEZ 2014).

Após a invasão de um vertebrado e de mudança para temperatura mais elevada, o parasita desenvolve uma resposta ao estresse caracterizada pelo aumento de proteínas de choque térmico (HSPs) (PEREZ-MORALES et al., 2012). Um aumento semelhante ocorre durante a diferenciação de promastigota para amastigota em *Leishmania donovani* (SAAR et al., 1998) e em formas sanguíneas de *Trypanosoma brucei*. Alguns membros das famílias chaperonas são induzíveis sobre estresse, enquanto outros são constitutivamente expressos. A geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) e espécies nitroge-reativas (NRS) como subprodutos de um metabolismo oxidativo é característica geral de células eucarióticas, da mesma forma que todas as células possuem mecanismos para eliminar espécies oxidativas e restaurar o equilíbrio redox (KULTZ et al., 2005).

Patógenos intracelulares como *T. cruzi* encontram fontes adicionais de estresse oxidativo ao invadir macrófagos, onde o burst oxidativo sugere-se ser a parte da resposta imune inata direcionada para eliminar o parasita (TANAKA et al., 1983).

Mudanças no estado oxidativo e o excesso de radicais livres causam estresses significativos afetando o DNA e a integridade de proteínas, além de induzir danos às membranas, regular a função das enzimas e alterar o metabolismo energético (KULTZ et al., 2005). Tripanosomatídeos possuem diferenças significativas em suas propriedades antioxidantes em comparação com os sistemas de defesa, e células de mamíferos essas vias têm estado sob intenso estudo, que puderam representar importantes alvos de drogas (PIÑEYRO et al., 2007, PIACENZA et al., 2012). O principal captador de ROS e NRS tripanotíon é, uma pequena molécula que contém duas glutations ligado a espermidina covalentemente. *T. cruzi* carece de catalase e glutational peroxidase, mas possui pelo menos duas peroxidases dependentes de glutational, e duas peroxiredoxinas e quatro superóxidos dismutase dependentes de ferro, bem como uma via de biossíntese completa por ascorbato (KRAUTH-SIEGEL et al., 2008). Esta rede protege o parasita contra o estresse oxidativo de uma maneira muito eficaz. Algumas evidências apontam para H₂O₂ como sendo responsável pela redução dos parasitas dentro dos macrófagos (TANAKA et al., 1983). Recentemente, PAIVA et al., (2012) demonstraram que o estresse oxidativo em macrófagos promove a infecção pelo *T. cruzi*, aumentando a disponibilidade de ferro, um nutriente essencial para a proliferação do parasita. Novas evidências indicam que a cruzipaina, uma cisteína proteinase exposta na superfície intracelular das amastigotas, é capaz de bloquear a ativação do NF-κB, impedindo a produção de IL-12 e facilitar a replicação intracelular do parasito nas fases iniciais da infecção (DOYLE et al., 2011). No entanto, o acúmulo de ROS e NRS faz matar o parasito por qualquer necrose ou apoptose, provavelmente como resultado de danos ao DNA acumulado (CABRERA et al., 2011). Diferenças

significativas na capacidade antioxidante foram observadas entre estágios de desenvolvimento e cepas do parasita, que liga a capacidade de resistir à agressão oxidativa com a virulência [94]. Formas infectantes são mais tolerantes ao estresse oxidativo (PIÑEYRO et al., 2007, PIACENZA et al., 2012, OSORIO et al., 2012), embora a concentração de tiol seja maior em epimastigotas (MAYA et al., 1997).

Enzimas antioxidantes são expressas em níveis mais elevados em formas metacíclicas e tem sido sugerido que este é um mecanismo pré-condicionado de formas infectantes para lidar com a explosão oxidativa após a invasão de macrófagos (ATWOOD et al., 2005). Maiores expressões destas enzimas, tem sido associada com a resistência de *T. cruzi* à benzimidazol, mas a relevância clínica destes resultados ainda não se conhece (ATWOOD et al., 2005).

As Peroxiredoxinas (Prxs) são peroxidases eficientes e dependentes do funcionamento antioxidante da cisteína, sua regulação e dos sistemas de sinalização (HALL et al., 2011, KANG et al., 2005, POOLE et al., 2008, VEAL et al., 2007). Não são reconhecidas como enzimas generalizadas até 1994 (CHAE et al., 1994), e parece ser a primeira e dominante linha de defesa contra ROS (WINTERBOURN et al., 2008) e são também capazes de desintoxicar eficientemente peroxinitrito / ácido peroxinitroso agente oxidante produzido pela reação de superóxido.

Em muitos eucariotos Prxs também desempenham um papel importante na regulação de redes de sinalização que utilizam peróxido de hidrogênio (H_2O_2) como um segundo mensageiro (WOOD et al., 2003, HALL et al., 2009, FLOHÉ et al., 2010, KLOMSIRI et al., 2011, RHEE et al., 2011).

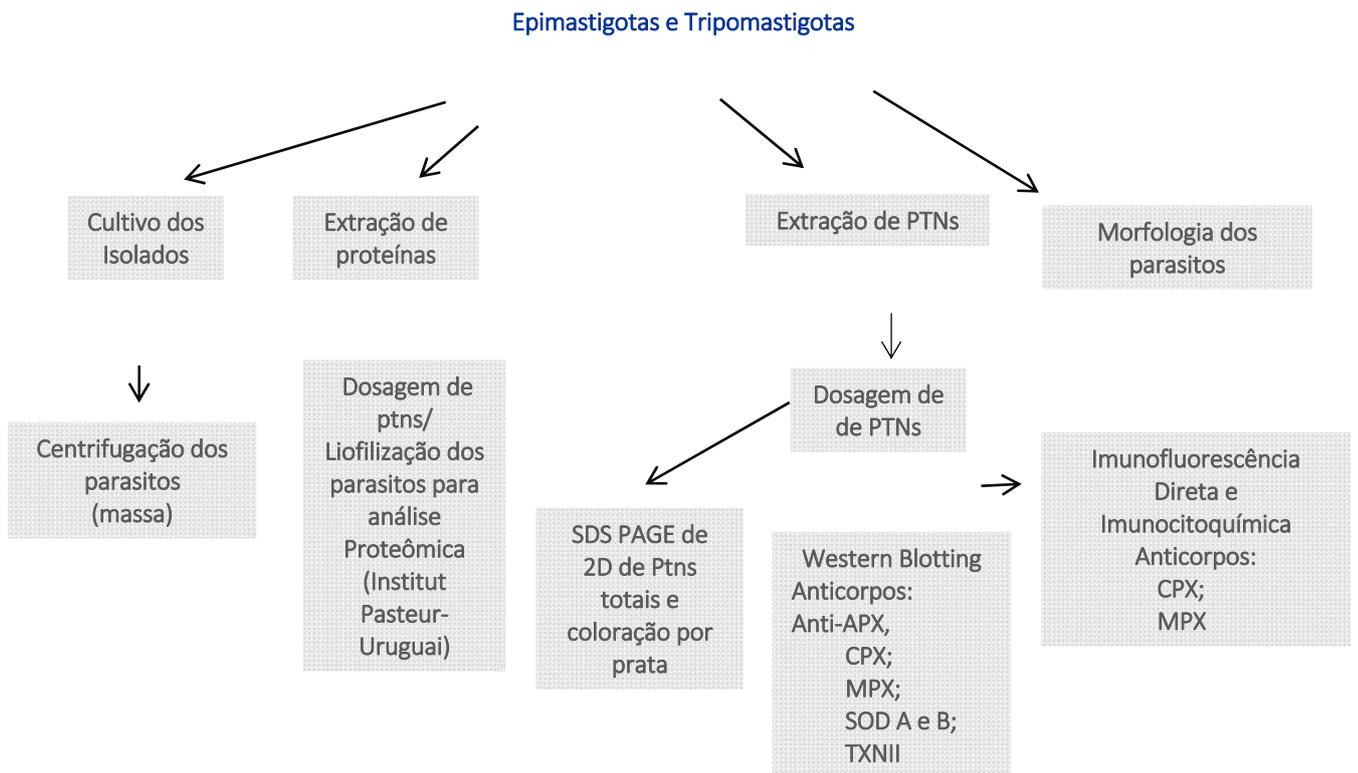
Os parasitas são organizados em grupos e subgrupos da seguinte forma: protozoários- os apicomplexa unicelulares, cinetoplastídeos e outros protistas; helmintos- multicelulares, vermes nematóides, cestóides e nematóides; e fungos (KLOMSIRI et al., 2011, RHEE et al., 2011).

Os tripanosomas possuem ciclos de vida complexos, como por exemplo: a mosca tsé-tsé (por *Trypanosoma brucei*) ou triatomíneos (*T. cruzi*) em que sua forma epimastigota se desenvolve e em seguida, diferencia-se em tripomastigota metacíclica. No hospedeiro humano, *T. brucei* desenvolve tripomastigotas na corrente sanguínea e dissemina-se em uma variedade de tecidos incluindo sangue, linfa, e fluido espinal. Em contraste, *T. cruzi* desenvolve formas amastigotas, e se diferenciam em tripomastigotas no local da ferida provocada pelo inseto e, em seguida, entra na corrente sanguínea. Curiosamente, em *T. brucei* e *T. cruzi* falta a glutaredoxina GRX e a TR (KRAUTH-SIEGEL et al., 2005; 2007). A cascata completa Prx tem sido mostrada em *T. brucei* o que parece ser essencial à sua sobrevivência, segundo ALPHEY et al., (2008) e é também considerado um importante alvo para a concepção de medicamentos. Ambos *T. brucei* e *T. cruzi* expressam duas Prxs: Prx1a e Prx1m. Estudos de localização demonstraram que a Prx1a e Prx1m de *T. cruzi* e *T. brucei* estão localizadas no citosol e mitocôndria, respectivamente (TETAUD et al., 2001, WILKINSON et al., 2000). Com relação aos níveis de expressão e outros estudos in vivo: TbPrx1a e TbPrx1m são ambos expressos na corrente sanguínea e nas fases pró-cíclica do parasita (TETAUD et al., 2001). Do mesmo modo, foi observada que a Prx1 em *T. cruzi* é expressa em todo o ciclo de vida do parasito (PIÑEYRO et al., 2001).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Desenho Experimental

Isolados de silvestres de *T. cruzi* (Z3) do Estado do Rio de Janeiro



4.2 Procedência dos isolados

Os isolados estudados neste trabalho são provenientes de três áreas (A, B e F), duas (SMM98 e SMM36) da localidade de Triunfo, (latitude 22° 02' 52''S; longitude 41° 56', 32'' W), Município de Santa Maria Madalena, e uma (SMM1) da localidade de Vista Alegre, do Município de Conceição de Macabu, ambos do Estado do Rio de Janeiro, Brasil, de onde foram obtidas originalmente 119 amostras de *T. cruzi*, isoladas de *T.vitticeps* (GONÇALVES et al. 1998) intituladas SMM. Desta forma, os três isolados utilizados neste trabalho foram selecionados devido ao comportamento biológico observado previamente por GONÇALVES, (2000) e SILVA, (2006) a presença de barreiras geográficas entre os locais de captura.

Os triatomíneos foram capturados na área A onde foi isolada a amostra SMM98 localizada em uma área desmatada para dar lugar ao cultivo de banana, localizada a 250m de altitude e afastada 3.5km do povoado. A amostra SMM36 é oriunda da área B situada em um vale com vegetação preservada à 130km de altitude e distante 4 km do povoado. Estas duas áreas distam entre si 2 km sendo separadas por área montanhosa, com altitudes de 400 a 900m, pertencentes a localidade de Triunfo. A amostra SMM1 área F é proveniente de triatomíneo capturado no povoado de Vista Alegre, do município vizinho de Conceição de Macabu (figura 6 e 7).

As cepas de referência: TCC (cepa atenuada de cultivo), Silvio (cepa de caso humano) e Dm28c (clone proveniente de *Didelphis marsupialis*) foram cedidas pelo Dr. Carlos Robello do laboratório de Biologia Molecular do Institut Pasteur UY, a fim de compará-las com os isolados do Rio de Janeiro.

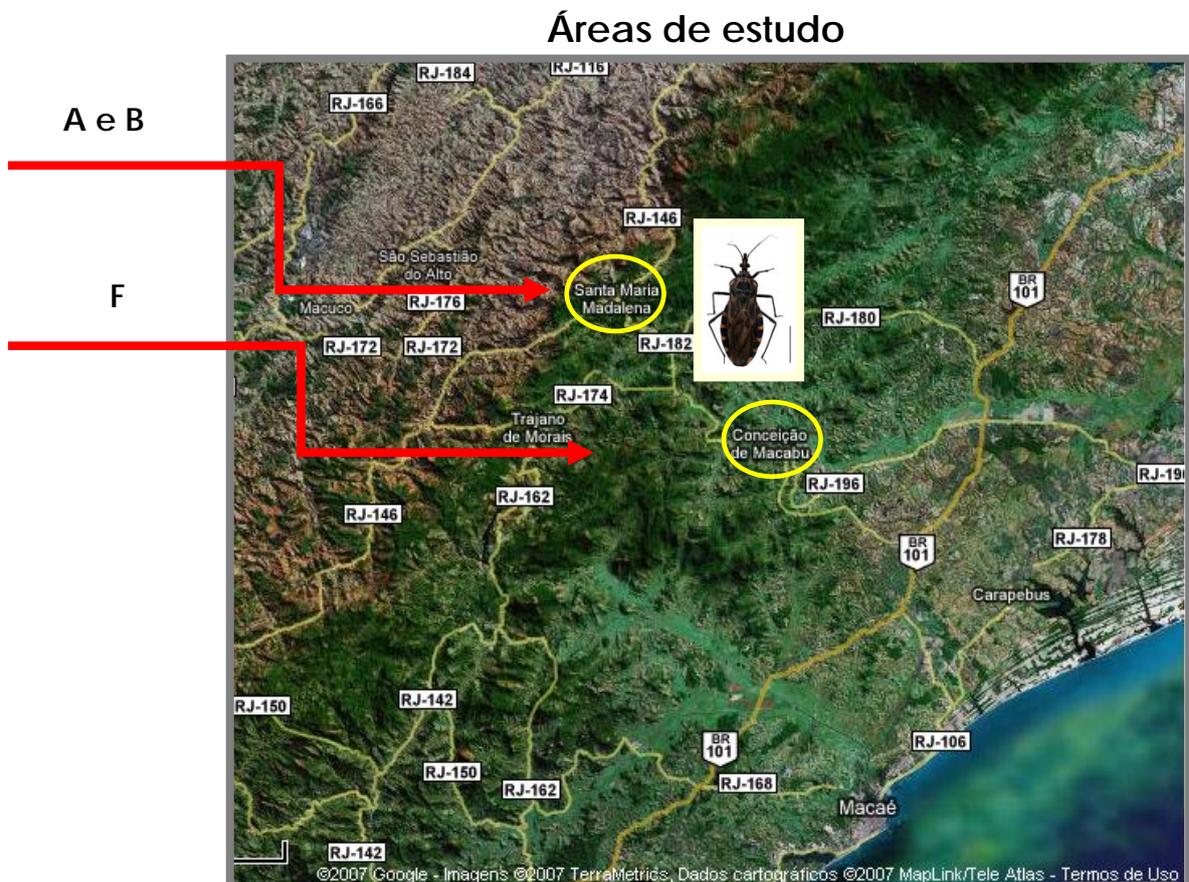


Figura 6: Áreas de captura de *Triatoma vitticeps* (Google maps). Adaptado.

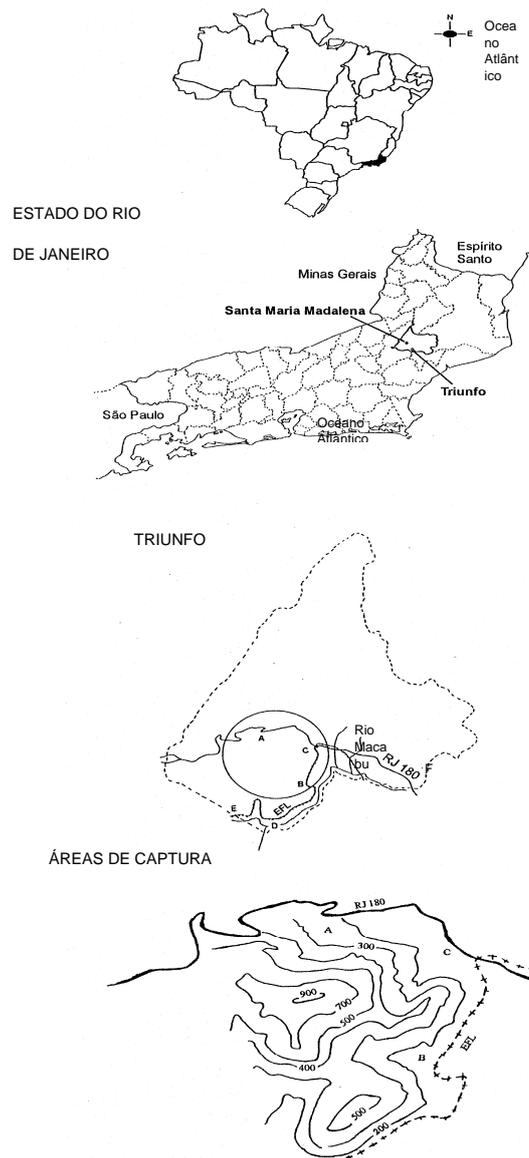


Figura 7: Mapa com as áreas de captura de *Triatoma vitticeps* (Foto: Gonçalves, *et al.*, 2008).

4.3 Cultivo dos parasitos

Em todos os experimentos foram utilizadas amostras criopreservadas. E, a cada etapa, as amostras foram retiradas do nitrogênio líquido. A partir daí, foram crescidas e mantidas em meio NNN (NOVY & MACNEAL 1904, NICOLE 1908) acrescidas de LIT (Liver Infusion Tryptose) (CAMARGO 1964), como fase líquida, suplementadas com 30% de soro fetal bovino. As mesmas foram acrescidas de LIT+ Soro Fetal Bovino + os 2×10^7 parasitos onde permaneceram incubados em estufa do tipo BOD (FANEM) a $27,3^{\circ}\text{C}$, sendo repicadas periodicamente com intervalos de sete dias para a obtenção das formas epimastigotas e para manutenção das amostras. A partir destes procedimentos, seguiram-se as metodologias específicas citadas abaixo.

4.4 Morfometria Clássica

A morfometria foi realizada com base nas formas oriundas de culturas axênicas a partir do 10º, 17º e 20º dias de cultivo das amostras SMM 98 (área A), SMM 36 (área B) e SMM1 (área F), encontradas em esfregaços preparados nos dias de leitura da curva de crescimento (SILVA 2006). Os mesmos foram previamente fixados com metanol por 10 minutos, tratados pelo ácido clorídrico (HCl) por 10 minutos, lavados e corados pelo método de GIEMSA tamponado (pH 7,2). E posteriormente, foram confeccionados os desenhos em microscópio óptico acoplado em câmara clara e em seguida mensurados com auxílio de um curvímeter. Um total de 20 formas epimastigotas e 20 formas tripomastigotas de cada lâmina foram observadas para cada uma das amostras (HOARE,1972) (Figura 8).

4.4.1 Mensuração das formas epi e tripomastigotas das amostras SMM98, SMM 36 e SMM1

Nove pontos de referência foram selecionados para a realização das medições visto na figura 8. Os seguintes parâmetros para mensuração foram utilizados: C – comprimento do corpo (sem o flagelo); L – largura do corpo (ao nível do meio do núcleo); F – comprimento do flagelo livre; PN – distância da extremidade posterior do corpo ao centro do núcleo; NA – distância da extremidade anterior do corpo ao centro do núcleo; IN (PN/NA) – índice nuclear (DIAS E FREITAS 1943); KN – distância do centro do cinetoplasto à margem do núcleo; PK – distância da extremidade posterior do corpo ao centro do cinetoplasto; IK (PK/KN) – índice do cinetoplasto (HOARE,1972).

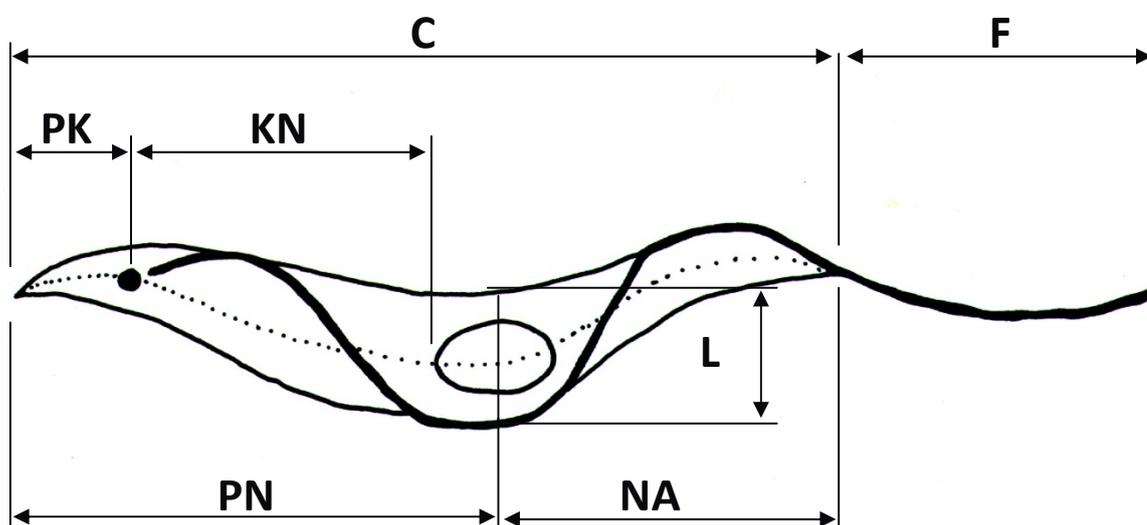


Figura. 8: Modificado de: Esquema demonstrativo dos parâmetros avaliados para realização do estudo morfométrico dos tripanosomatídeos (baseado em Hoare, 1972). C-comprimento do corpo sem o flagelo livre; L-largura do corpo ao nível do meio do núcleo; F-comprimento do flagelo livre; PN-distância da extremidade posterior do corpo ao centro do núcleo; NA-distância da extremidade anterior do corpo ao centro do núcleo; KN- distância do centro do cinetoplasto à margem do núcleo; PK- distância da extremidade posterior do corpo ao centro do cinetoplasto (HOARE, 1972).

4.4.2 Análise estatística:

Posterior a obtenção das médias e desvios padrão, foi utilizado o teste de Levene para testar a homogeneidade. As variáveis foram analisadas usando ANOVA e os valores médios para cada grupo foram contrastados usando o teste Turkey. A exatidão e precisão das medições para cada caracter também foram calculadas. E todas as análises foram realizadas com o programa V. 8.0. (Chicago, IL, USA).

Para verificar as diferenças significativas entre os grupos, foram utilizadas as amostras SMM 98, SMM 36 e SMM1. Em seguida, encontramos as médias e os desvios padrão de cada amostra, separando-as de acordo com os dois tipos de formas analisadas e o pré-estabelecido para o desenho das formas obtidas nos diferentes intervalos pré-definidos. A análise do agrupamento que gerou o dendrograma se baseou nos valores médios estandarizados obtidos por Componentes Principais (PCA) de cada amostra utilizando o software JMP (SAS Institute, Inc., Cary, NC, EE.UU) para as análises.

4.5 Status Redox durante a metaciclologênese *in vivo*

Para este experimento, foram utilizadas formas epimastigotas das amostras SMM 36 e SMM 98 mantidas em meio LIT suplementado com 10% SFB, quantificadas a uma proporção de 2.5×10^6 parasitos/mL. Sete dias após a proliferação *in vitro* foi obtida a quantidade de 5×10^7 /ml por amostra utilizada no experimento.

Em seguida, foi realizada a montagem do banho maria circulante à temperatura de 37°C. Este aparato foi constituído de mamadeiras de vidro e recebeu o seguinte tratamento para as alimentações artificiais:

Tratamento (SMM 98 e SMM36)	Formas epi com 7 dias de cultivo em Meio LIT
Controle: sangue+ parasitos	epi 5×10^7 /ml
Sangue+Heme+para sitos	epi 5×10^7 /ml+30 μ M – Heme
Sangue+NAC+ parasitos	epi 5×10^7 /ml+30 μ M- NAC

4.5.1 Alimentação e Infecção oral em *Rhodnius prolixus*

A alimentação foi oferecida a ninfas de 5º estágio da espécie *Rhodnius prolixus* livres de infecção por *T. cruzi* logo após a muda e em jejum. E foram utilizados neste experimento, cinco insetos para cada alimentação pelo período de uma hora (figura 9).

Para os experimentos de interação, a dieta sanguínea foi substituída por meio de cultura (LIT + 10% de SFB) na presença ou na ausência de 30 μM de Heme e NAC numa concentração ótima de parasitas para se obter uma concentração final de 1×10^6 parasitas/ml de volume total (figura 9).

Posterior a alimentação os insetos foram separados e mantidos no Insetário (LIVEDIH- FIOCRUZ) para que se iniciasse a dissecação e quantificação nos seguintes intervalos pós alimentação artificial: 7 °, 14 ° e 19 ° dia.



Figura 9: Alimentação artificial em banho-maria circulante acoplado em mamadeiras artificiais.

4.5.2 Dissecção e separação dos compartimentos do intestino: Anterior, médio e posterior

Os insetos foram dissecados dorsalmente, em seguida foram retiradas e separadas as três porções (controle e os intestinos tratados). Os intestinos anteriores, médios e posteriores foram acondicionados separadamente em microtubos (Eppendorf) de 1 mL e macerados e completados com PBS à 7,4 pH para as posteriores diluições subsequentes, quantificações e verificação do número de formas epi e tripomastigotas encontradas nos intervalos pré-estabelecidos (figura 10).

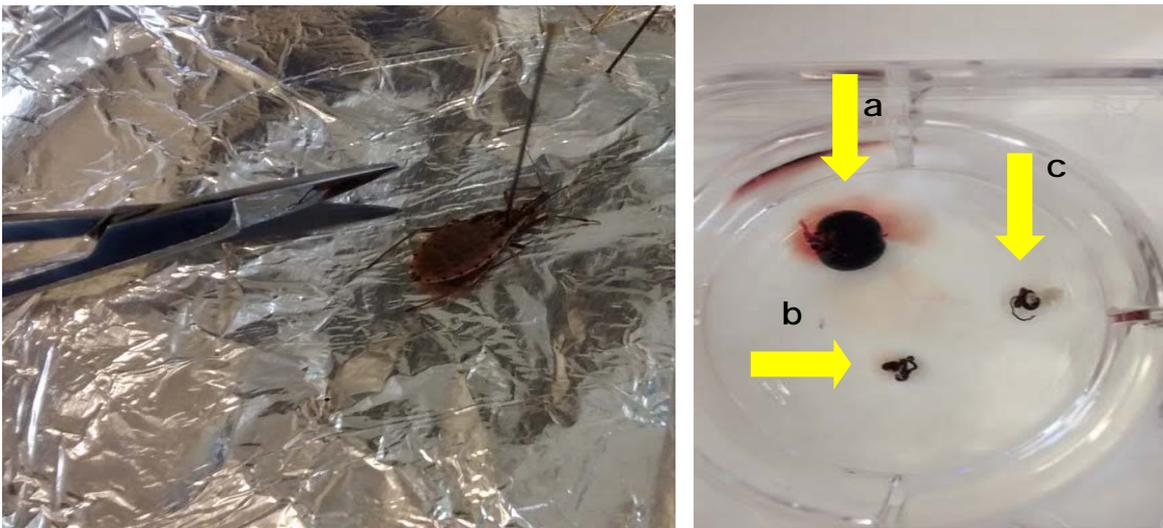


Figura 10: a- intestino anterior; b- intestino médio; c-intestino posterior

Quantificação das porções do intestino no 7 °, 14 ° e 19 ° dia

Tratamento Intestino Anterior	Tratamento Intestino Médio	Tratamento Intestino Posterior
Sangue (Heme) + <i>T. cruzi</i> + 1,2ml PBS	Sangue+ (Heme) + <i>T. cruzi</i> + 500µl PBS	Sangue (Heme) + <i>T. cruzi</i> + 200µl PBS
Sangue +NAC + <i>T. cruzi</i> + 1,2ml PBS	Sangue+ NAC+ <i>T. cruzi</i> + 500µl PBS	NAC + <i>T. cruzi</i> + 200µl PBS
Sangue+NAC+ <i>T. cruzi</i> + 1,2ml PBS	Sangue+NAC+ <i>T. cruzi</i> + 500µl PBS	Sangue+NAC+ <i>T. cruzi</i> + 200µl PBS
Controle: Sangue+ <i>T. cruzi</i> +1,2ml PBS	Sangue + <i>T. cruzi</i> +500µl PBS	Sangue + <i>T. cruzi</i> + 200µl PBS

*As contagens dos parasitos foram realizadas em triplicata e quantificadas em câmara de Neubauer e diluições realizadas no 7º dia; 14º dia e 19º dia. Posteriormente foi utilizado o teste 2wayAnova e pós-teste Bonferroni para a análise da metaciclogênese.

