

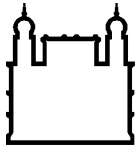
**MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

Curso de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Estresse térmico em formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*: avaliação ultraestrutural, indução de autofagia e manutenção da virulência

RENAN PAZINI BORGES

Rio de Janeiro
Agosto 2016



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Estresse térmico em formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*: avaliação ultraestrutural, indução de autofagia e manutenção da virulência

RENAN PAZINI BORGES

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências na área de Biologia Celular e Molecular.

Orientadores: Rubem F. S. Menna-Barreto
Solange Lisboa de Castro

Rio de Janeiro
Agosto 2016

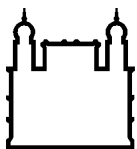
FICHA CATALOGRÁFICA

Pazini-Borges, Renan

Estresse térmico em formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*: avaliação ultraestrutural, indução de autofagia e manutenção da virulência/ Renan Pazini Borges – Rio de Janeiro: 2016, 132 p.; 29,7 cm

Dissertação (Mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Biologia Celular e Molecular, 2016.

- | | | |
|-----------------------------|----------------------------------|---------------------|
| 1. <i>Trypanosoma cruzi</i> | 2. Doença de Chagas | 3. Mitocôndria |
| 4. Autofagia | 5. Espécies reativas de oxigênio | 6. Estresse térmico |



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Estresse térmico em formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*: avaliação ultraestrutural, indução de autofagia e manutenção da virulência

RENAN PAZINI BORGES

Orientadores: Rubem F. S. Menna-Barreto
Solange Lisboa de Castro

Aprovada em: ____/____/____

EXAMINADORES:

Dra. Mirian Cláudia de Souza Pereira (IOC/FIOCRUZ) (presidente)

Dra. Narcisa Leal da Cunha e Silva (IBCCF/UFRJ)

Dr. Eduardo Caio Torres dos Santos (IOC/FIOCRUZ)

Dra. Márcia Cristina Paes (IBRAG/UERJ)

Dra. Helene Santos Barbosa (IOC/FIOCRUZ) (revisora)

Rio de Janeiro, 31 de agosto de 2016

Esta dissertação foi desenvolvida sob orientação dos Drs. Rubem F. S. Menna-Barreto e Solange Lisboa de Castro no Laboratório de Biologia Celular do Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, com o apoio financeiro do Programa de Auxílio a Pesquisa (PAPES) VI/Fiocruz, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ).

“[...] Numa *relax*,
Numa tranquila,
Numa boa [...]”

Tim Maia

AGRADECIMENTOS

Às minhas três mães: Mamãe, Vó Carmelita e Tia Erlizete, mais uma vez obrigado pelas noites de sono perdidas e por sempre me apoiarem nas minhas decisões. Ao meu avô por ser um exemplo a ser seguido.

Agradeço também ao amor da minha vida, Valdo Diu, por todo apoio, carinho e amor nesses anos que estamos juntos. Obrigado pelos abraços carinhosos, beijos saudosos e cafés sem açúcar de todo dia. “Te amo mais que ontem e menos que amanhã”.

Infelizmente não tive irmão de sangue nessa vida, porém fui presenteado com diversos irmãos de alma. Obrigado a todos os moradores, ex-alunos, agregados, calouros e amigos da saudosa República Trem de Doido, pelos momentos de descontração, tal como pelas palavras de sabedoria e ânimo nos momentos mais difíceis. Vocês são especiais demais. Aos meus amigões Satanás e Belzebu, por me ensinarem a ser uma pessoa melhor a cada dia.

Aos meus orientadores, Drs. Rubem Menna-Barreto e Solange Lisboa de Castro, muito obrigado pela paciência, ensinamentos, dedicação, e exemplo de profissionalismo. Jamais irei esquecer de todas lições de cunho profissional e pessoal que aprendi ao longo desses dois anos.

À Dra. Helene Santos Barbosa meu muito obrigado pela revisão realizada no trabalho. Seu trabalho foi fundamental para a conclusão dessa dissertação. Obrigado pela inspiração necessária para o término desse trabalho e pelo exemplo de profissionalismo, que serão para sempre lembrados.

Às minhas florzinhas: Ana Cristina “Cristien”, Marcelle “Pantera” Caminha e “Julianderson”. Meu muito obrigado! Sério, sem vocês a caminhada até aqui seria impossível. Só posso agradecer pelos inúmeros almoços fora da Fiocruz durante a semana (principalmente quando íamos comer hamburguers), pelas horas a fio de conversa, pelas risadas, pela ajuda nas disciplinas e nos assuntos da vida. Vocês são pessoas que faço questão de levar para o resto da minha vida.

A todos os membros do Laboratório de Biologia Celular, em especial à Dra. Maria de Nazaré Soeiro, obrigado pela acolhida e ensinamentos. Meu obrigado também a Marcos Meuser pelo apoio técnico, essencial para o desenvolvimento desse trabalho, tal como à Dra. Renata Stiebler por realizar os experimentos de qPCR.

À Plataforma de Microscopia Eletrônica Rudolf Barth do Instituto Oswaldo Cruz, por ser de grande importância no desenvolvimento do trabalho.

Ao CNPq e Fiocruz, pelo suporte financeiro.

RESUMO

Dissertação de mestrado

Renan Pazini Borges

O *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico da doença de Chagas, se depara com diversas alterações físico-químicas durante seu ciclo de vida, dentre as quais a variação térmica, seja natural ou artificial, que representa uma importante barreira para o sucesso da infecção. Este trabalho tem como objetivo analisar o impacto da variação térmica sobre formas tripomastigotas de *T. cruzi*, e o papel da mitocôndria e da via autofágica em resposta a tal estresse. Como resultados, observamos que a variação térmica tem efeitos deletérios sobre os parasitos, sendo estes lisados rapidamente nas temperaturas de -20 e 40°C, quando comparadas às demais temperaturas estudadas (4, 15, 28 e 37°C). Esta lise é acompanhada por um aumento no número de formas amastigotas-símile, indicando mudança de forma do protozoário induzida pelo estresse. A mitocôndria do *T. cruzi* demonstrou ser sensível à variação térmica, sendo observado um decréscimo no seu potencial de membrana em todas as temperaturas empregadas. Este decréscimo foi brusco a -20 e 40°C, e tempo-dependente a 4, 28 e 37°C. Os dados de qPCR mostraram menor número de transcritos de componentes do metabolismo energético, dentre os quais destacam-se citrato sintase (28°C/24 h), complexos II e III da cadeia transportadora de elétrons (4 e 28°C) e ATP sintase (-20°C/2 h). Esta redução da atividade metabólica do *T. cruzi* induzida pela variação da temperatura não culminou no aumento da produção de ROS, exceto em parasitos submetidos a 4°C por 144 h. A análise ultra-estrutural dos parasitos mantidos a 37, 28 e 4°C a partir de 24 h de incubação indicou a presença de características morfológicas de autofagia, como estruturas membranares concêntricas, autofagossomos, inchaço das cisternas do Golgi, assim como inchaço do retículo endoplasmático. A observação dessas estruturas sugestivas de autofagia foi observada também pela marcação com monodansilcadaverina (MDC), pelo uso do anticorpo contra proteínas Atg8 de *T. cruzi* (TcAtg8), ambas avaliadas por microscopia de fluorescência. Uma intensa marcação do intercalante de fita dupla de DNA TO-PRO foi observada por citometria de fluxo em parasitos submetidos a -20°C por 2 h e 28°C por 144 h, indicando perda da integridade da membrana plasmática, entretanto todas as demais condições apresentaram marcação inferior a 5%. Mesmo com as alterações bioquímicas, morfológicas e estruturais observadas, os parasitos ainda mantêm a infectividade e sustentam a infecção até 72 h em macrófagos peritoneais. Dessa forma, a melhor compreensão dos mecanismos adaptativos do *T. cruzi* frente ao estresse térmico pode fornecer subsídios para o desenvolvimento de novas estratégias de controle do parasito.

ABSTRACT

Dissertação de mestrado

Renan Pazini Borges

Trypanosoma cruzi, the etiological agent of Chagas disease, is challenged by several physical and/or chemical factors during its life cycle, representing thermic variation (natural or artificial) one important barrier to the infection success. The goal of the present work is the analysis of the effect of thermic stress on *T. cruzi* trypomastigotes, as well as the role of the mitochondrion and of the autophagic process during the response to such stress. Thermic variation led to deleterious effects on the parasites, inducing fast lysis at -20 e 40°C, when compared to the other experimental conditions evaluated (4, 15, 28 and 37°C). An increase in the number of amastigote-like form is observed, indicating a shift in the protozoa morphology induced by stress. *T. cruzi* mitochondrion demonstrated to be sensitive to thermic variation, being detected a decrease in its membrane potential in all temperatures investigated. Such reduction was abrupt at -20 e 40°C, and time-dependent at 4, 28 and 37°C. qPCR results showed reduced number of energetic metabolism transcripts, as citrate synthase (28°C/24 h), complexes II and III from electron transport chain (4 and 28°C) and ATP synthase (-20°C/2 h). This reduction in *T. cruzi* metabolic activity induced by the thermic variation does not culminate in ROS production increase, except in parasites submitted at 4°C for 144 h. Ultrastructural analysis of parasites incubated at 37, 28 and 4°C indicated the presence of characteristic autophagic structures, such as concentric membranar structures, autophagosomes and swelling of Golgi cisternae and of endoplasmic reticulum. The appearance of autophagy-suggestive structures was also observed by MDC labelling, and by the use of anti-TcAtg8 antibody, both analyzed by fluorescence microscopy. An intense TO-PRO labeling was observed by flow cytometry in parasites submitted to -20°C for 2 h and 28°C for 144 h, indicating loss of the plasma membrane integrity, however, in all other experimental conditions tested this labelling were lower than 5%. Despite the biochemical, morphological and structural alterations detected, the parasites is still able to infect peritoneal macrophages, sustaining the intracellular cycle up to 72 h. In this context, a better comprehension about *T. cruzi* adaptive mechanisms to the thermic stress can contribute to the development of novel strategies to control the parasite.

LISTA DE ABREVIATURAS

AA = Antimicina A
ADP = Difosfato de adenosine
Atg = Proteína relacionada à autofagia
ATP = Trifosfato de adenosina
BENEFIT = Benznidazole Evaluation for Interrupting Trypanosomiasis
BSA = Albumina sérica bovina
cDNA = DNA complementar
DAPI = 4',6-diamidino-2-phenilindol
DC = Doença de Chagas
DHE = Dihidroetídio
DMSO = Dimetilsulfóxido
DNA = Ácido desoxirribonucleico
DND*i* = Drugs for Neglected Diseases initiative
DTU = *Discrete typing units*
FAD = Flavina adenina dinucleotideo
FADH₂ = Dinucleótido de flavina-adenina
FCCP = Carbonilcianeto 4-(trifluorometoxi)fenilhidrazona
FE = Fosfatidiletanolamina
GAPDH = Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
gRNA = *Guided RNA*
H₂O₂ = Peróxido de hidrogênio
HSP = *Heat shock proteins*
IL-2 = Interleucina tipo 2
IL-4 = Interleucina tipo 4
IV = Índice de variação
kDNA = DNA de cinetoplasto
kDNA = DNA de cinetoplasto
MDC = Monodansilcadeverina
MET = Microscopia eletrônica de transmissão
MEV = Microscopia eletrônica de varredura
mRNA = RNA mensageiro
mTOR = *Mammalian target of rapamycin*
NADH = Dinucleótido de nicotinamida e adenina

NADPH = Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido

NO = Óxido nítrico

NTR = Nitroreduases

OPAS = Organização Pan-americana de Saúde

ORFs = *Open reaging frames*

OsO₄ = Tetróxido de ósmio

PBS = Solução salina tamponada com fosfato

PCR = Reação em cadeia da polimerase

PI3K = Classe-III-fosfatidilinositol 3-quinase

qPCR = Reação em cadeia da polimerase em tempo real

RNA = Ácido ribonucleico

ROS = Espécies reativas de oxigênio

SFB = Soro fetal bovino

SNP = Polimorfismo de único nucleotídeo

TC = Tripomastigotas obtidos de cultura celular

TcAtg8 = Proteína Atg8 de *T. cruzi*

TCD4+ = Linfócito T *helper*

TCD8+ = Linfócito T citotóxico

TMRE = Metil éster de tetrametilrodamina

TS = Tripomastigotas sanguíneos

WHO = World Health Organization

$\Delta\Psi_m$ = Potencial de membrana mitocondrial

ÍNDICE

RESUMO	viii
ABSTRACT	ix
I. INTRODUÇÃO	1
1. Doença de Chagas e <i>Trypanosoma cruzi</i>	2
1.1. Vias de transmissão e controle.....	3
1.1.1. <i>Transmissão vetorial</i>	3
1.1.2. <i>Transmissão transfusional</i>	6
1.1.3. <i>Transmissão oral</i>	9
1.1.4. <i>Transmissão congênita</i>	11
1.1.5 <i>Transmissão sexual</i>	12
1.2. O Parasito.....	13
1.2.1. <i>Diversidade do T. cruzi</i>	16
1.2.2. <i>Organização ultraestrutural</i>	18
1.2.2.1. <u>Cinetoplasto</u>	18
1.2.2.2. <u>Mitocôndria</u>	20
1.2.2.3. <u>Glicossomo</u>	25
1.2.2.4. <u>Acidocalcissomo</u>	25
1.2.2.5. <u>Superfície celular, microtúbulos e flagelo</u>	27
1.2.2.6. <u>Golgi e retículo endoplasmático</u>	28
1.3. A doença e seu tratamento.....	28
1.3.1. <i>Fases da doença</i>	28
1.3.2. <i>Benznidazol</i>	31
1.3.3. <i>Nifurtimox</i>	32
2. <i>T. cruzi</i> e estresse térmico.....	34
3. Autofagia.....	40
3.1. Macroautofagia.....	40
3.2. Microautofagia.....	42
3.3. Autofagia mediada por chaperonas.....	43
3.4. Autofagia em protozoários.....	43
4. Justificativa.....	45

II. OBJETIVOS	46
III. MATERIAIS E MÉTODOS.....	48
1. Parasitos e culturas de células.....	49
2. Avaliação do efeito da temperatura x tempo de exposição sobre os parasitos.....	50
3. Análises por microscopia eletrônica de transmissão e varredura de TC sob estresse térmico.....	50
4. Avaliação da integridade da membrana celular em TC sob estresse térmico.....	51
5. Avaliação da ativação da via autofágica em TC sob estresse térmico.....	52
5.1. <i>Marcação com monodansilcadaverina</i>	52
5.2. <i>Marcação com anticorpo contra TcAtg8</i>	53
6. Avaliação do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) de TC sob estresse térmico.....	53
7. Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) por TC sob estresse térmico.....	54
8. PCR em tempo real em TC sob estresse térmico.....	55
9. Infecção em macrófagos peritoneais por TC submetidos a estresse térmico.....	56
IV. RESULTADOS.....	57
1. Avaliação do efeito da temperatura sobre <i>T. cruzi</i>	58
2. Análise ultraestrutural.....	64
2.1. Microscopia eletrônica de varredura.....	64
2.2. Microscopia eletrônica de transmissão.....	66
3. Avaliação da integridade da membrana celular.....	78
4. Análise de vacúolos ácidos pela marcação com MDC.....	79
5. Marcação com anticorpo contra TcAtg8.....	82
6. Avaliação do potencial de membrana mitocondrial.....	85
7. Avaliação da produção de ROS.....	86
8. Análise por PCR em tempo real (qPCR).....	88
9. Infecção em macrófagos peritoneais.....	90

V. DISCUSSÃO.....	94
VI. CONCLUSÕES.....	101
VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	103

I. INTRODUÇÃO

1. Doença de Chagas e *Trypanosoma cruzi*

Em 1908, Carlos Chagas durante uma expedição para combater a malária, enquanto dissecava o intestino de um triatomíneo hematófago, em busca de patógenos, descreveu pela primeira vez este protozoário. O pesquisador nomeou este novo espécime de *Schizotrypanum cruzi* em homenagem ao seu orientador, o pesquisador brasileiro Oswaldo Cruz, que mais tarde foi classificado como *Trypanosoma cruzi*. Estes estudos foram realizados no então Instituto Soroterápico Federal, localizado na Fazenda de Manguinhos (atual Fiocruz), onde, foi encontrado o tripanosomatídeo na circulação de macacos saguis após 40 dias do contato com o inseto infectado. Cerca de um ano depois, ao analisar o sangue de uma menina de dois anos com o baço dilatado, linfadenopatia e febre recorrente, Chagas encontrou vários protozoários com a morfologia parecida com o novo tripanosomatídeo recém-isolado, sendo capaz assim de relacionar o *T. cruzi* como o agente etiológico da nova doença, nomeada de tripanosomíase americana (Chagas, 1909). Desta forma, este eminente pesquisador brasileiro descreveu o patógeno, vetores, hospedeiros, sintomatologia clínica, espécies reservatórias e epidemiologia, sendo o primeiro, e até o momento, o único a descrever todo o ciclo evolutivo de uma nova doença (Gurgel e cols., 2009).

Esta parasitose passou a ser conhecida como doença de Chagas, e há cerca de 7 milhões de portadores localizados principalmente na América Latina, além de cerca de 100 milhões de pessoas em risco de infecção em todo mundo (WHO, 2015). No início da década de 1990, como consequência de programas transnacionais na América Latina, focados na eliminação do vetor domiciliar e controle do sangue a ser transfundido, houve um decréscimo acentuado na prevalência da doença de Chagas (Moncayo & Silveira, 2009). Os dados epidemiológicos até então mostravam cerca de 70 milhões em 1960, 16-18 milhões em 1990 e 8 milhões em 2006 de pessoas infectadas em todo mundo (Schofield et al., 2006; PAHO, 2010).

Mesmo com os avanços obtidos, novos desafios são encontrados em todo o Mundo, em especial na América Latina, como os surtos agudos decorrentes da ingestão de alimentos contaminados, principalmente na região amazônica (Ianni & Mady, 2005; Pereira e cols., 2009), e a presença de vetores invertebrados da

doença resistentes ao uso de inseticidas na região do Gran Chaco (Germano e cols., 2010).

1.1. Vias de transmissão e controle

A doença de Chagas ao ser descrita teve sua forma de aquisição associada à via vetorial, ou seja, adquirida pelo contato com fezes de triatomíneos hematófagos, contendo formas tripomastigotas metacíclicas. Atualmente sabe-se que diversas são as possibilidades de transmissão da doença, que tem como requisito o contato do parasito com diversos sítios do hospedeiro vertebrado, como mucosas e pele não íntegra, podendo ser citadas, ainda outras vias adicionais de infecção, como a transfusional, oral e congênita (revisto em Dias e cols., 2011).

1.1.1. Transmissão vetorial

Atualmente são descritas cerca de 140 espécies de triatomíneos, agrupados em 19 gêneros (Coura e cols, 2014), sendo que no Brasil até o ano de 2009 foram registradas 64 espécies, dessas 7 possuem impacto na epidemiologia da doença de Chagas: *Triatoma infestans*, *Panstrongylus megistus*, *Rhodnius prolixus*, *Triatoma sordida*, *Triatoma maculata*, *Panstrongylus geniculatus* e *Rhodnius brethesi* (Noireau e cols., 2009). Com exceção do *T. infestans* que foi introduzido no Brasil e é estritamente domiciliar, as outras espécies são nativas de diferentes regiões e são distribuídas de acordo com padrões geográficos específicos. *T. sordida* é encontrado em regiões onde o cerrado é predominante, *P. megistus* encontra-se em áreas costeiras úmidas, com variados graus de contato com o ser humano, e em regiões no interior do país nas margens de rios. *T. braziliensis* e *T. pseudomaculata* são nativos da região semi-árida brasileira (Silveira & Vinhães, 1999).

O ciclo de vida dos triatomíneos consiste de cinco estágios ninfais antes de alcançar a maturidade sexual. O tempo necessário para completar todas as etapas varia de acordo com a espécie, e sua distribuição nos ecotopos varia de acordo com os gêneros. De maneira geral, *Rhodnius* está presente em palmeiras de diversas espécies, *Panstrongylus* em tocas e fendas em árvores e o gênero *Triatoma* é

encontrado com maior facilidade em ambientes rochosos ou árvores ocas (revisto em Noireau e cols., 2009).

A introdução da transmissão doméstica do *T. cruzi* foi facilitada pela habilidade de algumas espécies de triatomíneos se adaptar em regiões com vegetação aberta e desenvolver tropismo por habitações humanas ao longo do tempo (Walsh e cols., 1993). Dessa forma, o *T. infestans*, originário da Bolívia onde é encontrado no ambiente doméstico, peridoméstico e silvestre (Noireau e cols., 2000), foi transportado e inserido no ambiente domiciliar de países vizinhos como Argentina, Chile, Paraguai, Uruguai e Brasil, onde se tornou exclusivamente doméstico (Coura, 2015). Essa espécie habitando principalmente casas de pau-a-pique, que apresentam rachaduras nas paredes e no teto facilitando o albergue de grandes populações do inseto, é considerada o principal vetor da doença de Chagas no Brasil (antes dos controles da transmissão da via vetorial na região do Cone Sul) (Schofield, 1982; Coura & Borges-Pereira, 2012). Desta forma, o desmatamento para construção de propriedades agrícolas teve alto impacto no histórico epidemiológico do parasito, com o aumento na prevalência da doença de Chagas (Walsh e cols., 1993).

Outra espécie de destaque na transmissão vetorial do parasito no Brasil é o *P. megistus*, triatomíneo a partir do qual o *T. cruzi* foi isolado pela primeira vez (revisto em Tartarotti e cols., 1999). Algumas características deste triatomíneo, como sua distribuição por todo território brasileiro, sua susceptibilidade a infecção, e a sua adaptação ao ambiente doméstico, refletem o seu impacto na epidemiologia da doença de Chagas (revisto em Coura, 2015). Villela e colaboradores (2009) relataram uma prevalência de 99,3% de *P. megistus* entre os triatomíneos capturados entre 2003 e 2007 nos municípios do centro-oeste mineiro, estando 8,3% destes infectados com *T. cruzi*,

O *R. prolixus* é o principal vetor na Colômbia, Guiana, Guiana Francesa, Suriname e Venezuela, que teria se distribuído para países da América Central (com exceção do Panamá e Costa Rica), devido a processos passivos, como carregamentos por pássaros e mamíferos (Schofield e cols., 1999), alcançando a Amazônia e países dos Andes e da América Central (Guhl e cols., 2007). Sua importância na transmissão da doença está associada a um conjunto de características como sua antropofilia, ciclo de desenvolvimento rápido, alta

densidade, intensa dispersão e grande susceptibilidade a infecção e transmissão do *T. cruzi* (revisto em Coura, 2015). Sabe-se que iniciativas de eliminação de vetores foram capazes de eliminar o *R. prolixus* de El Salvador, Guatemala, Honduras e Nicaragua (Coura e cols., 2009).

T. sordida foi descrito inicialmente na região central do Brasil, por onde se disseminou rumo ao sul até atingir a Argentina. No Brasil está presente na região que se estende do Rio Grande do Sul até Pernambuco e sudeste do Piauí, ocupando regiões onde o *T. infestans* foi eliminado (revisto em Sherlock, 1999).

T. maculata é o um importante vetor doméstico no Brasil, encontrado em galinheiros e esporadicamente em domicílios em Roraima (Luitgards-Moura e cols., 2005). *P. geniculatus* é encontrado em regiões peridomiciliares, apresentando adaptação ao ambiente doméstico (Valente e cols., 1998). *R. brethesi* é um importante vetor para a doença de Chagas na microregião do Rio Negro (Amazonas), principalmente entre apanhadores de piaçava e seus familiares, onde esta doença é considerada ocupacional (Coura & Junqueira, 2012).

O controle da transmissão pela via vetorial já era uma preocupação desde 1940, quando os primeiros inseticidas organoclorados foram desenvolvidos. Logo foi descoberto que o diclorodifeniltricloroetano (DTT) não tinha eficácia contra os triatomíneos, e dois outros compostos foram aplicados no controle - lindane e dieldrin - que apresentaram maior eficácia quando aplicados nas paredes das casas (revisto em Dias & Schofield, 1999). Em 1980, o uso dos inseticidas piretróides sintéticos deltametrina e ciflutrina foi um grande avanço no controle de triatomíneos devido à menor toxicidade em mamíferos; outras características também estimularam o uso de piretróides, como a ausência de cheiro desagradável e de marcas nas paredes durante a aplicação, com uma melhor relação custo-efeito (revisto em Dias e cols., 2002 e em Sterveding e cols., 2014).

Juntamente com o desenvolvimento de novos inseticidas, diversas campanhas de controle da transmissão vetorial da doença de Chagas foram implementadas. O primeiro programa criado foi o INCOSUR (Iniciativa do Cone Sul), criado em 1991, sendo seguido pelos programas dos Países Andinos, América Central e México e Países Amazônicos apoiados pela Organização Pan-Americana da Saúde/Organização Mundial da Saúde (Schofield et al., 2006; Dias, 2009; Moncayo

& Silveira, 2009; Cevallos & Hernandez, 2014; PAHO, 2014). Tais ações levaram a uma queda drástica na transmissão da doença de Chagas em diversos países sul americanos, principalmente na transmissão relacionada com o *T. infestans* (WHO, 2002). Em 2006, a Comissão Intergovernamental da Iniciativa do Cone Sul contra a doença de Chagas, declarou o Brasil livre da transmissão desta doença pelo *T. infestans* (revisto em Dias & Schofield 1999 e em Steverding, 2014). Porém, com o controle do *T. infestans*, outros triatomíneos que eram considerados vetores secundários, como *T. sordida* e *P. megistus* passaram a dominar o ambiente domiciliar.

1.1.2. Transmissão transfusional

A transmissão pela via transfusional foi primeiro descrita por Mazza e colaboradores (1936), e os primeiros casos no Brasil foram notificados por Freitas e colaboradores (1952) em São Paulo. Este grupo propôs ainda a adição do corante violeta de genciana ao sangue estocado como forma de quimioprofilaxia alternativa complementar ou substitutiva à seleção de doadores por sorologia pré-transfusional contra *T. cruzi* (Dias e cols., 1984; Dias & Schofield, 1998).

O processo de êxodo rural vivenciado fortemente na América Latina no final da década de 1960 aumentou a migração do homem do campo, muitas vezes portador da doença de Chagas, para os grandes centros urbanos presentes em áreas endêmicas ou não, aumentando a transmissão desta doença pela via transfusional (Benjamim e cols., 2012). O aumento do número de bolsas de sangue contaminadas, juntamente com as práticas de controle da transmissão pela via vetorial, foram responsáveis por tornar a transfusão de sangue, contendo formas tripomastigotas, a principal via de transmissão da doença de Chagas na década de 1980 (Moraes-Souza & Ferreira-Silva, 2011).

A partir dos anos 80 houve um grande movimento populacional de latinos para países como Estados Unidos, Canadá, Espanha e Japão impulsionado por questões sociais, econômicas e políticas. Muitos desses imigrantes eram portadores da doença de Chagas, dispersando assim o *T. cruzi* em países não endêmicos, principalmente Estados Unidos e Espanha (Benjamim e cols., 2012). Segundo dados da Organização Mundial de Saúde (WHO, 2009), os Estados Unidos receberam no

ano de 2007 cerca de dezesseis milhões de imigrantes latino-americanos, destes 2% infectados com *T. cruzi*. A Espanha, recebeu até o ano de 2009 quase dois milhões de imigrantes e estima-se que cerca de 87.000 imigrantes eram portadores da doença (aproximadamente 4,7%). Na **Tabela I.1** encontram-se listados os dados epidemiológicos acumulados até 2015 nos países que mais receberam imigrantes latinos e sua relação com a doença de Chagas.

Tabela I.1. Listagens de países fora da América Latina que mais recebem imigrantes latinos

	EUA	Espanha	Itália	Japão	França	Canadá
Nº de imigrantes latinos	22.000.000	2.090.695	440.000	371.700	208.395	100.000
Nº estimado de portadores da doença de Chagas	300.167	47.738-67.423	5.520-7.081	3.592	2116	1.789
Nº de casos confirmados em laboratório	799	3.617	114	46	2	1
Nº de pacientes tratados	nd	195	22	nd	28	Nd
Análise sorológica de bancos de sangue	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim

nd: não determinado. Adaptado de Liu & Zhou (2015).

Na América, a pesquisa de anticorpos contra *T. cruzi* em bolsa de sangue foi iniciada no final da década de 1980, e em países não endêmicos este controle se deu posteriormente: na Inglaterra em 1998, na Espanha em 2005, nos EUA e no Japão em 2007 e no Canadá em 2010 (Yasukawa, 2014). Alguns parâmetros, como o nível de parasitemia do doador, o número e volume das transfusões recebidas, o tempo de acondicionamento da bolsa de sangue na geladeira e o perfil imunológico do receptor da transfusão são parâmetros que alteram o risco do paciente em desenvolver formas sintomáticas da doença. Este risco ocorre entre 12 e 20% em paciente imunocompetentes que recebem uma bolsa de sangue de um paciente na fase aguda (Moncayo & Ortiz, 2006).

Nos países latinos com cobertura sorológica universal (**Tabela I.2**), o risco de transmissão transfusional se restringe aos casos que passam como falsos-negativos

perantes aos testes empregados (a sensibilidade do método é de aproximadamente 99,5%) ou a possíveis erros de interpretação dos resultados. No ano de 2005, a cobertura sorológica já alcançava todos os hemocentros e bancos de sangue no território brasileiro. Ainda assim, das 3,2 milhões de bolsas de sangue obtidas para doação, 107 contaminadas foram liberadas para a transfusão, infectando 13 pessoas com o sangue contendo *T. cruzi* (Moraes-Souza & Ferreira-Silva, 2011).

Tabela I.2. Quadro epidemiológico da doença de Chagas nos países latino-americanos

País	Prevalência de portadores da d. de Chagas (%)	Interrupção da transmissão via vetorial	Cobertura da análise em bancos de sangue	Bolsas de sangue positivas para <i>T. cruzi</i> (%)
Argentina	4,13 - 8,20	Não*	100	4,50
Belize	0,74	Sim	100	0,40
Bolívia	6,75 -15,40	Não	86	9,90
Brasil	0,80 -1,30	Não *	100	0,61
Chile	0,99 -2,80	Sim	75	0,47
Colômbia	0,48 -1,20	Não	99	2,80
Costa Rica	0,53 -11,70	Sim	99	0,98
Equador	0,20 -1,74	Não	100	0,15
El Salvador	3,37- 6,10	Sim	100	2,46
Guatemala	1,98 - 7,89	Sim	100	0,79
Honduras	3,05 -5,80	Sim	100	1,40
México	0,50 - 6,80	Não *	100	1,50
Nicaragua	1,14-1,70	Sim	100	0,49
Panamá	0,01-9,02	Não	98	0,90
Paraguai	0,69 - 9,30	Não *	99	2,80
Peru	0,20 - 3,00	Não *	99	0,26
Uruguai	0,60 - 1,20	Sim	100	0,47
Venezuela	1,16 - 4,00	Não	100	0,67

* Houve eliminação do principal vetor em algumas localidades, ou em todo o país, porém ainda há transmissão por vetores secundários. Adaptado de Liu & Zhou (2015).

1.1.3. Transmissão oral

Esta via de transmissão é provavelmente o mecanismo mais frequente entre as espécies reservatórias da doença de Chagas no ciclo silvestre. Primatas, marsupiais e pequenos mamíferos ao ingerirem triatomíneos, contendo o parasito, se infectam, sendo uma forma de transmissão entre os vetores invertebrados e vertebrados. Transmissão oral foi proposta inicialmente por Chagas (1909), e investigada em modelos animais por outros pesquisadores (Nattan-Larrier e cols., 1921; Cardoso e cols., 1933; Kofoid & Donat, 1933; Marsden, 1967). Shaw e colaboradores (1969) descreveram os primeiros casos de doença de Chagas na fase aguda transmitida provavelmente pela via oral para humanos, na cidade de Belém. E desde então, vários casos agudos transmitidos pela via oral foram descritos na região da Amazônia brasileira, classificando-a como uma região endêmica.

Com os avanços no controle da transmissão vetorial e transfusional, a via oral se tornou a via com maior taxa de transmissão (**Fig. I.1**), sendo responsável por surtos de casos da forma aguda da doença. Estes surtos estão associados ao contato de tripomastigotas com a mucosa oral do vertebrado, via consumo de alimentos contaminados com triatomíneos infectados ou suas fezes, como açaí, ou por meio do consumo de carne mal cozida de espécies reservatórias do *T. cruzi*, ou ainda, pelo contato com secreções da glândula para-anal de marsupiais infectados (revisto em Coura, 2014). Em toda América Latina, mais de 1.000 casos de doença de Chagas transmitida pela via oral foram descritos entre 2000 e 2010, sendo 71% associados com a ingestão de alimentos contaminados (Shikanai-Yasuda & Carvalho, 2012).

O primeiro surto de doença de Chagas, transmitida por via oral para humanos no Brasil, foi descrita em 1986, no município de Catolé da Rocha (Paraíba), onde 26 pessoas foram diagnosticadas, ocorrendo um óbito. Todos os casos estariam associados com o consumo de caldo de cana contaminado, uma vez que fragmentos de triatomíneos foram observados na moenda utilizada para processamento do produto (Shikanai-Yassuda e cols., 1991). Muitos outros surtos foram notificados após este episódio. Por exemplo, na região de Navegantes (Santa Catarina) em 2005, 19 pessoas foram conaminadas com 3 óbitos, onde o compartilhamento de caldo de cana em uma barraca às margens de uma estrada foi associado com a transmissão (Steindel e cols., 2008). Em Ibititanga (região rural da

Bahia), onde a ingestão de sucos preparados com uma possível água contaminada (foi encontrado fragmentos de triatomíneos dentro do reservatório da água da residência) foi associada com a infecção de 6 pessoas, sem mortes até o momento do estudo (Bastos e cols., 2010).

Em modelos experimentais a infecção de camundongos por via oral (injeção de parasitos na cavidade oral) e pela via gástrica (administração de parasitos por gavagem) são eficazes em induzir a forma aguda da doença de Chagas. Recentemente, Barreto-de-Albuquerque e colaboradores (2015) demonstraram que a infecção obtida pela via oral (quando o parasitos eram inoculados diretamente na mucosa oral) gera maior nível de parasitemia e mortalidade, lesões hepáticas mais evidentes, e uma maior expressão de citocinas pro-inflamatórias (IFN- γ e TNF- α), quando comparada à infecção pela via gástrica.(quando os parasitos eram inoculados por gavagem) De maneira semelhante, a via intergástrica de infecção, demonstrou um desenvolvimento mais lento de parasitemia, com pico menos evidente, e menor mortalidade quando comparado com camundongos infectados pela via intraperitoneal. Este estudo mostrou que o sítio de infecção pelo *T. cruzi* interfere no desenvolvimento da resposta imune do hospedeiro e na consequência da doença (Yoshida, 2009).

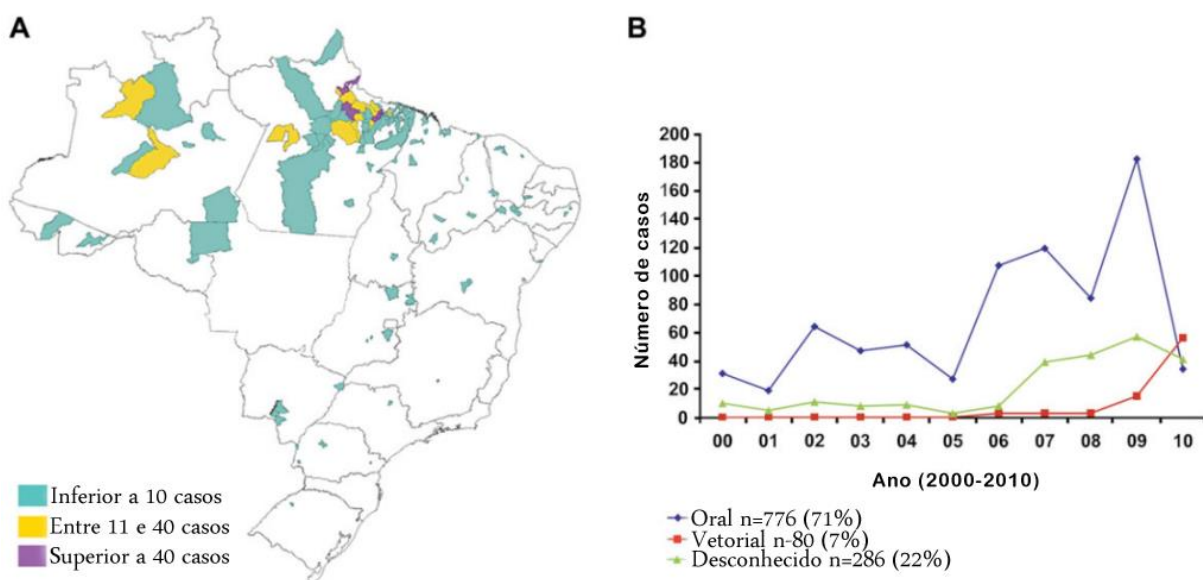


Figura I.1. Casos de doença de Chagas na fase aguda registrados no Brasil entre 2000 e 2010. **(A)** Dispersão destes casos no território brasileiro, sendo que na região amazônica nota-se uma maior prevalência. **(B)** Fases agudas da doença foram relacionadas com o mecanismo de transmissão, notando-se que a via oral tem maior percentual de casos acumulados nos 10 anos (71%) quando comparados à via vetorial (7%) (MS, 2005).

1.1.4. Transmissão congênita

A transmissão congênita se tornou uma fonte importante de novos casos da doença de Chagas, após o sucesso dos programas de controle vetorial e de bancos de sangue (Gebrekristos & Buekens, 2014; Carlier et al., 2015). Das cerca de sete milhões de pessoas portadoras da doença de Chagas dispersas por todo o mundo, aproximadamente metade é composta por mulheres que podem transmitir a infecção para o seu filho durante a gestação (Gurtler e cols., 2003). O número estimado de novos casos de infecção congênita em todo mundo é de 8.668 casos/ano (WHO, 2015). Uma revisão sistemática da literatura até 2012, estimou que as taxas de transmissão vertical são 5 e 2.7% em áreas endêmicas e não endêmicas, respectivamente (Howard e cols., 2014). No Brasil através de levantamento nos bancos de dados *PubMed*, *Web of Science*, *Scopus*, *Science Direct*, *LILACS* e *SciELO*, Martins-Melo e colaboradores (2014) descreveram que em 2010, cerca de 34.500 mulheres grávidas eram portadoras da doença de Chagas, e em média 589 crianças nasceram infectadas com *T. cruzi* (**Fig. I.2**). Uma análise retrospectiva da transmissão congênita confirmou uma prevalência de 2% na região Central e de 5% na região sul do Brasil, similar aos valores encontrados na Argentina, Paraguai e Bolívia (Luquetti e cols., 2015).

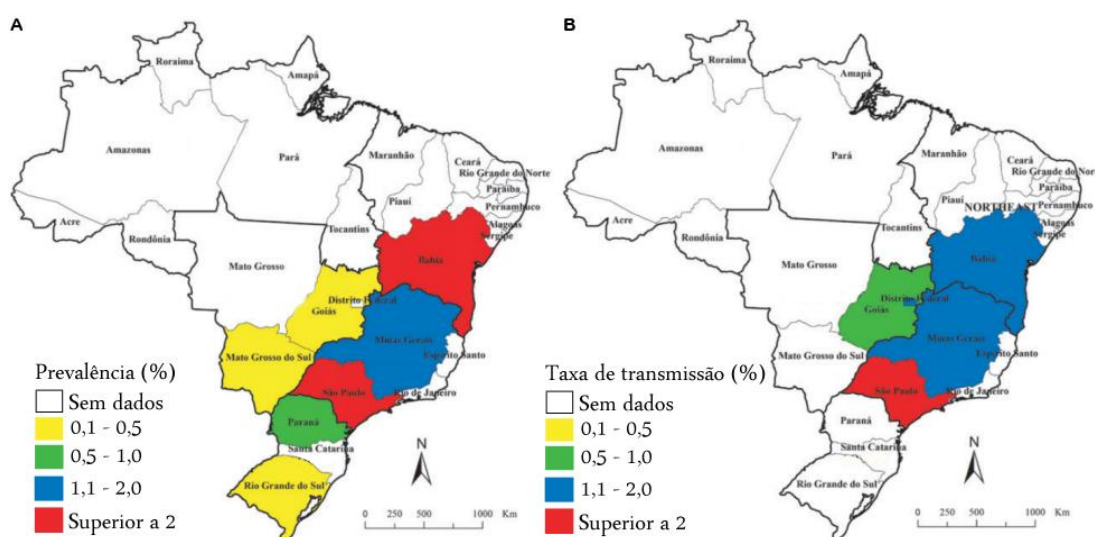


Figura I.2. (A) Distribuição de mães portadoras de doença de Chagas, (B) casos de transmissão da doença pela via congênita reportados no Brasil. Em vários estados casos de doença de Chagas não são notificados, devido à ausência ou pela subnotificação (adaptado de Martins-Melo e cols, 2014).

Em grávidas na fase crônica da doença de Chagas a parasitemia apresenta pequeno aumento de parasitos por volta do segundo ou terceiro trimestres, sendo a carga parasitária significativamente maior entre mulheres que transmitem a doença em comparação às que não transmitem (Rendell e cols., 2015). A taxa de transmissão congênita é muito superior em infecções agudas (cerca de 54% de risco de transmissão) e em casos de co-infecção com HIV (que chega em 100% de risco de transmissão) em comparação com as taxas de transmissão durante a fase crônica (Moretti e cols., 2005; Scapellato e cols., 2009). A mortalidade é alta em casos de infecção aguda, reagudização ou reinfeção durante a gravidez (Scapellato e cols., 2009). O tratamento tripanocida não é indicado durante a gravidez, e o uso de medicamentos com ação sobre o sistema cardiovascular pela gestante portadora da doença de Chagas deve ser realizado sob controle médico (Andrade e cols., 2011).

No caso de infecção congênita as características clínicas são heterogêneas, variando de assintomática (60-90% de recém-nascidos infectados) a casos severos como meningoencefalite, miocardite ou síndrome de estresse respiratório (Bittencourt, 1976; Freilij & Altcheh, 1995; Torrico e cols., 2004). Estudos recentes mostram que a taxa de mortalidade nos casos congênitos, em áreas endêmicas ou não, indicam que a patologia é frequentemente não letal, e o recém-nascido nasce assintomático ou com casos de hepatoesplenomegalia, baixo peso e/ou prematuridade (Oliveira e cols., 2010). O tratamento de crianças infectados durante o primeiro ano de vida garante um sucesso de quase 100% dos casos com baixo risco de efeitos colaterais (Carlier e cols., 2011; Altchech e cols., 2011).

