

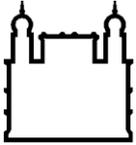
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Doutorado em Biologia Parasitária

**A HETEROGENEIDADE DOS ISOLADOS
SILVESTRES DE *TRYPANOSOMA CRUZI*
(ZIMODEMA III) EXPRESSA PELO PERFIL DE
SUAS GLICOPROTEÍNAS DE SUPERFÍCIE.**

SIMONE AKEMI KIKUCHI

Rio de Janeiro
2014



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Parasitária

A HETEROGENEIDADE DOS ISOLADOS SILVESTRES DE *TRYPANOSOMA CRUZI* (ZIMODEMA III) EXPRESSA PELO PERFIL DE SUAS GLICOPROTEÍNAS DE SUPERFÍCIE.

SIMONE AKEMI KIKUCHI

Orientadores: Dra. Jacenir Reis dos Santos Mallet

RIO DE JANEIRO
2014

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

K47 Kikuchi, Simone Akemi

A heterogeneidade dos isolados silvestres de *Trypanosoma Cruzi* (zimodema III) expressa pelo perfil de suas glicoproteínas de superfície / Simone Akemi Kikuchi. – Rio de Janeiro, 2014.

xiii, 110 f.: il. ; 30 cm.

Tese(Doutorado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Parasitária, 2014.

Bibliografia: f. 85-110

1. *Trypanosoma cruzi*. 2. Zimodema III. 3. Glicoproteínas. 4. Proteoma. I. Título.

CDD 616.9363

O presente trabalho foi realizado nos seguintes laboratórios:

Laboratório Transmissores de Leishmanioses

Instituto Oswaldo Cruz – Fiocruz/RJ

Departamento de Entomologia

Universidade Federal de São Paulo

Departamento de Microbiologia Imunobiologia e Parasitologia

Laboratório de Biologia Molecular

Instituto Oswaldo Cruz – Fiocruz/RJ

Departamento de Ultra Estrutura Celular e Biologia Celular

Laboratório de Genômica Funcional e Bioinformática

Instituto Oswaldo Cruz – Fiocruz/RJ

*Dedico a minha família e ao meu
Marido Fabio, pela paciência ,
compreensão e apoio em todos os momentos.
Obrigada!*

AGRADECIMENTOS

Todo trabalho, quando chega ao fim, incorpora em torno de si uma história de vida de renúncia e abnegação do autor e dos seus familiares próximos, como também, da colaboração e apoio de pessoas, sem as quais, certamente não seria possível a sua realização. Esse desprendimento lança sobre o trabalho uma aura de lembrança e reconhecimento àqueles que contribuíram com o desfecho dessa missão, desde a simples palavra de estímulo e encorajamento até a disponibilidade para o papel árduo e árduo de orientação. Assim sendo, pedindo desculpa às pessoas que, porventura, não venha mencionar nesta, muito me honra agradecer:

Aos meus amados pais, Masasi e Bela, que sempre me deram a liberdade de escolha, inclusive quanto à minha profissão, à minha irmã, Sabrina, ao meu marido, Fabio. Só vocês sabem como foi passar por esta fase ao meu lado. Se não fossem vocês, não sei se teria conseguido. Seu apoio foi fundamental. Vocês foram minha válvula de escape!

À minha orientadora, a Dr^a Jacenir Reis dos Santos Mallet, pela oportunidade que me deu de estar em seu laboratório e pelos seus ensinamentos. Ensinamentos não só de bancada, mas de experiência de vida. Ela também é uma pessoa batalhadora e tem uma incrível capacidade de agregar pessoas, está sempre com um belo sorriso no rosto, tem sempre uma palavra amiga para nos dizer, mesmo em momentos difíceis. É uma pessoa fantástica! Obrigada pela oportunidade de conviver com você!

À Dr^a Teresa Cristina Monte Gonçalves pelas conversas e por e ajudar com os isolados utilizados nesse trabalho.

À Dr^a Catarina Macedo pelos ensinamentos de vida nos momentos mais estressantes.

À Dr^a Suzete pela amizade e por aceitar a corrigir este trabalho.

Aos técnicos do laboratório: Simone Teves e Adalberto. Pessoas especiais que me ajudaram muito. Obrigada pela atenção e pelas palavras de apoio!

À Dr^a Miriam, do Laboratório de Biologia Celular, pela colaboração na realização desta dissertação. A Dra Leila de Mendonça Lima pela colaboração na plataforma de proteoma do Instituto Oswaldo Cruz.

Ao Seu Luciano, técnico do Laboratório de Biologia Celular, pelo auxílio fundamental na realização de alguns dos meus experimentos. Muito obrigada pela atenção e pelo apoio.

À minha amiga Cristina Santos Silva, além de estar sempre comigo, nos momentos divertidos e nas horas de trabalho me ajudou muito na realização desta dissertação. Obrigada, Cris!

Ao Roger da plataforma de microscopia e pela atenção e pelo auxílio na realização das fotos da microscopia de transmissão.

Às secretárias do quinto andar do prédio Carlos Chagas: Ester e Carlinha. Nunca esqueceram de colocar meu nome na lista do final de semana, mesmo sem eu pedir para colocar! Obrigada pela atenção e pela amizade.

À Maria Luiza Ribeiro por ajudar a formatar as Referências Bibliográficas e pelas risadas!!!!

À Alice Ricardo por me salvar nos momentos difíceis e por se tornar uma amiga!

À Mulé Tia, ops Simone Freitas, pelos momentos de alegria!

Aos colegas do laboratório: Ariane, Aline, Josi, Margareth Cardoso, Willian, Luciana Reboredo, Nathanielly Rocha, Silvia, Dany Misael, Renato, pela convivência, pelos momentos de descontração tornando o clima do nosso local de trabalho um clima leve, de amizade e agradável de trabalhar.

Aos meus amigos canadenses que mesmo sem saber do que se trata meu doutorado estavam sempre emitindo energia positivas!

Aos amigos conquistados nesses quatro anos de doutorado: Tainah, Amanda e Leonardo por tornar tão agradável, divertido e produtivo estudar na FIOCRUZ; pelo aprendizado tanto profissional quanto de vida; pelos conselhos profissionais, por todas as festas que aproveitamos e pelos congressos que participamos juntos.

Aos amigos de ontem, de hoje e para sempre presentes na minha, alguns estão sempre por perto, outros nem tanto devido a distancia; alguns são meus amigos há mais de dez anos, outros há menos dois anos. Não importa o tempo ou a distancia, apenas gostaria de agradecer a vocês por todo apoio, pelo carinho, paciência e pela amizade de vocês. Quero vocês para sempre na minha vida! Em especial Sabrina, Bia, Cintia, Carlinha, Regina, Renata, Rachel e Flavia.

A FIOCRUZ por fornecer subsídios fundamentais para o desenvolvimento da pesquisa: suporte financeiro, infra-estrutura e oportunidades. É um orgulho e uma honra estar neste grande centro de referência.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização desta dissertação. Obrigada!

Lista de figuras, tabelas e gráficos

FIGURA 1	Ciclo biológico: <i>Trypanosoma cruzi</i>	9
FIGURA 2	Distribuição epidemiológica das DTUs em humanos da América do Sul	12
FIGURA 3	Nomenclatura de <i>Trypanosoma cruzi</i> de acordo com os diferentes autores	17
FIGURA 4	Diagrama que Representa o Modelo Proposto da Evolução de cepas de <i>T.cruzi</i>	19
FIGURA 5	Mapa dos locais de coleta	37
FIGURA 6	Vista geral da localidade de Triunfo, localizada no município de Santa Maria Madalena- RJ	38
FIGURA 7	Vista geral da área A	39
FIGURA 8	Vista geral da área B	41
FIGURA 9	Caracterização molecular das cepas 3663 e 4167	53
FIGURA 10	Caracterização molecular dos isolados SMM10, SMM36, SMM53, SMM88, SMM98	53
FIGURA 11	Eletroforese bidimensional de proteínas solúveis de formas epimastigotas com faixa de pH 3-10	54
FIGURA 12	Comparação entre os géis 2D das cepas 4167 e 3663 e os isolados SMM98 e 36.	55
FIGURA 13	Eletroforese bidimensional de proteínas solúveis de formas epimastigotas com faixa de pH 4-7	56
FIGURA 14	Análise da reprodutibilidade da eletroforese bidimensional de proteínas solúveis de formas epimastigotas.	57
FIGURA 15	Imagem virtual obtida pela comparação entre os géis bidimensionais num gradiente de pH linear de 4-7 utilizando PDQuest software (Bio-Rad).	58
FIGURA 16	Identificação de <i>spots</i> da cepa 3663 (A) e 4167(B).	59
FIGURA 17	Variação da intensidade de spot identificado como arginina cinase entre as cepas 4167 e 3663 e os isolados silvestres SMM36 e 98.	62
FIGURA 19	Variação da intensidade de spot identificado como cruzipaína entre as cepas 4167 e 3663 e os isolados silvestres SMM36 e 98.	63

FIGURA 20	Análise zimográfica e <i>Western blotting</i> utilizando anticorpo anti-cruzipaína	64
FIGURA 21	Citometria de fluxo utilizando o anticorpo anti cruzipaína.	64
FIGURA 22	Cinética de infecção de células VERO pelas cepas SMM36, SMM98 , 3663 e 4167 nos períodos de 24h, 48h e 72h.	66
FIGURA 23	Gráficos da infecção de <i>Trypanosoma cruzi</i> em células Vero	67
FIGURA 24	Infecção da amostra SMM36 em cardiomiócitos	68
FIGURA 25	:Citometria de fluxo utilizando o anticorpo Gp82, Gp 35/50 , Gp 90 nos isolados silvestres de <i>Trypanosoma cruzi</i> .	69
FIGURA 26	Diferenças entre os isolados de <i>T. cruzi</i> quanto à expressão de moléculas de superfície (glicoproteínas) nos experimentos de <i>western blotting</i> .	70
TABELA 1	Procedência das amostras de <i>Trypanosoma cruzi</i> utilizadas.	36
TABELA 2	Programa utilizado para a Focalização isoeletrica (fitas de 7 e 17 cm).	44
TABELA 3	Médias e desvios padrão dos resultados obtidos em três curvas de crescimento	52
TABELA 4	Proteínas identificadas na cepa 3663 por espectrometria de massa com função conhecida e agrupada em categorias funcionais.	60
TABELA 5	Proteínas identificadas na cepa 4167 por espectrometria de massa com função conhecida e agrupada em categorias funcionais.	61
GRÁFICO 1	Curva de crescimento dos isolados silvestres de <i>Trypanosoma cruzi</i> obtidos no Estado do Rio de Janeiro.	51

Lista de abreviaturas

2d – Eletroforese Bidimensional

3'UTR - região 3' não traduzida

ACN - acetonitrila

APS - Persulfato de amônia

BSA - Albumina Sérica Bovina

CHAPS - 3-[3-colamidopropil dimetilamonio]-1-propanosulfonato

Dag - Diacilglicerol

Dc – Reagentes Detergentes

DHB – Ácido Diidroxibenzóico

DNA Ácido desoxirribonucléico

DTT - ditioneitol

EC numbers - The Enzyme Commission

EDTA - Ácido etilenodiaminotetracético

Eletroforese 2D - Eletroforese bi-dimensional

ESI – *Electrospray ionization*

gRNAs - RNAs guia

HCCA - ácido alfa-ciano-4-hidroxinâmico

IEF - Tampão de focalização isoeletrica

IPG - gradiente de pH imobilizado

KDa - Kilodáltons

kDNA - DNA do cinetoplasto

KEGG - *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*

LIT - *Liver Infusion Triptose*

MALDI - *matrix assisted laser desorption/ionization*

MALDI TOF-TOF - *matrix assisted laser desorption/ionization time of flight – time of flight*

MASP – proteínas associadas à mucina

MDS - *multidimensional scaling plot*

MLEE – *Multi Locus Enzyme Eletrophoresis*

Mm – Massa Molecular

MS – *Mass Spectrometry*

NNN - MacNeal, Novy e Nicole

OMS - Organização Mundial de Saúde

PAGE – *Polyacrilamide gel electrophoresis*
PBS - tampão salina fosfato
PCR – *Polymerase chain reaction*
pH - Potencial de hidrogênio
pI - Ponto isoelétrico
Pkcc – Proteína Cinase C
PM – Peso molecular
PMF - *Peptide mass fingerprinting*
PMSF - Fenilmetilsulfonil fluorido
Pvdf- Membrana De Polivinil
RAPD - *Random Amplified Polymorphic DNA*
Rc – Reagentes Redutores
RFLP-ITS-rDNA - *Restriction Fragment Length Polymorphism internal transcribed spacer rDNA*
RNA - ácido ribonucléico
RNAm – RNA mensageiro
RNAr - RNA ribossomal
SBF - soro bovino fetal
SDS - sulfato de dodecil de sódio
SDS-PAGE Gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio
SMF - Sistema Fagocítico Mononuclear
T. cruzi – *Trypanosoma cruzi*
T. cruzi II – *Trypanosoma cruzi II*
T.cruzi I – *Trypanosoma cruzi I*
TCA - Ácido tricloroacético
TEA - Trietanolamina
TEMED - N, N, N', N'-Tetrametiletenodiamina
TFA - Ácido trifluoroacético
Tof- Time Of Flight
Tris - tris-(hidroximetil)-amino metano
VP – Vacúolo parasitóforo
ZI - Zimodema I
ZII - Zimodema II
ZIII - Zimodema III

RESUMO

A doença de Chagas é uma doença tropical negligenciada que atinge principalmente a América Latina. *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico desta enfermidade, é largamente distribuído no continente americano e apresenta uma grande variabilidade fenotípica e genotípica em suas cepas. Os fatores que determinam as diferentes formas clínicas da doença, assim como as razões pela qual uma cepa apresenta tropismo diferenciado não estão claros. De forma semelhante, a correlação entre a variabilidade genética do parasito, sua relação com o desenvolvimento clínico da doença, assim como sua distribuição geográfica também não está bem estabelecida. Estas observações associadas com a variabilidade na resposta ao tratamento conduzem ao fato de que este cenário complexo, possivelmente, será mais bem entendido quando houver uma completa caracterização do parasito e o entendimento da relação parasito-hospedeiro na doença de Chagas. Desta forma, com o objetivo de estudar esta diversidade, caracterizações de populações deste parasito têm sido realizadas através de técnicas biológicas, bioquímicas e moleculares tentando associar determinado grupo de parasito a um determinado perfil epidemiológico. Neste estudo, foram utilizados parâmetros moleculares e bioquímicos para caracterização de amostras de *T. cruzi* isolados silvestres de *Triatoma vitticeps* do município de Santa Maria Madalena (Rio de Janeiro) e cepas da Amazônia (Manaus e Barcelos). Estudos baseados no perfil eletroforético de isoenzimas, propuseram que o *T. cruzi* fosse classificado em 3 zimodemas (ZI, ZII e ZIII). Posteriormente, através de diversas técnicas de biologia molecular, classificou-se as cepas em duas grandes linhagens filogenéticas: *T. cruzi* I (que se correlaciona ao ZI) e *T. cruzi* II (que se correlaciona ao ZII). Dados ecológicos e moleculares sugerem que as cepas pertencentes ao ZIII estejam mais relacionadas a *T. cruzi* I do que *T. cruzi* II, mas na realidade a posição de ZIII permanece controversa. 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. Este trabalho tem como objetivo principal definir o mapa de proteínas solúveis das cepas e isolados pertencentes ao ZIII ressaltando as diferenças existentes. Desta forma, buscamos analisar os mapas proteicos, perfil de proteases e estudar a expressão de glicoproteínas de superfície (Gp 82, Gp 35/50, Gp 90) destes isolados de *T. cruzi* (ZIII) (epimastigota e tripomastigota) obtidos de triatomíneos silvestres. Para isto foram utilizadas as técnicas de eletroforese bidimensional e espectrometria de massa. Foi feita a padronização de protocolos para a obtenção de extratos protéicos das formas epimastigotas e da separação das proteínas por eletroforese bidimensional. Os ensaios realizados na faixa de pH 3-10, revelaram uma grande diversidade de *spots*. Entretanto, quando a faixa de pH foi diminuída (4-7) houve um aumento no número de *spots* revelados. Uma diversidade considerável na expressão de proteína bem como na intensidade de vários *spots* também foi observada entre as cepas e isolados estudadas. Experimentos de western blot e citometria de fluxo mostraram uma expressão diferencial das gps nos diferentes isolados. Esses resultados contribuem para o conhecimento e registro do perfil de alguns isolados silvestres de *T. cruzi* em regiões ainda não acometidas pela doença. Nossos resultados apontaram uma heterogeneidade destes isolados de *T. cruzi* relacionados à biologia e expressão diferencial de enzimas de superfície.

ABSTRACT

Chagas disease is a neglected tropical disease which affects mainly Latin America. *Trypanosoma cruzi*, the etiologic agent of Chagas disease, is widely distributed in the American continent. The factors that determine the different clinical forms of the disease, as well as the reasons why one strain shows differential tropism are not clear. Similarly, the correlation between the genetic variability of the parasite, its relationship with the clinical development of the disease, as well as their geographical distribution is also not well established. Genetical studies are important to clarify the intra-specific heterogeneity of the parasite, the study of the biological behavior and the host-parasite relationships could clarify the importance of different strains, in the determination of clinico-pathological manifestations of Chagas' disease. These observations associated with the variability in response to treatment leads to the fact that this complex scenario possibly be better understood when there is a complete characterization of the parasite and the understanding of host-parasite relationship in Chagas disease. Thus, aiming to study aim of studying this diversity characterizations of populations of this parasite have been done by biological, biochemical and molecular techniques trying to associate certain group of a given parasite epidemiology. In this study, molecular and biochemical parameters for the characterization of *T. cruzi* isolated from *Triatoma vitticeps* municipality of Santa Maria Madalena (Rio de Janeiro) and strains of the Amazon (Manaus and Barcelos) were used. Studies based on enzyme electrophoresis profile clustered *T. cruzi* isolates into 3 zymodemes (ZI, ZII and ZIII). Molecular techniques showed a dimorphism among the isolates, grouping them into *T. cruzi* I (related to ZI) and *T. cruzi* II (related to ZII). Ecological and molecular data suggest that ZIII strains are more related to *T. cruzi* I than *T. cruzi* II, but their exact phylogeny is an unresolved issue. This work aims to define the map of soluble proteins of strains and isolates belonging to ZIII highlighting the differences. The diversity found among isolates, as well as between them and established strains leads to questions about the surface molecules of these populations and how these could influence the host-parasite interaction. Thus, we seek to analyze the protein maps, profile of proteases and study the expression of surface glycoproteins (Gp 82, Gp 35/50, Gp 90) of these isolates of *T. cruzi* (ZIII) (epimastigote and trypomastigote) obtained from silvatic triatomines. To this end the techniques of two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry were used. The present work describes the standardization of a protocol in order to obtain reproducible extraction and separation of soluble proteins using two dimensional gel electrophoresis from different ZIII strains. The experiments carried out in pH 3-10, revealed a great diversity of spots . Further separation using a narrow pH range (4-7) showed an increase in number of spots. A considerable diversity in protein expression as well as the intensity of various spots was also observed between the strains and isolates studied. Experiments western blot and flow cytometry showed a differential expression of the different GPS isolated. These results contribute to the knowledge and record of some wild isolates of *T. cruzi* in areas not yet affected by the disease profile. Our results showed a heterogeneity of isolates of *T. cruzi* biology and related differential expression of enzymes surface.

Sumário

1- Introdução	1
1.1. Doença de Chagas:	1
1.2. O vetor	4
1.3. O parasito	8
1.4. Diversidade do <i>T.cruzi</i>	10
1.5. Heterogeneidade do <i>ZII</i>	15
2 - .Análise proteômica	19
2.1. Eletroforese bi-dimensional (2D)	20
2.2. Análise computacional dos mapas proteômicos	21
2.3. Análise das amostras por espectrometria de massa	23
3. Invasão Celular	26
3.1. - Moléculas de superfície do <i>T.cruzi</i> envolvidas na invasão celular	27
3.1.1- Glicoproteínas	27
3.1.1 Gp82	28
3.1.2 Gp35/50	29
3.1.3 Gp90	30
4. Interação parasito – célula hospedeira	31
2 – Objetivos	34
3 – Material e Métodos	34
3.1. Procedência dos parasitas	35
3.2. Cultivo	39
3.2.1. Obtenção de formas epimastigotas e tripomastigotas	39
3.2.2 Obtenção de formas tripomastigota metacíclicas do <i>T. cruzi</i>	40
3.3 Extração de DNA	40
3.4 Quantificação de DNA	41
3.5 – Reação em cadeia da polimerase (PCR)	
3.2. Preparação do extrato protéico total solúvel	41
3.2.1. Extração das proteínas solúveis	41
3.2.2. Dosagem da concentração de proteínas no sobrenadante –	42

Método RCDC (BIO RAD)	
3.4. Eletroforese Bidimensional (2D)	44
3.4.1 . Focalização isoeétrica (1 ^a dimensão)	44
3.4.2. Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS (2 ^a dimensão)	44
3.5. Métodos de detecção das proteínas no gel	45
3.5.1. Coomassie Blue (G-250)	44
3.6. Análise e identificação das proteínas	45
3.6.1. Captura dos géis em um formato digital e análise das imagens obtidas	45
3.6.2. Retirada e processamento dos <i>spots</i>	46
3.6.3. Análise dos <i>spots</i> por espectrometria de massa e identificação dos peptídeos	46
3.7. Detecção glicoproteínas na superfície dos isolados silvestres para análise por FACS:	48
3.7.1 Anticorpos monoclonais	
3.8. Detecção de atividade de protease	49
3.9. SDS-PAGE e “Western blot”	50
3.10 Interação <i>T. cruzi</i> -célula hospedeira	
 4 – Resultados	 51
4.1. Curvas de crescimento <i>in vitro</i>	51
4.2. Caracterização molecular	52
4.3. Eletroforese Bidimensional (2D)	54
4.4. Análise dos <i>spots</i> por espectrometria de massa e identificação dos peptídeos	59
4.5. Atividade Proteolítica	63
4.6. Cinética de infecção de células VERO por tripomastigotas de diferentes cepas e isolados de <i>T. cruzi</i>	65
4.7. Experimentos de infecção em célula VERO utilizando anticorpo anti-cruzipaína	66
4.8. Infecção em Cardiomiócito	
4.9. Análise de citometria de fluxo da expressão de gp90, gp82 e gp35/50	68

4.10. Detecção de glicoproteínas na superfície dos isolados silvestres por <i>Western blot</i> e citometria de fluxo	69
5 – Discussão	71
6 – Conclusões	84
7 – Referências Bibliográficas	85

1 – INTRODUÇÃO

1.1 –Doença de Chagas

A história natural da doença de Chagas iniciou há milhões de anos como uma doença enzoótica de animais silvestres. Quando o homem aventurou-se nos ecótipos naturais, a doença começou a ser transmitida acidentalmente ao homem como uma antroponose. Como resultado do desmatamento provocado pela expansão da agricultura e agropecuária, a doença de Chagas tornou-se endêmica com a adaptação de insetos silvestres ao ambiente doméstico, na procura de nova fonte alimentar.

Trypanosoma cruzi (Chagas, 1909), é um protozoário autóctone do Continente Americano, causador de uma das mais importantes infecções parasitárias na América Latina devido ao seu impacto em termos econômicos e de saúde pública (Dias *et al.*, 2002). Sua distribuição geográfica compreende 21 países desde o sul dos Estados Unidos até a latitude 43°S no sul da Argentina e Chile (WHO, 1991, 2002). O protozoário *T.cruzi*, seus reservatórios mamíferos e os insetos vetores, os triatomíneos, existem na natureza há milhões de anos. O gambá, um dos reservatórios silvestres mais importantes, desempenha um papel relevante na epidemiologia da doença de Chagas, uma vez que este marsupial circula no ambiente silvestre, peridoméstico e doméstico em busca de alimento. Ao mesmo tempo, cães e gatos podem invadir o ambiente silvestre para caçar, adquirindo a infecção e trazendo-a também para o peridomicílio e domicílio. A adaptação dos triatomíneos às moradias certamente é o fator preponderante para o estabelecimento da infecção humana (Zingales 2011).

A infecção humana pelo *T. cruzi* na América Latina data de 9.000 a.C., conforme demonstrado por Afderheide *et al.* (2004), a partir de estudos realizados em múmias da região dos Andes. A passagem do parasito do ciclo enzoótico para o ciclo doméstico possivelmente foi um processo progressivo, no qual algumas espécies de triatomíneos foram capazes de se adaptar às novas condições ecológicas e estabelecer um novo ciclo de transmissão. Os triatomíneos são conhecidos desde o século XVI, porém acredita-se que sua adaptação aos domicílios é mais recente (Lent & Wygodzinsky, 1979). Especula-se que o desmatamento provocado pelo homem para fins de desenvolvimento agrícola nos últimos 300 anos tenha sido um processo central para a adaptação de triatomíneos ao domicílio e peri domicílio (Aragão, 1983; Coura, 2007).

A prevalência e a distribuição da doença de Chagas e sua associação com a mortalidade variam em consequência do impacto dos programas de controle, da migração rural e das mudanças nas condições socioeconômicas das comunidades de alto risco (Moncayo e Ortiz Yanise, 2006). A doença é endêmica em 21 países nas Américas, embora a migração de pessoas infectadas pode levar países não endêmicos da América e do Mundo. Estima-se que cerca de 100 milhões de pessoas estão em risco de infecção, 8 milhões infectado, com 56 mil novos casos por ano para todas as formas de transmissão, motivando 12 000 mortes por ano (WHO,2013).

Implementado em 1991, o pacto dos países do Cone Sul (Argentina, Brasil, Bolívia, Chile, Paraguai e Uruguai) visou à eliminação da transmissão vetorial da doença de Chagas nestes países (Anonymous, 1991). O combate químico visou ao controle dos vetores domiciliados e, em especial, ao *Triatoma infestans*, com resultados altamente positivos (Silveira *et al.*, 1994; Moncayo, 2003).

A interrupção da transmissão da doença de Chagas, pela via oral e via transfusional, no Uruguai ocorreu em 1997, no Chile em 1999 e no Brasil em 2006 (WHO, 1998b, 1999, 2000; Schmunis, 2007)

No Brasil, onde o *T. infestans*, *T. brasiliensis* e o *Panstrongylus megistus* eram os principais vetores, a prevalência da infecção pelo *T.cruzi* em crianças de sete a 14 anos de idade caiu 99,8% entre os anos de 1980 e 1999 (Moncayo & Ortiz Yanise, 2006).

O Inquérito Nacional da Soroprevalência iniciado em todas as regiões do país e dirigido ao grupo de faixa etária entre zero e cinco anos mostrou uma prevalência na ordem de 10^{-5} . Uma clara indicação que a transmissão, se ocorre, é somente acidental (Massad, 2007). Com base em dados soro epidemiológicos e entomológicos o Brasil recebeu, em nove de junho de 2006, da Organização Pan Americana da Saúde (OPAS), o Certificado Internacional da Eliminação da transmissão da doença de Chagas por *Triatoma infestans* (Massad, 2007).

Este avanço no controle vetorial do *T. infestans* causou um enorme impacto, modificando consideravelmente a epidemiologia da doença, no que diz respeito à sua incidência e forma de transmissão (Coura *et al.*, 2007). Na última década a transmissão de *T.cruzi* através da via oral tem crescido em frequência e número de casos em várias regiões brasileiras, especialmente na região norte do país, onde centenas de casos de doença de Chagas aguda têm sido relatados (Pinto *et al.*, 2004; Aguilar *et al.*, 2007). Em Igarapé da Fortaleza, no Amapá, a secretaria de vigilância em saúde informou a ocorrência de transmissão oral da doença de Chagas em 2004 (Ministério da Saúde, 2005). Em 2005, um

surto de doença aguda ocorreu na localidade de Navegantes, Santa Catarina, por transmissão oral, devido à ingestão de caldo de cana contaminado com *T. cruzi* (Steindel *et al.*, 2008). No Ceará, na cidade de Redenção, ocorreu caso agudo de doença de Chagas devido à transmissão oral, em março de 2006 (Cavalcanti, 2009). Em Macaúbas, Bahia, em maio de 2006, caso agudo devido possivelmente à ingestão de água contaminada com as fezes de *T. sordida* infectado (Dias *et al.*, 2008). Ainda na Bahia, na localidade de Ibipitanga, em outubro de 2006, ocorreu caso agudo da doença de Chagas devido à ingestão de caldo de cana (Bastos *et al.*, 2010). No Pará, os surtos que ocorrem em 2007, com suspeita de transmissão oral estão associados a ingestão de açaí (Barros *et al.*, 2009; Ministério da Saúde, 2007). Ano após ano, novos casos de contaminação oral por *T. cruzi* vem sendo notificados principalmente na região norte do País. De 2008 a 2012 foram notificados 549 casos (Medeiros *et al.*, 2008; Secretaria de Saúde do Tocantins, 2009; Gerência de epidemiologia da Fundação de vigilância a Saúde/Amazonas, 2010; SESP, 2011; 2012),

Em várias regiões do país, antes endêmicas para o *T. infestans*, verificou-se que algumas espécies de triatomíneos silvestres, até então de importância secundária na transmissão do *T. cruzi*, têm apresentado um comportamento de ocupação de ecótopos anteriormente ocupados pelo *T. infestans*, o que pode significar uma expansão geográfica da endemia em médio e longo prazo (Silveira e Resende, 1994). Espécies de triatomíneos praticamente desconhecidas podem exercer um papel importante em situações particulares, como foi o caso do *Triatoma tibiamaculata* no surto da doença de Chagas aguda em Santa Catarina ocorrido em 2005 (Steindel *et al.*, 2008).

A transfusão sanguínea constitui o segundo mecanismo de importância epidemiológica na transmissão da doença de Chagas (Rohwedder, 1969, Schmunis, 1985). Outras formas de transmissão possíveis são a transmissão materno-infantil, por via transplacentária, pelo leite materno e pelo coito (Bittencourt, 1976; Bittencourt, 1984; Bittencourt *et al.*, 1985).

A doença de Chagas no homem apresenta um curso bastante variado (WHO, 2002). Em virtude desta grande variabilidade clínica e epidemiológica, tem sido sugerido que fatores genéticos e imunológicos dos pacientes influenciam na evolução clínica da doença. Por outro lado, acredita-se que características genéticas da população de parasitos envolvidos, também tenham um papel importante no desenvolvimento das formas clínicas (Macedo & Pena, 1998).

Na transmissão vetorial do *T. cruzi*, o ciclo de maior importância epidemiológica é o doméstico, pois perpetua a infecção em seres humanos (Garcia *et al.*, 2005). O ciclo

doméstico é resultante do contato entre o homem e o vetor, envolvendo a colonização de ecótopos artificiais pelos triatomíneos. Normalmente, essa colonização é resultante de modificações sociais e ecológicas no meio ambiente, provocadas pelo próprio homem. Neste ciclo, o parasitismo pode causar importantes danos aos hospedeiros vertebrados, com alto grau de morbidade e mortalidade nas pessoas infectadas (Dias, 2000).

O ciclo silvestre de *T.cruzi* envolve a interação de vetores e hospedeiros silvestres em ecótopos naturais do continente americano. No âmbito silvestre, tem-se registrado mais de 100 espécies de pequenos mamíferos infectados naturalmente com *T.cruzi*, uma relação aparentemente muito antiga, que proporciona real equilíbrio entre hóspede e hospedeiro, sem dano para nenhuma espécie (Barreto, 1979). A maior importância é dada aos reservatórios capazes de aproximar-se dos seres humanos, especialmente alguns marsupiais (gambás, em geral) e ratos. Esses animais não só trazem o parasito para o peridomicílio do homem, na procura de alimento e abrigo, como também ajudam na dispersão dos triatomíneos. Os animais silvestres citados como reservatórios naturais para *T.cruzi* são: os marsupiais (gambás, marmotas e cuícas), os desdentados (tatus), os roedores (ratos e cobaias silvestres), os carnívoros (gatos, cachorros do mato, pequenas raposas etc.), os primatas (vários tipos de macacos), quirópteros (morcego) e os lagomorfos (coelhos e lebres) (Dias, 2000). Os marsupiais são classicamente considerados como os mais importantes reservatórios silvestres de *T.cruzi*, sendo os primeiros que podem representar o grupo de ligação entre os ciclos silvestre e doméstico do parasito (Fernandes *et al.*, 1999).

1.2 - Os vetores

Os hospedeiros invertebrados e vetores de *T.cruzi* são insetos pertencentes à Ordem Hemiptera, subordem Heteroptera, família Reduviidae, subfamília Triatominae. Todos os triatomíneos são obrigatoriamente hematófagos (Schofield & Galvão 2009). A maioria das espécies ocorre nas Américas, com exceção do gênero *Linshcosteus* na Índia e de *T. rubrofasciata* que está distribuído em todas as regiões tropicais (Schofield & Galvão 2009, Noireau & Dujardin 2010). Os principais gêneros de importância médica e veterinária são *Triatoma* sp., *Rhodnius* sp e *Panstrongylus* sp (Noireaus *et al* 2009). Estudos filogenéticos sugerem que a subfamília Triatominae evoluiu independentemente nas Américas, após a separação dos continentes (Schofield 1988, Schofield e Dolling 1993; Schofield, 2001).

São insetos ecléticos quanto a fonte de sangue (Costa & Lorenzo 2009), porém podem apresentar restrição alimentar ao habitat, vivendo em estreita associação com uma

determinada espécie de hospedeiro, como por exemplo, em copas de palmeiras, ninhos de pássaro e tocas de roedores (Noireau & Dujanrdin 2010).

Todas as espécies de triatomíneos são potenciais vetores de *T. cruzi* e todas as fases do ciclo de vida são capazes de serem infectadas e transmitirem. Uma vez infectados, estes insetos podem transmitir durante toda a vida (Schofield 1985). Contudo, existe uma série de variáveis que regulam a chance da ocorrência da infecção por *T. cruzi* no hospedeiro vertebrado através da via contaminativa: taxa de infecção nos triatomíneos, intervalo de tempo entre o repasto e a defecação, o número e o volume de evacuações por unidade de tempo, a intensidade do prurido durante o repasto, o número de parasitos eliminados, a porcentagem de formas infectantes (metaciclogênese) e sua capacidade de penetração, dentre outras (Coura 2007). Desta forma, Coura (2007) conclui que as chances de ocorrer a infecção por *T. cruzi* no homem pela via contaminativa dependem de intenso contato acumulativo com triatomíneos.

Os triatomíneos são divididos em seis tribos com 15 gêneros: Triatomini (*Triatoma*, *Meccus*, *Dipetalogaster*, *Mepraia*, *Eratyrus*, *Panstrongylus*, *Hermanlenticia*, *Paratriatoma*), Rhodiini (*Rhodnius*, *Psammolestes*), Cavernicolini (*Cavernicola*, *Torrealbaia*), Bolboderini (*Bolboderia*, *Belminus*, *Parabelminus*, *Microtriatoma*) e Alberprosenini (*Alberprosenia*). O grupo é formado por cerca de 140 espécies, 105 no Novo Mundo, sendo a maior parte distribuída nas Américas e associadas a ciclos enzoóticos. As teorias atuais sugerem que as tribos Rhodniini, Cavernicolini, Bolboderini, Linshcosteini e Alberproseniini são monofiléticas e Triatomini é polifilética (Tartarotti *et al.*, 2006, Schofield & Galvão, 2009).

Os gêneros mais importantes como vetores da doença de Chagas são *Rhodnius*, *Triatoma* e *Panstrongylus*. Triatomíneos do gênero *Rhodnius* possuem uma história biogeográfica complexa e uma longa associação com espécies de palmeiras na América Latina. As espécies desse gênero estão distribuídas em três complexos de acordo com filogenias baseadas em zimodemas (Dujardin *et al.*, 1999) e seqüências de 16S mitocondrial rDNA, citocromo b e 28S rDNA (Lyman *et al.*, 1999; Hyspa *et al.*, 2002; Monteiro *et al.*, 2000; Paula *et al.*, 2005): (1) complexo *R. pallescens* que compreende as espécies *R. pallescens*, *R. colombiensis* e *R. ecuadoriensis*, distribuído do oeste dos Andes a América Central, norte e noroeste da América do Sul; (2) complexo *R. brethesi*, constituído por *R. brethesi*, *R. pictipes* e *R. amazonicus*, restritos a região amazônica, e *R. stali*, encontrado na Bolívia e regiões vizinhas do Brasil (leste dos Andes); (3) complexo *R. prolixus*, composto por *R. prolixus*, *R. robustus*, *R. neglectus*, *R. nasutus*, *R. domesticus* e *R. neivai* (Galvão *et al.*, 2003). *R. prolixus* é largamente distribuído e o principal vetor de doença de Chagas na

América Central e noroeste da América do Sul, que apresentam três espécies domiciliadas: *R. prolixus*, *R. pallescens* e *R. ecuadoriensis*. No Brasil, todas as espécies do gênero *Rhodnius* são consideradas silvestres e a existência de colônias intradomiciliares nunca foi confirmada. Por outro lado, esses triatomíneos são atraídos pela luz e adultos têm sido encontrados dentro de casas. *R. brethesi* apresenta um comportamento peculiar de voar e atacar humanos durante a noite (Coura *et al.*, 1996; Galvão *et al.*, 2003).

Triatomíneos do gênero *Triatoma* e *Panstrongylus* são encontrados predominantemente associados à habitats terrestres como rochas, abrigos de animais e ocos de árvores. Algumas espécies de *Panstrongylus* são encontradas também em habitats arbóreos (Gaunt & Miles 2000). O gênero *Panstrongylus* compreende 14 espécies amplamente distribuídas em todas as Américas com registros do México até a Argentina, algumas delas com grande importância epidemiológica como vetores da doença de Chagas. As distâncias genéticas entre as espécies desse gênero sugerem que o grupo seja polifilético (Marcilla *et al.*, 2002). Epidemiologicamente, *P. megistus* é uma das mais importantes espécies de triatomíneos no Brasil. Dados biogeográficos indicam que pode ter surgido há 18000 anos, com populações de Santa Catarina e Ceará separadas por barreiras geográficas como as Serras do Mar e da Mantiqueira. As populações do sudeste e nordeste são mais próximas geneticamente (Barbosa *et al.*, 2006). No Brasil, *P. geniculatus* é silvestre e encontrado na Amazônia, com insetos adultos apresentando altas taxas de infecção por *T. cruzi* encontrados nas casas (Miles *et al.*, 1978; Coura *et al.*, 2002). Esta espécie também é comum na Bolívia, Colômbia e na Venezuela, onde tem sido sugerida como substituta de *R. prolixus* como vetor da doença de Chagas (Carrasco *et al.*, 2005).

T. infestans foi o principal vetor da doença de Chagas e alvo de programas de controle nos países do cone sul. O contínuo controle desses insetos em áreas endêmicas levou a eliminação de populações domésticas do vetor, com a interrupção da transmissão da doença (Dias *et al.*, 2002). Até o momento, a Bolívia é o único país com populações silvestres de *T. infestans* (Richer *et al.*, 2007). Estudos filogenéticos apóiam a origem de *T. infestans* nos planaltos bolivianos e sua dispersão em duas linhas, uma ao longo das regiões andinas da Bolívia e Peru e outra nas planícies do Chile, Paraguai, Argentina, Uruguai e Brasil (Bargues *et al.*, 2006).