4.6 Eletroforese- SDS Page

Extração e purificação dos antígenos parasitários (preparação de amostras).

Devido à alta mortalidade de camundongos infectados com a amostra SMM 36 e, a presença de infiltrados mononucleares presentes nos tecidos de camundongos infectados com a SMM 98 verificados em estudos realizados por SILVA *et al.*, (2008) estes isolados foram selecionados para que fossem comparados os perfis de proteínas totais com as cepas padrão, Silvio e TCC.

A preparação das amostras SMM98, SMM36, Silvio e TCC teve início com a extração e solubilização, utilizando soluções simples ou misturas mais complexas de agentes caotrópicos, como uréia, detergentes e agentes redutores. Alguns fatores foram observados no procedimento para uma preparação eficaz das amostras, incluindo: solubilização das proteínas de todas as classes, as proteínas hidrofóbicas; prevenção da agregação protéica e perda de solubilidade; prevenção de modificações químicas durante as extrações; foram removidos os ácidos nucléicos ou outras moléculas que poderiam interferir na análise.

Dosagem das proteínas totais extraídas para aplicação nos géis de acrilamida

Valor máximo permitido -20µg por amostra

TCC	1,3 µg/ mL
Silvio	1,1 µg/ mL
SMM98	1,4 µg/ mL
SMM36	3,4 µg/ mL

4.6.1 Obtenção de extrato de proteínas totais e Eletroforese em gel de poliacrilamida

Extração de proteínas totais: Foi preparado o volume de tampão de lise completando com cocktail de inibidores de proteases, mix de nucleases (mantidas em gelo), Ditiotretitol (DTT) (1% final). Os parasitos foram lavados três vezes com PBS frio e uma vez em 1mL de Tris 10mM pH 7 para eliminar os sais. Todo o sobrenadante foi retirado com pipeta e agregado o tampão de lise em uma relação 50µL de tampão por cada 100 milhões de parasitos. Foi utilizado o vortex de 1 a 3 minutos aproximadamente para clarear a solução. Foram incubados por 30 minutos à temperatura ambiente com uma leve agitação para permitir completar a lise, foram centrifugados 30 minutos à 12500 rpm. Foi transferido o sobrenadante a um novo Eppendorf e conservado a -80°C.

4.6.2 Quantificação através do método de Bradford

Curva: Foram preparadas em placas duas soluções de Soro de Albumina Bovino (BSA) 5mg/mL e feitas seis diluições seriadas em meio independentes. Foi agregado 10µL de cada ponto de concentração nos poços da placa e adicionado 10µL de Bradford em uma diluição de 1:10 e 1:20 da amostra. Em seguida adicionado 200µL de Bradford em todos os poços. Posteriormente, foram incubados em agitação lenta por 15 minutos. Foi realizada leitura em absorbância (595nm). E, em seguida, feita a curva de concentração em função à absorbância, ajuste à reta e absorbância para a amostra. Seguindo os critérios aceitáveis: R >0,97 (figura 11).

Amostras utilizadas:

T	0,	0	0,	0,1	0,4	14,	r
CC	372	,389	3805	315	9926	97794	g/mL
S	0,	0	0,	0,1	0,6	18,	r
ilvio	408	,41	409	6	0404	12132	g/mL
S	0,	0	0,	0,1	0,4	14,	r
MM98	373	,373	373	24	7169	15074	g/mL
S	0,	0	0,	0,0	0,1	5,7	r
MM36	297	,297	297	48	9228	6838	g/mL

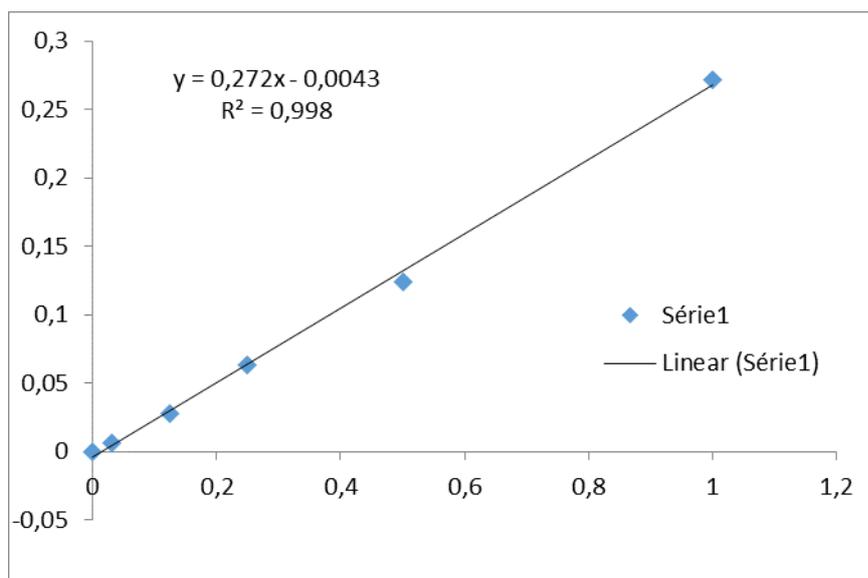


Figura 11: Regressão linear com média das duplicatas

4.6.3 SDS PAGE

A preparação dos géis de Poli-acrilamida (SDS) e desenvolvimento da Eletroforese de proteínas desnaturalizada foi realizada utilizando os volumes de soluções de acrilamida em um Becker à concentração de Acrilamida 10%. Em um becker próprio foram misturadas as seguintes soluções para dois géis: stock de acrilamida, a água purificada, o stock de tampão Tris-HCL 1,0 M pH=6,8 e as soluções de APS e SDS a 10% nas quantidades indicadas na tabela 1. Em seguida foi acrescentado TEMED, homogeneizado com pipeta e aplicado no cassete. Posteriormente, foram inseridos os pentes escolhidos para o tipo de gel. Posterior a este processo, os géis foram retirados dos cassetes (cuidadosamente entre placas de vidros) e transferidos para a cuba de eletroforese em suportes próprios da cuba.

Os géis foram colocados na cuba de eletroforese sem os pentes, com as amostras aplicadas e o marcador molecular THERMO PAGE RULER # 26619, preenchidos com o tampão de corrida. Posteriormente, foram conectados ao sistema de refrigeração da cuba e fonte de energia própria para o sistema. A intensidade de corrente utilizada foi de 25mA por gel.

Tabela I Soluções para o prepararo do gel de separação- SDS-PAGE

Concentração de Acrilamida	Componentes	Volume (mL) de cada componente para preparar o volume de gel
6%	-	-
8%	-	-
10%	H₂O purificada Stock Acrilamida Tris 1.5M pH 8.8 SDS 10% APS 10% TEMED	19,8 16,7 12,5 0,50 0,50 0,02 Volume final- 25mL
12%	-	-
14%	-	-
15%	-	-

4.6.4 Coloração SDS PAGE

A coloração foi realizada com Comassie blue, o gel com agitação em um amplo volume de corante (0.1% Comassie blue R-250 (P/V) em 40% metanol (V/V), 10% ácido acético (V/V) por 20 minutos. O gel foi lavado em solução de descoloração (40% metanol e 10% ácido acético). Posteriormente, foi fixado por aproximadamente 1 hora em uma mistura de 10% metanol e 7% ácido acético, adicionado a solução até a observação das bandas. A visualização foi feita em ultravioleta e escaneado por um captador de imagens.

4.7 Análise Proteômica

Solubilização das amostras SMM 98 e SMM36, isolados silvestres:

Mediante aos resultados obtidos na verificação do perfil total de proteínas das amostras silvestres confrontadas com cepas de referência atenuada (TCC) e a cepa de caso humana (Silvio), as mesmas foram utilizadas neste experimento.

Para a solução de solubilização das amostras SMM 98 e SMM 36 foram usadas como solução geral: a extração composta de uréia 8 M, DTT 50 mM ou TBS 2mM, CHAPS 4%, anfólitos carreadores 0,2 %, azul de bromofenol 0,0002 % e água q.s.p. 50

mL. Esta mesma solução foi utilizada para a reidratação das fitas de IPG (Eletroforese unidimensional).

✓ **Extração 1:**

Extração sequencial das proteínas: As amostras foram lavadas, centrifugadas a 12000 X g por 8 minutos à temperatura ambiente, lisadas e quantificadas. Foram adicionadas à cada 50 mg de proteínas por mililitro a solução 1 (Tris 40 mM). Posteriormente foram coletados os sobrenadantes e determinadas as concentrações das proteínas. O sobrenadante foi diluído em solução 2 (uréia 8 M, CHAPS 4 % TBP 2mM, Tris 40 mM e anfólitos 0,2%).

✓ **Extração 2:**

Após a lavagem das proteínas do “pellet” obtido na extração anterior com a solução 1 (2 vezes), foram desprezados o sobrenadante, adicionados ao “pellet”, meio volume da solução 2; foi ressuscitado cada “pellet” com a utilização do vortex e foi realizada a centrifugação a 12.000 x g por 8 minutos e coletado o sobrenadante.

✓ **Extração 3:**

Adicionada a solução 3 (uréia 5M, thiouréia 2 M, CHAPS 2%, SB-3-10 2%, TBP 2mM, Tris 40mM e anfólitos 0,2 %) ao “pellet” e repetidos os passos de preparação do mesmo da extração 2. Finalmente, as amostras foram tratadas com endonuclease à uma concentração de 150-300 U/mL por amostra (Incubadas por 20 minutos à temperatura ambiente. As diferentes frações foram separadas e submetidas a eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida e reveladas pela técnica de coloração por Nitrato de Prata.

4.7.1 Eletroforese Unidimensional

Aplicação de proteínas nas fitas de IPG: Fitas de 7 cm: Foi adicionada 10-100 µg de proteínas para coloração pelo método de prata ou 200-500 µg de proteínas para coloração por Comassie Blue. Fitas de 17 cm: E 100-300 µg de proteínas para coloração pelo método de prata ou 1-3 mg de proteínas para coloração por Comassie Blue. Reidratação das fitas de IPG: A solução usada para reidratar foi a mesma usada para solubilizar/diluir as amostras. - Reidratação passiva: Fitas de 7 cm – 125 uL de tampão; Fitas de 17 cm – 300 uL de tampão. As fitas foram reidratadas por 11 horas e as mesmas cobertas para evitar evaporação e precipitação da uréia. A reidratação ativa, foi feita em bandeja de focalização, submetendo as amostras a uma baixa voltagem (50 V), após uma hora de reidratação, sendo as fitas cobertas com óleo mineral.

***OBS:** O desenvolvimento da focalização isoelétrica (IEF) ocorrera nas seguintes condições: Fitas de 7 cm - 4000 V e fitas de 17 cm - 10000 V.

4.7.2 Eletroforese Bidimensional

As fitas foram armazenadas a -20°C por tempo indeterminado. Fitas de IPG equilibradas em tampão com SDS de maneira similar a ebulição das amostras em géis de eletroforese em SDS-PAGE unidimensional. Cada fita foi posicionada nos canais e preenchidas com tampão de equilíbrio (uréia 6 M, SDS 20%, tampão Tris/HCL 1,5 M pH 8.8, Glicerol 50% e água q.s.p 100 mL), adicionado de DTT 2% e incubadas por 1-10 minutos, para reduzir grupos sulfidríla; O tampão anterior foi retirado e preenchido o canal com novo tampão de equilíbrio adicionado de iodo acetamida 2.5%, para alquilar os grupos sulfidríla; as fitas foram posicionadas no topo do gel preparado previamente e submetidas a unidade à corrida eletroforética bidimensional.

4.8 Western Blotting

Para dar continuidade aos experimentos e com a finalidade de verificar os níveis de virulência através da expressão da amostra SMM 36 e compará-la com a cepa de referência DM28c (isolado silvestre de *D. marsupialis*), foram utilizados os anticorpos TcCPX, TcMPX, APX, SOD A, SOD B e TXNII.

Preparação dos anticorpos primários e secundário para incubação (Peroxiredoxinas):

Anticorpos primários	Diluição- PBS +BSA 2%
CPX	1:10000
MPX	1:1000
APX	1:1000
SOD A	1:2000
SOD B	1:2000
TXNII	1:1000

Anticorpo secundário	Diluição- PBS +BSA 2%
α Coelho/ Rabbit (SIGMA)	1:15000

Após a transferência, as membranas de nitrocelulose foram submetidas a solução contendo Ponceau 0,2% em Acético 10% (5 min); posteriormente, foi utilizada solução de bloqueio por 1 hora. E a leitura de cada anticorpo foi feita sobre parafilme separadamente, incubados por 1 hora a temperatura ambiente em diluição apropriada (1/500-1/4000); Em seguida, foram realizadas lavagens de 5 minutos com agitação

vigorosa. A revelação ocorreu durante os últimos lavados. A câmara escura foi preparada e foram separados três recipientes: revelador, H₂O e fixador. Em seguida, demos sequência a rotina específica para a revelação do gel.

Para a normalização foi utilizada a Tubulina de peso molecular de 55 KDa e de acordo com suas mensurações prévias utilizando-se o programa IMAGE J, foram realizadas as medidas e comparações entre as massas visualizadas e marcadas em cada banda encontrada nas radiografias reveladas.

***OBS:** Após a transferência foi realizada coloração Ponceau S para verificar a possível presença de proteínas.

4.9 Imunofluorescência Direta

Com a finalidade de visualizar através da fluorescência os parasitos (SMM 36 e Dm28c) marcados com os anticorpos TcCPX, TcMPX, APX, SOD A, SOD B e TXNII foi realizado o processamento dos parasitos em temperatura ambiente. Posteriormente foram fixados em tubos FALCON com paraformaldeído 2% (PFA) e incubados por 1 h na estufa a 28° C. Foram ressuspensos e centrifugados a 2000 rpm durante 5 minutos. Posteriormente, foram lavados 1 X em meio Eagle simples (tripsina +PBS) em temperatura ambiente e acondicionados na estufa 28° C com a finalidade de evitar choque térmico. As amostras foram quantificadas, fixadas e homogeneizadas antes da aplicação de 50 a 100µl por lamínula (revestida com Poli L Lisina A) e em seguida colocadas em placa de Petri com papel filtro úmido na estufa e aderidas *over night* na bancada. As amostras aderidas nas lamínulas foram lavadas 2 X em PBS estéril, mantidas em placa de Petri e reservadas na geladeira para aplicação dos anticorpos.

***OBS:** A Poli L lisina A foi aplicada nas lamínulas redondas de vidro, 80 µl (por lamínula), acondicionadas em placa de Petri por 30 minutos na estufa a 37° C. Foi retirado o excesso com pipeta Pasteur. E em seguida, foram lavadas em PBS 2 X, secas na estufa e reservadas para a aplicação dos parasitos.

Anticorpos	Diluição- PBS +BSA 2%
CPX	1:500
MPX	1:200
APX	1:200
SOD A	1:200
SOD B	1:100
TXNII	1:1000
Controle	1 lamínula p cada amostra – sem anticorpo primário. Apenas: Amostra + PBS – BSA2%

Preparação dos anticorpos primários para incubação (Peroxiredoxinas)

4.9.1 Preparação e incubação com os anticorpos primários

Os anticorpos diluídos (figura 16) foram depositados em recipientes com gelo em todas as etapas. Posteriormente, as lamínulas contendo os parasitos fixados foram lavadas duas vezes em PBS por 10 minutos em agitação lenta, lavadas em: PBS 3 X 10 minutos; PBS + Triton 0,5% 3 X 15 minutos; PBS 3X 10 minutos e PBS + BSA 4% 3X por 20 minutos.

Os anticorpos foram preparados em Eppendorf 1,5mL, diluídos em PBS+BSA à 2%. Em seguida, foram distribuídos 80 a 100 µl por lamínula, e acondicionados em câmara úmida *over night* na geladeira.

4.9.2 Pós incubação e pré incubação com o anticorpo secundário

As amostras foram lavadas 3X por 20 minutos em Salina tampão fosfato (PBS) + Bovine Serum Albumin (BSA) 4% sob agitação lenta. Retirou-se o anticorpo secundário do congelador e o mesmo foi mantido em gelo (gelo picado) com papel alumínio sob a bancada para descongelamento gradual. Em seguida, foi realizada a preparação da diluição do anticorpo secundário.

4.9.3 Anticorpo Secundário

Foi utilizado: Alexia 546 – Anti rabbit 1:1000. Posteriormente, foi preparada a diluição para aplicar nas lamínulas 1:1000. 999 µl PBS +BSA 4% +-1 µl Alexia 546 (retirado previamente no fluxo laminar). Foram colocadas as lamínulas em placa de Petri marcadas, incubadas por 1h a 37°C na estufa. Foram lavadas 3X por 10 minutos em PBS puro (agitação leve) livre de luminosidade. Em seguida, foram incubadas com 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) 1:5000 (5ml PBS puro + 1 µl DAPI) por cinco minutos na bancada coberto com papel alumínio (de 50 µl a 100 µl por lamínula). Foram lavadas com PBS puro 2X por cinco minutos. Separou-se as lâminas que receberam as lamínulas redondas com as amostras (identificadas com: nome da amostra; data, diluição, anticorpo).

4.9.4 Montagem em Diazabicyclo[2.2.2]octane (DABCO)

Foi retirado o excesso de PBS de cada lâmina com papel filtro, e em seguida foi colocada uma gota espessa de DABCO nas lâminas. Sendo as lamínulas acondicionadas sobre esta e pressionadas levemente com lenço de papel para retirar o excesso de DABCO. E com a finalidade de selar as lamínulas sobre as lâminas foi aplicado esmalte incolor na borda das lamínulas depois de secas, por fim, as amostras foram mantidas no freezer para visualização em microscópio Axio Imager M1 Apo Tome Zeiss.

4.10 Imunocitoquímica das amostras SMM 36 e Dm28c

Com o intuito de observar a imunomarcção das peroxidases na amostra SMM36, os isolados foram recolhidos por centrifugação a 1.500 g, lavados em PBS e, em seguida, fixados durante 1 hora a 4 ° C com 0,1% de glutaraldeído e 4% paraformaldeído diluído em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,2. Após lavagem, as células

foram desidratadas numa série graduada de metanol e incorporados a -20°C em resina hirifilica- Lowicryl K4M.

A detecção da marcação da TcCPX e TcMPX na amostra SMM36, foi realizada através dos cortes ultrafinos em micrótomo e o material foi colocado em grades de níquel para visualização em microscópio eletrônico de transmissão. As grades foram lavadas com TBS (Tris-tampão-saline) por 10 minutos, e incubadas com TBS com 50mM de cloreto de amônia por 10 minutos. Lavadas uma vez em TBS por 10 minutos, mais três vezes em TBS; BSA a 4%; Tween a 1%; por 20 minutos. O material foi incubado com o anticorpo primário (CPX-1:50; MPX-1:20) diluído em solução de TBS; BSA a 4%; Tween 1% em câmara úmida a 37°C . As grades foram lavadas três vezes em solução TBS; BSA a 2%; e Tween 1% por 10 minutos. Foram novamente incubadas com o anticorpo secundário conjugado a ouro diluídos na solução TBS; BSA a 2%; e Tween 1%, em câmara úmida a 18°C por 30 minutos. Em seguida foram lavadas em TBS; BSA a 2%; e Tween 1%, lavadas três em água tridestilada deionizada. Posteriormente foram contrastadas em acetato de uranila por sete minutos. E observadas em microscópio eletrônico de transmissão da marca: JEOL JEM 1011 .

5. RESULTADOS

5.1 Morfometria Clássica

Os aspectos morfológicos de epimastigota e tripomastigotas mostraram diferença no comprimento. Observou-se que os parasitos da amostra SMM1 são mais curtos quando comparados com outros isolados (Figura 12).

Medição das Formas epimastigotas no 10º dia

Comparando os resultados das medições obtidas para epimastigota no dia 10 (Tabela II), observou-se que o parâmetro de comprimento (C), apresentou valor elevado na amostra SMM 36 média = $22,9 \pm SD = 4.1$, assim como o maior comprimento do flagelo (F) média = $9,0 \pm sd = 2,4$, enquanto que o maior valor encontrado para a largura do corpo foram: (L) média = $2,3 \pm dp = 0,3$ e índice nuclear (NI) média = $5,4 \pm SD = 1.7$ que pôde ser visto na amostra SMM1.

Medição das formas Tripomastigotas formas no 17º dia

Entre as formas tripomastigotas no dia 17 (Tabela III), o maior comprimento (C) foi observado para a amostra SMM 36 média = $20,1 \pm SD = 3.3$, assim como o comprimento do flagelo (F) média = $5,8 \pm dp = 1,9$ e índice cinetoplasto média = $0,3 \pm sd = 0,1$. SMM 98 a amostra apresentou uma média ligeiramente superior = $0,9 \pm dp = 0,2$ para a largura do corpo quando comparado com outras amostras, que seriam considerados insignificantes ($p > 0,01$). A amostra SMM1 também mostrou pouca diferença no cinetoplasto média = $0,2 \pm sd = 0,2$ quando comparadas entre as outras amostras.

Medição das formas Tripomastigotas formas no dia 20

Os resultados das amostras de tripomastigotas em 20 dias, demonstraram significância para todas as variáveis testadas $p < 0,01$. Os índices analisados revelaram também que o maior valor encontrado para o comprimento do corpo, largura do corpo, flagelo e o índice nuclear pôde ser notado na amostra SMM36. O índice de cinetoplasto embora tenha sido maior para amostra SMM1, não demonstrou tanta diferença dentre as demais amostras (Tabela III). Com estes resultados, verificou-se que as amostras são morfológicamente heterogêneas, destacando-se a amostra SMM 98 proveniente da área A (figura 12).

Tabela II. Medidas das formas epimastigotas (μm) de *Trypanosoma cruzi* encontradas no 10^o dia da curva de crescimento em meio LIT. Os dados representam a média e o desvio padrão; entre parênteses está a amplitude (mínima e máxima).

		Parâmetros de Mensuração				
Amos tras						
	N	C	L	F	IN	
SMM 98	2 0	19,1 $\pm 4,6$ (12,2 – 29,6)	1,6 \pm 0,3 (1,1 – 2,2)	6,4 \pm 2,8 (2,2 – 13,9)	0,4 \pm 0,1 (0,2 – 0,7)	
SMM 36	2 0	22,9 $\pm 4,1$ (15,2 – 30,5)	2,1 \pm 0,4 (1,3 – 2,8)	9,0 \pm 2,4 (4,4 – 13,1)	0,3 \pm 0,1 (0,2 – 0,7)	
SMM 1	2 0	17,8 $\pm 4,0$ (9,6 – 25,2)	2,3 \pm 0,3 (1,7 – 3,0)	4,7 \pm 1,7 (2,2 – 9,6)	5,4 \pm 1,7 (2,2 – 9,6)	

N: número de espécimes medidos; C: comprimento do corpo sem o flagelo livre; L: largura do corpo ao nível do meio do núcleo; F: comprimento da porção livre do flagelo; PN: distância da extremidade posterior do corpo ao centro do núcleo; NA: distância da extremidade anterior do corpo ao centro do núcleo; IN (PN/NA): índice nuclear.

Tabela III. Medidas das formas tripomastigotas (μm) de *Trypanosoma cruzi* encontradas no 17º ao 20º dia da curva de crescimento em meio LIT. Os dados representam a média e o desvio padrão; entre parênteses está a amplitude (mínima e máxima).

Amostr s	Parâmetros de Mensuração					
	N	C	L	F	IN	IK
SMM 98	20	10º dia 15,9 ± 2,6 (12,2 - 20,9)	10º dia 0,9 ± 0,2 (0,4 - 1,3)	10º dia 4,6 ± 1,9 (0,9 - 8,7)	10º dia 1,2 ± 0,6 (0,7 - 2,7)	10º dia 0,2 ± 0,1 (0, 1 - 0,4)
		17º dia 16,9 ± 2,7 (13,1 - 22,6)	17º dia 0,8 ± 0, 2 (0,4 - 1 ,3)	17º dia 4,3 ± 2,0 (0,9 - 7, 8)	17º dia 1,0 ± 0,4 (0,5 - 2, 0)	17º dia 0,3 ± 0,2 (0, 0 - 1,0)
SMM36	20	10º dia 20,1 ± 3,3 (15,2 - 26,1)	10º dia 0,8 ± 0, 2 (0,4 - 1,3)	10º dia 5,8 ± 1,9 (2,28,7)	10º dia 1,0 ± 0,5 (0,5 - 3,0)	10º dia 0,3 ± 0,1 (0, 31,2)
		17º dia 19,1 ± 4,3 (13,1 - 27, 0)	17º dia 0,8 ± 0, 2 (0,4 - 1 ,1)	17º dia 5,9 ± 2,2 (2,2 - 8, 7)	17º dia 1,1 ± 0,8 (0,5 - 2, 0)	17º dia 0,2 ± 0,2 (0, 3 - 1,2)

		10º dia	10º dia	10º dia	10º dia	10º dia
		9,4±6,9	0,8±0,6	3,3±2,7	1,0±0,3	0,2±0,2
SMM1	20	(0,018,3)	(0,0-2,1)	(0,07,8)	(0,6-1,7)	(0,00,8)
		17º dia	17º dia	17º dia	17º dia	17º dia
		9,0±6,7	0,7±0,6	3,1± 3,2	0,9±0,4	0,3±0,3
		(0,0-16,5)	(0,0-1,7)	(0,0-13,1)	(0,2-1,8)	(0,0-1,2)

N: número de espécimes medidos; C: comprimento do corpo sem o flagelo livre; L: largura do corpo ao nível do meio do núcleo; F: comprimento da porção livre do flagelo; PN: distância da extremidade posterior do corpo ao centro do núcleo; NA: distância da extremidade anterior do corpo ao centro do núcleo; IN (PN/NA): índice nuclear, KN: distância do centro do cinetoplasto à margem do núcleo; PK: distância da extremidade posterior do corpo ao centro do cinetoplasto; IK (PK/KN): índice do cinetoplasto.

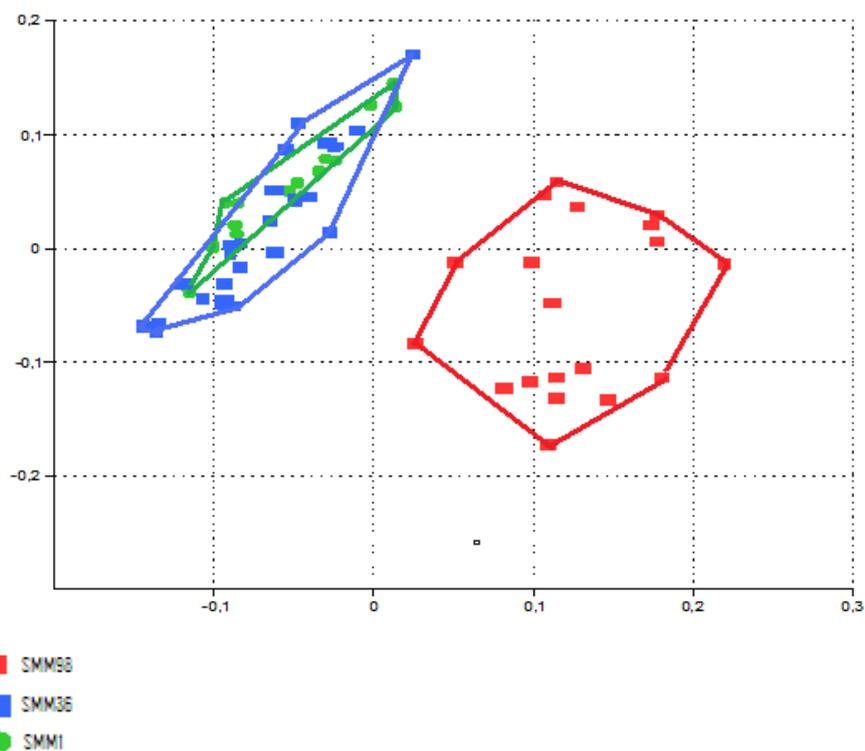


Figura 12: Análise dos Componentes Principais (PCA) - epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*

5.2 Avaliação do Status Redox no trato digestivo de *Rhodnius prolixus* submetidos a tratamento com NAC: SMM 98 (área A)

Formas Epimastigotas tratadas por 7 dias

Foi realizada a quantificação dos isolados coletados nas porções (anterior, média e posterior) dos intestinos tratados com NAC por 7 dias. E pôde ser observado nas triplicatas do intestino anterior, aumento do número das formas tratadas com NAC+Sangue (42×10^6), assim como no controle (35×10^6 células). No intestino médio, as formas epimastigotas tratadas com NAC+Sangue sofreram um acentuado declínio (18×10^6) no número de células, diferente do controle, que apresentou aumento no número de formas (52×10^6). Na porção posterior do intestino, as formas epimastigotas tratadas com NAC+Sangue sofreram declínio (30×10^6). O que pode ser observado também no controle que apresentou decréscimo no número de formas (9×10^6) (tabela IV; figura 13).