1.1.5. Transmissão sexual

Poucos trabalhos descrevem a via sexual de transmissão da doença de Chagas, porém desde sua descoberta a possibilidade de tal via tem sido sugerida. A descoberta de formas amastigotas em testículos e ovários de crianças infectadas (Vianna, 1911) e no túbulo seminífero (Teixeira e cols., 1970) reforçaram a discussão e suposição da transmissão do parasito pela via sexual.

Além desses relatos, formas tripomastigotas de *T. cruzi* já foram encontradas na menstruação (Jörg & Oliva, 1980), e no trato geniturinário de *Cavia porcellus* infectados (Carvalho e cols., 1991).

Além da presença do parasito em diversas estruturas do trato geniturinário, a inoculação do semên proveniente de camundongos infectados, pela via intraperitoneal, em camundongos saudáveis foi capaz de gerar ninhos de amastigotas em diversos tecidos (Carvalho e cols., 2009).

Hecht e colaboradores (2010), foram capazes de detectar a presença do DNA nuclear de *T. cruzi* no semên de indivíduos infectados em diversas fases da doença de Chagas, fortalecendo a hipótese da transmissão pela via sexual. Recentemente, Martin e colaboradores (2015), após investigarem a presença do parasito em diversos tecidos de camundongas fêmeas imunossuprimidas que cruzaram com camundongos infectados na fase aguda, concluíram que a probabilidade de transmissão sexual macho para fêmea do *T. cruzi* é escassa.

Dessa forma, a transmissão do *T. cruzi* pela via sexual requer mais estudos para demonstrar seu impacto no quadro epidemiológico da doença de Chagas, possibilitando maior entendimento do parasito e do seu ciclo de vida.

1.2. O parasito

T. cruzi é um protozoário flagelado da ordem Kinetoplastida e da família Trypanosomatidae, um grupo de protozoários flagelados que divergiram de outros eucariotos há cerca de 180 milhões de anos atrás, antes do aparecimento de algas vermelhas e fungos (Hedges, 2002). Apresenta uma relação de parasitismo obrigatório com mamíferos e insetos hematófagos da família Reduviidae, como o *R. prolixus*, *T. infestans* e *P. megistus*, conhecidos popularmente no Brasil como “barbeiros”. O parasito apresenta três formas evolutivas distintas (**Fig. 1.3**), sendo duas destas replicativas (epimastigotas presentes nos hospedeiros invertebrados, e amastigotas no hospedeiro vertebrado) e uma infectante (trypomastigota). Diversas cepas têm sido isoladas que apresentam com características distintas, principalmente quanto a sua virulência (de Freitas e cols., 2006).

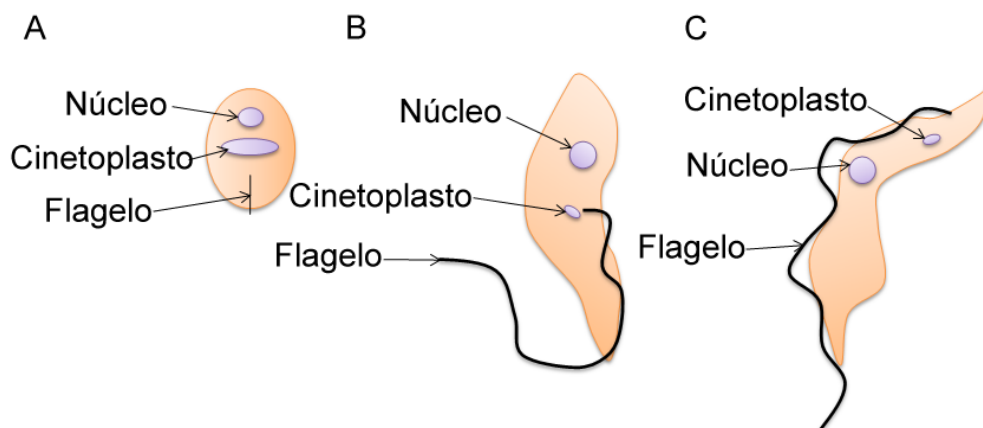


Figura I.3. Representação esquemática das formas evolutivas do *T. cruzi*. (A) Amastigota, (B) Epimastigota, (C) Tripomastigota.

O ciclo de vida do *T. cruzi* é complexo (**Fig. I.4**), apresentando dois hospedeiros e três diferentes estágios de desenvolvimento. Ao se alimentar do sangue de mamíferos infectados, o triatomíneo hematófago ingeri formas tripomastigotas (formação replicativa e infectante, apresentam comprimento aproximado de 20 μm , cinetoplasto localizado na região posterior do núcleo e flagelo livre medindo 7 μm).

Alcançando o intestino médio do inseto, diversos parasitos morrem, e os que resistem se diferenciam para epimastigotas (forma replicativa, medindo entre 20 e 40 μm , com cinetoplasto localizado na região anterior ao núcleo) (Vallejo e cols., 2008). Estas formas aderem ao epitélio intestinal onde iniciam a multiplicação por divisão binária. Após alguns ciclos de divisão celular, os epimastigotas se desprendem do epitélio e migram para a porção final do aparelho digestivo do inseto denominada ampola retal onde há acúmulo de excretas. Neste local, os parasitos se diferenciam, dando origem às formas tripomastigotas metacíclicas. Esse fenômeno de conversão de formas recebe o nome de metaciclogênese (Contreras e cols., 1985).

Ao se alimentar do sangue de um vertebrado, o triatomíneo excreta nas suas fezes formas tripomastigotas metacíclicas, que penetram pela ocasionada pela picada do inseto, ou até mesmo por mucosas íntegras, podendo invadir qualquer célula nucleada. Uma vez no interior da célula, os tripomastigotas escapam no vacúolo parasitóforo recém-formado e se convertem na forma replicativa presente no hospedeiro vertebrado: os amastigotas (apresentam um pequeno flagelo não

aparente em microscopia óptica, medindo entre 2 e 7 μm). Após vários ciclos reprodutivos, os parasitos sofrem novamente uma diferenciação para formas tripomastigotas, que são liberadas durante a ruptura da célula hospedeira, podendo invadir outras células e tecidos através da corrente sangüínea, ou serem ingeridas pelo inseto vetor, no qual irão se diferenciar para epimastigotas, completando assim o ciclo de vida do *T. cruzi* (Tyler & Engman, 2001).

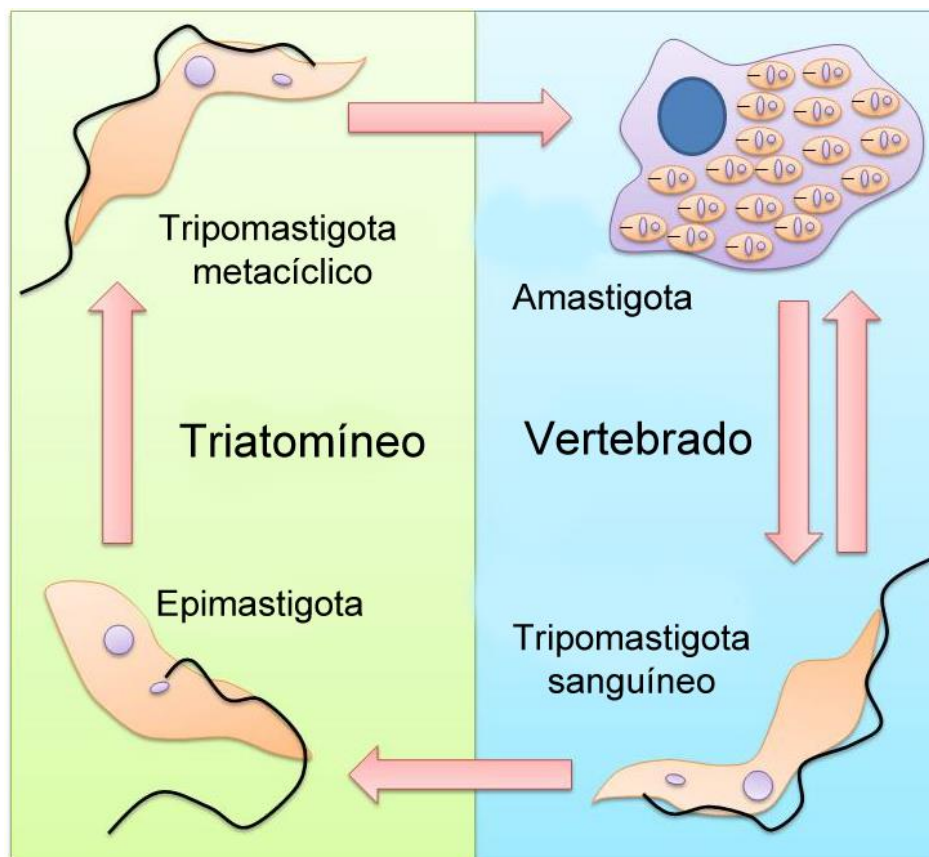


Figura I.4. Formas tripomastigotas são ingeridas durante a alimentação do triatomíneo. No sistema digestório do inseto, se convertem em epimastigotas, aderem ao epitélio internal e se multiplicam por divisão binária. Após alguns ciclos de divisão, se desprezem do epitélio e migram para a ampola retal onde se diferenciam em formas metacíclicas, infectantes para hospedeiros vertebrados. Tais formas são excretadas juntamente com as fezes do barbeiro durante sua alimentação podendo infectar qualquer célula nucleada do hospedeiro vertebrado. No interior desta célula, os tripomastigotas se diferenciam, originando as amastigotas, que são as formas replicativas no hospedeiro vertebrado. Após alguns ciclos de divisão, as amastigotas voltam a se diferenciar, originando os tripomastigotas que rompem a célula e alcançam a circulação, infectando novas células (Chagas, 1909).

1.2.1. Diversidade do *T. cruzi*

Estudos de genética de populações explicam as divergências biológicas dentre os parasitos que perfazem a espécie *T. cruzi*, sendo bem evidente nas populações localizadas em regiões geográficas distintas. Algumas destas diferenças interferem diretamente no quadro patológico da doença de Chagas (Campbell e cols., 2004). Tal diversidade é notada principalmente em alguns parâmetros, como morfologia, resistência ao tratamento tripanocida, exposição de antígenos superficiais, virulência e tendência por parasitar certo tipo tecidual (Krettli & Brener, 1982; Andrade, 1985; Brener, 1977; Toledo e cols., 2003, 2004).

Quando se observou essas diferenças entre as populações do parasito, houve a necessidade de agrupá-los. A primeira forma de classificação envolvia parâmetros como morfologia do parasito, parasitemia, tropismo e lesões teciduais e virulência em camundongos infectados. Assim, de acordo com estes parâmetros as populações foram classificadas em três grupos: tipo I ou biodema I (representada pela cepa Y, constituído por cepas com parasitemia elevada, e morte do camundongo entre 7 e 12 dias após a infecção, com parasitos apresentando tropismo por macrófagos), tipo II (sua referência é a cepa São Felipe), agrupando populações com miocardiotropismo, multiplicação lenta em camundongos e pico de parasitemia entre 12 e 20 dias, elevado índice de mortalidade nesse período), e o tipo III (caracterizado pela cepa Colombiana, agrupando parasitos com multiplicação lenta, com pico de parasitemia tardio - ocorrendo entre 20 e 40 dias após a infecção -, tropismo pela musculatura esquelética e baixo índice de mortalidade (revisto em Devera e cols., 2003).

A variação de genótipos e fenótipos, gerada pela diversidade biológica nas populações do *T. cruzi*, possibilita uma nova forma de classificação para as populações do parasito de acordo com a variação genética em seis grupos designados DTUs (*discrete typing units*): TcI, TcII, TcIII, TcIV, TcV e TcVI (revisto em Zingales e cols., 2012). O *T. cruzi* é predominante diplóide e sua replicação celular se dá por fissão binária (processo assexuado). Assim, a formação de um novo DTU é dada pelo acúmulo de mutações discretas (não envolvendo eventos de troca gênica) (Gaunt e cols., 2003). Entretanto, algumas linhas de pesquisas indicam a presença de genes heterozigotos, principalmente no TcV e TcVI, sugerindo que tais

DTU são híbridas e derivadas da TcII e TcIII, ao passo que as demais DTUs (TcI, TcII, TcIII e TcIV) apresentam alelos homozigóticos (Sturm & Campbell, 2010).

A análise de polimorfismos de único nucleotídeo (SNP) por sequenciamento entre as seis classes de DTU apontou para quatro classes diferentes de sequência de DNA, denominadas halogrupos (Broutin e cols., 2006). Dois destes estão presentes no TcV e TcVI, e os alelos presentes no TcII e TcIII apresentam similaridade com os halogrupos TcV e TcVI, o que confirma que TcII e TcIII como os mais prováveis tipos parentais de TcV e TcVI (Yeo e cols., 2011; Lewis e cols., 2011). A relação entre DTUs distintas se dá por mecanismos de carreamento, como a migração de mamíferos, induzidas muitas vezes pelas mudanças climáticas que interferem nos habitats dos vetores (Miles e cols., 2009).

A distribuição geográfica e principais características das DTUs, segundo Zingales e colaboradores (2012), encontram-se resumidas na **Tabela I.3**.

Tabela I.3. Distribuição geográfica e principais características das DTUs de *T. cruzi*

	Distribuição geográfica	Principais características
TcI	Toda América	Associada com cardiomiopatia chagásica
TcII	Sul e centro da América do Sul	Associada a danos cardíacos e gastrointestinais concomitantemente, e resistência ao tratamento tripanocida
TcIII	Brasil e países vizinhos	Infecções humanas são raras, sendo relacionado com o ciclo silvestre do <i>T. cruzi</i>
TcIV	Brasil e países vizinhos, ausente somente na região do Chaco.	Infecta o homem, sendo o maior responsável pela transmissão da doença de Chagas na Venezuela
TcV	Sul e centro da América do Sul	Associado a transmissão pela via congênita
TcVI	Sul e centro da América do Sul	Ainda não elucidado devido problemas relacionados a genotipagem

1.2.2. Organização ultraestrutural

O *T. cruzi* apresenta diversas formas evolutivas durante seu ciclo de vida, que são caracterizadas por morfologias específicas, mantidas por uma camada de microtúbulos adjacentes a membrana plasmática denominados microtúbulos subpeliculares. O parasito possui organização precisa de microtúbulos e filamentos, que auxiliam na distribuição das organelas únicas, como mitocôndria, flagelo e, contribuindo na caracterização de cada uma de suas formas (Gull, 1999).

As primeiras tentativas de analisar o *T. cruzi* em microscopia eletrônica de transmissão foram realizadas por Hertha Meyer em 1950, sem o auxílio de cortes ultrafinos. Nessa época foi possível detectar estruturas como o flagelo e o corpo celular, e a presença de microtúbulos subpeliculares (Meyer & Porter, 1954). Os desenvolvimento de ultramicrotômos, de procedimentos de emblocamento do material biológico e contrastação com metais pesados possibilitaram a obtenção de cortes ultrafinos ao final da década de 1950, e com isso a elucidação de estruturas celulares de diferentes eucariotos incluindo o *T. cruzi* (revisto em De Souza, 2008a,b).

1.2.2.1. Cinetoplasto

Em 1958, foi identificada uma estrutura eletrondensa, ligeiramente curva, que até então era definida como cinetonúcleo, e atualmente é definida como cinetoplasto, que é situado próximo ao núcleo, tendo forma e organização estrutural variando de acordo com a forma evolutiva do parasito. Estudos ultraestruturais e bioquímicos realizados entre 1958 e 1968 apontaram que o cinetoplasto é composto por material genético, denominado DNA de cinetoplasto (kDNA) (Meyer e cols., 1958; Steinert e cols., 1958; Burto & Dusanic, 1968; Anderson & Hill, 1969).

Cerca de 30% de todo material genético do *T. cruzi* é composto pelo kDNA, sendo composto de moléculas circulares, interligadas formando apenas uma rede filamentosa. Tais estruturas podem ser de dois tipos: mini- e maxicírculos. Vários minicírculos formam a estrutura do kDNA, variando seu tamanho entre 0,5 e 2,5 kb, já os maxicírculos se apresentam em menor número, e seu tamanho varia entre 20 e 40 kb (revisto em Shapiro & Englund, 1995). Os maxicírculos apresentam função semelhante ao DNA mitocondrial dos demais eucariotos, codificando RNA

ribossomal e subunidades dos complexos da cadeia respiratória e seu processo de transcrição requer a ação de topoisomerases II, DNA polimerase, primases e ribonucleases (Liu & Englund, 2007).

O tamanho dos minicírculos varia entre as espécies de tripanosomatídeos, porém sua sequência varia até no mesmo organismo (Stuart, 1983). Minicírculos de todas as espécies contêm uma pequena região conservada (que varia em tamanho e número de cópias em diferentes espécies) e um grande domínio não conservado que varia entre os minicírculos (Avliyakov e cols., 2003). Tais domínios podem codificar *guides* RNA, que atuam adicionando ou removendo uridinas ao RNA mensageiro, interferindo no processo de transcrição originado das sequências contidas nos maxicírculos (Avila & Simpson, 1995).

A maior parte das proteínas mitocondriais (cerca de 95%) é codificada no núcleo, sintetizada e sofre alterações pós transcricionais no citoplasma e são importadas para a mitocôndria (revisto em Fidalgo & Gille, 2011). Os outros 5% (cerca de 18 proteínas) são codificadas no kDNA, destas 13 são codificadas nos maxicírculos (que corresponde a 10% da massa total do kDNA): citocromo b, subunidades I-III da citocromo oxidase, subunidade 6 da ATP sintase, seis subunidades da NADH desidrogenase, uma proteína ribossomal e cinco ORFs (*open reading frames*) com função desconhecida, os demais 90% da massa do kDNA corresponde aos minicírculos e se relacionam com a transcrição de gRNA (*guide* RNA) (Schneider, 2011).

Os minicírculos codificam 12 criptogenes (genes “não funcionais”) que mesmo após transcritos, não conseguem ser traduzidos. Para que sua ação seja concluída há necessidade que uma cascata de reações atue sobre o transcrito, com o objetivo de adicionar resíduos de uracilas, gerando dessa forma ORFs possibilitando a alteração do RNA por mecanismos complexos de edição gênica dependente da ação de moléculas de gRNA, tal fenômeno só ocorre em protozoários da ordem Kinetoplastidea (revisto em Aphasizhev & Aphasizheva, 2014).

Foi demonstrado por Ogbadoiyi e colaboradores (2003), a presença de proteínas que conectam o kDNA ao corpo basal, determinando a posição do cinetoplasto, a região celular onde o corpo basal é localizado e, conseqüentemente, a posição de origem do flagelo. O kDNA tem carga predominantemente negativa,

inibida pela ação de duas proteínas: a p166 (Zhao e cols., 2008) e histonas do tipo H1 (Cavalcanti e cols., 2004). A ação de tais proteínas possibilita a interação entre os filamentos de kDNA e a formação de estruturas compactas. O kDNA se localiza em uma porção vacuolar especializada, na matriz mitocondrial, em posicionamento perpendicular ao eixo do flagelo. No *T. cruzi*, a posição do cinetoplasto muda de acordo com a forma de desenvolvimento do parasito, porém mantendo sempre a proximidade com o corpo basal (Souto-Padron e cols., 1984).

Há também diferenças quanto a forma do cinetoplasto presente em cada forma do parasito, sendo utilizado como diagnóstico da forma o parasito se encontra, por exemplo, o cinetoplasto de formas amastigotas e epimastigotas apresentam morfologia semelhante, com o material filamentoso empacotado em um disco convexo de aproximadamente 1 µm de comprimento e 0,1 µm de largura, podendo se apresentar na forma de dupla camada, ao passo que em formas tripomastigotas o cinetoplasto se apresenta menos condensado, com aspecto semelhante a cesto (revisado em De Souza, 2005).

1.2.2.2. Mitocôndria

Todos os tripanosomatídeos, independente da sua forma no ciclo de vida, possuem uma única mitocôndria (Paulin, 1977). No *T. cruzi*, a mitocôndria é ramificada e distribuída por todo o citoplasma do parasito sob os microtúbulos subpericulares, apresentando uma região dilatada, a qual abriga o kDNA, como ilustrado na **Fig. 1.5** (revisado em De Souza e cols., 2009).

A morfologia das cristas e da matriz mitocondrial apresenta distribuição irregular e o volume da organela varia de acordo com a disponibilidade nutricional, podendo alcançar até 12% do volume total do parasito (Fidalgo & Gille, 2011).

Em mamíferos, a cadeia transportadora de elétrons é composta por quatro complexos de transferência de elétrons, presentes na membrana mitocondrial interna: Complexo I (NADH: ubiquinona desidrogenase), complexo II (succinato: ubiquinona oxidoreductase), complexo III ou citocromo bc1 (ubiquinol: citocromo C oxidoreductase) e complexo IV (citocromo C oxidase), com a ubiquinona (coenzima Q) e citocromo c atuando como carreador de elétrons entre os complexos (Mather e cols., 2007). O gradiente de prótons gerado pela transferência de elétrons é dirigido

para a proteína F1/F0 ATPase (complexo V), em um processo acoplado, denominado fosforilação oxidativa (Dey & Swaminathan, 2010).

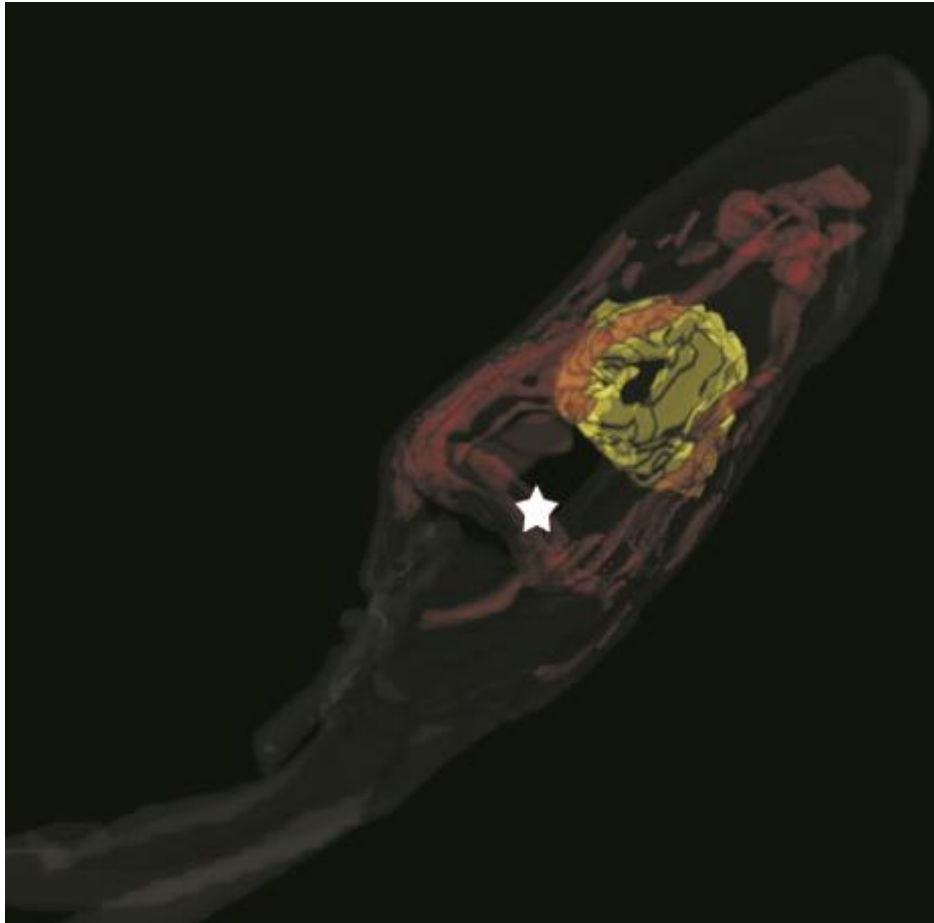


Figura I.5. Modelo de reconstrução tridimensional de formas epimastigotas de *T. cruzi*. A mitocôndria está destacada em vermelho e o núcleo em amarelo. A estrela branca indica o cinetoplasto (adaptado de De Souza e cols., 2009).

Durante o processo de respiração, ilustrado na **Fig. I.6**, a energia livre gerada pela oxidação de substratos é conservada em moléculas reduzidas de NADH e FADH₂. Tais moléculas redutoras doam seus elétrons para os complexos (NADH doa para o complexo I e FADH₂ doa para o complexo II) da cadeia respiratória, e a energia conservada é utilizada para transportar prótons para o espaço intermembranar, gerando dessa forma uma força motriz prótonica e um potencial de membrana mitocondrial (que é negativo, por volta de 180 mV). A manutenção do potencial de membrana mitocondrial é essencial para a vida das células, variações em tal parâmetro ocorrem durante a inibição da cadeia transportadora de elétrons, o

bloqueio da ATP sintase, o estímulo das proteínas desacopladora ou permeabilização da membrana mitocondrial interna (Gottlieb, 2003).

Os elétrons provenientes dos complexos I e II são carreados pela ubiquinona, que doa tais elétrons para o complexo III. De maneira análoga, o citocromo C faz o transporte dos elétrons entre o complexo III e IV. No complexo IV ocorre a redução do oxigênio molecular em água. O processo de transporte de elétrons é associado com o bombeamento de prótons através da membrana interna por meio de complexos, estabelecendo dessa forma um gradiente eletroquímico, utilizado para sintetizar ATP a partir de ADP e fosfato inorgânico pelo complexo V, transportando também os prótons de volta para a matriz mitocondrial, por meio do complexo V (Leloup e cols., 2011). Os prótons podem também ser transportados de volta para a matriz mitocondrial pela ação de proteínas desacopladoras (UCPs - *uncoupling proteins*), que dissipam o gradiente de prótons, diminuindo a síntese de ATP e a energia acumulada, que é dissipada na forma de calor (Mehta & Li, 2009).

Porém em tripanosomatídeos notam-se algumas diferenças na cadeia transportadora de elétrons quando comparada aos mamíferos. Por exemplo, o complexo I de *T. brucei* contém 19 subunidades, apresentando-se menor que a proteína homóloga de mamíferos e maior do que nos procariotos, e teoricamente poderia realizar toda a ação de transporte de elétrons, uma vez que ela contém todas as subunidades necessárias para tal ação (Chen e cols., 2001, Gabádon e cols., 2005). Apresentam ainda limitada transferência de elétrons entre os complexos I e III, apontando que o succinato pode ser um importante doador de elétrons para a produção de energia. Tal substrato pode ainda ser sintetizado pela enzima fumarato redutase, específica de alguns microorganismos e ausente em mamíferos (Turrens e cols., 1987). O complexo IV é composto por 14 subunidades, destas, 3 são codificadas no kDNA e as demais 11 são codificadas no núcleo, sendo que uma das subunidades de codificação nuclear tem importante papel na função mitocondrial e é correlacionada com virulência do parasito (Horvath e cols., 2000; Zikova e cols., 2008). Outra diferença interessante observada entre a cadeia transportadora de elétrons de mamíferos e tripanosomatídeos compreende a presença de uma oxidase alternativa, que atua como um aceptor final de elétrons, gerando energia de maneira não relacionada com a gradiente eletroquímico protônico na membrana mitocondrial (Tielens & van Hellemond, 1998).

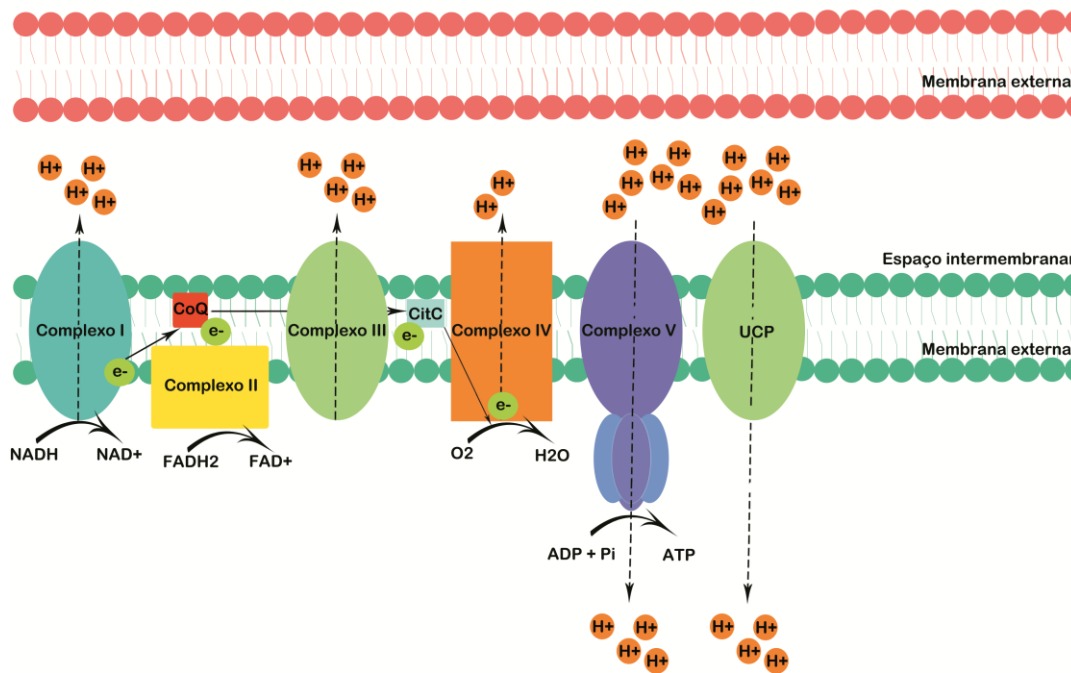


Figura I.6. Diagrama esquemático demonstrando a cadeia transportadora de elétrons mitocondrial de mamíferos. As moléculas reduzidas NADH e FADH₂ são oxidadas nos complexos I e II, respectivamente. Tal processo libera elétrons (e⁻), os quais são carregados por proteínas móveis, como a coenzima Q (CoQ) e citocromo C (CitC) até o complexo IV, onde são doados para o O₂, reduzindo-o à H₂O. O transporte de elétrons possibilita o bombeamento de prótons (H⁺) pela membrana externa, chegando ao espaço intermembranar, pelos complexos I, III e IV, gerando um gradiente eletroquímico. O transporte de H⁺ de volta para matriz mitocondrial pelo complexo V possibilita a formação de ATP a partir de ADP + Pi. O efluxo de H⁺ para a matriz mitocondrial pode ser realizado pelas UCP, e a energia nesse processo é dissipada na forma de calor. (Adaptado de Mehta & Li 2009).

Em outros protozoários, esta organela é dinâmica, apresentando alterações morfo-funcionais de acordo com ambiente onde a célula está inserida, sendo tal mudança mais marcante quando o parasito alterna entre os hospedeiros invertebrado e vertebrado (Osellame e cols., 2012). Este processo de modelamento mitocondrial mediado por fissão, fusão e autofagia (Griparic & van der Bliek, 2001). A mitocôndria do *T. cruzi* é uma organela extremamente dinâmica, que apresenta modificações durante o ciclo evolutivo do parasito. As formas epimastigotas apresentam um metabolismo mais oxidativo do que glicolítico devido a maior disponibilidade de substratos da cadeia transportadora de elétrons no intestino médio de triatomíneos, tornando a mitocôndria de epimastigotas mais funcional. Os tripomastigotas sanguíneos, por sua vez, apresentam metabolismo mais glicolítico do que oxidativo, uma vez que no sangue do hospedeiro vertebrado há maior

disponibilidade de glicose quando comparado a substratos da cadeia respiratória, como o succinato (Gonçalves e cols., 2011).

A maior parte da produção mitocondrial de espécies reativas de oxigênio (ROS) ocorre na cadeia transportadora de elétrons, como um produto secundário da respiração, podendo ocorrer em taxas relativamente maiores quando comparado a produção citosólica (Gille & Nohl, 2001). A produção excessiva de ROS em muitas ocasiões é associada com processos deletérios na célula (Wosniak e cols., 2009).

Alguns componentes da cadeia transportadora de elétrons não estão associados com a produção de ROS, por exemplo, o complexo IV, um dos componentes terminais da cadeia transportadora de elétrons, reduz uma molécula de O_2 a duas moléculas de H_2O , num processo envolvendo a transição de 4 elétrons. Nessa situação há produção de espécies intermediárias no interior da enzima, que devido sua adaptação, não permite a liberação de ROS em quantidades mensuráveis (Nicholls & Fergusson, 2001). De maneira análoga, o citocromo C (doador de elétrons para o complexo IV) não está associado com a produção de espécies reativas em modelos biológicos (Giannattasio e cols., 2008). O complexo II, uma flavoproteína, não está associado com a produção de ROS, devido a estrutura enzimática, que não permite o oxigênio acessar o FAD intrínseco (Yankoskaya e cols., 2003).

Porém, alguns sítios da cadeia transportadora de elétrons são conhecidos produtores de ROS mitocondrial. O complexo III recebe elétrons da coenzima Q e os doa ao citocromo C, e nesse processo a coenzima Q é convertida, através de uma série de reações complexas, em uma molécula altamente reduzida, possibilitando a formação de ROS por meio da doação de elétrons ao oxigênio, uma vez que esse tem acesso a qualquer sítio da cadeia transportadora de elétrons (Boveris e cols., 1976; St-Pierre e cols., 2002). O complexo I tem dois sítios de formação de ROS, um associado com a ação do inibidor rotenona, e outra sem relação com tal inibidor, provavelmente relacionado com a presença de íons metálicos na formação de tal complexo (Lambert & Brand, 2004).

Mesmo com a baixa formação de espécies reativas pelo complexo II, o succinato é uma importante fonte de ROS em vários modelos, devido a transferência de elétrons reversa do succinato para a coenzima Q, via complexo II, e de volta ao

complexo I, sendo favorecida quando a mitocôndria apresenta um aumento no seu potencial de membrana mitocondrial, que permite a doação eletrônica no sentido do complexo II a complexo I (Liu e cols., 2003).

1.2.2.3. Glicossomo

O peroxisomo dos Kinetoplastidea é uma organela com características peculiares, que tem papel crucial no metabolismo da glicose, a maior parte das enzimas glicolíticas está no seu interior, o que determina seu nome nesses organismos (revisto em Haanstra e cols., 2015). O conteúdo glicossomal pode variar bastante de espécie para espécie, tal como durante os diferentes estágios de diferenciação celular (Opperdoes e cols., 1984). A degradação de glicossomos pela via autofágica e a biogênese de novas organelas tem um importante papel na adaptação eficiente do metabolismo glicolítico durante as transições entre hospedeiros encontradas nos ciclos de vida destes protozoários (Blattner e cols., 1992).

A correta compartimentalização das enzimas é essencial para a regulação do metabolismo dos tripanosomatídeos, e dessa forma tem impacto na sua viabilidade. Em *T. brucei*, o glicossomo tem um papel importante na regulação do ciclo de vida do parasito, através do deslocamento de uma proteína fosfatase do citoplasma para o seu interior, desfosforilando diferentes proteínas glicossomais, interferindo na atividade enzimática, sendo assim uma importante maneira de adaptação do metabolismo energético frente a alterações no ambiente (Colasante e cols., 2006).

1.2.2.4. Acidocalcissomo

Os acidocalcissomos foram nomeados primeiramente grânulos metacromáticos (Babes, 1895). Estudos posteriores descreveram a presença de polímeros de ortofosfato (polifosfato), mudando sua nomenclatura para grânulos de polifosfato (Wiame, 1947). A descoberta de diversos transportadores associados ao transporte de íons na sua maioria, elevaram sua classificação à organela, com ampla distribuída filogeneticamente, desde bactérias à células humanas (revisto em Docampo e cols., 2005).

Os acidocalcissomos são organelas esféricas, que variam bastante de número em diferentes espécies, e podem ser detectadas com corantes que se acumulam em vesículas ácidas, como laranja de acridina e LysoSensor (Docampo e cols., 1995; Seufferheld e cols., 2003), com técnicas que detectam os polímeros de fosfatos, como o DAPI (Ruiz e cols., 2004) ou com uso de anticorpos específicos contra enzimas típicas como a H⁺-ATPase tipo vacuolar (Ramos e cols., 2010). O acidocalcissomo dos tripanossomatídeos tem aproximadamente 0,2 µm e são distribuídos randomicamente pelo citoplasma (Do Campo e cols., 2005), contendo polímeros de fosfato e ortofosfato, associados a íons sódio, potássio, magnésio, cálcio, zinco e ferro, e a aminoácidos básicos (Rohloff e cols., 2003). Ainda nestes protozoários, a organela apresenta conteúdo rico em polímero de fosfato de cadeia curta (entre 3 e 5 fosfatos conjugados), o que leva a uma concentração de fosfato que pode chegar a 3 M no interior dos parasitos (Do Campo e cols., 2005) (**Fig. I.7**).

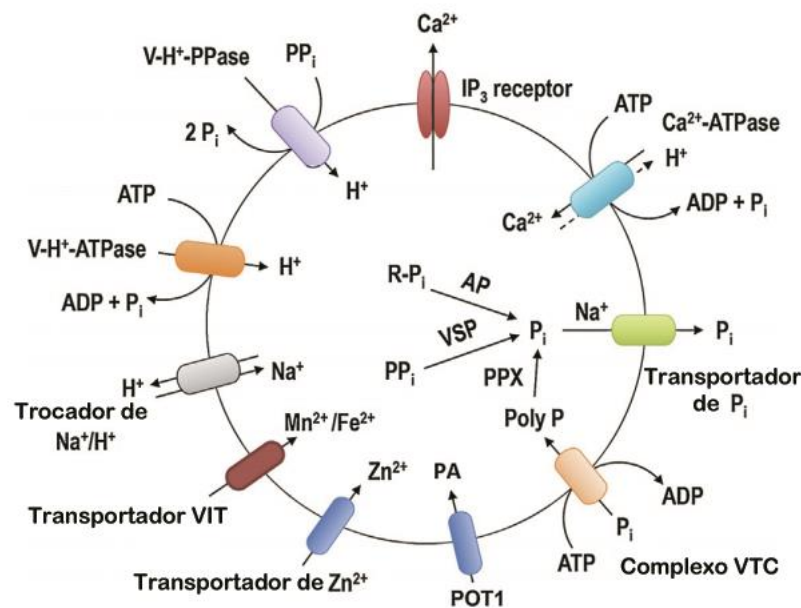


Figura I.7. Representação do acidocalcissomo. Ca²⁺ é transportado por uma ATPase, em um processo ativo e com co-transporte reverso de H⁺. Os prótons são transportados para o interior da organela por proteínas de transporte vacuolar H⁺-PPase e H⁺-ATPase, clivando respectivamente PPi e ATP para gerar energia. A proteína trocadora de Na⁺/H⁺ é responsável pelo transporte anti-porte entre os íons, levando o sódio para o interior do acidocalcissomo e retirando os H⁺ do seu lúmen. O transportador VIT (*vacuolar iron transporter*) pode ser utilizado para o transporte de Mn²⁺ e Fe²⁺ e o transporte de Zn²⁺ pelo transportador de Zn²⁺. O VTC (*vacuolar transporte chaperone complex*) sintetiza os polímeros de fosfato a partir de ATP, e o transporta para o interior da organela (adaptado de DoCampo, 2005).

1.2.2.5. Superfície celular, microtúbulos e flagelo

A superfície do *T. cruzi* pode ser dividida em dois componentes: a membrana plasmática e os microtúbulos subpeliculares. A membrana plasmática é constituída por carboidratos (que formam o glicocálix na superfície do parasito), lipídeos e proteínas, que são associadas à membrana plasmática via ancoramento pelo glicosilfosfatidilinositol, ou pela ligação aos grupamentos farnesil ou geranil pela porção C-terminal da proteína (revisto em De Souza, 1989).

Usando microscopia eletrônica de transmissão foi possível revelar a presença de microtúbulos na região da membrana plasmática do parasito, sendo estes denominados microtúbulos subpeliculares. Apresentam arranjo regular ligados a uma distância de aproximadamente 44 nm entre cada microtúbulo e sua distância da membrana plasmática é constante, com algumas conexões entre a membrana plasmática e os microtúbulos (cerca de 12 nm). Essas estruturas têm distribuição por todo o corpo do parasito e sua principal função é estrutural, com exceção da região da bolsa flagelar e do citóstomo (revisto em De Souza, 2009).

O tratamento com citocalasina B (inibidor da formação dos filamentos de actina) gera alterações morfológicas em regiões específicas em atividade endocítica de transferrina, presentes em epimastigotas (o complexo citóstomo-citofaringe), porém os microfilamentos de actina nunca foram observados no *T. cruzi* (Corrêa e cols., 2008). Abordagens *in silico* e *in vitro* foram capazes de apontar um possível sistema funcional semelhante ao actina-miosina dos demais eucariotos, a actina em especial atuaria em diversas estruturas citoplasmáticas presentes nas formas do *T. cruzi* (De Melo e cols., 2008).

Todas as formas do *T. cruzi* apresentam um único flagelo, com um axonema clássico e com presença de estrutura paraflagelar (Gull, 1999). O flagelo é formado por um axonema típico de eucariotos, apresentando padrão 9+2 de distribuição de microtúbulos (nove pares radiais e um par central). A estrutura como um todo emerge de uma invaginação chamada bolsa flagelar. Nas formas epimastigotas emergem na porção lateral do corpo do parasito, enquanto nas tripomastigotas na extremidade posterior. Amastigotas apresentam flagelo curto e interiorizado, não aparente em microscopia óptica convencional (revisto em De Souza, 2002).

1.2.2.6. Golgi e retículo endoplasmático

Nas primeiras análises realizadas em cortes ultrafinos por microscopia eletrônica foi possível analisar a presença de estriações paralelas localizadas entre o cinetoplasto e o núcleo, em regiões proximais ao flagelo. O desenvolvimento das técnicas possibilitou apontar que tal estrutura correspondia ao Golgi morfológicamente semelhante ao descrito em células de mamíferos (Araripe e cols., 2004). O retículo endoplasmático é encontrado por todo o corpo do *T. cruzi*, sustentado ou não pelos microtúbulos subpeliculares (revisto em De Souza, 1984).

A ação do Golgi é fundamental para manter a atividade do glicocálix do *T. cruzi*, que possui um papel fundamental na sobrevivência e virulência do parasito. Assim como nos demais eucariotos, a síntese de glicoconjugados do parasito ocorre no interior do Golgi e do retículo endoplasmático, devido a ação de enzimas glicosiltransferases (Baptista e cols., 2015).

1.3. A doença e seu tratamento

1.3.1. Fases da doença

A doença de Chagas é caracterizada por duas formas clínicas distintas: aguda e crônica. Logo após a infecção ocorre um período que varia entre 2 a 3 semanas, onde a presença do parasito no sangue periférico não é detectada (Rassi e cols., 2012). Após tal período inicia-se a fase aguda, caracterizada pela identificação do parasito na circulação sanguínea, com sintomatologia branda e não específica que sanam espontaneamente em 2 meses, como febre, hepatoesplenomegalia, linfadenopatia que desaparecem espontaneamente em até 2 meses. Alguns pacientes apresentam nódulos no local da porta de entrada do parasito (WHO, 2002). A taxa de mortalidade durante a fase aguda é entre 5 e 10% entre os pacientes sintomáticos, devido principalmente a encefalomielite ou insuficiência cardíaca severa (Prata, 2001).