Nas regiões secas da Caatinga, *T. brasiliensis* é o vetor mais importante, capaz de colonizar ambientes silvestres e domésticos, formando geralmente grandes colônias. Essa espécie tem grande capacidade de repovoamento a partir de regiões silvestres, aumentando o risco de introdução de novas linhagens de *T. cruzi* no ciclo doméstico da doença de Chagas

(Bargues *et al.*, 2006). *T. brasiliensis* é encontrado exclusivamente entre rochas. *T. pseudomaculata*, também comum no nordeste do Brasil, é encontrado em ninhos de pássaros. Ambas as espécies invadem o ambiente peridoméstico, porém, não colonizam habitações humanas (de La Fuente, 2008).

No Brasil, a colonização de habitações humanas por triatomíneos ocorreu em áreas de Caatinga e Cerrado. Na Mata Atlântica não existem espécies adaptadas ao ambiente doméstico. No entanto, casos autóctones de doença de Chagas têm sido atribuídos à transmissão por adultos de *T. vitticeps*, que invadem casas, vindos de áreas remanescentes de floresta, onde são encontrados em ninhos de marsupiais com altas taxas de infecção por *T. cruzi* (Gonçalves *et al.*, 1998; dos Santos *et al.*, 2005).

Um aspecto muito importante da história evolutiva do *T. cruzi* é a associação de populações (linhagens) com gêneros e espécies de triatomíneos, e seus respectivos ecótopos e nichos ecológicos. A tribo Cavernicolini é a mais divergente e está fortemente associada com morcegos. As espécies do gênero *Rhodnius* estão associadas com palmeiras. O gênero *Panstrongylus* é predominantemente encontrado em tocas de animais e ocos de árvores, já o gênero *Triatoma* é terrestre e está associado com habitats rochosos e tocas de roedores. Algumas espécies de *Triatoma* podem ser encontradas exclusivamente em ocos de árvores e/ou ninhos de pássaros (*T. maculata*, *T. platensis*, *T. delpontei*), outras exibem uma clara preferência por rochas ou cavernas. Algumas espécies podem exibir uma relação estreita com um ecótopo (*R. brethesi* com a palmeira *Leopoldina piassaba*) enquanto outras apresentam uma gama de ecótopos (*P. megistus* e *T. dimidiata*). São raras as espécies de triatomíneos encontradas apenas em árvores. *T. infestans* e *T. sórdida*, cujas populações vivem em regiões de altitude onde habitam rochas, quando estão na região de várzea vivem em árvores (Dujardin *et al.*, 2000; Gaunt e Miles 2000; Noireau *et al.*, 2000).

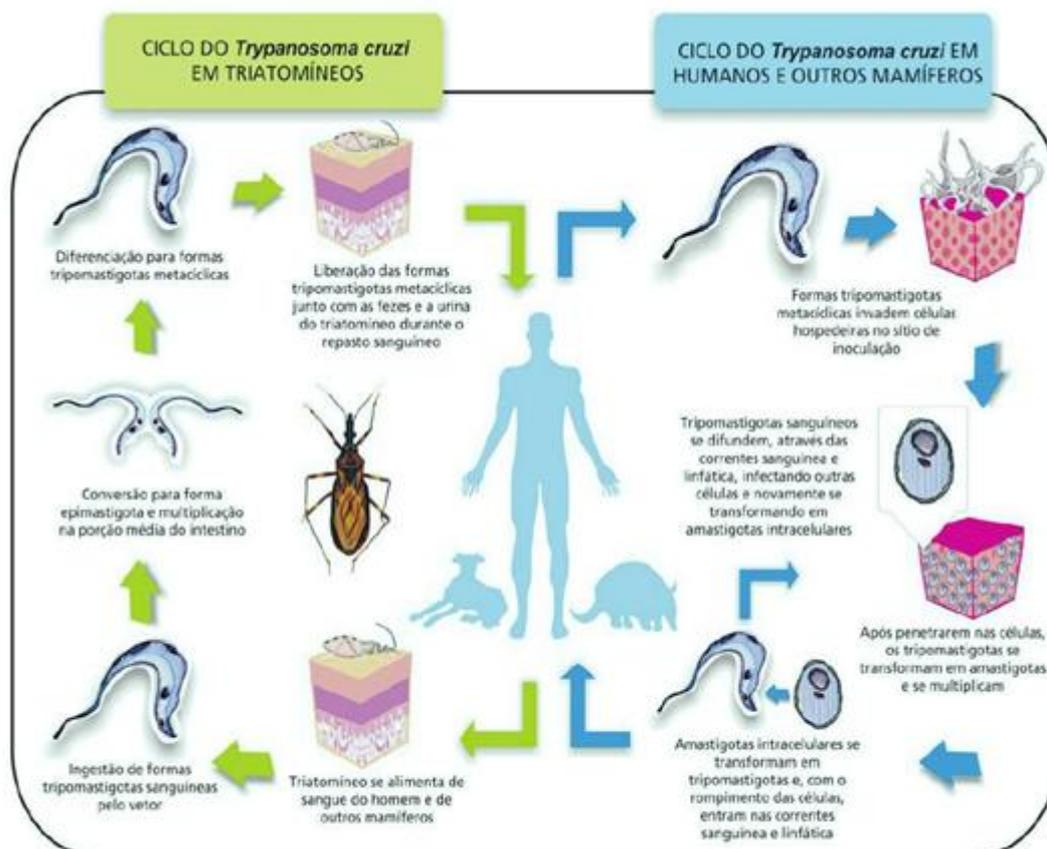
A luta contra a doença de Chagas exige um amplo sistema de vigilância capaz de detectar e controlar reinfestações por triatomíneos não domiciliados de residências já tratadas com inseticidas. No entanto, persistem em diferentes regiões, triatomíneos que não colonizam as habitações. Nestes casos, os estudos taxonômicos dos triatomíneos são essenciais para esclarecer e definir os padrões de risco. Os padrões ecológicos, de distribuição e preferências de cada espécie também necessitam de mais estudos. Os principais mecanismos de adaptação do inseto a ecótopos naturais ainda continuam mal compreendidos (Noireau *et al.*, 2000; Abadh-Franch *et al.*, 2008).

1.3 – O Parasito: *Trypanosoma cruzi*

T. cruzi é um protozoário flagelado pertencente à ordem Kinetoplastida, Família Tripanosomatidae e Gênero *Trypanosoma*. É um tripanosomatídeo eurixeno e digenético, uma vez que parte do seu ciclo ocorre em hospedeiro vertebrado e invertebrado (Hoare 1964, Hoare 1972, De Souza 2000), representados respectivamente, pelos mamíferos e triatomíneos silvestres, domiciliados ou domésticos. Por pertencer à seção Stercoraria dentro do gênero *Trypanosoma*, apresenta um desenvolvimento no intestino do inseto vetor que culmina com a liberação de formas infectivas pelas fezes (Hoare, 1972). *T. cruzi* apresenta um ciclo evolutivo complexo incluindo formas evolutivas distintas (amastigota, tripomastigota e epimastigota). É encontrado parasitando um número considerável de mamíferos e os mais variados tecidos desses hospedeiros, possibilitando ocupar diferentes nichos como descrito por Deane *et al.* (1984). Este ecletismo caracterizou-o como um dos parasitos mais bem sucedidos na vida parasitária (Jansen *et al.* 1999). Sua manutenção na natureza ocorre através de ciclos enzooticos entre hospedeiros silvestres, constituindo o ciclo silvestre, cuja distribuição geográfica é restrita ao continente americano, abrangendo o Sul dos Estados Unidos até a Argentina Central (Carrasco *et al.* 2012). Do ciclo silvestre, derivam-se os ciclos domésticos e peridomestico (Coura & Dias 2009).

Em condições naturais, formas infectantes do parasito são transmitidas pelos vetores através das fezes e urina contaminadas em contato com a pele e mucosa do hospedeiro vertebrado. Quando um triatomíneo deposita as fezes na pele lesada ou mucosa sã, estas formas denominadas tripomastigotas metacíclicas penetram ativamente em uma célula do Sistema Fagocítico Mononuclear (SMF). Estas formas diferenciam-se em amastigotas, multiplicam-se intensamente por divisão binária, rompem a célula e caem na corrente sanguínea sob a forma tripomastigota (Andrade & Andrews, 2004). as quais penetram em células vizinhas ou em outras distantes como células musculares e nervosas (Engman & Leon, 2002). No interior destas novas células, transformam-se novamente em amastigota e continuam o ciclo. Durante o hábito alimentar do inseto no hospedeiro humano, as formas tripomastigotas são ingeridas e no intestino do hospedeiro invertebrado transformam-se em epimastigotas. Estas, ao migrarem para a porção posterior do intestino do inseto, sofrem metaciclogênese e originam os tripomastigotas metacíclicos (Buscaglia & Di Noia, 2003, Teixeira *et al.* 2012). Esta via de transmissão não reflete todas as possíveis formas de infecção aos hospedeiros. Além da via contaminativa, *T. cruzi* pode ser transmitido através da via

congenita e oral. Fora das condições naturais a transfusão sanguínea e o transplante de órgãos estão também envolvidos na sua transmissão (Dias *et al* 2001) (Figura 1).



Ciclo de transmissão do *Trypanosoma cruzi* (simplificado). Infográfico: Venício Ribeiro, KICT/Fiocruz.

Figura 1: Ciclo biológico: *Trypanosoma cruzi*.

A doença de Chagas no homem apresenta um curso bastante variado (WHO,2002). Em virtude desta grande variabilidade clínica e epidemiológica, tem sido sugerido que fatores genéticos e imunológicos dos pacientes influenciam na evolução clínica da doença. Por outro lado, acredita-se que características genéticas da população de parasitos envolvidos, também tenham um papel importante no desenvolvimento destas formas clínicas (Macedo & Pena, 1998).

Na transmissão vetorial de *T.cruzi*, o ciclo de maior importância epidemiológica é o doméstico, pois perpetua a infecção em seres humanos (Garcia *et al.*, 2005). O ciclo doméstico é resultante do contato entre o homem e o vetor, envolvendo a colonização de

ecótopos artificiais pelos triatomíneos. Normalmente, essa colonização é resultante de modificações sociais e ecológicas no meio ambiente, provocadas pelo próprio homem. Neste ciclo, o parasitismo pode causar importantes danos aos hospedeiros vertebrados, com alto grau de morbidade e mortalidade nas pessoas infectadas (Dias, 1992).

Os diferentes mecanismos de transmissão do parasito entre espécies de mamíferos e vetores com características biológicas e ecológicas variadas resultaram na manutenção em distintos ciclos: desde focos de transmissão enzoóticos em restritos habitats a complexas redes interligadas por espécies domésticas e silvestres. Diante da sua ampla distribuição geográfica, bem como de seu ecletismo quanto as espécies de hospedeiros, as diferentes estratégias de transmissão e aos tecidos que coloniza, pode –se considerar que o *T.cruzi* apresenta grande sucesso evolutivo (Araujo *et al* 2009)

1.4 - Diversidade Genética em *T.cruzi*

T.cruzi compõe um táxon bastante heterogêneo. Desde a época de sua descrição, muitos autores propuseram variadas subdivisões intraespecíficas, de acordo com o desenvolvimento de ferramentas com maior poder de discriminação. Inicialmente, com base em variações morfológicas (Chagas, 1909), no perfil imunológico (Nussenzweig & Goble 1966) e no comportamento no hospedeiro (Andrade, 1974), foi possível definir *T.cruzi* em diferentes grupos de acordo com cada autor.

Os primeiros estudos de genética de população de *T.cruzi*, basearam-se na análise de isoenzimas, para demonstrar o grau de diversidade genética de tais organismos. Tais estudos revelaram a presença de três grupos principais, denominados Zimodemas (Miles *et al.*, 1978; 1980; Zingales,2011). Analisando um maior número de loci genéticos em um número maior de isolados, a diversidade foi ampliada para 43 zimodemas (Tibayrenc & Ayala,1988; Zingales, 2011). Evidências de que *T.cruzi* é um organismo diplóide, que a reprodução sexual é inexistente e que a estrutura populacional é clonal foram fornecidas por novos estudos (Tibayrenc & Ayala,1988; Tibayrenc,1995; Zingales,2011). As metodologias usadas para verificar a genética do parasita sendo baseadas em marcadores genéticos de evolução rápida, não permitiram definir agrupamentos de parasitas que permitissem sua associação com características epidemiológicas.

A análise de sequências de genes com menor taxa evolutiva, indicou um claro dimorfismo nos isolados de *T.cruzi*, definindo dois grupos (Souto *et Al.*, 1996; Zingales, 2011).

A existência das duas linhagens e a presença de isolados híbridos foi confirmada por uma série de marcadores moleculares sendo designada com nomenclatura diferentes por cada laboratório (revisto em Zingales *et al.*, 1999). Visando homogenizar a nomenclatura, um comitê decidiu que as linhagens fossem denominadas “grupos” *T.cruzi* I e *T.cruzi* II (Anônimo, 1999; Zingales, 2011). Por decisão do comitê os isolados híbridos não foram classificados em nenhum grupo para que estudos adicionais fossem realizados a fim de melhor caracterizar estes organismos (Zingales, 2011).

A divisão de *T.cruzi* em dois grupos foi investigada, primeiro, em países do Cone Sul, com a conclusão de que *T.cruzi* II predomina no ciclo doméstico da transmissão, sendo responsável pela doença de Chagas em humanos (Breniere *et al.*, 1998; Fernandes *et al.*, 1998; Zingales *et al.*, 1998; Zingales, 2011). Estudos em isolados de reservatórios silvestres e triatomíneos da Mata Atlântica do Rio de Janeiro mostraram a adaptação preferencial de *T.cruzi* I a gambás e de *T.cruzi* II a primatas. Nos triatomíneos, os dois grupos foram observados (Fernandes *et al.*, 1999; Zingales, 2011). Com base nessas informações foi proposto os possíveis ciclos de transmissão dos dois grupos de parasitas (Fernandes *et al.*, 1999; Zingales, 2011).

Visando facilitar a comunicação entre os pesquisadores, o entendimento de questões de biologia básica, das características eco-epidemiológicas e de patogenicidade dos grupos, a comunidade científica sentiu a necessidade de padronizar mais uma vez a nomenclatura dos grupos de *T.cruzi*, realizando um simpósio com um comitê de cientistas em 2009. Por recomendação deste comitê, *T.cruzi* foi dividido em seis grupos (*T.cruzi* I-VI); sendo cada grupo denominado DTU (“discrete typing unit”), definido como um conjunto de isolados que é geneticamente semelhante e que pode ser identificado por marcadores moleculares ou imunológicos comuns (Tibayrenc, 1988; Zingales, 2011). As DTUs *T.cruzi* I e *T.cruzi* II correspondem aos dois grupos originalmente definidos na primeira reunião (Anônimo, 1999; Zingales, 2011). E as DTUs III-VI correspondem a organismos híbridos, originados a partir de diferentes eventos de trocas genéticas. As conclusões foram que as DTUs apresentam distribuição geográfica distinta e que todas as DTUs são capazes de promover a doença de Chagas. Embora poucos casos são relatados de DTU IV em humanos, a DTU I não favorece a forma digestiva, e as DTUs II e V promovem as manifestações cardíaca e digestiva, sendo aparentemente as mais patogênicas (Zingales, 2011) (Figura 2).

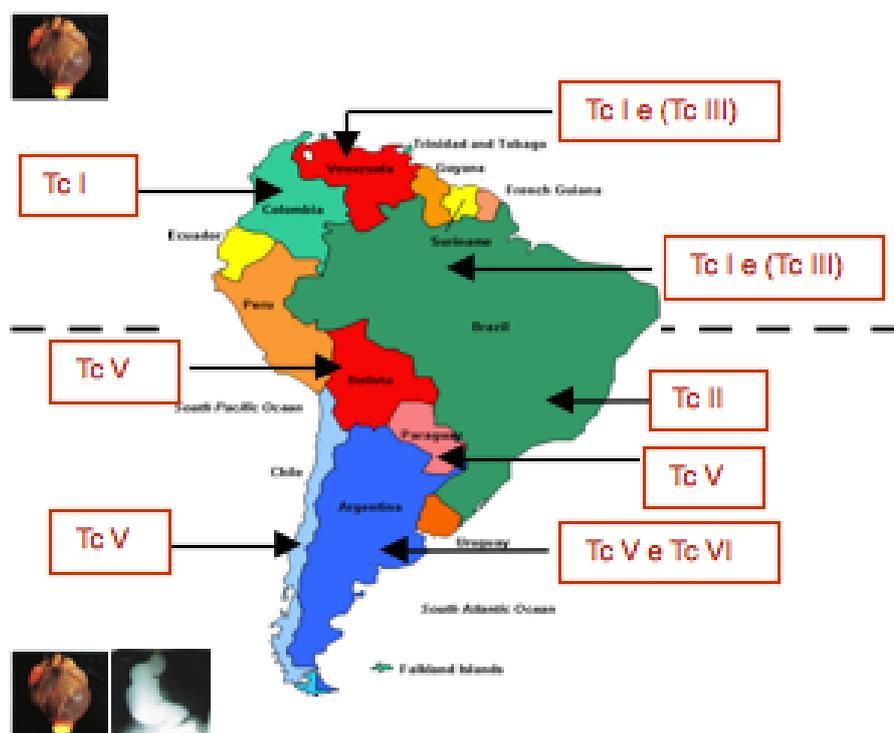


Figura 2. Distribuição epidemiológica das DTUs em humanos da América do Sul

A heterogeneidade de *T. cruzi* é comprovada por um conjunto de populações de parasitos (cepas) que circulam entre diversos hospedeiros vertebrados e invertebrados, silvestres e domésticos (Brener, 1977; Miles *et al.*, 1980; Morel *et al.*, 1986; Zingales *et al.*, 1998). Estudos experimentais com isolados de *T. cruzi* mostraram uma grande diversidade intra-específica evidenciada por diferenças na morfologia de formas sanguíneas (Brener, 1965), virulência e patogenicidade (Lauria-Pires *et al.*, 1997; Tekiel *et al.*, 1997), cinética de crescimento (Deane, 1984), susceptibilidade a agentes quimioterápicos (Haberkorn *et al.*, 1972; Brener *et al.*, 1976; Filardi & Brener, 1987 e Murta *et al.*, 1998), constituição antigênica e propriedades bioquímicas (Bongertz & Dvorak, 1983; Zingales *et al.*, 1984), propriedades imunológicas (Braga *et al.*, 1993) e infectividade em células hospedeiras (Doyle *et al.*, 1984).

Este parasito apresenta uma grande variabilidade fenotípica e genotípica em suas cepas e desta forma, com o objetivo de estudar esta diversidade, caracterizações de populações deste parasito têm sido realizadas através de técnicas biológicas, bioquímicas e moleculares tentando associar determinado grupo de parasito a um determinado perfil epidemiológico. A estrutura populacional de *T. cruzi* está distante de ser completamente

entendida. Embora a existência de dois grupos seja bem aceita, a existência ou não de um terceiro grupo ancestral tem sido debatida (Pedroso *et al.*, 2003; Brisse *et al.*, 2003; Sturm *et al.*, 2003).

As análises de zimodemas, um método bioquímico para detecção da variação eletroforética de isoenzimas, têm sido usadas por diversos autores para identificar populações de parasitos. Diferenças isoenzimáticas entre estoques de *T. cruzi* foi primeiramente estudado por Toyé, em 1974, usando aspartato e alanina aminotransferases. Neste artigo, o autor descreve as diferenças nos padrões eletroforéticos de seis enzimas entre isolados de *T. cruzi* provenientes de ciclos silvestres, domésticos e regiões adjacentes de uma área endêmica da doença de Chagas (Toyé, 1974). Baseando-se no polimorfismo observado nos perfis eletroforéticos de seis enzimas, Miles e colaboradores (1977; 1978) caracterizaram três perfis de enzimas pertencentes a grupos de parasitos (zimodema), onde o zimodema I (ZI) e zimodema III (ZIII) estão relacionados ao ciclo de transmissão silvestre e zimodema II (ZII) com o ciclo doméstico do parasito (Miles *et al.*, 1978). À medida que o número de isoenzimas analisadas foi sendo ampliado e sub-populações que circulam entre vertebrados domésticos, silvestres e invertebrados foram estudadas, observou-se um alto grau de heterogeneidade (Miles *et al.* 1980; Bogliolo *et al.* 1986; Tibareyenc *et al.* 1986, Tibareyenc & Ayala, 1988; Barnabé *et al.*, 2000).

Estas populações têm sido agrupadas: (a) em TCI, TCII e TCIII que correspondem ao zimodemas propostos Miles *et al.* (1977) com base no polimorfismo observado nos perfis eletroforéticos de seis enzimas onde o zimodema I (ZI) e zimodema III (ZIII) estariam relacionados ao ciclo de transmissão silvestre e zimodema II (ZII) com o ciclo doméstico do parasito; (b) o taxon *T. cruzi* foi subdividido do em seis linhagens ou DTUs, I, IIa, IIb, IIc, IId, IIe, sendo o DTU I correspondente à linhagem *T. cruzi* I e o DTU IIb correspondente à linhagem *T. cruzi* II. As sublinhagens IIa, IIc-e incluem as cepas híbridas e aquelas pertencentes ao zimodema III (Brisse *et al.* 2000); (c) *T. cruzi* é dividido em 2 grupos filogenéticos, TCI e TCII e os demais isolados são considerados resultantes de combinações de sub-populações de TCI e TCII (Tomazi *et al.*, 2009). Mais recentemente, em reunião realizada para a padronização da nomenclatura do *T. cruzi*, por consenso, o comitê reconheceu que as cepas de *T. cruzi* deverão ser classificadas em seis DTUs (Discret Taxonômica Units), que foram denominadas de *T. cruzi* I-VI (Zingales *et al.*, 2009). Para padronizar a nomenclatura, duas principais linhagens foram adotadas em 1999 em uma reunião realizada durante o Simpósio Internacional Comemorativo dos 90 anos da descoberta da doença de Chagas, no Rio de Janeiro: *T. cruzi* I e *T. cruzi* II. Cepas híbridas e pertencentes ao zimodema ZIII não

puderam ser classificadas como *T. cruzi* I e II. Ficou estabelecido que estas cepas seriam identificadas como *T. cruzi*, sem qualquer denominação (Anonymous, 1999).

T. cruzi I é predominantemente observado em mamíferos silvestres e triatomíneos e *T. cruzi* II é geralmente encontrado em humanos (Fernandes *et al.*, 1998; Zingales *et al.*, 1998; Yeo *et al.*, 2005). Fernandes *et al.*, (1999a) revelaram a presença de ambos os grupos no ciclo silvestre do parasito, ilustrando a complexidade do ciclo natural do parasito. Estes achados têm ajudado a entender como o ciclo silvestre e o doméstico são conectados e, portanto, esta nova classificação de *T. cruzi* pode ser importante para a definição de padrões ecoepidemiológicos da doença de Chagas (Devera *et al.*, 2003).

As cepas híbridas incluem: uma população que apresenta ambos os alelos para o *locus* D7 DNAr 24S α (grupo 1/2 – Souto *et al.*, 1996), cepas do clone 39 (Tibayrenc, 1995), cepas pertencentes ao zimodema ZIII (Fernandes *et al.*, 1998, 1999a) e cepas mostrando discrepantes alelos para diferentes *loci* D7 tipo 2 e Mini-Exon tipo 1 (Souto *et al.*, 1996).

O gene de mini-exon está presente no genoma nuclear dos kinetoplastida em torno de 200 cópias organizadas em sequências repetitivas do tipo tandem e é constituído por três regiões: uma altamente conservada correspondente aos exons (39pb), outra com 98% de identidade denominada introns (73pb) e uma região intergênica muito divergente. A amplificação da região intergênica do mini-exon pela Reação Polimerásica em Cadeia (PCR) em diferentes cepas de *T. cruzi* demonstrou um dimorfismo com produtos amplificados de 300pb e 350pb definindo também dois grupos principais (Murthy *et al.*, 1992, Souto *et al.*, 1996). Análises comparativas de seqüências do gene 24S α rRNA de *T. cruzi* mostraram dimorfismo semelhante ao proposto com o gene de mini-exon (Souto & Zingales, 1993). Posteriormente, estes dois grupos foram denominados de: *T. cruzi* I que se correlaciona ao ZI e *T. cruzi* II que se correlaciona ao ZII (Souto *et al.*, 1996; Fernandes *et al.*, 1998a, 1999). Fernandes e cols (1999) revelaram a presença de ambos os grupos no ciclo silvestre da doença e preferência da associação de linhagens filogenéticas principais de *T. cruzi* com diferentes hospedeiros, ilustrando a complexidade do ciclo do parasito na natureza (Devera *et al.*, 2003).

Devera e cols (2003) resumiram todas as características biológicas e moleculares que têm sido utilizadas no estudo da grande diversidade encontrada em diferentes isolados do parasito, descrevendo de forma pontual que ainda existem algumas lacunas a serem preenchidas, como por exemplo, em relação ao questionamento sobre a origem filogenética do ZIII, uma vez que ainda não existe um consenso. Trabalhos mais recentes utilizando técnicas moleculares sugeriram que o ZIII está mais próximo filogeneticamente de *T. cruzi* I

do que de *T.cruzi* II. Desta forma, *T.cruzi* I e ZIII parecem estar compartilhando rotas funcionais comuns (Brandão & Fernandes, 2006)

A caracterização destes parasitos, procedentes de diferentes hospedeiros, visa contribuir para o esclarecimento do significado biológico e repercussão dessa variabilidade na clínica e na epidemiologia dessa enfermidade. Entretanto, a grande maioria dos estudos realizados, está relacionada a populações de parasitos pertencentes aos grupos TCI e TCII, sendo escassos os trabalhos relacionados ao grupo ZIII. Vale ressaltar que quanto mais se estuda o ciclo silvestre, são obtidos mais resultados que refutam as diferentes associações. Bacigalupo *et al* (2012) encontraram infecção por TcII, TcV e TcVI em triatomíneos silvestres no Chile, além de Walleckx *et al* (2012) observarem infecção por TcII em *T.infestans*.

1.5- Heterogeneidade do *T.cruzi*: Zimodema III

Através de estudos filogenéticos baseados no perfil de RFLP-ITS-rDNA (Restriction Fragment Length Polymorphis- Internal Transcribed Spacer - rDNA) com isolados de ZIII da Amazônia brasileira, demonstrou-se uma clara dicotomia entre isolados deste grupo que permitiu dividi-lo em dois subgrupos denominados ZIII-A e ZIII-B, em que a distância genética mostrou um baixo nível de heterogeneidade (Mendonça *et al.*, 2002).

Miles *et al.*, (1981b) e Povia *et al.*, (1984) analisando isolados de *T.cruzi* de mamíferos e triatomíneos silvestres, observaram um predomínio absoluto do *T.cruzi* I e ZIII silvestres na Amazônia Brasileira, com registros também na Bahia (Barrett *et al.* 1980), Venezuela (Miles *et al.*, 1981), Colômbia (Saraiva *et al.* 1987) e USA (Brisse, Barnabé & Tibayrenc 2000). A análise de isolados de *T.cruzi* provenientes de animais silvestres coletados em quatro biomas brasileiros (Floresta Amazônica, Mata Atlântica, Caatinga e Pantanal), através da análise pelo gene de mini-exon, demonstrou que a prevalência da subpopulação ZIII é baixa na natureza (Lisboa *et al.*, 2009). O ZIII é raro, com uma distribuição larga, mas esporádica (Miles & Cibulskis 1986), tendo sido isolado em poucas espécies de triatomíneos: *P.geniculatus*, *Rhodnius robustus* e *R.brethesi* (Miles & Cibulskis, 1986) e *Triatoma vitticeps* (Santos-Mallet *et al* 2008).

Amostras de *T.cruzi* isoladas de *T. vitticeps*, coletados no estado do Rio de Janeiro foram classificados como ZIII com base no gene de mini-exon (Santos-Mallet *et al.*, 2008) e demonstraram grande heterogeneidade ao analisar curvas de crescimento, virulência das amostras após inoculação em camundongos, susceptibilidade ao tratamento com benznidazol

mostrando uma ação tempo-dependente, perfil de proteínas totais, avaliação da atividade proteolítica e perfil de proteases (Gomes *et al.* 2006, Silva 2006, Sousa, 2009). Esta heterogeneidade observada em amostras coletadas em uma mesma região conduz a um questionamento sobre de que forma esta diversidade poderia influenciar na interação parasito – célula hospedeira.

Em 1977, Miles e cols., utilizando a mobilidade eletroforética de 6 enzimas, caracterizaram grupos de *T.cruzi* de ciclos silvestres e domésticos transmitidos por diferentes vetores provenientes da cidade de São Felipe, Bahia. Um grupo de cepas, nomeado de ZI, foi principalmente encontrado em gambá e em espécies de triatomíneos silvestres. Um segundo grupo de isolados, provenientes de casos agudos e crônicos da doença de Chagas, Amazônia brasileira e triatomíneos domiciliados, foi identificado como ZII. Posteriormente, Miles e cols., (1978) compararam os zimodemas encontrados em São Felipe com os seis primeiros casos da fase aguda da doença de Chagas encontrados na Amazônia brasileira. Os dados mostraram que dois dos seis casos do Amazonas associaram-se com o ZI encontrado em São Felipe. Interessante notar, que não havia sido reportada a presença de isolados humanos neste zimodema. Os outros quatro casos (todos encontrados na mesma casa) mostraram um novo padrão de isoenzimas, caracterizados como ZIII. Posteriores caracterizações, de mais 60 isolados de *T.cruzi* de mamíferos e vetores silvestres, demonstraram seus agrupamentos no ZI. Por sua vez, o ZIII seria ocasionalmente encontrado em ciclos enzoóticos que se limitam a região Amazônica. Assim, os autores concluíram que os três grupos de *T.cruzi* encontrados, podem infectar o homem no Brasil, todos os três zimodemas podem causar a forma aguda da doença de Chagas e apenas o ZII causaria a síndrome crônica da doença de Chagas no estado da Bahia (Miles e *et al.*, 1978). Em uma caracterização mais extensiva de isolados de *T.cruzi* do Brasil, com um número maior que 18 enzimas, foi demonstrada uma maior complexidade e heterogeneidade nos três zimodemas propostos (Miles *et al.*,1980). Miles *et al.*, (1981b) e Pova *et al.*, (1984) analisando de isolados de *T.cruzi* de mamíferos e triatomíneos silvestres de indivíduos com doença de Chagas, observaram um predomínio absoluto de *T.cruzi* I e ZIII silvestres na Amazônia Brasileira, com registros também na Bahia (Barrett *et al.* 1980), Venezuela (Miles *et al.*, 1981), Colômbia (Saraiva *et al.* 1987) e USA (Brisse, Barnabé & Tibayrenc 2000). É frequentemente isolado de animais silvestres como o tatu (como *Dasypus novemcinctus*) (Pova *et al.* 1984) (Figura 3).

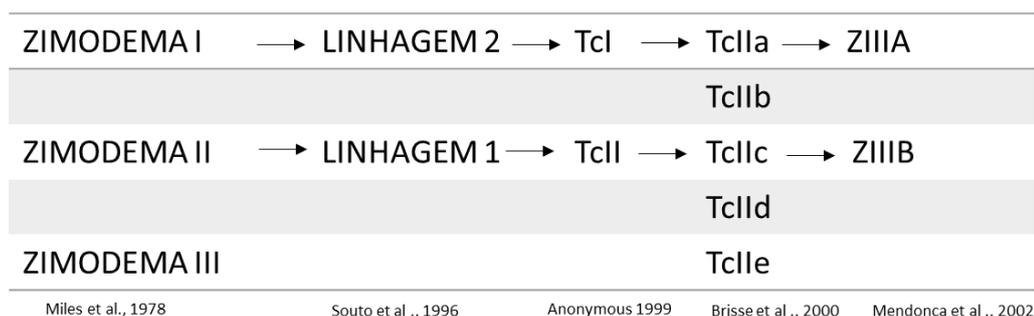


Figura 3: Nomenclatura de *Trypanosoma cruzi* de acordo com os diferentes autores.

Brisse e cols (2000), analisando 50 isolados de *T. cruzi* por MLEE (Multi Locus Enzyme Electrophoresis) (22 diferentes loci gênicos) e RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) (20 iniciadores aleatórios), mostraram que isolados podiam ser agrupados em 2 grupos bem definidos, o primeiro grupo pertencente à *T. cruzi* I e o segundo subdividido em 5 subgrupos 2a - 2e. No subgrupo 2a estava incluído o isolado CANIII (ZIII); no subgrupo 2b o isolado Esmeraldo (ZII); no subgrupo 2c os isolados M6421 e M5631 (ZIII com locus ASAT com perfil de ZI); no subgrupo 2d o ZII boliviano e no subgrupo 2e, a cepa CL Brener. Para uniformizar a nomenclatura proposta pelo comitê, os autores propuseram a designação de linhagens I e IIa-IIe. *T. cruzi* I corresponderia a ZI ; *T. cruzi* IIb-e a ZII e *T. cruzi* IIa a ZIII, sugerindo que ZIII estaria mais próximo de *T. cruzi* II. Os mesmos autores (Brisse *et al.*, 2000b) desenvolveram um método de identificação baseado na PCR utilizando iniciadores específicos a partir dos fragmentos obtidos do perfil de RAPD, que discriminam os seis grupos de *T. cruzi*.

Com o objetivo de achar uma correspondência entre as linhagens encontradas por Souto e cols. (1996) usando os marcadores RNA ribossomal 24S α , gene de mini-exon e RAPD que definiram *T. cruzi* I e II e o perfil de MLEE e RAPD de Brisse e cols. (2000a,b). Brisse e cols. (2001) utilizaram todos os marcadores em conjunto associados ao riboprinting proposto por Stothard e cols. (1998) para caracterizar 50 isolados, confirmando assim os seis grupos (*T. cruzi* I, *T. cruzi* IIa-IIe).

Análises baseadas em riboprinting, permitiu a construção de uma matriz onde um grupo continha isolados ZI e outro ZII e um ZIII; os outros isolados ZIII permaneceram intermediários entre esses dois grupos (Stothard *et al.*, 1998).

Brandão & Fernandes (2006) procurando uma nova evidência desta divergência entre *T. cruzi* estudaram a região 3' não traduzida (3'UTR) do gene da calmodulina. Este gene é essencial, pois modula o metabolismo de cálcio em várias atividades celulares (Hoelfling &

Ikura , 2002). Foram observadas várias mutações localizadas no segmento de 330pb da 3'UTR dos quais três eventos de inserção/eliminação importantes, são eles: a presença do dinucleotídeo AG em isolados de ZIII, a ausência de 13 bases purinas em ZIII e cinco grupamentos de GT em *T.cruzi* II. Essas mutações em 3'UTR do gene da calmodulina levantam a possibilidade que *T.cruzi* I e o ZIII estejam compartilhando vias funcionais comuns se comparados com os isolados de *T.cruzi* II (Brandão & Fernandes, 2006).

A posição de ZIII em relação aos grupos *T.cruzi* I e II continua controversa. Alguns autores consideram que ZIII está mais perto filogeneticamente do *T.cruzi* I do que *T.cruzi* II (Miles *et al.*, 1981; Fernandes *et al.* 1998b; Brandão & Fernandes, 2006). Enquanto outros autores sugerem que ZIII esteja mais perto filogeneticamente do *T.cruzi* II (Barnabé *et al.*, 2000; Brisse *et al.*, 2000; Machado & Ayala, 2001; Toma, 2005).

A estrutura populacional de *T.cruzi* está distante de ser completamente entendida. Embora a existência de dois grupos seja bem aceita, incertezas sobre a existência ou não de um terceiro grupo ancestral tem sido levantada (Pedroso *et al.*,2003; Brisse *et al.*, 2003; Sturm *et al.*, 2003). Baseado em dados de microsatélite - multidimensional scaling plot (MDS) e análises por RFLP do gene mitocondrial COII (citocromo oxidase subunidade II) foi demonstrado que todas as cepas agrupadas no grupo B e BH (ZIII e as cepas híbridas, respectivamente) pertenciam ao mesmo grupo mitocondrial B (Freitas *et al.*,2006). Neste artigo é demonstrado que o grupo mitocondrial B é uma terceira divisão filogenética de *T.cruzi*, distinto de *T.cruzi* I (grupo mitocondrial A) e *T.cruzi* II (grupo mitocondrial C). Baseado nesses resultados foi proposto um cenário para a evolução das populações de *T.cruzi*, onde no passado existiram três grupos ancestrais (MDS cluster A, C, e B na Figura 4). É interessante observar que esta proposta combina com a inicial sugestão feita por Miles e cols (Miles *et al.*, 1978) há quase 30 anos com base em estudos de isoenzimas. Provavelmente, *T.cruzi* II e *T.cruzi* III tiveram nichos ecológicos sobrepostos e, assim, as condições necessárias para hibridização. (Freitas *et al.*, 2006)

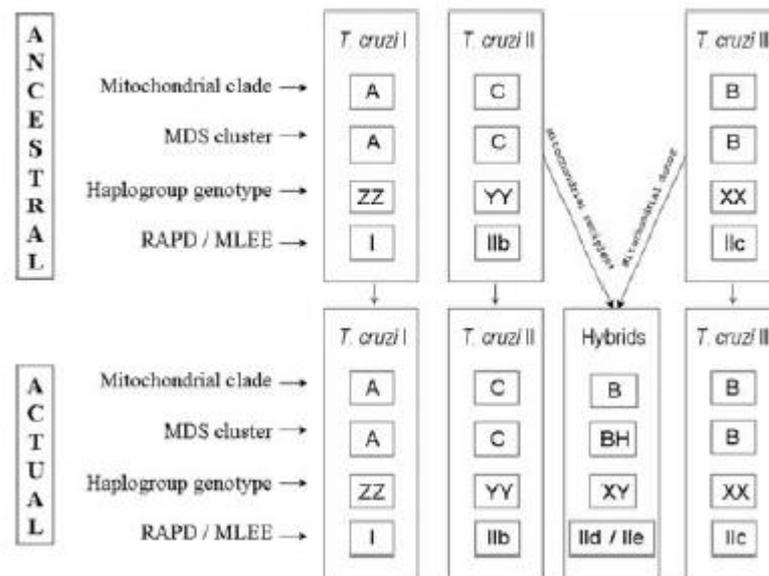


Figura 4: Diagrama que Representa o Modelo Proposto da Evolução de cepas de *T. cruzi* (Freitas *et al.*, 2006)

2 - Análise proteômica

As proteínas definem o fenótipo de um organismo e representam os alvos principais da maioria dos agentes terapêuticos conhecidos. Em 1995, Wasinger e cols descreveram proteoma como o complemento total de proteínas de um determinado genoma. Proteoma foi, então, um termo cunhado para fazer analogia com o termo genoma (Wasinger *et al.*, 1995; Wilkins *et al.*, 1996) Atualmente, a proteômica é definida como um conjunto de técnicas bioquímicas que permite a análise em grande escala de proteínas e peptídeos de uma célula, um tecido ou um organismo. Pode ser encarada também como uma ferramenta fundamental para a compreensão da função dos genes (Mallick & Kuster 2010). Informações sobre sequências de DNA, ainda que muito úteis, pouco nos dizem acerca dos mecanismos dinâmicos complexos que ocorrem no interior do organismos. A análise da transcrição de mRNAs revela o padrão de expressão gênica diferencial nestas amostras, mas nem sempre apresenta correlação direta com os níveis de proteínas efetivamente expressas (Cox & Mann 2011). Por sua vez, a proteômica permite não só a identificação e a quantificação das proteínas, mas também a determinação de suas modificações, interações, atividades e, eventualmente, funções biológicas (Fiedls 2001; Zhu *et al* 2003).