Formas Epimasgotas tratadas por 14 dias

Foi observado decréscimo do número de formas epimastigotas nas porções do intestino anterior, tratadas com NAC+Sangue (18×10^6), e no controle (20×10^6) que também demonstrou diminuição do número de formas. No intestino médio, as formas tratadas com NAC+Sangue sofreram um leve declínio (16×10^6) no número de células, assim como o controle quantificado que sofreu redução do número de formas (14×10^6). As formas tratadas com NAC+Sangue coletadas do intestino posterior sofreram aumento (30×10^6) o que também pôde ser observado no controle (28×10^6) (tabela IV; figura 13).

Formas Epimasgotas tratadas por 19 dias SMM 98

Observou-se no intestino anterior, que as formas epimastigotas tratadas com NAC+Sangue sofreram declínio de (8×10^6), já as formas utilizadas como controle sofreram decréscimo (0×10^6). No intestino médio, as formas tratadas com NAC+Sangue sofreram um leve declínio (6×10^6) do número de células, assim como verificado no controle (10×10^6). No intestino posterior, as formas epimastigotas tratadas com NAC+Sangue sofreram declínio (2×10^6) no número de parasitos, o que também pôde ser observado no controle (6×10^6) (tabela IV; figura 13).

Formas Tripomastigotas tratadas por 7 dias

Isolados coletados no intestino anterior tratados com NAC+Sangue apresentaram decréscimo do número de formas (10×10^6) assim como no controle que também apresentou declínio (35×10^6). No intestino médio das formas tratadas com NAC+Sangue não foi observado aumento (10×10^6) e as formas tripomastigotas tratadas com controle sofreram declínio do número de formas (15×10^6). No intestino posterior as formas tratadas com NAC+Sangue sofreram redução do número de 1×10^6 , enquanto que o controle apresentou aumento do número de formas (20×10^6) (tabela IV; figura 14).

Formas Tripomastigotas tratadas por 14 dias

No intestino anterior as formas epimastigotas tratadas com NAC+Sangue (0×10^6) na porção anterior do intestino não apresentaram parasitos e quando tratadas somente com controle (0×10^6) também demonstram declínio no número de formas. No intestino médio as formas as formas tratadas com NAC+Sangue sofreram um leve acréscimo no número de células (2×10^6) e o controle sofreu declínio do número de formas (0×10^6). No intestino posterior, observou-se um aumento de 20×10^6 de parasitos tratados com NAC+Sangue, e, observou-se ainda que o mesmo ocorreu com o controle que apresentou aumento do número de formas (45×10^6) (tabela (tabela IV; figura 14).

O número de formas tripomastigotas nas porções do intestino anterior demonstram que os isolados da amostra SMM98, quando tratadas com NAC+Sangue (0×10^6) não apresentaram parasitos, e, o mesmo foi observado no controle (0×10^6). No intestino médio, as formas tripomastigotas tratadas com NAC+Sangue sofreram leve acréscimo no número de células (8×10^6), já o controle, apresentou declínio total do número de formas (0×10^6). No intestino posterior, as formas tratadas com NAC+Sangue apresentaram um aumento de 65×10^6 células, assim com visto no controle (20×10^6) (tabela IV; figura 14).

Tabela IV: SMM 98: Metaciclogênese e Status Redox no intestino de *Rhodnius prolixus*

***HE= Heme; NAC= N-acetil cisteína**

Dias	SMM98			
	Epi		Tripo	
Intestino Anterior	Controle	NAC	Controle	NAC
7° dia	35.10 ⁶	42.10 ⁶	35.10 ⁶	10.10 ⁶
14° dia	20.10 ⁶	18.10 ⁶	0.10 ⁶	0.10 ⁶
19° dia	0.10 ⁶	8.10 ⁶	0.10 ⁶	0.10 ⁶
Intestino Médio				
7° dia	52.10 ⁶	18.10 ⁶	15.10 ⁶	10.10 ⁶
14° dia	14.10 ⁶	16.10 ⁶	0.10 ⁶	2.10 ⁶
19° dia	10.10 ⁶	6.10 ⁶	0.10 ⁶	8.10 ⁶
Intestino Posterior				
7° dia	9.10 ⁶	30.10 ⁶	20.10 ⁶	1.10 ⁶
14° dia	28.10 ⁶	30.10 ⁶	45.10 ⁶	20.10 ⁶
19° dia	6.10 ⁶	2.10 ⁶	20.10 ⁶	65.10 ⁶

Segundo o teste 2wayAnova o P> possui valor significativo 0.05.

- ▣ Controle: Sangue+ T. cruzi (intest. anterior)
- ▣ NAC+ Sangue+ T. cruzi (intest. anterior)
- ▣ Controle: Sangue+ T. cruzi (intest. médio)
- ▣ NAC+ Sangue+ T. cruzi (intest.médio)
- ▣ Controle: Sangue+ T. cruzi (intest. posterior)
- ▣ NAC+ Sangue+ T. cruzi (intest.posterior)

SMM98 Área A (epimastigotas)

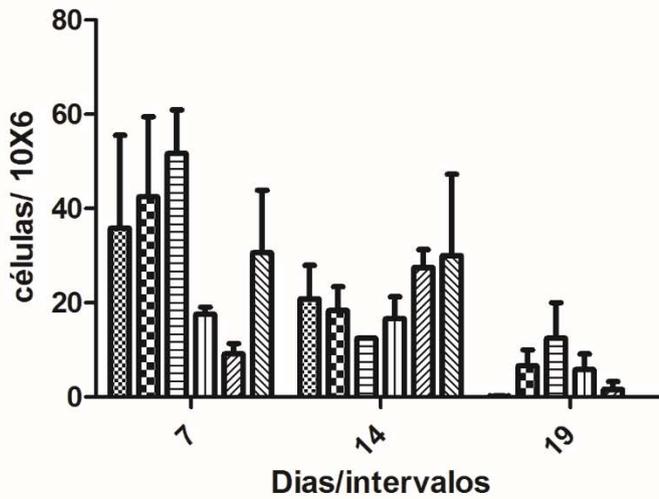


Figura 13: Status Redox-Metaciclógênese *in vitro*- formas epimastigotas: NAC (SMM98-área A).

- ▨ Controle: Sangue+ T. cruzi (intest. anterior)
- ▩ NAC+ Sangue+ T. cruzi (intest.anterior)
- ▧ Controle: Sangue+ T. cruzi (intes médio)
- ▦ NAC+ Sangue+ T. cruzi (intest.médio)
- ▤ Controle: Sangue+ T. cruzi (intest. posterior)
- ▣ NAC+ Sangue+ T. cruzi (intest.posterior)

SMM98 Área A (tripomastigotas)

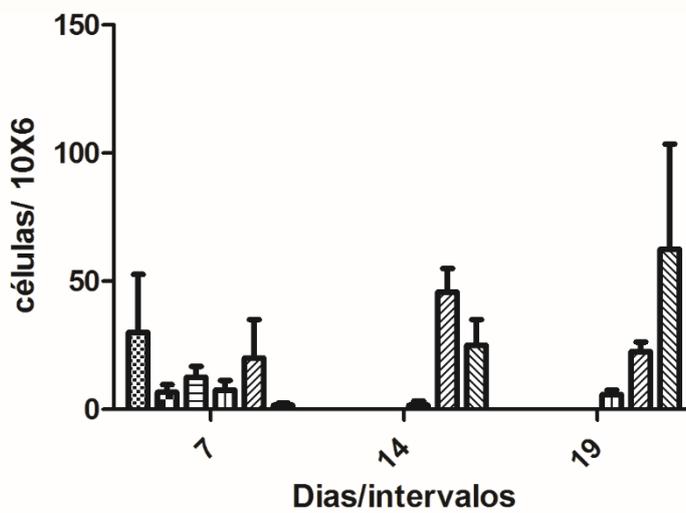


Figura 14: Status Redox-Metaciclógese *in vitro* de formas tripomastigotas: NAC (SMM98-área A).

5.2.1 Avaliação do Status Redox no trato digestivo de *Rhodnius prolixus* submetidos a tratamento com NAC: SMM 36 (área B)

Formas Epimastigotas tratadas por 7 dias

As formas epimastigotas tratadas com NAC+Sangue demonstraram aumento do número de parasitos (35×10^6) localizadas na porção anterior do intestino e o mesmo foi observado no controle que apresentou (30×10^6). No intestino médio, as formas tratadas com NAC+Sangue sofreram um acentuado declínio (12×10^6) do número de parasitos e o controle sofreu aumento (48×10^6). No intestino posterior, as formas tratadas com NAC+Sangue sofreram aumento ($25 \cdot 10^6$) no número de células e o controle sofreu decréscimo no número de formas ($8 \cdot 10^6$) (tabela V; figura 15).

Formas Epimastigotas tratadas por 14 dias

Nas porções do intestino anterior, as formas epimastigotas tratadas com NAC+Sangue demonstram diminuição do número de formas (18×10^6), assim como os isolados tratados somente com controle (20×10^6). No intestino médio, as formas tratadas com NAC+Sangue sofreram um leve declínio (15×10^6) no número de células, o que também foi observado no controle (10×10^6). Na porção posterior do intestino as formas tratadas com NAC+Sangue e o controle sofreram acréscimo de 24×10^6 e 22×10^6 , respectivamente (tabela V; figura 15).

Formas Epimastigotas tratadas por 19 dias

Nas porções do intestino anterior, as formas epimastigotas tratadas com NAC+Sangue, assim com o controle totalizaram 0×10^6 parasitos. No intestino médio, ocorreu decréscimo no número de formas (14×10^6), já o controle apresentou aumento de (48×10^6). Na porção posterior do intestino, as formas tratadas com NAC+Sangue que apresentaram aumento (8×10^6) e o mesmo foi verificado no controle que apresentou (8×10^6) (tabela V; figura 15).

Formas Tripomastigotas tratadas por 7 dias

As formas encontradas no intestino anterior tratadas com NAC+Sangue sofreram decréscimo de 6×10^6 e o controle apresentou aumento do número de formas (30×10^6). No intestino médio, as formas tratadas com NAC+Sangue apresentou leve crescimento durante a quantificação (8×10^6), e o controle sofreu declínio no número de formas (12×10^6). No intestino posterior, as formas tratadas com NAC+Sangue apresentaram redução no número de forma em cerca de $2 \cdot 10^6$ parasitos e no controle sofreram aumento no número de formas (14×10^6 células) (tabela V; figura 16).

Formas Tripomastigotas tratadas por 14 dias

Nas porções do intestino anterior, as formas tratadas com NAC+Sangue e o controle (0×10^6) demonstram declínio total no número de formas. No intestino médio, as formas tratadas com NAC+Sangue e o controle demonstrou a ausência de parasitos (0×10^6). Na porção posterior do intestino, as formas tratadas com NAC+Sangue que

apresentaram um total de 25×10^6 e o controle sofreu aumento considerável no número de formas (41×10^6 células) (tabela V; figura 16).

Formas Tripomastigotas tratadas por 19 dias

Nas porções do intestino anterior, os resultados demonstram que formas tripomastigotas tratadas com NAC+Sangue e o controle apresentaram (0×10^6). No intestino médio as formas tratadas com NAC+Sangue sofreram leve acréscimo no número de células (8×10^6) e o controle sofreu declínio total do número de formas (0×10^6 células). No intestino posterior, as formas tratadas com NAC+Sangue que apresentaram um aumento considerável (23×10^6) e o controle também sofreu um aumento de (2×10^6) (tabela V; figura 16).

Tabela V: SMM 36(B): Metacicloênese e Status Redox no Intestino de *Rhodnius prolixus*

Dias	SMM36			
	Epi		Tripo	
Intestino Anterior	Controle	NAC	Controle	NAC
7° dia	30.10 ⁶	35.10 ⁶	30.10 ⁶	6.10 ⁶
14° dia	20.10 ⁶	18.10 ⁶	0.10 ⁶	0.10 ⁶
19° dia	0.10 ⁶	0.10 ⁶	0.10 ⁶	0.10 ⁶

Intestino Médio

7° dia	48.10 ⁶	12.10 ⁶	12.10 ⁶	8.10 ⁶
14° dia	10.10 ⁶	15.10 ⁶	0.10 ⁶	0.10 ⁶
19° dia	48.10 ⁶	14.10 ⁶	0.10 ⁶	8.10 ⁶

Intestino Posterior

7° dia	8.10 ⁶	25.10 ⁶	14.10 ⁶	2.10 ⁶
14° dia	22.10 ⁶	24.10 ⁶	41.10 ⁶	25.10 ⁶
19° dia	8.10 ⁶	8.10 ⁶	2.10 ⁶	23.10 ⁶

*HE= Heme; NAC= N-acetil cisteína

Segundo o teste 2wayAnova o P> possui valor significativo 0.05.

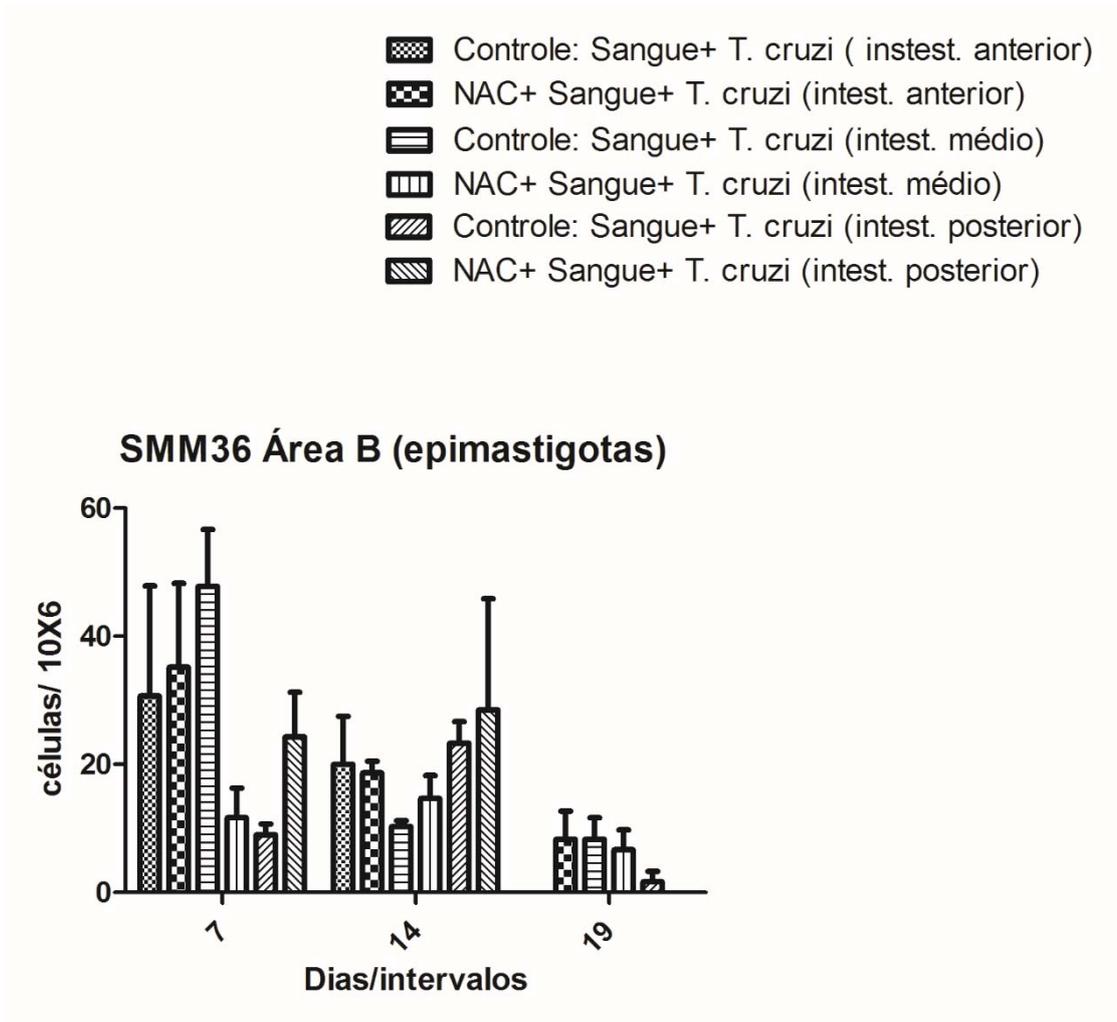


Figura 15: Status Redox-Metaciclôgênese *in vitro*- formas epimastigotas: NAC (SMM36-área B).

- ▨ Controle: Sangue + T. cruzi (intest. anterior)
- ▩ NAC+ Sangue+ T. cruzi (anterior)
- ▧ Controle: Sangue+ T cruzi (intest. médio)
- ▦ NAC+ Sangue+ T. cruzi (intest. médio)
- ▤ Controle: Sangue+ T. cruzi (intest. posterior)
- ▣ NAC+ Sangue+ T. cruzi (posterior)

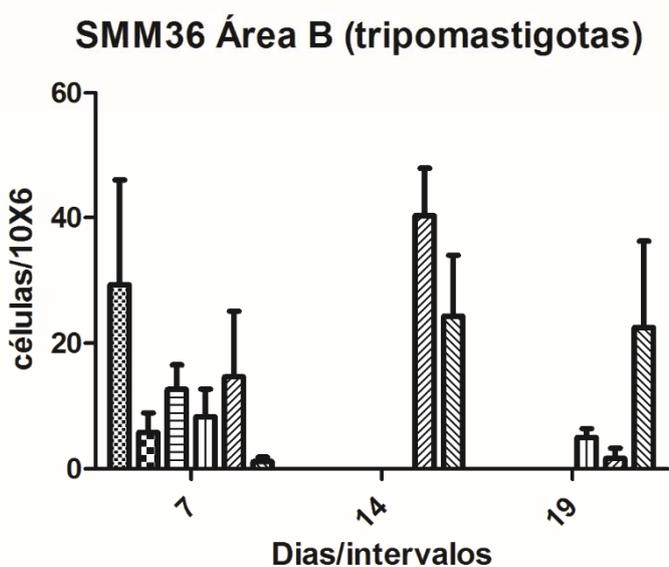


Figura 16: Status Redox-Metacicloênese *in vitro*- formas tripomastigotas: NAC (SMM36-área B).

5.3 Perfil de Proteínas - SDS PAGE

Estudo comparativo dos perfis de proteínas totais de cepas padrão *T. cruzi* com relação aos isolados da amostra SMM36- SDS Page (15µg/ml- *T. cruzi*)

A expressão das proteínas presentes na amostra SMM 36 apresentou banda com nítida expressão quando comparada com a cepa TCC, considerada uma cepa atenuada cultivada em laboratório e a cepa Silvio, isolada de caso humano e que apresenta baixa virulência.

Através do programa IMAGE J foi possível realizar a quantificação das proteínas expressas no gel. E conseqüentemente, a confecção do gráfico em colunas (Programa Graf Pad Prism 5.0) demonstrando desta forma, distintas expressões dentre as amostras utilizadas (figuras 17 e 18).

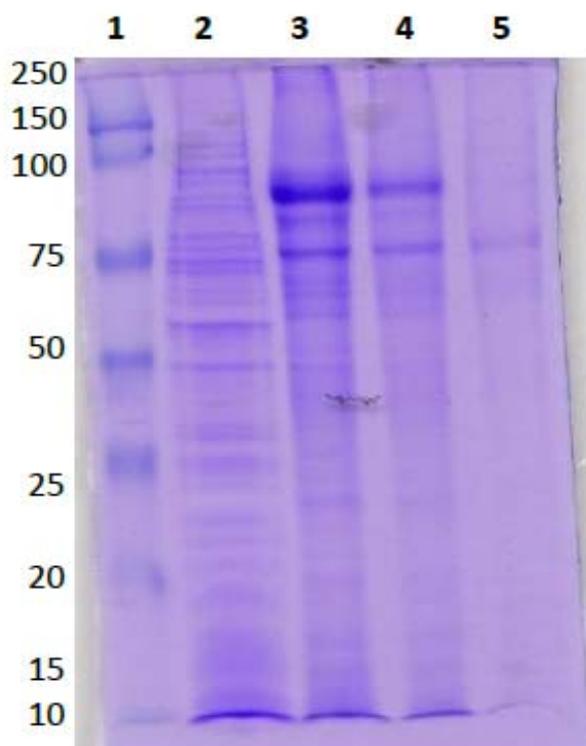


Figura 17: Proteínas totais: 1 Marcador molecular em KDa; 2 TCC; 3 SMM36; 4 Silvio
5 SMM98-Gel SDS 10% - coloração em Coomassie blue.

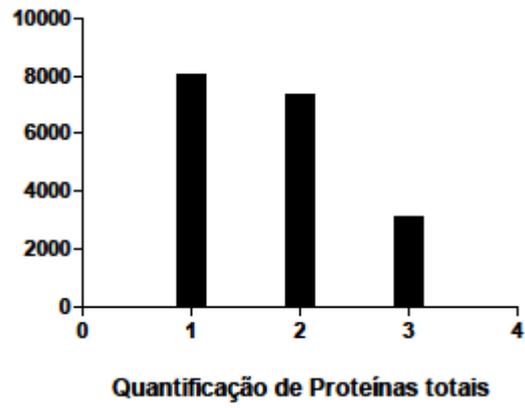


Figura 18: Quantificação das proteínas expressas no gel SDS page utilizando o programa Image J. 1- SMM36; 2- TCC; 3-Silvio; 4- SMM98

5.4 Análise Proteômica dos isolados do RJ: SMM 98 e SMM36

Foram verificados nos géis (bidimensionais) 2D proteínas aplicadas nos *strips* imobilizados pH 4-7 IPG contendo formas epimastigotas das amostras SMM 98 e SMM36 mediante a alíquota de 15µg/ml de parasitos por amostra (figuras 19a; b e 21a; b).

A princípio, observou-se que os isolados da amostra SMM 98 apresentou perfil proteômico diferenciado quando confrontado com expressão observada no gel 2D da amostra SMM 36 (figuras 20; 22).

Através da ampliação do gel 2D foi possível realizar a quantificação e a análise comparativa das amostras SMM 98 e SMM36. E, de acordo com os resultados obtidos nos géis 2D, pôde-se observar comparativamente que os isolados da amostra SMM 98 (área A) expressam quantitativamente menos proteínas que os isolados da amostra SMM 36 (área B) aproximadamente 93 ptns e 120 ptns, respectivamente (figuras 23a e b).

Proteínas expressas em gel 2D da amostra SMM 98 proveniente da área A

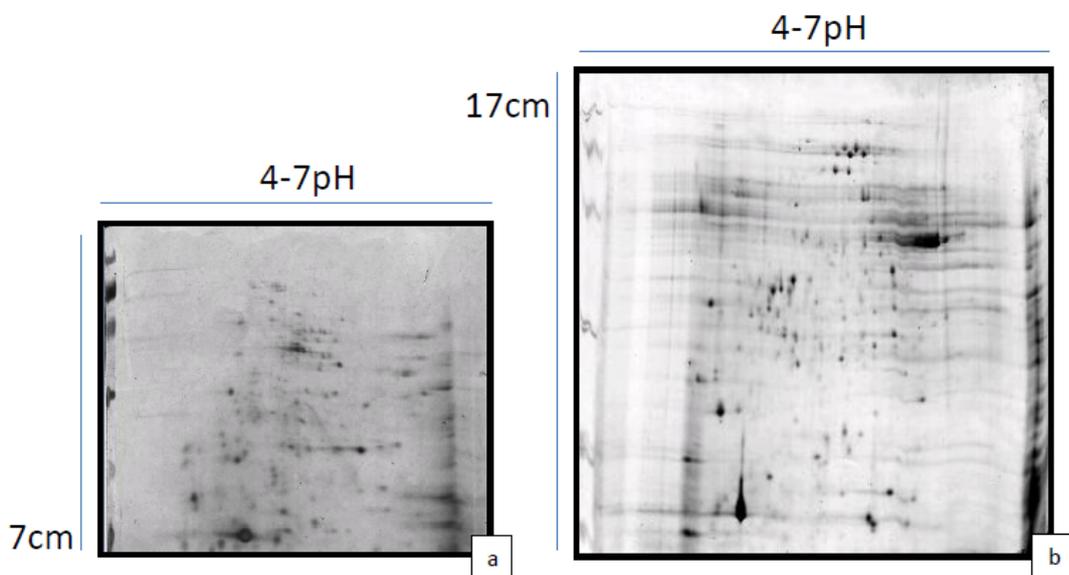


Figura 19: a-Mapa proteômico em gel de 7 cm (Corado por Prata) pH 3-10; b- Proteínas ampliadas pH 4-7 (17 cm) - SMM 98 (área A) epimastigotas

SMM 98 – Análise quantitativa de proteínas aproximadamente ±93 proteínas

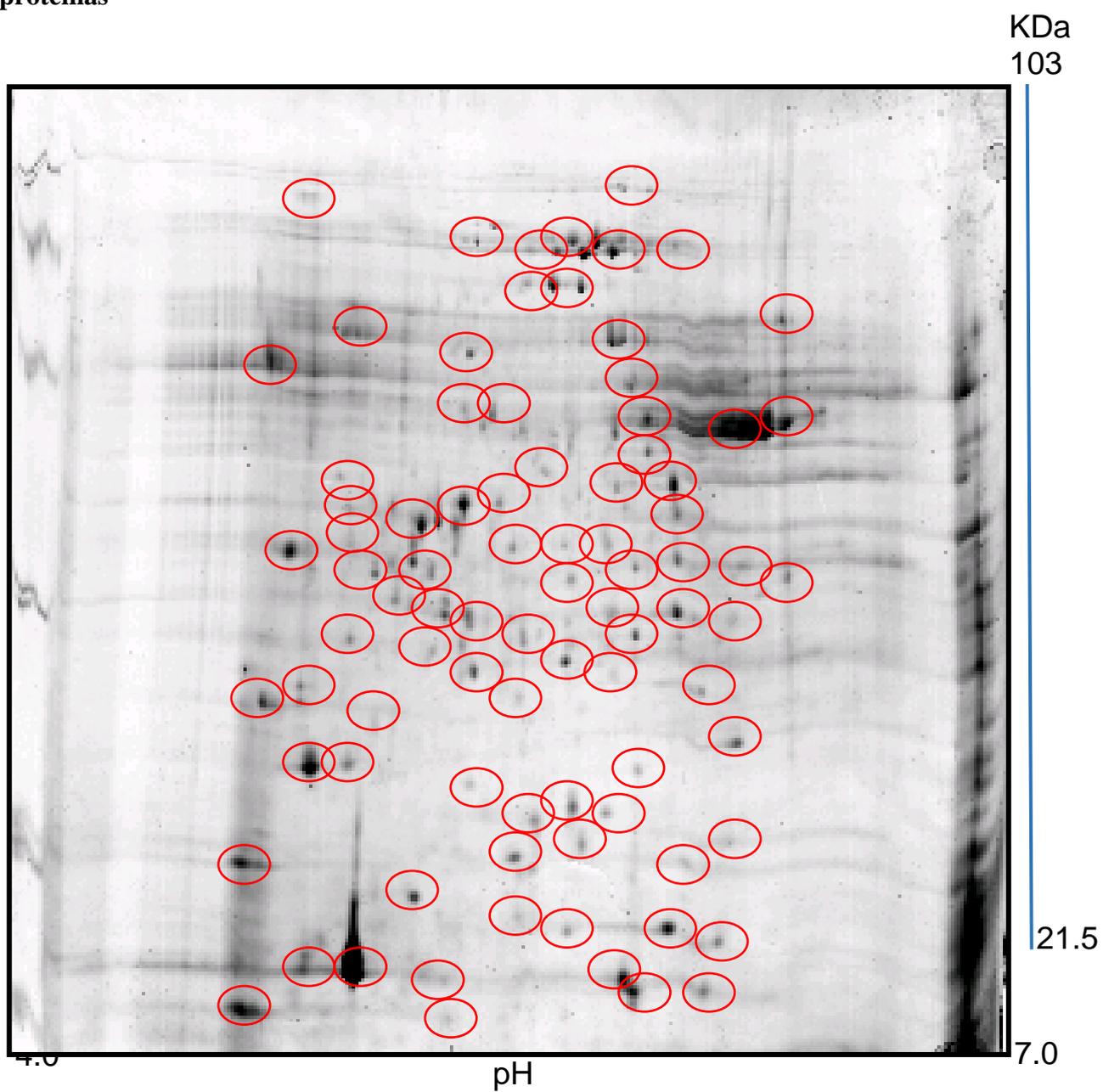


Figura 20: Ampliação do gel (17 cm) e Quantificação das proteínas (SMM98-área A) expressas por análise proteômica