Se a doença não for tratada durante a fase aguda, após aproximadamente três meses a resposta imune do hospedeiro é eficaz em eliminar o parasito da circulação periférica e limitar sua proliferação, dando início à fase crônica indeterminada. Essa fase da doença é caracterizada pela não detecção dos

parasitos por análises microscópicas do sangue periférico, podendo o diagnóstico do paciente ser realizado por técnicas como hemocultura, xenodiagnóstico e PCR, o paciente ainda apresenta normalidade nos exames de eletrocardiograma e de imagem (Prata, 2001; SVS/MS, 2005).

Com o passar dos anos (e até mesmo décadas), o paciente pode apresentar impactos em órgãos do sistema circulatório e gastrointestinal. Na fase crônica, a imunidade mediada por células T mantém a baixa taxa de replicação dos parasitos (Machado e cols., 2012). Porém, falhas no balanço da resposta inflamatória (influenciada por fatores do parasito e do hospedeiro) têm grande impacto na patogenia da fase crônica (Tarleton, 2001). Entre 30 e 40% dos pacientes nesta fase irão apresentar danos provenientes da infecção crônica do parasito principalmente no coração, no esôfago, cólon e em casos mais raros há acometimento de nervos periféricos (WHO, 2002).

A cardiomiopatia chagásica é marcada por inflamação local e difusa, com fibrose progressiva, gerando desordens no sistema de condução elétrica cardíaca, que culmina em bradicardias, fibrilação atrial, palpitações, bloqueio atrioventricular e taquicardia ventricular sustentada ou não (Rassi e cols., 2009). Os pacientes com cardiomiopatia podem apresentar coração dilatado e insuficiência cardíaca congestiva, podendo ocorrer infartos e outros acidentes tromboembólicos, devido à dilatação do ventrículo esquerdo e aneurisma (Acquatella, 2007).

Quando a doença é caracterizada pela inflamação crônica e destruição da inervação parassimpática relacionada ao sistema gastrointestinal ocorre alargamento progressivo do esôfago e do cólon, caracterizando o megaesôfago e megacólon, que afeta cerca de 15% dos portadores crônicos (Pinazo e cols., 2010; Rassi et al., 2012). O comprometimento do cólon desencadeia sintomas que variam entre brandos como disfunções assintomáticas na motilidade e rigidez do músculo liso, a quadros severos de megaesôfago sintomático, com dificuldade ao engolir, perda de peso, refluxo esofágico, tosses recorrentes e vômitos. O megacólon é caracterizado por constipação prolongada dando origem a fecaloma, obstrução e isquemia mesentérica (de Oliveira e cols., 1998).

Os primeiros sinais da infecção pelo *T. cruzi* dependem da carga parasitária de tripomastigotas, da cepa e da condição imunológica do paciente (Teixeira e cols.,

1975; revisto em Teixeira, 2006). Em linhas gerais o parasito, depositado na pele lesionada ou em mucosas, estimula respostas inflamatórias, gerando em alguns casos o chagoma de inoculação ou sinal de Romana. Os tripomastigotas são fagocitados por macrófagos, e carregados para órgãos como o fígado, baço, linfonodos, músculo esquelético estriado e cardíaco. A miocardite envolve principalmente as células TCD4+, TCD8+, e as citocinas IL-2 e IL-4. A reação inflamatória descontrolada leva ao dano muscular e neuronal, e a manutenção desta resposta é dada pela presença do parasito no tecido ou por antígenos de persistência prolongada no hospedeiro vertebrado, gerando quadros de hipersensibilidade tardia, dilatação da microcirculação e fibrose, que induzem a cardiomiopatia crônica, arritmias, e as manifestações gastrointestinais (megaesôfago e megacólon) (revisto em Coura & Borges-Pereira, 2010).

Como mencionado anteriormente, o quadro da doença de Chagas no homem pode resultar em uma cardiomiopatia fatal e lesões no trato gastrointestinal. Como não há vacinas ou controle de todas as formas de transmissão, o tratamento etiológico é a única ferramenta disponível para controlar a progressão da doença (Bermudez e cols., 2015).

Atualmente tem-se duas drogas aprovadas para o tratamento: o benznidazol (Bz) e o nifurtimox (Nif), lançadas no final da década de 1960, e ambas compartilham características em comum, como a maior tolerância em crianças, maior eficácia durante a fase aguda, grande toxicidade em adultos e diferente susceptibilidade entre as DTUs do *T. cruzi* (Andrade e cols., 1985; Toledo e cols., 2004). As drogas disponíveis para o tratamento são contraindicadas em casos de gestação, ou insuficiência renal e/ou hepática (Dias e cols., 2016) e apresentam taxa de cura de aproximadamente 70% em casos agudos em adultos. Porém, nota-se baixa eficácia dos dois fármacos na fase crônica da doença, com taxa de cura entre 8 e 37% (Viotti e cols., 2006).

Os efeitos adversos relacionados com o tratamento com Bz e Nif geram uma rejeição ao tratamento por parte do paciente. Dessa forma, entre 7,6 e 29,7% dos pacientes abandonam o tratamento com Bz (Pinazo e cols., 2010; Perez-Ayala e cols., 2011) e entre 14 e 75% dos pacientes abandonam o tratamento com o Nif (Jackson e cols., 2010; Perez-Molina e cols., 2012).

Para verificar a eficácia o uso de benznidazol no avanço dos sintomas cardíacos da doença de Chagas, foi realizado entre 2004 e 2011, por Morillo e colaboradores (2015) um estudo randomizado denominado BENEFIT. Nesse, 2854 pacientes latinos na fase crônica da doença tiveram a parasitemia (quantificada por PCR em tempo real de segmentos do kDNA) acompanhada até 6 meses após o tratamento com o agente tripanocida. Foi concluído que o tratamento tripanocida é eficaz nos primeiros estágios da fase crônica da doença de Chagas, porém o mesmo tratamento aplicado a pacientes em estágios mais avançados não inibe a progressão do dano ao tecido cardíaco, ainda que diminua a detecção de parasitos circulantes.

1.3.2. Benznidazol

Bz (N-benzil-2-(nitro-1-H-imidazol) acetamida) (**Fig. I.8**), é um derivado nitroimidazólico e seu tratamento é realizado por via oral por no mínimo 60 dias, com uma dose diária entre 5 e 7 mg/Kg para adultos, e 10 mg/Kg para crianças (WHO, 2002). Sua absorção é dada pelo trato gastrointestinal e sua excreção é majoritariamente renal, com meia vida de eliminação de 12 h (Andrade e cols., 2011; Pinazo e cols., 2013).

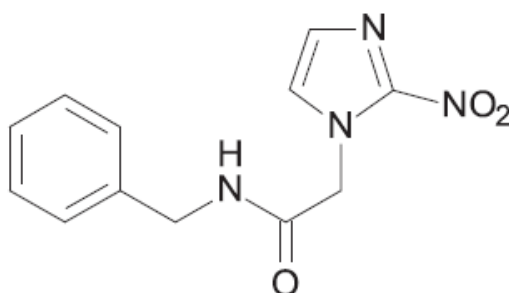


Figura I.8. Estrutura química do benznidazol.

A baixa solubilidade do Bz em água, as altas concentrações empregadas no tratamento, e o tempo da administração do medicamento geram duas características importantes sobre o tratamento com o Bz: a primeira diz respeito aos efeitos adversos observados no paciente durante o tratamento como, hipersensibilidade (erupções cutâneas sensíveis a luz e dermatite esfoliante), supressão da medula óssea (gerando quadros de trombocitopenia e neutropenia) e neuropatia periférica

(WHO, 2013). A segunda é a queda da eficácia do tratamento quando o paciente está na fase crônica, uma vez que, nessa situação os parasitos estão localizados no interior das células, principalmente as pertencentes do tecido muscular estriado esquelético e cardíaco (Lima e cols., 2011).

Não se sabe de uma concentração sérica de Bz que seja responsável pelos efeitos adversos. Um estudo realizado por Pinazo e colaboradores (2013) não foi capaz de determinar diferenças entre a concentração plasmática de Bz entre pacientes que sofreram algum tipo de efeito adverso durante o tratamento.

1.3.3. Nifurtimox

Nifurtimox ((RS)-3-metil-N-[(1E)-(5-nitro-2-furil)metileno]tiomorfolina-4-amino1,1-dióxido)) (**Fig. I.9**) teve sua produção entre a década de 1960 e 1990 pela Bayer e foi encerrada devido a baixa demanda e retornou no ano 2000, quando foi incluída no tratamento da tripanosomíase africana causada pelo *T. brucei* (revisto em Sterveding, 2014).

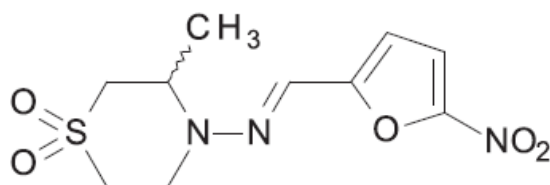


Figura I.9. Estrutura química do nifurtimox.

A posologia pediátrica e em casos agudos é 15 mg/Kg/dia e entre 8 a 10 mg/Kg/dia em adultos, durante 60 dias de tratamento, sendo a dose diária dividida em três vezes. Sua absorção é gastrointestinal e sofre efeitos de metabolismo de primeira passagem hepática. Sua biotransformação é hepática (mediada pela ação da citocromo P450) e sua eliminação é dada pela urina. Apresenta grande impacto nos órgãos do trato gastrointestinal, apresentando dessa forma como efeitos não desejados anorexia, dor abdominal, náuseas, vômitos e emagrecimento. Em 30% dos casos os pacientes têm efeitos indesejados relacionados com o sistema nervoso, como polineurite, convulsões e até mesmo psicose, que cessa com a interrupção do tratamento (Andrade e cols., 2011). Indivíduos deficientes em glicose-

6-fosfato desidrogenase podem apresentar anemia hemolítica durante o tratamento, e nota-se também um aumento em alterações cromossomais em crianças que se submetem ao tratamento (Gorla e cols., 1989).

Um dos fatores que inibe o uso de Nif em países endêmicos para a doença de Chagas é sua alta capacidade de gerar insuficiência cardíaca, devido aumento do estresse oxidativo em tal órgão, sendo assim o tratamento com Nif durante a fase crônica pode gerar maiores riscos do que o tratamento com o Bz (Mecca e cols., 2008).

O mecanismo da ação de Bz e Nif ainda é controverso, apesar destas drogas estarem em uso clínico por mais de quatro décadas. Nitrocompostos agindo como prodrogas sofrem ativação por duas classes de nitroredutases (Peterson e cols., 1979). Nos anos 80, os estudos iniciais com Bz e Nif mostraram que a atividade tripanocida estava ligada à formação de radicais livres e/ou metabólitos eletrofílicos. Para Nif, a atividade tripanocida foi associada ao estresse oxidativo devido a transformação da droga em um nitroânion radical por NTR-II, ciclo redox com oxigênio e produção de ROS (DoCampo & Stoppani, 1979; Moreno e cols., 1982). Para Bz, o dano oxidativo não foi considerado mecanismo chave da ação tripanocida, uma vez que a detecção do nitroânion radical correspondente ocorria somente em concentrações muito mais elevadas em relação àquela tripanocida. A atividade de Bz foi associada a ligação covalente de metabólitos reduzidos de Bz a lipídeos, DNA e proteínas (Polak & Richle 1978; Diaz-de-Toranzo et al., 1988). Os diferentes modos de ação podem ser explicados pelo menor potencial de redução de Bz em comparação a Nif, levando a uma menor taxa de formação do nitroânion radical (DoCampo, 1990). Mais recentemente, Boiani e colaboradores (2010) observaram em parasitos tratados com Nif uma redução de tióis de baixo peso molecular, enquanto a geração de ROS e ciclo redox não foram observados em concentrações tripanocidas, em oposição ao estresse oxidativo como modo de ação.

O grupo de Wilkinson defende que uma nitroredutase específica de *T. cruzi* (TcNTR), uma NTR-I está envolvida no mecanismo de ação de nitrocompostos por meio de uma redução de dois elétrons, utilizando NADH como cofator (Wilkinson e cols., 2008). Anteriormente esta NTR-I, também chamada “old yellow enzyme” (TcOYE), estava envolvida na metabolização de compostos nitroheterocíclicos no parasito (Kubata e cols., 2002). A redução *in vitro* por TcNTR leva a um intermediário

hidroxilamina, que sofre diferentes transformações: o grupo nitrofurano é transformado em uma nitrila de cadeia aberta altamente reativa (Hall e cols., 2011), enquanto para Bz, reduções tipo 2 elétrons consecutivas leva a um derivado dihidroxi-dihidroimidazólico que por decomposição forma glioxal, metabólito tóxico, que pode reagir com o DNA do parasito (Hall & Wilkinson, 2012). Porém uma análise metabólica de *T. cruzi* tratado com Bz mostrou ligação da droga a tióis de baixo peso molecular, enquanto o produto final do metabolismo de Bz por TcNTR não foi detectado (Trochine e cols., 2014).

2. *T. cruzi* e estresse térmico

Todos os organismos, uni- e multicelulares, são constantemente expostos a várias fontes de estresse de origem endógena e exógena que podem resultar em diminuição transitória do crescimento celular, aumento na proliferação, senescência ou morte celular (Pelicanos e cols., 2014). A natureza, a intensidade e a duração dessas alterações determinam o tipo de resposta que as células desenvolvem, estabelecendo o balanço entre as fontes de estresse e os mecanismos de compensação (revisto em Jimenez, 2014).

O *T. cruzi* é exposto a diferentes condições de crescimento que variam significativamente entre os hospedeiros vertebrados e invertebrados (**Fig. I.10**). Durante seu ciclo de vida, este parasito se depara com diversas fontes de estresse, como a resposta imune, viabilidade de nutrientes, ambientes pró-oxidante, variação na pressão osmótica e na temperatura (revisto em Jimenez e cols., 2014). Dentre as quais, a variação térmica é uma importante barreira para o sucesso da infecção.

Em 1963, Trejos e colaboradores, demonstraram alterações morfológicas no parasito induzidas pela variação térmica, sendo observado aumento da largura do corpo dos parasitos submetidos a 26°C. Na década seguinte, foi demonstrado que a temperatura das fezes de triatomíneos contendo formas metacíclicas influenciava fortemente a viabilidade dos parasitos. A incubação desse material a 24 e 30°C foi capaz de aumentar o percentual de animais infectados, sugerindo a temperatura como um fator para a transmissão da doença de Chagas (Mardsen e cols., 1979). No hospedeiro vertebrado, a temperatura tem grande impacto na progressão da infecção. A manutenção de células Vero infectadas com diferentes cepas a 33 ou

37°C apontou um acentuado aumento do percentual de infecção na menor temperatura (Bertelli e cols., 1977).

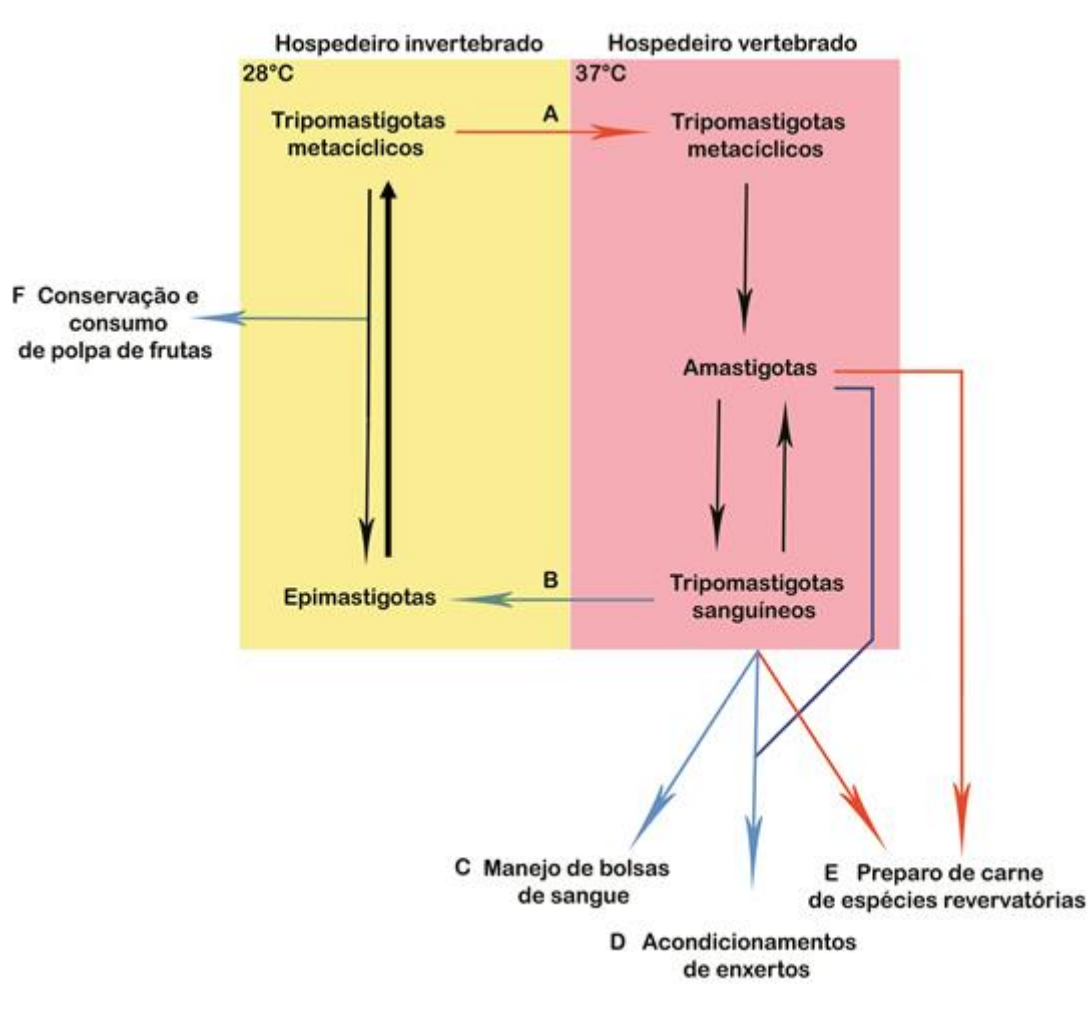


Figura I.10. Relação entre o *T. cruzi* e temperatura. Durante seu ciclo de vida *T. cruzi* é exposto a variações térmica de maneira natural ou artificial. A mudança do hospedeiro invertebrado para o vertebrado expõe o parasito a um choque térmico de calor (**A**), e o oposto ocorre quando há transição entre o vertebrado e o invertebrado (**B**), caracterizando as alterações térmicas naturais no ciclo de vida do *T. cruzi*. Outras alterações são induzidas pela atividade humana no ciclo de vida do parasito (**C**, **D**, **E** e **F**). seta azul - choque térmico frio; seta vermelha: choque térmico de calor.

Nos anos 1990, foi demonstrado que a variação de temperatura que ocorre na passagem entre os hospedeiros invertebrados e vertebrados (28 para 37°C)

aumenta cerca de 4 vezes a transcrição de mRNA que codifica HSP70. Após 2 h de incubação, a 42°C diminui a expressão de HSP70 e do controle endógeno utilizado, indicando o potencial tripanocida do choque térmico (Requena e cols., 1992). Ainda baseado na mudança da temperatura entre o hospedeiro vertebrado e invertebrado, Florin-Christensen e colaboradores (1997) avaliaram o impacto no metabolismo lipídico de epimastigotas submetidos a temperaturas de 28 e 37°C, sendo observada diminuição no conteúdo de fosfolípidos e aumento na concentração de lipídeos neutros, principalmente triacilglicerol nos parasitos a 37°C. Já em 28°C, há acúmulo gradual de lipídeos neutros, porém em menor proporção dos que os parasitos submetidos a 37°C.

Com a descrição de diversos métodos alternativos de transmissão da doença de Chagas, abrem-se novas perspectivas para análise do impacto da variação térmica na biologia do *T. cruzi*, tal como métodos para interromper seu ciclo de vida. Em 2003, Santos-Ferreira e colaboradores apontaram que o tratamento térmico de leite contaminado com tripomastigotas em fornos micro-ondas por sete minutos a 63°C (2460 MHz, 700 W e 45% de potência) foi capaz de inibir a infecção oral em camundongos. Três anos mais tarde, Cardoso e colaboradores (2006) descreveram a manutenção da viabilidade de tripomastigotas incubados em caldo-de-cana por 24 h a 21°C, sendo a ingestão deste suco capaz de infectar camundongos. Em 2012, estudo subsequente foi realizado com os sucos de diferentes frutas, como tangerina, graviola, goiaba, água e água com açúcar, submetidos a incubação a 21°C (temperatura ambiente) e 4°C (temperatura de acondicionamento em geladeira), demonstrando uma maior viabilidade nos parasitos mantidos a 4°C (Suárez e cols., 2012). Recentemente, Martin e colaboradores (2014) observaram que sangue infectado mantido por 24 h a temperatura ambiente, na presença ou não de anticoagulantes, mantém a virulência de tripomastigotas *in vitro*.

Por exemplo, no hospedeiro vertebrado, o parasito encontra diferenças principalmente ao transitar entre o ambiente extra e intracelular, devido a mecanismos de defesa do organismo como a formação do vacúolo parasitóforo que expõe o parasito a um ambiente ácido e pró-oxidante (Hall, 1993). Já no hospedeiro invertebrado, a ação de enzimas digestivas e fatores provenientes da digestão do sangue pelo inseto, gera um ambiente hostil para o parasito (Azambuja e cols., 1989). Era de se esperar que tais ações eliminassem o parasito, e assim, a

continuidade do seu ciclo de vida, porém o *T. cruzi* desenvolveu mecanismos que permitiram sua sobrevivência (revisto em Jimenez, 2014).

No *T. cruzi*, uma das formas de estresse presente durante a transmissão entre os hospedeiros é a mudança súbita na temperatura. No interior do inseto, os parasitos se encontram a uma temperatura média de 28°C (variando cerca de 10°C durante o decorrer do dia, e da espécie de triatomíneo), e quando invade o hospedeiro vertebrado o protozoário se depara com uma temperatura de 37°C, caracterizando um evento de choque térmico (Olson e cols., 1994).

De maneira semelhante o parasito pode ser exposto a diferentes temperaturas de forma “artificial”. Quando um portador da doença de Chagas doa sangue, seu material pode passar como um falso-negativo pelas análises empregadas na triagem realizada (Moraes-Souza & Ferreira-Silva, 2011). Ao serem realizados os procedimentos para a separação de componentes aplicados na hemoterapia o parasito é exposto a diferentes temperaturas. Por exemplo, a porção concentrada de hemácias é mantida entre 2 e 6°C, o plasma a -20°C e o concentrado de plaquetas entre 20 e 24°C (Hemominas, 2010).

O parasito pode ainda ser exposto a variações de temperatura ao se empregar técnicas de conservação e consumo de alimentos contaminados (Suárez e cols., 2012). Sucos de açaí (*Euterpe oleracea*), cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*), goiaba (*Psidium guajava*), tangerina (*Citrus reticulata*) e graviola (*Annona muricata*) são conhecidos veículos para a transmissão da doença de Chagas pela via oral (Silveira, 2006). Ao triturar os frutos e/ou componentes da planta para obtenção da sua polpa, triatomíneos que se alojam nas árvores podem ser fragmentados juntamente no processo, expondo formas epimastigotas e tripomastigotas metacíclicos ao suco obtido. A bebida pode então ser ingerida logo após sua obtenção em temperatura ambiente, ou ser acondicionada em baixas temperaturas em geladeira comercial (expondo o parasito a aproximadamente 4°C), ou congeladas em freezers (condição que o *T. cruzi* irá se defrontar com uma temperatura de -20°C) (Suárez e cols., 2012). Vale ressaltar que o processo de pasteurização de sucos seguramente previne a presença de parasitos no líquido (Valente, 2005).

Outra prática que expõe o *T. cruzi* a variações de temperatura de forma artificial compreende o preparo de carnes de espécies reservatórias, uma vez que tripomastigotas e amastigotas podem estar no corte preparado do animal. Os parasitos podem ser facilmente eliminados pelo emprego de altas temperaturas no preparo do alimento (Dias, 2006).

Uma nova forma de transmissão começou a ser estudada por Martin e colaboradores (2014) compreendendo a passagem de formas amastigotas de um portador para uma pessoa sadia através de enxerto de tecidos diversos (pele, ossos longos, tendões, ligamentos, córnea, válvulas cardíacas, tecido muscular esquelético e tecido nervoso). Grande parte dos tecidos processados e armazenados antes do transplante, variam muito a temperatura de acondicionamento (entre -40°C e -20°C) (AATB, 2010). Este grupo de pesquisa foi capaz de demonstrar que formas tripomastigotas de *T. cruzi* se mantêm infectando células Vero após 1 ano, quando incubados a -80°C na ausência de substância criopreservante.

Em eucariotos, o choque térmico é responsável por gerar mudanças específicas na expressão gênica e na função celular do organismo, levando dessa forma a uma sinalização (ou resposta) ao estresse (Prohászka & Füst, 2004). Pouco se sabe dos mecanismos envolvidos na resposta ao estresse térmico em *T. cruzi*, podendo ser pontuado dois mecanismos moleculares, relacionado com o tipo de choque térmico que o parasito sofre: (i) aumento da expressão de *heat shock proteins* (HSPs), quando exposto a um choque térmico de calor, e, (ii) mudanças na composição lipídica da membrana do parasito, quando o choque térmico envolve expor a parasito a baixas temperaturas (revisto em Jimenez, 2014).

HSPs são chaperonas essenciais na resposta ao estresse térmico, podendo ser expressas constitutivamente ou durante eventos de estresse, com papel essencial no enovelamento, agregamento, localização intracelular, secreção, regulação e degradação de outras proteínas (Folgueira & Requena, 2007). Quando exposto a temperatura de 37°C, as formas epimastigotas de *T. cruzi* (comumente mantidas a 28°C) aumentam a expressão de HSP quando comparado ao nível geral de transcrição (que diminui nessa condição), quando se aumenta a temperatura de incubação para 40°C, o nível de HSP diminui enquanto o número geral de proteínas aumenta (de Carvalho e cols., 1990). A 42°C, o *splicing* e o poliadenilação diminuem, sendo possível observar o acúmulo de pre-mRNA que codifica HSP

associados a polissomos (Engman e cols., 1995), sem alterar a distribuição do mRNA maduro, havendo inibição da transcrição de genes relacionados com a HSP (Giambiagi-de-Marval e cols., 1996; Nazer e cols., 2012).

O mecanismo pelo qual as HSP apresentam maior expressão é dependente da estabilidade do mRNA. Em tripanosomatídeos, tal ação é controlada pela ação de elementos inseridos na região 3'-UTR (Clayton e cols., 2007). Interessantemente, o mRNA que codifica a HSP70 aumenta quando expostos a maiores temperaturas (29°C por 60 min e 37°C por 120 min), efeito mediado pelas regiões ricas em uracila na região 3' UTR e por aceptores *trans-splicing* na região 5' UTR (Rodrigues e cols., 2010).

Quando se tem a transmissão do parasito do hospedeiro vertebrado para o invertebrado, o parasito é exposto a menores temperaturas, sendo seu efeito sobre a mudança de forma no *T. cruzi* pouco estudado (revisto em Jimenez, 2014). No *T. brucei*, sabe-se que a conversão da tripomastigota sanguínea para as procíclicas (forma presente no vetor invertebrado) é desencadeada pelo cis-aconitato, sendo a expressão do seu transportador modulada pela mudança da temperatura para 20°C (Dean e cols., 2009).

A teoria da adaptação homeoviscosa foi construída sobre o fato de que a composição de fosfolipídeos de diversos organismos sofre alteração em resposta a mudança na temperatura do ambiente, mantendo dessa forma a fluidez da membrana plasmática em condições “não ideais” que envolvam variações na temperatura (Hazel, 1995, revisto em Dymond, 2015). No *T. cruzi*, tal fenômeno também ocorre, nas formas presentes no triatomíneo, quando expostas a 37°C, apresentam aumento na proporção de ergosterol e a proporção de insaturações na cadeia alifáticas dos fosfolipídeos presentes na membrana 24 h após o choque térmico (Florin-Christensen e cols., 1997).

Em outros modelos procariotos e eucariotos, aumento da temperatura resulta em uma fluidez transitória da membrana plasmática, estimulando a entrada de cálcio por canais específicos (Shigapova e cols., 2005, Nagy e cols., 2007). O cálcio no ambiente intracelular tem diversas funções, dentre estas ativar fatores associados com a função de HSP e/ou diversas cascatas de sinalização celular, dessa forma durante alterações térmicas há uma resposta celular que leva a modificações na

expressão gênica, adaptação metabólica e remodelamento de membranas, necessárias para a sobrevivência e adaptação do parasito (Balogh e cols., 2013).

Pérez-Morales e colaboradores (2012) analisaram a expressão proteica em epimastigotas de *T. cruzi* (cepa Ninoa) submetidos a choque térmico de 37 e 42°C através de técnicas de espectrometria de massas, sendo encontradas 24 proteínas com expressão diferenciada distribuídas em oito grupos funcionais: metabolismo (25%), defesa celular (16,7%), interação com o ambiente celular (16,7% das proteínas identificadas), proteínas hipotéticas (16,7%), morte celular (12,5%), transporte celular (4,2%), síntese proteica (4,2%) e ciclo celular (4,2%). Esses resultados claramente indicam que outras proteínas relacionadas com HSP ou modelagem lipídica têm sua expressão modificada durante estresse térmico.

3. Autofagia

Na década de 1950, de Duve descreveu o lisossomo em hepatócitos de ratos, sendo premiado com o Nobel devido a esta descoberta. Estudando os possíveis papéis desta organela, de Duve cunhou o termo “autofagia” (do grego, *auto*: si mesmo e *fagia*: comer) (De Duve, 1955). A autofagia é um processo fisiológico e constitutivo de degradação de organelas e componentes citoplasmáticos, por meio da sua fusão com lisossomos. A via autofágica é conservada filogeneticamente, e apresenta impacto no crescimento, sobrevivência e diferenciação das células eucarióticas (Kroemer e cols., 2010). De acordo com o mecanismo molecular e a seletividade do substrato, a autofagia pode ser classificada em três diferentes processos: macroautofagia, microautofagia e autofagia mediada por chaperonas.

3.1. Macroautofagia

Macroautofagia compreende um processo com várias etapas controladas pelas proteínas relacionadas à autofagia (Atg) (Klionsky e cols., 2003) (**Fig. I.11**). Em leveduras, tais proteínas localizam-se, na sua maioria, em uma estrutura específica denominada estrutura preautofagossomal (PAS). A análise das ações das proteínas Atg revelam informações essenciais sobre a formação, função e mecanismos regulatórios da autofagia (Mizushima e cols., 2011). Quando se tem condições de

privações nutricionais a proteína *mammalian target of rapamycin* (mTor) não exerce sua ação inibitória sobre a autofagia, cessando a hiperfosforilação no Atg13 (aumentando sua afinidade pelo Atg1). Em mamíferos, o Atg1, juntamente com a Atg9, o complexo ULK1-Atg13-FIP200 quinase, e o complexo Atg14-Vps34-beclina PI3 quinase induzindo desprendimento de porções de membranas de organelas como mitocôndria, retículo endoplasmático e Golgi por meio da ação da classe-III-fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K), gerando o fagóforo em uma região denominada estrutura pré-autofagosomal (Bloommaart e cols., 1997).

Para o autofagossomo ser formado é necessário o alongamento da membrana que foi desprendida, sendo tal processo dependente de dois sistemas de conjugação, que atuam de forma integrada, por um mecanismo de inicialização comum: o Atg12 é conjugado ao Atg5 em um processo dependente da ação de Atg7 e Atg10. Dessa forma cria-se um sítio para a interação com Atg16. O complexo Atg12-Atg5-Atg16 permite que o Atg8 seja clivado pelo Atg4 na sua porção C-terminal, criando um sítio para a interação da fosfatidiletanolamina (PE) (Tanida e cols., 2004).

Um dos sistemas de conjugação é iniciado com Atg7, que se liga a porção C-terminal da Atg12. Uma vez na sua forma ativa, a Atg12 se conjuga ao Atg5 através da atividade catalítica da Atg10. A Atg16 então é adicionada ao complexo, formando o complexo Atg12-Atg5-Atg16. O outro sistema de conjugação começa com a ação catalítica da Atg4, que remove a arginina da porção C-terminal da Atg8, expondo assim um resíduo de glicina. O Atg7 então atua nesse resíduo de glicina, ativando-o, e transfere o Atg8 para o Atg3. A Atg3 medeia a conjugação de Atg8 com a FE, lipidando a Atg8, gerando Atg8-FE. Ambos os sistemas de conjugação estão localizados no fagóforo e estão envolvidos na formação do autofagossomo (revisto em Yorimitsu & Klionsy, 2005).

Uma vez formado o complexo Atg8-FE este pode ser inserido na membrana do fagóforo, via ação da Atg7, Atg 3 e Atg16, onde permanece até sua fusão com o lisossomo, atuando como um bom marcador para os autofagossomos, sua retirada das organelas é realizada também pela ação catalítica da Atg4 (Satoo e cols., 2009). Ação das Atgs permitem o alongamento e fechamento do autofagossomo em torno do material a ser degradado e o direciona para a fusão com o lisossomo para haver a degradação do conteúdo pelas hidrolases (revisto em Juenemann & Reits, 2012).

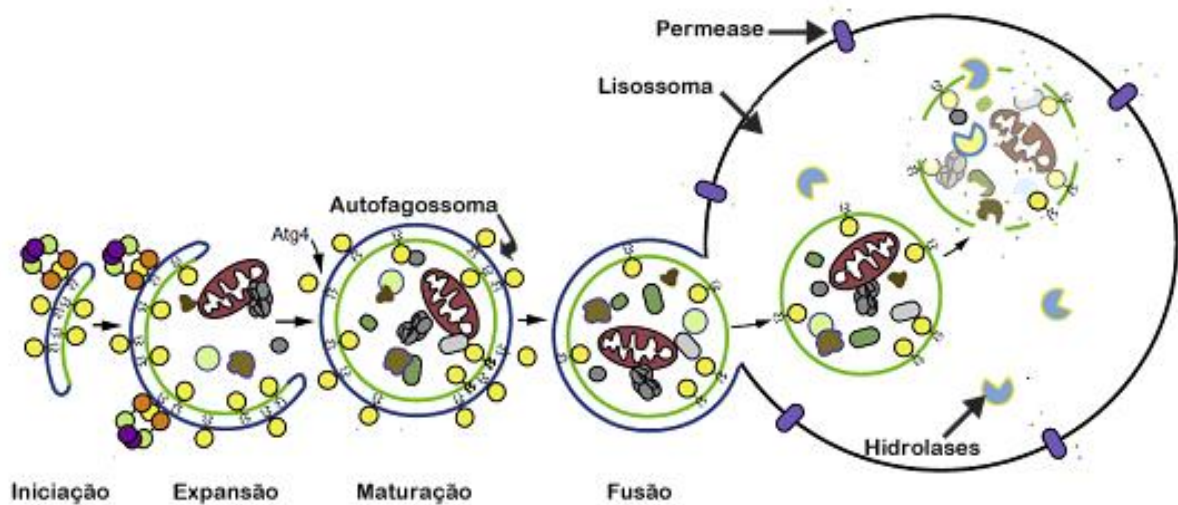


Figura I.11. Proteínas Atgs e a via autofágica. O complexo ULK1-Atg13-FIP200 quinase e o complexo Atg14-Vps34-beclina PI3 quinase atuam inicialmente no recrutamento de outras Atgs para o isolamento da membrana do fagóforo. Em seguida há indução do recrutamento seqüencial dos sistemas de conjugação Atg12 e Atg5 e LC3 (Atg8) para a membrana isolada. O Atg8 forma uma ligação covalente com o FE, gerando sua forma lipídica. Após o fechamento da membrana, as Atg8 são recicladas, exceto as que estão na membrana interna do autofagossoma. A parte final do processo é fusão entre o autofagossoma e o lisossoma para a degradação do material selecionado, incluindo o Atg8, pelas hidrolases lisossomais, e o material obtido da degradação é transportado para o exterior do lisossoma, para obtenção de energia (Patingre e cols., 2008).

3.2. Microautofagia

Compreende o processo de absorção direta de componentes do citoplasma pelos lisossomos. A dinâmica desse processo ocorre quando a membrana lisossomal é invaginada e forma os tubos autofágicos, contendo porção do citoplasma. Tal como no princípio da macroautofagia, a microautofagia era estudada exclusivamente morfológicamente, por metodologias ultraestruturais (Mortimore e cols., 1988).

Durante o processo de microautofagia há segregação de lipídeos e o deslocamento de proteínas transmembranas para regiões da membrana do lisossomo com menor densidade. Tal ação é induzida pela ação da GTPase Vsp1p, tornando possível a invaginação do lisossomo (Uttenweiler e cols., 2005). Essa invaginação cresce dando origem a estruturas tubulares características com diâmetro constante denominados túbulos autofágicos (Müller e cols., 2000). A formação dos

tubos autofágicos é mediada pela ação da Atg7 ou via chaperonas de transporte vacuolar (que atua conjugada a calmodulina) (Uttenweiler e cols., 2005). Pequenas vesículas se desprendem dos tubos autofágicos e tem movimento livre no lúmen do lisossomo enquanto são degradadas pelas hidrolases. Os nutrientes obtidos na degradação são liberados pela ação da Atg22 (Yang e cols., 2006).

3.3. Autofagia mediada por chaperonas

O processo pelo qual proteínas chegam à membrana do lisossomo e penetram para seu lúmen atravessando diretamente sua membrana é denominado autofagia mediada por chaperonas. As proteínas que são degradadas por tal via são selecionadas individualmente através de reconhecimento de um motivo KFERQ na sua seqüência de aminoácidos por uma chaperona (hsc70) (Dice, 1990). A proteína a ser degradada se liga ao receptor LAMP-2A e é transportada para o interior da organela, onde será degradada (Cuervo & Wong, 2015). As proteínas são retiradas especificamente sem perturbar as demais proteínas da vizinhança, fazendo a autofagia mediada por chaperonas eficiente em degradar proteínas com danos diversos, atuando em diversos processos celulares como no controle do nível de enzimas, de fatores de transcrição e de proteínas citoplasmáticas (Kaushik & Cuevo, 2012).

3.4. Autofagia em protozoários

Atraves de análises *in silico*, trabalhos publicados entre 2005 e 2008 sugeriram que mais da metade dos genes *ATG* presentes em leveduras apresentam um suposto gene ortólogo em tripanossomatídeos (Rigden e cols., 2005). Tal fato foi reafirmado por Herman e colaboradores (2006), por análises *in silico* sugerindo que em *T. cruzi* ocorreria uma versão “racionalmente inesperada” da via autofágica, descrevendo ainda a ausência do sistema de conjugação relacionado ao Atg12, Atg5, Atg10 e Atg16.

No ano de 2008, Alvarez e colaboradores estudaram a via autofágica em epimastigotas de *T. cruzi in vitro*, através de técnicas de microscopia de imunofluorescência e eletrônica de transmissão, confirmando o papel crucial do

sistema de conjugação Atg8, e ausência do sistema de conjugação Atg12. No mesmo ano foram descritas sequências análogas da *ATG4*, e seu papel no processamento do Atg8 (encontrado na membrana do autofagossomo durante privação nutricional) *in silico*. Foi demonstrada também a “via alternativa” autofágica na ausência dos genes *ATG5*, *ATG10* e *ATG12* (Shemi e cols., 2008). O papel do sistema Atg4-Atg8 foi reforçado ao encontrar diversas sequências homólogas em tripanossomatídeos (*ATG4.1*, *ATG4.2* e *ATG8.1*, *ATG8.2*), enquanto em leveduras tem-se um análogo para cada ATG em questão.

Ensaio *in vitro* foram capazes de indicar que Atg4.1 é capaz de processar a Atg8.1 e a Atg8.2, enquanto o Atg4.2 apresenta menor atividade. Dentre as Atg8.1 e Atg8.2, apenas a primeira possui semelhanças com a Atg8 encontrada em *S. cerevisiae*. Reforçando esses dados, somente Atg8.1 pode ser encontrada em autofagossomos de *T. cruzi* (Alvarez e cols., 2008, revisto em Kiel, 2010).

Em formas epimastigotas de *T. cruzi* expostas a estresse nutricional, a autofagia é induzida (Kirisako e cols., 2000). Foi demonstrado por Alvarez e colaboradores (2008), que durante a metaciclogênese, epimastigotas aumentam a expressão de Atg8.1, co-localizando com carboxipeptidases nos reservosomos. Entretanto, formas tripomastigotas metacíclicas quase não possuem marcação para o Atg8.1. Dessa forma, a imunomarcação da proteína Atg8.1 é padrão ouro para o estudo morfológico da autofagia em tripomastigotas de *T. cruzi*.

Os mecanismos de sinalização molecular para indução da autofagia através da TOR ainda não foram elucidados em *T. cruzi*, tal como a formação do fagóforo induzido por alguma proteína análoga da VPS34 de mamíferos. Sabe-se apenas que a PI3K é funcional no parasito, e que até o momento apresenta papel na osmeorregulação e endocitose mediada por receptores (Schoijet e cols., 2008). Sugere-se que em formas epimastigotas a degradação através da via autofágica é realizada por cisteínas proteinases no interior dos reservosomos, uma vez que o tratamento com inibidores específicos de tais enzimas bloqueia a diferenciação (Alvarez e cols., 2011).

A ação de diferentes inibidores de quinases como estauroporina, genisteína e wortmanina são capazes de causar efeitos antiproliferativos em epimastigotas de *T. cruzi*, com grande produção de autofagossomos evidenciados por microscopia

eletrônica de transmissão, sem interferir na multiplicação de amastigotas e sua diferenciação para tripomastigotas (Braga e cols., 2006). O papel da autofagia é crucial em diversos processos biológicos em células eucarióticas, além do *T. cruzi* outros parasitos como *Leishmania spp.*, *T. brucei*, *Plasmodium spp.* e *Entamoeba sp.*, podendo atuar como importante alvo farmacológico com ação anti-parasitária (revisto em Duszenko e cols., 2011).

O estudo do processo autofágico em *T. cruzi* mostra-se importante no desenvolvimento de novos alvos terapêuticos para o tratamento da doença de Chagas. Este processo é um dos principais mecanismos de degradação de organelas e macromoléculas sendo essencial para a manutenção da homeostase do parasito, com alto impacto em processos como diferenciação e metabolismo mitocondrial. A perturbação ou estímulo desta via pode potencialmente avançar na escolha de molécula com efeito tripanocida, introduzindo uma possível nova classe farmacológica no tratamento da doença de Chagas (revisto em Duszenko e cols., 2011).