O Estudo em larga escala de proteínas foi dificultado durante um bom tempo em função de limitações técnicas. Infelizmente, não existe uma PCR para proteínas e o grau de

complexidade destas moléculas é maior do que polímeros de ácidos nucleicos estudados na genômica e transcriptoma (Graves & Haystead 2002; Patterson & Aebersold 2003). Nos últimos anos, evoluções metodológicas, principalmente nas técnicas de eletroforese bidimensional, cromatografia líquida e espectrometria de massa, permitiram o desenvolvimento da proteômica de modo extraordinário, com perspectivas de aplicações em diversos campos da Biologia, incluindo a Parasitologia (Ashton *et al* 2001).

A evolução desta abordagem experimental é resultado de uma variedade de técnicas que permitem separar, identificar, quantificar e caracterizar proteínas, bem como relacionar essa informação com a obtida por outras abordagens através da bioinformática. A obtenção da seqüência de nucleotídeos do genoma de um organismo, por si só, constitui apenas um primeiro passo que abre caminho à realização de estudos sobre o nível de expressão dos genes e proteínas ou sobre características das proteínas expressas. A análise proteômica permite apreciar o efeito da regulação da expressão gênica que ocorre pós-transcrição e pós-tradução e fornece pistas quanto à sua função e envolvimento nos processos biológicos (Santos *et al.*, 2004). 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).

Para se estudar o proteoma, a estratégia de escolha mais utilizada atualmente e que tem demonstrado ser eficiente é a combinação de eletroforese bidimensional com espectrometria de massa. A eletroforese 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. Além da espectrometria de massa (MS), há outras técnicas para se identificar uma proteína, como por exemplo, o seqüenciamento através da degradação de Edman. Essa consiste na obtenção de seqüências dos aminoácidos de uma proteína a partir da sua extremidade N-terminal. O seqüenciamento automático de proteínas por degradação de Edman juntamente com a identificação por cromatografia líquida, tem sido aperfeiçoado desde a sua disponibilização no início da década de 80. A introdução do método de digestão parcial das proteínas (seqüenciamento dos peptídeos internos) e a utilização da técnica de eletrodisposição em membranas de polivinil (eletroblotting em PVDF) tornaram esta técnica altamente confiável na descoberta de novas seqüências de aminoácidos (Bisch, 2004).

A eletroforese bidimensional, comumente aplicada em análises proteômicas, consiste em separar as proteínas combinando-se duas técnicas: a focalização isoelétrica (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). Desde o final da década de 1980, a espectrometria de massa (MS) começou a ser considerada uma das mais importantes ferramentas utilizadas para identificação de proteínas com alta sensibilidade e precisão. A MS permite determinar a massa molecular de uma biomolécula, tais como carboidrato, lipídeo e no caso em questão, a proteína. Além disso, é possível obter informações sobre a estrutura primária dessas biomoléculas, bem como determinar modificações pós-traducionais de aminoácidos.

2.1- Eletroforese bi-dimensional (2D)

Estudos proteômicos normalmente envolvem a análise de misturas complexas de proteínas. Para reduzir a complexidade, as amostras devem ser fracionadas, permitindo a identificação eficiente de seus constituintes. Durante muitos anos, a eletroforese bidimensional foi a técnica mais utilizada para fracionar misturas proteicas (Righetti, 2009).

Os fundamentos desta técnica foram primeiramente apresentados por O'Farrell e Klose em 1975 (O'Farrell,1975; Klose,1975). Desde então, inúmeras modificações e melhorias foram adicionadas a então eletroforese bidimensional original, que incluem o uso de múltiplas faixas de pH (Wildgruber *et al.*, 2000), uso de anfólitos nas faixas de pH entre 9-12 ou 10-12 (Görg *et al.*, 1997) e a escolha de detergentes adequados, preferencialmente os não-iônicos. 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 isoelétrica (Görg *et al.*, 2000). Portanto, na primeira dimensão uma fita de IPG (gel de pH imobilizado) é embebida em solução contendo a mistura protéica e agentes desnaturantes não-carregados. As fitas são submetidas a uma corrente elétrica, onde as proteínas são separadas através de focalização isoelétrica, ou seja, segundo seu ponto isoelétrico (pI). Na segunda dimensão, as proteínas são separadas em um gel de poliacrilamida que atua como uma peneira molecular onde as proteínas maiores - ou com alta massa molecular - migram mais lentamente do que as proteínas menores - ou de baixa massa molecular (Bisch, 2004). Para se minimizar a influência que a carga elétrica líquida das proteínas (pI) possa causar no processo de filtração molecular, adiciona-se tanto ao gel como às soluções-tampões detergente aniônico,

geralmente sulfato de dodecil de sódio (SDS), anulando-se possíveis cargas positivas na superfície das proteínas. Assim, a separação por massa molecular torna-se mais eficiente.

A eletroforese bidimensional é um método de separação eficiente porque permite o fracionamento simultâneo de centenas de proteínas de uma amostra complexa, fornecendo informações úteis sobre ponto isoelétrico, massa molecular, abundância relativa e modificações pós-traducionais, verificadas pela alteração da mobilidade eletroforética. Possibilita também a comparação quantitativa dos mapas bidimensionais gerados, permitindo a identificação de proteínas diferencialmente expressas. Entretanto, como qualquer técnica analítica, apresenta limitações dentre as quais destacamos 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. 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).

2.2- Análise computacional dos mapas proteômicos

As proteínas separadas pela eletroforese 2D são submetidas a métodos de coloração de modo a visualizar-se o mapa protéico gerado e assim facilitar a análise de comparação de proteomas. A existência de diferentes métodos de revelação de proteínas em géis de poliacrilamida é vastamente descrito na literatura, tais como: colorações por Coomassie blue, impregnação por prata, coloração fluorescente e a utilização de isótopos radioativos (Corthals *et al.*, 2000; Wilkins *et al.*, 1998). Vale ressaltar que esses métodos de revelação apresentam limitações e, portanto, podem ser usados em combinação fornecendo, então, mais informações na análise comparativa de diferença de expressão protéica (Rabilloud, 2000; White *et al.*, 2004; Patton *et al.*, 2002). A busca pelo método de visualização ideal procura características como alta sensibilidade, representada pela detecção de baixas concentrações de proteínas, além de reprodutibilidade dos mapas e compatibilidade com os procedimentos de identificação de proteínas, tais como espectrometria de massa e degradação de Edman.

A identificação de expressão diferencial entre duas ou mais situações de uma mesma amostra para se determinar proteínas com expressão downstream ou upstream é facilitada graças a existência de programas computacionais que basicamente detectam a intensidade e volume dos spots. Esses programas atualmente estão disponíveis nos mais

diferentes formatos como o Phoretix 2D (Nonlinear Dynamics), Melanie (Genebio), Image Master (Amersham BioSciences) e PDQuest (BioRad) (Dowsey *et al.*, 2003). Tais programas permitem padronizar as diferenças existentes de gel para gel, através da: (a) normalização das imagens, excluindo background; (b) detecção e quantificação dos spots; (c) escolha de spots landmarks, isto é, spots de referência que estejam presentes em todos os géis a serem analisados; (d) alinhamento dos spots landmarks entre os diferentes géis 2D; (e) comparação (matching), ou seja, pareamento automático entre os spots dos diferentes géis 2D submetidos à análise; (f) identificação de spots “expressos” diferencialmente; (g) resultados finais da interpretação das análises e (h) compilação dos resultados e criação de um banco de dados de géis 2D (Dowsey *et al.*, 2003; Garrels, 1989; Dunn *et al.*, 1992).

Os diversos programas disponíveis não promovem análises totalmente automáticas das imagens, em certas situações, se faz necessário a edição manual dos spots, além de uma revisão criteriosa em todas as etapas da análise (Dowsey *et al.*, 2003; Dunn *et al.*, 1992; Fievet *et al.*, 2004).

2.3- Análise das amostras por espectrometria de massa

Nas análises proteômicas, além da identificação de peptídeos e proteínas, a espectrometria de massa fornece informações sobre expressão proteica, modificações pós-traducionais e interações, permitindo uma análise detalhada da função das proteínas (Glish & Vachet 2003).

Os instrumentos de espectrometria de massa separam e detectam íons em fase gasosa de acordo com a relação massa/carga (m/z). Por isso, a primeira etapa desta técnica é converter as moléculas da amostra estudada em íons gasosos. Em seguida, para que ocorra a separação um campo eletro e/ou magnético deve ser gerado dentro do instrumento. Esses campos separam os íons influenciando sua trajetória espacial, velocidade e /ou direção. O espectro de massa da amostra analisada é então gerado, sendo composto pela quantidade de íons formados versus a relação carga/massa, com os quais a massa molecular pode ser deduzida (Canãs *et al* 2006).

A descoberta de processos de ionização “mais brandos”, onde a conversão de moléculas grandes e frágeis, tais como proteínas, em íons moleculares evitando-se a sua fragmentação, possibilitaram o desenvolvimento de estratégias no estudo de biomoléculas. Dessas técnicas de ionização, as duas que mais apresentaram sucesso

foram a ionização por eletrospray (ESI- electrospray ionization) e ionização por desorção a laser auxiliada por matriz (MALDI - a matrix assisted laser desorption/ionization), ou seja, formação de íons em fase gasosa a partir de moléculas presentes em uma matriz sólida ou líquida, a qual é irradiada com um laser (Vessecchi et al., 2011). Deve-se ressaltar que outros fatores como melhoramento na resolução de massa, aumento da acurácia e sensibilidade do aparelho, assim como rapidez de análises juntamente com o progresso recente nas ciências de computação, contribuíram para os avanços recentes observados na espectrometria de massa.

Na ionização do tipo MALDI, os peptídeos são misturados a uma matriz constituída por ácidos orgânicos aromáticos. A mistura é bombardeada por um feixe de raios laser formando íons que são liberados da matriz com auxílio de um campo elétrico (Karas *et al.*, 1998, Canãs *et al.* 2006). Diferentemente da técnica MALDI, o procedimento de ionização da metodologia ESI envolve a geração de íons a partir de soluções aquosas (Fenn *et al.*, 1989). Os íons são produzidos em solução sob pressão atmosférica. As amostras são dissolvidas em um solvente aquoso pouco volátil e aplicadas em um tubo capilar sob influência de um campo elétrico. Quando o líquido atravessa este capilar, forma múltiplas gotículas carregadas, que rapidamente evaporam transferindo a carga para as moléculas da amostra (Fenn *et al.*, 1989; Yates, 1998; Wilm & Mann, 1996; Shevchenko *et al.*, 1996; 1997; Canãs *et al.* 2006).

As fontes de íon descritas acima são comumente combinadas com dois tipos de analisadores de massa: o tempo-de-vôo (TOF ou time of flight) onde as partículas carregadas são então detectadas por um detector. Os íons mais leves percorrem ou voam no tubo mais rapidamente sendo detectadas antes dos íons mais pesadas (Lim & Elenitoba-Johnson, 2004), analisa o tempo de deslocamento dos íons. O segundo tipo é o íon trap que analisa os íons separados baseado na frequência de ressonância da razão m/z e os quadrupolos (Q) que analisa a estabilidade da razão m/z . (Jonscher & Yates III, 1997; Yates *et al.*, 2009). Ambos analisadores de massa são capazes de determinar a estrutura primária de peptídeos (Bisch, 2004). A associação de dois analisadores é usada para identificar proteínas através da fragmentação peptídica (Cañas *et al.*, 2006). A sensibilidade desses analisadores varia de femtomols a attomols (Yates *et al.*, 2009)

Atualmente, em estudos proteômicos, a estratégia de escolha utilizada na identificação de proteínas tem sido a espectrometria de massa principalmente devido a sensibilidade (attomoles) (Görg *et al.*, 2004). Esta técnica baseia-se na análise dos peptídeos oriundos da digestão das proteínas por proteases, resultando em um

fingerprint (Rappsilber & Mann, 2002). Basicamente, o procedimento de preparação da amostra requer etapas de descoloração dos spots, tripsinização das proteínas no gel de poliacrilamida (in-gel digestion) e concentração dos peptídeos. Todas estas etapas requerem um manuseio cuidadoso das amostras, pois qualquer tipo de contaminação, principalmente por queratina, pode inviabilizar o material.

Métodos de digestão de proteínas in-gel foram desenvolvidos e desde então são comumente aplicados a proteínas observadas em géis uni ou bidimensionais (Shevchenko *et al.*, 1996; Rosenfeld *et al.*, 1992). A tripsina é, usualmente, a protease utilizada para digestão das proteínas, por ser uma enzima estável e que se mostra altamente específica: o sítio de clivagem é a porção carboxi-terminal de resíduos de arginina e lisina. Na etapa final de preparação da amostra, os peptídeos extraídos requerem um procedimento de purificação a fim de remover contaminantes provenientes do SDS-PAGE, como, por exemplo, sais, tampões e detergentes. As amostras ainda necessitam de uma etapa de concentração dos peptídeos antes da análise por espectrometria de massa. Esta etapa geralmente é feita por cromatografia de fase reversa (Graves & Haystead, 2002).

Algumas proteínas estágio-específicas desempenham papéis importantes na infectividade e sobrevivência. Com o intuito de entender as bases moleculares da diferenciação do parasito, trabalhos anteriores se interessaram pela identificação de proteínas específicas, expressas nas diferentes formas do parasito (Parodi-Talice *et al* 2004, Paba *et al* 2004 , Sodré *et al* 2009, D Pérez-Morales - 2012, RM Queiroz - 2013).

A abordagem proteômica é uma ferramenta valiosa para o estudo de padrões globais de expressão genica (Hancock *et al* 1999; Tyers & Mann 2003). Esta metodologia tem sido empregada no estudo dos tripanosomatídeos (Paba *et al* 2004, Parodi-Talice *et al* 2004, Atwood *et al* 2005; Magalhaes *et al* 2008, Ferella *et al* 2008, Sodre *et al* 2009, Ayub *et al* 2009; Pérez-Moralez *et al.*, 2012; Bayer-Santos *et al.*, 2012 Queiroz *et al.*, 2013) e sua aplicação tem se mostrado particularmente importante ao nível pós transcricional (Clayton & Shapira 2007). Além disso, modificações pós traducionais desempenham um papel importante na modulação da função de proteínas nesses parasitos. Juntas, essas considerações apoiam as análises proteômicas como uma abordagem ideal para avaliar os níveis de expressão proteica em diferentes estágios ou sub tratamentos específicos nos tripanossomatídeos. Além disso, uma abordagem proteômica para *T.cruzi* se torna ainda mais significativa dado o fato de que o projeto

genoma para este parasito já foi concluído (El Sayed *et al* 2005, Degraeve *et al* 2001, Luchtan *et al* 2004).

Baseado na complexidade estrutural da população de *T.cruzi* torna-se importante caracterizar diferenças entre isolados de distintos padrões patogênicos, definir marcadores protéicos em diferentes estágios evolutivos e em condições metabólicas de crescimento específicas. A proposta se volta para a identificação de fatores do parasito que estejam envolvidos na patogenicidade e na relação hospedeiro humano- *T.cruzi*.

3 - Invasão celular

A invasão celular pelo *T.cruzi* é uma etapa crucial no estabelecimento da infecção no hospedeiro vertebrado. Tripomastigotas metacíclicos provenientes do vetor triatomíneo e os tripomastigotas sanguíneos, responsáveis pela propagação da infecção no hospedeiro vertebrado, são as principais formas de *T.cruzi* capazes de invadir células fagocíticas e não fagocíticas. Além disso, amastigotas também podem invadir células (Ley *et al.*, 1988; Mortara, 1991). Estudos realizados com formas do parasito geradas em cultura têm contribuído para o esclarecimento dos diversos aspectos do processo de invasão celular. Diversos são os tipos celulares que podem ser infectados por *T.cruzi*. Além dos tipos celulares alvos predominantes em mamíferos, como células musculares e nervosas, *in vitro* o parasito invade células como fibroblastos, células epiteliais e endoteliais (Piras *et al.*, 1983; Schenkman *et al.*, 1988a; Morris *et al.*, 1988).

Segundo estudos com tripomastigotas metacíclicos de cultura axênica e com tripomastigotas de cultura de tecido (TCT), a invasão celular pelo *T.cruzi* é um processo de várias etapas, como a adesão dos parasitos à célula hospedeira através de moléculas de superfície de ambas as células, ativação de cascatas de sinalização que leva ao aumento da concentração intracelular de cálcio (Ca^{+2}) tanto no parasito como na célula hospedeira, e conseqüente entrada do parasito (Docampo *et al.*, 1996; Burleigh e Andrews, 1998; Yoshida, 2006). Na invasão celular por *T.cruzi* participam ainda moléculas do parasito que são secretadas.

3.1- Moléculas de superfície do *T.cruzi* envolvidas na invasão celular

As proteínas de superfície estão diretamente envolvidas no reconhecimento celular e penetração, podendo funcionar como importantes antígenos que elicitam a resposta imune humoral e celular (Zingales & Colli 1985, Giovanni-de-Simone *et al* 1988, Souto-Padrón *et al* 1990). Podem ainda desempenhar o papel de receptores celulares, envolvidos com a transdução de sinais externos para o interior da célula (Berridge 1985, Monteiro *et al* 2007). Estudos com diferentes tripanosomatídeos, demonstram que certas proteínas estão associadas com a infectividade, crescimento e diferenciação celular (Ilgoutz & McConville 2001). Glicoproteínas, glicolipídios, glicosaminoglicanos e âncoras glicosilfosfatidilinositol são moléculas contendo carboidratos, que usualmente recobrem a superfície de células, sendo o domínio carboidrato (oligossacarídeo ou glicana) considerado um modulador ou mediador de mecanismos envolvidos em interações célula-célula e molécula-célula; e, também, em processos de interação entre parasitos e as células hospedeiras.

3.1.1- Glicoproteínas

Diversas glicoproteínas de superfície de formas metacíclicas do *T.cruzi* estão envolvidas na interação com a célula hospedeira. Entre essas moléculas estão gp82, gp90 e gp35/50 (Yoshida *et al.*, 1989; Ramirez *et al.*, 1993; Ruiz *et al.* 1993), que se ligam à célula hospedeira de maneira receptor-dependente, sendo que a gp82 e a gp35/50 desencadeiam a cascata de sinalização, que leva à mobilização de Ca²⁺ intracelular, tanto no parasito quanto na célula alvo (Ruiz *et al.*, 1998, Yoshida *et al.*, 2000), enquanto a gp90 aparentemente não tem atividade sinalizadora de Ca²⁺ (Ruiz *et al.*, 1998).

3.1.2 - Gp82

Gp82 é uma glicoproteína identificada pelo anticorpo monoclonal 3F6 como sendo específica de tripomastigotas metacíclicos (Teixeira e Yoshida, 1986). Ela contém oligossacarídeos N-ligados (Ramirez *et al.*, 1993) e é ancorada à membrana plasmática via glicosilfosfatidilinositol (GPI) (Almeida e Heise, 1993). Estudos mostram que cepas distintas de *T.cruzi* apresentam expressão diferenciada de gp82.

Embora a gp82 esteja expressa em tripomastigotas metacíclicos das cepas CL e G, as indicações são de que ela desempenha um papel essencial na invasão celular da cepa CL, enquanto a infectividade da cepa G depende predominantemente das moléculas do tipo mucina gp35/90 (Yoshida, 2006).

Um achado importante sobre a gp82 é que em camundongos, há evidências de que ela está envolvida no estabelecimento da infecção por *T.cruzi* por via oral (Neira *et al.*, 2003, Cortez *et al.*, 2006a). Além da capacidade de adesão à célula hospedeira, a gp82 possui outra propriedade que é relevante na infecção oral, a de ligar-se à mucina gástrica (Staquicini *et al.*, 2010).

Estudando tripomastigotas metacíclicos do clone CL-14, Atayde *et al.* (2004), verificaram que esses expressam baixos níveis de gp82 na superfície, quando comparados à cepa CL e, correspondentemente, têm capacidade menor de invadir células. Quanto à expressão de gp90 ou das moléculas do tipo mucina gp35/50, as formas metacíclicas do clone CL-14 e da cepa CL foram indistinguíveis. A ligação da gp82 à célula hospedeira desencadeia a ativação de vias de transdução de sinal, com aumento na concentração de Ca^{+2} intracelular, tanto no parasito quanto na célula hospedeira (Ruiz *et al.*, 1998, Yoshida, *et al.*, 2000). Em ambas as células, alguns componentes dessas vias foram identificados. O papel da gp82 na infecção oral tem sido reforçado pelos estudos com tripomastigotas metacíclicos das cepas de *T.cruzi* deficientes na expressão de gp82, mas que apresentam perfil de moléculas de superfície similar à da cepa CL. Quando administradas oralmente em camundongos, as cepas gp82- deficientes produzem parasitemias muito menores que a cepa CL (Cortez *et al.*, 2003).

Entretanto, a capacidade das cepas gp82-deficientes em invadir a célula hospedeira *in vitro* é similar à da cepa CL. Foi observado que os tripomastigotas metacíclicos das cepas deficientes em gp82 expressam uma glicoproteína de superfície de 30 kDa (gp30), que é reconhecida pelo anticorpo monoclonal 3F6, e compartilha com gp82 a propriedade de induzir sinal de Ca^{+2} na célula hospedeira. Contudo, a capacidade de adesão à mucina gástrica da gp30 é muito menor que a da gp82 (Cortez *et al.*, 2003).

Isso explicaria a discrepância entre infectividade *in vivo* e *in vitro* das cepas gp82- deficientes. Corroborando a importância da gp82, na presença de alta concentração de mucina gástrica, para mimetizar a condição *in vivo*, a invasão celular das cepas gp82- deficientes foi reduzida em comparação ao controle, ao contrário da

cepa CL cuja infectividade permaneceu inalterada (Cortez *et al.*, 2003). Conjuntamente, esses achados indicam que a invasão da célula hospedeira por tripomastigotas metacíclicos pode ser mediada tanto por gp82 como por gp30, mas a eficiente infecção da mucosa gástrica depende da expressão de gp82.

Estudos realizados com tripomastigotas metacíclicos deficientes em gp82 mostram que eles expressam uma glicoproteína de superfície de 30 kDa (gp30), que é reconhecida pelo anticorpo monoclonal 3F6, e compartilha com gp82 a propriedade de induzir sinal de Ca²⁺ na célula hospedeira. Contudo, a capacidade de adesão à mucina gástrica da gp30 é muito menor que a da gp82 (Cortez *et al.*, 2003).

3.1.3 - Gp35/50

As mucinas gp35/50 são expressas em formas metacíclicas e em epimastigotas de *T. cruzi* (Yoshida, 2006), sendo codificadas por uma grande família multigênica (Di Noia *et al.*, 1998). Elas são detectadas em gel de SDS-PAGE como bandas duplas ou triplas, apresentando polimorfismo entre as cepas (Mortara *et al.*, 1992). Embora todas as cepas de *T. cruzi* expressem gp35/50, as mucinas do grupo *T. cruzi* I diferem daquelas do grupo II pela presença de resíduos de galactofuranose, que fazem parte do epitopo para o anticorpo monoclonal 10D8 (Yoshida, 2006).

Diferentemente da cepa CL, os tripomastigotas metacíclicos da cepa G, que são pouco infectantes *in vivo* e *in vitro* (Yoshida, 2006), utilizam glicoproteínas do tipo mucina, gp35/50, para invasão celular (Yoshida *et al.*, 1989). As mucinas gp35/50 são expressas em formas metacíclicas e em epimastigotas de todas as cepas de *T. cruzi* examinadas (Yoshida, 2006), sendo codificadas por uma grande família multigênica (Di Noia *et al.*, 1998). Elas são detectadas em gel de SDS-PAGE como bandas duplas ou triplas, apresentando polimorfismo entre as cepas (Mortara *et al.*, 1992).

Embora todas as cepas de *T. cruzi* expressem gp35/50, as mucinas do grupo *T. cruzi* I diferem daquelas do grupo II pela presença de resíduos de galactofuranose, que fazem parte do epitopo para o anticorpo monoclonal 10D8 (Yoshida, 2006). Do mesmo modo que a gp82, as mucinas das formas metacíclicas da cepa G têm atividade sinalizadora dual e, ao ligar-se à célula hospedeira, induzem aumento na concentração de Ca⁺² intracelular em ambas as células; no entanto a intensidade do sinal é menor que a da gp82, o que poderia explicar a menor infectividade em comparação à cepa CL (Ruiz *et al.*, 1998).

3.1.4 - Gp90

Entre os fatores responsáveis pela baixa infectividade de tripomastigotas metacíclicos de algumas cepas está a glicoproteína de superfície gp90, específica dessas formas. A gp90 expressa em altos níveis atua como regulador negativo da invasão celular (Málaga e Yoshida, 2001). Em estudo realizado com duas cepas de *T.cruzi* derivadas de pacientes chagásicos na fase aguda foi mostrado que a gp90 modula negativamente a invasão do epitélio da mucosa gástrica em camundongos infectados por via oral (Cortez *et al.*, 2006a). Entre os fatores responsáveis pela baixa infectividade de tripomastigotas metacíclicos da cepa G está a glicoproteína de superfície gp90, específica dessas formas. A gp90 expressa em altos níveis na cepa G e em baixos níveis na cepa CL, atua como regulador negativo da invasão celular (Málaga e Yoshida, 2001).

No que se refere às moléculas secretadas por tripomastigotas metacíclicos, Baida *et al.* (2006) observaram que a proteína rica em serina, alanina e prolina (SAP), tem participação na invasão celular da cepa CL, mas não na cepa G que expressa essa molécula em níveis menores. Quanto à cruzipaina, a cisteína protease majoritária do *T.cruzi*, o seu papel na entrada de formas metacíclicas na célula hospedeira não tem sido definido.

A maioria dos trabalhos de interação do *T.cruzi* – célula hospedeira tem sido realizado com as cepas Y e CL Brener, pois apresentam alto nível de parasitemia em camundongo e bom desenvolvimento em cultura de tecido. Entretanto, não há relatos de ensaios com isolados silvestres pertencentes ao grupo ZIII. Visando buscar um entendimento do comportamento desses isolados de ZIII (isolados silvestres de *T.cruzi* coletados no estado do Rio de Janeiro) foram realizados pelo nosso grupo, estudos de interação *in vivo* onde os isolados apresentaram perfis diferenciados de infecção. Foi verificado a expressão diferenciada de cruzipaina, protease majoritária deste parasito e que está associada à virulência e a patogenicidade (Gomes *et al.*, 2009), nesses isolados, sugerindo que os mesmos possuam diferenças nas moléculas expressas em suas superfícies. A análise da expressão de uma cisteína-proteinase também foi avaliada em isolados silvestres de *T.cruzi* I e *T.cruzi* II, recém coletadas de mamíferos e triatomíneos (Fampa *et al.*, 2008). O estudo destas moléculas de superfície poderá trazer mais conhecimento, que conseqüentemente poderá auxiliar no desenvolvimento de métodos diagnósticos, vacinas ou terapias direcionadas a cada grupo filogenético de *T.cruzi*.

A heterogenidade do *T. cruzi* também se reflete na capacidade de invadir células de mamífero in vitro, característica que está associada com a expressão diferenciada de glicoproteínas na superfície do parasita e com a ativação de diferentes vias de transdução de sinal dentro do mesmo (Yoshida, 2006). Os estudos com isolados tem tido como principal objetivo a identificação de cepas com diferentes características contribuindo para o conhecimento e registro do perfil destes isolados silvestres, inclusive em regiões ainda não acometidas pela doença. Entretanto, nenhum estudo relacionado às moléculas de superfície foi realizado em isolados de triatomíneos, fato que necessita ser investigado uma vez que estes podem fornecer importantes contribuições para o conhecimento da relação parasito-hospedeiro.

4 – Interação parasito – célula hospedeira

Nas últimas décadas, inúmeros trabalhos têm contribuído de forma significativa no que se refere ao entendimento da interação parasita-hospedeiro na doença de Chagas. Atualmente sabe-se que durante o processo de invasão, componentes celulares tanto do parasita quanto do hospedeiro são extremamente importantes (Burleigh & Woolsey, 2002; Yoshida, 2002). Também foi demonstrado que existem diferenças marcantes no mecanismo de invasão de tripomastigotas metacíclicos quando os mesmos são provenientes de linhagens filogenéticas distintas de *T. cruzi* (Neira *et al.*, 2002).

Sabe-se que durante o processo de invasão, componentes celulares tanto do parasita quanto do hospedeiro estão envolvidos (Burleigh & Woolsey, 2002; Yoshida, 2002). *T. cruzi* é um parasita obrigatoriamente intracelular e invade diferentes tipos de células de mamíferos. Embora diferentes moléculas tenham sido descritas como protagonistas do processo de invasão, as moléculas que deflagram a adesão e penetração de *T. cruzi* não estão bem definidas. Por isso, a elucidação das moléculas envolvidas no processo de reconhecimento entre parasita-célula hospedeira e de extrema importância e continua sendo um ponto importante de investigação. Evidências têm demonstrado que os resíduos de carboidratos na superfície do parasito e da célula hospedeira participam do processo de reconhecimento (Soeiro *et al* 1999, Bonay *et al* 2001). Estudos sobre a superfície celular, abordando os componentes proteicos, lipídicos e glicoproteicos estão fundamentados no importante papel que representa a interação parasita x hospedeiro vertebrado e invertebrado. Segundo De Souza (1999), o glicocálice de *T. cruzi* mostra-se como um revestimento muito delgado nas formas epimastigotas e amastigotas, enquanto

que nas formas tripomastigotas são maisevidentes. A invasão de *T.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 e cols, 1992, Carvalho e cols, 1999, Araujo-Jorge 1999).

De uma forma geral, deve-se considerar que a interação parasita-hospedeiro é o resultado da inter-relação entre célula hospedeira alvo e forma evolutiva em questão, pois não só a forma evolutiva é relevante, mas também a origem filogenética do parasita a qual parece exercer uma forte influência neste processo (Mortara *et al.*, 2005).

Embora os eventos moleculares envolvidos no processo inflamatório induzido pela infecção pelo *T.cruzi* ainda não tenham sido completamente elucidados, diversos estudos têm demonstrado que glicoconjugados presentes na superfície do parasita estão envolvidos neste processo. Estudos sobre a superfície celular, abordando os componentes proteicos, lipídicos e glicoproteicos estão fundamentados no importante papel que representam na interação parasita x hospedeiro vertebrado e invertebrado. A invasão de *T.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, envolvendo glicoconjugados da superfície, os ácidos siálicos e por carboidratos do tipo lectínico. Embora diferentes moléculas tenham sido descritas como protagonistas do processo de invasão, as moléculas que deflagram a adesão e penetração do *T.cruzi* não estão bem definidas em cepas de *T.cruzi* já estabelecidas, sendo escassos os estudos relacionados a isolados silvestres obtidos de triatomíneos.

Diante do exposto nos tópicos acima, os dados da literatura suportam a idéia de que maiores estudos precisam ser realizados tanto nas cepas padrão, quanto em isolados obtidos de hospedeiros vertebrados e de triatomíneos silvestres, pois desta forma poderão ser obtidas informações relevantes sobre como estes parasitos estão circulando na natureza. Assim, poderá ser estabelecido um registro sobre o comportamento destes isolados silvestres frente a ação de drogas, utilizadas no tratamento de pacientes chagásicos, uma vez que cada área pode apresentar um tipo de parasito com carga antigênica diferenciada, que pode ser responsável pelas diferentes respostas

apresentadas tanto em relação às interações parasito-célula, quanto aos tratamentos aplicados.

Desta forma, a fim de explorar a diversidade das amostras silvestres de *T. cruzi*, esta tese está focada: (i) na avaliação da expressão de glicoproteínas em formas epimastigota e tripomastigotas de isolados provenientes de triatomíneos capturados nos estados do Rio de Janeiro e na região Amazônica e (ii) no papel destas moléculas na interação do parasita com a célula hospedeira.

2 – OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Identificar, por meio de uma análise comparativa, semelhanças ou diferenças entre os isolados e cepas já estabelecidas que possam contribuir para o conhecimento sobre o impacto patogênico do *T. cruzi* em células de mamíferos.

2.2. Objetivos específicos

1. Definir o mapa protéico da forma epimastigota das cepas 3663 e 4167 e isolados silvetres (SMM36 e 98) utilizando a técnica de eletroforese bidimensional.
2. Definir possíveis proteínas diferenciais entre as cepas 3663 e 4167 e os isolados silvetres
3. Caracterização molecular de amostras de *T. cruzi* isoladas de *Triatoma vitticeps* por PCR multiplex;
4. Analisar a expressão de glicoproteínas (Gp 82, Gp 35/50, Gp 90) na superfície destes parasitas;
5. Caracterização biológica “in vitro” através de obtenção de curva de crescimento de amostras de *T. cruzi* isoladas de *Triatoma vitticeps*;
6. Avaliação do perfil de protease e expressão de cruzipaina.

3 - MATERIAL E MÉTODOS

3.1 - Procedência dos parasitas

Neste estudo utilizamos 2 cepas da região Amazônia brasileira e 6 isolados silvestres da Região de Mata Atlântica, no Rio de Janeiro.

As 2 cepas utilizadas de *T. cruzi* isoladas na região da Amazônia brasileira (3663 e 4167) pertencem ao zimodema III. A cepa 3663 foi isolada a partir de *Panstrongylus geniculatus* do distrito de Manaus e a 4167 de *Rhodnius brethesi* coletados na região do Rio Negro, no Município de Barcelos, ambos os municípios no Estado do Amazonas, Brasil (Mendonça *et al.*, 2002) (Tabela I).

As amostras de *T. cruzi* do Rio de Janeiro, foram isoladas de *Triatoma vitticeps* por Gonçalves TCM em 2000, na localidade de Triunfo, 2º distrito do município de Santa Maria Madalena (Figura 5). Naquela ocasião, foram capturados 465 espécimes de *T. vitticeps*: 294 fêmeas, 156 machos e 15 ninfas em cinco áreas diferentes: a área A, localizada a 250 metros de altitude e distante 3,5 Km da sede do distrito, se encontrava muito modificada pelo desmatamento para o cultivo de bananas; a área B, localizada a 130 metros de altitude, distando 4 Km da sede, situada num vale com vegetação preservada (floresta secundária). Estas áreas estão numa distância de 2 Km uma da outra, separadas por uma montanha. A área C, sede do distrito, localizada a 40 metros, está totalmente modificada pela formação de pastos. (Figura 6). Os isolados de *T. cruzi* utilizados neste estudo são provenientes dos triatomíneos capturados nas áreas A (Figura 7). e B (Figura 8) (Tabela I).

Os espécimes de triatomíneos, em cabine de segurança biológica, foram mortos em clorofórmio, imersos em álcool 80%, por alguns segundos e deixados sobre uma gaze estéril para retirar o excesso do álcool. Para a dissecação, foram alfinetados na altura do pronoto e fixados em uma placa de Petri parafinada. Após a retirada das asas, uma incisão foi feita em ambos os lados do abdome, nos conexivos, para a remoção dos tergitos abdominais. Em seguida o tubo digestivo foi retirado e transferido para uma placa de Petri pequena e estéril, contendo solução salina (NaCl 0,85%) antifúngico e antibiótico. O tubo digestivo foi macerado e a solução distribuída da seguinte forma: a) cultivo: transferência de 0,5 mL para dois tubos contendo meio de cultura, NNN (Novy & Mac Neal, 1904; Nicolle, 1908) com fase líquida de meio LIT (Liver Infusion

Tryptose) (Camargo, 1964); b) lâminas: observação a fresco entre lâmina e lamínula ao microscópio óptico, a fim de se verificar a presença de parasito e c) a criopreservação.

Após o isolamento das formas flageladas dos tripanosomatídeos, estas foram expostas a banho de gelo, misturando-se 2ml da cultura em 10% de glicerol estéril. Posterior a uma homogeneização, as amostras foram distribuídas em tubos estéreis próprios para criopreservação (NUNC), em seguida deixados na geladeira, ainda no banho de gelo por 30 minutos e posteriormente no freezer por 45 minutos, e finalmente, mantidos em nitrogênio líquido à -196°. Estas amostras encontram-se depositadas na Coleção de Tripanosomatídeos do Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ. Neste trabalho foram utilizadas cinco destas amostras nomeadas como SMM (SMM10, SMM36, SMM53, SMM88, SMM98). Todas estas cinco amostras foram utilizadas para a caracterização molecular.

Tabela 1: Procedência das amostras de *Trypanosoma cruzi* utilizadas.

Isolado(Amostra)	Área	Hospedeiro	Localidade
SMM10**	A	<i>Triatoma vitticeps</i>	Triunfo (RJ)
SMM53**	A	<i>Triatoma vitticeps</i>	Triunfo (RJ)
SMM88**	A	<i>Triatoma vitticeps</i>	Triunfo (RJ)
SMM36**	B	<i>Triatoma vitticeps</i>	Triunfo (RJ)
SMM98**	A	<i>Triatoma vitticeps</i>	Triunfo (RJ)
3663*	-	<i>Panstrongylus geniculatus</i>	Manaus
4167*	-	<i>Rhodnius brethesi</i>	Barcelos

Adaptado de *Mendonça *et al.*, 2002 e **Santos-Mallet *et al.*, 2008

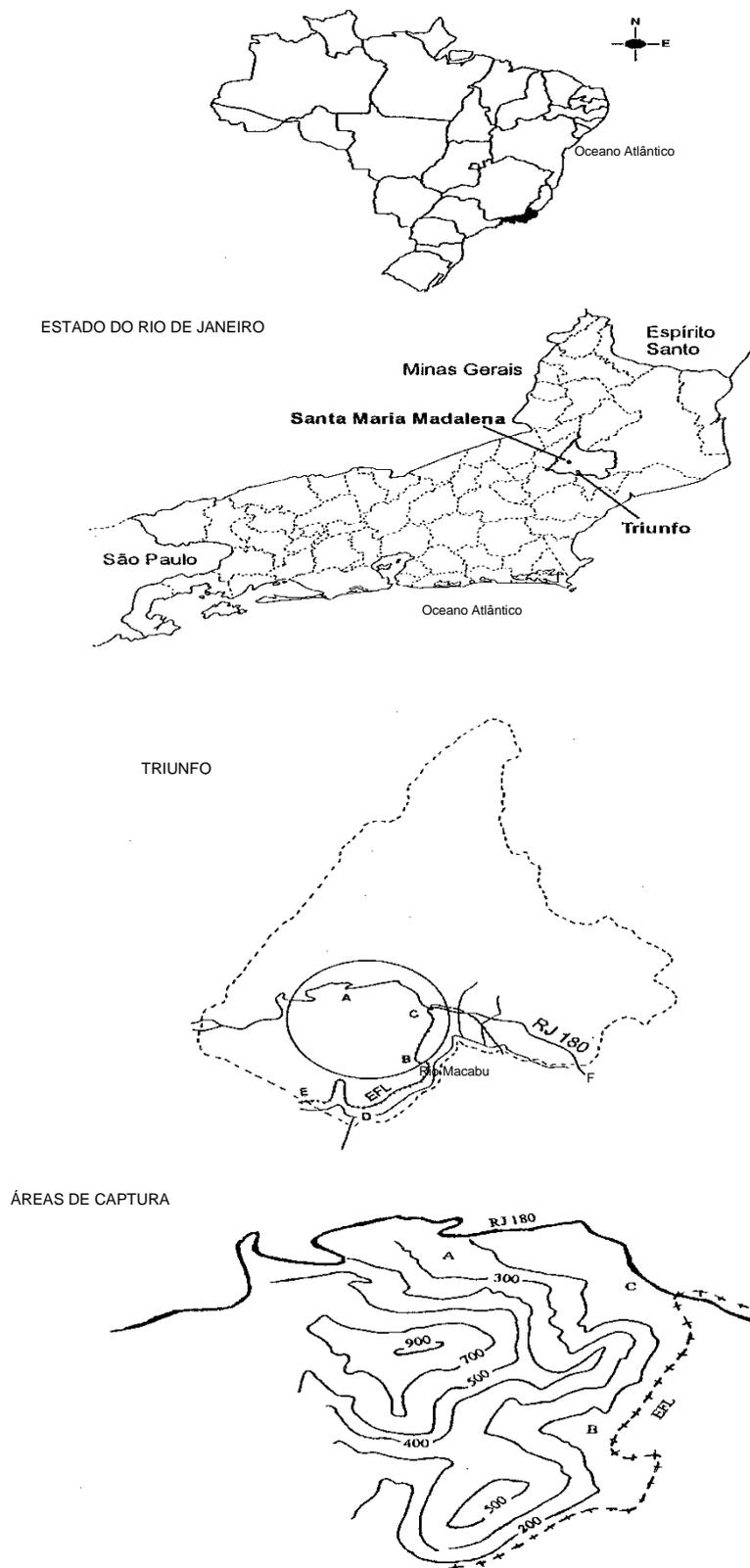


Figura 5: Mapa dos locais de coleta (Gomes *et al.*, 2009)



Figura 6: Vista geral da localidade de Triunfo, localizada no município de Santa Maria Madalena- RJ (Gomes *et al.*, 2009)



Figura 7: Vista geral da área A (Foto: Teresa Cristina M Gonçalves)



Figura 8: Vista geral da área B (Foto: Teresa Cristina M Gonçalves)

3.2 - Cultivo dos isolados

Em todos os experimentos foram utilizadas amostras criopreservadas de acordo com o procedimento descrito acima. As amostras foram retiradas do nitrogênio líquido, e a partir daí crescidas e mantidas em tubos de ensaio com tampa rosqueável contendo meio NNN (Novy & Macneal 1904, Nicole 1908) acrescido de LIT (*Liver Infusion Tryptose*) (Camargo 1964), como fase líquida, suplementado de 30% de soro fetal bovino. Os tubos permaneceram incubados em estufa do tipo BOD (FANEM) a 27,3°C, repicadas periodicamente a intervalos de 14 dias, para manutenção das amostras.