Proteínas expressas em gel 2D da amostra SMM 36 proveniente da área B

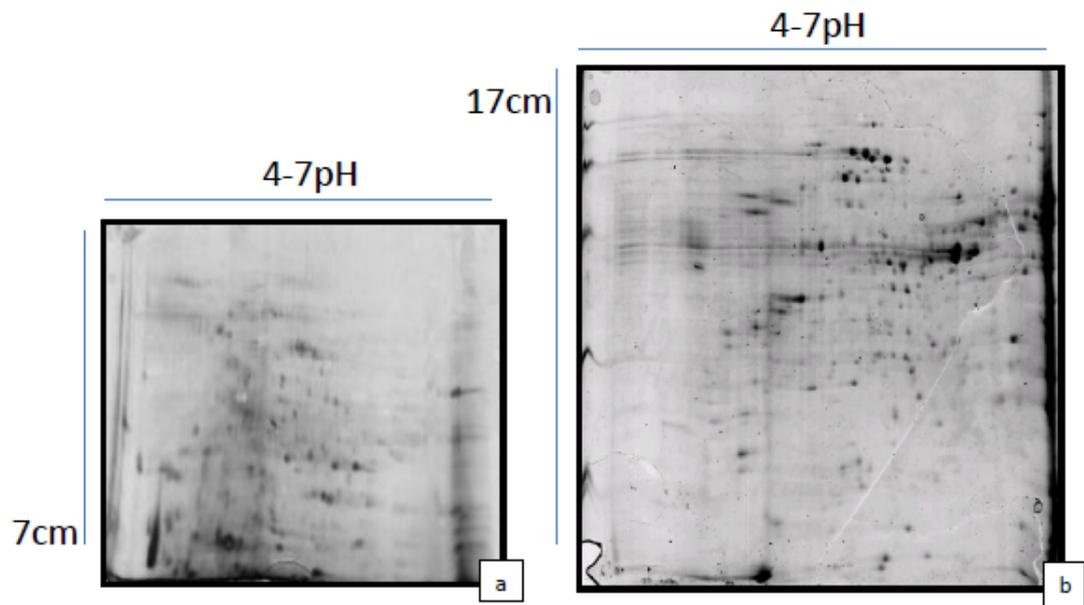


Figura 21: a- Mapa proteômico em gel de 7 cm 7 cm (Corado por Prata) pH 3-10; b- Proteínas ampliadas pH 4-7 (17 cm) - SMM 36 (área B) epimastigotas

SMM 36 – Análise quantitativa de proteínas (aproximadamente ±120 proteínas)

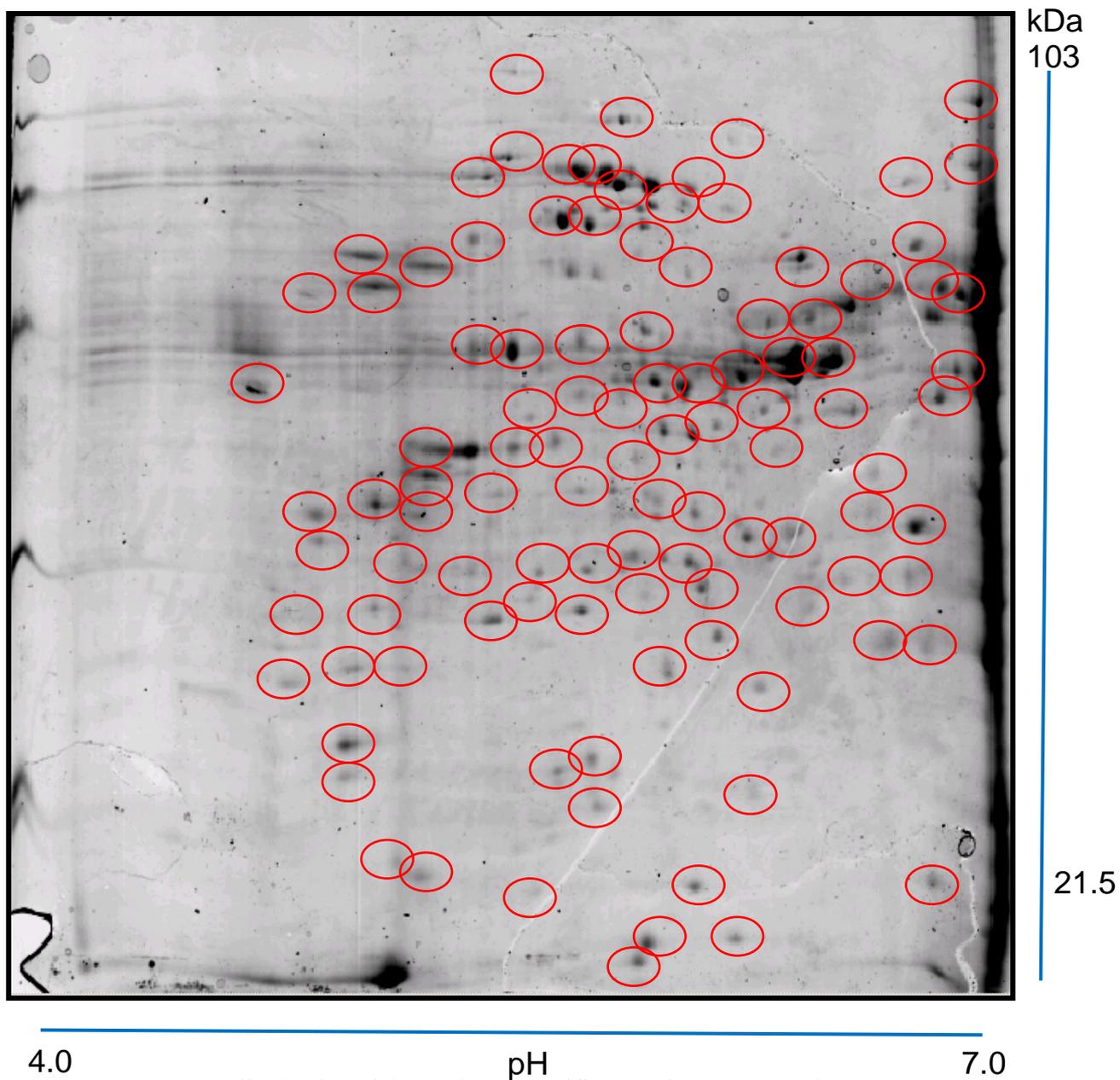


Figura 22: Ampliação do gel (17 cm) e Quantificação das proteínas (SMM36-
área B expressas por análise proteômica

Proteômica.

5.5 Perfil proteômico comparativo dos isolados do estado do Rio de Janeiro

SMM98 –Área A

SMM36 –Área B

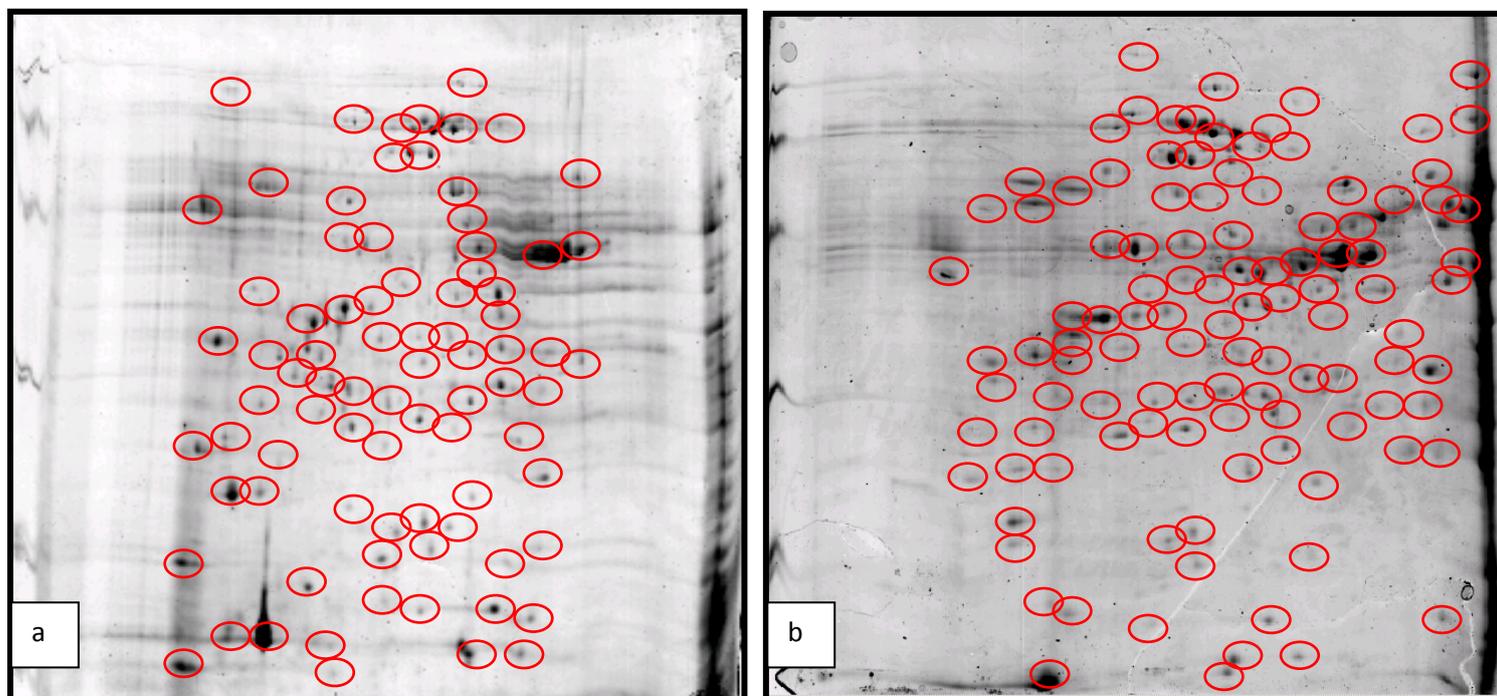


Figura 23: a-Análise Proteômica Comparativa de proteínas expressas em SMM 98 (área A) e b- SMM 36 (area B)

5.6 Western blotting da amostra SMM 36

Expressão de amostras de *T. cruzi* incubadas com o anticorpo APX-Ascorbato Peroxidase

A expressão do Ascorbato Peroxidase que apresenta peso molecular de 30 kDa, foi evidenciada através de Western Blotting utilizando formas epimastigotas de SMM 36 (isolado silvestre proveniente do RJ), TCC (cepa atenuada), Silvio (caso humano) e Dm28c (cepa silvestre), entretanto sua expressão variou de acordo com a especificidade do isolado. As diferentes expressões foram observadas no gráfico realizado a partir da normalização com Tubulina de peso molecular 55kDa. E dentre as amostras utilizadas, a SMM 36 apresentou similaridade com a cepa TCC (figura 24 a; b e 25).

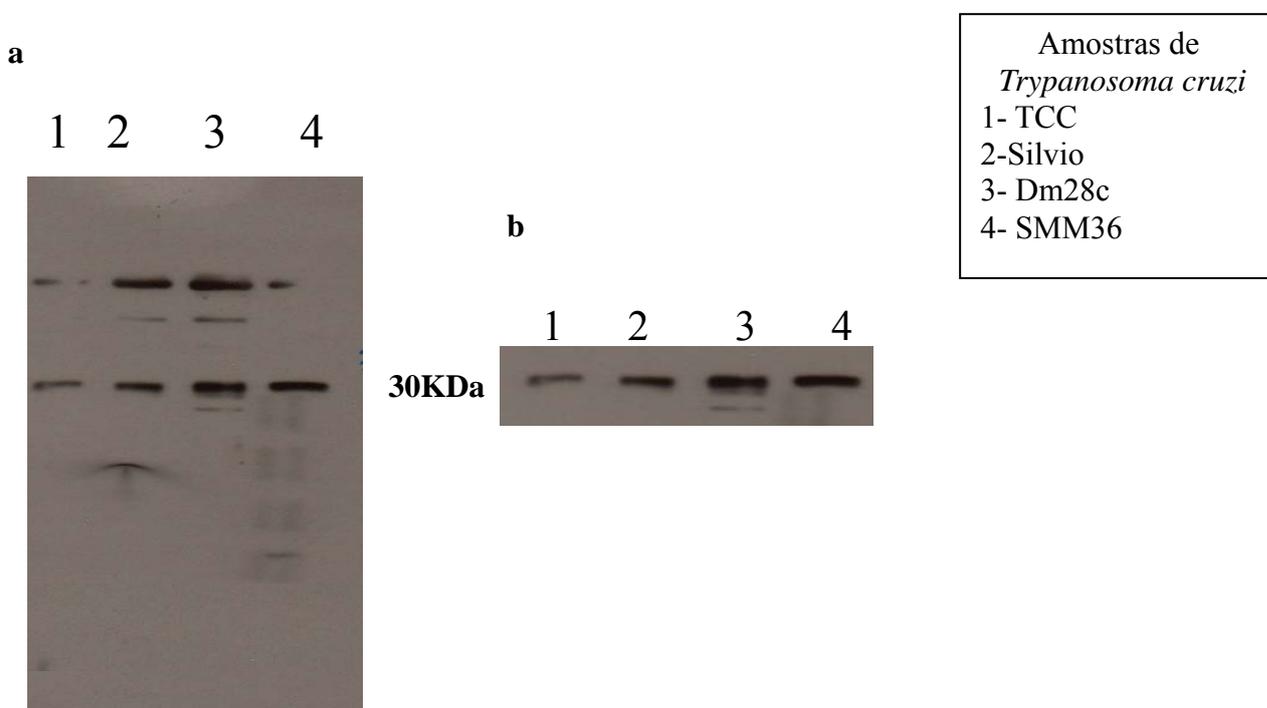


Figura 24: a Western Blotting – Expressão de APX em epimastigotas; b Ampliação das bandas (30 kDa).

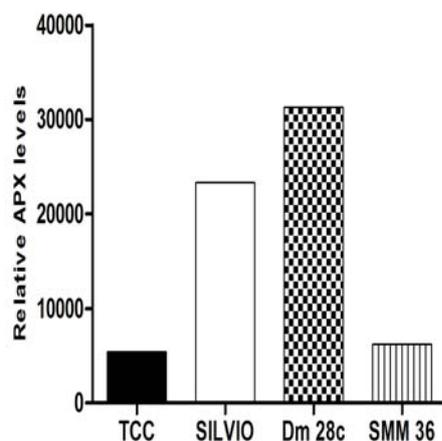


Figura 25 - Anticorpo Ascorbato Peroxidase. Quantificação e Normalização com Tubulina (55 kDa) Programa IMAGE J.

Expressão de amostras *T. cruzi* incubadas com o anticorpo TcCPX-Triparedoxina Peroxidase Citosólica

Com a utilização da peroxidase Triparedoxina peroxidase citosólica de peso molecular de 23 kDa, as amostras demonstraram variação em suas expressões, entretanto, o isolado SMM 36 demonstrou expressão levemente superior à cepa Silvio, porém bastante similar a mesma (figura 26 a; b e 27).

Anticorpo: Triparedoxina peroxidase citosólica – TcCPX

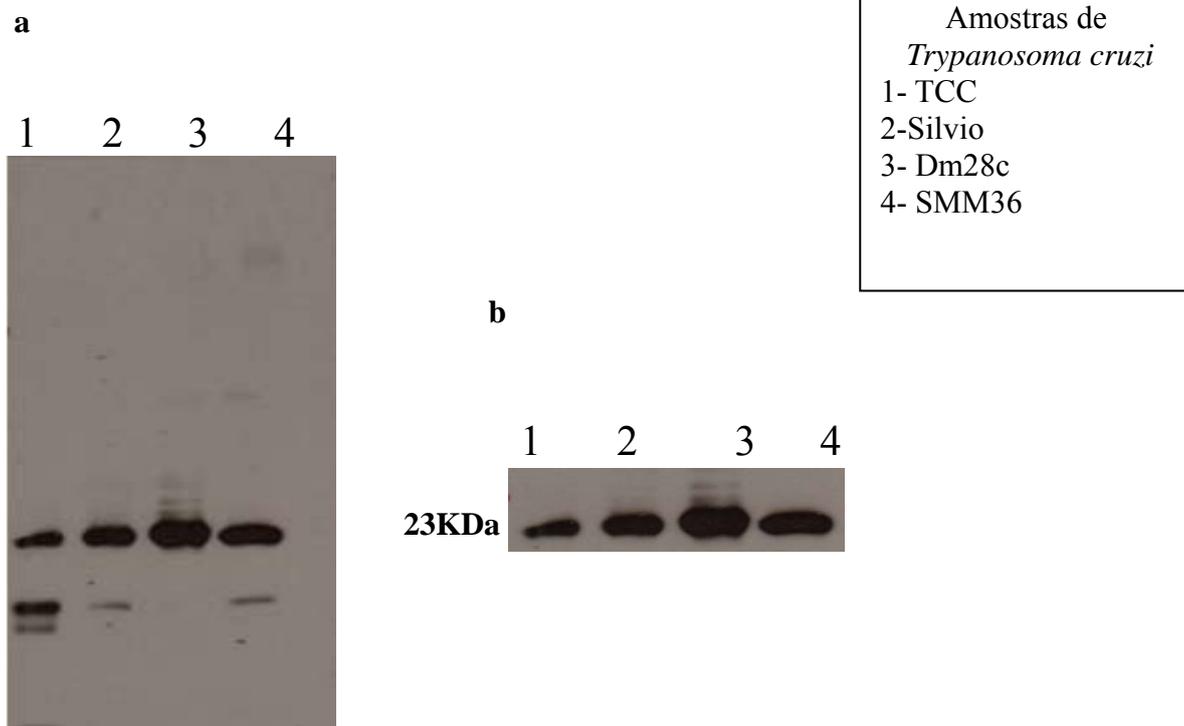


Figura 26:a- Western Blotting – Expressão de TcCPX em epimastigotas; b- Ampliação das bandas (23 kDa).

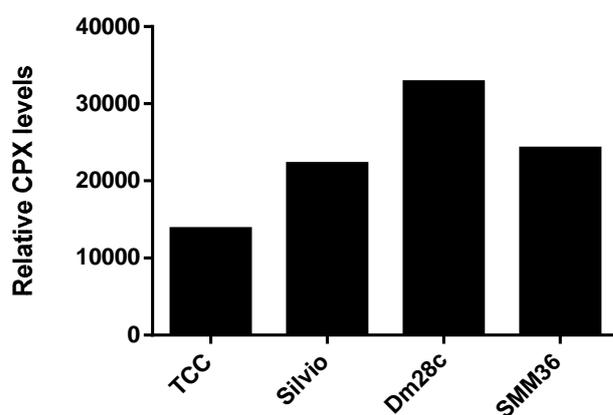


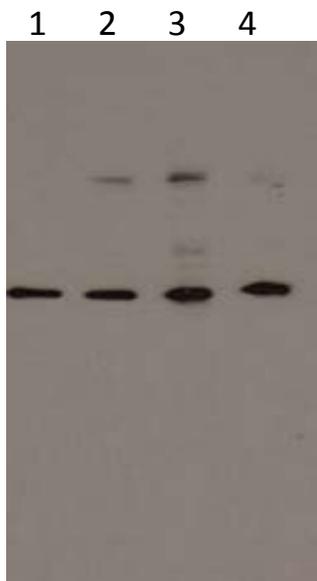
Figura 27: Anticorpo Triparedoxina peroxidase citosólica. Quantificação e Normalização com Tubulina (55 kDa) Programa IMAGE J.

Expressão de amostras de *T. cruzi* incubadas com o anticorpo TcMPX-Triaredoxina Peroxidase Mitocondrial

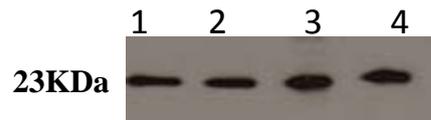
A expressão do Triaredoxina Peroxidase Mitocondrial que apresenta peso molecular de 23 kDa variou de acordo com a especificidade do isolado e diferentes expressões puderam ser observadas no gráfico realizado a partir da normalização com Tubulina, demonstrando similaridade da SMM 36 com a cepa padrão Dm28c (figura 28 a e b; 29).

Anticorpo: Triaredoxina peroxidase mitocondrial - TcMPX

a



b



Amostras de <i>Trypanosoma cruzi</i>	
1-	TCC
2-	Silvio
3-	Dm28c
4-	SMM36

Figura 28: a-Western Blotting – Expressão de TcMPX em epimastigotas; b-Ampliação das bandas (23 kDa).

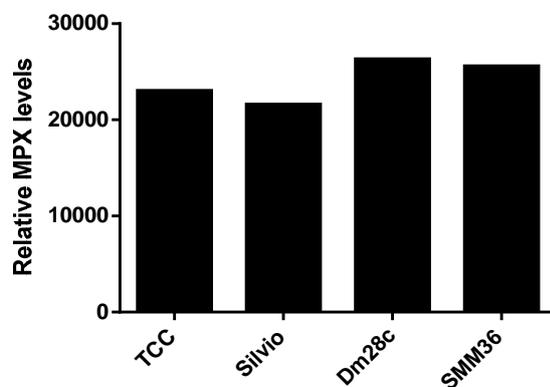


Figura 29: Triaredoxina peroxidase mitocondrial. Quantificação e Normalização com Tubulina (55 kDa) Programa IMAGE J.

Expressão de amostras de *T. cruzi* incubadas da SMM 36 com o anticorpo Superóxido Dismutase - SOD A

A expressão do Superóxido Dismutase que apresenta peso molecular de 24 kDa variou de acordo com a cepa, porém a SMM 36 apresentou menor expressão, semelhante a cepa TCC. E em contrapartida, a cepa Silvio obteve maior expressão, seguida da Dm28c (figura 30 a e b; 31).

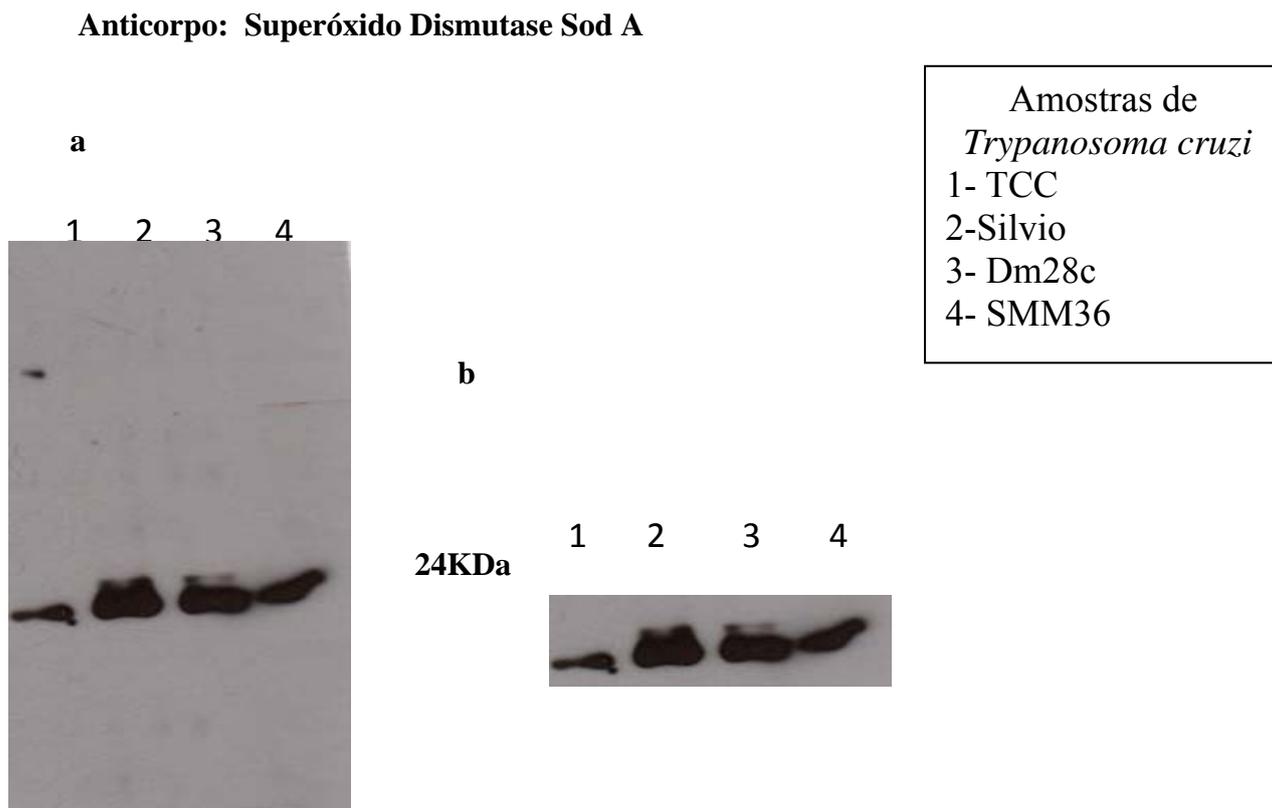


Figura 30: a- Western Blotting – Expressão de SOD A em epimastigotas; b- Ampliação das bandas (24 kDa).

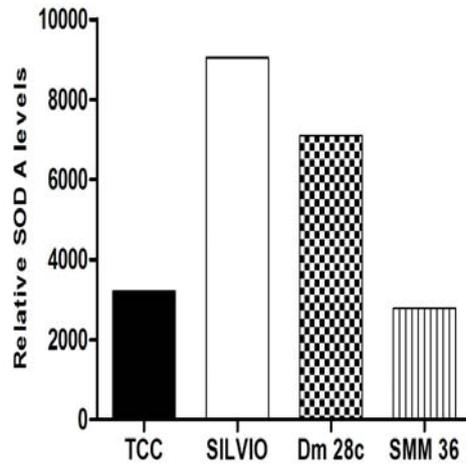


Figura 31 Superóxido dismutase. Quantificação e Normalização com Tubulina (55 kDa) Programa IMAGE J.

Expressão de amostras de *T. cruzi* incubadas com o anticorpo Superóxido Dismutase - SOD B

A expressão do Superóxido Dismutase B de peso molecular de 24 kDa, demonstrou expressões variadas que puderam ser observadas no gráfico realizado a partir da normalização com Tubulina (figura 33) onde evidencia a baixa expressão da amostra SMM 36 quando comparada às cepas de referência utilizadas (figura 32 a e b; 33).