4. Justificativa

As mudanças nos padrões epidemiológicos observadas na doença de Chagas levaram a ascensão das vias alternativas de transmissão, dentre elas as vias oral e transfusional. Nessas vias o *T. cruzi* sofre grandes variações térmicas ao transitar por diferentes ambientes (tecido de hospedeiros vertebrados, polpa de açaí, caldo de cana, sangue). Dessa forma, os mecanismos de sobrevivência e manutenção de virulência associados à resistência do parasito é de grande importância para o entendimento de processos desencadeados pelos parasitos em situações de estresse térmico, objeto de estudo desse trabalho

II. OBJETIVOS

Objetivo geral

Analisar a mitocôndria e autofagia de tripomastigotas de *T. cruzi* durante o estresse térmico.

Objetivos específicos

- Analisar o efeito do estresse térmico sobre a viabilidade e morfologia de tripomastigotas;
- Avaliar o efeito do estresse térmico sobre a morfologia e funcionalidade de mitocôndria de tripomastigotas;
- Investigar a participação da autofagia em tripomastigotas submetidos à variação térmica;
- Averiguar o impacto do estresse térmico sobre a capacidade infectiva de tripomastigotas de *T. cruzi*, *in vitro*.

III. MATERIAIS E MÉTODOS

1. Parasitos e culturas de células

No desenvolvimento deste trabalho utilizamos a cepa Y de *T. cruzi* (Silva & Nussenzweig, 1953). As formas tripomastigotas sanguíneas (TS) foram obtidas de camundongos albinos suíços infectados com um inóculo de 1×10^5 parasitos/0,2mL pela via intraperitoneal e posteriormente imunossuprimidos utilizando ciclofosfamida. Os parasitos eram obtidos durante o pico da parasitemia (sétimo dia após a infecção), isoladas por centrifugação diferencial e resuspensas em RPMI (pH 7,4) (de Oliveira, 2012).

Para obtenção de formas tripomastigotas de cultura (TC), utilizamos células Vero (linhagem celular epitelial renal, oriunda do epitélio distal normal do cótex renal do macaco verde, ATCC® CCL-81™) segundo metodologia descrita por Oliveira-Jr e colaboradores (2013). As culturas foram mantidas em meio RPMI 1640 suplementado com 10% soro fetal bovino (SFB) (Sigma-Aldrich), 1% L-glutamina (Sigma-Aldrich) e 1% penicilina-estreptomicina (10.000 unidades) (RPMIS), em estufa à 37°C e atmosfera com 5% de CO₂. Garrafas de cultura (150 cm²) contendo células Vero foram preparadas a partir da tripsinização de garrafas-mãe utilizando solução de 1% tripsina (Sigma-Aldrich) em tampão fosfato (PBS, pH 7,2) por 15 min a 37°C, quando então o sobrenadante rico em células foi coletado, quantificado e plaqueado (2×10^6 células/garrafa). Após 40 min, o meio de cultura foi trocado para retirada das células não aderidas e a incubação prosseguiu por 24 h. A seguir, as culturas foram infectadas com TS (proporção 100 parasitos:1 célula Vero) também por 24 h. O meio de cultura foi trocado a cada 24 h. Cinco dias pós-infecção, as formas tripomastigotas livres eram obtidas a partir do sobrenadante por processo de centrifugação diferencial (centrifuga Fanem, São Paulo, Brasil) em tubos cônicos de 50 mL. Células Vero e formas amastigotas presentes no sobrenadante sedimentavam a 1.500 rpm/15 min e o sobrenadante resultante era centrifugado a 4.500 rpm/15 min para isolamento das formas tripomastigotas de cultura (TC), sendo aceita uma contaminação de até 5% de amastigotas.

Para os ensaios de interação parasito-hospedeiro, macrófagos eram obtidos a partir do lavado peritoneal de camundongos albinos suíços, quantificados em câmara de Neubauer, sendo 100.000 células/poço plaqueadas em placas de 24 poços (detalhes no item 9).

Todos os experimentos foram executados de acordo com as orientações estabelecidas pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL), pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Fundação Oswaldo Cruz (CEUA-Fiocruz), por meio da licença LW 16/13, e sob as regras internacionais de cuidados na manipulação de animais e agentes patogênicos (“Guidelines on the Care and Use of Animals for Experimental Purposes and Infectious Agents/NACLAR”). Os animais experimentais foram cedidos pelo Centro de Criação de Animais de Laboratório (CECAL) da Fundação Oswaldo Cruz.

2. Avaliação do efeito da temperatura x tempo de exposição sobre os parasitos

TS e TC foram resuspenso em meio RPMIS na concentração de 5×10^6 parasitos/mL. Em tubos de 500 μ L foram adicionados 200 μ L desta suspensão, sendo posteriormente incubados em diversas temperaturas (-20, 4, 15, 28, 37 e 40°C) por diferentes tempos (0, 2, 24, 144 h e eventualmente até 240 h). Para determinar a indução de lise celular sob o efeito da temperatura, os parasitos de cada condição experimental foram quantificados em câmara de Neubauer, de acordo com a seguinte fórmula:

$$\% \text{ de morte} = 100 - [(A/B)] \times 100, \text{ onde:}$$

A: concentração de parasitos na condição experimental avaliada

B: concentração de parasitos no tempo inicial

Foram realizados 5 experimentos independentes. A partir dos resultados foram calculados: Média (M) e o Desvio padrão (DP) sendo a análise estatística obtida pelo emprego do teste de Mann-Whitney com um intervalo de confiança ao nível de significância de 0,5%

3. Análises por microscopia eletrônica de transmissão e varredura de TC sob estresse térmico

Para análise ultraestrutural, os TC nas diferentes condições experimentais (temperaturas -20, 4, 28, 37 e 40°C; tempos 0, 2, 24 e 144h), foram lavados em PBS, e então fixados em 2,5% glutaraldeído, diluído em tampão cacodilato de sódio 0,1M (pH 7,2) a temperatura ambiente por 40 min. Após lavagens no mesmo

tampão, as amostras foram pós-fixadas em 1% tetróxido de ósmio, na presença de 0,8% ferrocianato de potássio e 2,5 mM cloreto de cálcio, diluídos em tampão cacodilato de sódio 0,1M, durante 20 min a temperatura ambiente. Novas lavagens foram realizadas e subsequentemente as células foram desidratadas em bateria crescente de acetona (50, 70, 90, 100 e 100%, por 5 min/etapa). Os parasitos foram infiltrados em solução de resina PolyBed 812 e acetona absoluta (1:1) por 12 h, seguido pelo emblocamento em resina pura. A polimerização foi realizada por 72 h a 60°C. Cortes ultrafinos foram obtidos e contrastados com acetato de uranila e citrato de chumbo e as grades analisadas em microscópio eletrônico de transmissão JEM1011 (Jeol, Tóquio, Japão). Alternativamente, para microscopia eletrônica de varredura, após as etapas de fixação, pós-fixação e desidratação descritas acima, os parasitos foram aderidos em lamínulas recobertas com poli-*L*-lisina, secos pelo método do ponto crítico com CO₂, metalizados com ouro (20 nm) e examinados ao microscópio eletrônico de varredura Jeol JSM6390LV. Todas as análises de microscopia eletrônica foram realizadas na Plataforma de Microscopia Eletrônica Rudolf Barth (IOC/Fiocruz). Foram realizados 3 experimentos independentes em cada metodologia.

4. Avaliação da integridade da membrana celular de TC sob estresse térmico

TC nas diferentes condições experimentais (temperaturas -20, 4, 28, 37 e 40°C; tempos 0, 2, 24 e 144 h) foram marcados com 100 nM TO-PRO-3 (excitação no comprimento de onda de 642 nm e emissão em 661 nm) (ThermoFisher Scientific) por 30 min a 37°C. O TO-PRO-3 é um intercalante de DNA de fita dupla de alto peso molecular, ou seja, não consegue se difundir pela membrana plasmática íntegra. O TO-PRO-3 tem entre outros empregos a marcação da perda da integridade da membrana plasmática.

Em tal experimento utilizou-se como controle positivo parasitos mantidos a 80°C durante 2 h, e como controle negativo parasitos sem receber marcação pelo TO-PRO-3. A análise foi realizada no citômetro Cytex (CytexBiosciences Inc, Fremont, Califórnia, EUA), sendo capturados 10.000 eventos. Os dados obtidos foram analisados no programa Summit. Foram realizados 4 experimentos independentes.

5. Avaliação da ativação da via autofágica em TC sob estresse térmico

5.1. Marcação com monodansilcadaverina

Para uma primeira avaliação da via autofágica, utilizamos o marcador autofluorescente monodansilcadaverina (MDC) (excitação no comprimento de onda 335 nm e emissão em 518 nm) (Biederbick e cols., 1995). MDC permite a visualização de vesículas ácidas, lisossomos, e autofagolisossomos, através de fenômenos de sequestro iônico, e sua marcação aumenta em condições que induzem a via autofágica (Munafó & Colombo, 2001).

TC foram resuspenso em meio RPMIS na concentração de 10×10^6 parasitos/mL. Em microtubos de 1,5 mL foram adicionados 1 mL de suspensão de parasitos e a seguir foram mantidos em diferentes temperaturas (-20, 4, 28, 37 e 40°C) em tempos pré-definidos (0, 2, 24 e 144 h). Após incubação nas diferentes condições experimentais, os parasitos foram expostos a 100 μ M MDC (Sigma-Aldrich) por 60 min a 37°C. Após a marcação, os parasitos foram lavados em PBS e fixados em 4% PFA por 40 min a temperatura ambiente. A quantificação do percentual de tripomastigostas MDC+ (**Fig. III.1**) foi realizada no microscópio AxioObserver M1 (Zeiss, Oberkochen, Alemanha) com objetiva de 63x, sendo quantificados também o parâmetro número de pontos/ parasito marcado. Como controle positivo, incubamos os parasitos em meio de privação nutricional (PBS/6 h) (Munafó & Colombo, 2001). Foram realizados 3 experimentos independentes.

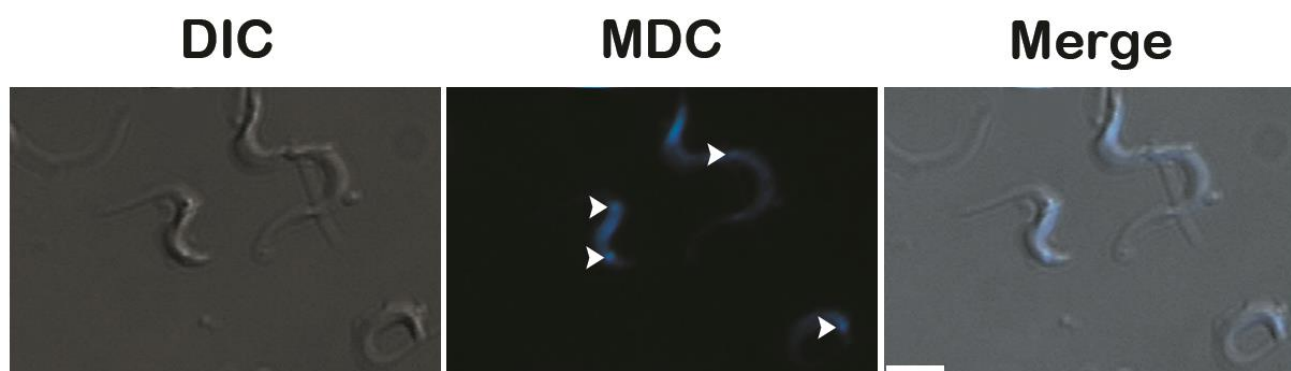


Figura III.1. Marcação com MDC em tripomastigotas de *T. cruzi*. cabeça de seta branca: vacúolos ácidos; barra: 10 μ m.

5.2. Marcação com anticorpo contra *TcAtg8*

Após incubação nas diferentes condições experimentais (temperaturas -20, 4, 28, 37 e 40°C; tempos 0, 2, 24 e 144 h), os parasitos foram lavados em PBS, fixados em 4% PFA por 40 min à temperatura ambiente, e depois lavados novamente em PBS para retirar o excesso de fixador. Os parasitos foram então permeabilizados por 1 h em solução contendo 1% albumina sérica bovina (BSA), 0,1% saponina, 5% SFB e a marcação com anticorpo contra *Atg8* de *T. cruzi* feita em coelho (Rhea Biotechnology, Campinas, Brasil) (1:200), realizada por 1 h. A seguir, os parasitos foram lavados com PBS e então marcados com anticorpo secundário Alexa 488 (Invitrogen), por 1h. Após novas lavagens em PBS, as amostras foram resuspensas e aderidas em lamínulas revestidas com poli-L-lisina. As lâminas foram então montadas com meio de montagem DABCO® (Sigma-Aldrich). Os parasitos foram analisados com objetiva de 100x em microscópio de fluorescência ImagerA.2 (Zeiss, Oberkochen, Alemanha). Como controle positivo, os parasitos foram incubados em meio de privação nutricional (PBS/6 h) (Munafó & Colombo, 2001). Os dados foram obtidos pela análise de 3 experimentos independentes.

6. Avaliação do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) de TC sob estresse térmico

TC nas diferentes condições experimentais (temperaturas -20, 4, 28, 37 e 40°C; tempos 0, 2, 24 e 144 h) foram marcados com 10 nM TMRE (metil éster de tetrametilrodamina, Sigma-Aldrich) por 30 min a 37°C. Tal marcador é utilizado para quantificar alterações no potencial de membrana mitocondrial. Trata-se de uma molécula permeável, carregada positivamente, de coloração laranja que se acumula na mitocôndria ativa, devido a carga negativa da organela. Uma mitocôndria inativa ou despolarizada tem um menor potencial de membrana e falha em sequestrar o TMRE.

Como controle da dissipação do $\Delta\Psi_m$, os parasitos foram pré-tratados com 10 μ M FCCP (carbonilcianeto 4-(trifluorometoxi)fenilhidrazona, Sigma-Aldrich) por 30 min. O FCCP é um ionóforo desacoplador da fosforilação oxidativa. O tratamento da célula com FCCP dissipa o potencial de membrana mitocondrial, e dessa forma anula a marcação mitocondrial pelo TMRE.

Como parâmetro de análise foi utilizado o índice de variação (IV), obtido utilizando a seguinte fórmula:

$$IV = (A_{\text{condição analisada}} - B_{\text{condição analisada}})/(A_{T0} - B_{T0}), \text{ onde,}$$

A: parasitos incubados com TMRE,

B: parasitos pré-tratados com 10 μM FCCP e marcados com TMRE.

Os valores para o tempo inicial se referem aos parasitos recém-obtidos de células Vero (T0). A análise foi realizada no citômetro Cytex (CytexBiosciences Inc, Fremont, Califórnia, EUA), sendo capturados 10.000 eventos. Os dados obtidos foram analisados no programa Summit. Foram realizados 5 experimentos independentes. A partir dos resultados foram calculados: Média (M) e o Desvio padrão (DP) sendo a análise estatística obtida pelo emprego do teste de Mann-Whitney com um intervalo de confiança ao nível de significância de 0,5%

7. Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) por TC sob estresse térmico

TC nas diferentes condições experimentais (temperaturas -20, 4, 28, 37 e 40°C; tempos 0, 2, 24 e 144 h) foram marcados com 10 μM DHE (dihidroetídio, Invitrogen) por 30 min a 37°C. O DHE é permeável a membranas celulares e sofre oxidação por radicais superóxidos a etídeo, que possui fluorescência vermelha. O etídeo por sua vez é um intercalante de DNA que permanece no interior da célula (Zhao e cols., 2003).

Como controle positivo adotamos a incubação com 10 μM antimicina A (AA, Sigma-Aldrich). Tal molécula atua se ligando a sítios específicos da citocromo c redutase (complexo III da cadeia transportadora de elétrons), o que interrompe a formação do gradiente de prótons pela membrana interna mitocondrial. Assim, inibe a produção de ATP e como resultado há também formação de grande quantidade de superóxido, justificando seu uso como controle positivo nessa análise.

O estudo foi realizado no citômetro Cytex (CytexBiosciences Inc, Fremont, Califórnia, EUA), sendo capturados 10.000 eventos. Os dados obtidos foram

analisados no programa Summit. Foram feitos 4 experimentos independentes. A partir dos resultados foram calculados: Média (M) e o Desvio padrão (DP) sendo a análise estatística obtida pelo emprego do teste de Mann-Whitney com um intervalo de confiança ao nível de significância de 0,5%

8. PCR em tempo real em TC sob estresse térmico

O RNA de TC nas diferentes condições experimentais (temperaturas -20, 4, 28, 37 e 40°C; tempos 0, 2, 24 e 144 h) foi extraído pelo método de TRIzol® (Life Technologies), como determina o fabricante, e posteriormente foi quantificado em espectrofotometro Qubit (ThermoFisher Scientific). O DNA complementar (cDNA) foi sintetizado utilizando o kit SuperScript® Vilo (Thermo Fisher Scientific). Genes mitocondriais (ATP sintase, complexo II, III e IV, citrato sintase), antioxidantes (tripanotiona redutase, triporedoxina peroxidase, TC52) e o controle endógeno (GAPDH) tiveram seus iniciadores sintetizados a partir das sequências genômicas dos respectivos genes de interesse depositadas no NCBI (**Tabela III.1**). Para a reação de PCR quantitativo utilizamos o SYBR (GoTaq® qPCR Master Mix, Promega) como sistema de detecção. Foram realizados 3 experimentos independentes. A partir dos resultados foram calculados: Média (M) e o Desvio padrão (DP) sendo a análise estatística obtida pelo emprego do teste de Mann-Whitney com um intervalo de confiança ao nível de significância de 0,5%

Tabela III.1. Sequência dos iniciadores *forward* e *reverse* dos genes mitocondriais e antioxidantes utilizados no qPCR.

Gene	Iniciador <i>forward</i>	Iniciador <i>reverse</i>
Citrato sintase	CGGACCCTCGCTATATGTGT	GGGAAGGGATTTTTTCGTCTT
Complexo II	GGCTTTGGAAACAACCCATA	TCAATCAACCAGCGATACGA
ATP sintase	TGGCTACCTGGACGATGTGA	CGTGTAGGACAGGGCTATTT
Complexo IV	CTACGTGAAAAGACGCGTTG	GCATACTCCCGCTCAACATT
Complexo III	GGTCACAGTGAACAGGCAAA	CCCCAACGAAAGAAATACCA
Tripanotiona redutase	ACCTGCGGTCTCATTGAAGAGGTT	ACAGTGCCATCGGAGTGGTTTGTA
Tc52	TAACCAGCGTGAAACTGTGCCAAC	TCACATGGTACGATCCATCGGCAT
Triporedoxina peroxidase	TATGGTGTGCTGAAGGAGGAGGAT	ACTGGAACGCCTTACAAGACGAA
GAPDH	CATGGTCTTTCAAGCCTTGTGTGA	TCTTCGTCGTCGTCACGTTGTA

9. Infecção em macrófagos peritoneais por TC submetidos a estresse térmico

Para analisar o perfil de infecção em macrófagos *in vitro* frente aos parasitos incubados em variadas condições experimentais (temperaturas -20, 4, 28, 37 e 40°C; tempos 0, 2, 24 e 144 h) estes foram adicionados às culturas de macrófagos peritoneais (relação 10:1 parasitos/macrófago) e mantidos em estufa a 37°C com atmosfera contendo 5% de CO₂. Duas metodologias foram aplicadas: (i) os parasitos interagiram durante 24 h com os macrófagos, e então as lamínulas contendo as células infectadas eram lavadas, fixadas e coradas pelo método de Panótico rápido; (ii) os parasitos interagiram durante 24 h com os macrófagos, seguido da lavagem das culturas com PBS para retirada dos parasitos do sobrenantes e as culturas infectadas foram mantidas por mais 72 h em estufa de 37°C e em atmosfera de 5% de CO₂, fixados e corados pelo Panótico rápido. As lamínulas foram analisadas em microscopia de luz, sendo avaliados o percentual de células infectadas, e quantificados uma amostra de no mínimo 300 macrófagos por condição experimental.

Foram realizados 3 experimentos independentes, em duplicata técnica. A partir dos resultados foram calculados: Média (M) e o Desvio padrão (DP) sendo a análise estatística obtida pelo emprego do teste de Mann-Whitney com um intervalo de confiança ao nível de significância de 0,5%

IV. RESULTADOS

1. Avaliação do efeito da temperatura sobre *T. cruzi*

As análises do efeito direto da temperatura sobre a viabilidade dos tripomastigotas (consolidados a partir de seis experimentos independentes) mostraram lise mais rápida quando os parasitos foram incubados a -20 e 40°C (**Fig. IV.1 e Tabela IV.1**), sendo observado que a porcentagem de lise foi superior a 98% após 24 h a para ambas condições.

As temperaturas de 28 e 37°C alteraram a viabilidade dos parasitos somente após 144 e 168 h alcançando 85% e 100% de morte, respectivamente (**Fig. IV.1, Tabelas IV.1 e IV.2**).

Por outro lado, os parasitos submetidos às temperaturas de 4 e 15°C apresentaram maior sobrevivência, com percentuais de morte de 48,6% e 60,7%, após 168 h, respectivamente, e a morte de todos os parasitos foi alcançada após 240 h (**Fig. IV.1, Tabelas IV.1 e IV.2**).

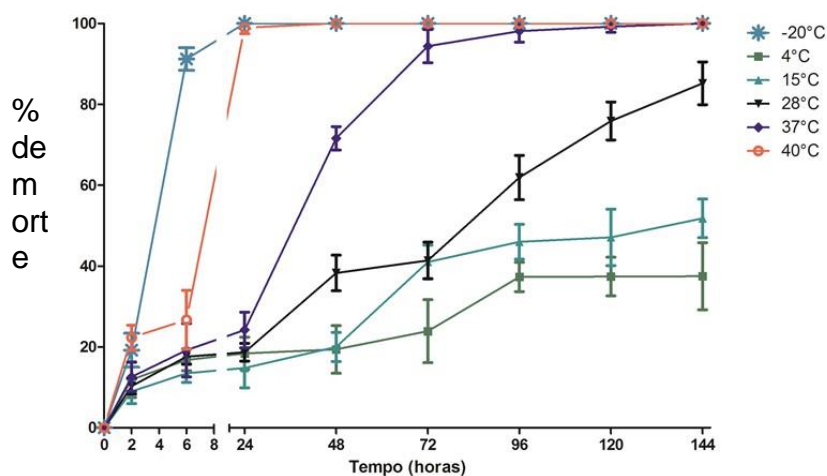


Figura IV.1. Efeito da temperatura sobre formas tripomastigotas obtidas de cultura celular. Análise por contagem em câmara de Neubauer a fresco (n = 3).

Tabela IV.1. Efeito da temperatura sobre formas tripomastigotas obtidas de cultura celular.
(2 a 96 h).

% morte						
°C	2 h	6 h	24 h	48 h	72 h	96 h
-20°C	19,2 ± 4,2	91,2 ± 2,8*	100,0 ± 0,1#,*	100,0 ± 0,0	100,0 ± 0,0	100,0 ± 0,0
4°C	11,9 ± 4,4	16,8 ± 2,7	18,4 ± 4,0	19,4 ± 5,9	23,9 ± 7,8#	37,3 ± 3,6#,*
15°C	9,0 ± 3,0	13,5 ± 2,3*	14,8 ± 4,9#	20,0 ± 3,6#	41,0 ± 4,2#	46,0 ± 4,3#
28°C	10,3 ± 2,0	17,6 ± 1,9#,*	18,7 ± 2,2#	38,3 ± 4,4#,*	41,4 ± 4,5#	61,9 ± 5,5#,*
37°C	12,6 ± 3,6	19,2 ± 6,6	24,2 ± 4,4#	71,6 ± 2,9#,*	94,4 ± 4,1#,*	98,1 ± 2,7#
40°C	22,3 ± 3,1	26,7 ± 7,3	98,9 ± 1,4#,*	100,0 ± 0,0#	100,0 ± 0,0#	100,0 ± 0,0#

* diferença significativa quando comparado ao tempo anterior ($p \leq 0,05$)

diferença significativa quando comparado a 2 h de incubação ($p \leq 0,05$)

Os valores correspondem à média ± desvio padrão de três experimentos independentes

Tabela IV.2. Efeito da temperatura sobre formas tripomastigotas obtidas de cultura celular
(120 a 240 h)

% perda de sobrevivência						
°C	120 h	144 h	168 h	192 h	216 h	240 h
-20°C	100,0 ± 0,0	100,0 ± 0,0	100,0 ± 0,0	100,0 ± 0,0	100,0 ± 0,0	100,0 ± 0,0
4°C	37,4 ± 4,8#	37,5 ± 8,3#	48,6 ± 4,7#	47,4 ± 7,7#	47,8 ± 3,0#	50,5 ± 2,8#
15°C	47,1 ± 7,0#	51,8 ± 4,8#	60,7 ± 7,0#	68,3 ± 6,5#	72,6 ± 2,3#	72,7 ± 1,4#
28°C	75,9 ± 4,7#,*	85,2 ± 5,3#,*	97,4 ± 2,9#,*	100,0 ± 0,0#	100,0 ± 0,0#	100,0 ± 0,0#
37°C	99,2 ± 1,4#	100,0 ± 0,0#	100,0 ± 0,0#	100,0 ± 0,0#	100,0 ± 0,0#	100,0 ± 0,0#
40°C	100,0 ± 0,0#	100,0 ± 0,0#	100,0 ± 0,0#	100,0 ± 0,0#	100,0 ± 0,0#	100,0 ± 0,0#

* diferença significativa quando comparado ao tempo anterior ($p \leq 0,05$)

diferença significativa quando comparado a 2 h de incubação ($p \leq 0,05$)

Os valores correspondem à média ± desvio padrão de três experimentos independentes

A análise do efeito do estresse térmico na morfologia dos parasitos por microscopia de luz apontou a integridade morfológica dos protozoários na maior parte das condições avaliadas, sendo que as incubações a -20°C por 2h, e a 28 e

37°C por 144 h induziram alterações morfológicas proeminentes, gerando fenótipo semelhante a amastigotas (**Fig. IV.2**).

Em particular, em 28°C após 144 h, foi possível observar alguns parasitos com morfologia semelhante a epimastigotas, com cinetoplasto típico desta forma, e estes formando por muitas vezes macroestruturas semelhantes a rosetas (dados não mostrados).

Com bases nestes resultados selecionamos as seguintes condições experimentais nos ensaios subsequentes: temperaturas de -20, 4, 28, 37 e 40°C. Estas condições experimentais foram então testadas sobre tripomastigotas sanguíneos (TS) obtidos de camundongos.

Ainda durante a análise dos parasitos corados pelo método de Panótico rápido foi quantificada a proporção de diferentes formas dos parasitos em cada condição experimental (**Fig. IV.3 e Tabela IV.3, IV.4 e IV.5**). Nota-se um aumento na proporção de formas semelhantes a amastigotas em todas as condições de maneira tempo-dependente. Destacam-se as condições de 28 e 37°C, que após 144 h de incubação apresentam uma proporção de amastigotas superior à de tripomastigotas. Podemos apontar ainda uma maior proporção de formas epimastigotas-símile do que nas demais condições. É importante ressaltar que esta análise foi possível somente após concentração da suspensão dos parasitos.

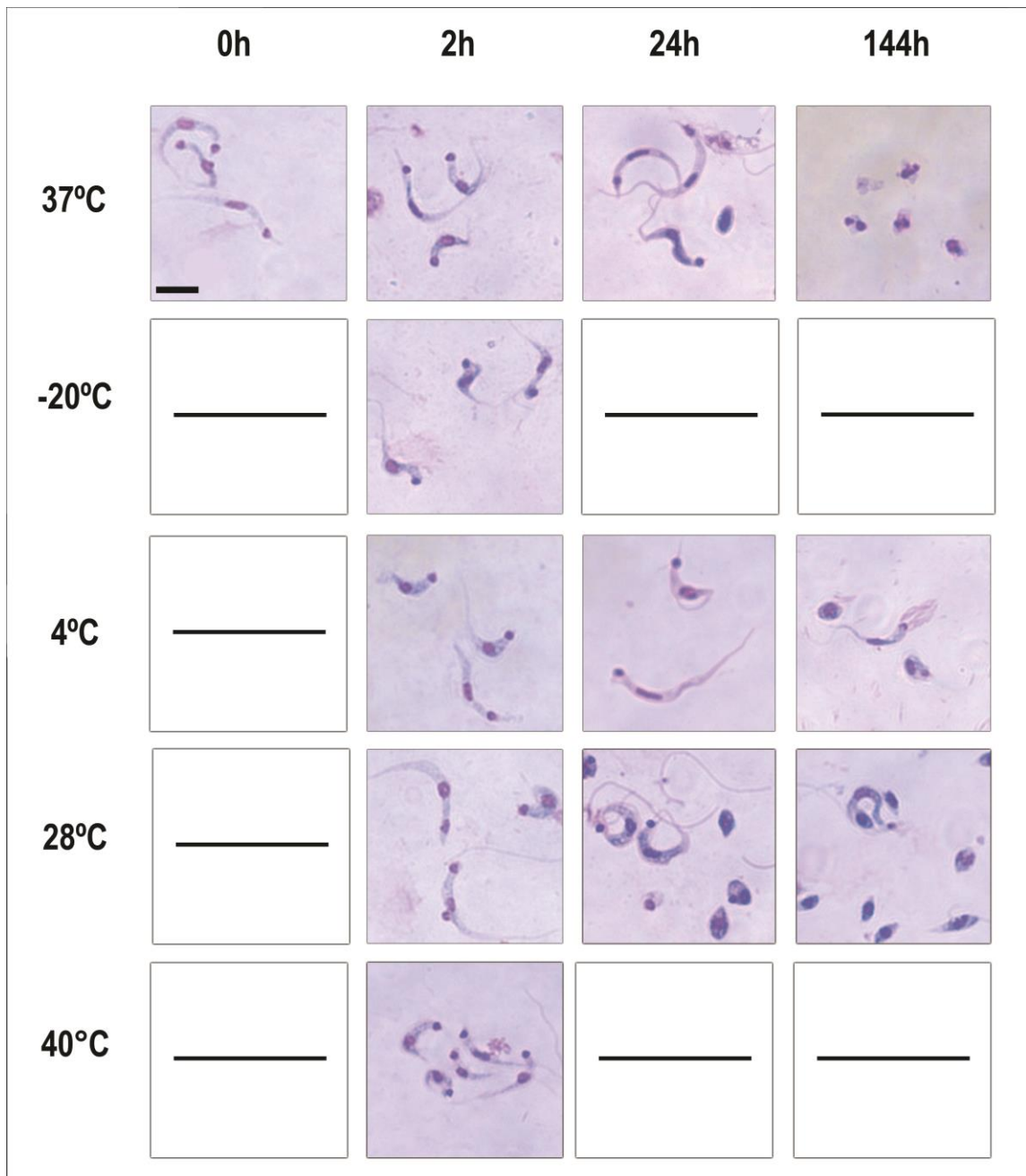


Figura IV.2. Morfologia de formas tripomastigotas de cultivo celular (TC) nas diferentes condições experimentais. Parasitos foram concentrados por centrifugação, fixados e corados pelo método de Panótico rápido (n = 3). Barra = 5 µm.

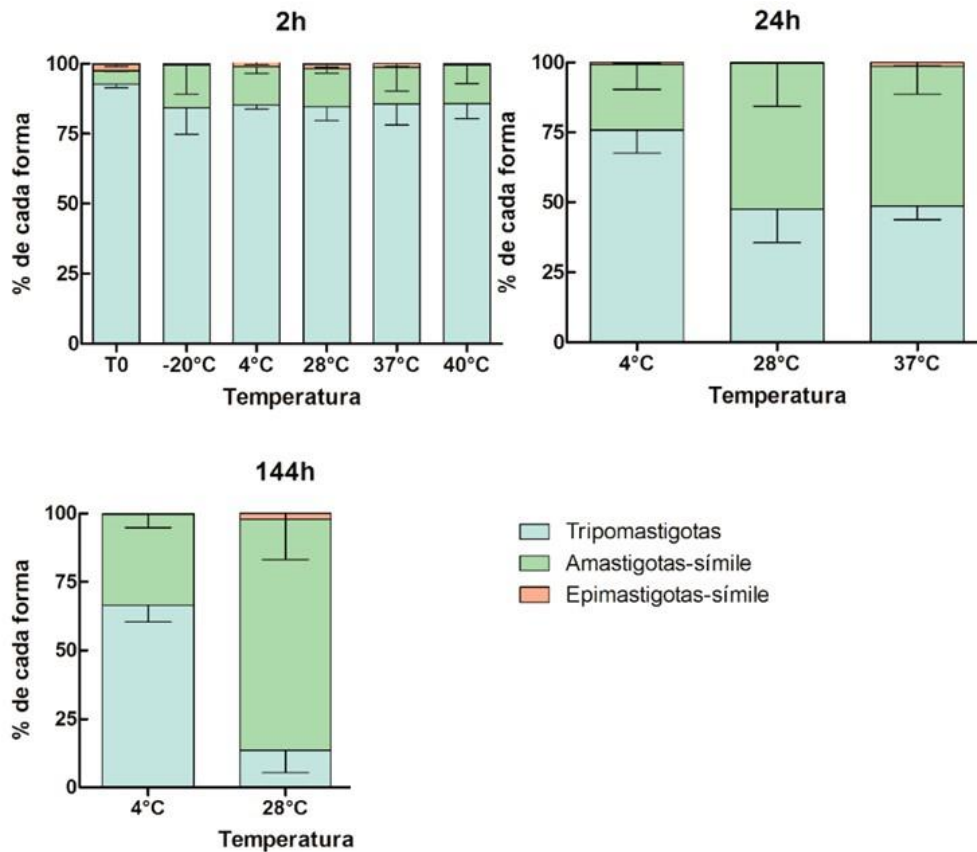


Figura IV.3. Ação de diferentes temperaturas na alteração da forma de TC. Parasitos foram concentrados por centrifugação, fixados e corados pelo método de Panótico rápido (n = 3).

Para avaliar o efeito da temperatura sobre tripomastigotas obtidos do sangue de camundongos foram realizados cinco experimentos independentes. Os resultados apontam que o percentual de morte aumentou de maneira tempo-dependente em todas condições avaliadas. Nas temperaturas de -20 e 40°C, os parasitos sofrem morte mais rápida, dado semelhante ao descrito para TC, com morte total total após 24 h de incubação (**Tabela IV.1**). Nas temperaturas de 4, 28 e 37°C, a taxa de morte é mais lenta, sendo observado em 144 h: 41,1%, 88,6% e 100%), respectivamente (**Tabela IV.6, Fig. IV.4**).

Tabela IV.3. Efeito da temperatura sobre formas tripomastigotas obtidas do sangue de camundongos infectados (2-144 h)

	% morte		
	2 h	24 h	144 h
37°C	16,3 ± 2,8	30,3 ± 3,9 ^{*,#}	99,7 ± 0,7 ^{*,#}
-20°C	25,9 ± 5,9	100,0 ± 0,0 ^{*,#}	100,0 ± 0,0 ^{*,#}
4°C	4,5 ± 1,5	16,5 ± 2,1 ^{*,#}	41,1 ± 5,4 ^{*,#}
28°C	9,7 ± 1,2	59,9 ± 3,7 ^{*,#}	88,6 ± 1,3 ^{*,#}
40°C	90,2 ± 3,6 ^{*,#}	100,0 ± 0,0 ^{*,#}	100,0 ± 0,0 ^{*,#}

* diferença significativa quando comparado ao tempo anterior ($p \leq 0,05$)

diferença significativa quando comparado às 2 h de incubação ($p \leq 0,05$)

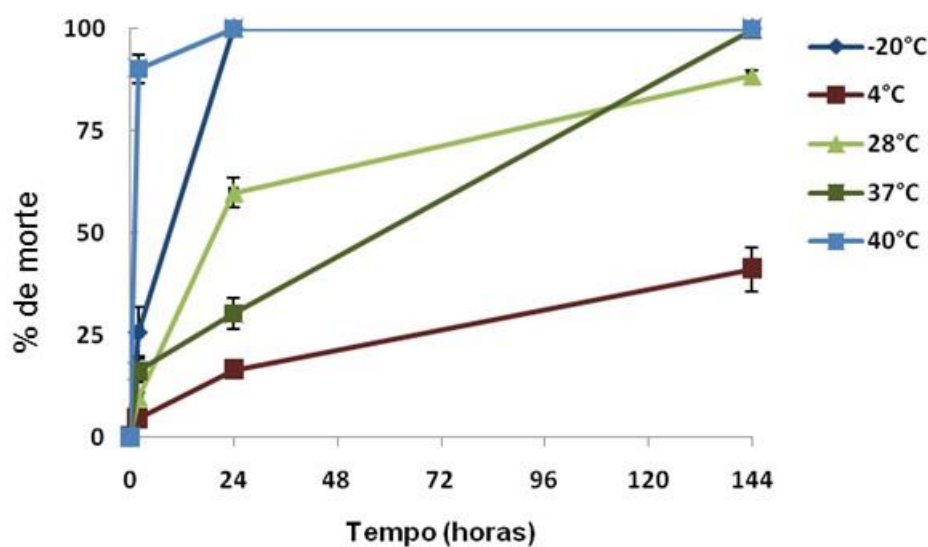


Figura IV.4. Percentual de morte sob o efeito da temperatura sobre formas tripomastigotas sanguíneas. Análise por contagem em câmara de Neubauer a fresco ($n = 5$).

A comparação entre o efeito da temperatura sobre TC e TS apontou perfis semelhantes na maioria das condições experimentais estudadas, exceto 28°C/24 h e 40°C/2 h, onde os parasitos obtidos de cultura demonstraram maior resistência a alteração térmica (**Fig. IV.5**). Assim, a partir dos dados obtidos, utilizamos apenas

TC para dar continuidade a este estudo, devido à maior facilidade na obtenção de uma grande quantidade de parasitos, sem sacrifício de animais e com menor custo.

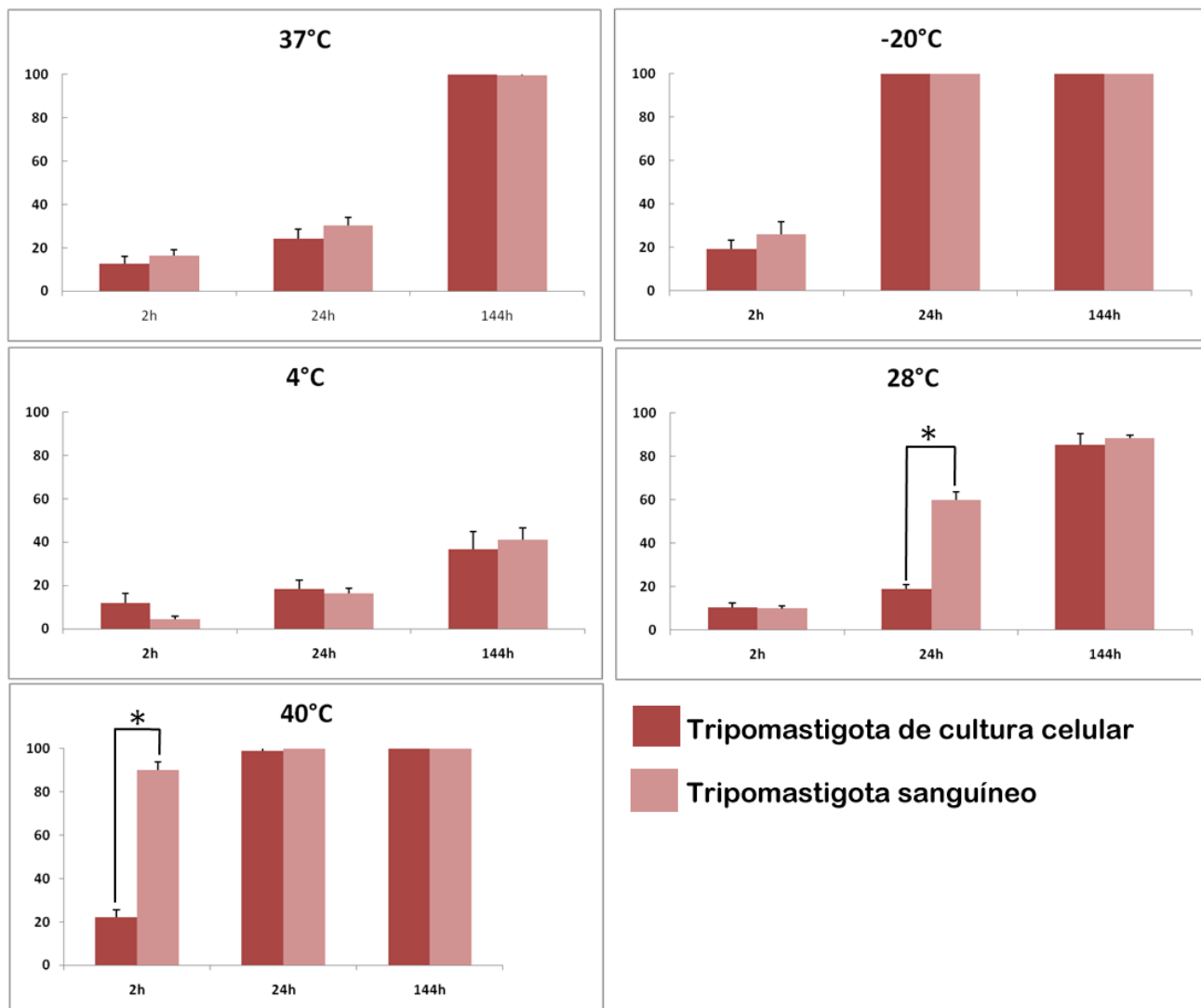


Figura IV.5. Análise comparativa do efeito da temperatura sobre tripomastigotas de cultura (TC) e sanguíneos (TS). * $p \leq 0,05$.

2. Análise ultraestrutural

2.1. Microscopia eletrônica de varredura

Para melhor avaliar os aspectos gerais dos parasitos incubados a 4 e 28°C por 144h utilizamos a técnica de microscopia eletrônica de varredura (**Fig. IV.6**). Parasitos recém obtidos de célula Vero apresentaram morfologia típica de formas tripomastigotas (**Fig. IV.6A**), ao passo que a incubação a 4°C por 144 h levou a

mudanças morfológicas importantes nos tripomastigotas como retração do corpo, e em alguns casos torção da sua região posterior (**Fig. IV.6B, C-F**). Parasitos sem alterações também foram observados (**Fig. 6.D**). Foi constatada a presença de formas amastigotas-símile (**Figs. IV.6C e E**), caracterizada pela forma arredondada, com o flagelo reduzido, interiorizado ou ausente. Já a temperatura de 28°C induziu a presença de inúmeros amastigotas-símile (**Fig. IV.6G e H**), e raros epimastigotas-símile (**Fig. IV.6H**).