3.2.1 Obtenção de formas epimastigotas e tripomastigotas

(i) Formas epimastigotas foram obtidas após cultivo das amostras criopreservadas em meio LIT (*Liver Infusion Tryptose*) (Camargo 1964), como fase líquida, suplementado de 20% de SFB; (ii) Formas tripomastigotas foram obtidas de sobrenadantes de células Vero após 4 dias de infecção. (iii) Formas tripomastigotas sanguíneas foram obtidas de camundongos Suíços no pico da parasitemia. Todos os

procedimentos com animais experimentais foram aprovados pela Comissão de ética no uso de animais experimentais (CEUA) da FIOCRUZ sob a licença LW-11/09.

3.2.2 Obtenção de formas tripomastigota metacíclicas do *T. cruzi*

Os parasitos foram mantidos em meio LIT, onde se multiplicavam na forma epimastigota e se diferenciavam em tripomastigotas metacíclicas nesse meio. As culturas na fase estacionária, ricas em formas metacíclicas, foram lavadas em tampão salina fosfato com glicose (PSG), pH 8,0, que consistia de 8.09 g/l de Na₂HPO₄, 0.47 g/l de NaH₂PO₄.H₂O, 2,55 g/l de NaCl, 54 g/l de glicose, por centrifugação a 4.000 rpm por cinco minutos. Após duas lavagens, os parasitos em PSG foram colocados sobre uma coluna de cromatografia de troca iônica de dietilaminoetil celulose (DEAE-celulose, Sigma Chemical Co), montada em seringa de 20 ml e equilibrada com PSG, como já descrito (Teixeira e Yoshida, 1986). Os tripomastigotas metacíclicos foram obtidos por eluição com PSG, ficando os epimastigotas retidos no topo da coluna. Após concentrar o material eluído por centrifugação, uma amostra foi retirada, fixada e contada em câmara de Neubauer. As preparações purificadas continham invariavelmente 95-100% de formas metacíclicas.

3.3 – Extração de DNA

Foi utilizado um protocolo baseado no kit comercial para extração de DNA (DNAzol *Invitrogen Life Technologies, Gaithersburg, MD, USA*), (Gibco). Em resumo, culturas de *T. cruzi* (10mL) na fase exponencial de crescimento em meio LIT foram lavadas três vezes por centrifugação em PBS a 2.000 rpm por 10 minutos. Após retirada do sobrenadante, ao *pellet* foi adicionado 1mL de DNAzol, homogeneizando com a pipeta e centrifugando a 8900 rpm durante 10 minutos. Em seguida foi transferido o sobrenadante para tubos novos, adicionando-se 500µl de etanol absoluto para precipitar o DNA, centrifugando a 140.000 rpm por 10 minutos. Após desprezar o sobrenadante, lavar o tubo com 1 mL de etanol 75%, centrifugando a 140.000 rpm por 10 minutos. Por fim, desprezou-se o sobrenadante, deixando os tubos secando.

Após secagem dos tubos, foi adicionado 20µl de H₂O milli-Q estéril em cada amostra.

3.4 – Quantificação de DNA

No sentido de estimar a concentração de DNA (Moore *et al.*, 1997), cada amostra extraída foi diluída (1:100) em H₂O milli-Q estéril, num tubo cônico de 1,5 ml (tipo EPPENDORF), submetida a agitação (RETSCH MIXER) para homogeneização da solução, sendo depois colocada em cuvette de quartzo e submetida a leitura da densidade óptica a 260 nm (DO260), para avaliar a quantidade de DNA, num quantificador automático GeneQuant II (RNA/DNA CALCULATOR, AMERSHAM BIOSCIENCES). (Moore *et al.*, 1997).

3.5 – Reação em cadeia da polimerase (PCR)

3.5.1 – Variabilidade da região intergênica do gene de Mini-Exon

A variabilidade da região intergênica do gene do mini-exon das amostras foi estudada através da técnica do PCR Multiplex, utilizando-se os iniciadores *TcI*, *TcII*, *ZIII*, *TR* e *ME* (Fernandes *et al.*, 2001). Estes iniciadores geram um produto de amplificação de 250 pb (*TcII*), 200 pb (*TcI*), 150 pb (*ZIII*) e 100 pb (*T. rangeli*). A reação foi realizada em um volume final para cada amostra de 50 µl contendo 1 µl de DNA molde, 0,3 µl de Taq Gold DNA polimerase, 5 µl de dNTPs, 6 µl de MgCl₂, 5 µl de tampão (Tris-HCl 10mM pH 8,5), 1 µl de cada iniciador (*TcI*, *TcII*, *ZIII*, *Tr* e *ME*), completando o volume final com água MiliQ. A amplificação do fragmento foi realizada nas seguintes condições de temperatura: desnaturação inicial a 94°C/5min, seguido de 5 ciclos (94°C/1min, 50°C/1min para ligação dos iniciadores, 72°C/1min para extensão), seguido de 25 ciclos (94°C/30seg, 55°C/30seg, 72°C/30seg) e uma extensão final a 72°C/5min. Os produtos de digestão foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,5%, submetidos a coloração por Brometo de etídeo.

3.6. Preparação do extrato protéico total solúvel

3.6.1. Extração das proteínas solúveis

Formas epimastigotas (1x10⁹) cultivadas em meio LIT foram lavadas com PBS e lisadas através de 4 ciclos de congelamento (nitrogênio líquido) e descongelamento (37°C) na presença de coquetel de inibidor de proteases (inibidores de serina, cisteína e

calpaína proteases e metaloproteases), Ao final, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 16.000g para obtenção das proteínas solúveis, presentes no sobrenadante.

As proteínas foram precipitadas com 20% de ácido tricloroacético (TCA) e após 10 minutos no gelo, foram centrifugadas por 15 minutos a 16.000g .

Os precipitados resultantes foram lavados três vezes com acetona gelada acrescida de 1% trietanolamina (TEA) e centrifugados como descrito anteriormente. Os precipitados resultantes foram ressuspensos em tampão contendo uréia 8M; CHAPS 2%; DTT 20 mM (Tampão para focalização isoeletrica– IEF), alicotados e armazenados a -20°C.

3.6.2. Dosagem da concentração de proteínas no sobrenadante – Método RCDC *Protein Assay* (BIO RAD)

As proteínas foram quantificadas através do método RCDC da Bio-Rad, conforme as instruções do fabricante, utilizando como padrão albumina de soro bovino (BSA). Este método é adaptado do protocolo de Lowry (1951), sendo compatível tanto para reagentes redutores (RC) quanto detergentes (DC). A linearidade do método é de 0,2-1,5mg/ml e sua leitura foi efetuada em espectrofotômetro no comprimento de onda de 750nm com estabilidade de 1 hora.

Inicialmente partiu-se de um volume de 25µl tanto para o padrão quanto para as amostras, ambos em tampão para focalização isoeletrica (IEF). Para a etapa de precipitação foi adicionado 125 µl do reagente RC I em todas as amostras e as mesmas foram mantidas em incubação a temperatura ambiente por 1 minutos. Em seguida, foi adicionado 125 µl do reagente DC II e todas as amostras foram centrifugadas por 16.000 g durante 5 minutos, e o sobrenadante resultante foi descartado. Foi adicionado 127 µl do reagente A' (preparado no momento do ensaio: para cada 250 µl do reagente A DC foi adicionado 5 µl do reagente S DC) e as amostras foram incubadas durante 5 minutos à temperatura ambiente. Posteriormente, foi adicionado 1ml do reagente B DC e as amostras foram incubadas por 15 minutos à temperatura ambiente. Após a incubação, foi feita a leitura da absorbância a 750nm. A concentração foi obtida utilizando a curva padrão de albumina de soro bovino (BSA).

3.7- Eletroforese Bidimensional (2D)

3.7.1 – Focalização isoeétrica (1^a dimensão)

A amostra foi descongelada e foi acrescida à mesma, anfólitos, azul de bromofenol na concentração final de 1% de cada um e tampão IEF, quando necessário, para atingir um volume total de 300µl para géis de 17cm e 125µl para géis de 7cm. A mistura foi homogeneizada e mantida à temperatura ambiente durante 1h, período suficiente para a interação entre amostra e reagentes. Posteriormente, todo o conteúdo foi aplicado na cuba de focalização isoeétrica (BIO RAD *Protein IEF Cell*). Sobre a amostra colocou-se a fita contendo um gel com gradiente de pH imobilizado (*Ready Strip IPG Strip* -BIO RAD). Após 1h de rehidratação da fita de IPG a temperatura ambiente, esta foi coberta com óleo mineral e procedeu-se a rehidratação de forma ativa na cuba de focalização isoeétrica, com uma voltagem de 50 Volts durante 11 horas a 20°C. A focalização isoeétrica foi iniciada imediatamente após a finalização da rehidratação ativa, segundo programa descrito na tabela 2, padronizado pela Plataforma de Eletroforese Bidimensional, coordenada pela Dra Leila de Mendonça Lima do Laboratório de Genômica Funcional e Bioinformática Instituto Oswaldo Cruz – Fiocruz/RJ. Para este protocolo, foram aplicadas amostras de uma única cepa na cuba de focalização isoeétrica, uma vez que já havia sido observado que a utilização de amostras de espécies ou cepas diferentes na mesma cuba não propiciava mapas protéicos com boa resolução. Ao final da primeira dimensão, as fitas podem ser armazenadas a -20°C por tempo indeterminado.

Tabela 2: Programa utilizado para a Focalização isoeétrica (fitas de 7 e 17 cm).

Géis de 7 cm			
	Voltagem	Gradiente	Tempo
Rehidratação	50 V		11h
Passo 1	250 V	Linear	15 minutos
Passo 2	4000 V	Linear	2 h
Passo 3	4000 V	Rápido	15.000 V/h (Impregnação por Prata)
Passo 4	500 V	Rápido	<i>Hold</i>

Géis de 17 cm			
	Voltagem	Gradiente	Tempo
Rehidratação	50 V		11h
Passo 1	250 V	Linear	20 minutos
Passo 2	10000 V	Linear	2:30 h
Passo 3	10000 V	Rápido	60000 V/h (Impregnação por Prata) 90000 V/h (coloração por Coomassie Blue – G250)
Passo 4	500 V	Rápido	<i>Hold</i>

3.7.2. Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS (2^a dimensão)

As fitas de IPG foram equilibradas com tampão contendo uréia 6 M, SDS 20%, tampão Tris/HCl 1,5 M pH 8,8, Glicerol 50% mais DTT 130mM por 10 minutos para reduzir as pontes dissulfetos. Cada fita foi posicionada no suporte específico com o gel voltado para cima. Posteriormente, eliminou-se o tampão anterior e foi adicionado o mesmo tampão contendo iodoacetamina 125 mM para alquilar os grupos sulfidril. As fitas foram mantidas nesta solução por 10 minutos à temperatura ambiente, sob leve agitação e depois lavada em tampão Laemli (Tris base 24,6 mM, Glicina 192 mM e SDS 3,48 mM). A fita, uma vez equilibrada, foi encaixada cuidadosamente no gel preparativo SDS-PAGE 12% (Tris – HCl 0,375 M pH 8,8, 12% da solução de 30% acrilamida / 0,8% bisacrilamida, 0,1% SDS, 0,1% APS e 0,01% TEMED). Os géis foram submetidos à corrida eletroforética por aproximadamente 1 h a 200mA (géis 7cm) ou 1 h a 20 mA e posteriormente a 40 mA (géis 17cm). Os géis foram revelados por impregnação por prata ou por Coomassie Blue G-250.

3.8. Métodos de detecção das proteínas no gel

3.8.1. Coomassie Blue G-250

Neste método de revelação, o Coomassie Blue G-250 forma microprecipitados em meio ácido contendo sulfato de amônio. É um método bastante sensível, sendo capaz de revelar até 0,2 µg de proteína (em cada *spot*). A coloração compreende três etapas: fixação das proteínas, lavagem para retirada dos interferentes e a revelação das proteínas por Coomassie Blue G-250 (adaptado de Nehoff *et al.*, 1988) (anexo 7).

3.9. Análise e identificação das proteínas

3.9.1. Obtenção e análise das imagens dos géis em um formato digital

Para obtenção das imagens dos géis em um formato digital, foi utilizado o densitômetro *GS-800 Calibrated Densitometer* (BIO-RAD). As análises foram realizadas com a utilização do programa PDQuest™ (BIO-RAD). Para as análises comparativas entre as imagens obtidas, foram realizadas as seguintes etapas:

- (i) escolha de um gel *master* (imagem virtual que irá conter todos os *spots* de todos os géis utilizados na análise);
- (ii) escolha de *spots* de referência (*spots* que estejam presentes em todos os géis a serem analisados),
- (iii) alinhamento dos mesmos entre os diferentes géis 2D;
- (iv) detecção dos *spots*;
- (v) pareamento automático entre os *spots* dos diferentes géis 2D;
- (vi) normalização das imagens
- (vii) identificação de *spots* expressos diferencialmente.

Neste trabalho, foram feitas análises provenientes de comparações de três experimentos independentes. Foram realizadas análises de reprodutibilidade utilizando parâmetros do programa que sobrepunham às imagens obtidas de diferentes experimentos provenientes da mesma amostra. Além disso, também foram feitas análises observando expressão qualitativa e/ou quantitativamente diferentes entre as cepas em estudo

3.9.2. Retirada e processamento dos *spots*

Após as análises dos géis, os *spots* de interesse foram retirados do gel e processados para serem analisados pelo espectrômetro de massa. Nesta etapa, é fundamental a limpeza do ambiente e o cuidado na manipulação das amostras, pois a contaminação por queratina é um problema relativamente comum e deve ser evitado. Por isso, o uso de luvas, preferencialmente sem talco, jalecos, máscaras e touca é de extrema importância.

Os *spots* foram transferidos para tubos siliconizados novos previamente lavados em água milliQ/ metanol/ água milliQ. Todos os *spots* eram provenientes de géis 2D revelados por Coomassie Blue G-250, devido à compatibilidade deste método com o espectrômetro de massa. O material foi armazenado a -20°C até o seu processamento.

Inicialmente foi realizada a descoloração dos *spots*, adicionando a cada tubo contendo um *spot* coletado, $400\mu\text{L}$ de uma solução de acetonitrila (ACN) 50% (p/v) / bicarbonato de amônio 25 mM pH 8,0. Foram feitas três lavagens de 15 minutos cada, em agitação contínua até a descoloração total do *spot*.

O descorante foi removido e então, adicionado a cada tubo $200\mu\text{L}$ de ACN 100% (para desidratação), permanecendo por 5 minutos sob agitação. O procedimento foi repetido até que o *spot* (gel) estivesse opaco. A etapa seguinte promovia a secagem do *spot* no *Speed Vac* durante 15 minutos. Posteriormente, foi realizada a etapa de tripsinização, adicionando-se $10\mu\text{L}$ da solução de tripsina $20\text{ng}/\mu\text{L}$, de forma a cobrir completamente o *spot* (gel). Os tubos foram mantidos no gelo por 10 minutos, para que a tripsina penetrasse no gel. Após o término deste tempo, todo o excesso de tripsina foi removido e $20\mu\text{L}$ de solução de bicarbonato de amônio 50 mM foi adicionado, iniciando a digestão. Os tubos foram incubados por uma noite, à 37°C (16-24 h).

A etapa seguinte consistiu na extração e concentração dos peptídeos gerados pela tripsinização. Para isso, transferiu-se os $20\mu\text{L}$ de solução de bicarbonato de amônio 50mM do tubo contendo o *spot* para um tubo limpo. Adicionou-se ao tubo com o *spot* $30\mu\text{L}$ de ácido fórmico 5% (v/v) / ACN 50% (v/v), de modo a extrair os peptídeos. Esta solução permaneceu no tubo durante 30 minutos, sob agitação constante, sendo transferida posteriormente para o tubo contendo os $20\mu\text{L}$ previamente coletados.

A extração foi repetida mais uma vez e todos os extratos foram combinados em um mesmo tubo, com um volume final de aproximadamente $60\mu\text{L}$. A amostra foi então

concentrada até 20 μ L por cerca de 1 h no *Speed Vac*. Os peptídeos foram armazenados à -20°C para posterior análise por espectrometria de massa (León *et al.*,2007)

3.9.3. Análise dos *spots* por espectrometria de massa e identificação dos peptídeos

Após o processamento dos *spots*, as amostras foram aplicadas em uma resina de fase reversa empacotada em uma ponteira de micropipeta (*ZipTip*TM C18), com o objetivo de retirar sais e outros interferentes, visando a análise por espectrometria de massa. Previamente à aplicação da amostra, o *ZipTip* foi umidecido em 100 % ACN e equilibrado com uma solução de TFA 0,1 % (ácido trifluoracético). A adsorção de peptídeos à resina foi feita com sucessivas aspirações da amostra. Uma vez adsorvidos, os peptídeos foram lavados com 0,1% TFA em água milliQ e finalmente eluídos em um novo tubo utilizando uma solução de 0,1 % TFA / 50 % ACN.

Depois de concentradas, as amostras foram co-cristalizadas com uma matriz de ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico em uma placa de aço inox especialmente utilizada para a análise no espectrômetro de massa. Foram misturadas quantidades iguais de amostra e matriz (0,5 μ L: 0,5 μ L), estando a matriz a uma concentração de 5,0 mg/ mL diluída em solução de 50% ACN / 0,3% TFA em água milliQ (León *et al.*,2007).

Uma vez preparada a placa, contendo de 1 a 100 amostras, esta foi colocada no espectrômetro de massa MALDI TOF-TOF 4700 *Proteomics Analyser*. A determinação da massa dos diferentes peptídeos, obtidos pela proteólise de cada um dos *spots* coletados nos diferentes géis 2D, foi feita automaticamente pelo equipamento e após a conclusão, os resultados foram capturados através do programa integrado ao equipamento (4000 *Explorer Remote Client*) e retirados os picos de contaminantes, caso existissem. Os mesmos foram transferidos para um programa de busca, visando à identificação das proteínas. Foram utilizados dois programas de busca, *Mascot* e *MS-Fit*, ambos disponíveis *on-line* nos endereços: http://www.matrixscience.com/cgi/search_form.pl?FORMVER=2&SEARCH=MIS e <http://prospector.ucsf.edu/ucsfhtml4.0/msfit.htm>, respectivamente. Cada espectro obtido foi avaliado pelos dois programas paralelamente.

Para o programa <i>Mascot</i> foram utilizados parâmetros de busca descritos previamente no programa (<i>default</i>), onde foram efetuadas as seguintes modificações <i>Taxonomy: All entries</i>
<i>Type of search: MS/MS Ion search</i>
<i>Enzyme: Trypsin</i>
<i>Fixed modifications: Carbamidomethyl (C)</i>
<i>Variable modifications: Oxidation (M), Phospho (ST), Pyro_glu (N-term E)</i>
<i>Peptide tol. ± 0.5 Da MS/MS tol. ± 0.5 Da</i>
<i>Peptide charge +1 Da</i>
<i>Mass values: Monoisotopic</i>
<i>Instrument : Maldi TOF-TOF</i>
<i>Overview: Report top 50 hits</i>

3.10. Detecção de glicoproteínas na superfície dos isolados silvestres para análise por FACS

Para a análise por FACS após as incubações, as células foram lavadas três vezes em PBS e analisadas em citômetro de fluxo (Epics Elite, Counter Electronics) (Matta e cols 1999).

Para a detecção de glicoproteínas por imunofluorescência indireta utilizamos os anticorpos monoclonais gerados em camundongos: 3F6, que reconhece uma glicoproteína de massa molecular de 82 kDa (gp82) ou gp30 de metacíclicos, 1G7 e 5E7, que reconhecem a gp90 de tripomastigotas metacíclicos (Teixeira e Yoshida, 1986), 2B10 e 10D8, que são dirigidos contra glicoproteínas do tipo mucina gp35/50 em metacíclicos e epimastigotas (Yoshida *et al.*, 1989; Mortara *et al.*, 1992).

3.11. Interação *T. cruzi*-célula hospedeira

Para avaliar a capacidade de infecção dos isolados silvestres provenientes do Rio de Janeiro formas tripomastigotas de *T. cruzi* provenientes de cultivo celular e tripomastigotas metacíclicas foram utilizadas nos ensaios de interação com cardiomiócitos e células Vero. A interação *T. cruzi*-célula alvo foi realizada na proporção de 20:1 parasita/ célula hospedeira e a cinética de infecção foi interrompida após 2, 4, 6, 24, 48 e 72h. As culturas serão fixadas com Bouin e o percentual de

infecção será determinado após coloração pelo Giemsa e quantificação randômica de 400 células ao microscópio de luz.

3.12. Culturas de células de mamíferos

3.12.1 Cultura primária de células musculares cardíacas

Os cardiomiócitos foram obtidos de embriões de camundongos com 18 dias (Meirelles e cols, 1986). O coração foi fragmentado e dissociado por tratamento enzimático, utilizando-se tripsina 0,025% e colagenase 0,02%. As células isoladas foram semeadas em placas de cultura previamente revestidas com 0,1% gelatina, cultivadas em DMEM acrescido de 5% SFB, 2% extrato embrionário, 2,5mM CaCl₂, 1mM de L-glutamina e antibióticos e mantidas a 37°C em 5% CO₂. Todos os protocolos que envolvem o manuseio de animais experimentais foram aprovados pela CEUA (registro LW-11/09).

3.13. Anticorpos monoclonais

Utilizamos os seguintes anticorpos monoclonais: 3F6, que reconhece uma glicoproteína de massa molecular de 82 kDa (gp82), 1G7 e 5E7, que reconhecem a gp90 (Teixeira e Yoshida, 1986), 2B10 e 10D8, que são dirigidos contra glicoproteínas do tipo mucina gp35/50, que são visualizadas geralmente como bandas duplas (Yoshida *et al.*, 1989; Mortara *et al.*, 1992).

3.14. SDS-PAGE e “Western blot”

Para análise da expressão de moléculas de tripomastigotas metacíclicos por imunodeteccção foram feitos extratos de 3×10^7 parasitos em tampão de lise contendo 1% do detergente Nonidet P-40 (NP-40), na presença de inibidores de proteases (PMSF 1mM, iodoacetamida 1 mM), que foram então centrifugados a 13.000 rpm durante 10 minutos. À fração solúvel (sobrenadante) foi adicionado tampão de amostra (62 mM de Tris pH 6,8, 10% de glicerol, 2% de SDS (dodecilsulfato de sódio), 5% de 2-mercaptoetanol e 0,01% de azul de bromofenol). As amostras foram fervidas e separadas por eletroforese em gel de 10% de poliacrilamida com SDS (SDS-PAGE).

Após a eletroforese, as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose (Hybond-ECL Nitrocellulose membrane; Amersham Biosciences) em tampão de transferência contendo Trizma base 35 mM, glicina 192 mM e 20% de metanol por, no mínimo, 2 horas a 200 mA. As proteínas e os marcadores de peso molecular (low molecular-weight range; Protein mixture; Amersham Biosciences) foram visualizados por coloração com 0,1% de Ponceau-S em 10% de ácido acético, para verificar a eficiência na transferência. A membrana foi bloqueada com 7,5% de leite desnatado (Molico) em PBS (PBS-leite) por 1 hora, seguida de incubação com o anticorpo primário de interesse diluído em PBS-leite por uma hora, 3 lavagens por 15 minutos em PBS contendo 0,05% de Tween-20 incubação com o anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase por 1 hora, e 3 lavagens em PBS-Tween-20. Todas as etapas foram feitas à temperatura ambiente, sob agitação constante. A membrana foi então revelada por quimioluminescência com reagente de detecção (ECL Western blotting; Amersham Biosciences) e filme (Hyperfilm-MP; Amersham Biosciences) seguida de incubação da membrana com solução contendo 0,2 mg/ml de diaminobenzidina (DAB) e H₂O₂ (1:1000 de uma solução 30%).

4.15. Detecção de atividade de protease

Para verificar atividade de protease em tripomastigotas, 3×10^7 parasitos foram lisados em solução contendo 0,4% de Triton X-100 em PBS e a esse extrato total foi adicionado tampão de amostra, sem 2-mercaptoetanol. As amostras foram então aplicadas, sem ferver, em gel de 10% de poliacrilamida (SDS-PAGE) co-polimerizado com 0,05% de gelatina como substrato. A eletroforese foi feita em condições não denaturantes. Após eletroforese o gel foi lavado por duas vezes (30 minutos cada) em solução contendo 2,5% de Triton X-100 em tampão acetato de sódio 0,1 M, pH 6,0, para remover o SDS, e incubado por pelo menos 12 horas em tampão acetato de sódio sem detergente. O gel foi corado com Coomassie blue R250 para visualização das bandas brancas (degradadas) em gel azul.

4 – RESULTADOS

4.1 Curvas de Crescimento

As curvas de crescimento das cepas 3663 e 4167 e dos isolados SMM10, 36, 53, 88, 98 foram realizadas em meio LIT em triplicata para cada cepa. As médias e os desvios padrão correspondentes encontram-se descritos na Tabela 3. O crescimento máximo em meio LIT das amostras analisadas foi observado no 4º dia para a amostra SMM10 (45.000 células/ μ l), no 7º dia para a SMM53 (52.750 células/ μ l), no 10º dia para as amostras SMM88 (33.125 células/ μ l) e no 20º dia para as amostras SMM36 (54.375 células/ μ l) e SMM98 (44.000 células/ μ l). As curvas de crescimento das cepas 4167 e 3663 apresentaram a fase exponencial entre o 4º e 10º dia, respectivamente. (Gráfico 1). Neste período, os parasitos foram coletados para o procedimento de extração de proteínas solúveis.

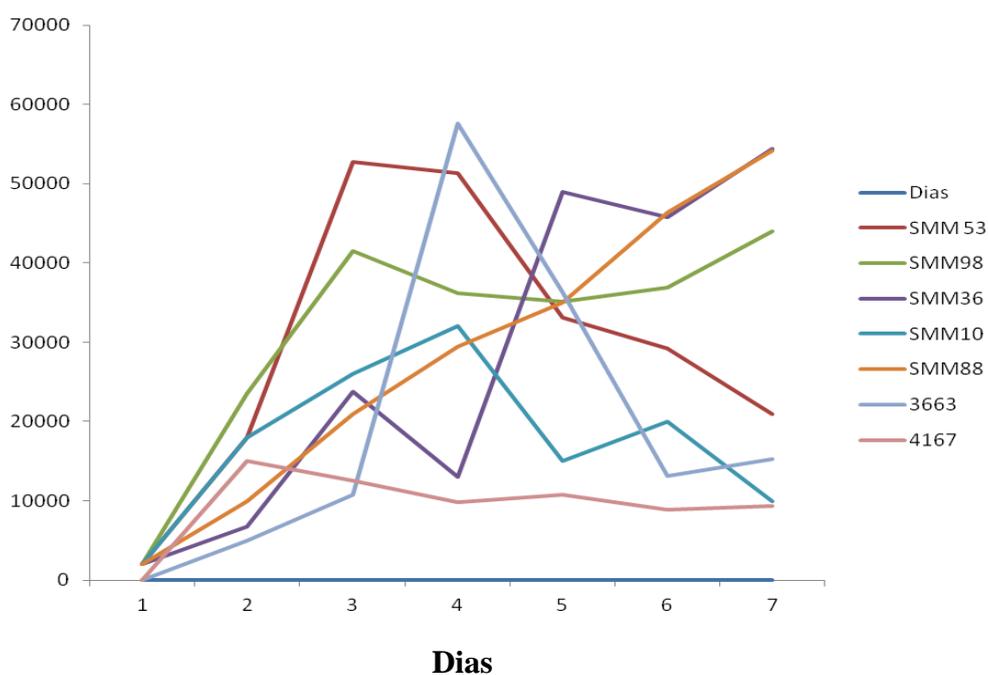


Gráfico 1: Curva de crescimento dos isolados silvestres de *Trypanosoma cruzi* obtidos no Estado do Rio de Janeiro.

Tabela 3: Médias e desvios padrão dos resultados obtidos em três curvas de crescimento

Cepas/Isolados	Dias de contagem						
	0	4	7	10	13	17	20
3663	0,5	5,25±0,25	10,75±0,66	57,58±8,65	36,33±3,21	13,08±2,00	15,25±0,66
4167	0,5	17,5±1,32	12,5±0,5	9,08±1,01	10,83±1,01	8,83±0,52	9,33±2,27
SMM10	0,5	18,8±1,08	26,0±0,88	32,2±1,98	15,1±0,49	20,2±0,98	10,0±1,03
SMM36	0,5	6,78±2,06	23,7±1,01	13,4±1,64	49,5±0,97	45,7±0,34	54,3±1,88
SMM53	0,5	18,4±1,46	52,7±0,59	51,3±0,87	33,1±1,08	29,2±1,52	21,0±0,87
SMM88	0,5	10,0±1,57	21,0±0,67	29,4±1,44	35,6±1,01	46,4±1,93	54,2±1,46
SMM98	0,5	23,5±1,86	41,5±1,37	36,2±0,57	35,1±0,29	36,8±1,31	44,1±0,5

4.2. Variabilidade da região intergênica do gene de Mini-Exon

Aproximadamente 50ng de DNA genômico obtidos dos isolados silvestres de *Triatoma vitticeps* (SMM10, SMM36, SMM53, SMM88, SMM98) e das cepas 3663 e 4167, foram submetidos a amplificação do segmento do espaçador não-transcrito do gene de mini-exon de *T. cruzi* (Figuras 9 e 10). Foram utilizados como controles o DNA genômico das cepas Dm28c (caracterizada como *T. cruzi* I), CL Brener (caracterizada como *T. cruzi* II), JJ (pertencente ao ZIII) e cepa H14 de *Trypanossoma rangeli*. Esta tipagem foi realizada em triplicata, a fim de confirmar os resultados obtidos. Esta tipagem foi realizada em três momentos diferentes do desenvolvimento desta tese e todos os resultados obtidos confirmaram a classificação original dos isolados utilizados.

Todos os isolados de *T. cruzi* analisados apresentaram a banda de 150 pb característica do zimodema III. Ainda na mesma análise todos apresentaram também bandas com uma menor intensidade de ~ 250pb, sugerindo a presença de possíveis misturas nos isolados.

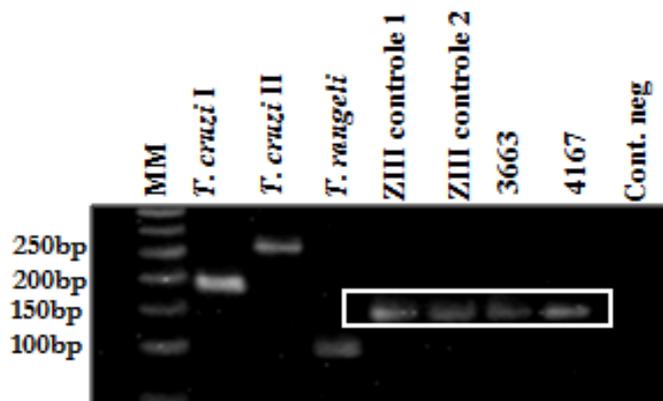


Figura 9: Caracterização molecular das cepas 3663 e 4167 através da análise do segmento do espaçador não-transcrito do gene de mini-exon por eletroforese em gel de agarose a 2% e corado com brometo de etídeo. MM – Marcador molecular (50pb), 1 – amostra controle de *T. cruzi* I (Dm28c), 2 – amostra controle de *T. cruzi* II (CL Brener), 3 – amostra controle de *T. rangeli*, 4 – amostra controle de ZIII (JJ), 5 – amostra de escolha para controle de ZIII (4182), 6 – 3663, 7 – 4167, 8 – controle negativo.

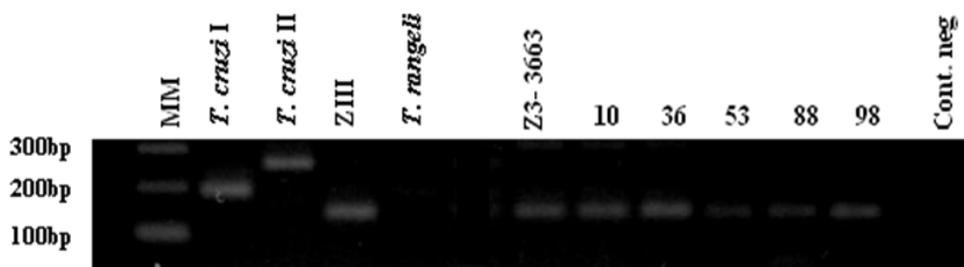


Figura 10:- Caracterização molecular dos isolados SMM10, SMM36, SMM53, SMM88, SMM98 através da análise do segmento do espaçador não-transcrito do gene de mini-exon por eletroforese em gel de agarose a 1,5% e corado em brometo de etídeo. MM – Marcador molecular (100pb), amostra controle de *T. cruzi* I (Dm 28c), amostra controle de *T. cruzi* II (CL Brener), amostra controle de ZIII, amostra controle de *T. rangeli*, amostra de escolha para ZIII -3663, SMM10, SMM36, SMM53, SMM88, SMM98.

4.3. Eletroforese Bidimensional (2D)

Os ensaios de eletroforese bidimensional utilizando extrato protéico solúvel de formas epimastigotas em uma faixa de pH 3-10 mostraram que uma quantidade significativa de proteínas focalizou em uma faixa mais estreita de pH (Figura 11). Comparando os géis 2D das cepas 4167 e 3663 e os isolados SMM98 e 36 foi possível observar diferenças de intensidade do mesmo spot (Figura 12). Quando foi utilizada uma faixa de pH 4-7, observou-se uma resolução melhor destas proteínas e uma considerável diversidade na expressão protéica entre as cepas 3663 e 4167 e os isolados SMM36 e 98 (Figura 13). Estes experimentos foram feitos em triplicata, mostrando-se reprodutíveis (Figura 14). A análise computacional dos géis bidimensionais (programa PDQuest – Bio-Rad) realizados na faixa de pH 4-7 detectou 300 *spots* na cepa 3663 e 325 *spots* na cepa 4167. Nos isolados foram detectados 310 *spots* na SMM36 e 285 *spots* na SMM98. Dentre eles, foi possível detectar *spots* comuns e exclusivos das cepas 3663, 4167 e dos isolados SMM36 e 98 (Figura 15).

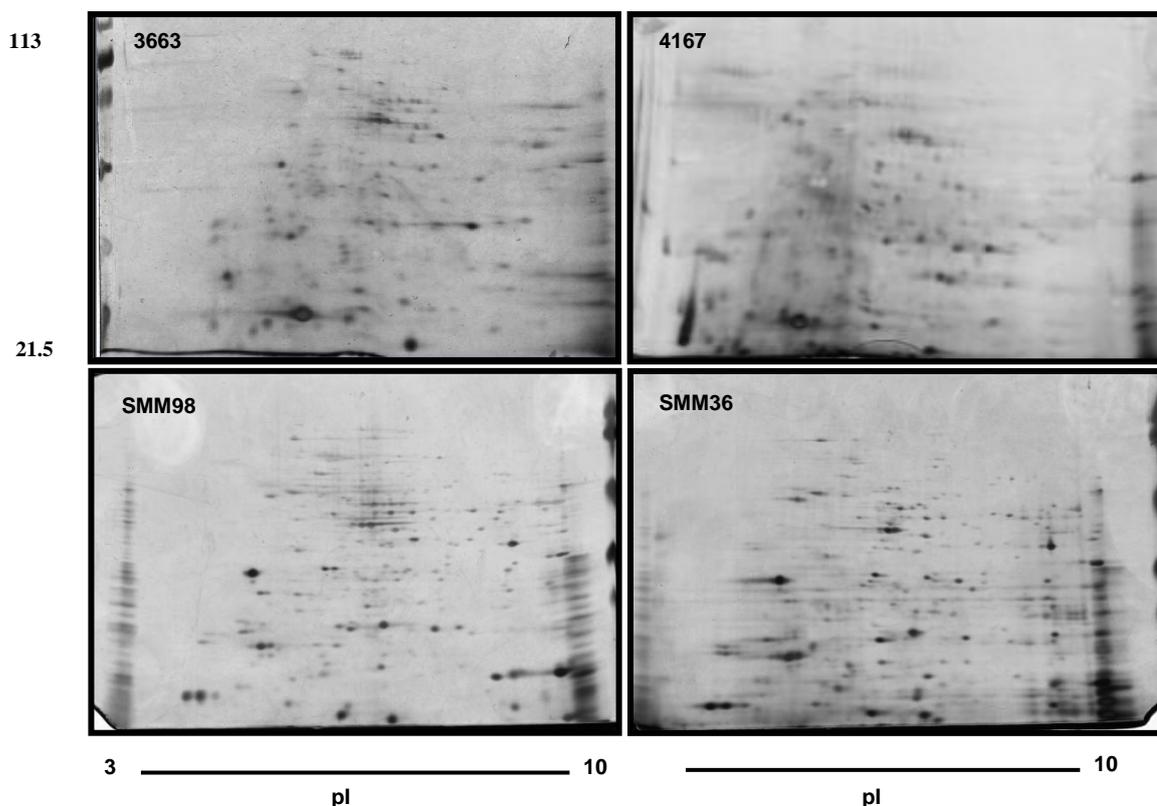


Figura 11: Eletroforese bidimensional de proteínas solúveis de formas epimastigotas. Proteínas solúveis (40µg) foram aplicadas em fitas de IPG – 7 cm (Bio-

Rad) com faixa de pH 3-10 e separadas por focalização isoeétrica (primeira dimensão). Posteriormente, as fitas de IPG foram submetidas aos tratamentos de redução (DTT) e alquilação (iodoacetamida). A segunda dimensão foi feita em SDS-PAGE (12% poliacrilamida). As proteínas foram visualizadas utilizando impregnação pela prata.