Anticorpo: Superóxido Dismutase - SOD B

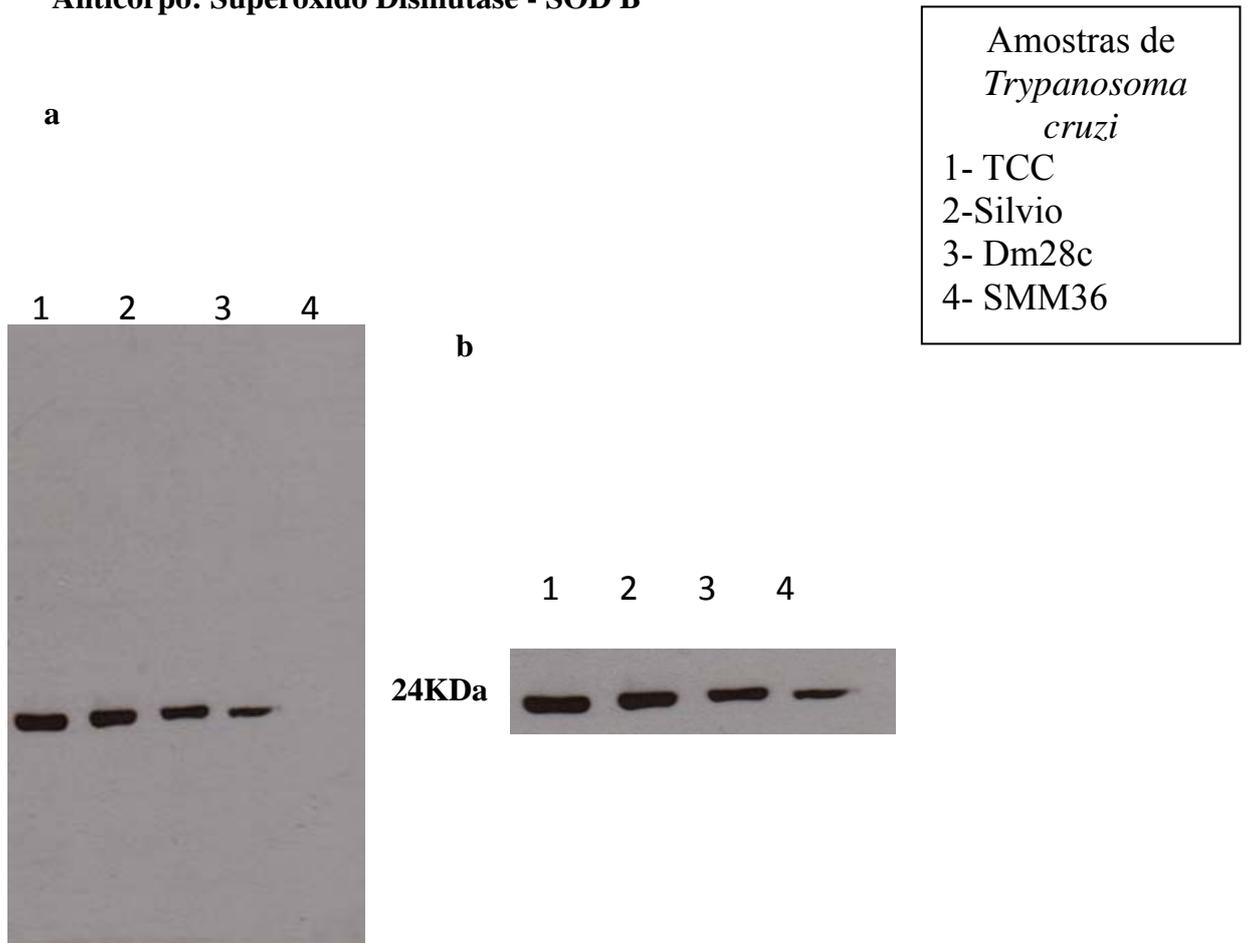


Figura 32: a- Western Blotting – Expressão de SOD B em epimastigotas; b- Ampliação das bandas (24 kDa).

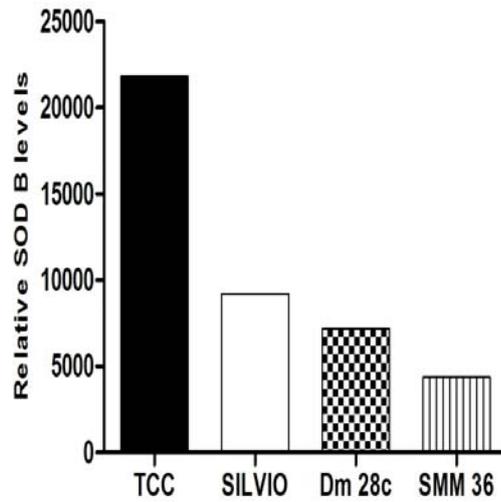


Figura 33: Superóxido dismutase. Quantificação e Normalização com Tubulina (55 kDa) Programa IMAGE J.

Expressão de amostras de *T. cruzi* incubadas com anticorpo Triparedoxina II – TXN II

A expressão do Triparedoxina II que apresenta peso molecular de 20 kDa apresenta diferentes expressões e podem ser observadas no gráfico realizado a partir da normalização com Tubulina. E, pudemos observar a semelhança entra a SMM 36 e Dm28c. (figura 34 a e b; 35).

Anticorpo: TXNII - TriparedoxinaII

Amostras de
Trypanosoma cruzi
1- TCC
2- Silvio
3- Dm28c
4- SMM36

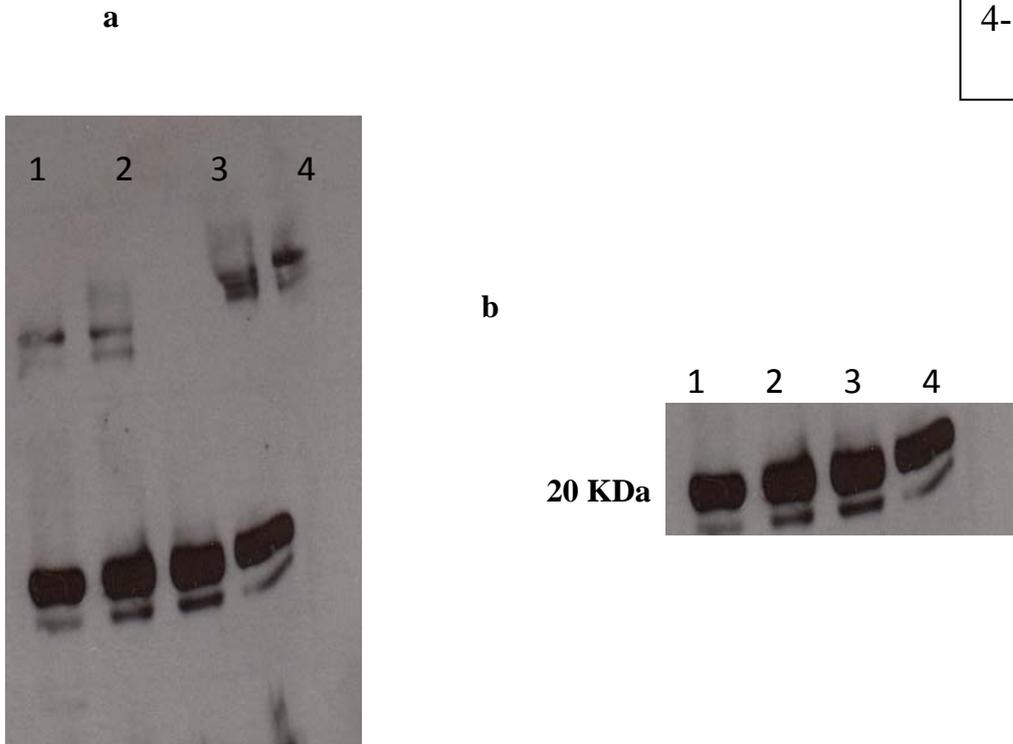


Figura 34a: Western Blotting – Expressão de TXNII em epimastigotas; **34b** Ampliação das bandas (20 kDa).

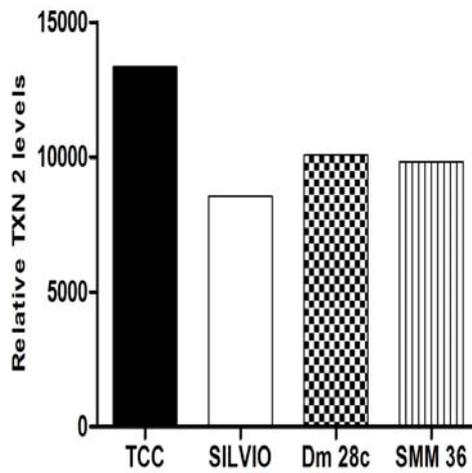


Figura 35: Anticorpo Tripanoredixina II. Quantificação e Normalização com Tubulina (55 kDa) Programa IMAGE J.

Coloração com Ponceau S

Não foram visualizadas proteínas na membrana após coloração pelo método Ponceau S, somente foi evidenciada a presença dos marcadores moleculares específicos utilizados para as verificar os pesos moleculares das peroxidases APX, TcCPX, TcMPX, SOD A, SOD B e TXN II.

5.7 Normalização com Tubulina

A fim de padronizar os experimentos, foi realizada a normalização das proteínas através da Tubulina de peso molecular de 55 kDa e a mesma foi medida e comparada com as expressões obtidas nas amostras através do Programa IMAGE J e foram confeccionados os gráficos (figuras 25, 27, 30, 33 e 35) com auxílio do Programa Prism 5.0 (figura 36).

55KDa -



Figura 36: Normalização através da Tubulina realizada com a visualização através do Programa IMAGE J

5.8 Imunofluorescência Direta TcCPX -Marcação utilizando os Anticorpos TcCPX e TcMPX (SMM 36 e Dm28c)

Com a finalidade de verificar a presença e localização subcelular de TcCPX e TcMPX foi realizada a técnica de Imunofluorescência direta utilizando as formas epimastigotas das amostras SMM 36 e Dm28c.

A peroxidase TcCPX, localizada no citosol foi nitidamente visualizada através da fluorescência presente nos citosóis das amostras SMM 36 e Dm28c.

E, também foi possível observar através da fluorescência a expressão da TcMPX localizada na mitocôndria, presente e bem evidente tanto na SMM 36 quanto na Dm28c.

As visualizações subcelulares foram observadas em presença ou ausência do DAPI, Rodamina, marcação conjugada com DAPI+Rodamina, através do contraste interferencial e sobreposição (figuras 37a, b, c, d; 38 a, b e c; 39 a, b, c; 40 a, b, c, d; 41 a, b, c, d).

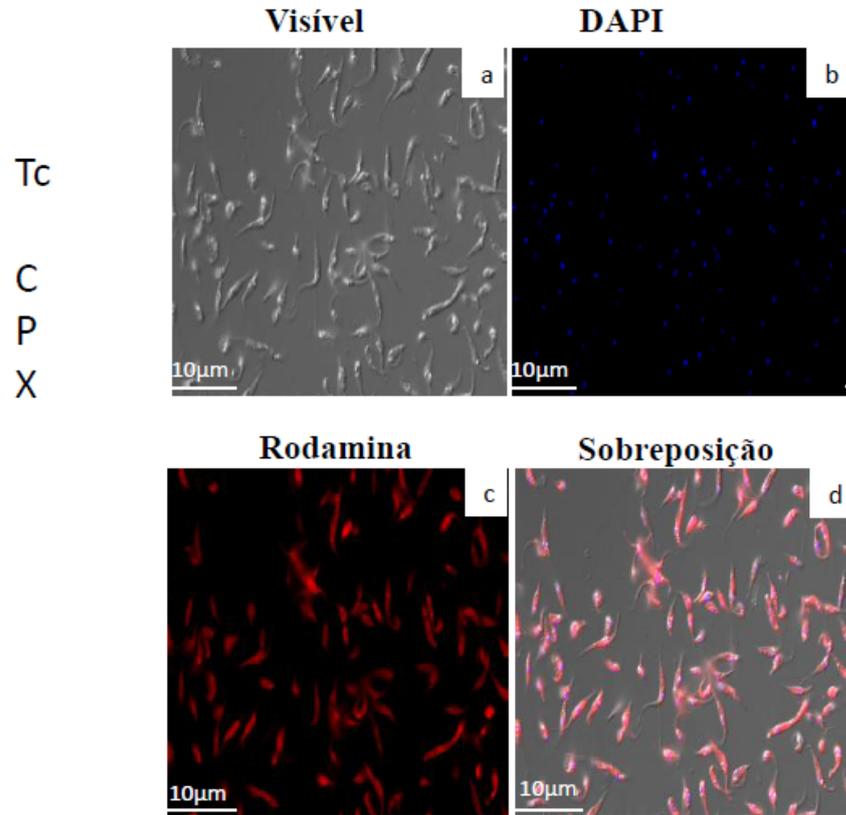


Figura 37 a, b, c e d: Imunofluorescência Direta da amostra SMM36 utilizando Triparedoxina Citosólica- Tc CPX

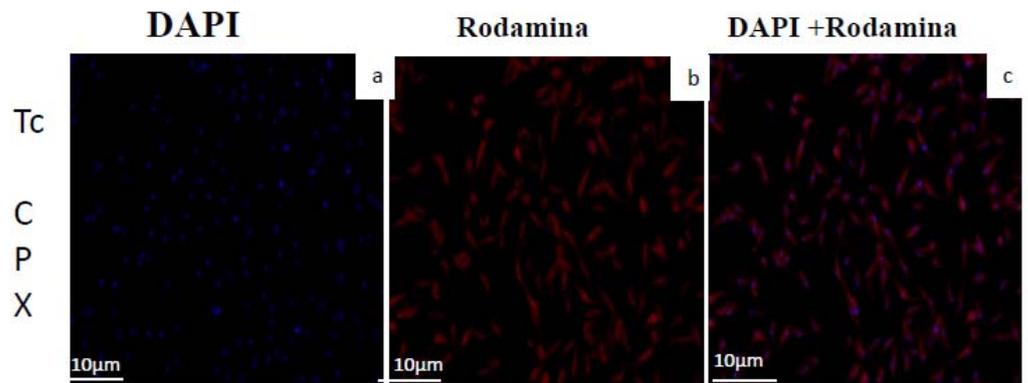


Figura 38 a, b, c: Imunofluorescência DAPI+ Rodamina : TcCPX- SMM36

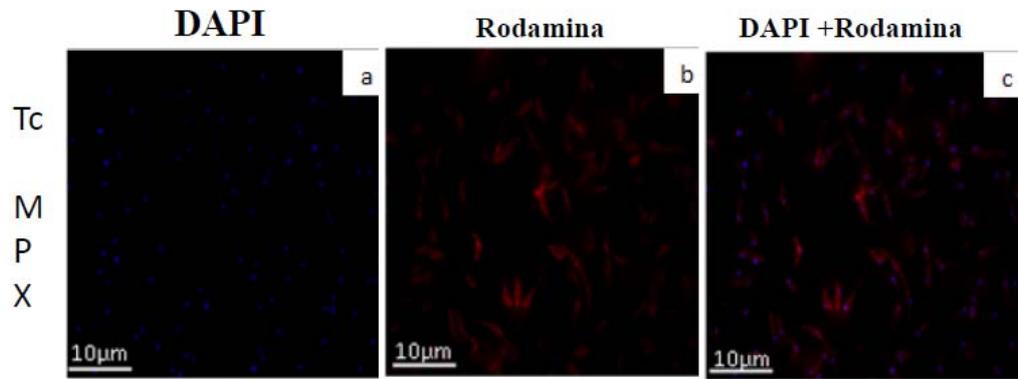


Figura 39a, b, c, d: Imunofluorescência Direta da amostra SMM 36 utilizando Triparedoxina Mitocondrial- Tc MPX

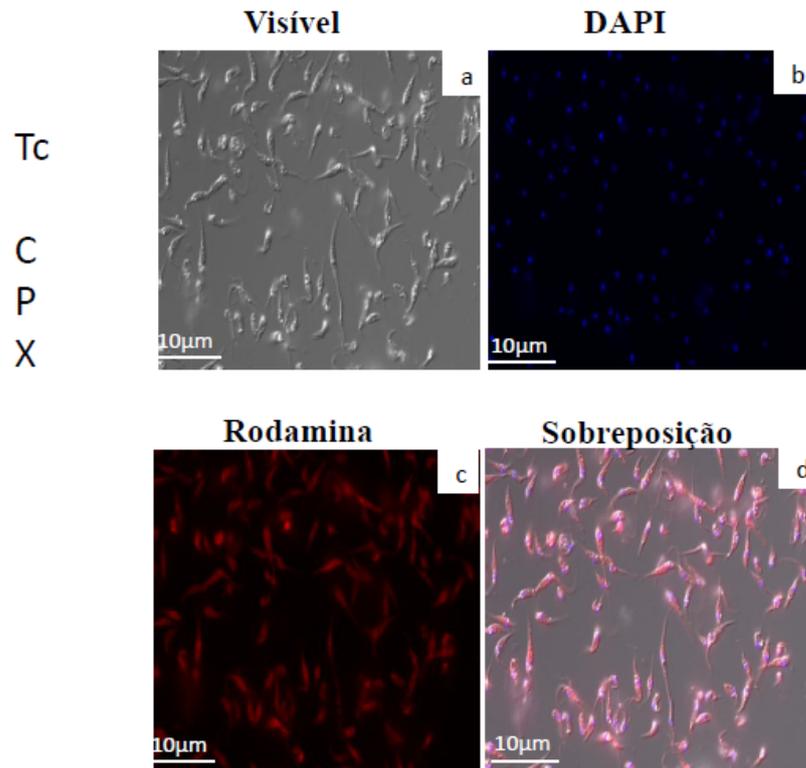


Figura 40a, b, c, d: Imunofluorescência Direta da amostra Dm28c utilizando Triparedoxina Citosólica – Tc CPX

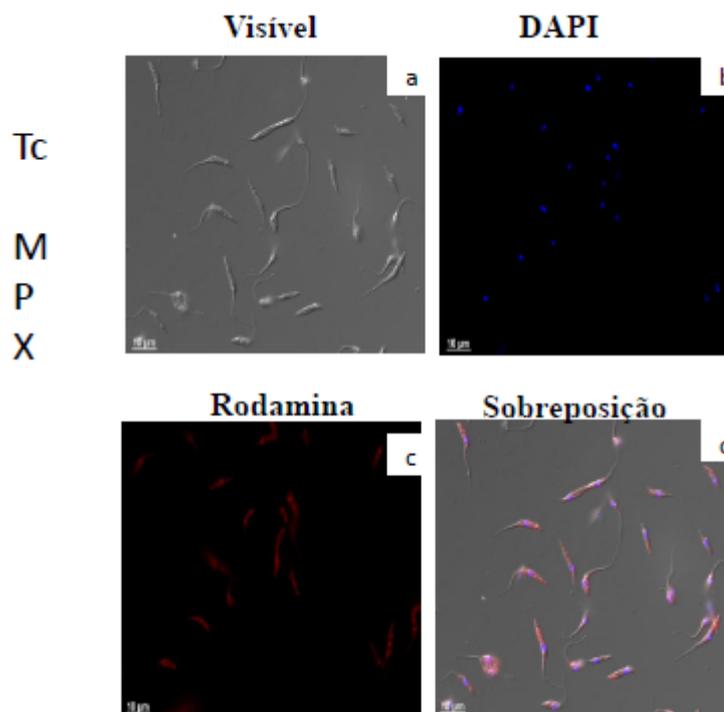


Figura 41a, b, c, d: Imunofluorescência Direta da amostra Dm28c utilizando Triparedoxina Mitocondrial- Tc MPX

5.10 Imunocitoquímica das formas epimastigotas e tripomastigotas da amostra SMM36

Através da imunocitoquímica aliada a ultraestrutura foi possível observar a marcação e expressão da TcCPX e TcMPX das formas epimastigotas e tripomastigotas do isolado SMM 36 (figura 42 b;c;d).

A expressão da TcCPX no citosol demonstra a presença e confirmação da imunolocalização da peroxidase em formas epimastigotas e tripomastigotas (42 c; d).

A peroxidase TcMPX apresentou marcação seletiva pela mitocôndria presente na amostra SMM 36 (figura 42 b).

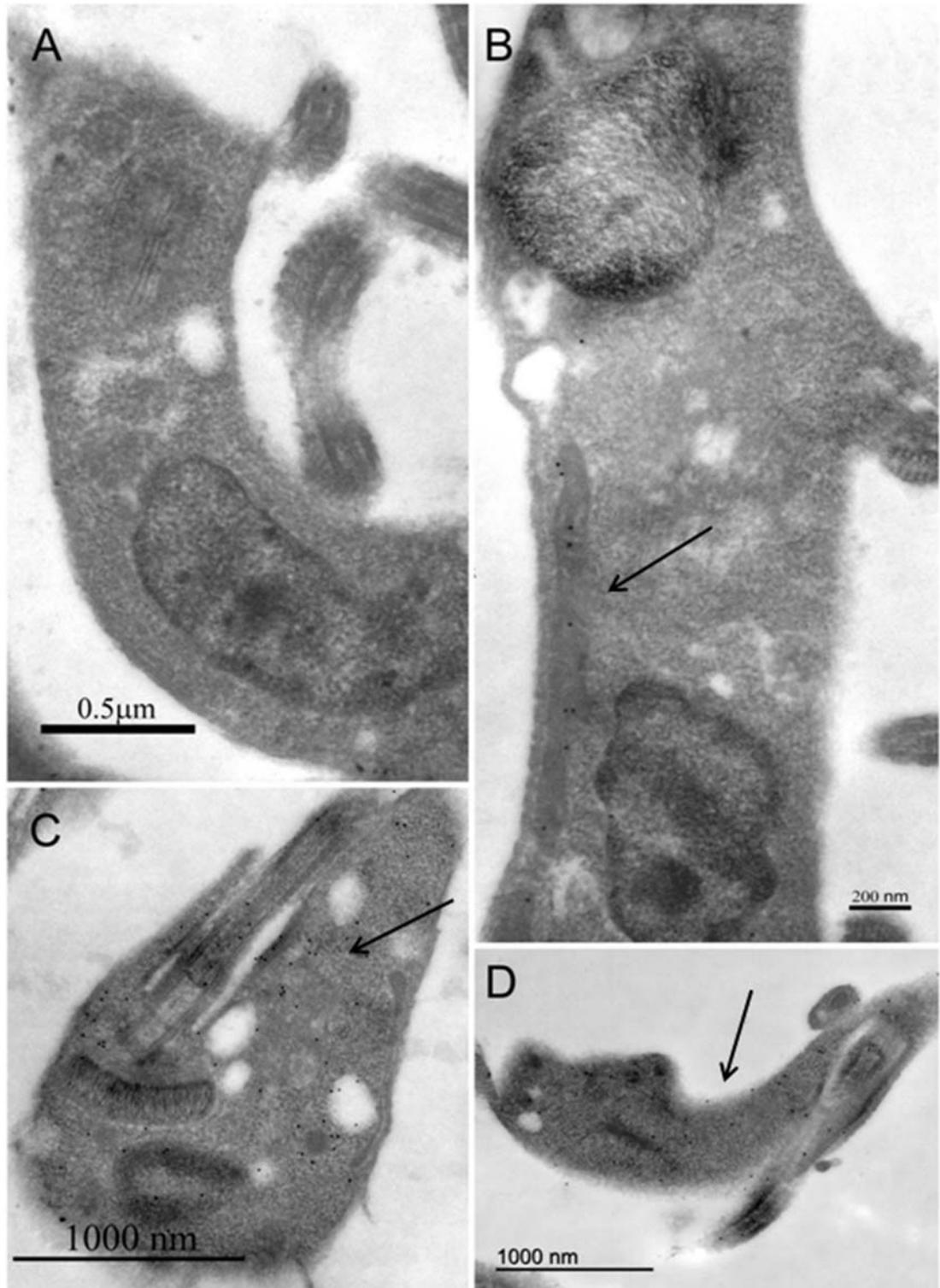


Figura 42: Análise Ultraestrutural da Triparedoxina peroxidase citosólica (TcCPX) e mitocondrial (TcMPX) peroxiredoxinas in *T. cruzi*. (A) Controle negativo; (B) Mitocôndria claramente detectada com anti-TcMPX; anticorpo em tripomastigotas com anti-TcCPX; anticorpo marcado no citoplasma de epimastigotas (C) e Marcação no citosol com a TcCPX em formas tripomastigotas (D).

6. DISCUSSÃO

Trypanosoma cruzi se desenvolve bem em inúmeros tipos de meios de cultivo (WYNNE DE MARTINI *et al.*, 1980) e apresenta crescimento máximo evidente entre o 14º e 18º dias. Além disso, em curvas de crescimento, bem como as características morfológicas, podem apresentar variações de acordo com a amostra utilizada, segundo BRENER & CHIARI (1965) que assinalaram que as cepas CL, FL, MR podem apresentar agregados de formas amastigotas em sua fase inicial, e depois originarem formas flageladas, enquanto que as cepas Y e Berenice raramente dão origem a amastigotas, aparecendo formas epimastigotas e rosetas. Cepas com predomínio de formas largas (*stout*), como as CL, FL e MR, tendem a apresentar inicialmente formas finas, predominantes em cepas Y e Berenice e mantém sua forma sem apresentar formas amastigotas (SILVA 1959).

Resultados semelhantes também foram observados por GOMES *et al.* (2003), onde foram verificadas altas taxas de metaciclo gênese em meio M16, enquanto que com a utilização do meio LIT, estas taxas apresentaram-se bem mais reduzidas em cerca de 0,8% a 12,2%. O que denotou características peculiares em suas amostras biológicas de *T. cruzi*, provenientes de pacientes chagásicos crônicos do Estado do Paraná, Brasil quando cultivados em meio M16.

Em estudos prévios realizados por (SILVA, 2006) foi observado nas curvas de crescimento das amostras SMM 98, 36 e 1, mantidas em meio LIT sob as mesmas condições de cultivo, uma grande heterogeneidade entre as diferentes amostras estudadas. E ainda, também foi observado que quando submetidas a infecção experimental em camundongos, as amostras SMM98 e 36 apresentaram respostas diferenciadas, e observou-se que a SMM36 levou ao óbito de 80% dos camundongos infectados em comparação com a baixa mortalidade apresentada nos camundongos infectados pela SMM98 (10%) (SILVA *et al.*, 2008). Neste sentido, (GONÇALVES, 2000) reforça a existência de heterogeneidade entre as amostras e também a variabilidade no crescimento de formas epimastigotas. O que se confirma em nossos resultados, quando através da análise morfométrica, observamos que as três amostras: SMM 98 e SMM 36 das áreas A e B respectivamente cultivadas em meio LIT, apresentaram morfologia semelhantes, enquanto que os isolados da SMM1 oriundos da área F, separados por barreira geográfica demonstraram estruturas morfológicas significativamente diferenciadas quando comparadas com as demais amostras utilizadas neste estudo. A análise da diferenciação revelou que as formas sofreram modificações heterogêneas de amostra para amostra. Muito embora, as amostras de *T. cruzi* analisadas, duas das amostras tenham sido procedentes da mesma área e uma de outra localidade, os resultados demonstraram uma diversidade no comportamento e com relação a alguns aspectos morfológicos, o que está de acordo com as observações de SILVA (2006) e MARTINEZ-DIAZ *et al.*, (2001).

Diversos estudos têm relacionado o estresse oxidativo com o desenvolvimento do parasito e o estabelecimento da doença de Chagas (SALEH *et al.*, 2009; IGBOKWE *et al.*, 1994; GUPTA 2009). Além disso, alguns mecanismos de defesa sensíveis ao estresse oxidativo, podem indicar uma possível explicação para os efeitos de cobalto protoporfirina na redução da infecção causada por *T. cruzi*. Outros antioxidantes tais como: a N-acetilcisteína (NAC) (precursora da GSH), ou os produtos do catabolismo de HO-1, como a bilirrubina, também reduziram a carga parasitária de macrófagos (PARODI *et al.*, 2009).

Trypanosoma cruzi apresenta um ciclo de vida muito complexo que envolve as fases funcionais diferenciadas contribuindo para a adaptação às mudanças ambientais. As

condições físico-químicas representam um importante mecanismo de sobrevivência para este parasito. E ainda, a co-evolução entre parasitas e seus insetos vetores promoveu uma estratégia elegante para seu desenvolvimento e manutenção no vetor (LARA., *et al* 2007); NOGUEIRA *et al.* 2011).

Neste trabalho, ao analisarmos o efeito de moléculas redutoras na proliferação das formas epimastigota e tripomastigotas das amostras SMM 98 e SMM36, observou-se que a proliferação mediante tratamento com NAC, resultou em diminuição do número de formas quando em comparação com o controle. O papel de ROS e proliferação de formas epimastigotas foram previamente relatados por (NOGUEIRA *et al.*, 2011, 2015), corroborando com nossos resultados, e desta forma, pudemos observar que a inibição da proliferação celular por NAC resultou na redução do número de formas dos isolados estudados. Em conjunto a estes dados, NOGUEIRA *et al.*, 2015 suportam a hipótese de que a modulação entre moléculas fisiológicas do status redox antagônicos, indicam um papel inibidor de moléculas redutoras sobre as formas epimastigotas durante sua proliferação, confirmando a necessidade de uma sinalização oxidante, fisiologicamente fornecida pelo Heme para promover o crescimento destes parasitas.