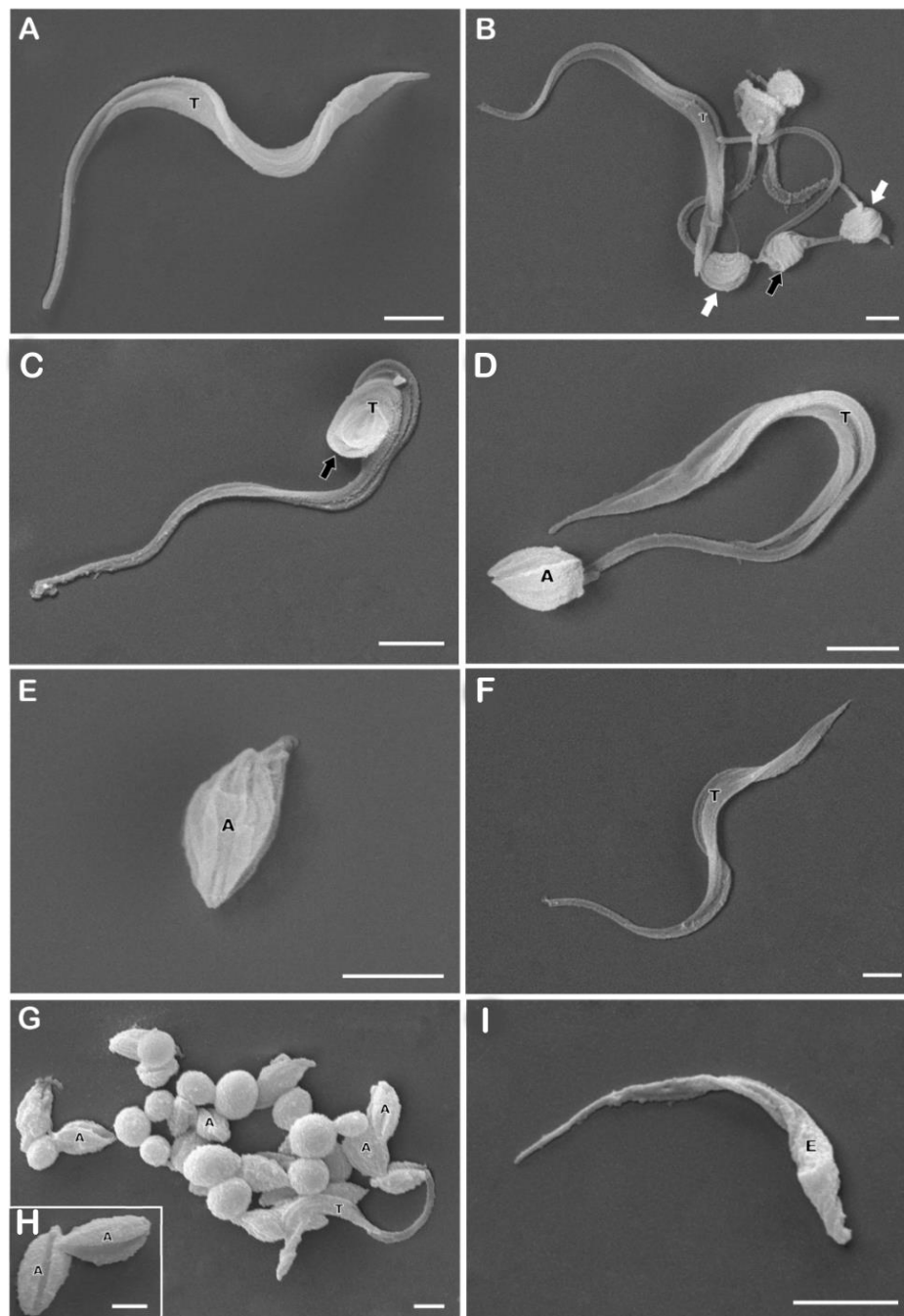


Figura IV.6. Análise por microscopia eletrônica de varredura de tripomastigotas submetidos ao estresse térmico. (A) parasitos recém-extraídos de célula Vero demonstrando morfologia típica (T). (B-F) Parasitos incubados a 4°C por 144 h, onde são observadas retração do corpo (setas brancas) e torção da região posterior do parasito (seta preta), além da presença de formas amastigotas-símile (A). (G-I) Parasitos incubados a 28°C por 144 h, onde observamos maior proporção de formas amastigotas-símile, tal como formas epimastigotas-símile (E). Barras = 2 µm.

2.2. Microscopia eletrônica de transmissão

Ao analisar a ultraestrutura de cortes ultrafinos de TC recém isolados de células Vero, podemos constatar a morfologia típica do parasito. Organelas, como a mitocôndria, o flagelo e o cinetoplasto apresentam estrutura padrão (**Fig. IV.7**). Resultado semelhante foi observado em parasitos incubados à 37°C/2 h, mostrando ausência de danos (**Fig. IV.8**). Parasitos expostos à 4°C/2 h apresentaram inchaço das cisternas do Golgi (**Fig. IV.9**), enquanto a 28°C nesse mesmo tempo de incubação induziu o aparecimento de autofagossomos e estruturas membranares concêntricas, sugestivos do processo de autofagia (**Fig. IV.10**).

As temperaturas extremas geraram grandes danos aos parasitos já em duas horas de incubação. Parasitos expostos a -20°C apresentaram inchaço mitocondrial, com extração de material da matriz mitocondrial, maior frequência de aparecimento de autofagossomos, assim como condensação anormal da cromatina (**Fig. IV.11**). A exposição de parasitos a 40°C levaram a um inchaço das cisternas do Golgi, formação de estruturas membranares concêntricas no interior da mitocôndria, e aumento na formação de autofagossomos (**Fig. IV.12**). Podemos ainda observar um íntimo contato entre as membranas do retículo endoplasmático, da mitocôndria e do acidocalcisomo, demonstrando uma possível interação entre estas organelas (**Fig. IV.12A**).

Em 24 h, parasitos expostos a 4, 28 e 37°C apresentaram morfologia normal da mitocôndria e cinetoplasto, inchaço das cisternas do Golgi e aumento da formação de autofagossomos (**Figs. IV.13, 14 e 15**). Tripomastigotas incubados a 4 e 28°C apresentaram estruturas membranares concêntricas dentro da mitocôndria (**Figs. IV.14 e 15**). A exposição a 4°C induziu ainda a dilatação do retículo endoplasmático (**Fig. IV.14C**).

Nos parasitos submetidos a 4°C por 144 h podemos observar alterações mais severas nas organelas, dentre as quais se destacam o inchaço mitocondrial, porém sem apresentar perda da sua eletrondensidade, presença de estruturas membranares concêntricas distribuídas pelo citoplasma, além do inchaço do retículo endoplasmático e das cisternas do Golgi (**Fig. IV.16**). A incubação a 28 °C por 144 h levou ao aparecimento de cinetoplastos em forma transitória entre o mais frouxo (típico de tripomastigotas) e mais compactado (característico de amastigotas e epimastigotas) (**Figs. IV.17C e D**). Outras características recorrentes foram o inchaço mitocondrial e a presença de autofagossomos.

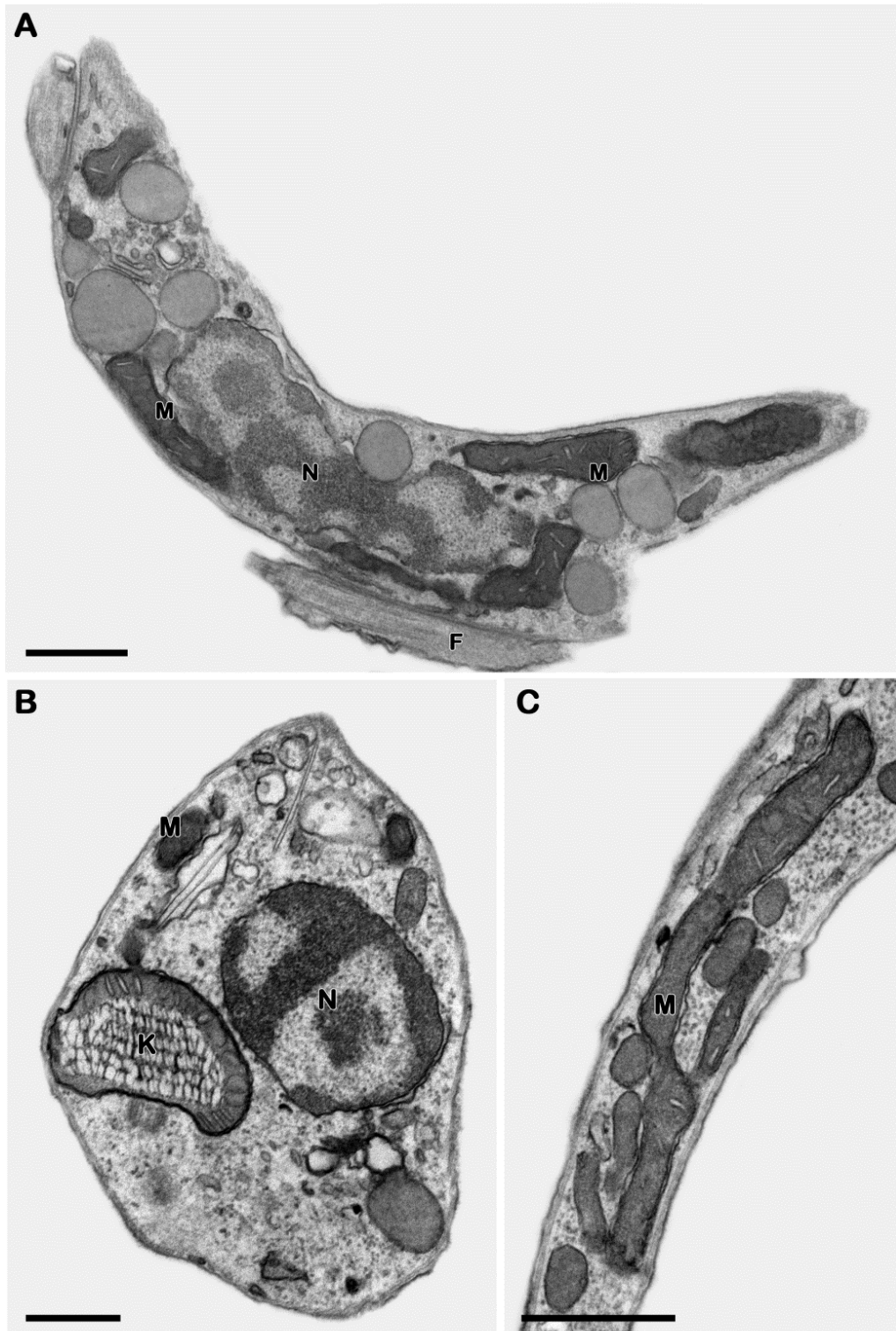


Figura IV.7. Análise por microscopia eletrônica de transmissão de tripomastigotas de TC recém isolados de células Vero. (A-C) Parasitos apresentando morfologia típica da mitocôndria (M), núcleo (N), cinetoplasto (K) e flagelo (F). Barras = 0,5 μ m.

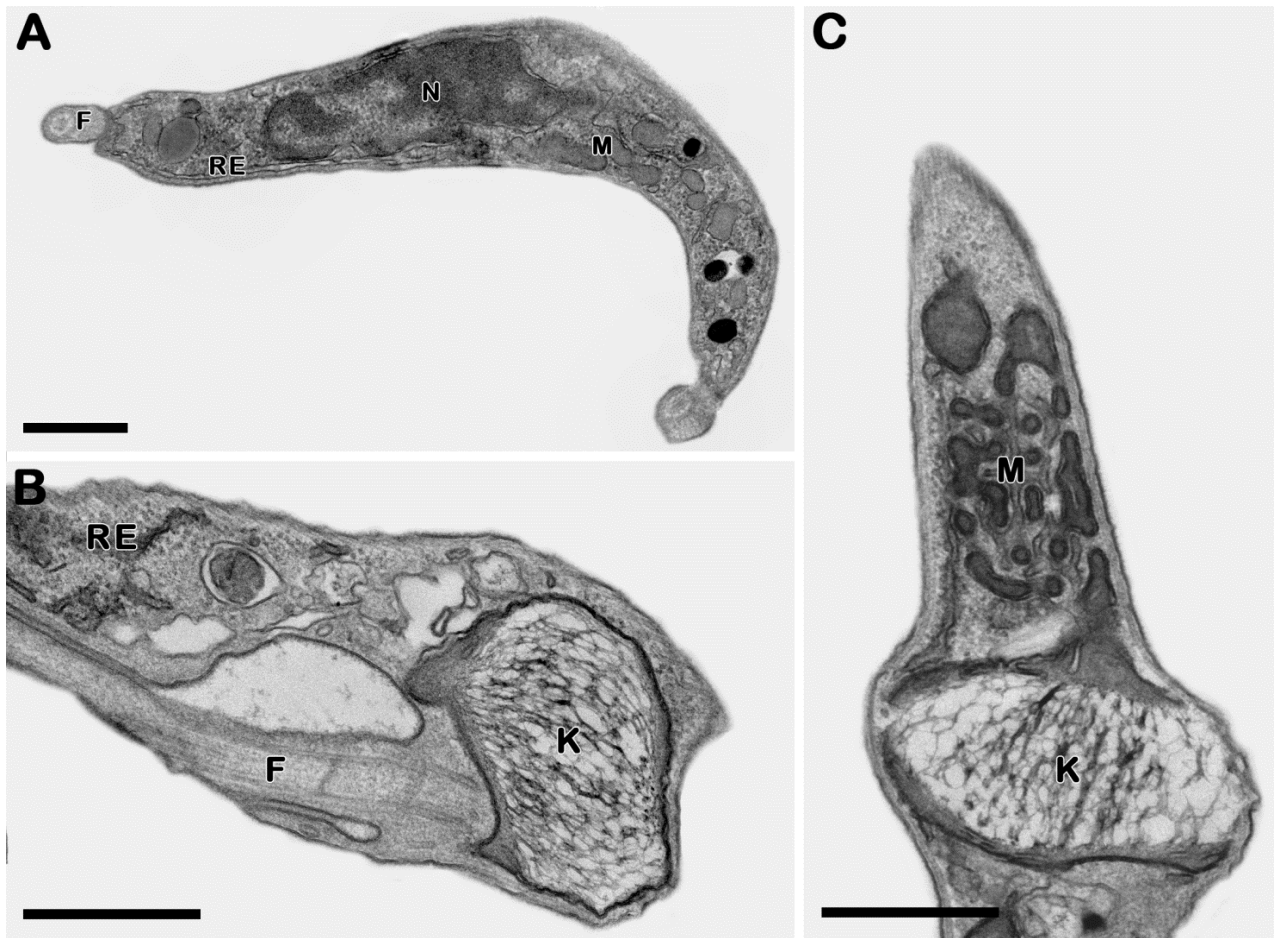


Figura IV.8. Análise por microscopia eletrônica de transmissão de tripomastigotas de *T. cruzi* incubados por 2 h a 37°C. (A-C) Parasitos apresentando morfologia típica da mitocôndria (M), núcleo (N), cinetoplasto (K) e flagelo (F), além de perfis de retículo endoplasmático por todo o parasito (RE). Barras = 0,5 μ m.

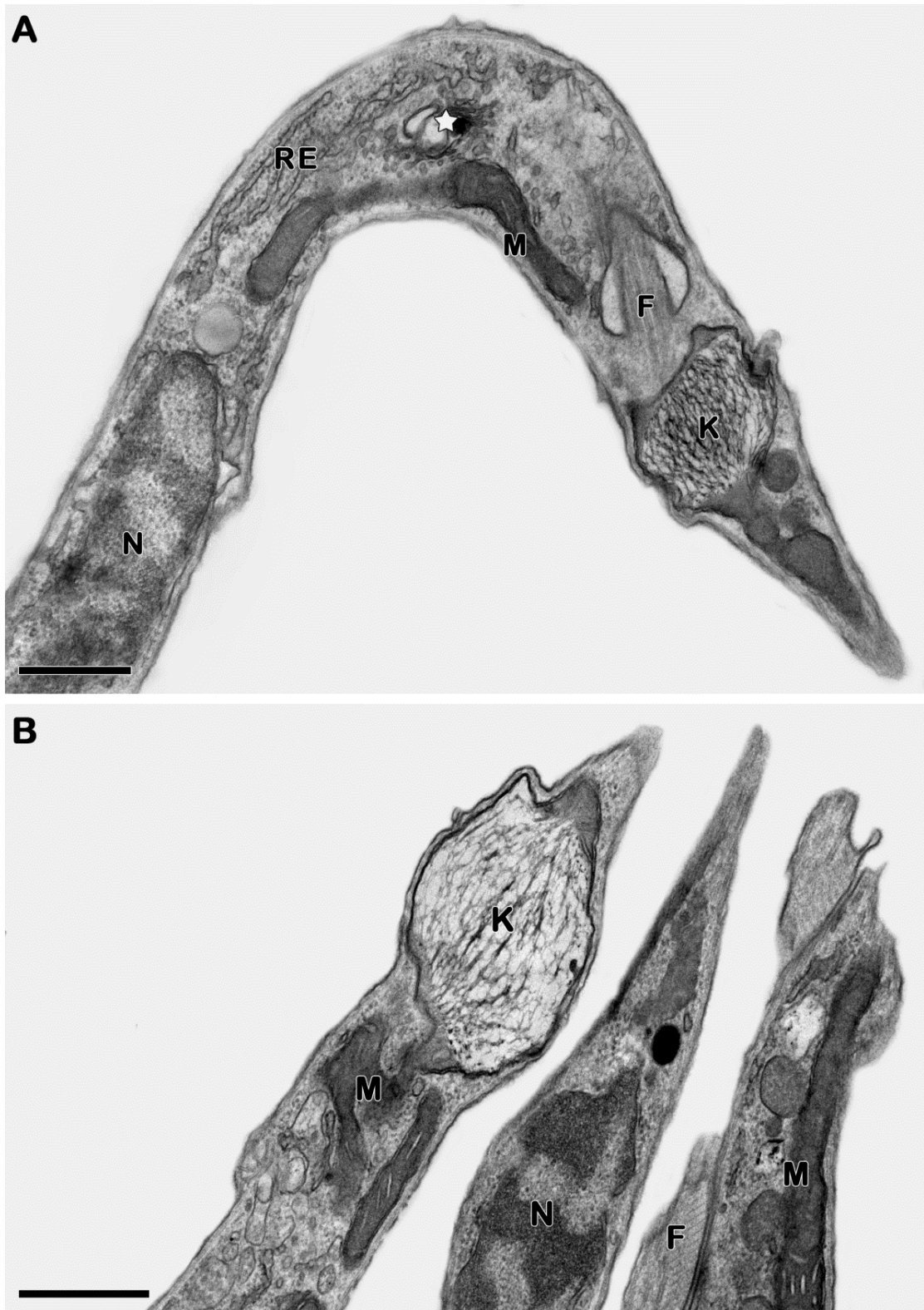


Figura IV.9. Análise por microscopia eletrônica de transmissão de tripomastigotas de *T. cruzi* incubados por 2h a 4°C. (A, B) Parasitos apresentando morfologia típica da mitocôndria (M), núcleo (N), cinetoplasto (K) e flagelo (F), além de perfis de retículo endoplasmático por todo o parasito (RE). Inchaço nas cisternas do Golgi pode ser observado (estrela branca). Barras = 0,5 μm

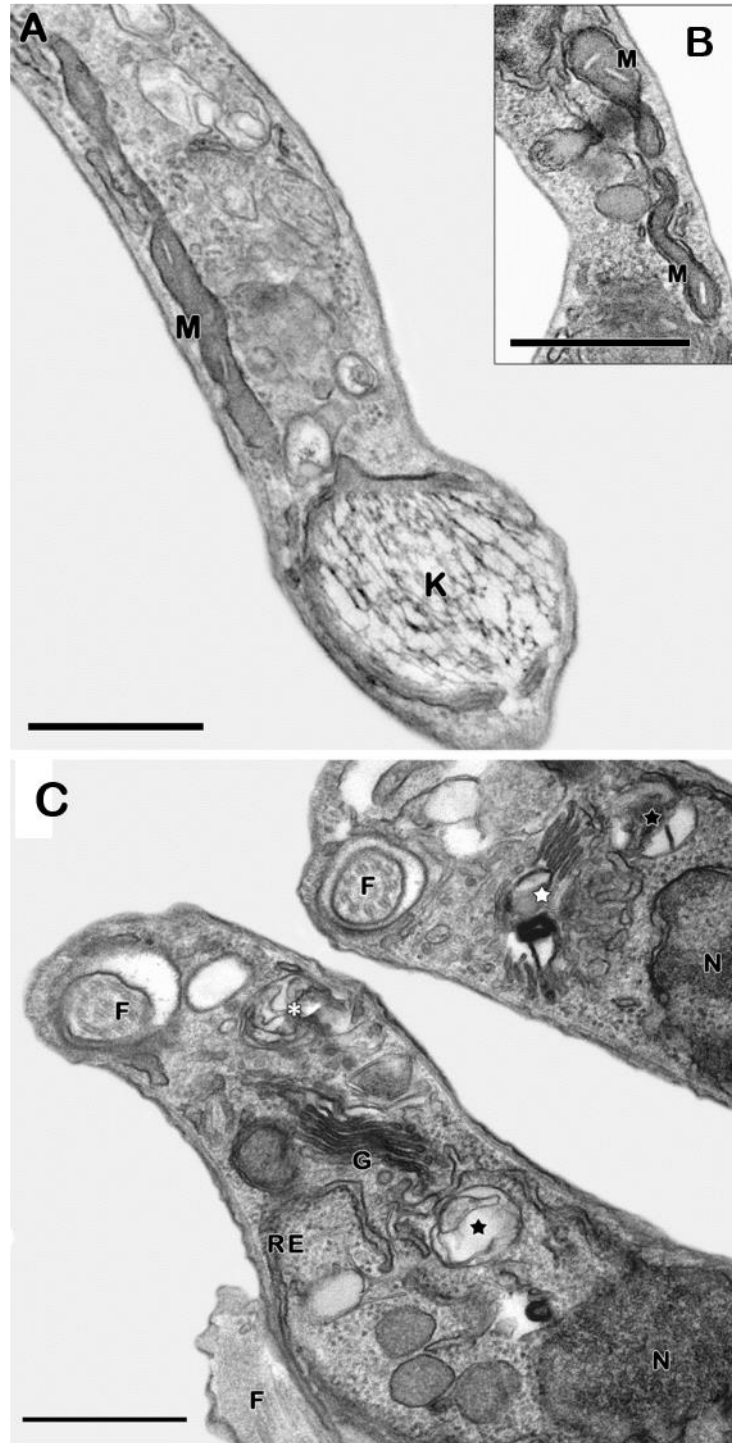


Figura IV.10. Análise por microscopia eletrônica de transmissão de tripomastigotas de *T. cruzi* incubados por 2 h a 28°C. (A) Os parasitos apresentando morfologia normal da mitocôndria (M) e cinetoplasto (K). (B) A incubação a 28°C induziu o aparecimento de autofagosomos (estrela preta) e de estruturas membranares concêntricas citosólicas (asterisco branco), além de induzir inchaço das cisternas do Golgi (estrela branca). N: Núcleo; M: mitocôndria; K: cinetoplasto; F: flagelo; RE: retículo endoplasmático. Barras = 0,5 μm

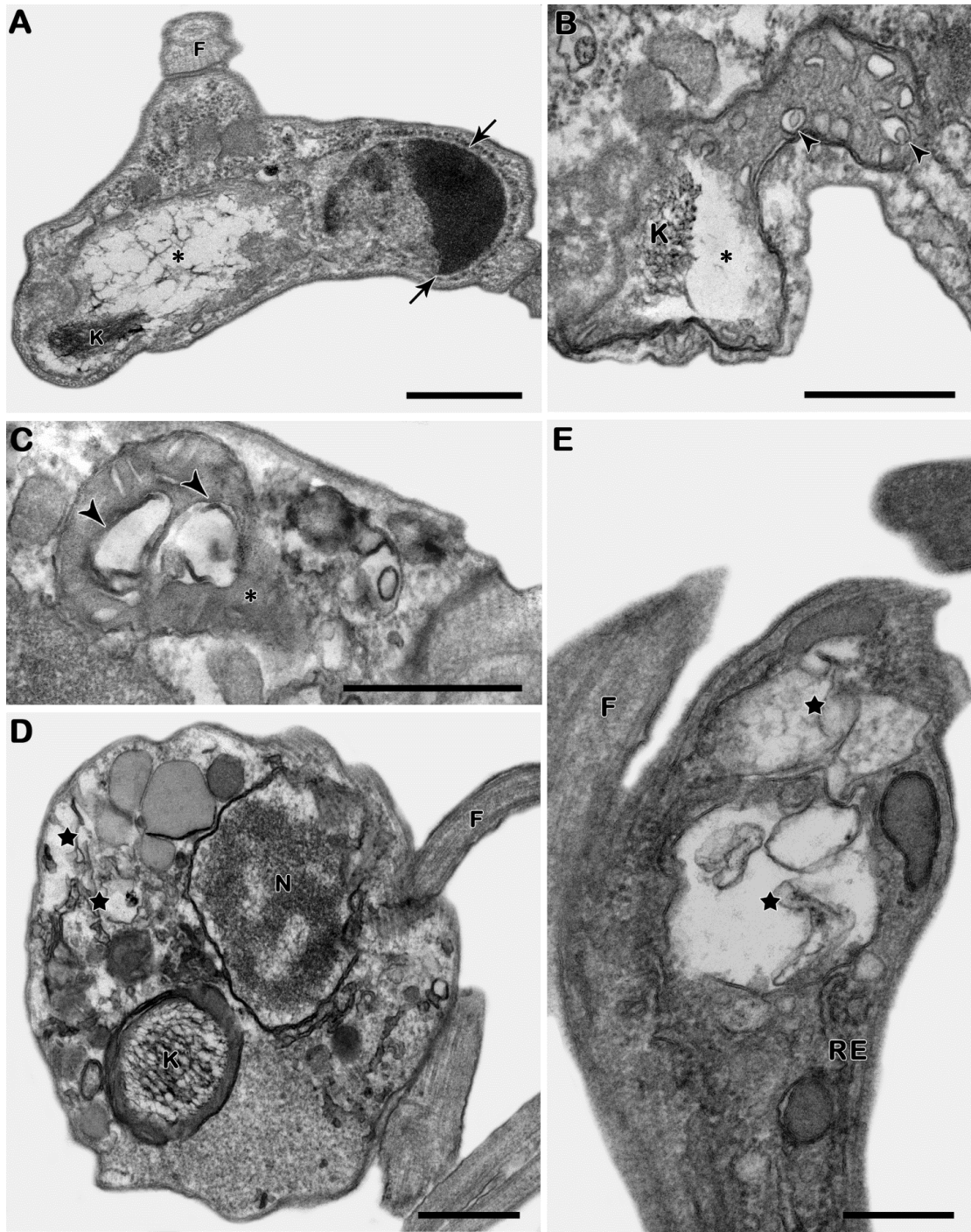


Figura IV.11. Análise por microscopia eletrônica de transmissão de tripomastigotas de *T. cruzi* incubados por 2 h a -20°C . (A-C) A incubação a -20°C induziu inchaço mitocondrial e extração da matriz da mitocôndria (asteriscos pretos), podendo estas organelas apresentar estruturas membranares concêntricas em seu interior (cabeças de seta pretas). Os parasitos ainda apresentaram condensação anormal da cromatina (seta preta). (D,E) Esta temperatura também levou ao aparecimento de autofagossomos (estrela preta). N: Núcleo; K: cinetoplasto; F: flagelo; RE: retículo endoplasmático. Barras = $0,5\ \mu\text{m}$

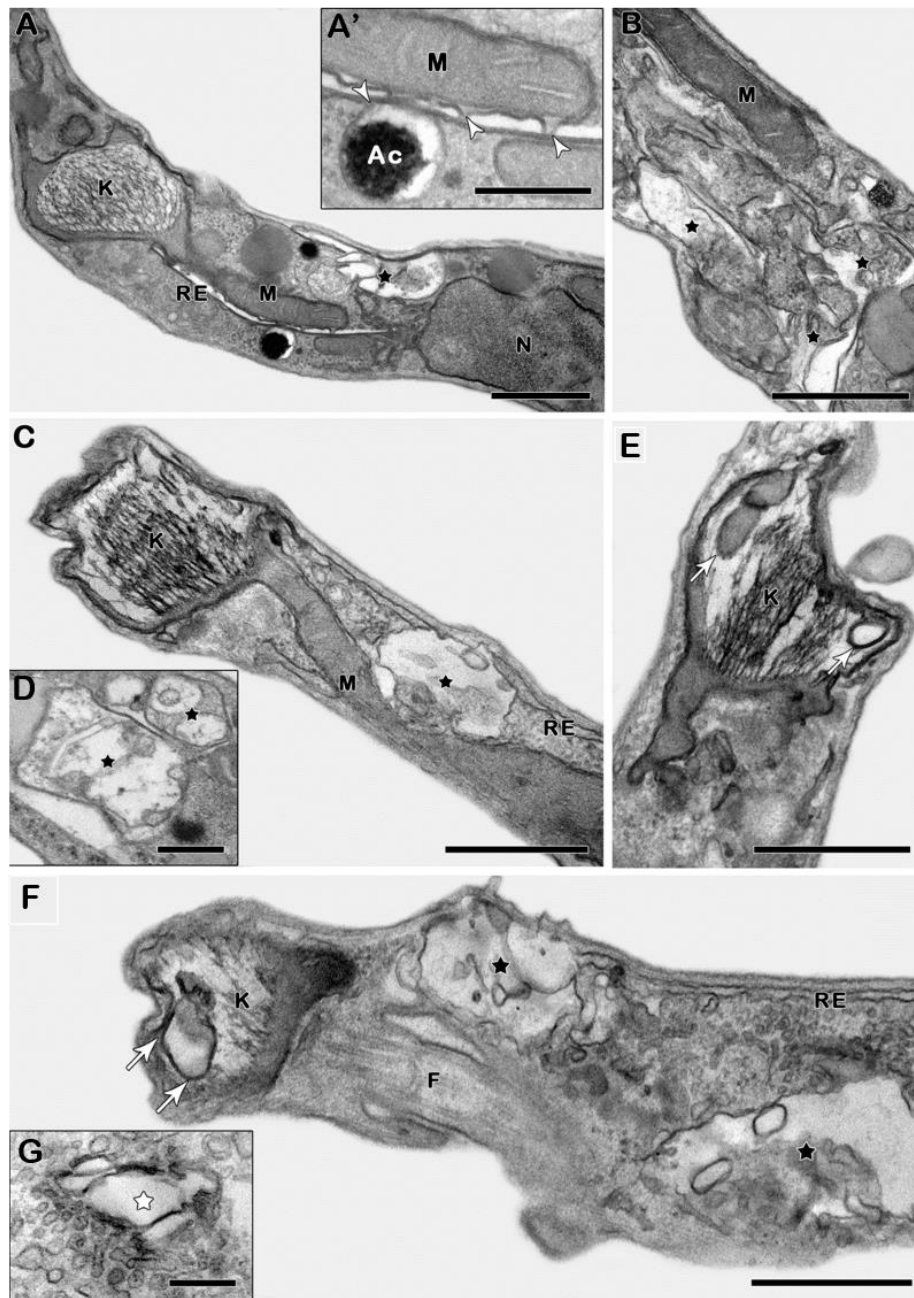


Figura IV.12. Análise por microscopia eletrônica de transmissão de tripomastigotas de *T. cruzi* incubados por 2 h a 40°C. (A) Parasito apresentando morfologia normal da mitocôndria (M) e cinetoplasto (K). (A'): íntimo contato da membrana do retículo endoplasmático (cabeças de seta brancas) com as membranas da mitocôndria (M) e do acidocalcisomo (Ac). (A, B, C, D) A elevada temperatura levou à formação de autofagossomos (estrela preta). (E, F) Formação de estruturas membranares concêntricas na região do cinetoplasto (setas brancas). (G) Esta temperatura ainda induziu o inchaço das cisternas do Golgi (estrela branca). N: Núcleo; M: mitocôndria; K: cinetoplasto; F: flagelo; RE: retículo endoplasmático. Barras = 0,5 μm; barras nos destaques = 0,2 μm

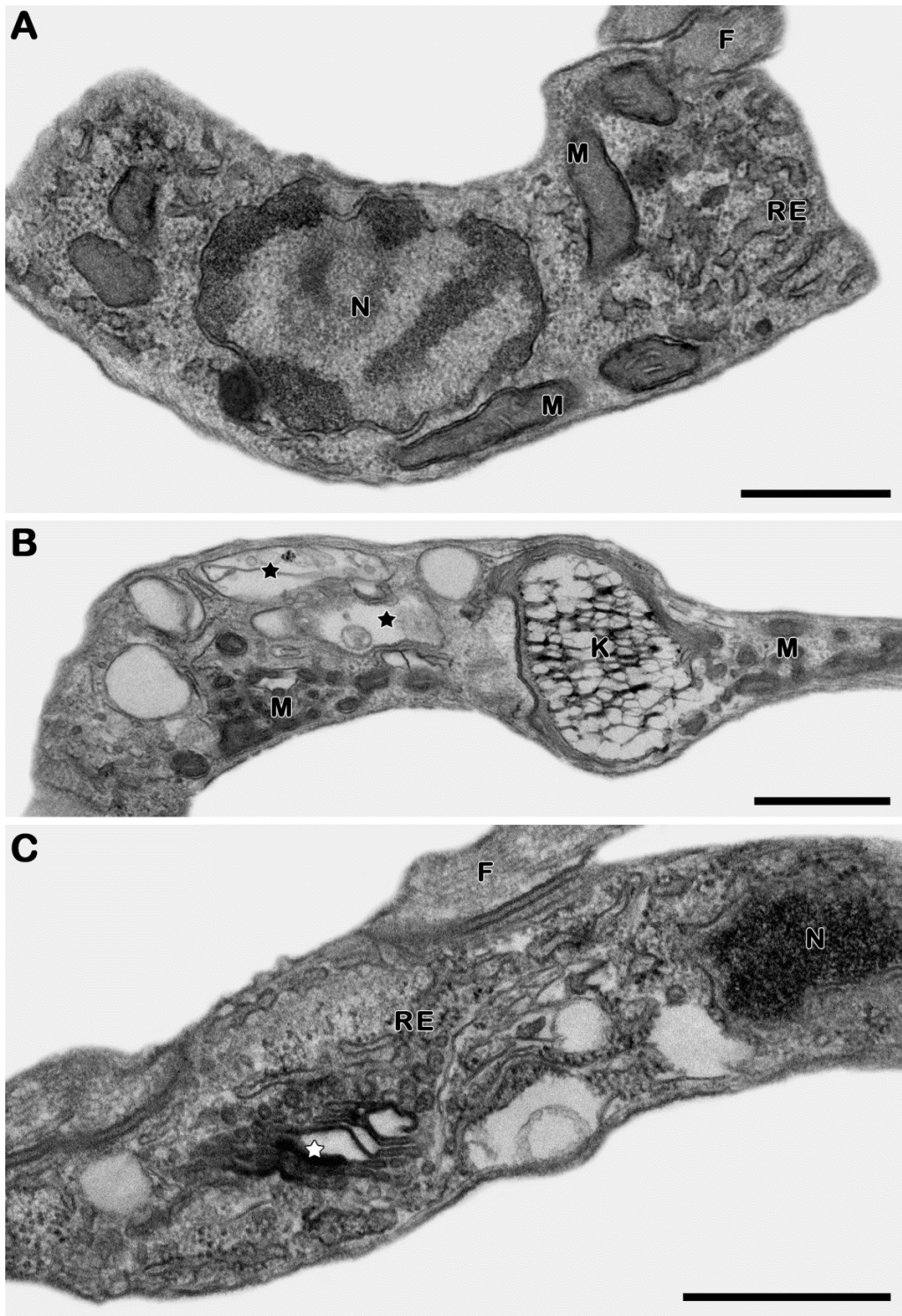


Figura IV.13. Análise por microscopia eletrônica de transmissão de tripomastigotas de *T. cruzi* incubados por 24 h a 37°C. (A, B) Parasitos apresentando morfologia normal da mitocôndria (M), retículo endoplasmático (RE) e cinetoplasto (K). (B, C) Formação de autofagossomos (estrela preta) e inchaço das cisternas do Golgi (estrela branca). N: Núcleo; M: mitocôndria; K: cinetoplasto; F: flagelo; RE: retículo endoplasmático. Barras = 0,5 µm

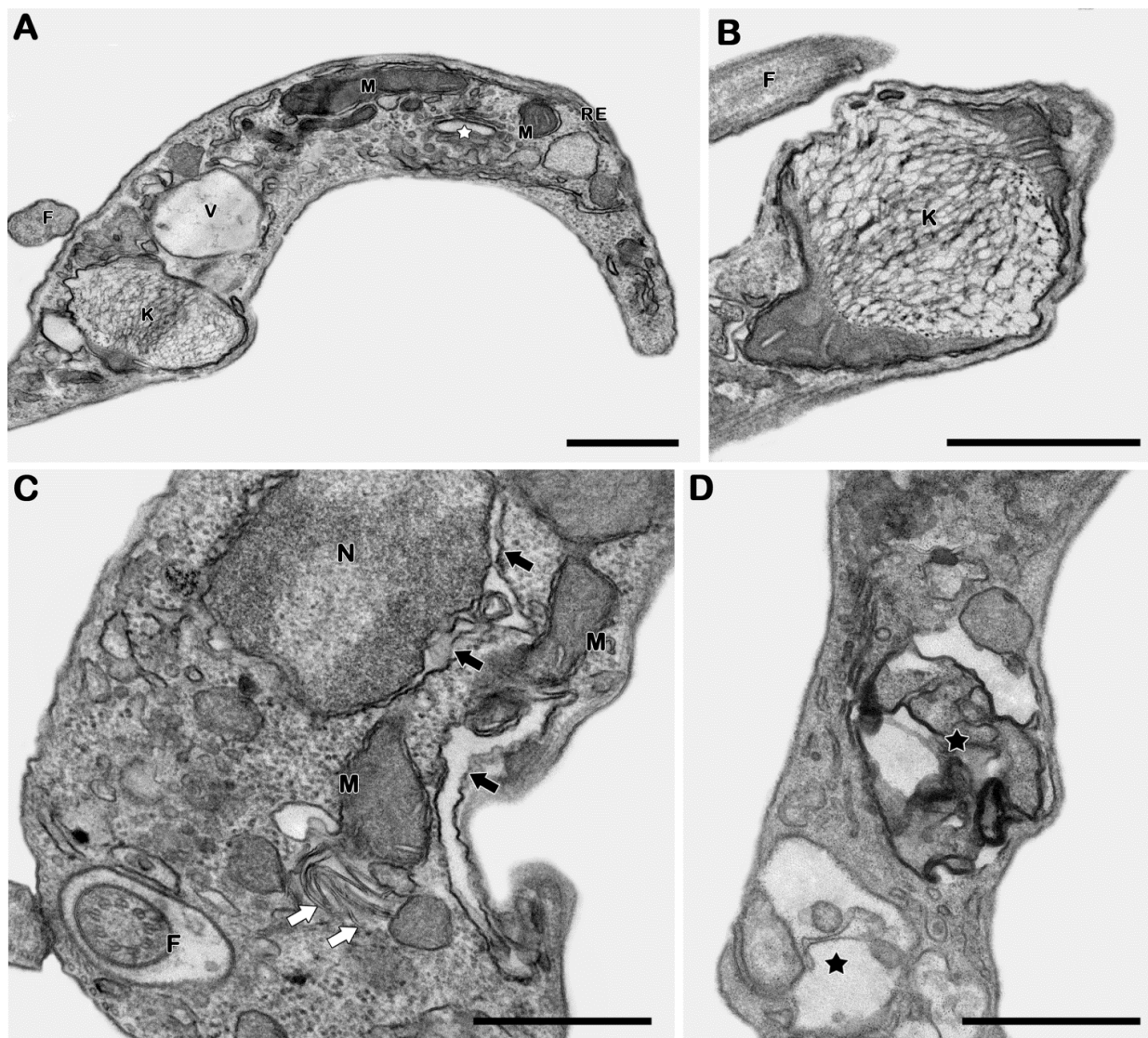


Figura IV.14. Análise por microscopia eletrônica de transmissão de tripomastigotas de *T. cruzi* incubados por 24 h a 4°C. **(A, B)** Parasitos apresentando morfologia normal da mitocôndria (M) e cinetoplasto (K). **(A)** Inchaço das cisternas do Golgi (estrela branca) e vacuolização citosólica (V). **(C)** Íntimo contato da membrana mitocondrial com estruturas membranares concêntricas (setas brancas) e uma atípica dilatação do retículo endoplasmático (setas pretas). **(D)** Formação de autofagossomos (estrelas pretas). N: Núcleo; M: mitocôndria; K: cinetoplasto; F: flagelo; RE: retículo endoplasmático. Barras = 0,5 µm.