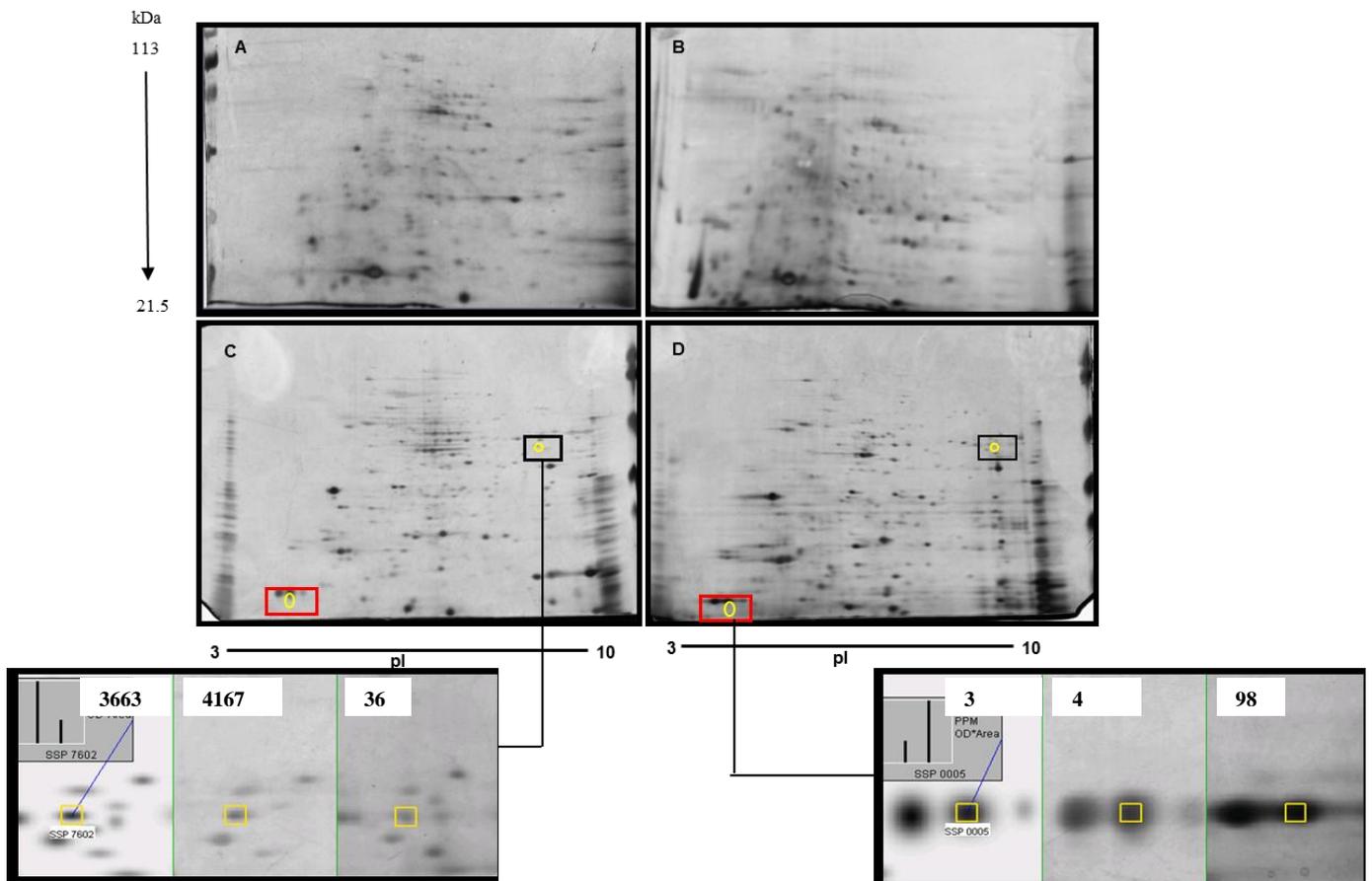


Figura 12: Comparação entre os géis 2D das cepas 4167 e 3663 e os isolados SMM98 e 36. (A)4167(B) 3663(C) SMM98 (D)SMM36. Podemos observar *spots* que mostram diferentes intensidade entre as amostras de estudo .

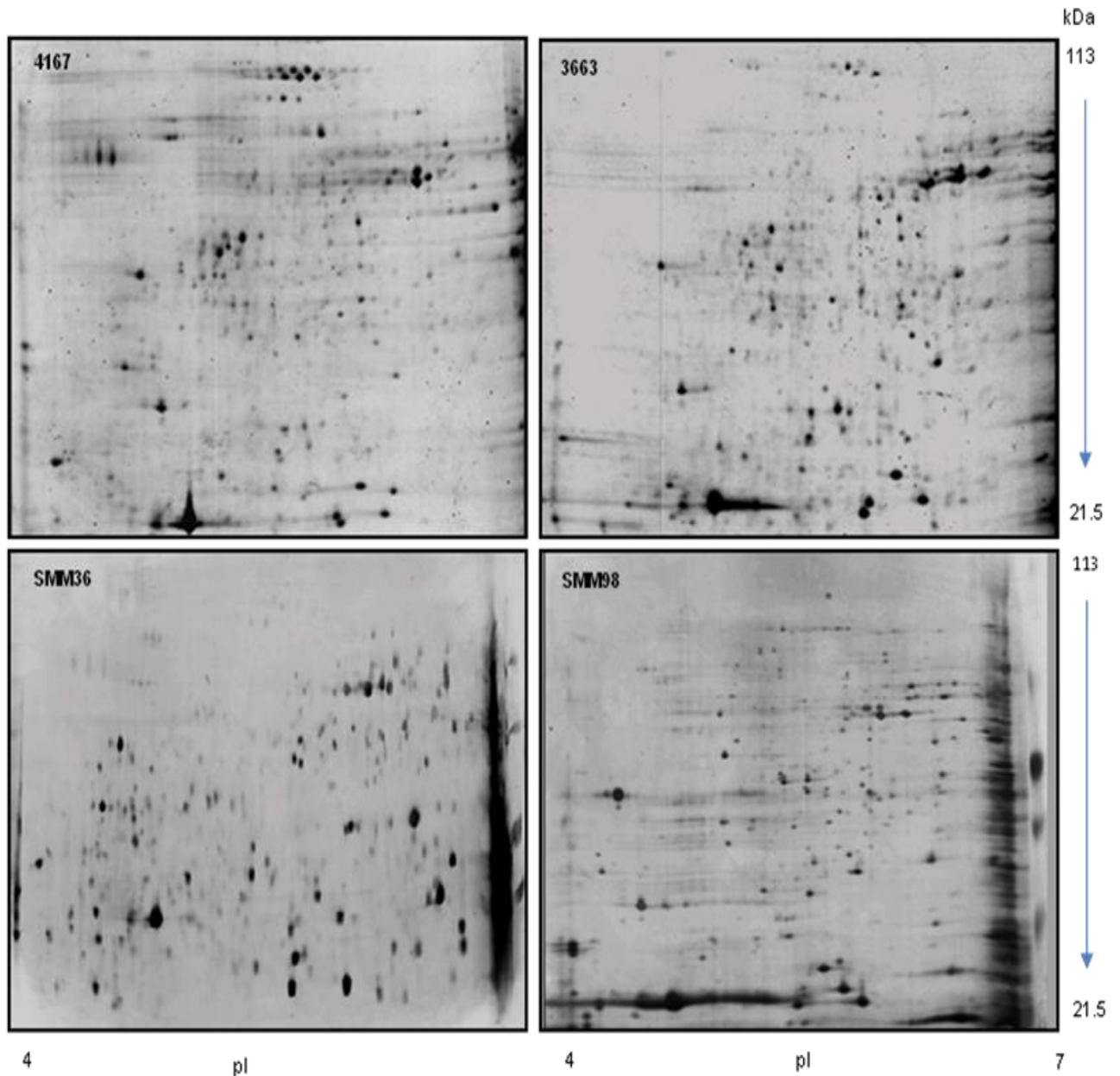


Figura 13: Eletroforese bidimensional de proteínas solúveis de formas epimastigotas. Proteínas solúveis (700 μ g) foram aplicadas em fitas de IPG – 17 cm (Bio-Rad) com faixa de pH 4-7 e separadas por focalização isoeletrica (primeira dimensão). Após a primeira dimensão, as fitas de IPG foram submetidas aos tratamentos de redução (DTT) e alquilação (iodoacetamida). A segunda dimensão foi feita em SDS-PAGE (12% poliacrilamida). As proteínas foram visualizadas utilizando a técnica de coloração por saturação com o Coomassie Blue G-250.

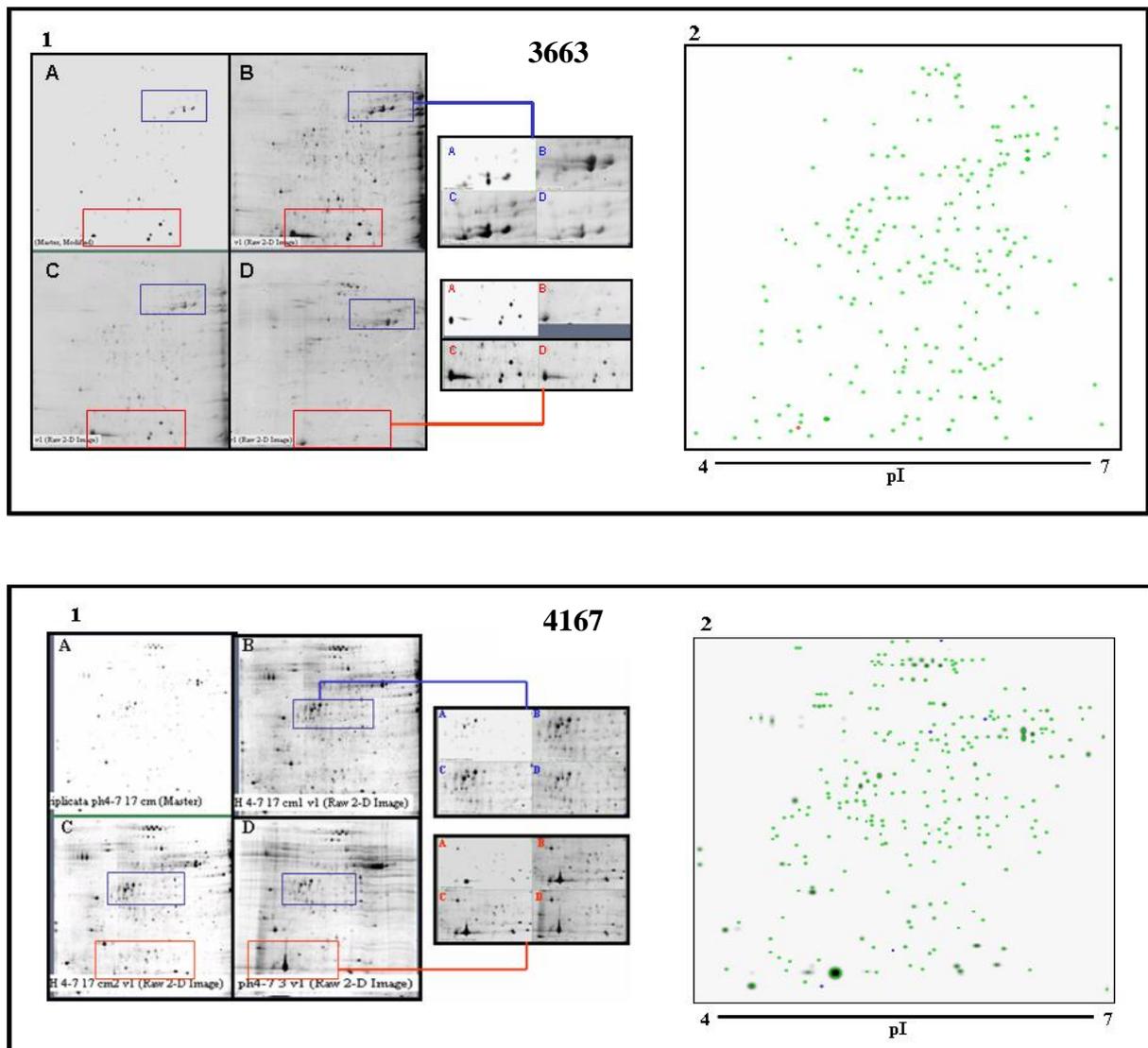


Figura 14: (1) Análise da reprodutibilidade da eletroforese bidimensional de proteínas solúveis de formas epimastigotas. O procedimento foi realizado como descrito na Figura 12 e a análise foi feita utilizando o programa PDQuest (Bio-Rad). (A) Imagem virtual obtida através da análise comparativa entre as triplicatas (B, C e D). Os retângulos representam áreas ampliadas dos géis (B, C e D) que encontram-se delineadas pelas cores azul e vermelho; (2) Imagem virtual ampliada (1 A) resultante da comparação entre os géis bidimensionais. *Spots* verdes – comuns as triplicatas; *spots* vermelhos – presentes somente no gel C.

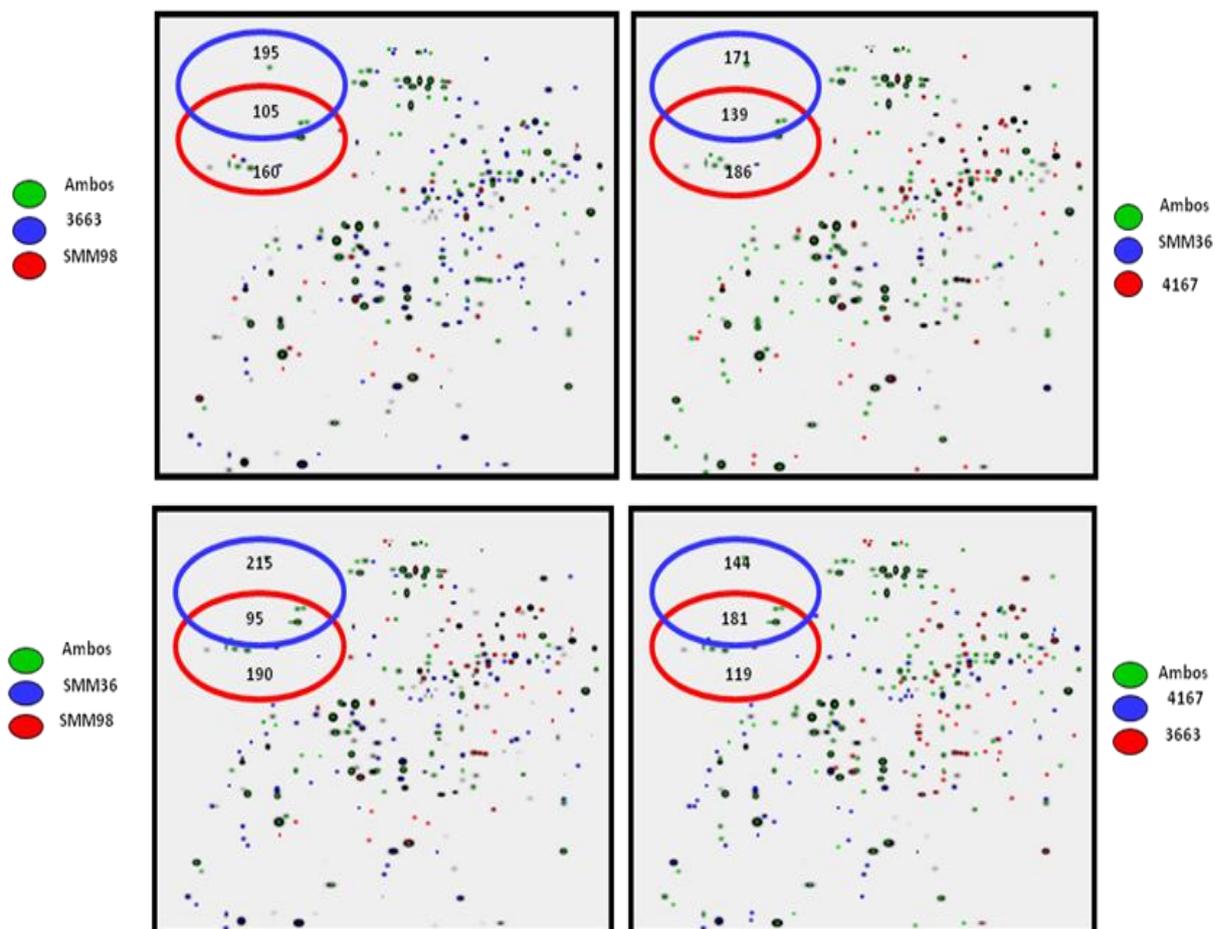


Figura 15: Imagem virtual obtida pela comparação entre os géis bidimensionais num gradiente de pH linear de 4-7 utilizando PDQuest software (Bio-Rad). *Spots* vermelhos e azuis - presentes somente em uma cepa/isolado e *spots* verdes – comuns.

4.4. Análise dos *spots* por espectrometria de massa e identificação dos peptídeos

Para identificar a proteína correspondente aos *spots* presentes nos mapas protéicos das cepas estudadas foi utilizada a técnica de espectrometria de massa. Foram retirados e processados 80 *spots* do gel bidimensional referente ao pH 4-7 da cepa 3663, mas somente 25 foram identificados. Em relação à cepa 4167, foram retirados e processados 91 *spots* sendo 30 identificados (Figuras 16).

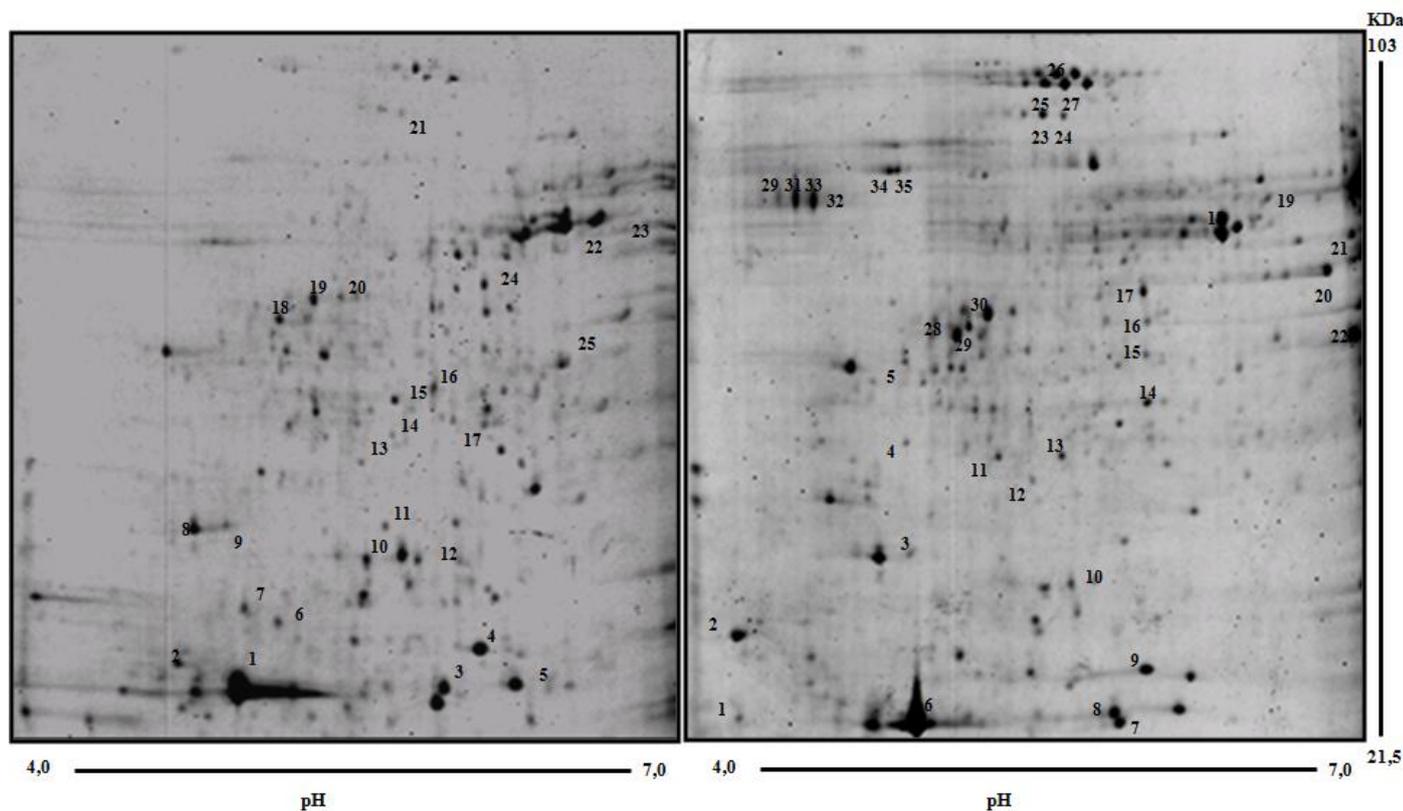


Figura 16: Identificação de *spots* da cepa 3663 (A) e 4167(B).

As proteínas identificadas apresentam funções celulares distintas. Sendo assim, foram agrupadas em categorias funcionais (Tabelas 4 e 5).

Tabela 4: Proteínas identificadas na cepa 3663 por espectrometria de massa com função conhecida e agrupada em categorias funcionais.

Cepa 3663	
Caracterização funcional	Proteína
Síntese de proteínas	<i>40S ribosomal protein S12 (T.cruzi)</i>
Sinalização / Diferenciação Celular	<i>Activated protein kinase C (T.cruzi)</i>
Metabolismo	<i>Alcohol dehydrogenase (T.cruzi)</i> <i>Dehydrogenase (T.cruzi)</i> <i>Nitrilase (T.cruzi)</i> <i>Ubiquitin-conjugating enzyme E2 (T.cruzi)</i> <i>Ubiquitin-conjugating enzyme like (T.cruzi)</i>
Metabolismo, resposta ao stress oxidativo	<i>Glutathione peroxidase-like protein (T.cruzi)</i>
Organização celular	<i>Alpha tubulin (T.cruzi)</i> <i>Beta tubulin (T.cruzi)</i>
Resposta ao stress/ Proteína da matriz mitocondrial	<i>Chaperonin HSP60, mitochondrial precursor (T.cruzi)</i> <i>Eukaryotic initiation factor 5a (T.cruzi)</i>
Fator de iniciação de tradução	<i>Hlsvu complex proteolytic subunit like (T.cruzi)</i>
Catabolismo de proteínas	<i>Ran binding protein 1 (T.cruzi)</i>
Transporte nuclear	<i>29kDa proteasome subunit (T.cruzi)</i>
Degradação de proteínas	<i>Peroxiredoxin (T.cruzi)</i>
Transporte de elétrons	<i>Calpain-like cysteine peptidase (T.cruzi)</i>
Outras	<i>Putative cofilin (T.cruzi)</i> <i>Hypothetical protein (T.cruzi)</i>

Tabela 5: Proteínas identificadas na cepa 4167 por espectrometria de massa com função conhecida e agrupada em categorias funcionais.

Cepa 4167	
Caracterização funcional	Proteína
Comunicação Celular	<i>Activated protein kinase C receptor (T.cruzi)</i>
Metabolismo	<i>Arginine kinase, putative (T.cruzi)</i> <i>Aromatic L-alpha-hydroxyacid dehydrogenase (T.cruzi)</i> <i>Tyrosine aminotransferase (L-tyrosine:2-oxoglutarate aminotransferase (TAT) (T.cruzi)</i> <i>Nitrilase (T.cruzi)</i> <i>Putative proteasome alpha 3 subunit (T.cruzi)</i> <i>Peroxiredoxin ou Tryparedoxin peroxidase (T.cruzi)</i>
Transporte de elétrons	
Processo de formação de proteínas	<i>Prefolin subunit 2 (T.cruzi)</i>
Processo biológico	<i>Prostaglandin F synthase (T.cruzi)</i>
Atividade tripanotio- dissulfide redutase	<i>Proteosome alpha 5 subunit (T.cruzi)</i>
Resposta ao stress/Proteína de destino	<i>Putative heat shock 70kDa protein, mitochondrial precursor (T.cruzi)</i>
Codifica epítomos reativos	<i>Ribosomal potein P-JL5 (T.cruzi)</i> <i>S-adenosylmethionine synthetase, putative (T.cruzi)</i>
Processo celular	
Organização celular	<i>Beta tubulin (T.cruzi)</i>
Resposta ao Stress / Proteína mitocondrial	<i>Chaperonin HSP60, mitochondrial precursor (T.cruzi)</i>
Organização dos filamentos de actina	<i>Cofilin/actin depolymerizing factor (T.cruzi)</i>
Outras	<i>Hypothetical protein (T.cruzi)</i> <i>Hypothetical protein conserved (T.cruzi)</i> <i>Mitochondrial elongation factor G putative (T.cruzi)</i>
Proteína mitocondrial	
Separação da cromátide irmã, reparo de DNA , recombinação e	
transporte intracelular	<i>Putative structural maintenance of chromosome 3 protein (T.cruzi)</i>
Resposta ao stress	<i>Heat shock 60 kDa protein (T.cruzi)</i>

Nos isolados SMM36 e 98, foram encontradas diferentes expressões proteicas. Foram encontradas: Proteína Kinase C, Beta tubulina, Chaperona, Deidrogenase/ Prostaglandina F2 alfa sintetase, Peroxiredoxina, Tryparedoxina peroxidase, Ubiquinina, Proteína Colifina Proteína de Choque térmico, Arginina cinase. A Arginina cinase apresentou expressão variada entre as cepas da região amazônica e os isolados silvestres do Rio de Janeiro, ambos do grupo ZIII (Figuras 17). Outra proteína

identificada que apresentou uma expressão diferenciada foi a cruzipaina (Figura 18). Foi possível identificar diferentes spots como cruzipaina (Figura 19).

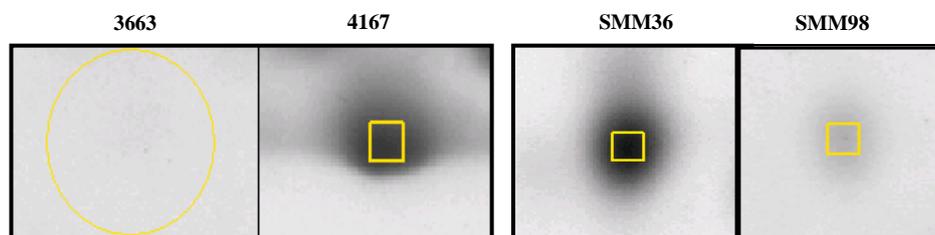


Figura 17 : Variação da intensidade de spot identificado como arginina cinase entre as cepas 4167 e 3663 e os isolados silvestres SMM36 e 98.

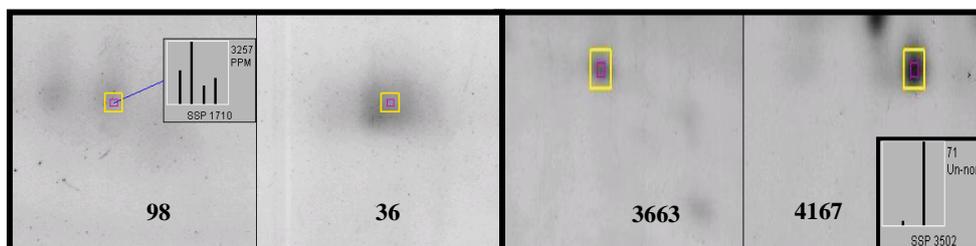


Figura 18: Variação da intensidade de spot identificado como cruzipaina entre as cepas 4167 e 3663 e os isolados silvestres SMM36 e 98.

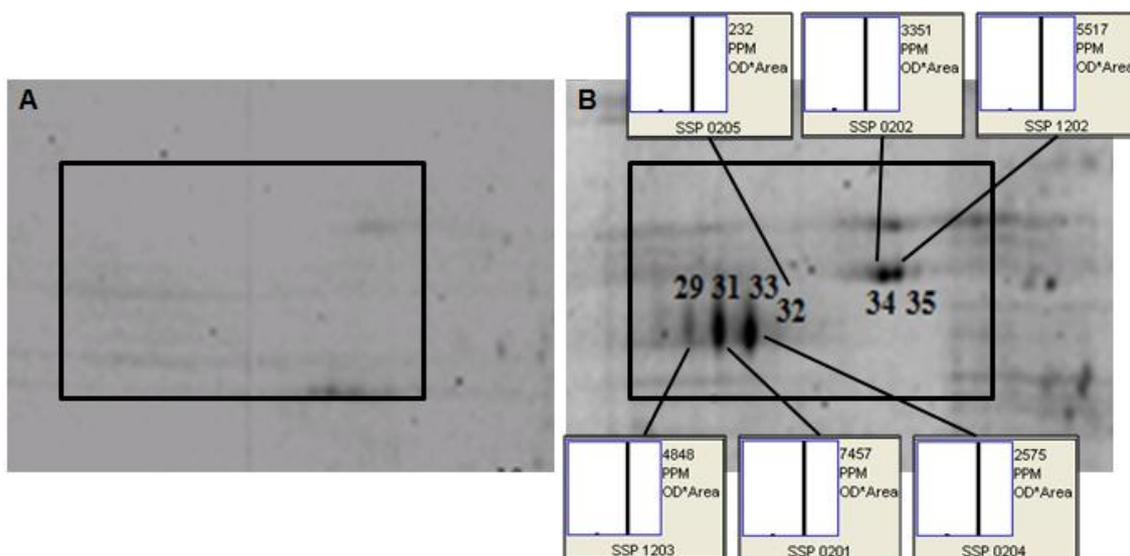


Figura 19: Variação da intensidade de *spots* identificados como cruzipaina entre as cepas 4167 e 3663. Os gráficos de intensidade (gráficos em barra) foram gerados pelo programa PDQuest após comparação entre as cepas estudadas.

4.5. Atividade Proteolítica

Os resultados da atividade proteolítica obtidos através da análise zimográfica evidenciaram uma protease com massa molecular aparente de 45kDa em todas as amostras nas formas epimastigotas e tripomastigotas (SMM10, SMM36, SMM53, SMM88, SMM98) e nas cepas 3663 e 4167. Uma vez que as massas moleculares obtidas possuíam perfil semelhante ao da cruzipaina (cisteína protease produzida por *T. cruzi*), ensaios de *Western blotting* e citometria de fluxo foram realizados utilizando um anticorpo anticruzipaina. Nestes ensaios foi possível observar uma reação positiva ao anticorpo entre os isolados testados apresentando uma forte banda com aparente massa molecular entre 40 e 50kDa (Figura 20) e uma variação no nível de expressão da cruzipaina entre os isolados e cepas testados (Figura 21).

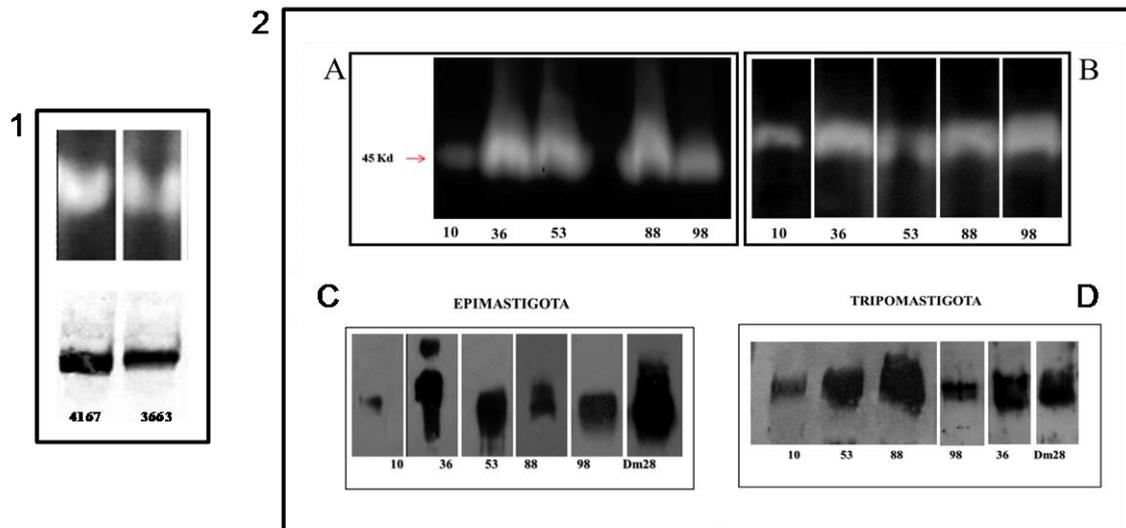


Figura 20: Análise zimográfica e *Western blotting* utilizando anticorpo anti-cruzipaína evidenciando bandas de aproximadamente 45 kDa. (1) Cepas 3663 e 4167 (2) Isolados SMM10, SMM36, SMM53, SMM88 e SMM98.

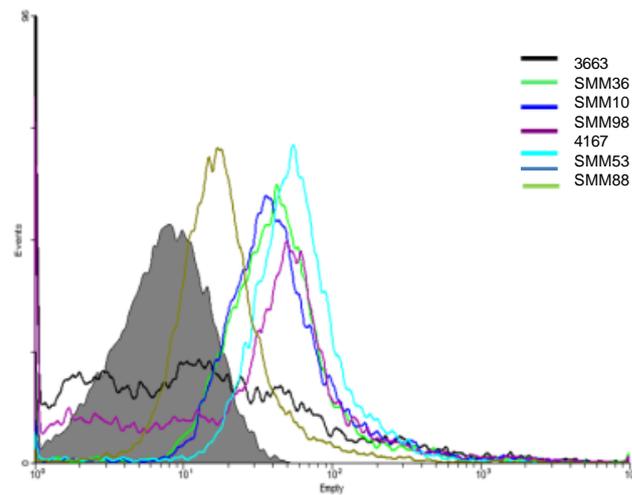


Figura 21: Citometria de fluxo utilizando o anticorpo anti cruzipaína.

4.6. Cinética de infecção de células VERO por tripomastigotas de diferentes cepas e isolados de *T. cruzi*

A cinética temporal de infecção de células VERO pelos parasitos foi realizada em meio RPMI'S com 5% de SBF e para cada dia de observação foram montadas lâminas. Através da observação das lâminas ao microscópico óptico foi possível visualizar diferentes momentos da infecção das células VERO com as cepas 3663 e 4167 e SMM36 e 98 de *T. cruzi*.

As cepas e isolados analisadas apresentaram perfis distintos de infecção nos diferentes tempos determinados (Figuras 22). A figura 22 mostra os resultados relativos ao percentual de células VERO infectadas pelos diferentes estoques de *T. cruzi* ao longo de uma cinética de 24-72 h de infecção. Nossos resultados mostraram que a interação de células VERO com formas tripomastigotas do isolado SMM36 resultou em cerca de 60% de infecção, enquanto a interação de parasitos da cepa 3663 e SMM98 com este mesmo tipo celular resultou em somente cerca de 3% de células infectadas. A invasão de células VERO por tripomastigotas das cepas 4167 alcançou níveis de aproximadamente 40% de infecção das culturas (Figura 22).

Os dados referentes ao número de parasitos por célula infectada (par/cel) ao longo da cinética de infecção de células VERO pelos diferentes estoques de *T. cruzi*. A interação por 24, 48 e 72 horas com parasitos SMM98 resultou em cerca de 1,1; 1,5 e 4,6 par/cel, respectivamente. Após 24, 48 e 72 horas de infecção com SMM36, o número médio de par/cel foi de 6; 28 e 40, respectivamente. A análise da infecção pela cepa 4167 mostrou valores de 2,8, 4,6 e 17 par/cel, após 24, 48 e 72 horas, respectivamente. A interação de células VERO com a cepa 3663 resultou em índices médios de 1, 1,97 e 5 no número de par/cel, respectivamente após 24, 48 e 72 horas.

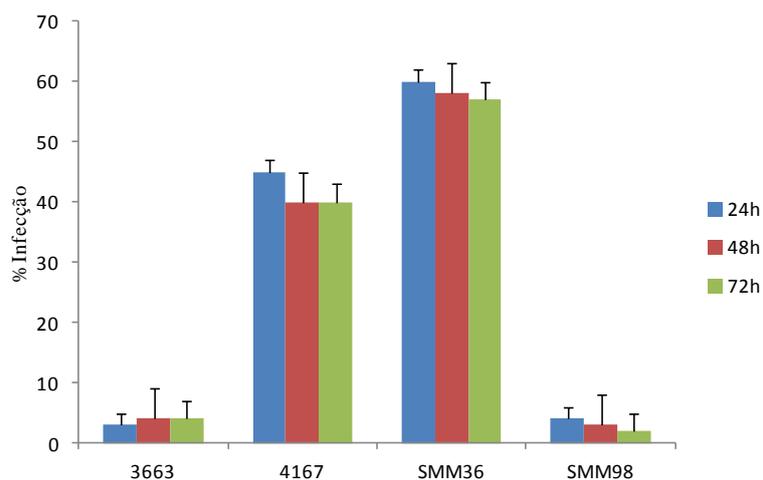
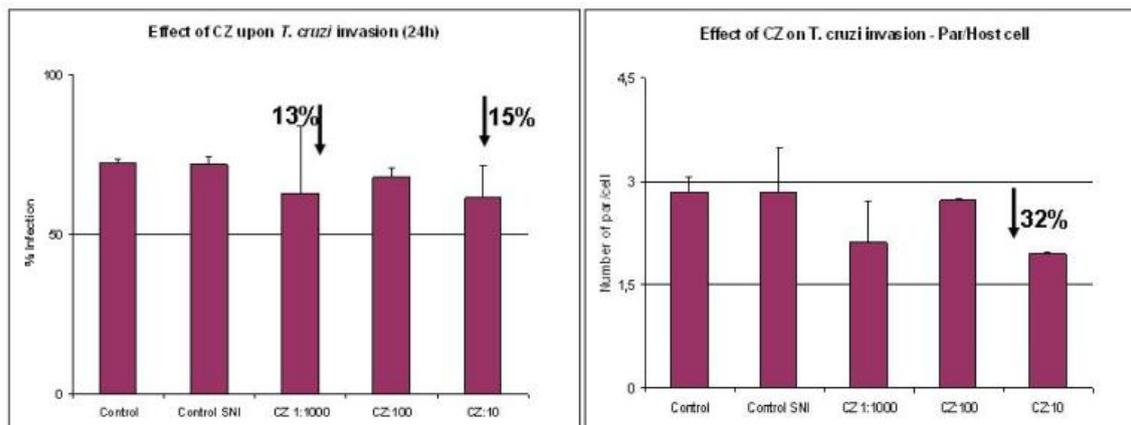


Figura 22: Cinética de infecção de células VERO pelas cepas SMM36, SMM98 , 3663 e 4167 nos períodos de 24h, 48h e 72h. O resultado representa a média aritmética de três experimentos.

4.7. Experimentos de infecção em célula VERO utilizando anticorpo anti-cruzipaina

Após a realização deste ensaio houve somente uma redução de cerca de 30% no número de parasitas intracelulares na cepa 4167 e SMM36 (Figura 23). Quando foram utilizadas as amostras 3663 e SMM98, frente ao seu baixíssimo índice de infecção (1-3%) esta praticamente não ocorreu.