Corroborando com nossos resultados NOGUEIRA *et al.*, (2015) avaliou *in vivo e in vitro*, quantitativamente a carga parasitária nos diferentes compartimentos do intestino de *R. prolixus* infectados com o *T. cruzi* durante cinco dias após a infecção, verificaram que as infecções foram mais elevadas em presença de urato e NAC, demonstrado pelo aumento do número de formas nas três regiões do trato digestivo analisados. Este aumento deveu-se ao número de formas tripomastigotas, destacando-se a metacicloênese *in vivo* e o ambiente redutor fornecido pelo urato e NAC, ambos antioxidantes. O papel das espécies reativas de oxigênio durante a proliferação de epimastigotas tem sido relatado em estudos anteriores (NOGUEIRA *et al.*, 2011), porém também tem sido demonstrado que a inibição da proliferação de células por NAC pode ser resultado da parada do ciclo celular em fase G1, como observado com diferentes células de mamíferos (KIM KY *et al.*, 2000). Estes dados suportam a hipótese de modulação entre moléculas fisiológicas do status redox antagônico, sinalizando o papel inibidor das moléculas redutoras de epimastigota durante a proliferação e confirmando a necessidade de um sinal oxidante fornecido pelo Heme com a finalidade de promover o crescimento dos parasitos (NOGUEIRA *et al.*, 2011). A diferenciação do *T. cruzi* é afetada por fatores tais como: pH, estresse metabólico, AMPc, e a adenil ciclase. (WIGGLESWORTH, 1931). Teoricamente, muitas moléculas estariam envolvidas no processo de ingestão sanguínea pelo triatomíneo, como exemplo: os peptídeos derivados de globina (FRAIDENRAICH *et al.*, 1993), fatores hemolíticos, lectinas e fragmentos de hemoglobina. (AZAMBUJA *et al.*, 2005; CABRAL *et al.*, 1999, 2001), componentes enzimáticos presentes no intestino médio do inseto (Garcia *et al* 2010), a microbiota intestinal (CABRAL *et al.*, 2001), a muda hormonal ecdisona (SOUZA *et al.*, 2009) e o Heme, capazes de modular a proliferação e diferenciação do *T. cruzi*. Apesar destes dados e, devido à complexidade dos mecanismos envolvidos nesta interação, a molécula e ou fatores necessários para desencadear o processo de proliferação e diferenciação de *T. cruzi* não foram ainda identificados. E as interações bioquímicas entre *T. cruzi* e triatomíneos vetores têm sido investigadas desde 1909.

Recentemente, análises funcionais e proteômicas sugerem a regulação de proteínas da rede de antioxidantes de *T. cruzi*, tal como Fe-superóxido dismutase A, tripanotona sintase, triparedoxina peroxidase e outros comparando formas epimastigotas e tripomastigotas metacíclicas (ATWOOD *et al.*, 2005; PIACENZA *et al.*, 2013). Desta forma, ao que tudo indica, as alterações redox metabólicas ocorridas durante a

metaciclo gênese podem ser afetadas em diferentes ambientes redox em cada compartimento do inseto. Assim, supõem-se que a modulação da metaciclo gênese pelos antioxidantes iria ocorrer como consequência da intensificação da defesa antioxidante do parasito. Neste contexto, as moléculas que promovem a proliferação de oxidantes parecem promover metaciclo gênese. Em um contexto fisiológico, urato representa uma molécula significativa tanto para o parasita quanto para o vetor para a modulação de metaciclo gênese e consequente transmissão de *T. cruzi* para os hospedeiros vertebrados (NOGUEIRA *et al.*, 2015).

Em nossos estudos, verificamos o perfil de proteínas da amostra de *T. cruzi* SMM 36, comparando-a com lisados das amostras TCC, Silvio e SMM98. E nossos resultados demonstraram que o isolado SMM 36 apresentou um nível elevado de proteínas em relação as demais amostras utilizadas neste estudo. Em outros estudos, ambas as SMM's já demonstraram heterogeneidade entre elas, mesmo tratando-se de isolados de uma mesma região, o que corrobora com nossos achados (MALLETT *et al.*, 2008, SILVA 2006; SILVA *et al.*, 2008; ARAÚJO *et al.*, 2012).

Estudos proteômicos realizados com isolados silvestres indicam que enzimas previamente identificadas normalmente têm sido agrupadas em três grandes grupos: hidrolases (Nitralase), transferases (Tirosina amino transferase, e S-adenosilmetionina sintetase) e oxidorreduções (Prostaglandina F sintase, glutathione peroxidase *like*, desidrogenase e triparedoxina peroxidase), estando envolvidas em vias metabólicas importantes destes parasitos (KIKUCHI *et al.*, 2010).

E ainda, tem demonstrado ser uma eficiente ferramenta utilizada para a identificação de proteínas, principalmente devido à sua alta sensibilidade (GÖRG *et al.*, 2004 PARODI *et al.*, 2004; KIKUCHI *et al.*, 2010). E, através desta análise, utilizando eletroforese bidimensional de proteínas totais solúveis de formas epimastigotas das cepas SMM 98 e SMM 36 as mesmas se mostraram reprodutíveis, a padronização da preparação de proteínas e as condições de focalização isoelétrica foram satisfatoriamente reveladas. Os ensaios realizados na faixa de pH 3-10 revelaram uma grande diversidade de bandas entre as cepas SMM98 e SMM 36 das áreas A e B respectivamente. Entretanto, quando a faixa de pH foi alterada para 4-7 houve um aumento do número de bandas reveladas. E, uma diversidade considerável na expressão de proteínas, bem como na intensidade de várias bandas também foram observadas entre as cepas estudadas. Dentre as bandas quantificadas da amostra SMM 98 e SMM 36 observamos uma diferença de expressão entre elas de 27 proteínas aproximadamente. A SMM 36 apresentou aproximadamente 120 bandas e foram visualizadas na SMM 98 cerca de 93 bandas, indicando um número expressivo, porém inferior a SMM 36. Desta forma, a SMM36 pode ser considerada uma cepa importante, por apresentar proteínas expressas ainda não estudadas, comportamento diferenciado e por sua alta capacidade infectiva e potencial virulento investigados previamente (SILVA., 2008).

Os membros da ordem Kinetoplastida, incluindo o *T. cruzi*, apresentam um mecanismo de detoxificação diferente daquele encontrado no hospedeiro vertebrado. Estes parasitos não apresentam a enzima glutathione peroxidase dependente de selênio e catalase, responsáveis pela detoxificação do peróxido de hidrogênio. E, para compensar a ausência destas enzimas, os tripanosomatídeos utilizam um sistema antioxidante dependente de “tiol”, responsável pela eliminação do peróxido de hidrogênio (TURRENS, 2004). Participam do mecanismo de defesa antioxidante destes tripanosomatídeos as enzimas ferro-superóxido dismutase (FeSOD), triparedoxina peroxidase (TXNPx), ascorbato peroxidase (APX), tripanotiona redutase (TR) e

glutathione peroxidase dependente de cisteína (GPx), distribuídas em compartimentos celulares diferentes e ativas contra vários oxidantes (TURRENS, 2004; IRIGOÍN *et al.*, 2008).

Estudos citam que para que ocorra o estabelecimento de uma infecção, as formas tripomastigotas metacíclicas devem invadir macrófagos e sobreviver às condições altamente oxidativas gerados dentro do fagossoma, onde encontraria várias enzimas antioxidantes, incluindo uma liga de Fe-SOD mitocondrial (contendo ferro Superóxido Dismutase) TcMPX (*T. cruzi* -triparedoxina peroxidase mitocondrial) e APX (*T. cruzi* ascorbato dependente de peroxidases), e que estes, seriam regulados positivamente durante a transformação de epimastigotas não-infecciosos para as tripomastigotas metacíclicas infecciosos (ATWOOD *et al.*, 2005).

Estudos revelam que a expressão aumentada em presença de APX previne potencialmente danos letais resultantes da interação do H₂O₂ com componentes do retículo endoplasmático, onde a proteína está localizada. É interessante salientar que a APX de *L. major* apresenta uma região hidrofóbica de 22 aminoácidos na porção N-terminal da proteína que pode desempenhar um papel importante no controle da susceptibilidade ao H₂O₂ e na oxidação de ascorbato (ADAK & DATTA, 2005). Estes autores observaram também que a APXm possui uma inativação dependente de H₂O₂ na ausência de doadores de elétrons como ascorbato E, em nosso trabalho, foram verificados os níveis de virulência da amostra SMM 36, comparando-a com as cepas de referência: TCC, Silvio e Dm28c. Neste sentido, foram utilizadas a APX de peso molecular de 30 kDa, e observamos que sua expressão foi semelhante a TCC, intitulada cepa atenuada.

Os parasitos que superexpressam a TcCPX e a TcMPX, mostraram maior infectividade tanto em células fagocíticas como em não fagocíticas segundo PIÑEYRO *et al.*, (2008). Além de serem consideradas peroxidases que apresentam chave-integrante no mecanismo de defesa do parasito contra ROS (PIACENZA *et al.*, 2008, 2015).

Neste trabalho, verificamos mediante a expressão da peroxidase TcCPX de peso molecular de 23 kDa, similaridade à expressão verificada na cepa Silvio, incriminada cepa de caso humano e expressão inferior à cepa padrão Dm28c, cepa silvestre. Já a peroxidase TcMPX, com mesmo peso molecular e funções semelhantes as da TcCPX demonstrou similaridade com a cepa de referência Dm28c, reforçando sua importância quanto aos mecanismos de defesa contra espécies reativas de oxigênio.

O aumento do nível de expressão da proteína ferro-Superóxido dismutase-A (TcFeSOD-A) foi constatado na população do *T. cruzi* com resistência induzida *in vitro* quando comparada com outra amostra sensível e livre de resistência. Esta enzima participa da defesa antioxidante do parasita removendo o excesso de ânion superóxido em moléculas de oxigênio e peróxido de hidrogênio (BANNISTER *et al.*, 1987). E em nossos estudos, a SOD A e B que apresentam peso molecular de 24 kDa, denotaram expressões variadas de acordo com a cepa estudada. Neste sentido, ficou evidenciado que a SMM 36 expressou um nível de SOD A semelhante ou inferior à TCC e quando observada sua expressão em SOD B, observou-se que sua expressão foi ainda menor que a apresentada na Dm28c, demonstrando a semelhança à nível de virulência da SMM 36 e Dm28c.

Dados da literatura mostraram que enzimas peroxidases podem ser essenciais para a sobrevivência de parasitas submetidos à pressão de drogas. E, a *Entamoeba histolytica* resistente ao metronidazol apresentou um aumento de 3 vezes no nível de RNAm do gene quando avaliado o nível de TXNPx (WASSMANN *et al.*, 1999). Adicionalmente, quando parasitas foram transfectados simultaneamente com os genes ferro-superóxido dismutase

e TXNPx, o nível de RNAm do gene TXNPx foi 20-30% maior comparado com os parasitos superexpressando apenas o gene TXNPx. Similarmente, LIN *et al.*, (2005) observaram em *L. amazonensis* resistentes, um aumentado de 5 e 4 vezes no nível de transcrição dos genes cTXNPx e mTXNPx, respectivamente. WYLLIE *et al.*, (2008) observaram um aumento de 6.5 e 1.8 vezes nas enzimas TXNPx citosólica e mitocondrial, respectivamente, em *L. tarentolae* resistente ao antimônio trivalente. Em *T. cruzi*, alguns estudos mostraram que a superexpressão das enzimas cTXNPx e mTXNPx protegem os parasitos dos danos causados pelo peróxido de hidrogênio, t-butil hidroperóxido e peroxinitrito (WILKINSON *et al.*, 2000; FINZI *et al.*, 2004; PIACENZA *et al.*, 2008). A compartimentalização das peroxiredoxinas em *T. cruzi* protege a célula contra os efeitos tóxicos do peróxido exógeno, indicando que estes oxidantes podem penetrar o citosol e a mitocôndria. Em células que superexpressam enzimas peroxidases, o metabolismo de peróxido aumenta em ambos os compartimentos, protegendo contra o dano celular (TURRENS, 2004). Devido a sua localização, a cTXNPx pode ser importante durante o estresse oxidativo gerado por fontes externas similar ao dano oxidativo de macrófagos, pois o primeiro produto de estresse oxidativo produzido no parasito deve ser no citosol. Enquanto que no processo de estresse oxidativo gerado pela própria mitocôndria da célula, a mTXNPx pode ser mais ativa (LYER *et al.*, 2008). Sendo assim, nossos resultados, demonstraram que mediante a verificação do nível de expressão da TXNII, de peso molecular de 20 kDa, as cepas estudadas SMM 36 e Dm28c apresentaram expressões semelhantes, conferindo-lhes possivelmente um fator protetivo contra possíveis efeitos tóxicos.

Através da imunofluorescência direta e imunocitoquímica foi possível localizar e confirmar a presença da fluorescência e marcação específica dos compartimentos subcelulares envolvidos em processos protetivos dos parasitos. A peroxidase TcCPX e TcMPX foram evidenciadas nas formas epimastigotas dos isolados SMM 36 e DM28c quando submetidos a imunofluorescência direta. E, puderam ser observados os citosóis e as mitocôndrias dos parasitos bem nítidos e reservados dos demais compartimentos. As micrografias obtidas através da microscopia eletrônica revelaram a marcação localizada no citosol através da TcCPX e a marcação das mitocôndrias dos parasitos com a TcMPX. E ainda, estudos prévios citam a importância dos estudos sobre as localizações de substratos específicos para TcCPX e TcMPX nos parasitos, devido à sua importância e ao seu potencial para estudos sobre a localização de sítios específicos. (PIÑEYRO *et al.*, 2008; PIACENZA *et al.*, 2009). Segundo PELOSO *et al.*, (2012), indicam claramente que a identificação dos diferentes perfis de epimastigotas de diferentes linhagens, contribuem para o esclarecimento e reforçando a heterogeneidade entre cepas de *T. cruzi*.

Os resultados obtidos neste trabalho demonstraram a importância dos estudos com isolados silvestres, pois desta forma, se pôde obter resultados mais fidedignos, por tratarem-se de cepas mais recentes. Os parasitos silvestres aqui estudados, apresentaram importantes diferenças quanto a sua morfologia, alterações sobre o Status Redox, expressão protéica e altos níveis de virulência quando comparados às cepas já estabelecidas. E através das expressões verificadas nos diferentes compartimentos, denota-se a importância dos estudos sobre possíveis bloqueios de sítios específicos relacionados aos índices de virulência, defesa virulência de *T. cruzi* e, futuramente possíveis produções de fármacos.

7. CONCLUSÕES

1- As características observadas nas amostras SMM98, 36 e 1, demonstraram uma variabilidade quanto à diversidade destes isolados em relação às áreas estudadas, como também dentre as áreas comprovando a heterogeneidade das amostras estudadas, as quais diferem também em relação a vários pontos das curvas da maioria das cepas padrão.

2- Através das observações quantitativas das formas epimastigotas e tripomastigotas das amostras SMM 98 (A) e SMM36(B): foi possível notar que para que ocorra a proliferação de formas epimastigotas, é necessário que haja um ambiente oxidativo, enquanto que a diferenciação de epi- em tripomastigotas, necessita de um ambiente redutor, pois as moléculas que promovem sua proliferação em ambiente de oxidante/oxidativo, parecem promover a metaciclo gênese. Ao contrário do que ocorre ambientes antioxidantes.

3- A visualização comparativa dos perfis de proteínas totais das cepas padrão em confronto com os isolados da amostra SMM36 (B) confirma a importância dos estudos relacionados a cepas silvestres, pois demonstram possuir tantas proteínas expressas quanto as cepas já estabelecidas.

4- A análise proteômica dos isolados do estado do Rio de Janeiro propiciou a obtenção dos mapas protéicos comparativos de proteínas solúveis de formas epimastigotas das cepas SMM98(A) e SMM36(B) na faixa de pH 3-10 e 4-7 expressaram 93 e 120 bandas, respectivamente. E, a esse respeito, os isolados SMM 98 e SMM 36 visivelmente apresentaram diferenças qualitativas e quantitativas consideráveis à nível de expressão protéica.

5- As peroxiredoxinas APX, TcCPX, TcMPX, SOD A, SOD B e TXN II foram expressas nas formas epimastigotas tanto nos isolados da SMM36(B) quanto nas cepas padrão estudadas, apresentando maior ou menor expressão e ao que tudo indica a SMM 36 parece apresentar alto perfil de virulência semelhante a cepa Dm28c. As proteínas foram expressas em níveis altos em SMM 36 e Dm28c, exceto as cepas e Silvio e TCC que apresentaram maior nível em SOD A e SOD B respectivamente. Desta forma, consideramos este um resultado relevante, pois essas enzimas são importantes marcadores de virulência que podem corroborar para com estudos acerca de possíveis alvos de drogas para o tratamento da doença de Chagas.

6- Através da imunofluorescência direta foi possível observar a presença da TcCPX e TcMPX em formas epimastigotas tanto nos isolados da SMM36(A) quanto Dm28c e, pudemos verificar nitidamente a marcação das peroxidases localizadas no citosol (TcCPX) e mitocôndria (TcMPX), reforçando a importância dos estudos com isolados silvestres.

7- A verificação das marcações com os anticorpos TcCPX e TcMPX para a amostra SMM36(B) demonstraram claramente que formas epimastigotas e tripomastigotas expressaram as proteínas de interesse o que corrobora com os estudos sobre a expressão de peroxidases e níveis de virulência em formas tripomastigotas.

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo revelou que de acordo com os resultados obtidos neste trabalho, podemos considerar que os triatomíneos que circulam na natureza, especialmente no estado do Rio de Janeiro merecem maior atenção. Dado que os isolados utilizados no trabalho SMM 98 e SMM 36 das áreas A e B respectivamente apresentam níveis de proteínas diferenciados e ainda que, a SMM 36 possui alto nível de virulência.

O mapa protéico revelou que a SMM 36 oriunda da área B, apresentam proteínas distintas e que precisam ser identificadas e classificadas por espectrometria de massa, variação de intensidade dos *spots* e comparadas com outras amostras e/ou, cepas de referência para melhor compreensão dos resultados obtidos. Dessa forma, esperamos que os dados proteômicos obtidos como resultado possam fornecer avanços na compreensão da biologia deste parasito na identificação de fatores-chave de virulência, de resistência e/ou infectividade.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAK S & DATTA, A.K. *Leishmania major* encodes an unusual peroxidase that is a close homologue of plant ascorbate peroxidase: a novel role of the transmembrane domain. *Biochem J* 390, 465 – 474, 2005.

ALPHEY, M.S.; KÖNIG, J.; FAIRLAMB A.H. Structural and mechanistic insights into type II trypanosomatid tryparedoxin-dependent peroxidases. *Biochem J. Sep 15;414(3):375-81*, 2008.

ANDRADES, G.J.B.; MAGALHÃES, J.B.; PONTES, A.L. Evaluation of chemotherapy with benznidazole and nifurtimox in mice infected with *Trypanosoma cruzi* strains of different types. *Experimental Parasitology* Volume 100, Issue 4, April, Pages 269–275, 2002.

ANDRADE, H.M.; MURTA, S.M.F.†; CHAPEAUROUGE, A.; PERALES, J.; NIRDÉAND, P.; A.J. Proteomic Analysis of *Trypanosoma cruzi* Resistance to Benznidazole. *France J. Proteome Res.*7 (6), pp 2357–2367, 2008.

ANDRADE, L.O.; MACHADO, C.R.; CHIARI, E.; PENA, S.D.; MACEDO, A.M. Differential tissue distribution of diverse clones of *Trypanosoma cruzi* in infected mice. *Mol Biochem Parasitol* 100: 163-172, 1999.

ANDRADE, S.G.; CARVALHO, M.L. & FIGUEIRA, R.M. Caracterização morfológica e histopatológica de diferentes cepas do *Trypanosoma cruzi*. *Gaz. Med. Bahia* v. 70, p. 32-42, 1970.

ANDRADE, S.G.; PONTES, J.B. Evaluation of chemotherapy with benznidazole and nifurtimox in mice infected with *Trypanosoma cruzi* strains of different types. *Bull World Health Organ*, 63(4): 721–726, 1985.

ANÔNIMO. Recommendations from a satellite meeting. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 94, (Suppl. 1), 429- 432. *Antioxidant Enzymes* Volume XX, Number XX, 1999.

ARAGÃO, M.B. “Domiciliação de triatomíneos ou pré-adaptação à antropofilia e à ornitofilia. *Rev Saúde Públ (S Paulo)*; 22: 401-410, 1983.

ARAÚJO, C.A.C.; WANIEK, P.J.; JANSEN, A.M. An overview of Chagas disease and the role of triatomines on its distribution in Brazil. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 9(3):227-34, 2009.

ARAÚJO-JORGE, T.C.; BARBOSA, H.S.; MEIRELLES, M.N. *Trypanosoma cruzi* recognition by macrophages and muscle cells: perspectives after a 15 year study. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* v. 87(S5), p. 43-56, 1992.

ARIAS, D.G.; PIÑEYRO, M.D., IGLESIAS, A.A.; GUERRERO, S.A.; ROBELLO, C. Molecular characterization and interactome analysis of *Trypanosoma cruzi* tryparedoxin II. *Journal of Proteomics* 120: 95-104, 2015.

ATWOOD, J.A.; WEATHERLY, D.B.; MINNING, T.A.; BUNDY, B.; CAVOLA, C. The *Trypanosoma cruzi* proteome. *Science* 309: 473–476, 2005.

AZAMBUJA, P.; GARCIA, E.S.; NORMAN, RATCLIFFE, A. Gut microbiota and parasite transmission by insect vectors. *Trends in parasitology.* Volume 21, Issue 12, Pages 568–572. December, 2005.

AZAMBUJA, P.; RATCLIFFE, N.A.; GARCIA, E.S. Towards an understanding of the interactions of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* within the reduviid insect host *Rhodnius prolixus*. *An Acad Bras Cienc* 77: 397–404, 2005.

ÁVILA, A.R.; DALLAGIOVANNA, B.; OGATTA-YAMADA, S.F.; GÓES-MONTEIRO, V.; FRAGOSO, S.P.; KRIEGER, M.A.; GOLDENBERG, S. Stage-specific gene expression during *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. *Genet. Mol. Res.* v. 2, n. 1, p. 159-168, 2003.

AZAMBUJA, P.; RATCLIFFE, N.A. AND GARCIA, E.S. Towards an understanding of the interactions of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* within the reduviid insect host *Rhodnius prolixus*. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 2005b 77, 397–404, 2000.

BANKS, R.E.; DUNN, M.J.; HOCHSTRASSER, D.F.; SANCHEZ, J.C.; BLACKSTOCK, W.; PAPPIN, D.J.; SELBY, P.J. Proteomics: new perspectives, new biomedical opportunities. *Lancet*; 356 (9243):1749-56, 2000.

BARRETTO, M.P. Trypanosomas semelhantes ao *Trypanosoma cruzi* em animais silvestres e sua identificação como o agente etiológico da doença de Chagas. *Rev Soc Bras Med Trop São Paulo* v. 7, p. 305-315, 1965.

BARRIAS, E.S.; DE CARVALHO, T.M.U.; DE SOUZA, W. *Trypanosoma cruzi*: entry into mammalian host cells and parasitophorous vacuole formation. *Front Immunol*, 2013.

BANNISTER, L.H.; HOPKINS, J.M.; FOWLER, R.E.; KRISHNA, S.; MITCHELL, G.H.A. brief illustrated guide to the ultrastructure of *Plasmodium falciparum* asexual blood stages. *Parasitol Today* 16: 427-433, 2000.

BELDA, N. F.M. Estudo sobre a existência de correlação entre os dados biométricos e o grau de patogenicidade de amostras humanas do *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909). *Rev. Soc.bras. Med. Trop*, v. 8, p. 27-36, 1974.

BESTEIRO, S.; BIRAN, NB.; COUSTOU, V.; BALTZ, T.; CANIONI P.; BRINGAUD, F. Succinate Secreted by *Trypanosoma brucei* is produced by a novel and unique glycosomal enzyme, NADH-dependent Fumarate Reductase. *The Journal of Biological Chemistry*. Vol. 277, No. 41, Issue of October 11, pp, 2002.

BOSCARDIN, S.B.; TORRECILHAS, A.C.; MANARIN, R. Chagas' disease: an update on immune mechanisms and therapeutic strategies. *J Cell Mol Med.* ;14:1373–1384, 2010.

BOVERIS, A.; CADENAS, E.; REITER, R.; CHANCE, B.; JAMIEESON, D. The relation of free radical production to hyperoxi. *Annual Review of Physiology*. v. 48, p.703-719, 1986.

BRINGAUD, F.J. A mitochondrial NADH-dependent fumarate reductase involved in the production of succinate excreted by procyclic *Trypanosoma brucei*. *Biol Chem Apr* 29;280(17):16559-70. Epub 2005 Feb 17, 2005.

BRINGAUD, F. Energy metabolism of trypanosomatids: Adaptation to available carbon sources. *Molecular & Biochemical Parasitology*, v. 149, p.1-9, 2006.

BRISSE, S.; BARNABÉ, C.; TIBAYRENC, M. Identification of six *Trypanosoma cruzi* phylogenetic lineages by random amplified polymorphic DNA and multilocus enzyme electrophoresis. *International Journal for Parasitology* 30, 34-44, 2000.

BRISSE, S.; VERHOEF, J.; TIBAYRENC, M. Characterization of large and small subunit rRNA and mini-exon genes further supports the distinction of six *Trypanosoma cruzi* lineages. *Int. J Parasitol*, v. 31, p. 1218-1226, 2001.

BRUNORO, G.V.F.; CAMINHA, M.A.; FERREIRA, A.T.S.F.; LEPREVOSTC, F.V.; CARVALHO, P.C.; PERALESA, J.; VALENTE, R.H.; MENNA-BARRETO, R.F.S. Reevaluating the *Trypanosoma cruzi* proteomic map: The shotgun description of bloodstream trypomastigotes. *Journal of proteomic*, 115: 58-65, 2015.

BURGOS, J.M.; DIEZ, M.; VIGLIANO, C.; BISIO, M.; RISSO, M.; DUFFY, T.; CURA, C.; BRUSSES, B.; FAVALORO, L.; LEGUIZAMON, M.S.; LUCERO, R.H.; LAGUENS, R.; LEVIN, M.J.; FAVALORO, R.; SCHIJMAN, A.G. Molecular identification of *Trypanosoma cruzi* discrete typing units in end-stage chronic Chagas heart disease and reactivation after heart transplantation *Clin Infect Dis*. Sep 1;51 (5):485-95, 2010.

CABRAL, M.M.O.; AZAMBUJA, P.; GOTTLIEB, O.R.; KLEFFMANN, T.; GARCIA E.S.; SCHAUB G.A. Burchellin: effects on *Triatoma infestans* and on *Trypanosoma cruzi* within this vector. *Parasitol Res* 87: 730-735, 2001.

CABRERA, G.; BARRÍA, C.; FERNANDEZ, C.; SEPULVEDA, S.; VALENZUELA, L.; KEMMERLING, U.; GALANTI, N. DNA repair BER pathway inhibition increases cell death caused by oxidative DNA damage in *Trypanosoma cruzi*. *J Cell Biochem*. 112(8): 2189-2199, 2011.

CARCAVELLA RU, GALÍNDEZ-GIRON I, JUBERO J, LENT H. Atlas of Chagas disease vectors in the Americas. Editora Fiocruz, Rio de Janeiro, 1998.

CARRANZA, J. C.; VALADARES, H. M. S.; D'ÁVILA, D. A.; BAPTISTA, R. P.; MORENO, M.; GALVÃO, L. M. C.; CHIARI, E.; STURM, N. R.; GONTIJO, E. D.; MACEDO, A. M.; ZINGALES, B. *Trypanosoma cruzi* maxicircle heterogeneity in Chagas disease patients from Brazil. *International Journal for Parasitology* 39, 963–973, 2009.

CARRANZA, J. C.; VALADARES, H. M. S.; D'ÁVILA, D. A.; BAPTISTA, R. P., MORENO, M.; GALVÃO, L. M. C.; CHIARI, E.; STURM, N. R.; GONTIJO, E. D.; MACEDO, A. M.; ZINGALES, B. (2009). *Trypanosoma cruzi* maxicircle heterogeneity in Chagas disease patients from Brazil. *International Journal for Parasitology* 39, 963–973.