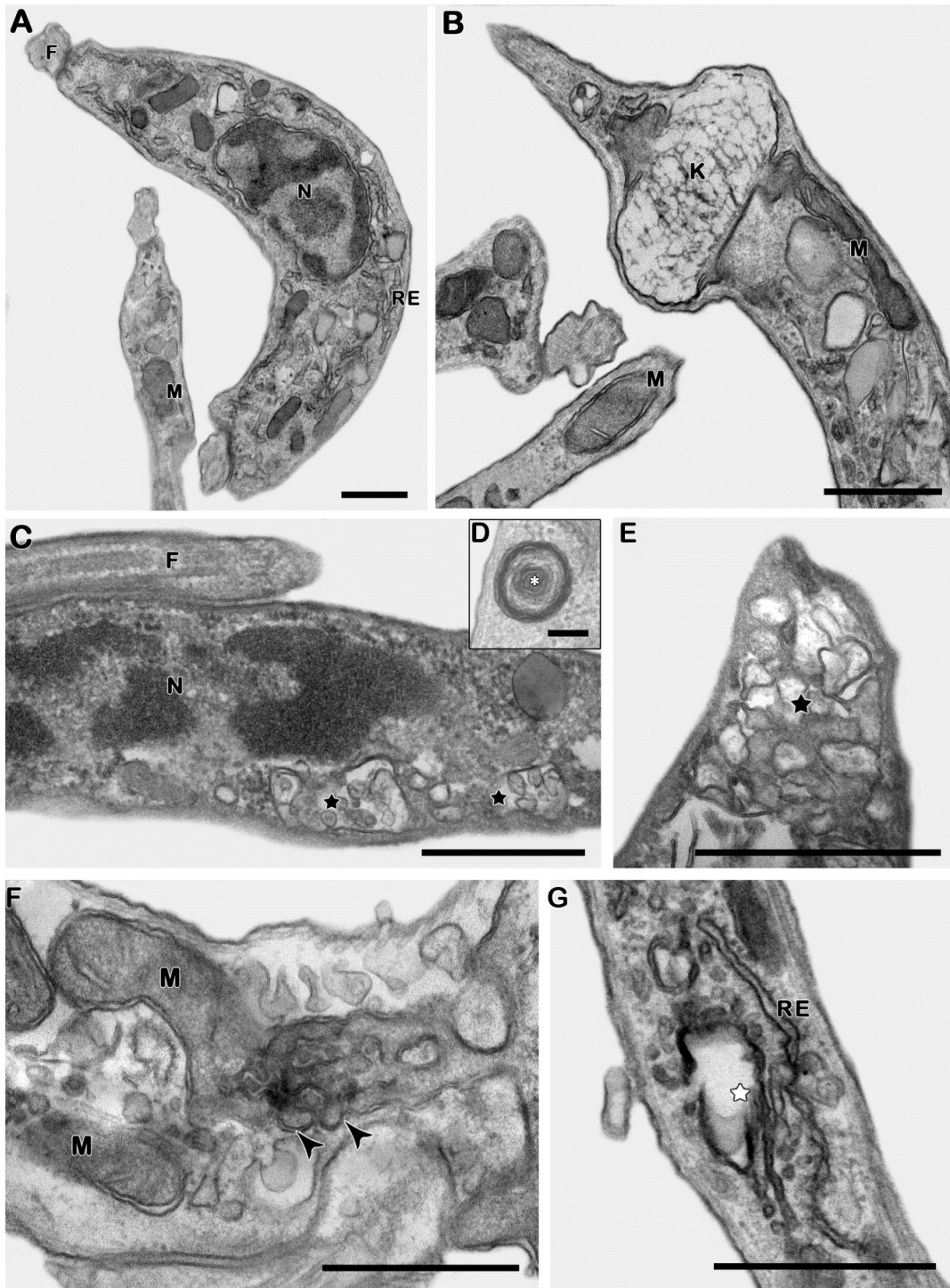


Figura IV.15. Análise por microscopia eletrônica de transmissão de tripomastigotas de *T. cruzi* incubados por 24 h a 28°C. (A, B) Parasitos apresentando morfologia normal da mitocôndria (M) e cinetoplasto (K). (C, D) Formação de autofagossomos (estrelas pretas) e de (E) estruturas membranares concêntricas (asterico branco). (D, G) Formação de estruturas membranares concêntricas dentro da mitocôndria (cabeça de seta preta). (G) Inchaço das cisternas do Golgi (estrela branca). N: Núcleo; M: mitocôndria; K: cinetoplasto; F: flagelo; RE: retículo endoplasmático. Barras = 0,5 µm; barra inset = 0,125 µm

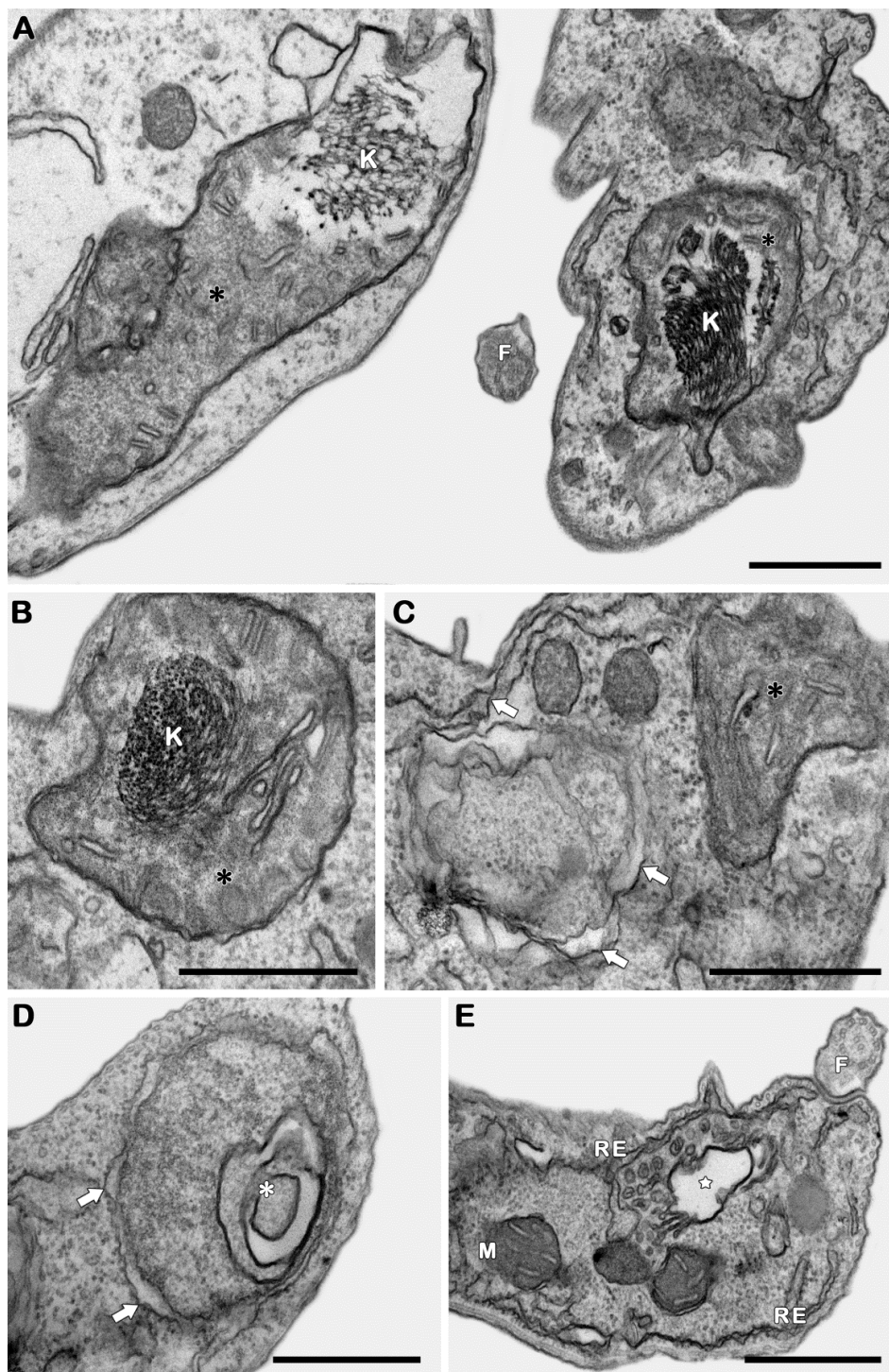


Figura IV.16. Análise por microscopia eletrônica de transmissão de tripomastigotas de *T. cruzi* incubados por 144 h a 4°C. Observa-se inchaço mitocondrial (asterisco preto) (**A**, **B**, **C**, **D**), estruturas membranares concêntricas (asterisco branco) (**D**), dilatação do retículo endoplasmático (setas largas brancas) (**C**, **D**) e inchaço das cisternas do Golgi (estrela branca) (**E**). N: Núcleo; M: mitocôndria; K: cinetoplasto; F: flagelo; RE: retículo endoplasmático. Barras = 0,5 µm.

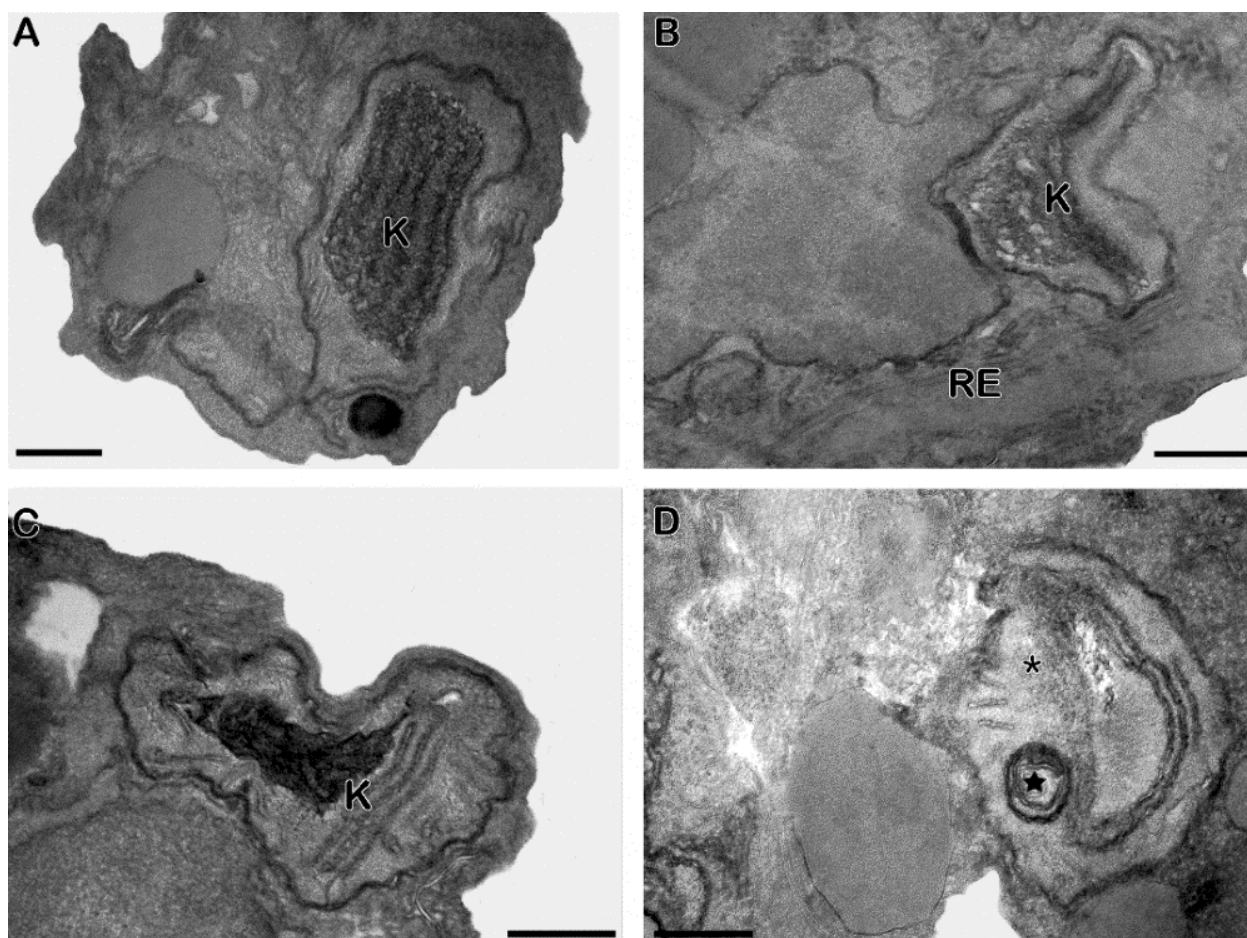


Figura IV.17. Análise por microscopia eletrônica de transmissão de tripomastigotas de *T. cruzi* incubados por 144 h a 28°C. **(A, B e D)** inchaço mitocondrial (asterisco preto), com aparecimento de estruturas membranares concêntricas dentro da organela (estrela preta), foram as alterações mais comumente observadas. Em muitos parasitos pode ser detectada características de transição na organização do kDNA (K). Barras = 0,5 µm

3. Avaliação da integridade da membrana celular

Após 2 h de incubação, a temperatura de -20°C induziu um aumento expressivo na marcação de TO-PRO 3 (51%). Nos tempos de 24 e 144 h, a temperatura de 28°C esse aumento foi de 4 e 11%, respectivamente. Em 144 h, a 4°C levou a um discreto aumento do percentual de parasitos TO-PRO+. Todas as demais condições experimentais testadas não apresentaram diferença em relação ao controle (**Tabela IV.4** e **Fig. IV.18**). Como controle positivo da marcação, parasitos foram incubados a 80°C por 2 h foram utilizados.

Tabela IV.4. Análise do percentual de parasitos TO-PRO+ após incubação de TC em diferentes condições experimentais

	0 h	2 h	24 h	144 h
Controle -	0,1 ± 0,0	NA	NA	NA
Controle +	91,6 ± 5,5 *	NA	NA	NA
37°C	1,0 ± 0,1	1,0 ± 0,2	1,1 ± 0,2	NA
-20°C	NA	52,8 ± 1,1 *	NA	NA
4°C	NA	1,3 ± 0,1 *	1,3 ± 0,1	2,7 ± 0,4 *
28°C	NA	1,7 ± 0,5 *	4,4 ± 0,7 *	11,0 ± 1,7 *
40°C	NA	1,0 ± 0,1	NA	-

*: diferença estatisticamente significativa quando comparado ao tempo inicial ($p \leq 0,05$); NA: Não avaliado.

4. Análise de vacúolos ácidos pela marcação com monodansilcadaverina

Para uma primeira análise da ativação da via autofágica no processo de reposta ao estresse térmico em tripomastigotas de *T. cruzi* utilizamos a monodansilcadaverina (MDC), um composto com autofluorescência que marca vesículas ácidas através de fenômenos de sequestro iônico (Jimenez e cols., 2008).

TC submetidos às temperaturas de: -20, 4, 28, 37 e 40°C por 2, 24 e 144 h foram marcados com MDC, para avaliação de vacúolos ácidos. Após 2 h de incubação, as temperaturas de 4, 28 e 40°C levaram a diferenças significativas nos percentuais de TC MDC+ quando comparado aos parasitos recém-extraídos de células Vero (T0) (**Tabela IV.5; Fig. IV.19A**), apresentando marcações de 10%, 10,8% e 12,1%, respectivamente. Nos tempos de 24 e 144 h, todos os grupos experimentais apresentaram discreto aumento no percentual de parasitos marcados (não excedendo cerca de 16%). O parâmetro número de pontos por parasito marcado não apresentou variação significativa em nenhuma das condições estudadas (**Tabela IV.6; Fig. IV.18B**). Para ambos os parâmetros, o controle com parasitos submetidos a estresse nutricional aumentou a marcação com MDC.

Tabela IV.5. Percentual de parasitos MDC+ após incubação de TC em diferentes condições experimentais

	0 h	2 h	24 h	144 h
37°C	9,3 ± 0,2	9,9 ± 0,8	14,7 ± 1,4 *	NA
-20°C	NA	9,4 ± 0,8	NA	NA
4°C	NA	10,0 ± 0,6	14,0 ± 2,3 *	16,4 ± 0,4 *
28°C	NA	10,8 ± 1,1 *	14,6 ± 2,1 *	16,2 ± 0,4 *
40°C	NA	12,1 ± 1,9 *	NA	NA

* diferença significativa em relação ao tempo inicial ($p \leq 0,05$) (n=4); NA: não avaliado.

Tabela IV.6. Número de pontos por parasito MDC+ após incubação de TC em diferentes condições experimentais

	0 h	2 h	24 h	144 h
37°C	1,5 ± 0,4	1,4 ± 0,2	1,6 ± 0,7	NA
-20°C	NA	1,3 ± 0,3	NA	NA
4°C	NA	1,7 ± 0,0	1,8 ± 0,5	1,4 ± 0,2
28°C	NA	1,4 ± 0,2	1,8 ± 0,2	1,2 ± 0,1
40°C	NA	1,4 ± 0,1	NA	NA

NA: não avaliado.

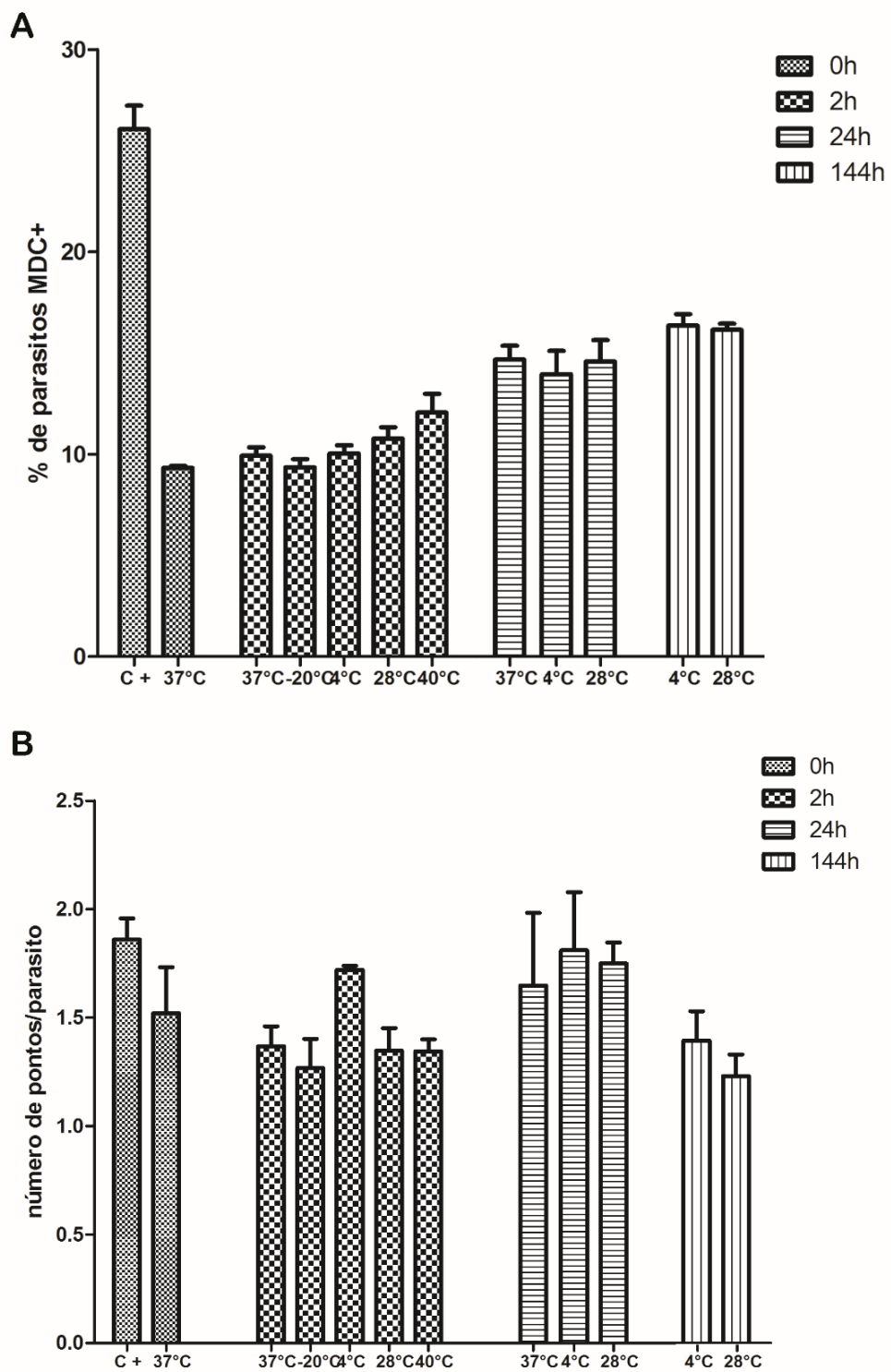


Figura IV.19. Marcação de vacúolos ácidos pelo MDC. Grupos A e B foram analisados quanto o percentual de parasitos MDC+ (A) e número de pontos por parasito (B). Controle positivo (C+): parasitos em estresse nutricional (PBS) por 6 h.

5. Marcação com anticorpo contra TcAtg8

Uma percentagem dos parasitos sob estresse nutricional (controle positivo) assumiu uma forma arredondada, e ambas populações (parasitos com morfologia típica de triplo e em forma arredondada) foram intensamente marcados pelo anticorpo. Também foram observados parasitos que mantiveram a morfologia típica de tripomastigotas (**Fig. IV.20**). No tempo inicial, a marcação se manteve mais dispersa pelo citoplasma dos tripomastigotas, com algumas marcações pontuais. Após 24 e 144 h de incubação nota-se maior proporção de marcações pontuais, tanto nas formas tripomastigotas, quanto nas formas semelhantes a amastigotas presentes em cada condição, (mais comumente observadas nas temperaturas de 28 e 37°C) (**Figs. IV.22 e 23**).

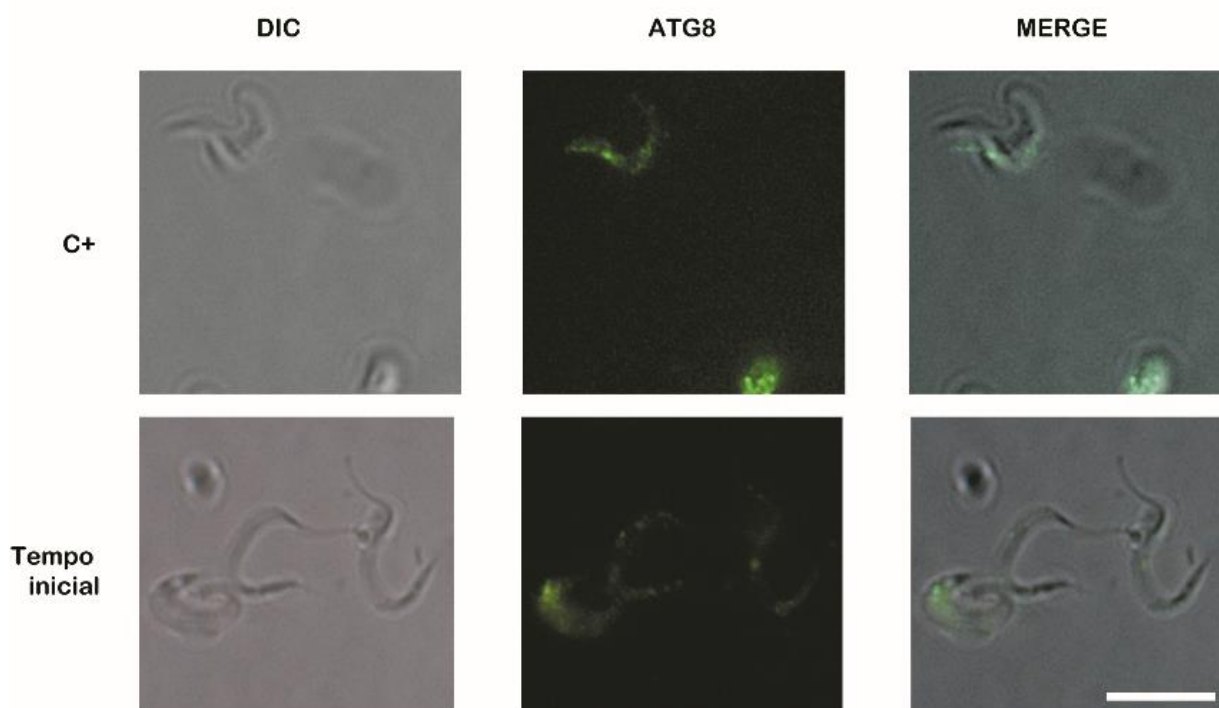


Figura IV.20. Marcação Atg8 em TC recém extraído de células Vero (tempo inicial) e controle positivo (incubados em PBS, durante 6h, a 37°C). Legendas: C+ controle positivo. Barra: 20 µm

Sob estresse térmico, em 2 h, padrão semelhante de marcação foi observado como no tempo inicial, com exceção da temperatura de 40°C, a qual nitidamente apresentam maior formação de pontos TcAtg8+ (**Fig. IV.21**). Por outro lado, foi

detectada menor proporção de pontos marcados em parasitos submetidos a 4°C durante o mesmo tempo. Em todas as condições avaliadas, as formas semelhantes a amastigotas foram fortemente marcadas.

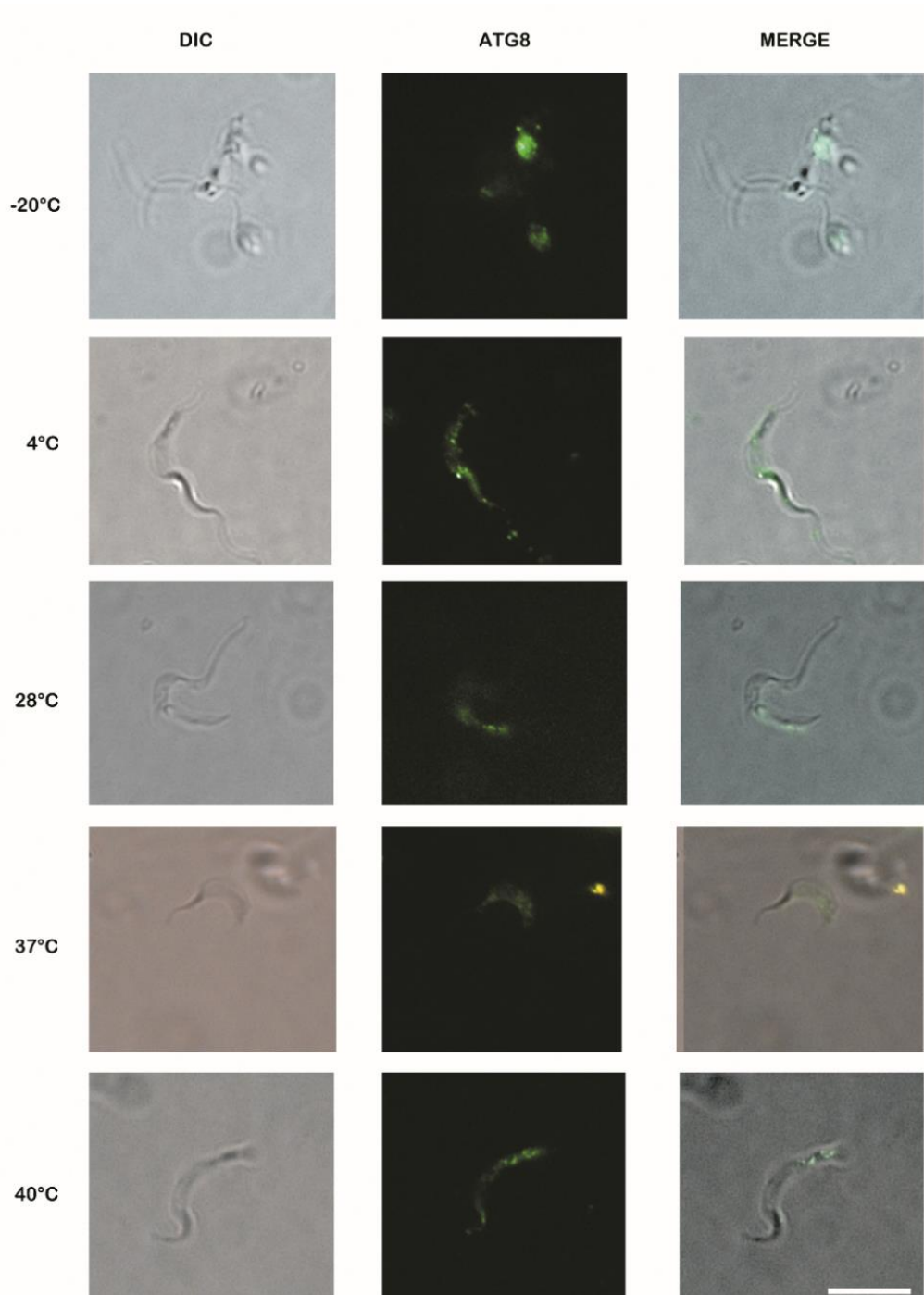


Figura IV.21. TC submetidos a estresse térmico durante 2 h marcados com anticorpo contra TcAtg8. Barra: 20 μ m

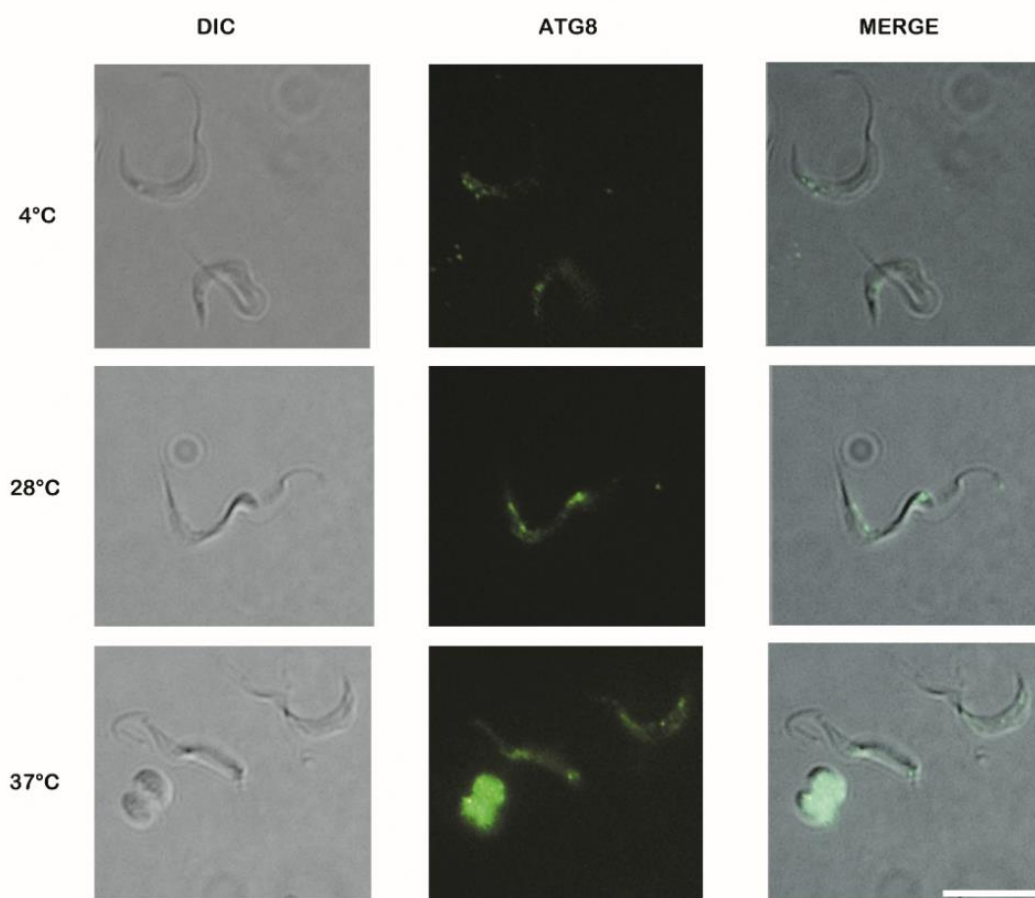


Figura IV.22. TC submetidos a estresse térmico durante 24 h marcados com anticorpo contra TcAtg8. Barra: 20 μ m

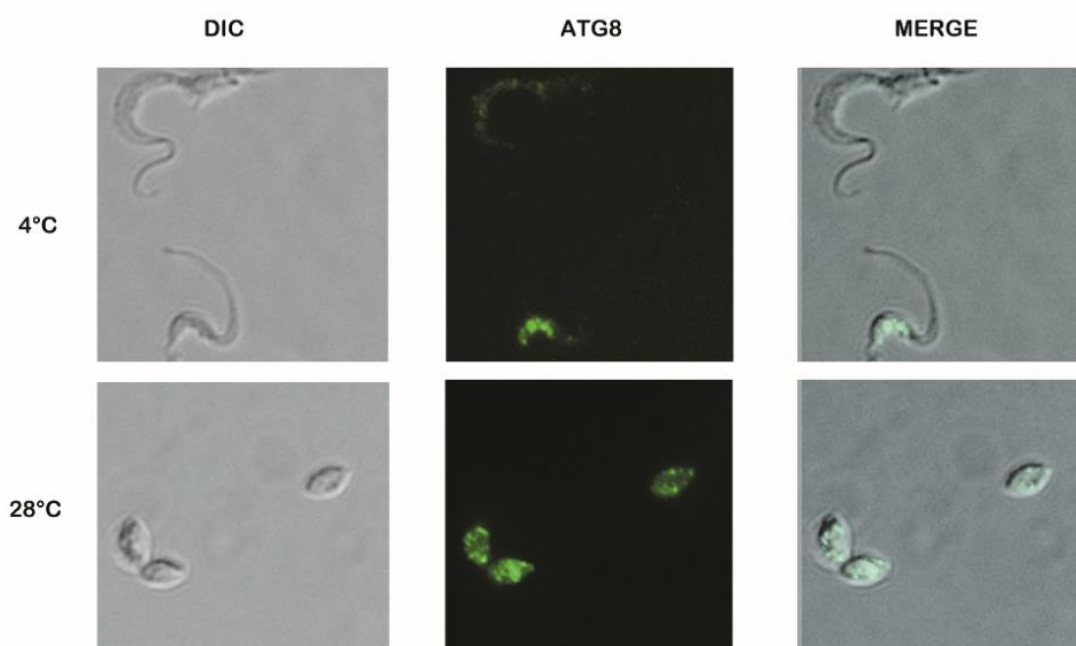


Figura IV.23. TC submetidos a estresse térmico durante 144h marcados com anticorpo contra TcAtg8. Barra: 20 μ m

6. Avaliação do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$)

Para avaliar as alterações no potencial de membrana mitocondrial de parasitos submetidos a estresse térmico utilizamos a marcação com tetrametilrodamina (TMRE), sendo que quanto mais ativa a mitocôndria, maior será sua marcação (Bernas e cols., 2002). A incubação por 2 h em diferentes temperaturas não alterou o percentual de parasitos TMRE+ (**Tabela IV.10**). Já após 24 h, a marcação diminui em tripomastigotas nas temperaturas de 37 e 28°C (67,9 e 58,6%, respectivamente). Após 144 h na temperatura de 28°C foi observada redução do número de parasitos TMRE+ para em torno de 35%.

Tabela IV.7. Percentual de parasitos marcados positivamente pelo TMRE

% parasitos TMRE+				
	0h	2 h	24 h	144 h
37°C	75,4 ± 6,5	80,2 ± 7,8	67,9 ± 4,3 *	NA
-20°C	NA	82,3 ± 7,4	NA	NA
4°C	NA	81,9 ± 8,0	71,0 ± 5,6	74,0 ± 1,1
28°C	NA	83,2 ± 7,8	58,8 ± 7,2 *	34,9 ± 5,6 *
40°C	NA	80,1 ± 7,8	NA	NA

* diferença estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$); NA: não analisado.

Analisando através do índice de variação (IV), onde a intensidade de marcação do TMRE foi normalizada pela intensidade observada nos parasitos recém obtidos. Nas temperaturas de -20 e 40°C, já em 2 h, houve uma redução de 30-40% a marcação. Após 24 h, em todas temperaturas avaliadas houve uma diminuição de cerca de 50%, redução esta ainda mais acentuada a 4 e 28°C em 144 h atingindo cerca de 60-80% (**Tabela IV.11**; **Fig. IV.24**). Em todas as condições testadas, o desacoplador mitocondrial FCCP foi utilizado para normalização dos dados.

Tabela IV.8. Índice de variação da marcação com TMRE, normalizado pelo tempo inicial

IV			
	2 h	24 h	144 h
37°C	0,92 ± 0,18	0,47 ± 0,14 *	NA
-20°C	0,69 ± 0,04 *	NA	NA
4°C	1,03 ± 0,09	0,47 ± 0,05 *	0,23 ± 0,07 *
28°C	0,83 ± 0,11	0,49 ± 0,08 *	0,40 ± 0,07 *
40°C	0,61 ± 0,09 *	NA	NA

* diferença significativa quando comparado ao tempo anterior $p \leq 0,05$; NA: não analisado.

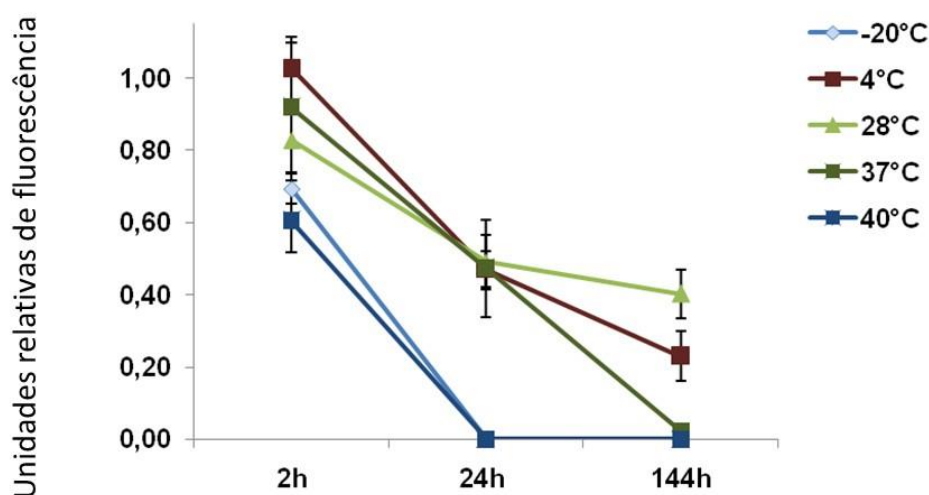


Figura IV.24. Marcação do $\Delta\Psi_m$ em TC submetidos a diferentes temperaturas e tempos de incubação.

7. Avaliação da produção de ROS

A análise da modulação da produção de ROS foi realizada utilizando a sonda dihidroetídio (DHE), a qual quando é oxidada por espécies radicalares, especialmente o superóxido, gera etídeo no meio intracelular, que por ser um intercalante de DNA de fita dupla, marca positivamente de maneira diretamente proporcional a produção de ROS de cada célula (Fink e cols., 2004).

Após 2 h de incubação nas temperaturas testadas não foi observada alteração do perfil de marcação de DHE. Já após 24 h, a incubação a 28°C levou ao

aumento de 25% na intensidade de marcação. Após 144 h a 4°C houve um aumento expressivo da marcação de 2,3x em relação ao tempo inicial. Por outro lado, a incubação a 28°C promoveu uma redução de cerca de 70% da intensidade do marcador (**Tabela IV.12** e **Fig. IV.25**). Como controle positivo, parasitos tratados com antimicina A (AA) foram utilizados para validação da produção de ROS.

Tabela IV.9. Índice de variação da marcação com DHE, normalizado pelo tempo inicial

	2 h	24 h	144 h
37°C	0,92 ± 0,25	1,02 ± 0,28	NA
-20°C	1,24 ± 0,19	NA	NA
4°C	0,90 ± 0,24	0,90 ± 0,08	2,31 ± 0,46*
28°C	0,99 ± 0,23	1,25 ± 0,15*	0,29 ± 0,06*
40°C	0,86 ± 0,22	NA	NA

*: diferença estatisticamente significativa quando comparado ao tempo inicial ($p \leq 0,05$); NA: não analisado.

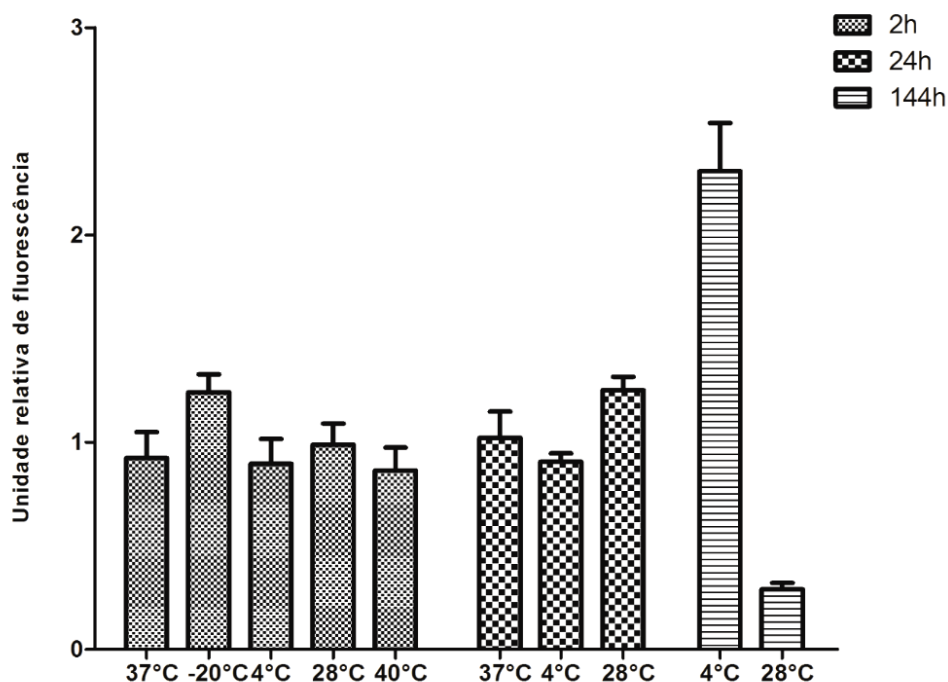


Figura IV.25. Marcação do DHE em TC submetidos a diferentes temperaturas e tempo de incubação, normalizada pelo tempo inicial (37°C, tempo: 0 h).

8. Análise por PCR em tempo real (qPCR)

As análises de qPCR apontaram uma redução na expressão de componentes da cadeia transportadora mitocondrial já em 2 h, em especial os complexos II e III (4 e 28°C) e ATP sintase em -20°C, atingindo cerca de 50-60% de inibição da sua expressão. Ainda em 2 h, observamos redução semelhante do antioxidante Tc52 em 28 e 40°C, além do aumento acentuado do conteúdo de transcritos de triparredoxina em 40°C, cerca de 3x mais expressos que nos tripomastigotas recém obtidos (**Tabela IV.13**).

Tabela IV.10. Expressão de genes anti-oxidantes e mitocondriais de parasitos incubados em diferentes temperaturas por 2 h normalizada pela expressão gênica de parasitos recém-obtidos de célula Vero.

	-20°C	4°C	28°C	37°C	40°C
Citrato sintase	0,82 ± 0,37	1,71 ± 1,02	0,87 ± 0,58	1,16 ± 0,17	0,85 ± 0,17
Complexo II	1,23 ± 0,82	0,48 ± 0,27 *	0,74 ± 0,46	2,52 ± 2,09	0,92 ± 0,19
Complexo III	1,08 ± 0,31	0,40 ± 0,29 *	0,72 ± 0,20 *	1,03 ± 0,66	1,41 ± 0,65
Complexo IV	1,18 ± 0,46	1,17 ± 0,49	0,84 ± 0,73	1,45 ± 0,43	1,91 ± 0,55
ATP sintase	0,47 ± 0,21*	0,69 ± 0,39	0,53 ± 0,16 *	0,73 ± 0,20	1,18 ± 0,58
Triparedoxina					
peroxidase	1,34 ± 0,58	1,13 ± 0,67	0,99 ± 0,60	1,55 ± 0,82	2,85 ± 1,22 *
Tripanotiona					
redutase	1,16 ± 0,47	0,62 ± 0,39	0,77 ± 0,37	1,10 ± 0,37	1,04 ± 0,19
Tc52	1,05 ± 0,26	0,84 ± 0,35	0,52 ± 0,04 *	1,26 ± 0,13	0,48 ± 0,04 *

*: diferença estatisticamente significativa quando comparado ao tempo inicial ($p \leq 0,05$).