A) CEPA 4167



B) SMM36

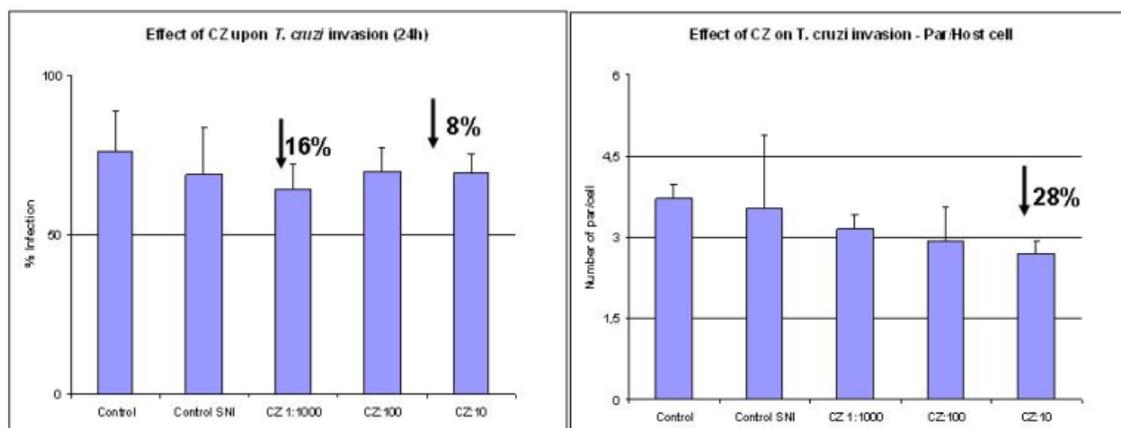


Figura 23: Gráficos da infecção de *Trypanosoma cruzi* em células Vero, das amostras 4167 (região amazônica) e SMM36 (isolado do Rio de Janeiro).

4.8. Infecção em Cardiomiócito:

A literatura se mostra escassa em relação a eventual diferença quanto à invasão celular *in vitro* desses isolados silvestres. Iniciamos os experimentos com a SMM36 por já ter apresentado um alto perfil de infecção *in vivo* (dados do grupo) e em células VERO, obtendo-se um alto índice de infecção em cultura (Figura 24). A SMM36 apresentou capacidade de infectar aproximadamente 70% cardiomiócitos.

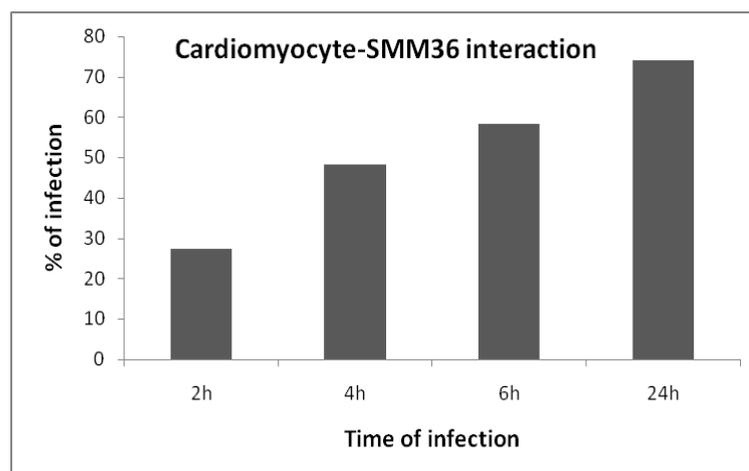


Figura 24: Infecção da amostra SMM36 em cardiomiócitos com 2, 4, 6 e 24h.

4.9. Análise de citometria de fluxo da expressão de gp90, gp82 e gp35/50

Foi possível observar nos experimentos de citometria de fluxo uma expressão diferenciada entre os isolados estudados. Por exemplo, a análise da gp90 revelou como sendo um dos componentes principais de superfície na SMM98, e detectou pouca expressão na SMM36. Vale ressaltar que esses resultados corroboram com os achados nos experimentos de western blotting. Foi possível observar a menor expressão de gp82 no isolado SMM98, que esta poderia justificar o menor percentual de invasão celular em células VERO (Figura 25).

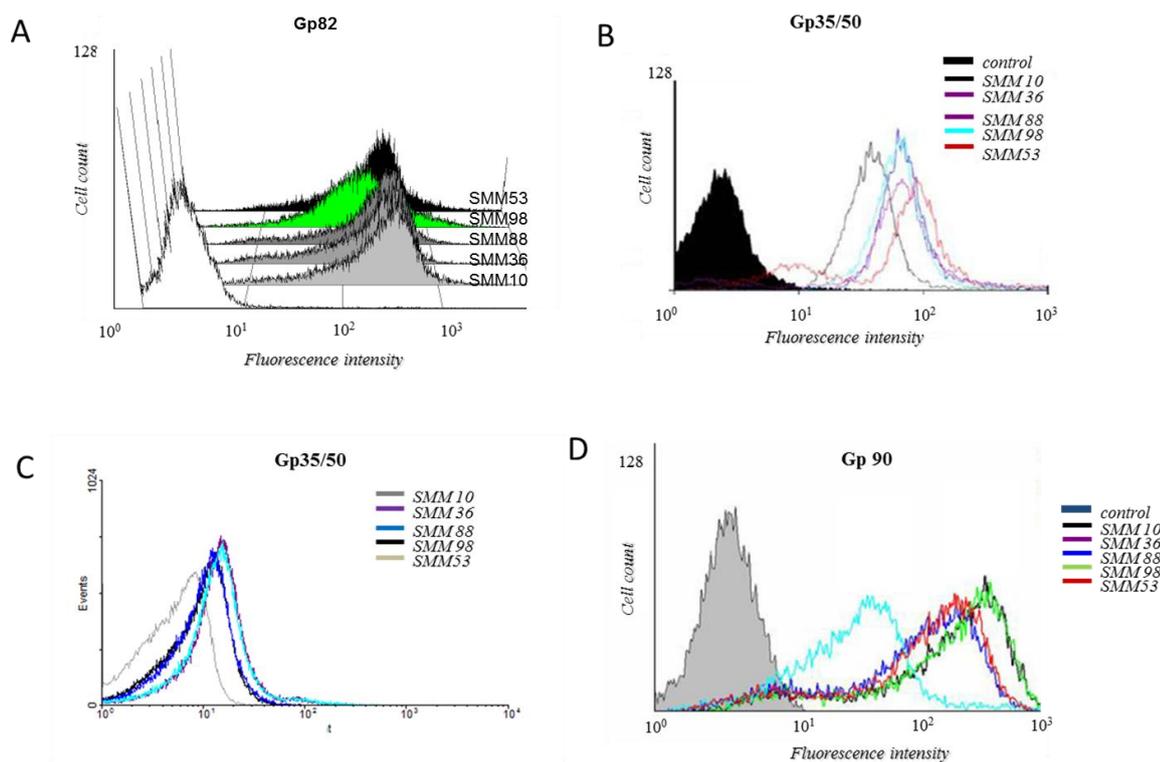


Figura 25: Citometria de fluxo utilizando o anticorpo Gp82 (A), Gp 35/50 (B), Gp 90 (D) nos isolados silvestres de *Trypanosoma cruzi*.

4.10. Detecção de glicoproteínas na superfície dos isolados silvestres por *Western blot* e citometria de fluxo

As diferenças entre os isolados de *T. cruzi* quanto à expressão de moléculas de superfície (glicoproteínas) foram observados nos experimentos de western blotting. As diferenças de expressão das GPs 35/50, 82 e 90 nas formas epimastigotas e tripomastigotas são compatíveis com as observações *in vivo* realizados pelo nosso grupo. No caso da gp90, a SMM98 apresentou maior expressão quando comparado com a SMM36. (Figura 26).

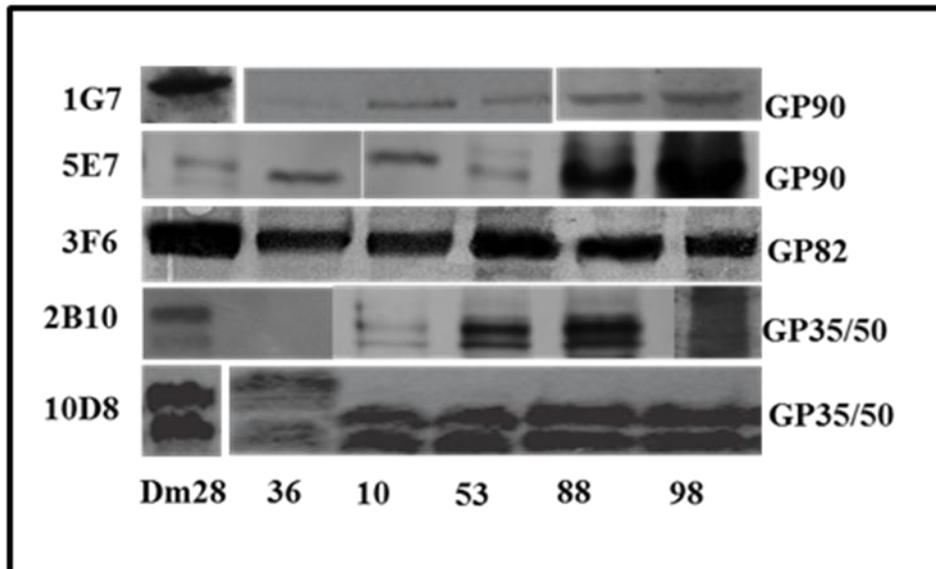


Figura 26: Diferenças entre os isolados de *T. cruzi* quanto à expressão de moléculas de superfície (glicoproteínas) nos experimentos de *western blotting*.

5 – DISCUSSÃO

A heterogeneidade do *Trypanosoma cruzi* vem sendo descrita desde a sua descoberta.

Miles e cols (1978, 1980) utilizando análises de isoenzimas agruparam as cepas em zimodemas e relacionaram os três diferentes grupos isoenzimáticos encontrados com o perfil epidemiológico dos isolados. Os zimodemas ZI e ZIII estariam relacionados ao ciclo silvestre do parasito e o ZII ao ciclo doméstico. Posteriormente, através de diversas técnicas de biologia molecular (Morel, 1986; Ávila *et al.*, 1990; Mimori, 1992; Tibayrenc *et al.*, 1993; Steindel *et al.*, 1993; Macedo *et al.*, 1993; Vago *et al.*, 1996; Souto *et al.*, 1996; Zingales *et al.*, 1998; Fernandes *et al.*, 1998a), observou-se um claro dimorfismo entre os isolados, levando ao agrupamento das cepas em duas grandes linhagens filogenéticas: *T. cruzi* I (que se correlaciona ao ZI) e *T. cruzi* II (que se correlaciona ao ZII). A posição de ZIII em relação aos grupos *T. cruzi* I e II continua controversa. Alguns autores consideram que ZIII está mais perto filogeneticamente do *T. cruzi* I do que do *T. cruzi* II (Miles *et al.*, 1981; Fernandes *et al.*, 1998b; Brandão & Fernandes, 2006), enquanto outros consideram o contrário (Barnabé *et al.*, 2000; Brisse *et al.*, 2000; Machado & Ayala, 2001; Toma, 2005).

Através de estudos filogenéticos baseados no perfil de RFLP-ITS-rDNA (*Restriction Fragment Length Polymorphis- Internal Transcribed Spacer - rDNA*) com isolados de ZIII da Amazônia brasileira, demonstrou-se uma clara dicotomia entre isolados deste grupo que permitiu dividi-lo em dois subgrupos denominados ZIII-A (cepa 3663) e ZIII-B (cepa 4167), em que a distância genética mostrou um baixo nível de heterogeneidade (Mendonça *et al.*, 2002).

Os diversos estudos desenvolvidos até o momento para caracterizar a posição filogenética de ZIII utilizam técnicas moleculares. Entretanto, a análise proteômica de cepas e isolados pertencentes ao ZIII, aparece como uma potencial ferramenta, que pode contribuir para o melhor entendimento desta questão estabelecendo uma abordagem proteômica global para o táxon *T. cruzi*. Sendo assim, este trabalho tem como objetivo principal definir o mapa de proteínas solúveis de cepas e isolados pertencentes ao zimodema III, ressaltando as diferenças existentes entre as mesmas. Para este estudo, foram utilizadas as técnicas de eletroforese bidimensional e espectrometria de massa.

As cepas utilizadas neste trabalho são orindas da região Amazônica brasileira e do estado do Rio de Janeiro. A cepa 3663 foi isolada a partir de *Panstrongylus geniculatus* do distrito de Manaus e a 4167 de *Rhodnius brethesi* do Município de

Barcelos, no Estado do Amazonas (Mendonça *et al.*, 2002). As amostras de *Trypanosoma cruzi* foram isoladas de *Triatoma vitticeps* por Gonçalves TCM em 2000, na localidade de Triunfo, 2º distrito do município de Santa Maria Madalena, estado do Rio de Janeiro. As cepas escolhidas (3663 e 4167), já foram bem caracterizadas como ZIII por diversos marcadores moleculares (Fernandes *et al.*, 1998; Mendonça *et al.*, 2002; Brandão *et al.*, 2006; Freitas *et al.*, 2006).

O estudo da doença de Chagas na região Amazônica tem demonstrado diversos isolados de *T. cruzi* caracterizados como ZIII, baseado em testes padrões de isoenzimas (Miles *et al.*, 1978) e mais recentemente na inserção no espaçador não transcrito do gene mini-exon (Fernandes *et al.*, 1998b; 2001). Embora este marcador genético distinga ZIII do grupo *T. cruzi* I e II, ele não permite a caracterização de polimorfismos do intra-grupo, desde que o gene mini-exon provou ser um gene de evolução lenta. Através da análise da região intergênica de cepas representantes dos grupos filogenéticos principais de *T. cruzi*, juntamente com as cepas utilizadas neste estudo, confirmou-se ZIII como um terceiro grupo (Figura 9 e 10). Este grupo de parasitos, tanto pela proximidade isoenzimática quanto pelas características epidemiológicas, estaria mais relacionado ao ciclo silvestre da doença de Chagas e, portanto mais próximo do ZI (*T. cruzi* I) do que ZII (Miles *et al.*, 1981). Entretanto, Brisse e cols (2000a) demonstraram que ZIII estaria mais relacionado à *T. cruzi* II. De forma antagônica, Fernandes e cols (1998b) utilizando o gene de mini-exon e Santos e cols (2002), utilizando a região espaçadora interna não-transcrita do gene ribossômico, definiram que ZIII estaria mais próximo de *T. cruzi* I validado pelas características isoenzimática e epidemiológicas.

Apesar de não ter havido confirmação da transmissão vetorial no estado do Rio de Janeiro, focos de *T. infestans* encontrados nos municípios da Baixada Fluminense (Duque de Caxias e Nova Iguaçu) na década de 1970 determinaram a inclusão do Rio de Janeiro na área de ações de controle da doença de Chagas em 1984 (Aragão & Souza 1971; Coura *et al.* 1971, Silveira *et al.* 1982, 1984; Silveira & Dias 2011). Tal fato poderia ser explicado pela possibilidade de transporte passivo de triatomíneos em bagagens de imigrantes de áreas rurais endêmicas do Brasil para o Rio de Janeiro (Dias 1986).

Alguns estudos do passado tentaram encontrar casos autóctones de doença de Chagas no Rio de Janeiro. Todavia, a maioria deles não tinha uma metodologia de investigação epidemiológica precisa (Guimarães & Jansen 1943; Bustamante & Gusmão 1953; Coura 1966; Coura *et al.* 1971). Alguns chegaram a encontrar casos positivos da

doença, mas não esgotaram a investigação de outras possibilidades de transmissão (Bustamante & Gusmao 1953; Coura 1966, Coura *et al* 1971).

Nos últimos anos, foram comunicados focos de doença de Chagas no estado do Rio de Janeiro em localidades rurais dos municípios de Miguel Pereira e São Fidelis onde foram capturados espécimes de *Triatoma vitticipes* no intradomicílio (Lorosa *et al* 2003; 2008). Nessas localidades foram identificados casos humanos da doença de Chagas, chamando a atenção para a possibilidade de transmissão vetorial da doença no Rio de Janeiro, fato até então não comprovado por nenhum estudo. Mais recentemente, foram identificados dois casos humanos da doença na localidade rural de Guarani no município de São Sebastião do Alto, região Serrana do Rio de Janeiro (Sangenis *et al* 2012). Os dois casos identificados não tinham histórico de viagens para fora do estado e nem relato de transfusão de sangue e de órgãos. Comum aos outros relatos de Lorosa, as duas pessoas residiam numa casa na área rural onde foram capturados espécimes de *T.vitticipes*, sendo que uma relatou já ter sido picada por barbeiros no intradomicílio.

O Rio de Janeiro sempre foi caracterizado como área livre de transmissão vetorial ou de casos autóctones de doença de Chagas. As poucas evidências da presença de triatomíneos domiciliados como *T. infestans* fez com que essa ideia ganhasse força nos meios científicos e acadêmicos (Coura 2006). A presença de vetores da doença de Chagas no RJ é um fato há muito conhecido e varias publicações relataram capturas de triatomíneos, alguns infectados com *T. cruzi*, tanto na cidade do RJ, quanto em outras regiões do estado (Neiva 1941; Neiva & Pinto 1922;1923; Dias 1943; Guimaraes & Jansen 1943; Lent 1942;1943; Dias & Seabra 1943; Costa Leite 1960; Coura *et al* 1966; Silveira *et al* 1982; Ferreira *et al* 1986, Gonçalves *et al.*, 1998; Fernandes *et al* 1999; Lorosa *et al.*, 2003;2008; Giordano-Dias *et al.*, 2010; Sangenis *et al* .,2012).

Diversas pesquisas identificaram a presença de reservatórios silvestres de *T.cruzi* no RJ, sendo documentado por Guimaraes & Jansen (1943) em gambá e cuíca; Coura *et al* (1966b) em gambá; Fernandes *et al* (1999), em gambá, cuíca, preguiça de coleira, mico leão dourado, roedor; Gonçalves *et al* (1998) em gambá; Lisboa *et al* (2000) em mico leão dourado; Sangenis *et al* (2012), em gambá e roedores. Inquéritos sorológicos também foram desenvolvidos por diversos pesquisadores e fizeram parte de estudos de campo na investigação de casos humanos de DC (Bustamante & Gusmao 1953; Coura 1966; Coura *et al* 1971; Camargo *et al* 1984; Gonçalves *et al* 1998; Giordano-Dias 2010; Sangenis *et al* 2012). Somente os estudos de Bustamante & Gusmao 1953, Coura 1966 e Sangenis *et al.*, 2012, relataram casos humanos de DC com possibilidade de autoctonia. A

hipótese de caso autóctone no RJ também é considerada na publicação de Benchimol et al (1954), onde, de dois casos de pacientes naturais da cidade do RJ, um nunca havia se afastado ou viajado para fora da cidade. O RJ possui 8 espécies de triatomíneos documentadas predominando as de comportamento silvestre. No RJ algumas espécies são estritamente silvestres (*M. borbai*, *P. geniculatus*, *R. domesticus*, *T. tibiamaculata*), enquanto outras também podem ser encontradas em ambientes antrópicos (*P. megistus*, *T. rubrofasciata* e *T. vitticeps*) (Lent & Wygodzinsky 1979; Jurberg et al 2009).

A distribuição geográfica e as considerações epidemiológicas, tais como: fontes naturais de infecção, vetores e reservatórios, foram estudados sugerindo - se diversas associações (Milles et. al ; 2005; Yeo et. al; 2005). *T. cruzi* I parece estar associado a marsupiais americanos (*Didelphis* spp) de distribuição ao norte, e *T. cruzi* II se encontra associado ao tatu em áreas do Cone- sul na América.

A heterogeneidade de *Trypanosoma cruzi* tem sido evidenciada (Mello et.al; 1980; Gonzales et.al; 1995; Martinez-Dias et.al; 2001; Pacheco et.al; 2005; Sanches-Gillen, 2006; Silva, 2006; Cardinal et.al; 2008) através de estudos realizados para a caracterização de isolados de *T. cruzi* obtidos a partir de casos humanos, reservatórios silvestres e triatomíneos principalmente em países da América Latina, contribuindo para o entendimento dos aspectos epidemiológicos e clínicos da doença de Chagas.

No presente estudo, foram analisadas amostras de *T. cruzi*, isoladas de *Triatoma vitticeps* provenientes de áreas A (SMM 10,53,88,98) e B (SMM36) do município de Santa Maria Madalena, estado do Rio de Janeiro. Os 5 isolados analisados para a variabilidade da região intergênica do gene de Mini-Exon apresentaram um perfil de bandas com 150 pb característica de zimodema III (Santos-Mallet et al., 2008).

Nossos resultados corroboram a hipótese de que os isolados de *T. cruzi* podem ser produto de uma mistura de populações de parasitos uma vez que o vetor no ambiente silvestre pode se alimentar de vários hospedeiros vertebrados. Esta complexidade foi demonstrada por Fernandes et al (1999) em um estudo no estado do Rio de Janeiro que mostrou a associação de duas linhagens de *T. cruzi* (TcI e TcII) com diferentes hospedeiros silvestres.

Evidências indicam que diferentes populações de *T. cruzi* podem circular na natureza através de ciclos independentes de transmissão, e que estes podem, em determinadas condições, sobrepor. Nestes casos de superposição de ciclos, deve-se admitir que eventualmente diferentes populações, que se mantinham isoladas, passem a

interagir no mesmo vetor e/ou hospedeiro. Mas, embora exista essa possibilidade, pouco se sabe a respeito destes mecanismos entre diferentes populações de *T. cruzi* quando entram em simpatria. A notória capacidade de *T. cruzi* de infectar diversas espécies implica em adaptações do parasita para viver nos mais variados microhabitats, que incluem os diferentes segmentos do trato intestinal do inseto (Dias, 1934; Schaub, 1989), células nucleadas de mamíferos incluindo macrófagos (Nogueira & Cohn, 1976), o sangue e também a secreção das glândulas de cheiro de alguns marsupiais (Steindel et al, 1988; Deane et al, 1988). Alguns destes microhabitats são aparentemente hostis para o desenvolvimento do parasita (Garcia & Azambuja, 1991).

A interação *T. cruzi*-vetor continua sendo um ponto a ser profundamente discutido. A heterogeneidade deste parasita, levou Coura (1966) a propor que o taxon *T. cruzi* fosse referido como “complexo cruzi”. Sabe-se que o *T. cruzi*, por ser um parasita de grande variabilidade genética, é também um excelente modelo para se estudar aspectos relativos ao fenômeno parasitismo. Com o surgimento de ferramentas bioquímicas e moleculares de caracterização de parasitas, foi possível avaliar de maneira mais aprofundada a heterogeneidade intraespecífica deste parasita. A análise de isolados de *T. cruzi* derivados de humanos, animais silvestres e vetores de diferentes áreas geográficas em todas as Américas, mostraram que embora apresente uma estrutura populacional clonal (Tibayrenc & Ayala, 1988; Tibayrenc, 1998), *T. cruzi* inclui subpopulações extremamente heterogêneas quanto a todos os parâmetros biológicos, bioquímicos e moleculares testados.

A complexidade do ciclo de transmissão silvestre de *T. cruzi* pode ser comprovada na medida em que observou-se que os ciclos de transmissão independentes podem ocorrer em um mesmo fragmento de mata (Pinho *et al.*, 2000; Fernandes *et al.*, 1998). Mais ainda, a prevalência e o perfil da infecção podem ser distintos em uma mesma espécie em fragmentos de mata de um mesmo bioma. O encontro de primatas naturalmente infectados com *T. cruzi* (TcII) resultou em uma série de hipóteses ainda comprovadas, entre as quais uma antiga associação entre ZII/TcII com primatas não humanos e humanos (Fernandes *et al.*, 1998; 1999). Esta linhagem já foi descrita em outros animais, como marsupiais (*Didelphis albiventris* e *philander opossum*) e roedor (*Trichomys apereoides*) (Pinho *et al.*, 2000; Herrera *et al.*, 2005). A posição filogenética do ZIII, ainda é bastante discutida, já que possui afinidades com TcI e TcII. Até agora, sabe-se que a subpopulação de ZIII é endêmica na Amazônia (Coura *et al.*, 2002; Mendonça *et al.*, 2002).

Mendonça *et al.*; (2002), em um estudo na região Amazônica brasileira, município de Barcelos, estado do Amazonas, isolaram amostras de *T. cruzi*, a partir casos humanos, de *Panstrongylus geniculatus* e de *Rhodnius brethesi*, que foram caracterizadas como ZIII por diversos marcadores moleculares (Fernandes *et al.*; 1998b, Brandão & Fernandes, 2006; Freitas *et al.*; 2006). Estudos baseados em testes padrões de isoenzimas sobre a doença de Chagas na região Amazônica têm demonstrado que diversos isolados de *T. cruzi* são caracterizados como ZIII (Miles *et al.*; 1978).

A taxonomia numérica baseada em 24 perfis isoenzimáticos sugeriu que ZIII é mais correlacionado com TcI do que TcII (Ready & Miles, 1980). Por outro lado, outros autores têm incluído ZIII em uma posição intermediária entre os grupos TcI e TcII (Stochanrd *et al.*, 1998). Fernandes *et al.* (2000) estudando isolados de *T. cruzi* da Amazônia através da caracterização molecular, observou uma grande biodiversidade deste parasito nesta região. Suas análises indicaram uma maior correlação de ZIII com o grupo TcI. Já Brisse e cols (2000), estudando isolados de morcegos da América do Sul, através de análise de perfis isoenzimáticos e RAPD, correlacionaram ZIII com TcII. Mendonça e colaboradores (2002) analisando isolados da Amazônia já caracterizados anteriormente como ZIII através do gene ribossomal 24S α demonstraram que através deste marcador suas cepas ZIII estariam mais correlacionadas ao grupo TcII.

A grande variabilidade biológica e genética encontrada nessa espécie pode ser explicada pelos múltiplos contatos entre os vetores e reservatórios nas áreas endêmicas, os quais proporcionaram infecções com mais de uma população de *T. cruzi*, que coexistiram dentro de um mesmo hospedeiro, sem recombinação entre eles, constituindo as cepas monoclonais e policlonais (Tibayrenc *et al.*, 1986; Tibayrenc *et al.*, 1991).

São comuns na natureza infecções mistas envolvendo parasitas, ou seja, um mesmo indivíduo pode encontrar-se infectado por um único genótipo parasitário ou por diferentes genótipos de parasitas, concomitantemente. Na natureza encontram-se comumente infecções mistas de *T. cruzi* e *T. rangeli* em hospedeiros vertebrados e invertebrados (Ramirez *et al.*, 2002). Infecções mistas envolvendo os diferentes genótipos de *T. cruzi* (TcI e TcII) também podem ocorrer em hospedeiros naturalmente infectados, principalmente em regiões endêmicas (Bosseno *et al.*, 1996). Além disso, vêm sendo sugerido que infecções mistas geralmente favorecem a seleção natural do parasita de maior virulência, podendo aumentar assim a virulência da infecção (Taylor *et al.*, 1998; Ebert *et al.*, 2000; Gower & Webster, 2005). Deve-se também considerar

que em determinada infecção, seja por um ou mais genótipos, o hospedeiro é um habitat que pode ser considerado como fator determinante para a virulência (Taylor *et al.*, 1998).

Em relação a dinâmica da interação interespecífica de parasitas, tem sido cada vez mais frequente competição e ou cooperação entre populações de parasitas (Vickerman, 1994). Um outro exemplo também mencionado por esse mesmo autor, é a evolução de *Leishmania* no vetor, onde na medida em que uma parte das leishmanias que não se diferencia em metacíclicos, aparentemente tem a função de facilitar a transmissão das leishmanias que se diferenciam. Desta forma, a hipótese de que o fenômeno de cooperação entre parasitas que infectam um mesmo habitat (um mesmo hospedeiro) seja mais frequente do que a competição, vem também sendo cada vez mais aceita (Rohde, 1994). Entretanto, é importante observar que qualquer espécie ou sistema biológico pode ser considerado como “filtro biológico”, definindo a composição final da população parasitária em um dado ecossistema (hospedeiro), que exercerá efeito modulatório sobre seus componentes.

Estudos experimentais têm mostrado que infecções mistas por *T. cruzi* podem ter um grande impacto sobre as propriedades biológicas do parasito no hospedeiro, enfatizando a importância de considerar a possível ocorrência de infecções mistas naturais em humanos e suas conseqüências sobre os aspectos biológicos da doença de Chagas (Martins *et al.*, 2006).

Os isolados obtidos nesse trabalho demonstraram de fato uma correlação de Z3 com TcII, indicando que há nesta localidade amostras associando-se tanto ao ciclo silvestre, quanto ao ciclo doméstico, respectivamente, corroborando com a complexidade do ciclo silvestre da doença (Reboredo, 2010). Estes resultados sugerem que nesta área estudada possa estar ocorrendo o ciclo de *T. cruzi* com características epidemiológicas propostas já por Zingales *et al.* (1998), onde ambas as linhagens circulam no hábitat silvestre. Sangenis (2013) – relatou 15 casos de DC no RJ onde foram classificados como autóctones e, provavelmente, adquiriram a doença por via vetorial ou oral de forma acidental.

A existência de populações mistas nos isolados de *T. vitticeps* pode estar refletindo a pressão que estes insetos estão sofrendo em decorrência da atuação antrópica, impelindo-os a circular em diferentes nichos ecológicos, aumentando a possibilidade de contraírem a infecção de diferentes hospedeiros (Gonçalves *et al.*, 1998).

Gonçalves (2000) estudando aspectos ecológicos e biológicos de *T. vitticeps* na localidade de Triunfo, no Estado do Rio de Janeiro, encontrou a incidência de formas adultas e as raras formas jovens achadas no domicílio, demonstrando que não há processo de domicialização, confirmando o hábito silvestre desta espécie, caráter assinalado também em outros estados (Silveira *et al.*, 1984; Correa *et al.*; 1989). Resultados diferentes, contudo, foram obtidos por Dias *et al.*; (1989). Esses autores, capturaram 88.3% de *T. vitticeps* no domicílio, comentando, porém, que a espécie apresenta baixas taxas de colonização e infestação domiciliar nos municípios estudados no Espírito Santo.

De acordo ainda com Gonçalves *et al.* (2000), a espécie *Triatoma vitticeps* em Triunfo, alimenta-se eventualmente em homem. Porém, nesta localidade, o estudo do hábito alimentar de *T. vitticeps* demonstrou que há uma predominância para o sangue de tatu. Este estudo revelou ainda que nesta região há um ecletismo da espécie para fontes alimentares, tais como, aves, porcos, cavalos, gambás e roedores. Nossos resultados junto com essas informações nos levam a hipótese de que está ocorrendo nessa região uma grande variedade de reservatórios, o que requer uma análise mais detalhada deste aspecto. Apesar da diversidade alimentar observada e da mobilidade espacial desse inseto o que aumentaria as chances de transmissão da doença de Chagas, nenhum caso humano foi registrado na região, confirmando que esta espécie não é um vetor potencial para o homem (Gonçalves *et al.*, 1998). Esses autores confirmaram ainda que a infecção de triatomíneos, por *T. cruzi* está sendo adquirida fora do domicílio, corroborando os dados obtidos por Dias *et al.*; (1989).

Através dos resultados encontrados nos experimentos de curva de crescimento foi possível observar uma diferença no comportamento das cepas em cultivo e determinar o pico de crescimento, momento em que os parasitos foram coletados para a extração de proteínas solúveis, utilizada nos experimentos de eletroforese bidimensional.

A realização da análise proteômica nos possibilita o estudo do nível de expressão gênica em condições específicas e também a identificação de proteínas que sofrem modificações pós-traducionais comumente encontradas em *T. cruzi*, e que não são detectadas por análise do genoma.

A análise protéica utilizando eletroforese bidimensional de proteínas totais solúveis de formas epimastigotas mostrou-se reproduzível, demonstrando que a padronização da preparação de proteínas e das condições de focalização isoeletrica

foram satisfatórias. Os ensaios realizados na faixa de pH 3-10 revelaram uma grande diversidade de *spots* entre as cepas 3663 e 4167. Entretanto, quando a faixa de pH foi diminuída (4-7) houve um aumento no número de *spots* revelados. A análise computacional das imagens dos géis (proteínas solúveis na faixa de pH 4-7) das cepas 3663 e 4167 mostrou a presença de 300 e 325 *spots*, respectivamente, sendo 181 comuns a ambas. Foi possível observar que os isolados silvestres compartilhavam os *spots* com as cepas da Amazônia e o padrão de mais infectiva era semelhante entre 4167 e SMM36, sendo o contrario também observado (3663 e SMM98).

Uma diversidade considerável na expressão de proteína, bem como na intensidade de vários *spots* também foi observada entre as cepas estudadas. Algumas das limitações encontradas na eletroforese 2D, foi a dificuldade de detecção de proteínas pouco abundantes e a possibilidade de analisar somente uma única amostra por gel. Em contra partida, a fácil manipulação, a reprodutibilidade e a alta resolução alcançada por esta metodologia foram pontos fundamentais para a sua escolha.

Atualmente, em estudos proteômicos, a estratégia de escolha utilizada na identificação de proteínas tem sido a espectrometria de massa, principalmente devido à sua alta sensibilidade (Görg *et al.*, 2004). A maioria das proteínas identificadas neste trabalho por espectrometria de massa foi classificada em três grupos funcionais: metabolismo, organização celular e proteína de destino. Dentre os *spots* identificados (25 da cepa 3663 e 30 da cepa 4167), somente cinco foram exclusivos da cepa 3663 (*spots* 70, 14, 62, 69 e 11) e quatro exclusivos da cepa 4167 (*spots* 1, 45, 60 e 15). As enzimas identificadas no ZIII foram agrupadas em três grandes grupos: hidrolases (Nitralase), transferases (Tirosina aminotransferase, cinases e S-adenosilmetionina sintetase) e oxidorreduções (Prostaglandina F sintase, glutathione peroxidase *like*, desidrogenase e triparedoxina peroxidase), estando envolvidas em vias metabólicas diversas. A arginina cinase apresentou expressão variada entre as cepas e os isolados do grupo ZIII. Esta enzima importante na produção de energia do parasito, pois permite que a molécula de ATP seja produzida rapidamente quando necessária, podendo regular assim a diferenciação celular (Pereira *et al.*, 2000). Estaria envolvida na adaptação do parasito a modificações ambientais e condições de *stress* (Silber *et al.*, 2005).

Inúmeros estudos de biologia molecular já foram realizados com o objetivo de classificar os grupos de *T. cruzi* e com isso posicionar filogeneticamente o ZIII. Através da abordagem proteômica, mais um passo foi dado para uma compreensão da posição de ZIII. Os resultados preliminares podem ser o ponto de partida para um melhor

entendimento da biologia do parasito e para a elucidação da posição de ZIII. Foi possível observar uma diversidade considerável na expressão de proteínas, assim como na intensidade de diversos *spots*. Este foi o primeiro passo nos estudos da obtenção do mapa protéico e expressão de proteínas para ZIII. Comparações entre os mapas protéicos, assim como na expressão diferencial de proteínas de cada forma evolutiva do parasito nos permitirão identificar possíveis alvos candidatos a ação de drogas. Dados proteômicos em conjunto com os dados do genoma de *T. cruzi* fornecerão avanços na compreensão da biologia deste parasito e na identificação de fatores-chave da virulência, de resistência e/ou infectividade.

A análise ao microscópio óptico da cinética de infecção de células VERO pelos diferentes estoques do *T. cruzi*, revelou diferenças quanto ao perfil de infecção das culturas por estes parasitos. A avaliação do percentual de células infectadas mostrou que (i) parasitos SMM36 foi mais infectivo em relação às demais cepas estudadas, (ii) a cepa 3663 e SMM98 foram a que apresentaram menor grau de infecção das culturas. Inicialmente, o processo de interação *T. cruzi*-célula hospedeira envolve uma etapa de adesão do parasito à superfície da célula hospedeira. Todas as formas evolutivas do parasito aderem à célula hospedeira, porém o grau de adesão varia de acordo com a cepa e com a célula hospedeira. Acredita-se que esta adesão aconteça em resposta a um processo de reconhecimento celular, onde glicoproteínas e lectinas, presentes tanto na superfície da célula hospedeira como no parasito, estejam envolvidas (Souza, 2000).

Os dados referentes ao número de parasitos por célula infectada, ao longo da cinética de infecção, mostraram que SMM36 apresentou um substancial incremento em número de parasitos intracelulares em relação às outras cepas estudadas (SMM98, 3663 e 4167). Este fato pode ser devido a uma superior capacidade multiplicativa (amastigotas) deste isolado e/ou a um escape mais rápido dos tripomastigotas do vacúolo parasitóforo (VP) para o citoplasma da célula hospedeira, onde se diferencia para amastigotas, que são as formas multiplicativas do *T. cruzi* em hospedeiros vertebrados. Por outro lado, a cepa 3663 e SMM98 foram a que apresentaram menor capacidade de invadir as células VERO e menor número de parasitos intracelulares em relação a outras cepas de *T. cruzi*, o que pode também refletir um menor potencial multiplicativo desta cepa e/ou um escape mais tardio deste parasito do VP.

Estudos têm revelado interessantes diferenças relacionadas à cinética e aos percentuais de invasão e multiplicação de diferentes estoques do *T. cruzi* em células hospedeiras (Meirelles *et al.*, 1986; 1987; Contreras *et al.*, 1988; Soeiro *et al.*, 1999).

Ensaio realizados com o clone Dm28c mostraram um elevado potencial de infecção e multiplicação intracelular destes parasitos (Soeiro *et al.*, 1999). Estes dados contrastam com o que é observado *in vivo*, pois tripomastigotas de *T. cruzi* II (CL Brener), são altamente infectivos para o hospedeiro vertebrado e induzem alta parasitemia (Ruiz *et al.*, 1998); já os de *T. cruzi* I (clone Dm28c) são pouco infectivos para as células hospedeiras e induzem baixa parasitemia *in vivo* (Ruiz *et al.*, 1998; Zingales *et al.*, 1999). Quando comparamos o perfil de infecção das cepas e isolados de ZIII (3663, 4167, SMM36 e SMM98), observou-se que mesmo estando alocadas dentro do mesmo grupo, possuíam comportamentos diferentes, pois a cepa 4167/SMM36 apresentou um perfil de infecção elevado; já a 3663 e SMM98 obteve uma baixa infectividade quando comparada aos resultados obtidos com as cepas de referência. Os experimentos descritos anteriormente foram realizados com tripomastigotas de cultura, sendo assim, uma correlação segura não poderia ser feita, pois como relatado por Kloetzel (1984) e Toma (2000), variações significativas existem entre tripomastigota de cultura e tripomastigota sanguíneos. As formas tripomastigotas de cultura, por exemplo, não possuem algumas características biológicas relevantes observadas em tripomastigotas sanguíneos, tais como componentes de membrana que podem influenciar na endocitose, interferindo no perfil diferenciado da infecção (Nogueira *et al.*, 1980; Toma *et al.*, 2000). As diferenças entre as cepas, assim como as observadas nos experimentos de infecção e curva de crescimento, podem refletir distintos estados fisiológicos de subpopulações do parasito, além das diversidades fenotípicas e genotípicas.