CHAE, H.Z.; CHUNG, S.J.; RHEE, S.G. Thioredoxin-dependent peroxide reductase from yeast. *J Biol Chem*. 269:27670-8, 1994.

CHAGAS' disease: an update on immune mechanisms and therapeutic strategies. *Journal of Cellular and Molecular Medicine (Print)*, v.14, p.1373 - 1384, 2010

CHAGAS, C. Nova tripanozomíase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi*., agente etiológico de nova entidade mórbida do homem. Mem Inst Oswaldo Cruz, v. 1, p. 159-218, 1909.

CICCARELLI, A.; ARAÚJO, L.; BATLLE, & LOMBARDO, E. Effect of haemin on growth, protein content and the antioxidant defence system in *Trypanosoma cruzi*. Parasitology 134, 959–965, 2007.

CORRÊA, R.R. Informe sobre a doença de Chagas no Brasil e em especial no Estado de São Paulo. Rev Brasil Malariol D Trop, v. 20, p. 39-81, 1986.

COSTALES, J.A.; KOTTON, C.N.; ZURITA-LEAL, A.C.; GARCIA-PEREZ, J.; LLEWELLYN, M.S.; MESSENGER, L.A.; BHATTACHARYYA, T.; BURLEIGH. Chagas disease reactivation in a heart transplant patient infected by domestic *Trypanosoma cruzi* discrete typing unit I (TcIDOM). BA.Parasit Vectors. Aug 25;8:435. doi: 10.1186/s13071-015-1039-3, 2015.

COURA, J.R.; ANUNZIATO, N.; WILLCOX, H.P.F. Morbidade da doença de Chagas. I. Estudo de casos de vários estados do Brasil observados no Rio de Janeiro. Mem Inst Oswaldo Cruz 78: 363-372, 1983

COURA, J.R. Chagas disease: control, elimination and eradication. Is it possible? 2013.

COURA, J.R.; FERREIRA, L.F.; RUBENS, J.; PEREIRA, N.C.; SILVA, J.R. Tripanossoma do "complexo cruzi" em reservatório silvestre no Estado da Guanabara. Estudo de sua patogenicidade. Rev Inst Med Trop Sao Paulo 36: 363-368, 1966.

COURA, J.R. Transmissão da infecção chagásica por via oral na história natural da doença de Chagas. Rev Soc Bras de Med Trop 39 (Suppl. 4): 113-117, 2006.

CURA, C.I.; MEJÍA-JARAMILLO, A.M.; DUFFY, T.; BURGOS, J.M.; RODRIGUERO, M.; CARDINAL, M.V.; KJOS, S.; GURGEL-GONÇALVES, R.; BLANCHET, D.; DE PABLOS, L.M.; TOMASINI, N.; DA SILVA, A.; RUSSOMANDO, G.; CUBA, C.; AZNAR, C.; ABATE, T.; LEVIN, M.J.; OSUNA, A.; GÜRTLER, R.E.; DIOSQUE, P.; SOLARI, A.; TRIANA-CHÁVEZ, Z. O.; SCHIJMAN, A.G. *Trypanosoma cruzi* I genotypes in different geographical regions and transmission cycles based on a microsatellite motif of the intergenic spacer of spliced-leader genes. Int J Parasitol 40: 1599-1607, 2010.

CRUZ, L.I.; VIVAS, A.; MONTILLA, M.; HERNÁNDEZ, C.; FLÓREZ, C.; PARRA, E.; RAMÍREZ, J.D. Comparative study of the biological properties of *Trypanosoma cruzi* I genotypes in a murine experimental model. *Infect Genet Evol.* doi: 10.1016/j.meegid.2014.11.012. Nov 20, 2014.

DE GODOY, L.M.; MARCHINI, F.K.; PAVONI, D.P. . Quantitative proteomics of *Trypanosoma cruzi* during metacyclogenesis. *Proteomics*, v. 12, n. 17, p. 2694-703, Aug, 2012.

DE SOUZA, A. short Review on the Morphology of *Trypanosoma cruzi*: from 1909 to 1999. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 94, supl. 1, p. 17-36, 1999.

DE SOUZA, W. Basic Cell Biology of *Trypanosoma cruzi*. *Pharmaceutical Design*, v.8, p.269-285, 2002.

DE SOUZA, W.; DE CARVALHO, T.M.U.; BARRIAS, E.S. Review on *Trypanosoma cruzi*: Host Cell Interaction, *International Journal of Cell Biology Article* . D 295394Volume, 2010.

DE SOUZA, W. *Trypanosoma cruzi*–Host Cell Interaction *Front Immunol.*; 5: 339, 2014.

DIAS, J.C.P. Doença de Chagas: sucessos e desafios. *Cad Saúde Pública.*; 22(10): 2020-2021, 2006.

DIAS, E. Observações sobre eliminação de dejeções e tempo de sucção em alguns triatomíneos sul-americanos. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 54, p. 115-124, 1955.

DIAS, E. Sobre um Schizotrypanum dos morcegos *Lonchoglossa ecaudata* e *Carollia perspicillata* do Brasil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 35, p. 399-411, 1940.

DIAS J.C. Epidemiologia. In: Brener, Andrade, Barral-Netto *Trypanosoma cruzi* e Doença de chagas, Segunda edição p.48-57, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2000.

DIAS, J.C.P.; FEITOSA, V.R.; FERRAZ FILHO, N.A.; RODRIGUES, V.L.C.; ALENCAR, A.S.; SESSA, P.A. Fonte alimentar e potencial vetorial de *Triatoma vitticeps* (Stal, 1859), com relação à doença de Chagas humana no estado do Espírito

Santo, Brasil (Hemiptera, Reduviidae). Mem Inst Oswaldo Cruz, v. 84, p. 165-173, 1989.

DIAS, J.C.; PRATA, A.R.; CORREIA, D. Problems and perspectives for Chagas disease control: in search of a realistic analysis. Rev Soc Bras Med Trop 41: 193-196, 2008.

DIAZ, M.L.; SOLARI, A.; GONZALEZ, C.I. Differential expression of *Trypanosoma cruzi* I associated with clinical forms of Chagas disease: overexpression of oxidative stress proteins in acute patient isolate. J Proteomics 74: 1673–1682, 2011.

DIOTAIUTI, L.; BRONFEN, E.; PERILO, M.M.; MACHADO, G.B.N.; LOIOLA, C.F. Aspectos do comportamento do *Triatoma vitticeps* na transmissão da doença de Chagas. Rev. Soc Med Trop, n. 20, supl, p. 87, 1987.

DOCAMPO, R. Sensitivity of parasites to free radical damage by antiparasitic drugs. Chem Biol Interactions 1990; 73:1–27, 1981.

DOYLE, O.S.; ZHOU, Y.M.; HSIEH, I.; GREENBAUM, D.C.; MCKERROW, J.H.; ENGE, J.C.L. The *Trypanosoma cruzi* Protease Cruzain Mediates Immune Evasion. PLoS Pathog. 2011 7(9), Sep, 2011.

DOWSEY, A.W.; DUNN, M.J.; YANG, G.Z. The role of bioinformatics in two-dimensional gel electrophoresis. Proteomics;3(8):1567-96, 2003.

EL-SAYED, N.M. The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. Science 309: 409-15, 2005.

FERNANDES, C.D.; MURTA, S.M.F.; CERÁVOLO, I.P.; KRUG, L.P.; VIDIGAL P.G.; STENDEINDEL, M.; NARDI, N.; ROMANHA, A.J. Characterization of *Trypanosoma cruzi* strains isolated from chronic chagasic patients, triatomines and opossums naturally infected from the state of Rio Grande do Sul, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz, v. 92, p. 343-351, 1997.

FERRÃO, P.M.; OLIVEIRA, F.L.; DEGRAVE, W.M.; ARAUJO-JORGE, T.C.; MENDONÇA-LIMA, L.; WAGHABI, M.C. A Phosphoproteomic approach towards the understanding of the role of TGF- β in *Trypanosoma cruzi* biology. PLoS One.;7: e 38736, 2012.

FERREIRA, E.; SOUZA, O.S.; FONSECA FILHO, M.; ROCHA I. Nota sobre a distribuição do *Triatoma vitticeps* (Stal, 1859), (Hemiptera, Reduviidae), no estado do Rio de Janeiro, Brasil. Rev Brasil Malariol D Trop, v. 38, p. 11-14, 1986.

FERRIOLLI, F.; F.; BARRETTO, M.P. & CARVALHEIRO, J.R. Estudos sobre reservatórios e vectores silvestres do *Trypanosoma cruzi*. XXIV – Variação dos dados biométricos obtidos em amostras do *T. cruzi* isoladas de casos humanos de doença de Chagas. Rev. Bras.Med.Trop., v. 2, p. 1-8, 1968.

FINZI, J.K.; CHIAVEGATTO, C.W.M.; CORAT, K.F.; LOPEZ, J.A.; CABRERA, O.G.; MIELNICZKI-PEREIRA, A.A.; COLLI, W.; ALVES, M.J.M.; GADELHA, F.R. *Trypanosoma cruzi* response to the oxidative stress generated by hydrogen peroxide Mol Biochem Parasitol; 133: 37–43, 2004.

FLOHÉ, L.; HECHT, H.J.; STEINERT, P. Glutathione and trypanothione in parasitic hydroperoxide metabolism. Free Radic Biol Med; 27:966-84, 2003.

FLOHÉ, L. The trypanothione system and the opportunities it offers to create drugs for the neglected kinetoplast diseases. Biotechnol Adv 30, 1: 294–301, 2012.

FORATTINI O. Biogeografia, origem e distribuição da domiciliação de triatomíneos no Brasil. Revista de Saúde Publica de São Paulo; 14:265-299, 1980.

FRAIDENRAICH, D.; PEÑA, C.; ISOLA, EL.; LAMMEL, E.M.; COSO, O. Stimulation of *Trypanosoma cruzi* adenylyl cyclase by an alpha D-globin fragment from *Triatomahindgut*: effect on differentiation of epimastigote to trypomastigote forms. Proc Natl Acad Sci 90: 10140–1044, 1993.

FREITAS, J.M.; AUGUSTO-PINTO, L.; PIMENTA, J.R.; BASTOS R.L.; GONÇALVES, V. F.; TEIXEIRA, S.M.R.; CHIARI, E.; JUNQUEIRA, A.C.V.; FERNANDES, O.; MACEDO, A. M.; MACHADO, C.R.; PENA, S.D.J. Ancestral genomes, sex, and the population structure of *Trypanosoma cruzi*. PLoS Pathogen 2, 226-235 (e24), 2006.

GARCIA, E.S. The digestion of Triatominae. In: Brenner, R.R., Stoka, A. (Eds.) Chagas' Disease Vector II. Anatomic and Physiological Aspects. CRC Press, Florida, pp.47–59, 1987.

GARCIA, E.S.; AZAMBUJA, P. Development and interactions of *Trypanosoma cruzi* within the insect vector. Parasitology Today; 7: 240–244, 1991.

GARCIA, E.; NORMAN S.A.; RATCLIFFE, A.; WHITTENC, M.C.; GONZALEZ, M.S. D, AZAMBUJA, P. Exploring the role of insect host factors in the dynamics of *Trypanosoma cruzi*–*Rhodnius prolixus* interactions. Journal of Insect Physiology. Volume 53, Issue 1, Pages 11–21 January, 2007.

GARRELS, J.I. The QUEST system for quantitative analysis of two-dimensional gels. J Biol Chem;264(9):5269-82, 1989.

GETACHEW, F.; GEDAMU, L. *Leishmania donovani* iron superoxide dismutase A is targeted to the mitochondria by its N-terminal positively charged amino acids. Mol. Biochem. Parasitol; 154: 62-9, 2007.

GOMES, S.A.O.; MISAEL, D.; SILVA, B.A.; FEDER D.; SILVA, C.S.; GONÇALVES, T.C.M.; SANTOS, A.L.S.; SANTOS-MALLET, J.R. Major cysteine protease (cruzipain) in Z3 sylvatic isolates of *Trypanosoma cruzi* from Rio de Janeiro, Brazil. Parasitology Research. 105: 743-749, 2009.

GONÇALVES, T.C.M.; OLIVEIRA, E.; DIAS, L.S.; ALMEIDA, M.D.; NOGUEIRA W.O.; ÁVILA-PIRES, F.D. An investigation on the ecology of *Triatoma vittices* (Stal, 1859) and its possible role in the transmission of *Trypanosoma cruzi*, in the locality of Triunfo, Santa Maria Madalena municipal district, state of Rio de Janeiro, Brasil. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, v. 93, p. 711-717, 1998.

GONÇALVES, T.C.M.; OLIVEIRA, E.; DIAS, L.S.; ALMEIDA, M.D.; NOGUEIRA W.O.; ÁVILA-PIRES, F.D. An investigation on the ecology of *Triatoma vittices* (Stal, 1859) and its possible role in the transmission of *Trypanosoma cruzi*, in the locality of Triunfo, Santa Maria Madalena municipal district, state of Rio de Janeiro, Brasil. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, v. 93, p. 711-717, 1998.

GONÇALVES, T.C.M.; VICTÓRIO, V.M.N.; JURBERG, J.; CUNHA, V. Biologia do *Triatoma vitticeps* (Stal, 1859) em condições de laboratório (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). I. Ciclo evolutivo. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, v.83, p. 519-523, 1988.

GORG, A.; OBERMAIER, C.; BOGUTH, G.; HARDER, A.; SCHEIBE, B.; WILDGRUBER, R.; WEISS, W. The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. Electrophoresis; 21(6):1037-53, 2000.

GRAÇA-SOUZA, A.V.; SILVA-NETO, M.A.C.; OLIVEIRA, P.L. Urate Synthesis in the Blood-sucking insect *Rhodnius prolixus*. Stimulation by hemin is mediated by protein kinase C. J. Biol. Chem.; 274 (2): 9673–9676, 1999.

GUPTA, S.; BHATIA, V.; WEN, J.J.; HUANG, W.U.Y.; GARG, M.H, *Trypanosoma cruzi* infection disturbs mitochondrial membrane potential and ROS production rate in cardiomyocytes NJ Free Radic Biol Med. Nov 15;47(10):1414-21. Aug 14, 2009.

HALL, J.E.; FU, W; SCHALLER, M.D. Focal adhesion kinase: exploring Fak structure to gain insight into function. Int. Rev. Cell Mol. Biol. 288, 185–225, 2011.

HALL, A.; KARPLUS, P.A. & POOLE, L.B. Typica 2cys peroxiredoxins-structures, mechanisms and functions. The FEBS Journal, 276(9), 2469-2477, 2009.

HARVEY, L.; ARNOLD, B.; KAISER, C.A.; KRIEGER, M.; MATTHEW, SCOTT, P.; BRETSCHER, A.; PLOEGH, H.; MATSUDAIRA, P. Molecular Cell Biology (Lodish, Molecular Cell Biology), 2007.

HERNÁNDEZ-OSORIO, L.A.; MÁRQUEZ-DUEÑAS, C.M.; FLORENCIO-MARTÍNEZ, L. E.G.; BALLESTEROS-RODE, A.; S.MARTÍNEZ-CALVILLO, R.; MANNING-CELA, G. Improved Method for In Vitro Secondary Amastigogenesis of *Trypanosoma cruzi*: Morphometrical and Molecular Analysis of Intermediate Developmental Forms,. Journal of Biomedicine and Biotechnology: 283842, 2010.

HIGUERA, SL.; GUHL, F.; RAMÍREZ, J.D. Identification of *Trypanosoma cruzi* Discrete Typing Units (DTUs) through the implementation of a High-Resolution Melting (HRM) genotyping assay <http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2015/agosto/03/2014-020.pdf>. 6:112, 2013.

HIGUERA, S.L.;† GUHL, F.; RAMÍREZ, J.D. Identification of *Trypanosoma cruzi* Discrete Typing Units (DTUs) through the implementation of a High-Resolution Melting (HRM) genotyping assay Higuera *et al.* Parasites & Vectors, 6:112, 2013.

HOARE, C.A_a. The Trypanosomes of mammals. A zoological monograph. Blackwell

Scientific Publications, Oxford, 749, 1972.

HOARE, C.A_b. The Trypanosomes of Mammals J. small Anim. Pract, 1972.

IGBOKWE, I.O. Mechanisms of cellular injury in African trypanosomiasis, *Veterinary Bulletin* 64(7): (March 1994), 611-620, ISSN 1684-5315, 1994.

IRIGOÍN, F.; CIBILS, L.; COMINI, M.A.; WILKINSON, S.R.; FLOHÉ, L.; RADI, R. Insights into the redox biology of *Trypanosoma cruzi*: trypanothione metabolism and oxidant detoxification. *Free Radical Biology and Medicine*. 45(6):733–742, 2008.

IRIGOÍN, F.; INADA, N.M.; FERNANDES, M.P. Mitochondrial calcium overload triggers complement-dependent superoxide-mediated programmed cell death in *Trypanosoma cruzi*. *Biochemical Journal*; 418(3):595–604, 2009.

IRIGOÍN, F.; CIBILS, L.; COMINI, M.A.; WILKINSON, S.R.; FLOHÉ, L.; RADI, R. Insights into the redox biology of *Trypanosoma cruzi*: Trypanothione metabolism a oxidant detoxification. *Free Radic Biol Med*; 45: 733–742, 2008.

IYER, J.P.; KAPRAKKADEN, A.; CHOUDHARY, M.L.; SHAHA, C. Crucial role of cytosolic tryparedoxin peroxidase in *Leishmania donovani* survival, drug response and virulence. *Mol. Microbiol.*; 68: 372–391, 2008.

JIMENEZ, V. Dealing with environmental challenges: Mechanisms of adaptation in *Trypanosoma cruzi*. *Research in Microbiology*. Volume 165, Issue 3, April Pages 155–165, 2014.

KANG, D.C. Expression analysis and genomic characterization of human melanoma differentiation associated gene-5, mda-5: a novel type I interferon-responsive apoptosis-inducing gene. *Oncogene* 23:1789–1800, 2004.

KELLY, J.X.; IGNATUSHCHENKO, M.V.; BOUWER, H.G.; PEYTON, D.H.; HINRICHS, D.J.; WINTER, R.W.; RISCOE, M. Anti-leishmanial drug development: exploitation of parasite Heme dependency. *Mol Biochem Parasitol*. 126: 43–49, 2003.

KIKUCHI, S.A.; SODRÉ, C.L.; KALUME, D.E.; ELIAS, C.G.; SANTOS, A.L.; DE NAZARÉ, S.M.; MEUSER, M.; CHAPEAUROUGE, A.; PERALES, J.; FERNANDES, O. Proteomic analysis of two *Trypanosoma cruzi* zymodeme 3 strains. *Exp Parasitol*. Dec. 126(4):540-51, 2010.

KRAUTH-SIEGEL, R.L.; BAUER, H.; SCHIRMER, R. H. Dithiol proteins as guardians of the intracellular redox milieu in parasites: old and new drug targets in

trypanosomes and malaria-causing plasmodia. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 44:690–715, 2005.

KRAUTH-SIEGEL, R.L.; COMINI, M.A. Redox control in trypanosomatids, parasitic protozoa with trypanothione-based thiol metabolism. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1780:1236–1248, 2008.

KLOSE, J. Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. A novel approach to testing for induced point mutations in mammals. *Humagenetik*: 26:231-243. 1987.

KLOMSIRI, C.; KARPLUS, P.A.; POOLE, L.B. Cysteine-based redox switches in enzymes. *Antioxid Redox Signal*14: 1065–1077, 2011.

KOLLIEN, A.H.; SCHAUB, G.A. The development of *Trypanosoma cruzi* in Triatominae. *Parasitology Today* 16, 381–387, 2000.

KOPEC, K.K.; BOZYCZKO-COYNE, D.; WILLIAMS, M. Target identification and validation in drug discovery: the role of proteomics. *Biochem Pharmacol*;6 9(8):1133-9, 2005.

KRIEGER, S.; SCHWARZ, W.; ARIYANAYAGAM, M.R.; FAIRLAMB, A.H.; KRAUTH-SIEGEL, R.L.; CLAYTON, C. Trypanosomes lacking trypanothione reductase are avirulent and show increased sensitivity to oxidative stress. *Mol Microbiol*; 35: 542–552, 2000.

LAINSON, R., SHAW, J.J., FRAIHA, H., MILES, MA., DRAPES, C.C. Chagas' disease in the Amazon basin: *Trypanosoma cruzi* infections in silvatic mammals, triatomine bugs and man in the state of Pará, north Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 73: 193-204. 1979.

LARA, F.A.; SANT'ANNA, C.C.; LEMOSA, D.; LARANJA, G.A.T.; COELHO M.G.P.; SALLES, I. R.; MICHELE, A.; OLIVEIRA, B.P.L.; CUNHA-E-SILVA, N. C. D.; SALMOND, M.C. PAES.. Biochemical and Biophysical Research Communications. Heme requirement and intracellular trafficking in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. Volume 355, Issue 1, 30 March, Pages 16–22, 2007.

LAURIA-PIRES, L.; SANTANA, J.M.; TAVARES, F.S.; TEIXEIRA, A.R.L. Diversity of *Trypanosoma cruzi* stocks and clones derived from chagas disease patients:

I - Behavioral characterization in vitro. Rev. Soc. Bras. Med Trop, v. 30, p. 187-192, mai-jun, 1997.

LENT, H. Transmissores da moléstia de Chagas no estado do Rio de Janeiro. Rev Flum Méd 6: 1-13, 1942.

LYER, J.P.; KAPRAKKADEN, A.; CHOUDHARY, M.L.; SHAHA, C. Crucial role of cytosolic trypanothione peroxidase in *Leishmania donovani* survival, drug response and virulence. Mol Microbiol; 68(2):372-91, 2008.

LYRIS, MF.; DE, GODOY.; MARCHINI, FK.; PAVONI, DP; RAMPAZZO, RC P.; PROBST, C.M.; GOLDENBERG, S.; KRIEGER, MA. Quantitative proteomics of *Trypanosoma cruzi* during metacyclogenesis Proteomics. Volume 12, Issue 17 Pages 2694–2703. August, 2012.

LEWIS, M.D.; MA, J.; YEO, M.; CARRASCO, H.J.; LLEWELLYN, M.S.; MILES, M.A. Genotyping of *Trypanosoma cruzi*: systematic selection of assays allowing rapid and accurate discrimination of all known lineages. Am J Trop Med Hyg, in press, 2009.

LLEWELLYN, M.S.; LEWIS, M.D.; ACOSTA, N.; YEO, M.; CARRASCO, H.J.; SEGOVIA, M.; VARGAS, J.; TORRICO, F.; MILES, M.A.; GAUNT, M.W. *Trypanosoma cruzi* IIc: phylogenetic and phylogeographic insights from sequence and microsatellite analysis and potential impact on emergent Chagas disease. PLoS Negl Trop Dis. 1;3(9):e 510, Sep, 2009.

LÓPEZ-OLMOS, V.; PÉREZ-NASSER, N.; PIÑERO, D.; ORTEGA, E.; HERNANDEZ, R.; ESPINOZA, B. Biological characterization and genetic diversity of Mexican isolates of *Trypanosoma cruzi*. Acta Tropica, v. 69, p. 239-254, 1998.

LOROSA, E.S.; SANTOS, C.M.; JUBERG, J. Foco da doença de Chagas em São Fidélis, no Estado do Rio de Janeiro. Rev Soc Bras Med Trop. 41(4):419–20, 2008.

LOROSA, E.S.; VALENTE, M.V.M.; CUNHA, V.; LENT, H.; JUBERG, J. Foco da doença de Chagas em Arcádia, Estado do Rio de Janeiro, Brasil. Mem Inst Oswaldo Cruz.98 (7):885–7, 2003.

MAYA, J.D.; REPETTO, Y.; AGOSIN, M.; OJEDA, J.M.; TLLEZ, R.; GAULE, C.; MORELLO, A. Effects of nifurtimox and benznidazole upon glutathione and trypanothione content in epimastigote, trypomastigote and amastigote forms of *Trypanosoma cruzi*. Mol. Biochem. Parasitol, Amsterdam, v. 86, p. 101-106, 1997.

MATHERS, C.D.; LOPEZ, A.; MURRAY, C. "The Burden of Disease and Mortality by Condition: Data, Methods, and Results for the Year 2001. In Global Burden of Disease and Risk Factors, ed. A. Lopez, C. Mathers, M. Ezzati, D. Jamison, and C. Murray. New York: Oxford University Press. Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Vol. 108(8): 962-967, 2006.

MATOS, H.J.; NEVES-PINTO, A.Y.D.; MIRANDA, A.M.M.; SILVA, F.L.C.; RAMOS, F.L.P. Cross-reactivity in serological tests between Chagas disease and visceral leishmaniasis in endemic regions for both diseases. Rev Pan-Amaz Saude v.6 n.1 Ananindeua mar, 2015.

MILES, M.A.; SOUZA, A.A.; POVOA D.E.M. Chagas disease in the Amazon Basin. III. Ecotopes of ten triatomine bug species (Hemiptera, Reduviidae) from the vicinity of Belém, Pará State, Brazil. J Med Entomol 18: 266-278, 1981.

MILES, M.A.; LLEWELLYN, M.S.; LEWIS, M.D.; YEO, M.; BALEELA, R.; FITZPATRICK, S.; GAUNT, M.W.; MAURICIO, I.L. The molecular epidemiology and phylogeography of *Trypanosoma cruzi* and parallel research on Leishmania: looking back and o the future. Parasitology 136, 1509- 1528, 2009.

MILES, M.A.; LANHAM, S.M.; SOUZA, A.A.; PÓVOA, M. FURTHER enzymic characters of *Trypanosoma cruzi* and their evaluation for strain identification. Trans R Soc Trop Med Hyg, v. 74, p. 221-237, 1980.

MILES, M.A.; TOYE, P.J.; OSWALD, S.C.; GODFREY, D.G. The identification by isoenzyme patterns of two district strain-groups of *Trypanosoma cruzi*, circulating independently in a rural area of Brazil. Trans R Soc Trop Med Hyg, v. 71, p. 217-225, 1977.

MILES, M.A.; FELICIANGELI, M.D.; DE ARIAS, A.R. American trypanosomiasis (Chagas' disease) and the role of molecular epidemiology in guiding control strategies. Brit. Med. J. 28, 1444–1448, 2003.

MINNING, T.A.; BUA, J.; GARCIA, G.A.; Mc GRAW, R.A.; TARLETON, R.L. Microarray profiling of gene expression during trypomastigote to amastigote transition in *Trypanosoma cruzi*. Mol Biochem Parasitol, v. 131, n. 1, p. 55-64, sep, 2003.

MONCAYO, A.; M. YANINE I.O. 677An update on Chagas disease (human American trypanosomiasis) Volume 100, Issue 8 pp. 663, 01 December, 2006.

MORTARA, R.A.; ANDREOLI, W.K.; TANIWAKI, N.N.; FERNANDES, A.B.; SILVA, C.V.; FERNANDES, M.C. Mammalian cell invasion and intracellular trafficking by *Trypanosoma cruzi* infective forms. An. Acad. Bras. Ciênc. 77: 77-94, 2005.

NAKAYASU, E.S.; SOBREIRA, T.J.; TORRES, J.R.R.; GANIKO, L.; OLIVEIRA, P.S.; MARQUES, A.F. Improved proteomic approach for the discovery of potential vaccine targets in *Trypanosoma cruzi*. Journal of Proteome Research, v. 11, n. 1, p. 237-46, Jan 1, 2012.

NAVARRO, M.C.; DE LIMA, AR.; ASKUE, J.; CONTREVAS, V.T. Morphological Comparison of Axenic Amastigogenesis of Trypomastigotes and metaciclogenesis forms of *Trypanosoma cruzi*. Mem Inst Oswaldo Cruz 98: 83-91, 2003.

NERY-GUIMARÃES, F.; SILVA, N.N.; CLAUSELL, DT. Um surto epidemiológico de doença de Chagas de provável transmissão digestiva, ocorrida em Teutônia (Estrela-Rio Grande do Sul). Hospital (RJ), v. 73, p. 1767-804, 1968.

NOGUEIRA, N.P.; DE SOUZA, C.F.; SARAIVA, F.M.; SULTANO, P.E.; DALMAU, S.R. Heme-induced ROS in *Trypanosoma cruzi* activates CaMKII-like that triggers epimastigote proliferation. One helpful effect of ROS. PLoS One 6: e25935, 2011.