Após 24 h de incubação, apenas na temperatura de 28°C foram observadas alterações nos níveis de expressão avaliados, sendo a redução observada na citrato sintase e complexo III (55 e 20% de inibição, respectivamente). Quanto à tripanotiona redutase e Tc52, houve redução em torno de 35% em relação ao controle (**Tabela IV.14**). Após 144 h, os níveis de tripanotiona redutase foram reduzidos em cerca de 50% em ambas condições analisadas (4 e 28°C), redução semelhante à observada na expressão de ATP sintase a 4°C (**Tabela IV.15**).

Tabela IV.11. Expressão de genes anti-oxidantes e mitocondriais de parasitos incubados a 4, 28 e 37°C por 24 h normalizada pela expressão gênica de parasitos recém-obtidos de célula Vero.

	4°C	28°C	37 °C
Citrato sintase	1,13 ± 0,76	0,44 ± 0,28 *	1,08 ± 0,49
Complexo II	1,53 ± 1,75	0,70 ± 0,54	1,41 ± 0,80
Complexo III	0,87 ± 0,52	0,80 ± 0,15 *	1,14 ± 0,25
Complexo IV	1,10 ± 0,14	1,18 ± 0,56	1,18 ± 0,19
ATP sintase	0,64 ± 0,26	0,75 ± 0,75	1,24 ± 0,81
Triparedoxina peroxidase	0,97 ± 0,60	1,64 ± 1,12	1,42 ± 0,54
Tripanotiona redutase	0,72 ± 0,52	0,62 ± 0,27 *	1,06 ± 0,63
Tc52	0,93 ± 0,62	0,65 ± 0,02 *	1,07 ± 0,41

*: diferença estatisticamente significativa quando comparado ao tempo inicial ($p \leq 0,05$).

Tabela IV.12. Expressão de genes anti-oxidantes e mitocondriais de parasitos incubados a 4 e 28°C por 144 h normalizada pela expressão gênica de parasitos recém-obtidos de célula Vero.

	4°C	28°C
Citrato sintase	1,33 ± 0,46	0,84 ± 0,53
Complexo II	0,84 ± 0,20	0,99 ± 0,23
Complexo III	0,94 ± 0,25	1,08 ± 0,55
Complexo IV	2,37 ± 2,43	1,05 ± 0,67
ATP sintase	0,49 ± 0,17 *	1,62 ± 1,06
Triparedoxina peroxidase	3,13 ± 1,91	1,02 ± 0,29
Tripanotiona redutase	0,43 ± 0,03 *	0,48 ± 0,21 *
Tc52	0,85 ± 0,43	1,57 ± 0,53

*: diferença estatisticamente significativa quando comparado ao tempo inicial ($p \leq 0,05$).

9. Infecção de macrófagos peritoneais

Na tentativa de avaliar a interferência de diferentes temperaturas na capacidade infectiva de TC após a incubação nas diferentes condições experimentais foram realizados, ensaios de interação com macrófagos por 24 h. As pré-incubações por 2 h a -20 e 4°C levaram a discreta redução no percentual de infecção de macrófagos (cerca de 2%). A pré-incubação a 28°C por 24 e 144 h acarretou um aumento de cerca de 7 e 38% na infecção, respectivamente. Em 144 h, ainda foi observado um aumento de quase 30% na infecção em parasitos pré-incubados a 4°C (**Tabela IV.16** e **Fig. IV.26**).

Tabela IV.13: Percentual de macrófagos infectados por TC pré-incubados nas diferentes temperaturas após 24 h de interação

	0 h	2 h	24 h	144 h
37°C	16,3 ± 1,5	15,9 ± 4,1	12,6 ± 0,9	NA
-20°C	NA	13,8 ± 1,2 *	NA	NA
4°C	NA	14,6 ± 1,3 *	14,4 ± 1,6 *	43,7 ± 3,5 *
28°C	NA	15,3 ± 3,2	22,9 ± 2,0 *	54,3 ± 7,1 *
40°C	NA	18,8 ± 1,0	NA	NA

*: diferença significativa quando comparado ao tempo inicial (37°C – 0 h) ($p \leq 0,05$); NA: não avaliado.

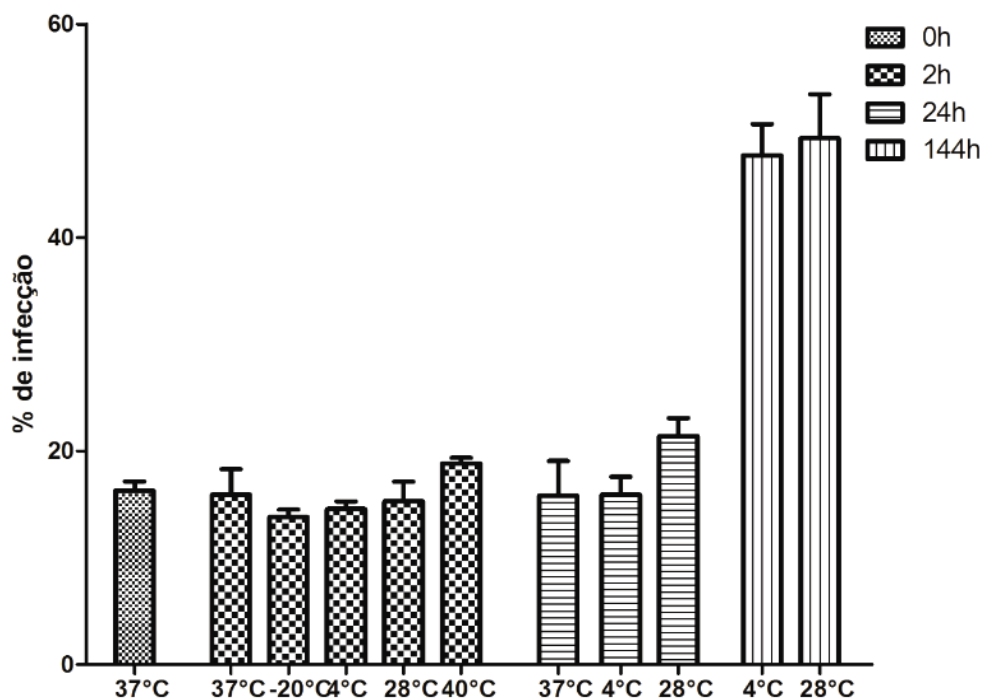


Figura IV.26. Percentual de infecção em macrófagos peritoneais após 24 h de interação parasito-célula (proporção 10:1 parasito célula).

Para avaliar se TC submetidos a diferentes condições experimentais de temperaturas não seriam degradados pela ação fagocítica dos macrófagos, aumentamos o tempo de progressão de infecção. Após 24 h de interação, seguida por 72 h de progressão da infecção, observamos que a pré-incubação a 4 e 40°C por 24 h reduziu a infecção em cerca de 12%. Neste mesmo tempo, um discreto aumento de 5% na infecção foi detectado para células pré-incubadas a -20°C. Adicionalmente, a pré-incubação a 37 e 28°C por 24 h levou a um aumento em torno de 25% na infecção. Por fim, parasitos pré-incubados a 4°C por 144 h infectaram cerca de 12% mais macrófagos que parasito recém obtidos (**Tabela IV.17** e **Fig. IV.27**).

Na **Fig. IV.28**, foram realizadas comparações dos percentuais de infecção entre as interações de TC com macrófagos sem (24 h) ou com tempo de progressão da infecção (24-72 h). No grupo de TC submetidos a 37°C, percebe-se que o percentual de infecção aumentou no experimento após 72 h de progressão de infecção (**Fig. IV.28A**). O mesmo quadro ocorreu em parasitos submetidos a -20°C, onde a progressão de infecção por 72 h aumentou o percentual de infecção em

macrófagos peritoneais (**Fig. IV.28B**). Nos parasitos submetidos a 4 e 40°C, observamos uma redução significativa em parasitos submetidos a 2 e 144 h de pré-incubação depois de 72 h de progressão da infecção (**Figs. IV.28C, E**). Já nos parasitos submetidos a 28°C, constatamos que o aumento da infecção entre os experimentos aumentou significativamente entre os tempos de 24 e 144 h com o curso da infecção (**Fig. IV.28D**).

Tabela IV.14. Percentual de macrófagos infectados após 96 h de interação parasito-célula (10:1).

	0 h	2 h	24 h	144 h
37°C	20,1 ± 2,3	16,3 ± 5,6	54,4 ± 9,2 *	NA
-20°C	NA	25,0 ± 2,5 *	NA	NA
4°C	NA	8,9 ± 2,4 *	22,3 ± 6,6	32,2 ± 7,8 *
28°C	NA	14,0 ± 4,8	53,8 ± 8,4 *	17,6 ± 7,3
40°C	NA	8,1 ± 1,7 *	NA	NA

*: Diferença significativa quando comparado ao tempo inicial (37°C – 0h) ($p \leq 0,05$). NA: não avaliado.

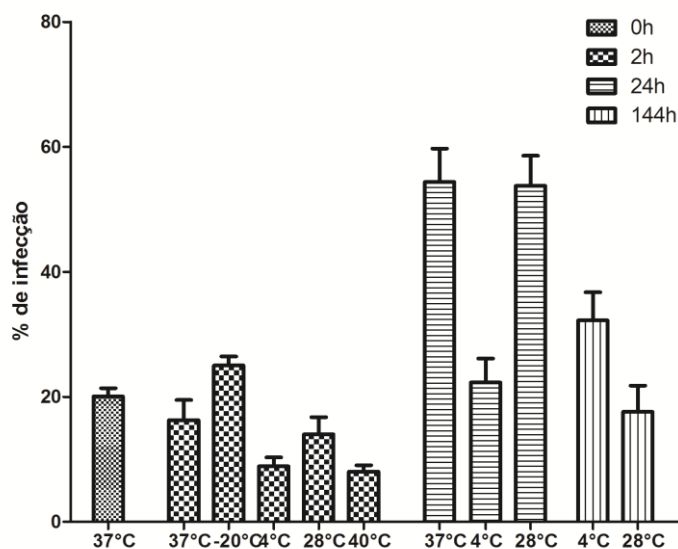


Figura IV.27. Percentual de macrófagos infectados após 24 h de interação parasito-célula (10:1) e 72 h de progressão de infecção.

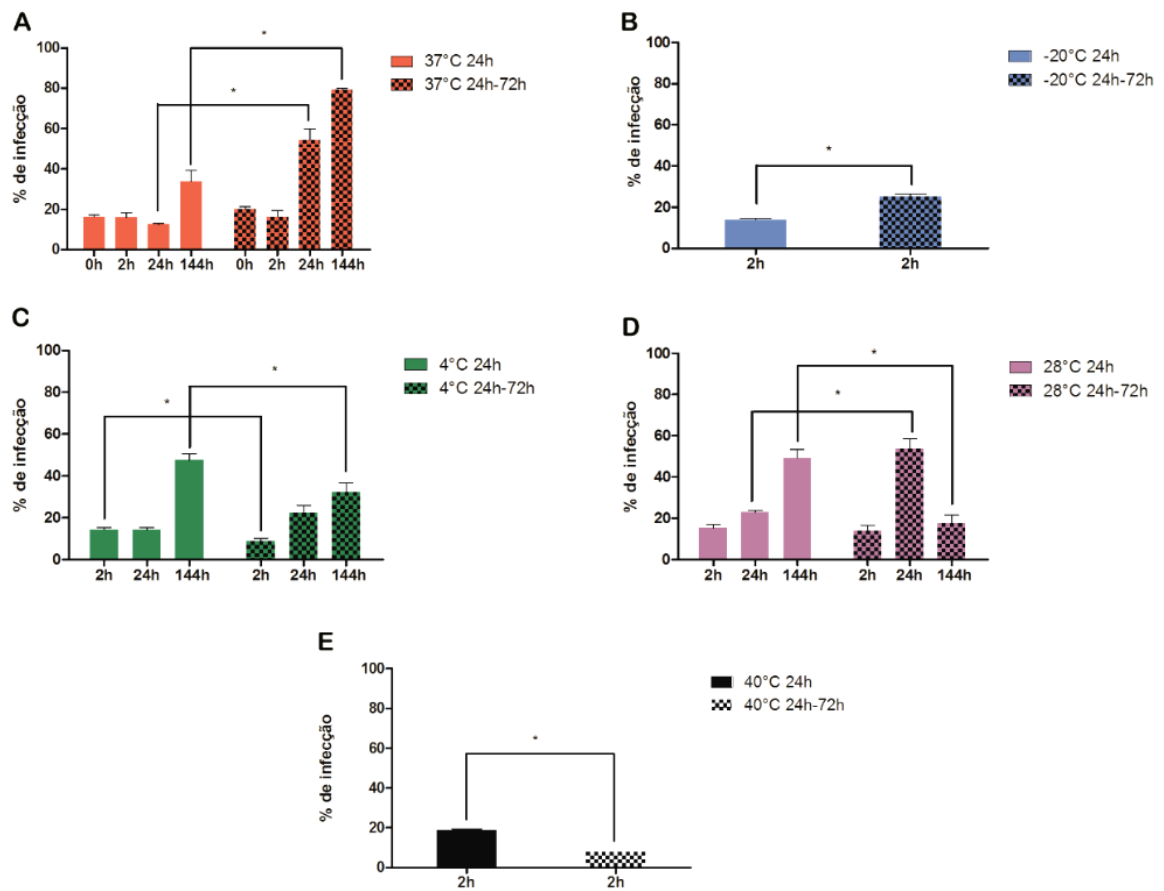


Figura IV.28. Comparação no percentual de infecção de TC submetidos a diferentes temperaturas e tempos de incubação em macrófago peritoneais, com ou sem tempo de progressão de infecção. *Diferença estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$).

V. DISCUSSÃO

Esta dissertação foi elaborada visando avaliar os efeitos de uma ampla faixa de temperatura e de tempo de incubação sobre tripomastigotas de *T. cruzi*. Ênfase foi dada à participação da mitocôndria e da via autofágica durante as condições de estresse térmico, sendo analisados parâmetros morfológicos, bioquímicos, celulares e moleculares.

As condições térmicas empregadas durante os experimentos foram escolhidas baseando-se nas temperaturas que as formas tripomastigotas são submetidos durante seu ciclo de vida, seja de forma natural ou artificial. A temperatura de -20°C foi escolhida por ser a utilizada para conservação (*freezers*) de alimentos como carne de reservatórios silvestres e polpa de frutas que podem estar contaminados com tripomastigotas. A temperatura de 4°C foi escolhida por ser a temperatura média dos refrigeradores nos quais são armazenados alimentos, bem como bolsas de sangue em hemocentros, representando condição de suma importância para a manutenção e transmissão do parasito (Hemominas, 2010). A temperatura de 15°C , apesar de não ter relação direta com o ciclo do parasito, é uma temperatura intermediária entre 4°C e 28°C , e decidimos em uma primeira análise incluí-la nos experimentos. Já a temperatura de 28°C se relaciona àquela encontrada no hospedeiro invertebrado, e como consequência, empregada também no manejo de formas epimastigotas. As condições experimentais de 37°C , tem relação direta com a infecção no hospedeiro vertebrado. A opção pela temperatura de 40°C , objetivou mimetizar acesso febril desencadeado pela infecção, sendo um dos sintomas da fase aguda da doença de Chagas.

Aplicando metodologias para verificar o percentual de morte de cada condição experimental sobre tripomastigotas oriundos do sangue camundongos ou de cultura celular, podemos verificar que o efeito foi semelhante nos parasitos independente da fonte de obtenção. Desta forma, os parasitos oriundos de cultura celular foram eleitos para a realização dos experimentos subsequentes, atendendo ao princípio dos 3Rs da sustentabilidade (reduzir, reutilizar e recilar), minimizando o sacrifício de animais experimentais, menor custo e mais facilidade em obter uma quantidade maior de parasitos para realizar os experimentos.

Um outro aspecto do desenho experimental foi a determinação dos tempos de incubação para exposição dos tripomastigotas a diferentes temperaturas. A opção

por períodos de 2, 24 e 144 h se justifica para o estudo dos impactos a curto, médio e longo prazo (respectivamente) sobre os tripomastigotas. O tempo de 144 h tem relação com a observação de que neste tempo de incubação ocorrem conversões de formas tripomastigotas metacíclicas em epimastigotas *in vitro* em cultura de células embrionárias de *Triatoma infestans* (Lana, 1979). Esses dados corroboram nossos achados demonstrando que algumas formas epimastigotas-símile foram observadas em 144 h de incubação a 28° C.

A variação térmica tem grande impacto na mudança de forma do parasito. Todas temperaturas avaliadas aumentam o percentual de formas arredondadas semelhantes a amastigotas já em duas horas de incubação, sendo tal fenômeno mais pronunciado com o aumento do tempo de incubação. Como sugerido anteriormente (Contreras e cols., 2002), esse trabalho também foi capaz de elucidar que a alteração de temperatura é capaz de desencadear mecanismos de alterações morfológicas no parasito. Porém, a vantagem dos dados descritos nessa dissertação sobre os dados previamente descritos na literatura, diz respeito a não necessidade de pré-incubação em meios específicos para que haja a mudança de formas do parasito.

Assim, sugere-se revisões nos protocolos utilizados para obtenção de formas amastigotas axênicas, não sendo necessário realizar qualquer alteração na composição no meio, mas somente no tempo de incubação, que seria entre 5 e 6 dias mantendo o parasito a 37°C ou 28°C. As formas semelhantes a amastigotas obtidas apresentam em sua maioria membrana plasmática íntegra e algumas alterações morfológicas, fortalecendo a sugestão da mudança de protocolos, que vise economia e qualidade no processo. Há ainda necessidade de elucidar a identidade de tais parasitos, através de marcadores específicas de formas amastigotas, como o uso de anticorpos contra SSP4 (proteína de membrana específica de amastigotas de *T. cruzi* (Andrews e cols., 1987).

Sabe-se que a autofagia tem grande impacto na mudança de formas evolutivas do *T. cruzi* (Alvarez e cols., 2008), no dano gerado sob efeito do tratamento com algumas drogas experimentais (Menna-Barreto e cols., 2009) e no processo de infecção das células hospedeiras (Romano e cols., 2009). Os dados obtidos nessa dissertação foram os primeiros a relacionar alteração de formas do *T. cruzi* de tripomastigotas à amastigotas com o aumento do processo autofágico.

Quantitativamente pelo MDC, qualitativamente pela imunomarcagem do TcAtg8 e pela análise ultraestrutural, pode-se mostrar um aumento no aparecimento de autofagossomas proporcional ao aumento do tempo de incubação, e em especial nas formas amastigotas presentes nas condições avaliadas. Propõe-se então que a autofagia tem grande impacto no processo de mudança de forma de tripomastigotas a amastigotas de *T. cruzi* durante o estresse térmico. Para aprimorar e refinar tal resultado sugere-se a aplicação de outras metodologias, como por exemplo o uso de qPCR tendo como alvo os genes autofágicos (tendo como exemplo Atg4, Atg8 e Atg13) nos parasitos submetidos a estresse de temperatura.

Ainda que os parasitos incubados a 28 e 37°C tenham sofrido grandes alterações morfológicas (**Tabela V.1**), esses ainda foram capazes de infectar células fagocíticas profissionais. Em muitos casos os tripomastigotas não conseguiram manter a infecção, com as amastigotas sofrendo degradação no interior do macrófago, principalmente nos maiores tempos de pré-incubação dos parasitos avaliados. Nesse caso sugere-se que estudos posteriores sejam realizados para elucidar a virulência de tais parasitos sobre células fagocíticas não profissionais e em sistemas *in vivo*. Outra possibilidade seria analisar tempos mais longos de incubação da cultura de macrófagos infectadas, visando três objetivos: (1) observar se o *T. cruzi* submetido a um prévio estresse térmico consegue concluir seu ciclo de vida intracelular com a liberação de formas tripomastigotas; (2) analisar se em um maior tempo de cultura, os macrófagos seriam capazes de degradar os parasitos presentes no seu interior; (3) analisar a ultraestrutura da interação parasito macrófago objetivando o monitoramento da diferenciação de tripomastigota em amastigota e ainda, se ocorre ação de enzimas lisossomais e sua efetividade sobre tripomastigotas nas diferentes condições térmicas experimentais.

Como perspectiva, tendo por base os resultados obtidos nesse bloco de experimentos, o desenvolvimento de ensaios *in vivo* será fundamental para uma maior compreensão do potencial de transmissão do *T. cruzi* acondicionado em diferentes condições térmicas, quer em bancos de sangue quer em alimentos contaminados. Acreditamos que os dados gerados nesta dissertação estimulam testar em camundongos se a inoculação de parasitos submetidos a diferentes condições de estresse térmico por diversas vias de administração (oral, intergástrica e peritoneal), gera infecção. Permitirá também verificar o curso da infecção,

virulência, produção de citocinas pró- e anti-inflamatórias e a susceptibilidade ao tratamento com benznidazol desses parasitos em murinos durante a progressão da doença de Chagas.

Danos ultraestruturais decorrentes da alteração de temperatura também foram descritos por Vasile e cols. (2003), onde células de linhagem CHO incubadas a 39,5°C sofreram alterações morfológicas no Golgi e retículo endoplasmático, sugestivo de ativação da via autofágica. Em *T. cruzi*, observamos fenótipo similar, sendo detectados autofagossomos por microscopia eletrônica e de fluorescência. Desta forma, sugere-se que a via autofágica impacta na reversão do estresse de retículo e Golgi presente durante a incubação a 37 e 28°C, sendo um possível mecanismo responsável pela manutenção da viabilidade.

As temperaturas de -20 e 40°C lisam todos os parasitos em um curto tempo e já em 24 h tripomastigotas não são mais aparentes, com diversas alterações morfológicas (**Tabela V.1**). Nos parasitos expostos a -20°C pode-se observar a perda da integridade da membrana plasmática com somente duas horas de incubação, o que não foi observado nos parasitos submetidos a 40°C. Logo, alimentos que são eventuais veículos para transmissão oral da doença de Chagas, podem ser armazenados à -20°C por no mínimo 48 h afim de minimizar o risco de infecção pelo *T. cruzi*, desde que tal alteração térmica não diminua as qualidades organolépticas e nutricionais do alimento em questão.

Como discutido por Alexandre e colaboradores (2004), as propriedades físico-químicas, organolépticas e nutricionais da polpa de açaí não são alteradas após sofrer o processo de pasteurização rápida (tratamento à 82,5°C/1 min). Tal processo foi capaz de reduzir o desenvolvimento de bolores e leveduras, contagem total de mesófilos, coliformes totais e termotolerantes e *Salmonella sp.* segundo a metodologia de APHA. Sabe-se que o processo de pasteurização é eficaz em eliminar do leite de camundongos formas tripomastigotas de *T. cruzi* (Ferreira e cols., 2001). Dessa forma, somando o conhecimento prévio da literatura com o conhecimento obtido nesta dissertação, sugere-se que o emprego da pasteurização seja amplamente aplicado nos alimentos que atuam como veículo na transmissão de Chagas. Quando tal método não puder ser aplicado, devido impedimentos técnicos e/ou financeiros, indica-se ainda o tratamento térmico a frio para evitar/minimizar a transmissão da doença de Chagas pela via oral.

Tabela V.1. Danos morfológicos induzidos pelo estresse térmico em TC.

Alteração/condição	2 h					24 h			144 h	
	37°C	-20°C	4°C	28°C	40°C	4°C	28°C	37°C	4°C	28°C
Inchaço das cisternas do Golgi			X		X	X	X	X	X	
Autofagossomos		X		X		X	X	X		X
Estruturas membranas concêntricas				X	X		X	X	X	
Inchaço mitocondrial		X							X	X
Condensação anormal da cromatina		X								
Dilatação do retículo endoplasmático						X				
Cinetoplasto em forma transitória										X
Depósito de lipídeos										X

Os parasitos submetidos a 4°C apresentam os menores impactos na % de morte e nas alterações morfológicas (**Tabela V.1**) no decorrer do tempo avaliado, com menor perda da integridade da membrana e manutenção da atividade mitocondrial, porém com maior produção de ROS. Tais parasitos ainda são eficazes em infectar células fagocíticas profissionais e manter-se no seu interior por até 96 h. Ainda não se sabe o impacto da temperatura na manutenção do ciclo de vida de tais parasitos, pois nosso protocolo experimental não visou avaliar a produção de novos tripomastigotas no sobrenadante da cultura celular.

As bolsas de sangue acondicionadas em Hemocentros são utilizadas no prazo de 15 após a doação (Hemominas, 2010). Os resultados aqui descritos demonstraram que as formas tripomastigotas se mantêm móveis e com morfologia típica frente câmara de Neubaer por até 20 dias quando incubadas a 4°C. Tal resultado é preocupante, pois algumas doações passam como falso negativos

durante a triagem sorológicas de para doença de Chagas. Dessa forma, é sugerido que sejam adotados exames mais sensíveis dos que os amplamente utilizados nos hemocentros. Por exemplo, a utilização de práticas moleculares que tem como alvo sequência do kDNA do parasito se mostram como uma boa sonda, pois apresentam maior sensibilidade quando comparado as técnicas sorológicas. De qualquer forma, em áreas endêmicas há necessidade do desenvolvimento de novas técnicas para que trate as bolsas de sangue possivelmente contaminadas. O método disponível atualmente em tais regiões é o tratamento das bolsas de sangue com o composto denominado Violeta de Genciana (Ramirez e cols., 1994). Porém, o tratamento das bolsas com tal composto está relacionado com diversos efeitos adversos, dentre eles a aquisição de uma coloração azuladas dos receptores das transfusões.

Assim sendo, o desenvolvimento de novas técnicas que utilizem de meios físicos, entres eles a temperatura, para eliminar os microorganismos sem afetar os componentes do sangue se mostra ideal. Há alguns anos, uma nova tecnologia que utiliza o calor para destruir vírus HIV do plasma de bolsa de sangue foi desenvolvida (Charma e cols., 1992), porém seu desenvolvimento foi interrompido devido a problemas de patentes. Assim sendo, sugere-se que se retorne o desenvolvimento de métodos que utilizem temperaturas altas para tratar as bolsas de sangue, pois como visto nessa dissertação e nos demais dados da literatura, os tripomastigotas de *T. cruzi* e demais microorganismos são sensíveis ao aumento da temperatura.

Outro fator que merece atenção a partir dos dados obtidos diz respeito a qualidade dos parasitos utilizados em diversos estudos com formas tripomastigotas de *T. cruzi*. A alteração térmica de 37 para 4°C em um curto espaço de tempo foi capaz de alterar alguns parâmetros do parasito, dentre eles o inchaço das cisternas do Golgi. Desta forma, tripomastigotas acondicionados a 4°C por um curto espaço de tempo para posteriormente serem utilizados em experimentos, poderão comprometer a análise de resultados.

Fica claro, portanto que, a alteração térmica tem grande impacto em parâmetros morfológicos, bioquímicos e moleculares de tripomastigotas de *T. cruzi*. A partir dos resultados expostos e discutidos nessa dissertação criam-se perspectivas para novas abordagens experimentais *in vitro* e *in vivo* que busquem elucidar, em maior profundidade, os impactos do estresse térmico sobre o parasito, e suas implicações em procedimentos experimentais e clínicos. Espera-se também

que as questões levantadas nessa dissertação possam ser incorporadas às diferentes linhas de pesquisa objetivando um melhor conhecimento dos riscos de transmissão do parasito e também da biologia celular do *T. cruzi*.

VI. CONCLUSÕES

- Todas temperaturas empregadas tiveram algum efeito deletério sobre os tripomastigotas de *T. cruzi*, sendo -20 e 40°C as temperaturas com maior pontencial tripanocida. Apenas os parasitos incubados a -20°C/2 h e 28°C/144 h apresentaram perda na integridade da membrana plasmática. O estresse térmico ainda foi capaz de induzir o aparecimento de formas amastigotas-símile diretamente proporcional ao percentual de morte.

- Diferentes temperaturas induziram alterações morfológicas e funcionais na mitocôndria do *T. cruzi*, em tempos curtos (em -20 e 40°C) e depois de 24 h de incubação nas temperaturas de 4, 28 e 37°C. A análise por qPCR apontou a redução na expressão de componentes do metabolismo energético, em especial os complexos II e III (4 e 28°C), citrato sintase (28°C) e ATP sintase (-20 e 4°C), de Tc52 (28 e 40°C), tripanotiona redutase (4 e 28°C), além de aumento expressivo nos níveis de transcritos de triparredoxina após a incubação a 40°C por 2 h.

- A análise morfológica e a detecção da marcação pontual do MDC e do TcAtg8 nas temperaturas de 37, 28 e 4°C indicam indução de autofagia, que fica mais pronunciada nos maiores tempos analisados, tal como nas formas amastigotas-símile;

- Os parasitos submetidos a todas as condições avaliadas foram capazes de infectar células fagocíticas profissionais. Mesmo após 96 h de infecção foi possível verificar amastigotas no interior do macrófago, concluindo-se que os parasitos submetidos a estresse térmico permanecem virulentos, porém não se sabe do seu impacto na progressão do ciclo de vida.

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bern C. Chagas' disease. *N Engl J Med*, 373(5): 456-466, 2015.
- AATB. American Association of Tissue Banks (AATB) Annual Survey of Accredited Tissue Banks in the United States. AATB McLean, 2010.
- Acquatella H. Echocardiography in Chagas heart disease. *Circulation*, 115: 1124-1131, 2007.
- Alexandre D, Cunha, RL, Hubinger, MD. CONSERVAÇÃO DO AÇAÍ PELA TECNOLOGIA DE OBSTÁCULOS. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* 24: 114-119, 2004.
- Altchek J, Moscatelli G, Moroni S, Garcia-Bournissen F, Freilij H. Adverse events after the use of benznidazole in infants and children with Chagas disease. *Pediatrics*, 127(1): e212-e218, 2011.
- Alvarez VE, Kosec G, Sant'anna C, Turk V, Cazzulo JJ e Turk B. Autophagy is Involved in Nutritional Stress Response and Differentiation in *Trypanosoma cruzi*. *J Biol Chem*, 283: 3454-3464, 2008.
- Alvarez VE, Niemirowicz GT, Cazzulo JJ. The peptidases of *Trypanosoma cruzi*: digestive enzymes, virulence factors, and mediators of autophagy and programmed cell death. *Biochim Biophys Acta*, 1824:195-206, 2011.
- Anderson WA & Hill GC. Division and DNA synthesis in the kinetoplast of *Crithidia fasciculata*. *J Cell Sci*, 4: 611-620, 1969.
- Andrade JP, Marin Neto JA, Paola AA, Vilas-Boas F, Oliveira GM, Bacal F, Bocchi EA, Almeida DR, Fragata Filho AA, Moreira MC, Xavier SS, Oliveira Junior WA, Dias JC. I Latin American Guidelines for the diagnosis and treatment of Chagas' heart disease: executive summary. *Arq Bras Cardiol*, 96(6): 434-442, 2011.
- Andrade SG, Andrade V, Brodskyn C, Magalhães JB, Netto MB. Immunological response of Swiss mice to infection with three different strains of *Trypanosoma cruzi*. *Ann Trop Med Parasitol*, 79: 397-407, 1985.
- Andrade SG, Magalhães JB, Pontes AL. Evaluation of chemotherapy with benznidazole and nifurtimox in mice infected with *Trypanosoma cruzi* strains of different types. *Bull WHO*, 63: 721-726, 1985.
- Andrade SG. Morphological and behavioural characterization of *Trypanosoma cruzi* strains. *Rev Soc Bras MedTrop*, 39-46, 1985.

- Andrews NW, Hong KS, Robbins ES, Nussenzweig V. Stage-specific surface antigens expressed during the morphogenesis of vertebrate forms of *Trypanosoma cruzi*. *Exp Parasitol*, 64 (3): 474-484, 1987.
- Antoniou AI, Pepe DA, Aiello D, Siciliano C, Athanassopoulos CM. Chemoselective Protection of Glutathione in the Preparation of Bioconjugates: The Case of Trypanothione Disulfide. *J Org Chem*, 81: 4353-4358, 2016
- Aphasizhev R, Aphasizheva I. Mitochondrial RNA editing in trypanosomes: small RNAs in control. *Biochimie*, 100: 125-131, 2014.
- Araripe JR, Cunha e Silva NL, Leal ST, de Souza W, Rondinelli E. *Trypanosoma cruzi*: TcRAB7 protein is localized at the Golgi apparatus in epimastigotes. *Biochem Biophys Res Commun*, 321: 397-402, 2004.
- Atwood JA 3rd, Weatherly DB, Minning TA, Bundy B, Cavola C, Opperdoes FR, Orlando R, Tarleton RL. The *Trypanosoma cruzi* proteome. *Science*, 309: 473-476, 2005.
- Avila HA, Simpson L. Organization and complexity of minicircle-encoded guide RNAs in *Trypanosoma cruzi*. *RNA*, 1: 939-947, 1995.
- Avliyakov NK, Hines JC, Ray DS. Sequence elements in both the intergenic space and the 3' untranslated region of the *Crithidia fasciculata* KAP3 gene are required for cell cycle regulation of KAP3 mRNA. *Euk Cell*, 2: 671-677, 2003.
- Azambuja P, Mello CB, D'Escoffier LN, Garcia ES. In vitro cytotoxicity of *Rhodnius prolixus* hemolytic factor and mellitin towards different trypanosomatids. *Braz J Med Biol Res*, 22: 597-599, 1989.
- Babes V. Beobachtungen über die metachromatischen körperchen, sporenbildung, verzweigung, kolben- und kapsel-bildung pathogener bakterien. *Zentralbl Bakteriol Parasitenkd Infektionskr Hyg*, 20: 412–420, 1895.
- Balogh G, Peter M, Glatz A, Gombos I, Torok Z, Horvath I, Harwood JL, Vigh L. Key role of lipids in heat stress management. *FEBS Lett*, 587: 1970-1980, 2013.
- Baptista CG, Rodrigues EC, Morking P, Klinke A, Zardo ML, Soares MJ, de Aguiar AM, Goldenberg S, Ramos AS. Identification of a Golgi-localized UDP-N-acetylglucosamine transporter in *Trypanosoma cruzi*. *BMC Microbiol*, 15: 269, 2015.

- Barreto-de-Albuquerque J, Silva-dos-Santos D, Pérez AR, Berbert LR, Santana-van-Vliet E1, Farias-de-Oliveira DA, Moreira OC, Roggero E, Carvalho-Pinto CE, Jurberg J, Cotta-de-Almeida V, Bottasso O, Savino W, de Meis J. *Trypanosoma cruzi* Infection through the Oral Route Promotes a Severe Infection in Mice: New Disease Form from an Old Infection? PLoS Negl Trop Dis, 9, 2015.
- Bastos CJ, Aras R, Mota G, Reis F, Dias JP, de Jesus RS, Freire MS, de Araújo EG, Prazeres J, Grassi MF. Clinical outcomes of thirteen patients with acute chagas disease acquired through oral transmission from two urban outbreaks in northeastern Brazil. PLoS Negl Trop Dis, 15: 4. 2010.
- Benjamin RJ, Stramer SL, Leiby DA, Dodd RY, Fearon M, Castro E. *Trypanosoma cruzi* infection in North America and Spain: evidence in support of transfusion transmission. Transfusion, 52: 1913-1921, 2012.
- Bermudez J, Davies C, Simonazzi A, Pablo Real J, Palma S. Current drug therapy and pharmaceutical challenges for Chagas disease. Acta Trop, 156: 1-16, 2015.
- Bernas T, Dobrucki J. Mitochondrial and nonmitochondrial reduction of MTT: interaction of MTT with TMRE, JC-1, and NAO mitochondrial fluorescent probes. Cytometry, 1;47(4): 236-242, 2002.
- Bertelli MS, Golgher RR, Brener Z. Intraspecific variation in *Trypanosoma cruzi*: effect of temperature on the intracellular differentiation in tissue culture, 63: 434-437, 1977.
- Biederbick A, Kern HF, Elsasser HP. Monodansylcadaverine (MDC) is a specific *in vivo* marker for autophagic vacuoles. Eur J Cell Biol, 66: 3-14, 1995.
- Bittencourt AL. Congenital Chagas disease. Am J Dis Child, 130(1): 97-103, 1976.
- Blattner J, Swinkels B, Dörsam H, Prospero T, Subramani S, Clayton C. Glycosome assembly in trypanosomes: variations in the acceptable degeneracy of a COOH-terminal microbody targeting signal. J Cell Biol, 119: 1129-1136, 1992.
- Blommaert EF, Luiken JJ, Meijer AJ. Autophagic proteolysis: control and specificity. Histochem J, 29: 365-385, 1997.
- Boiani M, Piacenza L, Hernández P, Boiani L, Cerecetto H, González M, Denicola A. Mode of action of nifurtimox and N-oxide-containing heterocycles against

- Trypanosoma cruzi*: is oxidative stress involved? *Bioch Pharmacol*, 79(12):1736-1745, 2010.
- Boveris A, Cadenas E, Stoppani A. O. Role of ubiquinone in the mitochondrial generation of hydrogen peroxide. *Biochem J*, 156: 435–444, 1976.
- Braga MV, de Souza W. Effects of protein kinase and phosphatidylinositol-3 kinase inhibitors on growth and ultrastructure of *Trypanosoma cruzi*. *FEMS Microbiol Lett*, 256: 209-216, 2006.
- Brener Z. Intraspecific variations in *Trypanosoma cruzi*: two types of parasite populations presenting distinct characteristics. *PAHO Sci Publ*, 347: 11-21, 1977.
- Broutin H, Tarrieu F, Tibayrenc M, Oury B, Barnabé C. Phylogenetic analysis of the glucose-6-phosphate isomerase gene in *Trypanosoma cruzi*. *Exp Parasitol*, 113: 1–7, 2006.
- Burton P, Dusanic DG. Fine structure and replication of the kinetoplast of *Trypanosoma lewisi*. *J Cell Biol*, 39: 318-331, 1968.
- Campbell, DA, Westenberger, SJ, Sturm, NR. The determinants of Chagas disease: connecting parasite and host genetics. *Curr Mol Med*, 4: 549-562, 2004.
- Cardoso AV, Lescano SA, Amato Neto V, Gakiya E, Santos SV. Survival of *Trypanosoma cruzi* in sugar cane used to prepare juice. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, 48(5): 287-289, 2006.
- Cardoso, FA. Sur le mécanisme de la transmission de la maladie de Chagas. *Ann Parasit Hum Comp*, 16: 341-349, 1933.
- Carlier Y, Sosa-Estani S, Luquetti AO, Buekens P. Congenital Chagas disease: an update. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 110(3):363-8, 2015
- Carlier Y, Torrico F, Sosa-Estani S, Russomando G, Luquetti A, Freilij H, et al. Congenital Chagas disease: recommendations for diagnosis, treatment and control of newborns, siblings and pregnant women. *PLoS Negl Trop Dis*, 5(10): e1250, 2011
- Carvalho, LO, Abreu-Silva, AL, Hardoim, DJ, Tedesco, RC, Mendes, VG, da Costa, SC, Calabrese, KS. *Trypanosoma cruzi* and myoid cells from seminiferous

tubules: interaction and relation with fibrous components of extracellular matrix in experimental Chagas' disease. *Int. J. Exp. Pathol.* 90, 52-57, 2009.

Carvalho, TL, Ribeiro, RD, Lopes, RA. The male reproductive organs in experimental Chagas' disease. I. Morphometric study of the vas deferens in the acute phase of the disease. *Exp. Pathol.* 41, 203-214, 1991.

Cavalcanti DP, Fragoso SP, Goldenberg S, De Souza W, Motta MC. The effect of topoisomerase II inhibitors on the kinetoplast ultrastructure. *Parasitol Res*, 94: 439-448, 2004.

Cevallos AM, Hernández R. Chagas' disease: pregnancy and congenital transmission. *Biomed Res Int*, 2014: 401864, 2014.

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

Charm SE, Landau S, Williams B, Horowitz B, Prince AM, Pascual D. High-temperature short-time heat inactivation of HIV and other viruses in human blood plasma. *Vox Sang.* 62: 12-20, 1992.

Chen M, Bennedsen M, Zhai L, Kharazmi A. Purification and enzymatic activity of an NADH-fumarate reductase and other mitochondrial activities of *Leishmania* parasites. *APMIS*, 109: 801-808, 2001.

Clayton C, Shapira M. Post-transcriptional regulation of gene expression in trypanosomes and leishmanias. *Mol Biochem Parasitol*, 156: 93-101, 2007.

Colasante C, Ellis M, Ruppert T, Voncken F. Comparative proteomics of glycosomes from bloodstream form and procyclic culture form *Trypanosoma brucei brucei*. *Proteomics*, 6: 3275-3293, 2006.

Contreras VT, Navarro MC, De Lima AR, Arteaga R, Duran F, Askue J, Franco Y. Production of amastigotes from metacyclic trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 97:1213-1220, 2002.

Contreras VT, Salles JM, Thomas N, Morel CM, Goldenberg S. In vitro differentiation of *Trypanosoma cruzi* under chemically defined conditions. *Mol Biochem Parasitol*, 16: 315-327, 1985.

- Corrêa JR, Atella GC, Batista MM, Soares MJ. Transferrin uptake in *Trypanosoma cruzi* is impaired by interference on cytosome-associated cytoskeleton elements and stability of membrane cholesterol, but not by obstruction of clathrin-dependent endocytosis. *Exp Parasitol*, 119(1): 58-66, 2008.
- Coura JR & Dias JC. Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease: 100 years after its discovery. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 104 Suppl 1:31-40, 2009.
- Coura JR, Borges-Pereira J. Chagas disease. What is known and what should be improved: a systemic review. *Rev Soc Bras Med Trop*, 45(3): 286-296, 2012.
- Coura JR, Junqueira AC. Risks of endemicity, morbidity and perspectives regarding the control of Chagas disease in the Amazon Region. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 107(2): 145-154, 2012.
- Coura, JR. The main sceneries of Chagas disease transmission. The vectors, blood and oral transmissions - A comprehensive review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 110(3): 277-282. 2015.
- Cuervo AM & Wong E. Chaperone-mediated autophagy: roles in disease and aging. *Cell Res*, 24: 92-104, 2014.
- De Carvalho EF, de Castro FT, Rondinelli E, Soares CM, Carvalho JF. HSP 70 gene expression in *Trypanosoma cruzi* is regulated at different levels. *J Cell Physiol*, 143: 439-444, 1990.
- De Duve C, Pressman BC, Gianetto R, Wattiaux R, Apellmans F. Tissue fractionation studies. 6. Intracellular distribution patterns of enzymes in rat-liver tissue. *Biochem J*, 60: 604-617, 1955.
- de Freitas JM, Augusto-Pinto L, Pimenta JR, Bastos-Rodrigues L, Gonçalves 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*, 2(3): e24, 2006.
- De Melo LD, Sant'Anna C, Reis SA, Lourenço D, De Souza W, Lopes UG, Cunha-e-Silva NL. Evolutionary conservation of actin-binding proteins in *Trypanosoma*

- cruzi* and unusual subcellular localization of the actin homologue. *Parasitology*, 135: 955-965, 2008.
- de Oliveira GM. Redução do número de camundongos utilizados na obtenção de formas infectantes de *Trypanosoma cruzi* através da imunossupressão com ciclofosfamida. *Rev Soc Bras Ciên An Lab*, 1: 92-96, 2012.
- de Oliveira RB, Troncon LE, Dantas RO, Menghelli UG. Gastrointestinal manifestations of Chagas' disease. *Am J Gastroenterol*, 93(6): 884-889, 1988.
- De Souza W, Cavalcanti DP. DNA-containing organelles in pathogenic protozoa: a review. *Trends Cell Mol Biol*, 2: 89-104, 2009.
- De Souza W. An introduction to the structural organization of parasitic protozoa. *Curr Pharm Des*, 14(9): 822-838, 2008a.
- De Souza W. Cell biology of *Trypanosoma cruzi*. *Int Rev Cytol*, 86:197-283, 1984.
- De Souza W. Components of the cell surface of Trypanosomatids. *Prog Protistol*, 3: 87-184, 1989.
- De Souza W. Electron microscopy of trypanosomes - a historical view. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 103(4): 313-325, 2008b.
- De Souza W. From the cell biology to the development of new chemotherapeutic approaches against trypanosomatids: dreams and reality. *Kinetoplastid Biol Dis*, 31; 1(1): 3, 2002.
- De Souza W. Structural organization of *Trypanosoma cruzi*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 104 Suppl 1: 89-100, 2009.
- Dean S, Marchetti R, Kirk K, Matthews KR. A surface transporter family conveys the trypanosome differentiation signal. *Nature*, 459: 213-217, 2009.
- Devera R, Fernandes O, Coura JR. Should *Trypanosoma cruzi* be called "cruzi" complex? A review of the parasite diversity and the potential of selecting population after in vitro culturing and mice infection. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 98: 1-12, 2003.
- Dey A, Swaminathan K. Hyperglycemia-induced mitochondrial alterations in liver. *Life Sci*, 1487: 197-214, 2010.