De uma forma geral, deve-se considerar que a interação parasito-hospedeiro é o resultado da inter-relação entre célula hospedeira alvo e forma evolutiva em questão, lembrando que não só a forma evolutiva é relevante, mas também a origem filogenética do parasito a qual parece exercer uma forte influência neste processo (Mortara *et al.*, 2005).

Além de glicoproteínas de superfície, moléculas secretadas por tripomastigotas metacíclicos devem também participar do processo de invasão celular. Neste trabalho investigamos o envolvimento de cruzipaína, a cisteína protease majoritária de *T. cruzi*, na entrada de formas metacíclicas em cardiomiócitos. Meirelles *et al.* (1992) verificaram que cruzipaína tem participação na invasão de TCT e também na multiplicação intracelular do parasito. Nós observamos que formas metacíclicas do isolados expressam cruzipaína. A participação da cruzipaína na entrada de tripomastigotas metacíclicos da cepa 4167 e SMM36 pôde ser observada através da

inibição da atividade enzimática, o mesmo não foi observado em relação a cepa 3663 e SMM98 frente ao seu baixíssimo índice de infecção. Segundo Scharfstein *et al.* (2000), que utilizaram TCT para os ensaios de invasão celular, o papel da cruzipaina é a de clivar cininogênio e gerar bradicinina que, ao ligar-se ao receptor de bradicinina tipo B2 (B2R), induz sinal de Ca^{2+} na célula hospedeira e propicia a entrada do parasito. Ainda de acordo com esses autores, a ação da cruzipaina deve ocorrer no microambiente formado pela justaposição do parasito com a membrana da célula hospedeira, pois apenas inibidores permeáveis, mas não os solúveis, são capazes de inibir a invasão. Esse mecanismo não é ubíquo, sendo dependente do tipo celular e também da cepa ou clone de *T. cruzi* (Scharfstein *et al.*, 2000; Todorov *et al.*, 2003). A análise global dos resultados gerados neste trabalho e dos dados anteriores sobre o tema permite compreender melhor por que tripomastigotas metacíclicos das cepas e isolados estudados diferem tanto em sua infectividade *in vitro* e *in vivo*.

As formas metacíclicas da cepa CL utilizam preferencialmente a gp82 de sua superfície para aderir à célula hospedeira. Essa ligação constitui a primeira etapa da via que é mais eficiente para a invasão celular produtiva, pois ela desencadeia cascatas de sinalização que promovem eventos facilitadores da invasão, como por exemplo, a desorganização da actina do citoesqueleto da célula hospedeira. Nossos resultados na citometria de fluxo com os isolados mostraram uma expressão diferenciada da gp82, onde a SMM98 apresentou uma menor expressão da mesma. Além disso, proteínas secretadas, como cruzipaina e SAP, podem favorecer ainda mais a entrada do parasito, através de mecanismos que ainda precisam ser esclarecidos. No caso de SAP, que tem atividade sinalizadora de Ca^{2+} (Baida *et al.*, 2006), essa propriedade pode-se somar àquela da gp82 e potencializar o efeito promotor da invasão. Um outro fator que deve contribuir para a maior eficiência infectiva de tripomastigotas metacíclicos da SMM98 é a expressão de baixos níveis de gp90, a glicoproteína de superfície que funciona como regulador negativo da invasão celular (Málaga e Yoshida, 2001), diferentemente da SMM36.

Além de invadir eficientemente as células-alvo, a SMM36 replica muito bem como amastigotas e, entre outros fatores, isto pode ser devido à cruzipaina que, segundo Meirelles *et al.* (1992), tem papel na multiplicação intracelular. Os tripomastigotas metacíclicos da cepa G, que aderem à célula hospedeira de maneira gp35/50-dependente desencadeiam vias de sinalização distintas daquelas acionadas pela cepa CL, embora mobilização de Ca^{2+} aconteça em ambos os casos. A ligação da gp35/50 não leva à

desestruturação do citoesqueleto da célula hospedeira e isto pode representar menor eficiência na internalização do parasito. Para dificultar ainda mais a entrada de formas metacíclicas da cepa G, estas expressam altos níveis de gp90, o modulador negativo da invasão celular, baixos níveis de SAP e a ação da cruzipaina é bloqueada pelo seu inibidor, chagasina. Se as formas metacíclicas da cepa G expressassem uma isoforma de gp90 suscetível à digestão péptica, a sua capacidade infectante por via oral poderia ser considerável. Cortez *et al.* (2006a) mostraram que determinadas cepas de *T. cruzi*, que invadem muito pouco a célula hospedeira *in vitro* por conta dos altos níveis de gp90 em sua superfície, podem ser muito eficientes em invadir o epitélio da mucosa do estômago, devido à degradação de gp90 após contato com o suco gástrico. Contudo, a gp90 da cepa G é resistente à digestão péptica (Covarrubias *et al.*, 2007), o que representa um bloqueio à penetração em células alvo. Além de invadir mal, a cepa 3663 SMM98 apresenta também desenvolvimento intracelular menor que a cepa 4167 e SMM36 *in vitro*, possivelmente em função da ausência de atividade da cruzipaina.

Nos blotting foi possível correlacionar com os resultados de infecção celular, chamando atenção para a SMM36 que conforme a literatura as cepas que apresentam menor expressam de gp90 (1G7) e gp 35/50(10D8) e a SMM98 menos infectiva apresentam maior expressão de gp90 (5E7 e 1G7) e gp 35/50(2B10 e 10D8). Esses dados batem com os dados da literatura em relação ao perfil de expressão dessas glicoproteínas como mostrado por Yoshida, 2006. Yoshida (2006) demonstrou que as cepas pertencentes aos Tc1 e Tc2 apresentam perfis de infecção bem distintos, nossos isolados mesmo pertencentes ao zimodema III apresentaram perfis compatíveis com Tc1 e Tc2 mostrando a complexidade deste grupo. Esses resultados corroboram os demais descritos na literatura e contribui para o conhecimento e registro do perfil de alguns isolados silvestres de *T. cruzi* em regiões ainda não acometidas pela doença.

6. CONCLUSÕES

1. A caracterização molecular utilizando como marcador o gene de mini-exon, confirmou a identidade de todas as cepas utilizadas neste estudo como pertencentes ao Zimodema III
2. A caracterização proteômica das amostras da região amazônica, utilizando a eletroforese bidimensional, possibilitou a obtenção do mapa protéico de proteínas solúveis de formas epimastigotas apresentando uma diversidade considerável na expressão destas proteínas entre as cepas estudadas.
3. Das 55 proteínas das cepas da região amazônica identificadas por espectrometria de massa (25 da cepa 3663 e 30 da cepa 4167) a maioria foi classificada em três grandes grupos funcionais: metabolismo, organização celular e proteína de destino.
4. O perfil proteico dos isolados silvestres obtidos no Rio de Janeiro apresentaram diferenças entre si em relação ao mapa proteico quando comparados com as cepas da região amazônica.
5. Os isolados silvestres obtidos no Rio de Janeiro apresentaram expressão diferenciada de glicoproteínas o que pode explicar a diferença relacionada à virulências destas amostras na infecção *in vivo* obtidos pelo grupo anteriormente.
6. Os resultados comprovam a grande variabilidade genética destas cepas silvestres, sugerindo que esta heterogeneidade possa estar relacionada às várias manifestações clínicas da doença, evidenciando a necessidade de aprofundar os estudos com estas amostras uma vez que representam a real situação dos parasitas na natureza.

7 – Referências Bibliográficas

Abad-Franch F, Monteiro FA, Jaramillo O N, Gurgel-Gonçalves R, Dias FB, Diotaiuti L 2008. Ecology, evolution, and the long-term surveillance of vector-borne Chagas disease: A multi-scale appraisal of the tribe Rhodniini (Triatominae). *Acta Trop* Jun 21 (Epub ahead of print).

Afderheide AC, Salo W, Madden M, Streitz J, Bulkestra J, Guhl F, Arriaza B, Renier C, Wittmers Jr LE, Fornaciari G, Alisson A 2004. A 9,000-years record of Chagas disease. *Proc Nat Acad Sci USA* 101: 2034-2039.

Aguilar HM, Abad-Franch F, Dias JCP, Coura JR 2007. Chagas disease in the Amazon region. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 102: 47-56.

Almeida, ML & Heise, N. 1993. Proteins anchored via glycosylphosphatidylinositol and solubilizing phospholipases in *Trypanosoma cruzi*. *Biol Res*. 26:285-312. Review.

Andrada LO, Andrews NW 2005 The *Trypanosoma cruzi* host cell interplay location invasion,retention *Nat Rev Microbiol* Oct;3(10):819-823

Andrade SG 1974. Caracterização de cepas do *Trypanosoma cruzi* isoladas no recôncavo baiano (Contribuição ao estudo da patologia geral da doença de Chagas em nosso meio). *Rev. Pat. Trop* 3: 65-121.

ANDRADE, LO; Andrews, NW. 2004. Lysosomal fusion is essential for the retention of *Trypanosoma cruzi* inside host cells. *J Exp Med*. 200:1135-1143.

Anônimo (1999). Recommendations from a satellite meeting. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 94, (Suppl. 1), 429-432.

ANÔNIMO. 1999. Recommendations from a satellite meeting. *Mem Inst Oswaldo Cruz*.94: 429-432.

Anonymous 1991. Reunión de Ministros de Salud del MERCOSUR, Brasilia, Junio 1991, *Resolution 04-3-CS*. Montevideo: Mercado Común del Sur.

Aragão MB 1983. Domiciliação de triatomíneos ou pré-adaptação à antropofilia e à ornitofilia? *Rev. Saúde públ.*, São Paulo, 17: 51-55.

Araújo-Jorge TC. 1999 Biology and ultra-structure of *Trypanosoma cruzi*: a 90-year old challenge for scientists. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. ;94 Suppl 1:131-4. Review

ARAUJO-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.

Atwood JA 3rd, Weatherly DB, Minning TA, Bundy B, Cavola C, Opperdoes FR, Orlando R, Tarleton RL 2005. The *Trypanosoma cruzi* proteome. *Science* 309(5733):473-6.

Avila H, Goncalves AM, Nehme NS, Morel CM, Simpson L. Schizodeme analysis of *Trypanosoma cruzi* stocks from South and Central America by analysis of PCR-amplified minicircle variable region sequences. *Mol Biochem Parasitol* 1990;42(2):175-87.

Ayub MJ, Atwood J, Nuccio A, Tarleton R, Levin MJ. 2009 Proteomic analysis of the *Trypanosoma cruzi* ribosomal proteins. *Biochem Biophys Res Commun.* Apr 24;382(1):30-4.

BAIDA, RC; Santos, MR; Carmo, MS; Yoshida, N; Ferreira, D; Ferreira, AT; El Sayed, NM; Andersson, B & da Silveira JF. 2006. Molecular characterization of serine-, alanine-, and proline-rich proteins of *Trypanosoma cruzi* and their possible role in host cell infection. *Infect Immun.* 74:1537-1546.

Banks RE, Dunn MJ, Hochstrasser DF, Sanchez JC, Blackstock W, Pappin DJ, Selby PJ. Proteomics: new perspectives, new biomedical opportunities. *Lancet* 2000;356(9243):1749-56.

Barbosa SE, Belisário CJ, Souza RC, Paula AS, Linardi PM, Romanha AJ, Diotaiuti L 2006. Biogeography of Brazilian populations of *Panstrongylus megistus* (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) based on molecular marker and paleo-vegetational data. *Acta Trop* 99(2-3):144-54.

Bargues MD, Klisiowicz DR, Panzera F, Noireau F, Marcilla A, Perez R, Rojas MG, O'Connor JE, Gonzalez- Candelas F, Galvão C, Jurberg J, Carcavallo RU, Dujardin JP, Mas-Coma S 2006. Origin and phylogeography of the Chagas disease main vector *Triatoma infestans* based on nuclear rDNA sequences and genome size. *Infect Genet Evol* 6(1):46-62.

Barnabe C, Brisse S, Tibayrenc M. Population structure and genetic typing of *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease: a multilocus enzyme electrophoresis approach. *Parasitology* 2000; 120 (Pt 5):513-26.

BARRETT, TV; Hoff, RH; Mott, KE; Miles, MA; Godfrey, DG; Teixeira, R; Almeida de Souza, JÁ & Sherlock, IA. 1980. Epidemiological aspects of three *Trypanosoma cruzi* zymodemes in Bahia State, Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg.*74:84-90.

Barretto MP 1979. Epidemiologia. Em: *Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas. (Brenner, Z. e Andrade, Z. Eds.) Guanabara-Koogan, Brasil.

Bastos CJ, Aras R, Mota G, Reis F, Dias JP, de Jesus RS, Freire MS, de Araújo EG, Prazeres J, Grassi MF. 2010 Clinical outcomes of thirteen patients with acute chagas disease acquired through oral transmission from two urban outbreaks in northeastern Brazil *PLoS Negl Trop Dis.* Jun 15;4(6):Arch Microbiol. Feb;191(2):177-84. doi: 10.1007/s00203-008-0439-6. Epub 2008 Nov 11.

Bayer-Santos E, Gentil LG, Cordero EM, Corrêa PR, da Silveira JF. 2012 *Acta Trop.* 2012 Sep;123(3):230-3. Regulatory elements in the 3' untranslated region of the GP82 glycoprotein are responsible for its stage-specific expression in *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigotes.

Berriman M, Ghedin E, Hertz-Fowler C, Blandin G, Renauld H, Bartholomeu DC, Lennard NJ, Caler E, Hamlin NE, Haas B, Böhme U, Hannick L, Aslett MA, Shallom J, Marcello L, Hou L, Wickstead B, Alsmark UC, Arrowsmith C, Atkin RJ, Barron AJ, Bringaud F, Brooks K, Carrington M, Cherevach I, Chillingworth TJ, Churcher C, Clark LN, Corton CH, Cronin A, Davies RM, Doggett J, Djikeng A, Feldblyum T, Field MC, Fraser A, Goodhead I, Hance Z, Harper D, Harris BR, Hauser H, Hostetler J, Ivens A, Jagels K, Johnson D, Johnson J, Jones K, Kerhornou AX, Koo H, Larke N, Landfear S, Larkin C, Leech V, Line A, Lord A, Macleod A, Mooney PJ, Moule S, Martin DM, Morgan GW, Mungall K, Norbertczak H, Ormond D, Pai G, Peacock CS, Peterson J, Quail MA, Rabbinowitsch E, Rajandream MA, Reitter C, Salzberg SL, Sanders M, Schobel S, Sharp S, Simmonds M, Simpson AJ, Tallon L, Turner CM, Tait A, Tivey AR, Van Aken S, Walker D, Wanless D, Wang S, White B, White O, Whitehead S, Woodward J, Wortman J, Adams MD, Embley TM, Gull K, Ullu E, Barry JD, Fairlamb AH, Opperdoes F, Barrell BG, Donelson JE, Hall N, Fraser CM, Melville SE, El-Sayed NM 2005. The genome of the African trypanosome *Trypanosoma brucei*. *Science* 309(5733): 416-22.

Bisch PM, Genômica Funcional: Proteômica. In: Mir, L (Organizador editorial) Genômica. p. 139-160, Atheneu, São Paulo, 2004.

Bittencourt AL 1976. Congenital Chagas' disease. *American Journal of Diseases of Childhood* 130: 97-103.

Bittencourt AL 1984. Actual aspects and epidemiological significance of congenital transmission of Chagas' disease. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 79 (suppl.): 133-137.

Bittencourt AL, Mota E, Ribeiro-Filho R, Fernandes LG, De Almeida PR, Sherlock I, Maguire J, Piesman J & Todd CW 1985. Incidence of congenital Chagas' disease in Bahia, Brazil. *Journal of Tropical Pediatrics* 31: 242-248.

Bogliolo AR, Chiari E, Silva-Pereira RO *et al.* A comparative study of *Trypanosoma cruzi* enzyme polymorphism in South América. *Brazilian J. Med. Biol. Res.* 1986;19:673-683.

Bonay P, Molina R, Fresno M. 2001 Binding specificity of mannose-specific carbohydrate-binding protein from the cell surface of *Trypanosoma cruzi*. *Glycobiology*. Sep;11(9):719-29.

Borst P, Van der Ploeg M, Van Hoek JFM, Tas J, James J 1982. On the content and ploidy of trypanosomes. *Mol Biochem parasitol* 6: 13-23.

Bosseno MF, Telleria J, Vargas F, Yaksic N, Noireau F, Morin A, Brenière SF. 1996 *Trypanosoma cruzi*: study of the distribution of two widespread clonal genotypes in Bolivian *Triatoma infestans* vectors shows a high frequency of mixed infections. *Exp Parasitol*. Aug;83(3):275-82.

Braga EM, Galvao LM, Chiari E, Martins MS. Difference in susceptibility to lysis between clones of the Y strain of *Trypanosoma cruzi*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1993;88(4):529-34.

Brandão A, Fernandes O 2006. *Trypanosoma cruzi*: Mutations in the 3' untranslated region of calmodulin gene are specific for lineages *T. cruzi* I, *T. cruzi* II, and the Zymodeme III isolates. *Exp Parasitol* 112(4):247-52.

Brener Z, Costa CA, Chiari C. Differences in the susceptibility of *Trypanosoma cruzi* strains to active chemotherapeutic agents. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 1976;18(6):450-5.

Brener Z. (Comparative Studies of Different Strains of *Trypanosoma Cruzi*). *Ann Trop Med Parasitol* 1965;59:19-26.

Brener Z. (Comparative Studies of Different Strains of *Trypanosoma cruzi*. *Ann Trop Med Parasitol* 1965;59:19-26. Brener Z. [Symposium on new approaches in research on American trypanosomiasis]. *Bol Oficina Sanit Panam* 1977;83(2):106-18.

Brenière SF, Bosseno MF, Telleria J, Bastrenta B, Yacsik N, Noireau F, Alcazar JL, Barnabé C, Wincker P, Tibayrenc M. 1998 Different behavior of two *Trypanosoma cruzi* major clones: transmission and circulation in young Bolivian patients. *Exp Parasitol*. Jul;89(3):285-95.

Breniere, S.F., Bosseno, M-F., Telleria, J., Bastrenta, B., Yacsik, N., Noireau, F., Alcazar, J. L., Barnabé, C., Wincker, P., Tibayrenc, M. (1998). Different behavior of two *Trypanosoma cruzi* major clones: transmission and circulation in young bolivian patients. *Experimental Parasitology* 89, 285-295.

Briones, M. R. S., Souto, R. P., Stolf, B. S., Zingales, B. (1999). The evolution of two *Trypanosoma cruzi* subgroups inferred from rRNA genes can be correlated with the interchange of American mammalian faunas in the Cenozoic and has implications to pathogenicity and host specificity. *Molecular and Biochemical Parasitology* 104, 219-232.

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* 2000; 30:35-44.

Brisse S, Dujardin JC, Tibayrenc M. Identification of six *Trypanosoma cruzi* lineages by sequence-characterised amplified region markers. *Mol Biochem Parasitol* 2000;111(1):95-105.

Brisse S, Henriksson J, Barnabe C, Douzery EJ, Berkvens D, Serrano M, De Carvalho MR, Buck GA, Dujardin JC, Tibayrenc M. Evidence for genetic exchange and hybridization in *Trypanosoma cruzi* based on nucleotide sequences and molecular karyotype. *Infect Genet Evol* 2003;2(3):173-83.

Brisse S, Henriksson J, Barnabe C, Douzery EJ, Berkvens D, Serrano M, De Carvalho MR, Buck GA, Dujardin JC, Tibayrenc M. Evidence for genetic exchange and hybridization in *Trypanosoma cruzi* based on nucleotide sequences and molecular karyotype. *Infect Genet Evol* 2003;2(3):173-83.

Brisse S, Verhoef J, Tibayrenc M. Characterisation of large and small subunit rRNA and mini-exon genes further supports the distinction of six *Trypanosoma cruzi* lineages. *Int J Parasitol* 2001;31(11):1218-26.

Brisse S, Verhoef J, Tibayrenc M. Characterisation of large and small subunit rRNA and mini-exon genes further supports the distinction of six *Trypanosoma cruzi* lineages. *Int J Parasitol* 2001;31(11):1218-26.

Brisse, S., Barnabé, C., Tibayrenc, M. (2000). Identification of six *Trypanosoma cruzi* phylogenetic lineages by random amplified polymorphic DNA and multilocus enzyme electrophoresis. *International Journal for Parasitology* 30, 34-44.

Burleigh BA, Andrews NW. 1998 Signaling and host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. *Curr Opin Microbiol.* Aug;1(4):461-5. Review.

BURLEIGH, BA & Andrews, NM. 1998. Signaling and host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. *Curr Opinion Microbiol.* 1: 461-465. Review.

Buscaglia CA, Di Noia JM 2003. *Trypanosoma cruzi* clonal diversity and the epidemiology of Chagas disease. *Microbes Infect* 5: 419-427.

Camargo ME, Silveira GR, Castillo, Silveira AC. Inquerito sorológico da prevalência da infecção chagásica no Brasil. *Rev. Inst. Med. Trop S. Paulo* 1984; 26:196-204.

Cañas JE, Cheng Q, Tian K, Anderson TA. 2006 Optimization of operating conditions for the determination of perchlorate in biological samples using preconcentration/preelution ion chromatography. *J Chromatogr A.* Jan 20;1103(1):102-9.

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.

Carrasco HJ, Torrellas A, García C, Segovia M, Feliciangeli MD 2005. Risk of *Trypanosoma cruzi* I (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) transmission by *Panstrongylus geniculatus* (Hemiptera: Reduviidae) in Caracas (Metropolitan District) and neighboring States, Venezuela. *Int J Parasitol* 35(13):1379-84.

Carvalho TM, Ferreira AG, Coimbra ES, Rosestolato CT, De Souza W. 1999 Distribution of cytoskeletal structures and organelles of the host cell during evolution of the intracellular parasitism by *Trypanosoma cruzi*. *J Submicrosc Cytol Pathol.* Jul;31(3):325-33.

Chagas C 1909. Nova tripanozomíase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1: 159-218.

Clayton c & Shapira M 2007 Post transcriptional regulation of gene expression in trypanosomes and leishmanias. *Mol Biochem parasitol* 156(2):93-101

- CORTEZ, M; Neira, I; Ferreira, D; Luquetti, AO; Rassi, A; Atayde, VD & Yoshida N. 2003. Infection by *Trypanosoma cruzi* metacyclic forms deficient in gp82 but expressing a related surface molecule, gp30. *Infect Immun.* 71:6184-6191.
- CORTEZ, M; Silva, MR; Neira, I; Ferreira, D; Sasso, GR; Luquetti, AO; Rassi, A & Yoshida, N. 2006a. *Trypanosoma cruzi* surface molecule gp90 downregulates invasion of gastric mucosal epithelium in orally infected mice. *Microbes Infect.* 8:36-44.
- Coura JR 1996. Perspectivas actuales del tratamiento específico de la enfermedad de Chagas. *Bol Chil Parasitol* 51: 69-75.
- Coura JR 2007. Chagas disease: what is known and what is needed - a background article. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 102 (Suppl. I): 113-122.
- Coura JR, Ferreira LF, Rubens J, Pereira NC, Silva JR 1966. Tripanosoma do "complexo *cruzi*" em reservatório silvestre no Estado da Guanabara. Estudo de sua patogenicidade. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 8: 125-133.
- Coura JR, Junqueira ACV, Carvalho-Moreira CJ, Borges-Pereira J, Albajar PV 2007. Uma visão sistêmica da endemia chagásica. In AC Silveira, La Enfermedad de Chagas a la Puerta de los 100 Años del Conocimiento de Una Endemia Americana Ancestral, Organización Panamericana de la Salud y Fundación Mundo Sano, Buenos Aires, p. 25-35.
- Coura JR, Junqueira ACV, Fernandes O, Valente SAS, Miles MA 2002. Emerging Chagas disease in Amazonian Brazil. *Trends Parasitol* 18: 171-176.
- Coura JR, Borges-Pereira J, Alves Filho FI, de Castro JA, da Cunha RV, Costa W, Junqueira AC. 1996 Morbidity of Chagas disease in areas of Sertão da Paraíba and Caatinga do Piauí]. *Rev Soc Bras Med Trop.* Mar-Apr;29(2):197-205. Portuguese.
- Coura JR, Dias JC. 2009 Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease: 100 years after its discovery. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* Jul;104 Suppl 1:31-40.
- Coura JR. 1996 Current prospects of specific treatment of Chagas' disease]. *Bol Chil Parasitol.* Jul-Dec;51(3-4):69-75. Review.
- Coura JR. 2006 Transmission of chagasic infection by oral route in the natural history of Chagas disease. *Rev Soc Bras Med Trop.* ;39 Suppl 3:113-7
- COVARRUBIAS, C; Cortez, M; Ferreira, D & Yoshida, N. 2007. Interaction with host de la Fuente AL, Dias-Lima A, Lopes CM, Emperaire L, Walter A, Ferreira A, Sherlock I, Noireau F 2008. Behavioral plasticity of Triatominae related to habitat selection in northeast Brazil. *J Med Entomol* 45(1):14-9.
- Deane MP, Moriearty PL, Thomaz, N. Cell differentiation in trypanosomatids and other parasitic protozoa. In Morel, CM (ed.), *Genes and Antigens of Parasites. A Laboratory Manual.* (2nd ed.) p.11-21. Proceedings of an Internacional Course.

Published on behalf of UNDP/ WORLD BANK/ WHO Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brasil, 1984.

DEANE, M.P; LENZI, H.L; JANSEN, A.M. *Trypanosoma cruzi*: vertebrate and invertebrate cycles in the same mammals host, the opossum *Didelphis marsupialis*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 79: 513-515, 1984a

Degrave WM, Melville S, Ivens A, Aslett M. 2001 Parasite genome initiatives. *Int J Parasitol*. May 1;31(5-6):532-6. Review.

Devera R, Fernandes O, Coura JR. Should *Trypanosoma cruzi* be called “cruzi” complex? A review of the parasite diversity and the potential of selecting populations after in vitro culturing and mice infection. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2003; 98 (1): 1-12.

Di Noia JM, Buscaglia CA, de Marchi CR, Almeida IC, Frasch AC. A *Trypanosoma cruzi* small surface molecule provides the first immunological evidence that Chagas’ disease is due to single parasite lineage. *J exp Med* 2002; 195:401-413.

Dias JCP, Silveira AC, Schofield CJ 2002. The Impact of Chagas Disease Control in Latin America: a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* Vol. 97(5): 603-612.

Dias JC, Silveira AC, Schofield CJ 2002. The impact of Chagas disease control in Latin America: a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 97 (5):603-12.

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

Dias JCP 2000. Epidemiologia. In: Brener Z, Andrade Z, Barral-Netto M (org.). *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan: 48-74.

Dias JCP, Feitosa VR, Ferraz Filho NA, Rodrigues VLC, Alencar AS, Sessa PA 1989. 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* 84: 165-173.

Dias JP, Bastos C, Araujo E, Mascarenhas AV, Araujo RF, Shikanai-Yasuda MA, 2008 Aras R Acute Chagas Disease outbreak associated with oral transmission *Ver. Soc Bras Med Trop* May-Jun;41 (3):296-300

Dias JP, Bastos C, Araújo E, Mascarenhas AV, Martins Netto E, Grassi F, Silva M, Tatto E, Mendonça J, Araújo RF, Shikanai-Yasuda MA, Aras R 2008. Acute Chagas disease outbreak associated with oral transmission. *Rev Soc Bras Med Trop*. May-Jun;41(3):296-300.

Dias JP, Bastos C, de Araújo EG, Mascarenhas AV, Netto E, Grassi F, Silva M, Tatto E, Mendonça J, de Araújo RF, Obara MT, Silva MP, Furuchó C, Aras R. 2006 [Outbreak of acute Chagas disease occurred in the state of Bahia, Brazil]. *Rev Soc Bras Med Trop*.;39 Suppl 3:135-7.

DIAS, E.; FREITAS FILHO, L.; Introdução ao estudo biométrico dos hemoflagelados do gênero *Schizotripanum*. I. Introdução, material e técnica, problema e métodos estáticos. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 38, p. 427-436, 1943.

DOCAMPO, R; Scott, DA; Vercesi AE & Moreno, SN. 1996. The role of Ca²⁺ in the process of cell invasion by intracellular parasites. *Parasitol Today*. 12: 61-65.

Dos Santos CB, Ferreira AL, Leite GR, Ferreira GE, Rodrigues AA, Falqueto A 2005. Peridomestic colonies of *Triatoma vitticeps* (Stal, 1859) (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) infected with *Trypanosoma cruzi* in rural areas of the state of Espírito Santo, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 100(5):471-3.

Dos Santos CB, Ferreira AL, Leite GR, Ferreira GE, Rodrigues AA, Falqueto A 2005. Peridomestic colonies of *Triatoma vitticeps* (Stal, 1859) (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) infected with *Trypanosoma cruzi* in rural areas of the state of Espírito Santo, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 100(5):471-3.

Dowsey AW, Dunn MJ, Yang GZ. The role of bioinformatics in two-dimensional gel electrophoresis. *Proteomics* 2003;3(8):1567-96.

Doyle PS, Dvorak JA, Engel JC. *Trypanosoma cruzi*: quantification and analysis of the infectivity of cloned stocks. *J Protozool* 1984;31(2):280-3.

Dujardin JP, Schofield CJ, Panzera F 2000. Les vecteurs de la maladie de Chagas. Recherches Taxinomiques Biologiques et Genetiques. *Acad R Scienc Natur Méd* 24(5):162.

Dujardin JP, Steindel M, Chavez T, Machane M, Schofield CJ 1999. Changes in the sexual dimorphism of Triatominae in the transition from natural to artificial habitats. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 94:565-9.

Dunn MJ. In Bryce CFA. (ed.), *Microcomputers in Biochemistry: A Practical Approach*, p. 215–242, IRL Press, Oxford, England, 1992.

El-Sayed NM, Myler PJ, Bartholomeu DC, *et al.* 2005. The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. *Science* 309(5733): 409-15.

El-Sayed NM, Myler PJ, Bartholomeu DC, Nilsson D, Aggarwal G, Tran AN, Ghedin E, Worthey EA, Delcher AL, Blandin G, Westenberger SJ, Caler E, Cerqueira GC, Branche C, Haas B, Anupama A, Arner E, Aslund L, Attipoe P, Bontempi E, Bringaud F, Burton P, Cadag E, Campbell DA, Carrington M, Crabtree J, Darban H, da Silveira JF, de Jong P, Edwards K, Englund PT, Fazelina G, Feldblyum T, Ferella M, Frasch AC, Gull K, Horn D, Hou L, Huang Y, Kindlund E, Klingbeil M, Kluge S, Koo H, Lacerda D, Levin MJ, Lorenzi H, Louie T, Machado CR, McCulloch R, McKenna A, Mizuno Y, Mottram JC, Nelson S, Ochaya S, Osoegawa K, Pai G, Parsons M, Pentony M, Pettersson U, Pop M, Ramirez JL, Rinta J, Robertson L, Salzberg SL, Sanchez DO, Seyler A, Sharma R, Shetty J, Simpson AJ, Sisk E, Tammi MT, Tarleton R, Teixeira S, Van Aken S, Vogt C, Ward PN, Wickstead B, Wortman J, White O, Fraser CM, Stuart KD, Andersson B 2005. The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. *Science* 309: 409-15.

El-Sayed, N. M., Myler, P. J., Bartholomeu, D. C. et al. (2005). The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. *Science* 309, 409-415.

Engman DM, Leon JS. Pathogenesis of Chagas heart disease:role of autoimmunity 2002 *Acta Trop* Feb;8(2):123-132

factors exacerbates *Trypanosoma cruzi* cell invasion capacity upon oral infection.

Fampa P, Lisboa CV, Jansen AM, Santos ALS, Ramirez MI 2008. Protease expression analysis in recently field-isolated strains of *Trypanosoma cruzi*: a heterogeneous profile of cysteine protease activities between TcI and TcII major phylogenetic groups. *Parasitology* 135:1093-1100

Fenn JB, Mann M, Meng CK, Wong SF, Whitehouse CM. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science* 1989;246(4926):64-71.

Fernandes O, Mangia RH, Lisboa CV, Pinho AP, Morel CM, Zingales B, Campbell DA, Jansen AM 1999. The complexity of the sylvatic cycle of *Trypanosoma cruzi* in Rio de Janeiro state (Brazil) revealed by the non-transcribed spacer of the mini-exon gene. *Parasitology* 118: 161-166. .

Fernandes O, Mangia RH, Lisboa CV, Pinho AP, Morel CM, Zingales B, Campbell DA, Jansen AM. The complexity of sylvatic cycle of *Trypanosoma cruzi* in Rio de Janeiro state (Brazil) revealed by the non-transcribed spacer of the mini-exon gene. *Parasitology* 1999;118:161-166.

Fernandes O, Santos S, Junqueira A, Jansen A, Cupolillo E, Campbell D, Zingales B, Coura JR. Populational heterogeneity of Brazilian *Trypanosoma cruzi* isolates revealed by the mini-exon and ribosomal spacers. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1999;94 Suppl 1:195-7.

Fernandes O, Santos SS, Cupolillo E, Mendonca B, Derre R, Junqueira AC, Santos LC, Sturm NR, Naiff RD, Barret TV, Campbell DA, Coura JR. A mini-exon multiplex polymerase chain reaction to distinguish the major groups of *Trypanosoma cruzi* and *T. rangeli* in the Brazilian Amazon. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2001; 95(1):97-9.

Fernandes O, Souto RP, Castro JA, Pereira JB, Fernandes NC., Junqueira ACV, Naiff RD., Barret TV, Degrave W, Zingales B, Campbell DA & Coura JR. Brazilian isolates of *Trypanosoma cruzi* from humans and triatomines classified into two lineages using the mini-exon and ribosomal RNA sequences. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 1998a; 58: 807-811.

Fernandes O, Sturm NR, Derré R, & Campbell DA . The mini-exon gene: a genetic marker for zymodeme III of *Trypanosoma cruzi* . *Molecular and Biochemical Parasitology* 1998b; 95:129-133.

Fernandes, O., Mangia, R. H., Lisboa, C. V., Pinho, A. P., Morel C. M., Zingales, B., Campbell, D. A., Jansen, A. M. (1999). The complexity of the sylvatic cycle of *Trypanosoma cruzi* in Rio de Janeiro state (Brasil) revealed by the non-transcribed spacer of mini-exon gene. *Parasitology* 118, 161-166.

Fernandes, O., Souto, R. P., Castro, J. A., Borges, J., Carrara, N., Junqueira, A. C., Naiff, R., Barret, T.V., Degraive, W., Zingales, B., Campbell, D. A., Coura, J. R. (1998). Brazilian isolates of *Trypanosoma cruzi* from humans and triatomines classified into two lineages using mini-exon and ribosomal RNA sequences. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 58, 807-811.

Fievet J, Dillmann C, Lagniel G, Davanture M, Negroni L, Labarre J, de Vienne D. Assessing factors for reliable quantitative proteomics based on two-dimensional gel electrophoresis. *Proteomics* 2004;4(7):1939-49.

Filardi LS, Brener Z. Susceptibility and natural resistance of *Trypanosoma cruzi* strains to drugs used clinically in Chagas disease. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1987; 81(5):755-9.

Freitas JM, Augusto-Pinto L, Pimenta JR, Bastos-Rodrigues L, Goncalves VF, Teixeira SM, Chiari E, Junqueira AC, Fernandes O, Macedo AM, Machado CR, Pena SD. Ancestral genomes, sex, and the population structure of *Trypanosoma cruzi*. *PLoS Pathog* 2006;2(3):e24.

Freitas, J. M., Augusto-Pinto, L., Pimenta, J. R., Bastos-Rodrigues, 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. (2006). Ancestral genomes, sex, and the population structure of *Trypanosoma cruzi*. *PLoS Pathogen* 2, 226-235 (e24).

Galvão C 2003. A sistemática de Triatomíneos (Hemikoptera, Reduviidae), de De Geer ao DNA. *In: II Encuentro Nacional de Entomología Médica y Vetrinária. VII Jornadas de Zoología del Uruguay*, 13–17 de octubre de 2003. *Montevideo Uruguay. Entomología y Vectores* 10: 511–530.

Galvão C 2003. A sistemática de Triatomíneos (Hemikoptera, Reduviidae), de De Geer ao DNA. *In: II Encuentro Nacional de Entomología Médica y Vetrinária. VII Jornadas de Zoología del Uruguay*, 13–17 de octubre de 2003. *Montevideo Uruguay. Entomología y Vectores* 10: 511–530.

Garcia MH, Souza L, Souza RD, Paula AS, Borges EC, Barbosa SE, Schoffield CJ, Diotaiuti L 2005. Occurrence and variability of *Panstrongylus lutzi* in the State of Ceara, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* 38(5): 410-415.

GARCIA, ES & AZAMBUJA, P. 1991. Development and interactions of *Trypanosoma cruzi* within the insect vector. *Parasitol Today*. 7: 240-244.

Gaunt M, Miles M 2000. The ecotopes and evolution of triatomine bugs (Triatominae) and their associated trypanosomes. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 95: 557-565.

Gaunt, M. W., Yeo, M., Frame, I. A., Stothard, J. R., Carrasco, H. J., Taylor, M. C., Mena, S. S., Veazey, P., Miles, G. A. J., Acosta, N., Arias, A. R., Miles, M. (2003). Mechanism of genetic exchange in American trypanosomes. *Nature* 421, 936-939.

Giovanni-de-Simone S, Bonaldo MC, Pinho RT, Pontes-de-Carvalho LC, Galvão-Castro B, Goldenberg S 1988. A study on the amphiphilic proteins of three *Trypanosoma cruzi* populations. *Braz J Med Biol Res* 21(3):435-43.

Gomes SA, Misael D, Silva BA, Feder D, Silva CS, Gonçalves TC, Santos AL, Santos-Mallet JR 2009. Major cysteine protease (cruzipain) in Z3 sylvatic isolates of *Trypanosoma cruzi* from Rio de Janeiro, Brazil. *Parasitol Res* 13.

Gonçalves TCM, Oliveira E, Dias LS, Almeida MD, Nogueira WO, Ávila-Pires FD (1998) An investigation on the ecology of *Triatoma vitticeps* (Stal, 1959) 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, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 93:711–717

Gonçalves TCM, Rocha DS, Cunha R 2000. Feeding patterns of *Triatoma vitticeps* (Stal, 1859) (Hemiptera, Triatominae) in the State of Rio de Janeiro, Brazil. *Rev Saúde Pública* 34: 348-352.

Gonçalves TCM, Victorio VMN, Jurberg J, Cunha V 1989. Biologia do *Triatoma vitticeps* (Stal, 1859) em condições de laboratório (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). II. Resistência ao jejum. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 84: 131-134.

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 vitticeps* (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.

Gonzalez J, Muñoz S, Ortiz S, Anaconda D, Salgado S, Galleguillos M, Neira I, Sagua H, Solari A 1995. Biochemical, immunological, and biological characterization of *Trypanosoma cruzi* populations of the Andean north of Chile. *Exp Parasitol* 81(1):125-35.

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* 2000;21(6):1037-53.

Görg A, Weiss W, Dunn MJ. Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. *Proteomics* 2004; 4: 3665–3685.

Graves PR, Haystead TA. Molecular biologist's guide to proteomics. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2002; 66(1):39-63.

Haberkorn A, Gonnert R. Animal experimental investigation into the activity of nifurtimox against *Trypanosoma cruzi*. *Arzneimittelforschung* 1972;22(9):1570-82.

Hancock W, Apffel A, Chakel J, Hahnenberger K, Choudhary G, Traina JA, Pungor E. Integrated genomic/proteomic analysis. *Anal Chem* 1999;71(21):742A-48A.