NOGUEIRA, N.P.; SARAIVA, F.M.S.; SULTANO, P.E.; CUNHA, P.R.B.B.; LARANJA G.A.T.; JUSTO, G.A.; SABINO, K.C.C.; COELHO, M.G.P.; ROSSINI, A.; ATELLA, G.C.; PAES, M.C. Proliferation and Differentiation of *Trypanosoma cruzi* inside Its Vector Have a New Trigger: Redox Status. PLOS ONE. February 11, 2015.

O'FARRELL, P.H. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. J Biol Chem. 250(10):4007-21, 1975.

OLIVEIRA, M.F.; SILVA, J.R.; DANSAPETRETSKI, M.; DE SOUZA, W.; BRAGA, C.M.S.; MASUDA, H.; OLIVEIRA, P.L. Haemozoin formation in the midgut of the blood-sucking insect *Rhodnius prolixus*. FEBS Lett 14: 95-8, 2000.

OLIVEIRA, M.F.; SILVA, J.R.; DANSA-PETRETSKI, M.; DE SOUZA, W.; LINS, U.; BRAGA, C.M.S.; MASUDA, H.; OLIVEIRA, P.L. Haem detoxification by an insect. *Nature*; 400: 517–518, 1999.

OLIVEIRA, M.F.; TIMM, B.L.; MACHADO, E.A.; MIRANDA, K.; ATTIAS, M.; SILVA, J.R.; DANSA-PETRETSKI, M.; DE OLIVEIRA, M.A.; DE SOUZA, W.; PINHAL, N.M.; SOUSA, J.J.; VUGMAN, N.V.; OLIVEIRA, P.L. On the pro-oxidant effects of haemozoin. *FEBS Lett.* 512: 139–144, 2002.

OPPERDOES, F.R.; MICHELS, P.A. Complex I of Trypanosomatidae: does it exist? *Trends Parasitol.* 24310-317, 2008.

OSORIO, L.; RÍOS, I.; GUTIÉRREZ, B.; GONZÁLEZ, J. Virulence factors of *Trypanosoma cruzi*: who is who? *Microbes Infect* 14(15): 1390-1340, 2012.

PAIVA, C.N.; LANNES-VIEIRA, J.; BOZZA, M.T.; Oxidative stress fuels *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *J Clin Invest.* 2012;122(7):2531-2542, 2012.

PAGOLA, S.; STEPHENS, P.W.; BOHLE, D.S.; KOSAR, A.D.; MADSEN, S.K. The structure of malaria pigment beta-haematin. *Nature* 2000; 404: 307–310 OLIVEIRA, 2000.

PAHO/WHO 2015
http://www.dndial.org/images/stories/pdf/Newsletter_3_ESP.pdf

PARODI, C.; PADILLA, A.M.; BASOMBRÍO, M.A. Protective immunity against *Trypanosoma cruzi*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* Jul;104 Suppl 1:288-94, 2009.

PARODI-TALICE, A.; DURÁN, R.; ARRAMBIDE, N. “Proteome analysis of the causative agent of Chagas disease: *Trypanosoma cruzi*,” *International Journal for Parasitology*, vol. 34, no. 8, pp. 881–886, 2004.

PARODI-TALICE, A.; MONTEIRO-GOES V.; ARRAMBIDE, N.; AVILA, A.R.; DURAN, R. Proteomic analysis of metacyclic trypomastigotes undergoing *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. *Journal of Mass Spectrometry*, v. 42, n. 11, p. 1422-32. Nov, 2007.

PELOSO, E.F.; GONÇALVES, C.C.; SILVA, T.M.; RIBEIRO, L.H.; PIÑEYRO, M.D.; ROBELLO, C.; GADELHA, F.R. Tryparedoxin peroxidases

and superoxide dismutases expression as well as ROS release are related to *Trypanosoma cruzi* epimastigotes growth phases. Arch Biochem Biophys. 2012 Apr 15;520(2):117-22. Mar 8, 2012.

PEREZ-MOLINA, J.A.; POVEDA, C.; MARTINEZ-PEREZ, A.; GUHL, F.; MONGE-MAILLO, B.; FRESNO, M.; LÓPEZ-VELEZ, R.; RAMÍREZ, J.D.; GIRONES, N. Distribution of *Trypanosoma cruzi* discrete typing units in Bolivian migrants in Spain. Infect Genet Evol. 21:440. Jan, 2014.

PÉREZ-MORALES, D.; OSTOA-SALOMA, P.; ESPINOZA, B. *Trypanosoma cruzi* SHSP16: characterization of an α -crystallin small heat shock protein. Exp Parasitol. ;123:182–189, 2009.

PIÑEYRO, M.D.; PARODI-TALICE, A.; ARCARI, T, ROBELLO, C. Peroxiredoxins from *Trypanosoma cruzi*: Virulence factors and drug targets for treatment of Chagas disease? a, Gene. Volume 408, Issues 1–2, 31, Pages 45–50. January, 2008.

PIACENZA, L.; PELUFFO, G.; ALVAREZ, M.N.; KELLY, J.M.; WILKINSON, S.R.; RADI, R. Peroxiredoxins play a major role in protecting *Trypanosoma cruzi* against macrophage- and endogenously-derived peroxynitrite. Biochem. J. 410: 359–368, 2008.

PIACENZA, L.; PELUFFO, G.; ALVAREZ, M.N.; KELLY, J.M.; WILKINSON, S.R.; RADI, R. Peroxiredoxins play a major role in protecting *Trypanosoma cruzi* against macrophage- and endogenously-derived peroxynitrite. Biochem. J. 410: 359–368, 2008.

PIACENZA, L.; PELUFFO, G.; ALVAREZ, M.N.; MARTÍNEZ, A.; RADI, R. *Trypanosoma cruzi* As Virulence Factors in Chagas Disease, *Trypanosoma cruzi* Antioxidant Enzymes As Virulence Factors in Chagas Disease. Antioxidants & Redox Signaling Volume 19, Number 7, 2013.

PIACENZA, L.; ZAGO, M.P.; PELUFFO, G.; ALVAREZ, M.N.; BASOMBRI, M.A.; RADI, R. Enzymes of the antioxidant network as novel determiners of *Trypanosoma cruzi* virulence. *International Journal for Parasitology*.;39(13):1455–1464, 2009.

PIÑEYRO, M.D.; PARODI-TALICE, A.; ARCARI, T.; ROBELLO, C. Peroxiredoxins from *Trypanosoma cruzi*: virulence factors and drug targets for treatment of Chagas disease? Gene. 2008 Jan 31;408 (1-2):45-50. Oct 22, 2007.

PIÑEYRO, M.D.; PARODI-TALICE, A.; PORTELA, M.; ARIAS, D.G.; GUERRERO, S.A.; ROBELLO, C. Molecular characterization and interactome analysis of *Trypanosoma cruzi* tryparedoxin 1. *J Proteomics*.74:1683–92, 2011.

PINHO, A.P.; MANGIA, R.H.; NEHME, N.; MOREL, C.M.; CUPOLILLO, E.; JANSEN, AM. The complexity of the circulation of *Trypanosoma cruzi* in the natural environment: biological and biochemical characterization of marsupial and *Rhodnius prolixus* isolates. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 91, supl, n. 220, 1996.

PINTO, A.Y.N.; HARADA, G.S.; VALENTE, V.C. Acometimento cardíaco em pacientes com doença de Chagas aguda em microepidemia familiar, em Abaetetuba, na Amazônia Brasileira. *Rev Soc Brás Med Trop*, v. 34, p. 413-9, 2001.

PINTO, A.Y.N.; HARADA, G.S.; VALENTE, V.C. Acometimento cardíaco em pacientes com doença de Chagas aguda em microepidemia familiar, em Abaetetuba, na Amazônia Brasileira. *Rev Soc Brás Med Trop*, v. 34, p. 413-9, 2001.

PRATA, A. Chagas` disease. *Infect. Dis. Clin. North America*, v. 8, n. 1, p. 61-75, 1994.

POOLE, L.; NELSON, K. Discovering mechanisms of signaling-mediated cysteine oxidation. *Curr Opin Chem Biol* 12: 18, 2008.

PUNUKOLLU, G.; GOWDA, R. M.; KHAN, I. A.; NAVARRO, V. S.; VASAVADA, B. C. Clinical aspects of the Chagas heart disease. *Int. Cardiol* 115, 279-83. PINTO DIAS, 199, 2007.

RAMÍREZ, J.D.; TAPIA-CALLE, G.; GUHL, F. Genetic structure of *Trypanosoma cruzi* in Colombia revealed by a High-throughput Nuclear Multilocus Sequence Typing (nMLST) approach.. *BMC Genet.* 30;14:96 doi: 10.1186/1471-2156-14-96. Sep, 2013.

REIS-CUNHA, J.L.; MENDES, T.A.; DE ALMEIDA, L.R.; RIBEIRO, D.R.; MACHADO-DE-AVILA, R.A.; DE OLIVEIRA, T.M.; LEMOS, D.S.; CAMARA, A.C.; OLORTEGUI, C.C.; DE LANA, M. Genome-wide screening and identification of new *Trypanosoma cruzi* antigens with potential application for chronic Chagas disease diagnosis. *PLoS One* 9(9), 2014.

REITHINGER, R.; TARLETON, R.L.; URBINA, J.A.; KITRON, U.; GURTLER, R.E. Eliminating Chagas disease: challenges and a road map. *BMJ* 338: b1283, 2009.

MORTARA, R.A.; ANDREOLI, W.K.; TANIWAKI, N.N.; FERNANDES, AB.; SILVA, CV.; FERNANDES, M.C.; L'ABBATE, C; DA SILVA, S. Mammalian cell invasion and intracellular trafficking by *Trypanosoma cruzi* infective forms. *An. Acad. Bras. Ciênc.* vol.77 no.1 Rio de Janeiro Mar, 2005.

ZINGALES, B. Revista da Biologia Revisão: *Trypanosoma cruzi*: um parasita, dois parasitas ou vários parasitas da doença de chagas? *Trypanosoma cruzi*: one parasite, two parasites or several parasites of chagas disease? 6b: 44-48 01 mar11, 2011.

RHEE, S.G.; WOO, H.A. Multiple functions of peroxiredoxins: peroxidases, sensors and regulators of the intracellular messenger H₂O₂, and protein chaperones. *Antioxid Redox Signal* 15: 781–794, 2011.

SANTOS, C.B.; RANGEL, C.V.; LEITE, G.R. Ocorrência de *Panstrongylus diasi* Pinto & Lent, 1946 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) no estado do Espírito Santo, Brasil. *Entomol Vect* 11: 363-367, 2004.

SANTOS,C.B.; LEITE, G.R.; FERREIRA, G.E.M.; FERREIRA, E.A.L. Infecção natural de *Triatoma vitticeps* (Stal, 1859) por flagelados morfologicamente semelhantes a *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909) no Estado do Espírito Santo Natural infection of *Triatoma vitticeps* (Stal, 1859) with flagellates morphologically similar to *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909) in Espírito Santo State *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 39(1):89-91, jan-fev, 2006

SALZMAN, T.A.; BATLLE, A.M.; DE SOUZA, W.C. Heme synthesis in *Trypanosoma cruzi*: influence of the strain and culture medium. *Comp Biochem Physiol* B 83: 57-61, 1986.

SANGENIS, L.H.C.; SARAIVA, R.M.; GEORG, I.; DE CASTRO, L.; LIMA, V.S.; ROQUE, A.L.R.; XAVIER, S.C.C.; SANTOS, L.C.; FERNANDES, F.A.; SARQUIS, O.; LIMA, M.M.; CARVALHO-COSTA, F.A.; BÓIA, M.N. Autochthonous transmission of Chagas disease in Rio de Janeiro State, Brazil: a clinical and eco-epidemiological study *BMC Infectious Diseases*. 15:4, 2015.

SANTOS, C.B.; LEITE, G.R.; SESSA, P.A.; FALQUETO, A. dynamics of feeding and defecation in *Triatoma vitticeps* (Stal, 1859) (Hemiptera, Reduviidae,

Triatominae) and its potential in the transmission of *Trypanosoma cruzi*. Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Vol. 101 (5): 543-546, 2006.

SANTOS-MALLET, J.R.; SILVA, C.S.; GOMES, S.A.O.; OLIVEIRA, D.L.; SANTOS, C.L.; SOUSA, D.M.; OLIVEIRA, L.R.; PINHEIRO, N.L.; GONÇALVES, T.C.M. Molecular characterization of *Trypanosoma cruzi* sylvatic isolates from Rio de Janeiro, Brazil. Parasitology Research June. Volume:103, No. 5, pp.1041-1045, 2008.

SANTOS, P.M.; TEXEIRA, M.C.; SÁ-CORREIA. Análise Proteômica Quantitativa na Revelação de Mecanismos de resposta a Stresse químico em microrganismos. Métodos em Biotecnologia – Proteômica Quantitativa; 7-17, 2004.

SANTOS, UM.; PINTO, A.F.S.; ALMEIDA, A.Z.; ZAGANELLI, F.L.; CARRANCHO, P.V.; NETTO, NA. Doença de Chagas no estado do Espírito Santo. III: Vetores do Trypanosoma. Rev Soc Bras Med Trop, v. 3, p. 51-52, 1969.

SCHAUB, G.A. Development of isolated and group-reared first instars of *Triatoma infestans* infected with *Trypanosoma cruzi*. Parasitol. Res. 74, 593-594, 1988.

SHANE, R.; WILKINSON, DJ.; MEYER, M.C.; TAYLOR, E.V.; BROMLEY, MA.; MILES, JOHN M K. The *Trypanosoma cruzi* Enzyme TcGPXI Is a Glycosomal Peroxidase and Can Be Linked to Trypanothione Reduction by Glutathione or Tryparedoxin. Received for publication, November 20, 2001, and in revised form, January 7, Vol. 277, No. 19, Issue of May 10, pp. 17062–17071, 2002.

SHIKANAI-YASUDA, M.A.C.; BRISOLA, MARCONDES, L.A.; GUEDES, G.S.; SIQUEIRA, A.A.; BARONE, J.C.P.; DIAS, V.; AMATO NETO, J.E.; TOLEZANO, B.A.; PERES, E.R.; ARRUDA, J.R.M.H.; LOPES, M.; SHIROMA, & CHAPADEIRO, E. Possible oral transmission of acute Chagas' disease in Brazil. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo, v. 33, p. 351-357, 1991.

SIES, H. Oxidative stress. London: Academic 507p, 1985.

SILVA, C.S. Estudo morfológico e histopatológico de amostras silvestres de *Trypanosoma cruzi* isoladas de *Triatoma vitticeps* (Stal, 1959) no Estado do Rio de Janeiro. (Master Thesis, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.85p, 2006.

SILVEIRA, A.C. Determinantes epidemiológicos, sociales y control de la enfermedad de Chagas en los países amazónicos. Workshop I “Neglected and emerging communicable disease and their determinants (The case of Chagas disease)” Rio de Janeiro, Brasil. In: Determinantes Epidemiológicos y Sociales de la Enfermedad de

Chagas. ALCUEH, Informaciones Básicas para Formulación de una Política de Vigilancia y Control, 2006.

SILVEIRA, A.C.; ALENCAR, T.A.; MÁXIMO, M.H.C. Sobre *Triatoma vitticeps* (Stal, 1859), no estado do Espírito Santo, Brasil. X Reunião Anual de pesquisa Básica de doença de Chagas, Caxambu, p. 58, 1983.

SILVEIRA, A.C; FEITOSA, V.R.; BORGES, R. Distribuição de triatomíneos capturados no ambiente domiciliar, no período 1975/83, Brasil. Rev Bras Malariol D Trop, v. 36, p. 15-312, 1984.

SOUTO, R.P.; FERNANDES, O.; MACEDO, A.M.; CAMPBELL, D.A.; ZINGALES, B. DNA markers define two major phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi*. Mol Biochem Parasitol. Dec 20;83 (2):141-52, 1996.

SOUSA, M.A. Tripanossomatídeos de Insetos e Plantas: Análise do Crescimento, Diferenciação e Divisão Celular, Biometria e Fenômenos Sugestivos de Sexualidade Valor Taxonômico. Tese de Doutorado, 2000.

SOUTO, R.P.; FERNANDES, O.; MACEDO, A.M.; CAMPBELL, D.A.; ZINGALES, B. DNA markers define two major phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi*. Molecular and Biochemical Parasitology. 83. 141-152, 1996.

SOUZA, C.F.; CARNEIRO, A.B.; SILVEIRA, A.B.; LARANJA, G.A.T.; SILVA-NETO M.A.C.; GONÇALVES DA COSTA, S.C.; PAES, M.C. Heme-induced *Trypanosoma cruzi* proliferation is mediated by CaMkinase II. Bioch. Bioph. Res. Comm.; 390: 541–546, 2009.

SOUZA, R.C.M.; SOARES, A.C.; ALVES, L.C.; LOROSA, E.S.; PEREIRA, M.H.; DIOTAIUTI, L. Feeding behaviour of *Triatoma vitticeps* (Reduviidae: Triatominae) in the state of Minas Gerais, Brazil Mem Inst Oswaldo Cruz; 106:16-22. 1940, 2011.

STAL. Apud Brener, Z. Vetores. In *Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas, eds.Z. Brener e Z. Andrade. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro, p. 463, 1859.

STEENKAMP, D.J. Trypanosomal antioxidants and emerging aspects of redox regulation in the trypanosomatids. Antioxid Redox Signal 4(1): 105-21, 2002.

STEINDEL, M.; TOMA, H.K.; ISHIDA, M.M.I.; MURTA, S.M.F.; PINTO, C.J.C.; GRISARD, E.C.; SCHLEMPER, J.RBR.; RIBEIRO-RODRIGUES, R.; ROMANHA, A.J. Biological and isoenzymatic characterization of *Trypanosoma cruzi* strains isolated from sylvatic reservoirs and vectors from the state of Santa Catarina, Southern Brazil. *Acta Tropica*, v. 60, p. 167-177, 1995.

STIEBLER, R.; TIMM, B.L.; OLIVEIRA, P.L.; HEARNE, G.R.; EGAN, T.J.; OLIVEIRA, M.F. On the physico-chemical and physiological requirements of hemozoin formation promoted by perimicrovillar membranes in *Rhodnius prolixus* midgut. *Insect Biochem Mol Biol*; 40: 284 – 292, 2010.

STURM, N.R.; CAMPBELL, D.A. Alternative lifestyles: The population structure of *Trypanosoma cruzi*. *Acta Tropica*. doi:10.1016/j.actatropica.2009.08.018, 2009.

PIMENTA, P.F.P. PIMENTA, W.; DE SOUZA, SOUTO-PADRÓN, T.P; PINTO DA SILVA. The cell surface of *Trypanosoma cruzi*: a fracture-flip, replica-staining label-fracture survey *Eur. J. Cell Biol.*, pp. 263–271 1989. 50, 1989.

TAYLOR, M.C.; HUAN, H.; KELLY, J.; 75:231-50. doi: 10.1016/B978-0-12-385863-4.00011-3. Genetic techniques in *Trypanosoma cruzi*, 2011.

TANAKA, Y.; TANAKA, H.; TANOWITZ, B.R. Bloom Growth of *Trypanosoma cruzi* in a cloned macrophage cell line and in a variant defective in oxygen metabolism *Infect. Immun.*, 41 (1983), pp. 1322–1331, 1983.

TETAUD, E.; GIROUD, C.; PRESCOTT, A.R.; PARKIN, D.W.; BALTZ, D.; BITEAU, N.; BALTZ, T.; FAIRLAMB, A.H. Molecular characterization of mitochondrial and cytosolic trypanothione-dependent trypanredoxin peroxidases in *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol*. Sep 3;116(2):171-83, 2001.

TIBAYRENC, M.; AYALA, F.J. Isozyme variability the agent of Chagas' disease: genetical, taxonomical, and epidemiological significance. *Evolution*, v. 42, p. 277-292, 1988.

TIBAYRENC, M.; HOFFMANN, A.; POCH, O.; ECHALAR, L.; LE PONT, F.; LEMESRE, J.L.; DESJEUX, P.; AYLA, F.J. Additional data on *Trypanosoma cruzi* isozymic strains encountered in bolivian domestic transmission cycles. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, v. 80, p. 442-447, 1986.

TIBAYRENC, M. Genetic epidemiology of parasitic protozoa and other infectious agents: the need for an integrated approach. *International Journal for Parasitology* 28, 85-104, 1998.

TURRENS, J.F. Oxidative stress and antioxidant defenses: a target for the treatment of diseases caused by parasitic protozoa, *Molecular Aspects of Medicine*. Volume 25, Issues 1–2, Pages 211–220, April, 2004.

MARCILI, A.; VALENTE, V.C.; VALENTE, S.A.; JUNQUEIRA, A.C.V.; SILVA, FM, NEVES, AYP.; NAIFF, R.D.; CAMPANER, MARTA, COURA, JR.; CAMARGO, EP.; MICHAEL, A. MILES & TEIXEIRA, M.M.G. *Trypanosoma cruzi* in Brazilian Amazonia: Lineages TCI and TCIIa in wild primates, *Rhodnius* spp. and in humans with Chagas disease associated with oral transmission q *International Journal for Parasitology*. *International Journal for Parasitology* 39. 615–623, 2009.

VALADARES, H.M.; PIMENTA, J.R.; SEGATTO, M.; VELOSO, V.M.; GOMES, M.L.; CHIARI, E.; GOLLOB, K.J.; BAHIA, M.T.; DE LANA, M.; FRANCO, G.R.; MACHADO, C.R.; PENA, S.D; MACEDO, A.M. Unequivocal identification of subpopulations in putative multiclonal *Trypanosoma cruzi* strains by FACs single cell sorting and genotyping. *PLoS Negl Trop Dis*. 2012;6 (7):e1722, 2012.

VALENTE, S.A.S.; PIMENTEL, O.S.; VALENTE, V.C. Microepidemia familiar de doença de Chagas em Santarém. Primeiro registro no oeste do Pará. *Rev.Soc Bras Med Trop*, v. 34 supl 1, p. 19-20, 2001.

COUSTOU, V.; BIRAN M.; BESTEIRO, S.; RIVIERE, L, BALTZ, T.; FRANCONI, JEAN-MICHEL, BRINGAUD, F. ‡Fumarate Is an Essential Intermediary Metabolite Produced by the Procyclic *Trypanosoma brucei*, 2006.

WASINGER, V.C.; CORDWELL, S.J.; CERPA-POLJAK, A.; YAN, J.X.; GOOLEY, A.A.; WILKINS, M.R.; DUNCAN, M.W.; HARRIS, R.; WILLIAMS, K.L.; HUMPHERY-SMITH, I.; Progress with gene-product mapping of the Mollicutes: *Mycoplasma genitalium*. *Electrophoresis*; 16(7):1090-4, 1995.

WHO:<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/secretarias/svs/doenca-de-chagas>WHO, 2015.

WIGGLESWORTH, V.B. The fate of haemoglobin in *Rhodnius prolixus* (Hemiptera) and other blood-sucking arthropods. *Proc.R.Soc. London*; 131: 313–339, 1943.

WIGGLESWORTH, V.B. The physiology of excretion in a blood-sucking insect. *Rhodnius prolixus*. III. The mechanism of uric acid excretion. *J. Exp. Biol.*; 8: 443–451, 1931.

WILDGRUBER, R.; HARDER, A.; OBERMAIER, C.; BOGUTH, G.; WEISS, W.; FEY, S.J.; LARSEN, P.M.; GORG, A. Towards higher resolution: two-dimensional electrophoresis of *Saccharomyces cerevisiae* proteins using overlapping narrow immobilized pH gradients. *Electrophoresis*; 21(13):2610-6, 2000.

WILKINS, M.R.; PASQUALI, C.; APPEL, R.D.; OU, K, GOLAZ, O.; SANCHEZ, J.C.; YAN, J.X.; GOOLEY, A.A.; HUGHES, G.; HUMPHERY-SMITH, I.; WILLIAMS, K.L.; HOCHSTRASSER, D.F. From proteins to proteomes: large scale protein identification by two-dimensional electrophoresis and amino acid analysis. *Biotechnology N Y*; 14(1):61-5, 1996.

WILKINSON, S.R.; HORN, D.; PRATHALINGAM, S.R.; KELLY, J.M. RNA interference identifies two hydroperoxide metabolizing enzymes that are essential to the bloodstream form of the african trypanosome *J. Biol. Chem.* 278(34): 31640-31646, 2003.

WILKINSON, S.R.; MEYER, D.J.; KELLY, J.M. Biochemical characterization of a trypanosome enzyme with glutathione-dependent peroxidase activity. *Biochem. J.* 352: 755–761, 2000.

WILKINSON, S.R. Prathalingam SR, Taylor MC, Ahmed A, Horn D, Kelly JM. Functional characterisation of the iron superoxide dismutase gene repertoire in *Trypanosoma brucei*. *Free Radic. Biol. Med.*; 40: 198-209, 2006.

WILKINSON, S.R.; TAYLOR, M.C.; TOUITHA, S.; MAURICIO, I.L.; MEYER, D.; KELLY, J. TcGPXII, a glutathione-dependent *Trypanosoma cruzi* peroxidase with substrate specificity restricted to fatty acid and phospholipid hydroperoxides, is localized to the endoplasmic reticulum. *Biochem. J a*; 364: 787–974, 2002.

WILKINS, M. R.; PASQUALI, C.; APPEL, R. D.; OU, K.; GOLAZ, O.; SANCHEZ, J. C.; JAN, J. X.; GOOLEY, A. A.; HUGHES, E.; HUMPHERY-SMITH, I.; WILLIAMS, K. L.; HOCHSTRASSER, D. F. From proteins to proteomes: large scale protein identification by two-dimensional electrophoresis and amino acid analysis. *Nature Biotechnology*, v.14, p. 61-65, 1996.

WINTERBOURN, C.C. Reconciling the chemistry and biology of reactive oxygen species. *Nat Chem Biol* 4: 278–286. doi: 10.1038/nchembio.85, 2008.

WOOD, Z.A.; POOLE, L.B.; HANTGAN, R.R.; KARPLUS, P.A. *Biochemistry* 41, 5493–5504, 2003.

WIGGLESWORTH, V.B. The physiology of excretion in a blood-sucking insect. *Rhodnius prolixus*. III. The mechanism of uric acid excretion. *J. Exp. Biol.*; 8: 443–451, 1931.

NGUI, R.; LIM, Y.A.; CHUA, K.H. Rapid Detection and Identification of Human Hookworm Infections through High Resolution Melting HRM Analysis. *PLoS One*. 2012;77:ed 41996. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. Nov; 108(7): 932–935, 2013.

VILLA, L.M.; GUHL, F.; ZABALA, D.; RAMÍREZ, J.D.; URREA, D.A.; HERNÁNDEZ, D.C.; CUCUNUBÁ, Z, MONTILLA M, CARRANZA JC, RUEDA K, TRUJILLO JE, VALLEJO GA. The identification of two *Trypanosoma cruzi* I genotypes from domestic and sylvatic transmission cycles in Colombia based on a single polymerase chain reaction amplification of the spliced-leader intergenic region. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, Vol. 108(7): 932-935, November, 2013.

VEAL, E. A; DAY, A. M; MORGAN, B. A. Hydrogen Peroxide Sensing and Signalin. *Molecular Cell*, v. 26, p. 1-14, 2007.

ZINGALES, B.; MILES, M.A.; CAMPBELL, D.A.; TIBAYRENC, M.; MACEDO, A.M.; TEIXEIRA, M.M.G.; SCHIJMAN, A.G.; LLEWELLY, M.S.; LAGES-SILVA, E.; MACHADO, C.R.; ANDRADE, S.G.; STURM, N.R. The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: rationale, epidemiological relevance and research applications. *Infect Genet Evol.* ;12:240–253, 2012.

ZINGALES, B.; STOLF, B.S.; SOUTO, R.P.; FERNANDES, O.; BRIONES, M.R. Epidemiology, biochemistry and evolution of *Trypanosoma cruzi* lineages based on ribosomal RNA sequences. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 94: 159-164, 1999.

ZHANG, W. Rogniaux H. Huang W. Chauvin A. Moreau E. Analysis of thioredoxin peroxidase as a promising antigen for diagnosis of *Fasciola gigantica* infection: a preliminary study. *Parasitol Int.*;60:206–208, 2011.