Heitman, J. (2006). Sexual reproduction and the evolution of microbial pathogens. *Current Biology* 16, R711–725.

- Henriksson J, Aslund L, Petterson U 1996. Karyotype variability in *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol Today* 12: 108-114.
- Herrera L, D'Andrea PS, Xavier SC, Mangia RH, Fernandes O, Jansen AM. 2005 *Trypanosoma cruzi* infection in wild mammals of the National Park 'Serra da Capivara' and its surroundings (Piauí, Brazil), an area endemic for Chagas disease. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* May;99(5):379-88.
- Hoare CA 1972. *The Trypanosomes of Mammals. A Zoological Monograph.* Blackwell Scientific Publication, Oxford.
- Hoefling, KP; Ikura M. Calmodulin in action: diversity in target recognition and activation mechanisms. *Cell* 2002; 108:739-742.
- Hypša V, Tietz DF, Zrzavy JR, Rego OM, Galvão C & Jurberg J 2002. Phylogeny and biogeography of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae): molecular evidence of a New World origin of the Asiatic clade. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 23: 447–457.
- Inne, S., Pedroso, A., Carmona e Ferreira, R., Briones, M. R. S., Zingales, B. (2010). Network genealogy of 195-bp satellite DNA supports the superimposed hybridization hypothesis of *Trypanosoma cruzi* evolutionary pattern. *Infection, Genetics and Evolution* 10, 601–606.
- Jansen AM, Pinho APS de, Lisboa CV, Cupolillo E, Mangia RH, Fernandes O 1999. The sylvatic cycle of *Trypanosoma cruzi*: a still unsolved puzzle. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 94 (suppl I): 203-204.
- Jonscher KR, Yates JR 3rd. The quadrupole ion trap mass spectrometer--a small solution to a big challenge. *Anal Biochem.* 1997; 244(1):1-15.
- Jurberg C. 2009 Chagas: one hundred years later. *Bull World Health Organ.* 2009 Jul;87(7):491-2
- Karas M, Hillenkamp F. Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Anal Chem.* 1988 Oct; 60(20):2299-301.

Klose J. Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. A novel approach to testing for induced point mutations in mammals. *Humangenetik*; 26(3):231-43.

Kopec KK, Bozyczko-Coyne D, Williams M. Target identification and validation in drug discovery: the role of proteomics. *Biochem Pharmacol* 2005;69(8):1133-9.

Lauria-Pires L, Santana JM, Tavares FS, Teixeira AR. Diversity of *Trypanosoma cruzi* stocks and clones derived from Chagas disease patients: I- Behavioral characterization in vitro. *Rev Soc Bras Med Trop* 1997;30(3):187-92.

Lent A, Wigodzinsky P 1979. Revision of the triatomine (Hemiptera: Reduviidae) and their significance as vectors of Chagas' disease. *Bulletin of the American Museum of Natural History*, art. 3, New York, 520 pp.

Lent H 1942. Transmissores da moléstia de Chagas no estado do Rio de Janeiro. *Rev F de Medicina* 6: 3-13.

Lewis, M. D., Llewellyn, M. S., Gaunt, M. W., Yeo, M., Carrasco, H. J., Miles, M. A. (2009). Flow cytometric analysis and microsatellite genotyping reveal extensive DNA content variation in *Trypanosoma cruzi* populations and expose contrasts between natural and experimental hybrids. *International Journal for Parasitology* 39, 1305–1317.

LEY, V; Andrews, NW; Robbins, ES & Nussenzweig, V. 1988. Amastigotes of *Trypanosoma cruzi* sustain an infective cycle in mammalian cells. *J Exp Méd.* 168:649-659.

Lim MS & Elenitoba-Johnson. Proteomics in pathology research. *Laboratory Investigation* 2004;84:1227-1244.

Lisboa CV, Dietz J, Baker AJ, Russel NN, Jansen AM. 2000 *Trypanosoma cruzi* infection in *Leontopithecus rosalia* at the Reserva Biológica de Poco das Antas, Rio de Janeiro, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* Jul-Aug;95(4):445-52.

Lisboa CV, Xavier SC, Herrera HM, Jansen AM. 2009 The ecology of the *Trypanosoma cruzi* transmission cycle: Dispersion of zymodeme 3 (Z3) in wild hosts from Brazilian biomes. *Vet Parasitol.* Oct 28;165(1-2):19-24. doi: 10.1016/j.vetpar.2009.07.002. Epub 2009 Jul 10.

Lyman DF, Monteiro FA, Escalante A.A, Cordon-Rosales C, Wesson DN, Dujardin JP & Beard CB 1999. Mitochondrial DNA sequence variation among Triatominae vectors of Chagas' disease. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 60: 377–386.

Macedo AM, Pena SDJ 1998. Genetic variability of *Trypanosoma cruzi*: implications for the pathogenesis of Chagas disease. *Parasitol Today* 14:119-123.

- Macedo AM, Vallejo GA, Chiari E, Pena SD. DNA fingerprinting reveals relationships between strains of *Trypanosoma rangeli* and *Trypanosoma cruzi*. *Exs* 1993;67:321-9.
- Machado CA, Ayala FJ. Nucleotide sequences provide evidence of genetic exchange among distantly related lineages of *Trypanosoma cruzi*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98(13):7396-401.
- Machado, C. A., Ayala, F. J. (2001). Nucleotide sequences provide evidence of genetic exchange among distantly related lineages of *Trypanosoma cruzi*. *Proceedings of the National Academy of Sciences. USA* 98, 7396-7401.
- MÁLAGA, S & Yoshida, N. 2001. Targeted reduction in expression of *Trypanosoma cruzi* surface glycoprotein gp90 increases parasite infectivity. *Infect. Immun.* 69: 353-359.
- Marcilla A, Bargues MD, Abad-Franch F, Panzera F, Carcavallo RU, Noireau F, Galvão C, Jurberg J, Miles MA, Durjardin JP & Mas-Coma S 2002. Nuclear rDNA ITS-2 sequences reveal polyphyly of *Panstrongylus* species (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae), vectors of *Trypanosoma cruzi*. *Infection, Genetics and Evolution* 1: 225–235.
- MARTINS, L.P. ; CASTANHO, R.E. ; CASANOVA, C. ; CARAVELAS, D.T. ; FRIAS, G.T; RUAS-NETO, A.L. ; ROSA, J.Á. Rupestrian triatomines infected by Trypanosomatidae, collected in Quaraí, Rio Grande do Sul, 2003. *Rev Soc Bras Med Trop* 39(2):198-202, 2006.
- Massad E 2007. The elimination of Chagas' disease from Brazil. *Epidemiol Infect* 136: 1153-1164.
- Medeiros MB, Guerra JÁ, Lacerda MV. 2008 meningoencephalialitis in patent with acute Chagas disease in Brazilian Amazon *Ver Soc Bras Med Trop Sep-Oct*;41(5):520-521.
- Meirelles, M.N.L., T.C. Araujo-Jorge, C.F. Miranda, W. de Souza, H.S. Barbosa: Interaction of *Trypanosoma cruzi* with heart muscle cells: ultrastructural and cytochemical analysis of endocytic vacuole formation and effect upon myogenesis *in vitro*. *Eur. J. Cell. Biol.* 41, 198-206 (1986).
- Meirelles, M.N.L., T.C. Araujo-Jorge, W. de Souza, A. Moreira, H.S. Barbosa: *Trypanosoma cruzi*: Phagolysosomal fusion after invasion into non professional phagocytic cells. *Cell structure and function* 12, 387-393(1987).
- MELLO, D.A. ; BORGES, M.M. ; CHIARINI, L.H. ; Growth and differentiation in vitro of *Trypanosoma cruzi* strains isolated from wild animals. *Rev Saude Publica* 4(4):569-81, 1980.
- Memórias do Instituto Oswaldo Cruz (2009) 104, (Suppl. 1), 332 páginas.

Mendonca MB, Nehme NS, Santos SS, Cupolillo E, Vargas N, Junqueira A, Naiff RD, Barrett TV, Coura JR, Zingales B, Fernandes O. Two main clusters within *Trypanosoma cruzi* zymodeme 3 are defined by distinct regions of the ribosomal RNA cistron. *Parasitology* 2002;124(Pt 2):177-84.

Metacyclic neutralizing effect of monoclonal antibody 10D8 directed to the 35- and 50-kilodalton surface glycoconjugates of *Trypanosoma cruzi*. *Infect. Immun.* 57: 1663-1667.

Miles M. A., Souza, A., Povia, M., Shaw, J. J., Lainson, R., Tøye, P. J. (1978). Isozymic heterogeneity of *Trypanosoma cruzi* in the first autochthonous patient with Chagas disease in Amazonian Brazil. *Nature* 272, 819-821.

Miles MA, Povia MM, Sousa AA, Lainson R, Shaw JJ & Ketteridge DS. Chagas' disease in the Amazon Basin: II. The distribution of *Trypanosoma cruzi* zymodemes 1 and 3 in the Para state, North Brazil. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 1981; 75: 667-674.

Miles MA, Cedillos RA, Povia MM, de Souza AA, Prata A, Macedo V. Do radically dissimilar *Trypanosoma cruzi* strains (zymodemes) cause Venezuelan and Brazilian forms of Chagas' disease? *Lancet* 1981;1(8234):1338-40.

Miles MA, Cibulskis RE. Zymodeme characterization of *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol Today* 1986;2(4):94-7.

Miles MA, Lanhan SM, Souza AA, *et al.* Further enzymic characters of *Trypanosoma cruzi* and their evaluation for strain identification. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1980;74:221-237.

Miles MA, Sousa A, Povia ME *et al.* Isozymic heterogeneity of *Trypanosoma cruzi* in first autochthonous patients with Chagas' disease in Amazonian Brazil. *Nature* 1978;272:819-821.

Miles MA, Souza A, Povia M, Shaw JJ, Lainson R, Tøye PJ 1978. Isozymic heterogeneity of *Trypanosoma cruzi* in the first autochthonous patients with Chagas' disease in Amazonian Brazil. *Nature* 272(5656): 819-21.

Miles MA, Tøye PJ, Oswald SC, Godfrey DG. The identification by isoenzyme patterns of two distinct strain-groups of *Trypanosoma cruzi*, circulating independently in a rural area of Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1977;71(3):217-25.

Miles, M. A., Lanham, S. M., Souza, A. A., Póvia, M. (1980). Further enzymic characters of *Trypanosoma cruzi* and their evaluation for strain identification. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 74, 221-237.

Miles, M. A., Llewellyn, M. S., Lewis, M. D., Yeo, M., Baleela, R., Fitzpatrick, S., Gaunt, M. W., Mauricio, I. L. (2009). The molecular epidemiology and phylogeography of *Trypanosoma cruzi* and parallel research on *Leishmania*: looking back and to the future. *Parasitology* 136, 1509-1528.

Ministerio da Saude . Secretaria de Vigilancia em Saude do Brasil. Nota Tecnica, 9 de outubro de 2007.

Ministerio da Saude . Secretaria de Vigilancia em Saude do Tocantis. Nota técnica 2009

Moncayo A 2003. Chagas Disease: Current epidemiological trends after the interruption of vectorial and transfusional transmission in the southern cone countries. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 98: 577-591.

Moncayo A, Ortiz Yanise MI 2006. An update on Chagas disease (human American trypanosomiasis). *Ann Trop Med Parasit* 100: 663-667.

Monteiro AC, Schmitz V, Morrot A, de Arruda LB, Nagajyothi F, Granato A, Pesquero JB, Müller-Esterl W, Tanowitz HB, Scharfstein J 2007. Bradykinin B2 receptors of dendritic cells, acting as sensors of kinins proteolytically released by *Trypanosoma cruzi*, are critical for the development of protective type-1 responses. *PLoS Pathog* 3(11):e185.

Monteiro FA, Wesson DM, Dotson EM, Schofield CJ & Beard CB 2000. Phylogeny and molecular taxonomy of the Rhodniini derived from mitochondrial and nuclear DNA sequences. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 62: 460–465.

Morel CM, Deane MP, Goncalves AM. The complexity of *Trypanosoma cruzi* populations revealed by schizodeme analysis. *Parasitol Today* 1986;2(4):97-101.

MORRIS, SA; Tanowitz, H; Hatcher, V; Bilezikian, JP & Wittner, M. 1988. Alterations in intracellular calcium following infection of human endothelial cells with *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol*. 29:213-221.

MORTARA, RA. 1991. *Trypanosoma cruzi*: amastigotes and trypomastigotes interact with different structures on the surface of HeLa cells. *Exp Parasitol*. 73:1-14.

MORTARA, RA; Silva, S; Araguth, MF; Blanco, AS & Yoshida, N. 1992. Involvement of the stage-specific 82-kilodalton adhesion molecule of *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigotes in host cell invasion. *Infect Immun*. 61: 3636-3641

Murta SM, Gazzinelli RT, Brener Z, Romanha AJ. Molecular characterization of susceptible and naturally resistant strains of *Trypanosoma cruzi* to benznidazole and nifurtimox. *Mol Biochem Parasitol* 1998;93(2):203-14.

Murthy VK, Dibbern KM, Campbell DA. PCR amplification of mini-exon genes differentiates *Trypanosoma cruzi* from *Trypanosoma rangeli*. *Mol Cell Probes* 1992;6(3):237-43.

NEIRA, I; Silva, FA; Cortez, M & Yoshida, N. 2003. Involvement of *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigote surface molecule gp82 in adhesion to gastric mucin and invasion of epithelial cells. *Infect Immun*. 71:557-561.

- Neiva A 1914. Presença em uma localidade do Estado do Rio de um novo transmissor da moléstia de Chagas encontrado infectado em condições naturais (Nota prévia). *Brasil Med* 28: 333-335.
- Nogueira N, Chaplan S, Tydings JD, Unkless J, Cohn Z. *Trypanosoma cruzi* surface antigens of blood and culture forms. *J exp Med* 1981;153:629-639.
- Noireau F, Flores R, Gutierrez T, Abad-Franch F, Flores E, Vargas F 2000. Natural ecotopes of *Triatoma infestans* dark morph and other sylvatic triatomines in the Bolivian Chaco. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 94(1):23-7.
- O'Farrell PH. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem.* 1975; 250(10):4007-21.
- Paba J, Santana JM, Teixeira AR, Fontes W, Sousa MV, Ricart CA. Proteomic analysis of the human pathogen *Trypanosoma cruzi*. *Proteomics.* 2004b; 4(4):1052-9.
- Pacheco RS, de Brito CM, Sarquis O, Pires MQ, Borges-Pereira J, Lima MM 2005. Genetic heterogeneity in *Trypanosoma cruzi* strains from naturally infected triatomine vectors in northeastern Brazil: epidemiological implications. *Biochem Genet* 43(9-10):519-30.
- Parodi-Talice A, Duran R, Arrambide N, Prieto V, Pineyro MD, Pritsch O, Cayota A, Cervenansky C, Robello C. Proteome analysis of the causative agent of Chagas disease: *Trypanosoma cruzi*. *Int J Parasitol* 2004;34(8):881-6.
- Patton WF, Schulenberg B, Steinberg TH. Two-dimensional gel electrophoresis; better than a poke in the ICAT? *Curr Opin Biotechnol* 2002;13(4):321-8.
- Paula AS, Diotaiuti L & Schofield CJ 2005, Testing the sister-group relationship of the Rhodniini and Triatomini (Insecta: Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Molecular Phylogenetics Evolution* 35: 712–718.
- Pedroso A, Cupolillo E, Zingales B. Evaluation of *Trypanosoma cruzi* hybrid stocks based on chromosomal size variation. *Mol Biochem Parasitol* 2003;129(1):79-90.
- Patton WF, Schulenberg B, Steinberg TH. Two-dimensional gel electrophoresis; better than a poke in the ICAT? *Curr Opin Biotechnol* 2002;13(4):321-8.
- Pereira CA, Alonso GD, Paveto MC, Iribarren A, Cabanas ML, Torres HN, Flawia MM. *Trypanosoma cruzi* arginine kinase characterization and cloning. A novel energetic pathway in protozoan parasites. *J. Biol. Chem.* 2000; 275: 1495–1501
- Pinto AY, Valente SA, Valente VC 2004. Emerging acute Chagas disease in Amazonian Brazil: case reports with serious cardiac involvement. *Braz J Infect Dis* 8: 454-460.
- Polymorphism of the 35- and 50-kilodalton surface glycoconjugates of *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigotes. *Infect. Immun.* 60: 4673-4678.

Povoa MM, de Souza AA, Naiff RD, Arias JR, Naiff MF, Biancardi CB, Miles MA. Chagas' disease in the Amazon basin IV. Host records of *Trypanosoma cruzi* zymodemes in the states of Amazonas and Rondonia, Brazil. *Ann Trop Med Parasitol* 1984;78(5):479-87.

Rabilloud T. Detecting proteins separated by 2-D gel electrophoresis. *Anal Chem*. 2000; 72(1):48A-55A.

RAMIREZ, MI; Ruiz, Rde C; Araya, JE; Da Silveira, JF & Yoshida, N. 1993. Involvement of the stage-specific 82-kilodalton adhesion molecule of *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigotes in host cell invasion. *Infect Immun*. 61: 3636-3641

Rappsilber J, Mann M. What does it mean to identify a protein in proteomics? *Trends Biochem Sci*. 2002; 27(2):74-8

Ready PD, Miles MA. Delimitation of *Trypanosoma cruzi* zymodemes by numerical taxonomy. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1980;74(2):238-42

Requena JM, Lopez MC, Alonso C 1996. Genomic Repetitive DNA Elements of *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol Today* 12: 279-282.

Richer W, Kengne P, Cortez MR, Perrineau MM, Cohuet A, Fontenille D, Noireau F 2007. Active dispersal by wild *Triatoma infestans* in the Bolivian Andes. *Trop Med Int Health* 12(6):759-64.

Rohwedder RW 1969. Infección chagásica en dadores de sangre y las probabilidades de transmitirla por medio de la transfusión. *Bol Chil Parasitol* 24: 8893.

Rosenfeld J, Capdevielle J, Guillemot JC, Ferrara P. In-gel digestion of proteins for internal sequence analysis after one- or two-dimensional gel electrophoresis. *Anal Biochem*. 1992; 15:203(1):173-9.

Ruiz RC, Favoreto S, Jr., Dorta ML, Oshiro ME, Ferreira AT, Manque PM, Yoshida N. Infectivity of *Trypanosoma cruzi* strains is associated with differential expression of surface glycoproteins with differential Ca²⁺ signalling activity. *Biochem J* 1998;330 (Pt 1):50

RUIZ, R de C; Rigoni, VL, Gonzalez, J & Yoshida, N. 1993. The 35/50 kDa surfaceantigen of *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigotes, an adhesion molecule involved in host cell invasion. *Parasite Immunol*. 15:121-125.

RUIZ, RC; Favoreto, S Jr; Dorta, ML; Oshiro, Me, Ferrreira, AT, Manque, PM & Yoshida, N. 1998. Infectivity of *Trypanosoma cruzi* strains is associated with differential expression of surface glycoproteins with differential Ca²⁺ signalling activity. *Biochem J*.330: 505-511.

SÁNCHEZ-GUILLÉN, MDEL. ; C, BERNABÉ, C.;TIBAYRENC, M.; ZAVALA-CASTRO, J.; TOTOLHUA J.L. ; MÉNDEZ-LÓPEZ, J.; GONZÁLEZ-MEJÍA, M.E., ;TORRES-RASGADO, E.. ; LÓPEZ-COLOMBO, A. ; PÉREZ-FUENTES, R. *Trypanosoma cruzi* strains isolated from human, vector, and animal

reservoir in the same endemic region in Mexico and typed as *T. cruzi* I, discrete typing unit 1 exhibit considerable biological diversity. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 101(6):585-90, 2006.

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. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 85p, 2006.

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* 36: 15-312, 1984.

SILVEIRA, A.C. Profilaxia. In: *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas (Z. Brener, Z.A. Andrade & M. Barral Netto, org.), Rio de Janeiro: Guanabara Koogan Editora, 75-78 pp, 1999.

SILVEIRA, A.C. ; DIAS, J.C.P. O controle da transmissão vetorial. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v 44: Suplemento II, 2011.

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* 83: 141-152, 1996.

Santos PM, Texeira MC, Sá-Correia. 2004. Análise Proteômica Quantitativa na Revelação de Mecanismos de resposta a Stresse químico em microrganismos. Métodos em Biotecnologia – Proteômica Quantitativa.; 7-17.

Santos SS, Cupolillo E, Junqueira A, Coura JR, Jansen A, Sturm NR, Campbell DA, Fernandes O. The genetic diversity of Brazilian *Trypanosoma cruzi* isolates and the phylogenetic positioning of zymodeme 3, based on the internal transcribed spacer of the ribosomal gene. *Ann Trop Med Parasitol* 2002;96(8):755-64.

Santos UM, Pinto AFS, Almeida AZ, Zaganelli FL, Carrancho PV, Netto NA 1969. Doença de Chagas no estado do Espírito Santo. III: Vetores do *Trypanosoma*. *Rev Soc Bras Med Trop* 3: 51-52.

Santos-Mallet JR, Silva CS, Gomes SAO, Oliveira DL, Santos CL, Sousa DM, Oliveira LR, Pinheiro NL, Gonçalves TCM (2008) Molecular characterization of *Trypanosoma cruzi* sylvatic isolates from Rio de Janeiro, Brazil. *Parasitol Res* 103:1041–1045

Saraiva NG, Holguin AF, Cibulskis RE, D'Alessandro A. Divergent isoenzyme profiles of sylvatic and domiciliary *Trypanosoma cruzi* in the Eastern plains, piedmont and highland of Colômbia. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 1987;36:59-69.

SCHARFSTEIN, J; Schmitz, V; Morandi, V; Capella, MM; Lima, AP; Morrot, A; Juliano, L & Muller-Esterl, W. 2000. Host cell invasion by *Trypanosoma cruzi* isopotiated by activation of bradykinin B(2) receptors. *J Exp Med*. 192:1289-1300.

SCHENKMAN, S; Andrews, N; Nussenzweig, V & Robbins, ES. 1988. *Trypanosomacruzi* invade a mammalian epithelial cell in a polarized manner. *Cell*. 55(1): 157-165.

Schmunis GA 1985. Chagas' disease and blood transfusion, p. 127145. In RV Dodd & LF Barker (eds), *Infection, Immunity and Blood Transfusion*, AR Liss, New York.

Schmunis GA 2007. Epidemiology of Chagas disease in non-endemic countries: the role of international migration. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 102 (Supl. I): 75-85.

Schofield CJ & Dolling WR 1993. Bedbugs and kissing-bugs (bloodsucking Hemiptera). In: *Medical Insects and Arachnids* (R. P. Lane & R. W. Crosskey, eds.), pp. 483-516, London: Chapman & Hall.

Schofield CJ 1988. Biosystematics of the triatominae. In: Biosystematics of haematophagous insect. M.W. Service, Clarendon Press, Oxford, p.284-312.

Schofield CJ, Galvão C 2009. Classification, evolution, and species groups within the Triatominae. *Acta Trop* 110(2-3):88-100

Schofield CJ, Maudlin I 2001. Trypanosomiasis control. *Int J Parasitol* 31: 615-620.

Shevchenko A, Wilm M, Mann M. Peptide sequencing by mass spectrometry for homology searches and cloning of genes. *J Protein Chem*. 1997; 16(5):481-90.

Shevchenko A, Wilm M, Vorm O, Mann M. Mass Spectrometric Sequencing of Proteins from Silver-Stained Polyacrylamide Gels. *Anal Chem* 1996; 68: 850-858.

Silber AM, Colli W, Ulrich H, Alves MJ, Pereira CA. Amino acid metabolic routes in *Trypanosoma cruzi*: possible therapeutic targets against Chagas' disease. *Curr Drug Targets Infect Disord*. 2005; 5(1):53-64.

Silva CS 2006. Estudo morfológico e histopatológico de amostras silvestres de *Trypanosoma cruzi* isoladas de *Triatoma vitticeps* (Stal, 1959) no estado do Rio de Janeiro. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 85p

Silva IG 1985. *Influência da temperatura na biologia de 18 espécies de triatomíneos (Hemiptera: Reduviidae) e no xenodiagnóstico*. MSC Thesis, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 169p.

SILVA, C.S; SANTOS-MALLET, J.R, ZICCARDI, M; GONÇALVES, T.C.M. Caracterização morfológica e estrutural de amostras de *Trypanosoma cruzi*, isoladas de *Triatoma vitticeps* no estado do Rio de Janeiro. *Rev Soc Med Trop*, v. 34, supl.1, p. 22, 2001.

- Silveira AC, Rezende DF 1994. Epidemiologia e controle da transmissão vetorial da doença de Chagas. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 27: 11-22.
- Silveira AC, Feitosa VR, Borges R 1984. Distribuição de triatomíneos capturados no ambiente domiciliar, no período 1975/83, Brasil. *Rev Bras Malariol D Trop* 36: 15-312.
- SILVEIRA, A.C. ; DIAS, J.C.P. O controle da transmissão vetorial. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v 44: Suplemento II, 2011.
- 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.
- Sodré CL, Chapeaurouge AD, Kalume DE, de Mendonça Lima L, Perales J, Fernandes O. 2009 Proteomic map of *Trypanosoma cruzi* CL Brener: the reference strain of the genome project.
- Soeiro MNC, Paiva M.M, Barbosa HS, Meirelles MNL, Araújo-Jorge TC .A cardiomyocyte mannose receptor system is involved in *Trypanosoma cruzi* invasion and is down modulated after infection. *Cell Struct Function* 1999; 24: 139-149
- SOUSA, M.A. Morphological characterization of *Trypanosoma cruzi* Chagas, 1909 and its distinction from other trypanosomes. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 94, supl I, p. 205-210, 1999.
- Souto RP & Zingales B. Sensitive detection and strain classification of *Trypanosoma cruzi* by amplification of ribosomal RNA sequence. *Mol. Biochem. Parasitol.*1993; 62: 45-52.
- Souto RP, Fernandes O, Macedo AM, Campbell DA, Zingales B. DNA markers define two major phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol* 1996;83(2):141-52.
- Souto, R. P., Fernandes, O., Macedo, A. M., Campbell, D. A., Zingales, B. (1996). DNA markers define two major phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi*. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 83, 141-152.
- Souto-Padrón T, Campetella OE, Cazzulo JJ, de Souza W 1990. Cysteine proteinase in *Trypanosoma cruzi*: immunocytochemical localization and involvement in parasite-host cell interaction. *J Cell Sci* 96(3):485-90.

Staquicini DI, Martins RM, Macedo S, Sasso GRS, Atayde VD, et al. (2010) Role of GP82 in the Selective Binding to Gastric Mucin during Oral Infection with *Trypanosoma cruzi*. *PLoS Negl Trop Dis* 4(3):

Steindel M, Dias Neto E, de Menezes CL, Romanha AJ, Simpson AJ. Random amplified polymorphic DNA analysis of *Trypanosoma cruzi* strains. *Mol Biochem Parasitol* 1993;60(1):71-9.

Steindel M, Kramer Pacheco L, Scholl D, Soares M, de Moraes MH, Eger I, Kosmann C, Sincero TC, Stoco PH, Murta SM, de Carvalho-Pinto CJ, Grisard EC2008. Characterization of *Trypanosoma cruzi* isolated from humans, vectors, and animal reservoirs following an outbreak of acute human Chagas disease in Santa Catarina State, Brazil. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2008 Jan; 60(1): 25-32.

Stothard JR, Frame IA, Carrasco HJ, Miles MA 1998. On the molecular taxonomy of *Trypanosoma cruzi* using riboprinting. *Parasitology* 117:243–247.

Stothard JR, Frame IA, Carrasco HJ, Miles MA. Temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) analysis of riboprints from *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology* 1998;117 (Pt 3):249-53.

Sturm NR, Vargas NS, Westenberger SJ, Zingales B, Campbell DA. Evidence for multiple hybrid groups in *Trypanosoma cruzi*. *Int J Parasitol* 2003;33(3):269-79.

Sturm, N. R., Campbell D. A. (2009). Alternative lifestyles: The population structure of *Trypanosoma cruzi*. *Acta Tropica*. doi:10.1016/j.actatropica.2009.08.018.

STEINDEL. M. ; DIAS NETO, E. ; DE MENEZES, C.L, ROMANHA, A.J. ; SIMPSON, A.J. Random amplified polymorphic DNA analysis of *Trypanosoma cruzi* strains. *Mol Biochem Parasitol* 60(1):71-9, 1993.

STOTHARD, J.R. ; FRAME, I.A. ;CARRASCO, H.J. ; MILES, M.A . On the molecular taxonomy of *Trypanosoma cruzi* using riboprinting. *Parasitology* 117:243–247, 1998.

TIBAYRENC, M. ; NEUBAUER, K. ; BARNABÉ, C. ; GUERRINI, F. ; SKARECKY, D. ; AYALA,F.J. Genetic characterization of six parasitic protozoa: parity between random-primer DNA typing and multilocus enzyme electrophoresis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 15;90(4):1335-9 , 1993.

Tibayrenc M, Kjellberg F, Arnaud J, Oury B, Breniere SF, Darde ML, Ayala FJ. Are eukaryotic microorganisms clonal or sexual? A population genetics vantage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;88(12):5129-33.

TIBAYRENC, M. ; AYLA, F.J. Isoenzyme variability in *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease: genetical, taxonomical and epidemiological significance. *Evolution* (42): 277-292, 1988.

Toma HK. Seleção de transcritos diferenciais pertencentes às duas linhagens filogenéticas principais de *Trypanosoma cruzi*, RJ.2005.Doutorado [Dissertação em Biologia Parasitária] – Instituto Oswaldo Cruz.

Tartarotti B, Sommaruga R 2006. Seasonal and ontogenetic changes of mycosporine-like amino acids in planktonic organisms from an alpine lake. *Limnology and Oceanography* 51: 1530–1541.

Tibayrenc M, Ayala FJ. Isozyme variability in *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease: genetical, taxonomical, and epidemiological significance. *Evolution* 1988; 42: 277-292.

Tibayrenc M, Kjellberg F, Arnaud J, Oury B, Breniere SF, Darde ML, Ayala FJ. Are eukaryotic microorganisms clonal or sexual? A population genetics vantage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991;88(12):5129-33.

Tibayrenc M, Neubauer K, Barnabe C, Guerrini F, Skarecky D, Ayala FJ. Genetic characterization of six parasitic protozoa: parity between random-primer DNA typing and multilocus enzyme electrophoresis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90(4):1335-9.

Tibayrenc M, Ward P, Moya A. & Ayala FJ . Natural populations of *Trypanosoma cruzi* the agent of Chagas' disease, have a complex multiclonal structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1986;83:1335-1339.

Tibayrenc M. Genetic subdivisions within *Trypanosoma cruzi* (Discrete Typing Units) and their relevance for molecular epidemiology and experimental evolution. *Kinetoplastid Biol Dis* 2003;2(1):12.

Tibayrenc, M. (1995). Population genetics of parasitic protozoa and other microorganisms. *Advances in Parasitology* 36, 47-115.

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

Tibayrenc, M., Ayala, F. J. (1988). Isoenzyme variability in *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease: genetical, taxonomical and epidemiological significance. *Evolution* 42, 277-292.

TODOROV, AG; Andrade, D; Pesquero, JB; Araujo, Rde C; Bader, M; Stewart, J; Gera, L; Müller-Esterl, W; Morandi, V; Goldenberg, RC; Neto, HC & Scharfstein, J.2003. *Trypanosoma cruzi* induces edematogenic responses in mice and invades cardiomyocytes and endothelial cells in vitro by activating distinct kinin receptor (B1/B2) subtypes. *FASEB J.* 17:73-75.

Toma HK. Seleção de transcritos diferenciais pertencentes às duas linhagens filogenéticas principais de *Trypanosoma cruzi*, RJ.2005.Doutorado [Dissertação em Biologia Parasitária] – Instituto Oswaldo Cruz.

Tomazi, L., Kawashita, S. Y., Pereira, P. M., Zingales, B., Briones, M. R. S. (2009). Haplotype distribution of five nuclear genes based on network genealogies and Bayesian inference indicates that *Trypanosoma cruzi* hybrid strains are polyphyletic. *Genetics and Molecular Research* 8, 458-476.

Toye PJ. Isoenzymic differences between culture forms of *Trypanosoma rangeli*, *Trypanosoma cruzi*, and *Trypanosoma lewisi*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1974;68(4):266.

VAGO, AR; Andrade, LO; Leite, AA; d'Avila Reis, D; Macedo, AM; Adad, SJ;Tostes, S Jr; Moreira, MC; Filho, GB & Pena, SD. 2000. Genetic characterization of *Trypanosoma cruzi* directly from tissues of patients with chronic Chagas disease:differential distribution of genetic types into diverse organs. *Am J Pathol.* 156: 1805-1809.

Vessecchi R, Peporine Lopes N, Gozzo F, Dörr A, Murgu M, Lebre D Abreu R, Bustillos O. 2011 NOMENCLATURAS DE ESPECTROMETRIA DE MASSAS EM LÍNGUA PORTUGUESA. *Quim. Nova*, Vol. 34, No. 10, 1875-1887,

Wasinger VC, Cordwell SJ, Cerpa-Poljak A, Yan JX, Gooley AA, Wilkins MR, Duncan MW, Harris R, Williams KL, Humphery-Smith I. Progress with gene-product mapping of the Mollicutes: *Mycoplasma genitalium*. *Electrophoresis* 1995;16(7):1090-4.

WHO - World Health Organization 1998b. Chagas disease. Interruption of transmission in Uruguay. *Weekly Epidemiological Record* 73: 1-4.

WHO - World Health Organization 1999. Chagas disease. Interruption of transmission in Chile. *Weekly Epidemiological Record* 74: 9-11.

WHO - World Health Organization 2000. Chagas disease. Certification of interruption of transmission in Chile. *Weekly Epidemiological Record* 75: 10-12.

WHO - World Health Organization 2002. *Control of Chagas disease*. Second report of the WHO Expert Committee. Technical Report Series No. 905, Geneva, 96 pp.

WHO-World Health Organization 1991. Control of Chagas disease, Technical Report Series, 811. Geneva, 91 pp.

Wilkins MR, Pasquali C, Appel RD, Ou K, Golaz O, Sanchez JC, Yan JX, Gooley AA, Hughes G, Humphery-Smith I, Williams KL, Hochstrasser DF. From proteins to proteomes: large scale protein identification by two-dimensional electrophoresis and amino acid analysis. *Biotechnology (N Y)* 1996;14(1):61-5.

Xavier SS, Sousa AS, Albajar VP, Junqueira ACV, Bóia MN, Coura JR 2006. Cardiopatia chagásica crônica no Rio Negro, Estado do Amazonas. Relato de três novos casos autóctones, comprovados por exames sorológicos, clínicos, radiográficos do tórax, eletro e ecocardiográficos. *Rev Soc Bras Med Trop* 39: 211-216.

Yarlett N, Garofalo J, Goldberg B, Ciminelli MA, Ruggiero V, Sufrin JR, Bacchi CJ. S-adenosylmethionine synthetase in bloodstream *Trypanosoma brucei*. *Biochim Biophys Acta* 1993;1181(1):68-76.

Yates JR 3rd. Mass spectrometry and the age of the proteome. *J Mass Spectrom.* 1998; 33(1):1-19.

Yeo. ; M, Acosta, N. ; Llewellyn, M. ; Sánchez, H. ; Adamson, S. ; Miles, G.A. ; López, E. ; González, N. ; Patterson, J.S. ; Gaunt, M.W. ; De Arias A.R. ; Miles, M.A. Origins of Chagas disease: Didelphis species are natural hosts of *Trypanosoma cruzi* I and armadillos hosts of *Trypanosoma cruzi* II, including hybrids. *Int J Parasitol* 35(2):225-33, 2005.

YOSHIDA, N. 1983. Surface antigens of metacyclic trypomastigotes of *Trypanosomacruzi*. *Infect Immun.* 40:836-839.

YOSHIDA, N. 2006. Molecular basis of mammalian cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. *An Acad Bras Cienc.* 78:87-111. Review.

YOSHIDA, N; Dorta, ML; Ferreira, AT; Oshiro, ME; Mortara, RA; Acosta-Serrano,A; Favoreto, Jr S. 1997. Removal of sialic acid from mucin-like surface molecules of *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigotes enhances parasite-host cell interaction. *Mol Biochem Parasitol.* 84:57-67.

YOSHIDA, N; Favoreto, S Jr; Ferreira, AT & Manque, PM. 2000. Signal transduction induced in *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigotes during the invasion of mammalian cells. *Braz J Med Biol Res.* 33:269-278.

Zeledón R 1974. Epidemiology, modes of transmission and reservoir hosts of Chagas' disease. *Trypanosomiasis and Leishmaniasis with reference to Chagas' disease.* 20 Ciba Foundation Symposium (new series), Amsterdam, p.51-85.

Zingales B, Abuin G, Romanha AJ, Chiari E, Colli W. Surface antigens of stocks and clones of *Trypanosoma cruzi* isolated from humans. *Acta Trop* 1984;41(1):5-16.

Zingales B, Souto RP, Mangia RH, Lisboa CV, Campbell DA, Coura JR, Jansen A, Fernandes O. Molecular epidemiology of American trypanosomiasis in Brazil based on dimorphisms of rRNA and mini-exon gene sequences. *Int J Parasitol* 1998;28(1):105-12.

Zingales B, Stolf BS, Souto RP, Fernandes O, Briones MR. Epidemiology, biochemistry and evolution of *Trypanosoma cruzi* lineages based on ribosomal RNA sequences. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1999;94 Suppl 1:159-64.

Zingales B. 2011 *Trypanosoma cruzi*: um parasita, dois parasitas ou vários parasitas da doença de chagas? *Revista da Biologia (2011) 6b: 44-48*

Zingales B., Souto, R. P., Mangia, R. H., Lisboa, C. V., Campbell, D. A., Coura, J. R., Jansen, A., Fernandes, O. (1998). Molecular epidemiology of american

trypanosomiasis in Brazil based on dimorphism of rRNA and mini-exon gene sequences. *International Journal for Parasitology* 28, 105-112.

Zingales, B., Andrade, S. G., Briones, M. R. S., Campbell, D. A., Chiari, E., Fernandes, O., Guhl, F., Lages-Silva, E., Macedo, A. M., Machado, C. R., Miles, M. A., Romanha, A. J., Sturm, N. R., Tibayrenc, M., Schijman, A. G. (2009). A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 104, 1051-1054.

Zingales, B., Stolf, B. S., Souto, R. P., Fernandes, O., Briones, M. R. S. (1999). Epidemiology, biochemistry and evolution of *Trypanosoma cruzi* lineages based on ribosomal RNA sequences. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 94, 811-814.

ZINGALES. B. ; SOUTO, R.P. ; MANGIA, R.H. ; LISBOA, C.V. ; CAMPBELL, D.A. ; COURA, J.R. ; JANSEN, A. ; FERNANDES, O. Molecular epidemiology of American trypanosomiasis in Brazil based on dimorphisms of r RNA and mini-exon gene sequences. *Int J Parasitol* 28: 105-112, 1998.

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 Suppl 1:159-64, 1999.

ZINGALES, B. *Trypanosoma cruzi*: um parasita, dois parasitas ou vários parasitas da doença de chagas? *Revista da Biologia*, 6b: 44-48, Revisão, 2011- Memórias do Instituto Oswaldo Cruz , 2009.