- Dias JCP, Amato-Neto VA, Luna, EJA. Mecanismos alternativos de transmissão do *Trypanosoma cruzi* no Brasil e sugestões para sua prevenção. Rev Soc Bras Med Trop, 44(3): 375-379, 2011.
- Dias JCP, Brener Z. Chagas disease and blood transfusion. Mem Inst Oswaldo Cruz, 79: 139-147, 1984.
- Dias JCP, Cláudio LDG, Lima MM, Viñas A, Silva RA, Alves RV, Costa VM. Changes in the paradigm of clinical and therapeutic management of Chagas' disease: progress and perspectives in the pursuit of comprehensive health. Epidemiol Serv Saúde, 25: 87-90, 2016.
- Dias JCP, Prata A, Schofield CJ. Chagas' disease in the Amazon: an overview of the current situation and perspectives for prevention. Rev Soc Bras Med Trop, 35(6): 669-678, 2002.
- Dias JCP, Ramos AN, Gontijo ED, Luquetti A, Shikanai-Yasuda MA, Coura JR, Torres, RM, Cunha-Melo JR, Almeida EA, Oliveira Jr W, Silveira AC, Rezende JM, Pinto FS, Ferreira AW, Rassi A, e cols. II Consenso Brasileiro em Doença de Chagas, 2015. Epidemiol Serv Saúde, 25: 7-86, 2016.
- Dias JCP, Schofield C. The evolution of Chagas disease (American trypanosomiasis) control after 90 years since Carlos Chagas discovery. Mem Inst Oswaldo Cruz, 94 Suppl 1:103-21, 1999.
- Dias JCP. Chagas' disease and blood transfusion in Brazil: surveillance and challenges. Rev Bra Hematol Hemoter, 28(2): 81-87, 2006.
- Dias JCP. Notas sobre o *Trypanosoma cruzi* e suas características bio-ecológicas, como agente de enfermidades transmitidas por alimentos. Rev Soc Bras Med Trop, 39:370-375, 2006.
- Dias, JCP. Elimination of Chagas disease transmission: perspectives. Mem. Inst. Oswaldo Cruz vol.104, 2009.
- Diaz-de-Toranzo EG, Castro JA, Franke de Cazzulo BM, Cazzulo JJ. Interaction of benznidazole reactive metabolites with nuclear and kinetoplasmic DNA proteins and lipids from *Trypanosoma cruzi*. Experientia, 44:880-1,1988.

- Dice JF, Terlecky SR, Chiang HL, Olson TS, Isenman LD, Short-Russell SR, Freundlieb S, Terlecky LJ. A selective pathway for degradation of cytosolic proteins by lysosomes. *Semin Cell Biol*, 1: 449-455, 1990.
- DoCampo R, de Souza W, Miranda K, Rohloff P, Moreno SN. Acidocalcisomes - conserved from bacteria to man. *Nat Rev Microbiol*, 3: 251– 261, 2005.
- DoCampo R, Scott DA, Vercesi AE, Moreno SN. Intracellular Ca²⁺ storage in acidocalcisomes of *Trypanosoma cruzi*. *Biochem J*, 310: 1005–1012, 1995.
- Docampo R, Stoppani AOM. Generation of superoxide anion and hydrogen peroxide induced by nifurtimox in *Trypanosoma cruzi*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 197: 317-21, 1979.
- Docampo R. Sensitivity of parasite to free radical damage by antiparasitic drugs. *Chemical-Biological Interactions*, 73:1-27, 1990
- Duszenko M, Ginger ML, Brennand A, Gualdrón-López M, Colombo MI, Coombs GH, Coppens I, Jayabalasingham B, Langsley G, de Castro SL, Menna-Barreto R, Mottram JC, Navarro M, Rigden DJ, Romano PS, Stoka V, Turk B, Michels PA. Autophagy in protists. *Autophagy*, 7: 127-158, 2011.
- Dymond MK. Mammalian phospholipid homeostasis: Homeoviscous adaptation deconstructed by lipidomic data driven modelling. *Chem Phys Lipids*, 191:136-46, 2015.
- Ehrenberg B, Montana V, Wei MD, Wuskell JP, Loew LM. Membrane potential can be determined in individual cells from the nernstian distribution of cationic dyes. *Biophys J*, 53: 785-794, 1988.
- Engman DM, Henkle-Duhrsen K, Kirchhoff LV and Donelson JE. *Trypanosoma cruzi*: accumulation of polycistronic hsp70 RNAs during severe heat shock. *Exp Parasitol*, 80: 575–577, 1995.
- Fernandes MC, Da Silva EN, Pinto AV, De Castro SL, Menna-Barreto RF. A novel triazolic naphthofuranquinone induces autophagy in reservosomes and impairment of mitosis in *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology*, 139: 26-36, 2012.

- Ferreira CS, Martinho PC, Amato Neto V, Cruz RR. Pasteurization of human milk to prevent transmission of Chagas disease. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 43:161-162, 2001.
- Fidalgo LM, Gille L. Mitochondria and trypanosomatids: targets and drugs. *Pharm Res*, 28: 2758-2770, 2011.
- Fink B, Laude K, McCann L, Doughan A, Harrison DG, Dikalov S. Detection of intracellular superoxide formation in endothelial cells and intact tissues using dihydroethidium and an HPLC-based assay. *Am J Physiol Cell Physiol*, 287(4): C895-902, 2004.
- Florin-Christensen, M, Florin-Christensen, J, de Isola, ED, Lammel, E, Meinardi, E, Brenner, RR and Rasmussen, L. Temperature acclimation of *Trypanosoma cruzi* epimastigote and metacyclic trypomastigote lipids. *Mol Biochem Parasitol*, 88: 25–33, 1997.
- Folgueira C, Requena JM. A postgenomic view of the heat shock proteins in kinetoplastids. *FEMS Microbiol Rev*, 31: 359-377, 2007.
- Freilij H, Altchek J. Congenital Chagas' disease: diagnostic and clinical aspects. *Clin Infect Dis*, 21(3): 551-555, 1995.
- Freitas JLP, Amato Neto V, Sonntag R, Biancalama A, Nussenzweig V, Barreto JG. Primeiras ratificações de transmissão acidental da moléstia de Chagas ao homem por transfusão de sangue. *Rev Paul Med*, 40:36-40, 1952.
- Gabaldón T, Rainey D, Huynen MA. Tracing the evolution of a large protein complex in the eukaryotes, NADH: ubiquinone oxidoreductase (Complex I). *J Mol Biol* 13, 348(4): 857-870, 2005.
- Gaunt MW, Yeo M, Frame IA, Stothard JR, Carrasco HJ, Taylor MC, et al. Mechanism of genetic exchange in American trypanosomes. *Nature*, 421: 936-939, 2003.
- Gebrekrstos HT, Buekens P. Mother-to-Child Transmission of *Trypanosoma cruzi*. *J Ped Infect Dis Soc*, 3(Suppl 1): S36-40, 2014.
- Germano MD, Roca Acevedo G, Mougabure Cueto GA, Toloza AC, Vassena CV, Picollo MI. New findings of insecticide resistance in *Triatoma infestans*

- (Heteroptera: Reduviidae) from Gran Chaco. *J Med Entomol*, 47: 1077-1081, 2010.
- Giambiagi-deMarval M, Souto-Padron T, Rondinelli E. Characterization and cellular distribution of heat-shock proteins HSP70 and HSP60 in *Trypanosoma cruzi*. *Exp Parasitol*, 83:335–345, 1996.
- Giannattasio S, Atlante A, Antonacci L, Guaragnella N, Lattanzio P, Passarella S, Marra E. Cytochrome c is released from coupled mitochondria of yeast en route to acetic acid-induced programmed cell death and can work as an electron donor and a ROS scavenger. *FEBS Lett*, 582: 1519-1525, 2008.
- Gille L, Nohl H. The ubiquinol/bc1 redox couple regulates mitochondrial oxygen radical formation. *Arch Biochem Biophys*, 388: 34-38, 2001.
- Gonçalves RLS, Menna-Barreto RFS, Polycarpo CR, Gadelha FR, De Castro SL, Oliveira MF. A comparative assessment of mitochondrial function in epimastigotes and bloodstream trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *J Bioenerg Biomembr*, 43: 651-661, 2011.
- Gorla NB, Ledesma OS, Barbieri GP, Larripa IB. Thirteenfold increase of chromosomal aberrations non-randomly distributed in chagasic children treated with nifurtimox. *Mut Res/Gen Toxicol*, 224: 263-267, 1989.
- Gottlieb RA. Mitochondrial signaling in apoptosis: mitochondrial daggers to the breaking heart. *Basic Res Cardiol*, 98: 242–249, 2003.
- Griparic L, van der Blik AM. The many shapes of mitochondrial membranes. *Traffic*, 2: 235-244, 2001.
- Guhl F, Aguilera G, Pinto N, Vergara D. Updated geographical distribution and ecoepidemiology of the triatomine fauna (Reduviidae: Triatominae) in Colombia. *Biomedica*, 27: 143-162, 2007.
- Gull K. The cytoskeleton of trypanosomatid parasites. *Annu Rev Microbiol*, 53: 629-655, 1999.
- Gurgel CBFM, et al. A doença de Chagas no Brasil: uma presença antiga. *Rev Soc Bras Clín Méd*, 5: 196-202, 2009.

- Gurtler RE, Segura EL e Cohen JE. Congenital transmission of *Trypanosoma cruzi* infection in Argentina. *Emerg Infect Dis*, 9: 29-32, 2003.
- Haanstra JR, González-Marcano EB, Gualdrón-López M, Michels PA. Biogenesis, maintenance and dynamics of glycosomes in trypanosomatid parasites. *Biochim Biophys Acta*, 1863(5): 1038-1048, 2016.
- Hal BF. *Trypanosoma cruzi*: mechanisms for entry into host cells, *Seminars in Cell Biology*, 4: 323–333, 1993.
- Hall BS, Bot C, Wilkinson SR. Nifurtimox activation by trypanosomal type I nitroreductases generates cytotoxic nitrile metabolites. *J Biol Chem*, 286: 13088-13095, 2011.
- Hall BS, Wilkinson SR. Activation of benznidazole by trypanosomal type I nitroreductases results in glyoxal formation. *Antimicrob Agents Chemother*, 56: 115-23, 2012
- Hazel JR. Thermal adaptation in biological membranes: is homeoviscous adaptation the explanation? *Annu Rev Physiol*, 57: 19-42, 1995.
- Hecht, MM, Nitz, N, Araujo, PF, Sousa, AO, Rosa, AC, Gomes, DA, Leonardecz, E, Teixeira, AR. Inheritance of DNA transferred from American trypanosomes to human hosts. *PLoSOne*. 5, e9181, 2010.
- Hedges SB. The origin and evolution of model organisms. *Nat Rev Genet.*, 3: 838-849, 2002.
- Hemominas. Portaria PRE no 285/2010 de 21 de dezembro 2010. Aprova Manual de Normas e Procedimentos de Transporte de Hemocomponentes no âmbito da Fundação Hemominas, Belo Horizonte, 2010.
- Herman M, Gillies S, Michels PA, Rigden DJ. Autophagy and related processes in trypanosomatids: insights from genomic and bioinformatic analyses. *Autophagy*, 2(2):107-118, 2006.
- Heytler PG, Prichard WW. A new class of uncoupling agents--carbonyl cyanide phenylhydrazones. *Biochem Biophys Res Commun* 4, 7: 272-275, 1962.

- Horvath A, Berry EA, Huang LS, Maslov DA. *Leishmania tarentolae*: a parallel isolation of cytochrome bc(1) and cytochrome c oxidase. *Exp Parasitol*, 96: 160–167, 2000.
- Howard EJ, Xiong X, Carlier Y, Sosa-Estani S, Buekens P. Frequency of the congenital transmission of *Trypanosoma cruzi*: a systematic review and meta-analysis. *BJOG*, 121: 22–33, 2014.
- Ianni BM, Mady C. The sugarcane juice was delicious, but*Arq Bras Cardiol*, 85: 379-381, 2005.
- Jackson Y, Alirol E, Getaz L, Wolff H, Combescure C, Chappuis F. Tolerance and safety of nifurtimox in patients with chronic Chagas disease. *Clin Infect Dis*, 51: e69–75, 2010.
- Jimenez V. Dealing with environmental challenges: mechanisms of adaptation in *Trypanosoma cruzi*. *Res Microbiol*, 165: 155-165, 2014.
- Jörg, ME, Oliva, R. Presencia de tripomastigotes en sangre menstrual de mujeres com tripanosomiasis cruzi. *Rev. Arg. Parasitol.* 1, 28–30, 1980.
- Juenemann K, Reits EA. Alternative macroautophagic pathways. *Int J Cell Biol*, 2012: 189794, 2012.
- Jurberg J, Rodrigues JMS, Moreira FFF, Dale C, Cordeiro IRS, Lamas Jr VD, Galvão C, Rocha DS. Atlas iconográfico dos triatomíneos do Brasil (Vetores da doença de Chagas). Laboratório Nacional e Internacional de Referência em Taxonomia de Triatomíneos Instituto Oswaldo Cruz - Rio de Janeiro 2014.
- Kaushik S, Cuervo AM. Chaperones in autophagy. *Pharmacol Res*, 66: 484-493, 2012.
- Kiel JA. Autophagy in unicellular eukaryotes. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 12; 365: 819-830, 2010.
- Kirisako T, Ichimura Y, Okada H, Kabeya Y, Mizushima N, Yoshimori T, Ohsumi M, Takao T, Noda T, Ohsumi Y. The reversible modification regulates the membrane-binding state of Apg8/Aut7 essential for autophagy and the cytoplasm to vacuole targeting pathway. *J Cell Biol*, 151(2): 263-276, 2000.

- Klionsky DJ, Cregg JM, Dunn WA Jr, Emr SD, Sakai Y, Sandoval IV, Sibirny A, Subramani S, Thumm M, Veenhuis M, Ohsumi Y. A unified nomenclature for yeast autophagy-related genes. *Dev Cell*, 5(4): 539-545, 2003.
- Klionsky DJ, et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). *Autophagy*, 12: 1-222, 2016.
- Kofoed CA, Donat F. Experimental infection with *Trypanosoma cruzi* from intestine of cone-nose bug, *Triatoma protracta*. *Proc Soc Exp Biol Med*, 30: 489-491, 1933.
- Krettli AU, Brener Z. Resistance against *Trypanosoma cruzi* associated to anti-living trypomastigote antibodies. *J Immunol*, 129: 2009-2012, 1982.
- Kroemer G, Mariño G, Levine B, Autophagy and the integrated stress response. *Mol Cell*, 40(2): 280-293, 2010.
- Kubata BK, Kabututu Z, Nozaki T, Munday CJ, Fukuzumi S, Ohkubo K, et al. A Key Role for Old Yellow Enzyme in the Metabolism of Drugs by *Trypanosoma cruzi*. *J Exp Med*, 196: 1241-1252, 2002.
- Lambert AJ, Brand MD. Inhibitors of the quinone-binding site allow rapid superoxide production from mitochondrial NADH: ubiquinone oxidoreductase (complex I). *J Biol Chem*, 279: 39414–39420, 2004.
- Lanar DE. Growth and differentiation of *Trypanosoma cruzi* cultivated with a *Triatoma infestans* embryo cell line. *J Protozool*, 26: 457-62, 1979.
- Leloup C, Casteilla L, Carrière A, Galinier A, Benani A, Carneiro L, Pénicaud L. Balancing mitochondrial redox signaling: a key point in metabolic regulation. *Antioxid Redox Signal*, 14: 519-530, 2011.
- Lewis MD, Llewellyn MS, Yeo M, Acosta N, Gaunt MW, Miles MA. Recent, independent and anthropogenic origins of *Trypanosoma cruzi* hybrids. *PLoS Negl Trop Dis*, 5(10): e1363, 2011.
- Lima AAN, Soares-Sobrinho JL, Silva JL, Corrêa-Júnior RAC, Lyra MAM, Santos FLA, et al. The use of solid dispersion systems in hydrophilic carriers to increase benznidazole solubility. *J Pharm Sci*, 100: 2443-2451, 2011.
- Liu Q, Zhou XN. Preventing the transmission of American trypanosomiasis and its spread into non-endemic countries. *Infect Dis Poverty*, 28: 4: 60, 2015.

- Liu Y, Englund PT. The rotational dynamics of kinetoplast DNA replication. *Mol Microbiol*, 64(3): 676-690, 2007.
- Liu Y, Song XD, Liu W, Zhang TY, Zuo J. Glucose deprivation induces mitochondrial dysfunction and oxidative stress in PC12 cell line. *J Cell Mol Med*. 2003 Jan-Mar;7(1):49-56.
- Luitgards-Moura JF, Vargas AB, Almeida CE, Magno-Esperança G, Agapito-Souza R, Folly-Ramos E, Costa J, Tsouris P, Rosa-Freitas MG. A *Triatoma maculata* (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) population from Roraima, Amazon region, Brazil, has some bionomic characteristics of a potential Chagas disease vector. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, 47: 131-137, 2005.
- Luquetti AO, Tavares SB, Siriano LR, Oliveira RA, Campos DE, Morais CA, Oliveira EC. Congenital transmission of *Trypanosoma cruzi* in central Brazil. A study of 1,211 individuals born to infected mothers. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 110(3):369-76, 2015.
- Machado FS, Jelicks LA, Kirchhoff LV, Shirani J, Nagajyothi F, Mukherjee S, Nelson R, Coyle CM, Spray DC, de Carvalho AC, Guan F, Prado CM, Lisanti MP, Weiss LM, Montgomery SP, Tanowitz HB. Chagas heart disease: report on recent developments. *Cardiol Rev*, 20(2):53-65, 2012.
- Marsden PD, Cuba CC, Alvarenga NJ, Barreto AC. Report on a field collection of *Dipetalogaster maximus* (Hemiptera Triatominae). *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, 197; 21: 202-206, 1894.
- Marsden, PD. *Trypanosoma cruzi* infection in CFI mice. II - Infection induced by different routes. *Ann Trop Med Parasitol*, 61: 62-67, 1967.
- Martin DL, Goodhew B, Czaicki N, Foster K, Rajbhandary S, Hunter S, Brubaker SA. *Trypanosoma cruzi* survival following cold storage: possible implications for tissue banking. *PLoS One*, 23; 9(4): e95398, 2014.
- Martin, DL, Lowe, KR, McNeill, T, Thiele, EA, Roellig, DM, Zajdowicz, J, Hunter, SA, Brubaker, SA. Potential sexual transmission of *Trypanosoma cruzi* in mice. *Acta Trop*. 149:15-18, 2015.

- Martins-Melo FR, Ramos Jr AN, Alencar CH e Heukelbach J. Prevalence of Chagas disease in Brazil: A systematic review and meta-analysis. *Acta Trop*, 13: 167-174, 2014.
- Mather MW, Henry KW, Vaidya AB. Mitochondrial drug targets in apicomplexan parasites. *Curr Drug Targets*, 8(1): 49-60, 2007.
- Mazza S, Montana A, Benitez C, Janzi EZ. Transmisión del *Schizotrypanum cruzi* al niño por leche de la madre con enfermedad de Chagas. *MEPRA*, 28: 41-46, 1936.
- Mecca MM, Bartel LC, Castro CR, Castro JA. Benznidazole biotransformation in rat heart microsomal fraction without observable ultrastructural alterations: comparison to Nifurtimox-induced cardiac effects. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 103: 549-53, 2008.
- Mehta SL, Li PA. Neuroprotective role of mitochondrial uncoupling protein 2 in cerebral stroke. *J Cereb Blood Flow Metab*, 29: 1069-1078, 2009.
- Menna-Barreto RF, Salomão K, Dantas AP, Santa-Rita RM, Soares MJ, Barbosa HS, de Castro SL. Different cell death pathways induced by drugs in *Trypanosoma cruzi*: an ultrastructural study. *Micron*. 40: 157-168, 2009.
- Meyer H, Oliveira Musacchio M, Andrade Mendonça I. Electron microscopy study of *Trypanosoma cruzi* in thin sections of infected tissue cultures and blood agar forms. *Parasitology*, 48: 1-8, 1958.
- Meyer H, Porter KR. A study of *Trypanosoma cruzi* with the electron microscope. *Parasitology*, 44: 16-23, 1954.
- Miles MA, Llewellyn MS, Lewis MD, Yeo M, Baleela R, Fitzpatrick S, Gaunt MW, Mauricio IL. The molecular epidemiology and phylogeography of *Trypanosoma cruzi* and parallel research on Leishmania: looking back and to the future. *Parasitology*, 136(12): 1509-1528, 2009.
- Ministério da Saúde. Nota Técnica 4/4/05. Doença de Chagas Aguda relacionada a ingestão de caldo de cana em Santa Catarina. Brasil, 2005. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/visualizar_texto.cfm?idtxt=31454. Acesso dia 9 de dezembro de 2015.

- Mizushima N, Yoshimori T, Ohsumi Y. The role of Atg proteins in autophagosome formation. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 27:107-32, 2011.
- Moncayo A, Ortiz Yanine MI. An update on Chagas disease (human American trypanosomiasis). *Ann Trop Med Parasitol*, 100(8):663-677, 2006.
- Moncayo A, Silveira AC. Current epidemiological trends for Chagas disease in Latin America and future challenges in epidemiology, surveillance and health policy. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 104 Suppl 1: 17-30, 2009.
- Moraes-de-Souza H, Ferreira-Silva MM. Control of transfusional transmission. *Rev Soc Bras Med Trop*, 44(Suppl 2): 64-67, 2011.
- Moreno SN, Docampo R, Mason RP, Leon W, Stoppani AO. Different behaviors of benznidazole as free radical generator with mammalian and *Trypanosoma cruzi* microsomal preparations. *Arch Biochem Biophys*, 218: 585-591, 1982.
- Morillo CA, Marin-Neto JA, Avezum A, Sosa-Estani S, Rassi A Jr, Rosas F, Villena E, Quiroz R, Bonilla R, Britto C, Guhl F, Velazquez E, Bonilla L, Meeks B, Rao-Melacini P, Pogue J, Mattos A, Lazdins J, Rassi A, Connolly SJ, Yusuf S; BENEFIT Investigators. Randomized Trial of Benznidazole for Chronic Chagas' Cardiomyopathy. *N Engl J Med*, 373: 1295-306, 2015.
- Mortimore GE, Lardeux BR, Adams CE. Regulation of microautophagy and basal protein turnover in rat liver. Effects of short-term starvation. *J Biol Chem*, 263(5): 2506-2512, 1988.
- Moutiez, M, Aumercier, M, Shöneck, R, Meziane-Cherif, D, Lucas, V, Aumercier, P, Ouaisi, A, Sergheraert e Tartar, A. Purification and characterization of a trypanothione-glutathione thioltransferase from *Trypanosoma cruzi*. *Biochem J*, 310: 433–437,1995.
- Müller O, Sattler T, Flötenmeyer M, Schwarz H, Plattner H, Mayer A. Autophagic tubes: vacuolar invaginations involved in lateral membrane sorting and inverse vesicle budding. *J Cell Biol* 30, 151(3): 519-528, 2000.
- Munafó DB, Colombo MI. A novel assay to study autophagy: regulation of autophagosome vacuole size by amino acid deprivation. *J Cell Sci*, 114(Pt 20): 3619-29, 2001.

- Nagy E, Balogi Z, Gombos I, Akerfelt M, Bjorkbom A, Balogh G, Torok Z, Maslyanko A, et al. Hyperfluidization-coupled membrane microdomain reorganization is linked to activation of the heat shock response in a murine melanoma cell line. *Proc Natl Acad Sci USA*, 104: 7945–7950, 2007.
- Nattan-LARRIER, L. Infectious à trypanosomes et voies de penetration dos vírus. *Bull Soc Pathol Exot Filiales*, 14: 537-542, 1921.
- Názer E, Verdún ER, and Sánchez DO. Severe Heat Shock Induces Nucleolar Accumulation of mRNAs in *Trypanosoma cruzi*. *PLoS One*, 7(8): e43715, 2012.
- Nicholls DG e Ward MW. Mitochondrial membrane potential and neuronal glutamate excitotoxicity: mortality and millivolts. *Trends Neurosci*, 23: 166–174, 2001.
- Nogueira NP, Saraiva FM, Sultano PE, Cunha PR, Laranja GA, Justo GA, Sabino KC, Coelho MG, Rossini A, Atella GC, Paes MC. Proliferation and differentiation of *Trypanosoma cruzi* inside its vector have a new trigger: redox status. *PLoS One*, 10(2): e0116712. 2015.
- Noireau F, Diosque P, Jansen AM. *Trypanosoma cruzi*: adaptation to its vectors and its hosts. *Vet Res*, 40: 26, 2009.
- Ogbadoiyi EO, Robinson DR, Gull K. A high-order trans-membrane structural linkage is responsible for mitochondrial genome positioning and segregation by flagellar basal bodies in trypanosomes. *Mol Biol Cell*, 14: 1769-1779, 2003.
- Oliveira I, Torrico F, Muñoz J, Gascon J. Congenital transmission of Chagas disease: a clinical approach. *Expert Rev Anti Infect Ther*, 8: 945-956, 2010.
- Olson CL, Nadeau KC, Sullivan MA, Winquist AG, Donelson JE, Walsh CT, Engman DM. Molecular and biochemical comparison of the 70-kDa heat shock proteins of *Trypanosoma cruzi*. *J Biol Chem*, 269; 3868–3874, 1994.
- Opperdoes FR, Baudhuin P, Coppens I, De Roe C, Edwards SW, Weijers PJ, Misset O. Purification, morphometric analysis, and characterization of the glycosomes (microbodies) of the protozoan hemoflagellate *Trypanosoma brucei*. *J Cell Biol*, 98: 1178-1184, 1984.

- Osellame LD, Blacker TS, and Duchen MR. Cellular and molecular mechanisms of mitochondrial function. *Best Practice & Res Clin Endocrinol & Metab*, 26: 711-723, 2012.
- Ouaissi MA, Dubremetz JF, Schoneck R, Fernandez-Gomez R, Gomez-Corvera R, Billaut-Mulot O, Taibi A, Loyens M, Tartar A, Sergheraert C. *Trypanosoma cruzi*: a 52-kDa protein sharing sequence homology with glutathione S-transferase is localized in parasite organelles morphologically resembling reservosomes. *Exp Parasitol*, 81(4): 453-461, 1995.
- PAHO. XVIIa. Reunión de la Comisión Intergubernamental de la Iniciativa Subregional Cono Sur de Eliminación de *Triatoma infestans* y la interrupción de la Transmisión Transfusional de la Tripanosomiasis Americana Santiago de Chile. HSD/CD/CH/03-11, 2010.
- Pattingre S, Espert L, Biard-Piechaczyk M, Codogno P. Regulation of macroautophagy by mTOR and Beclin 1 complexes. *Biochimie*, 90: 313-323, 2008.
- Paulin JJ. *Crithidia fasciculata*: reconstruction of the mitochondrion based on serial thick sections and high-voltage electron microscopy. *Exp Parasitol*, 41(2): 283-289, 1977.
- Pelicano H, Carney D, and Huang P. ROS stress in cancer cells and therapeutic implications. *Drug Resist Update*, 7: 97–110, 2004.
- Pereira KS, Schmidt FL, Guaraldo AM, Franco RM, Dias VL, Passos LA. Chagas' disease as a foodborne illness. *J Food Protect*, 72(2): 441-446, 2009.
- Pereira PC, Navarro EC. Challenges and perspectives of Chagas disease: a review. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis*, 19; 19(1): 34. 2013.
- Perez-Ayala A, Perez-Molina JA, Norman F, Monge-Maillo B, Faro MV, Lopez-Velez R. Gastro-intestinal Chagas disease in migrants to Spain: prevalence and methods for early diagnosis. *Ann Trop Med Parasitol*, 105: 25–29, 2011b.
- Pérez-Ayala A, Pérez-Molina JA, Norman F, Navarro M, Monge-Maillo B, Díaz-Menéndez M, Peris-García J, Flores M, Cañavate C, López-Vélez R. Chagas

- disease in Latin American migrants: a Spanish challenge. *Clin Microbiol Infect*, 17(7):1108-13,2011a.
- Pérez-Molina J, Norman F, López-Vélez R. Chagas disease in nonendemic countries: epidemiology, clinical presentation and treatment. *Curr Infect Dis Rep*, 14: 263–74, 2012.
- Peterson FJ, Mason RP, Hovsepian J, Holtzman JL. Oxygen-sensitive and -insensitive nitroreduction by *Escherichia coli* and rat hepatic microsomes. *J Biol Chem*, 254(10): 4009-4014, 1979.
- Pinazo MJ, Espinosa G, Cortes-Lletget C, Posada EJ, Aldasoro E, Oliveira I, Muñoz J, Gállego M, Gascon J. Immunosuppression and Chagas disease: a management challenge. *PLoS Negl Trop Dis*, 7: e1965, 2013.
- Pinazo MJ, Munoz J, Posada E, et al. Tolerance of benznidazole in treatment of chagas' disease in adults. *Antimicrob Agents Chemother*, 54: 4896–99, 2010.
- Polak A, Richle R. Mode of action of the 2-nitroimidazole derivative benznidazole. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 72:45-54, 1978.
- Prata A. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. *Lancet Infect Dis*, 1(2): 92-100, 2001.
- Prohászka Z, Füst G. Immunological aspects of heat-shock proteins-the optimum stress of life. *Mol Immunol*, 41: 29-44, 2004.
- Ramirez LE, Lages-Silva E, Pianetti GM, Rabelo RM, Bordin JO, Moraes-Souza H. Prevention of transfusion-associated Chagas' disease by sterilization of *Trypanosoma cruzi*-infected blood with gentian violet, ascorbic acid, and light. *Transfusion*. 35: 226-230, 1995.
- Ramos I, Gomes F, Koeller CM, Saito K, Heise N, Masuda H, Docampo R, de Souza W, Machado EA, Miranda K. Acidocalcisomes as calcium- and polyphosphate-storage compartments during embryogenesis of the insect *Rhodnius prolixus* Stahl. *PLoS One*, 6(11): e27276, 2011.
- Rassi Jr A, Rassi A, Marcondes de Rezende J. American trypanosomiasis (Chagas disease). *Infect Dis Clin North Am*, 26(2): 275-291, 2012.

- Rassi Jr A, Rassi A, Marin-Neto JA. Chagas heart disease: pathophysiologic mechanisms, prognostic factors and risk stratification. Mem Inst Oswaldo Cruz, 104(Suppl. 1): 152-158, 2009.
- Rendell VR, Gilman RH, Valencia E, Galdos-Cardenas G, Verastegui M, Sanchez L, Acosta J, Sanchez G, Ferrufino L, LaFuente C, Abastoflor Mdel C, Colanzi R, Bern C. *Trypanosoma cruzi*-infected pregnant women without vector exposure have higher parasitemia levels: implications for congenital transmission risk. PLoS One, 10(3): e0119527, 2015.
- Requena JM, Jimenez-Ruiz A, Soto M, Assiego R, Santarén JF, Lopez MC, Patarroyo ME, Alonso C. Regulation of hsp70 expression in *Trypanosoma cruzi* by temperature and growth phase. Mol Biochem Parasitol, 53: 201-212, 1992.
- Rigden DJ, Herman M, Gillies S, Michels PA. Implications of a genomic search for autophagy-related genes in trypanosomatids. Biochem Soc Trans, 33(Pt 5): 972-974, 2005.
- Rodrigues DC, Silva R, Rondinelli E, Urmenyi TP. *Trypanosoma cruzi*: modulation of hsp70 mRNA stability by untranslated regions during heat shock. Exp Parasitol, 126: 245-253, 2010.
- Rohloff P, Rodrigues CO, Docampo R. Regulatory volume decrease in *Trypanosoma cruzi* involves amino acid efflux and changes in intracellular calcium. Mol Biochem Parasitol, 126: 219- 230, 2003.
- Romano PS, Arboit MA, Vázquez CL, Colombo MI. The autophagic pathway is a key component in the lysosomal dependent entry of *Trypanosoma cruzi* into the host cell. Autophagy. 5: 6-18, 2009.
- Ruiz FA, Lea CR, Oldfield E, Docampo R. Human platelet dense granules contain polyphosphate and are similar to acidocalcisomes of bacteria and unicellular eukaryotes. J Biol Chem, 279: 44250-44257, 2004.
- Salomão K, De Santana NA, Molina MT, De Castro SL, Menna-Barreto RF. *Trypanosoma cruzi* mitochondrial swelling and membrane potential collapse as primary evidence of the mode of action of naphthoquinone analogues. BMC Microbiol 13: 196, 2013.

- Santos-Ferreira C, Amato Neto V, Gakiya E, Bezerra RC, Alarcón RS. Microwave treatment of human milk to prevent transmission of Chagas disease. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, 45 (1): 41-42, 2003.
- Satoo K, Noda NN, Kumeta H, Fujioka Y, Mizushima N, Ohsumi Y, Inagaki F. The structure of Atg4B-LC3 complex reveals the mechanism of LC3 processing and delipidation during autophagy. *EMBO J*, 28(9): 1341-1350, 2009.
- Scapellato PG, Bottaro EG, Rodríguez-Brieschke MT. Mother-child transmission of Chagas disease: could coinfection with human immunodeficiency virus increase the risk? *Rev Soc Bras Med Trop*, 42: 107-109, 2009.
- Schneider A. Unique aspects of mitochondrial biogenesis in trypanosomatids. *Int J Parasitol*, 31: 1403-1415, 2001.
- Schofield CJ, Dias JCP. The Southern Cone Initiative against Chagas disease. *Adv Parasitol*, 42: 1-27, 1999.
- Schofield CJ, Jannin J, Salvatella R. The future of Chagas disease control. *Trends Parasitol*, 22(12): 583-588, 2006.
- Schofield CJ, Marsden PD. The effect of wall plaster on a domestic population of *Triatoma infestans*. *Bull Pan Am Health Organ*, 16: 356-360, 1982.
- Schoijet AC, Miranda K, Girard-Dias W, de Souza W, Flawiá MM, Torres HN, Docampo R, Alonso GDA *Trypanosoma cruzi* phosphatidylinositol 3-kinase (TcVps34) is involved in osmoregulation and receptor-mediated endocytosis, 283(46): 31541-31550, 2008.
- Seufferheld M, Vieira MC, Ruiz FA, Rodrigues CO, Moreno SN, Docampo R. Identification of organelles in bacteria similar to acidocalcisomes of unicellular eukaryotes. *J Biol Chem*, 278: 29971-29978, 2003.
- Shapiro TA, Englund PT. The structure and replication of kinetoplast DNA. *Ann Rev Microbiol*, 49: 117-143, 1995.
- Shaw J, Lainson R, Fraiha H. Considerações sobre a epidemiologia dos primeiros casos autóctones de doença de Chagas registrados em Belém, Pará, Brasil. *Rev Saude Pub*, 3, 153-157, 1969.

- Shemi A, Ben-Dor S, Vardi A. Elucidating the composition and conservation of the autophagy pathway in photosynthetic eukaryotes. *Autophagy*, 11(4): 701-715, 2015.
- Sherlock IA. Epidemiology and dynamics of the vectorial transmission of Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 94 Suppl 1: 385-386, 1999.
- Shigapova N, Török Z, Balogh G, Goloubinoff P, Vígh L, Horváth I. Membrane fluidization triggers membrane remodeling which affects the thermotolerance in *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Res Commun*, 328(4): 1216-1223, 2005.
- Shikanai-Yasuda MA, Carvalho NB. Oral transmission of Chagas disease. *Clin Infect Dis*, 54, 845-852, 2012.
- Shikanai-Yasuda MA, Marcondes CB, Guedes LA, Siqueira GS, Barone AA, Dias JC, Amato Neto V, Tolezano JE, Peres BA, Arruda Júnior ER, et al. Possible oral transmission of acute Chagas' disease in Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, 33(5): 351-357, 1991.
- Silva LPH, Nussenzweig, V. Sobre una cepa de *Trypanosoma cruzi* altamente virulenta para o camundongo branco. *Folia Clinica*, 20: 197-233, 1953.
- Silveira A, Vinhões M. Elimination of vector-borne transmission of Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 94: 405-411, 1999.
- Silveira A. Factores de riesgo implicados en la transmisión oral de la enfermedad de Chagas. En: Unidad Regional de Prevención y Control de Enfermedades Transmisibles DPC/CD/CHA, Grupo Técnico Especializado en Inocuidad de Alimentos-DPC/VP/FOS. Informe final consulta técnica en epidemiología, prevención y manejo de la transmisión de la enfermedad de Chagas como enfermedad transmitida por alimentos (ETA). Río de Janeiro: OPS/OMS; 2006. p. 16-9.
- Souto-Padron T, De Souza W, Heuser JE. Quick-freeze, deepetch rotary replication of *Trypanosoma cruzi* and *Herpetomonas megaseliae*. *J Cell Sci*; 69: 167-168, 1984.
- Steinert G, Firket H, Steinert M. Synthesis of desoxyribonucleic acid in the parabasal body of *Trypanosoma mega*. *Exp Cell Res*, 15(3): 632-635, 1958.

- Steверding D. The history of Chagas disease. *Parasit Vectors*, 7: 317, 2014.
- St-Pierre J, Buckingham JA, Roebuck SJ, Brand MD. Topology of superoxide production from different sites in the mitochondrial electron transport chain. *J Biol Chem*, 277: 44784-44790, 2002.
- Stuart, K. Kinetoplast DNA, mitochondrial DNA with a difference. *Mol Biochem Parasitol*, 9: 93-104, 1983.
- Sturm NR, Campbell DA. Alternative lifestyles: the population structure of *Trypanosoma cruzi*. *Acta Trop*, 115: 35-43, 2010.
- Suárez DC, Rey AP, Orduz ML. Supervivencia de *Trypanosoma cruzi* en bebidas experimentalmente contaminadas. *Biomédica*, 32: 134-138, 2012.
- SVS/MS. Consenso Brasileiro em doença de Chagas, Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde. *Rev Soc Bras Med Trop*, 38(Suplemento III): 1-29, 2005.
- Tanida I, Ueno T, Kominami E. LC3 conjugation system in mammalian autophagy. *Int J Biochem Cell Biol*, 36(12): 2503-2518, 2004.
- Tarleton RL. Parasite persistence in the aetiology of Chagas disease. *Int J Parasitol*, 31(5-6): 550-554, 2001.
- Tartarotti E, de Azeredo-Oliveira MT. Heterochromatin patterns in triatomines of the genus *Panstrongylus*. *Cytobios*, 99 (391): 113-122, 1999.
- Teixeira AR, Santos-Buch CA. The immunology of experimental Chagas' disease. II. Delayed hypersensitivity to *Trypanosoma cruzi* antigens. *Immunology*, 28(3): 401-410, 1975.
- Teixeira, AR, Roters, F, Mott, KE. Acute Chagas disease. *Gaz. Méd. Bahia*. 70, 176-186, 1970.
- Tielens AG, Van Hellemond JJ. Differences in energy metabolism between trypanosomatidae. *Parasitol Today*, 14: 265-272, 1998.
- Toledo M, Bahia M, Veloso V, Carneiro C, Machado-Coelho G, Alves C, et al. Effects of specific treatment on parasitological and histopathological parameters in

- mice infected with diferente *Trypanosoma cruzi* clonal genotypes. J Antimicrob Chemother, 53: 1045-53, 2004.
- Toledo MJ, Bahia MT, Carneiro CM, Martins-Filho OA, Tibayrenc M, Barnabe C, Tafuri WL, De Lana LM. Chemotherapy with benznidazole and itraconazole for mice infected with different *Trypanosoma cruzi* clonal genotypes. Antimicrob Agents Chemother, 47: 223-230, 2003.
- Torrice F, Alonso-Vega C, Suarez E, Rodriguez P, Torrice MC, Dramaix M, et al. Maternal *Trypanosoma cruzi* infection, pregnancy outcome, morbidity, and mortality of congenitally infected and non-infected newborns in Bolivia. Am J Trop Med Hyg, 70(2): 201-9, 2004.
- Trejos A, Godoy GA, Greenblatt G, Cedillos R. Effects of temperature on morphologic variation of *Schizotrypanum cruzi* in tissue culture. Exp Parasitol, 13: 211-218, 1963.
- Trochine A, Creek DJ, Faral-Tello P, Barrett MP, Robello C. Benznidazole biotransformation and multiple targets in *Trypanosoma cruzi* revealed by metabolomics. PLoS Negl Trop Dis, 8(5): e2844, 2014.
- Turrens JF. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. J Physiol, 552(Pt 2): 335-344, 2003.
- Turrens JF. Possible role of the NADH-fumarate reductase in superoxide anion and hydrogen peroxide production in *Trypanosoma brucei*. Mol Biochem Parasitol, 25: 55-60, 1987.
- Twig G, Elorza A, Molina AJA, Mohamed H, Wikstrom JD, Walzer G, Stiles L, Haigh SE, Katz S, Las G, Alroy J, Wu M, Py BF, Yuan J, Deeney JT, Corkey BE, Shirihai OS. Fission and selective fusion govern mitochondrial segregation and elimination by autophagy. EMBO J., 27, 433-446, 2008.
- Tyler KM, Engman DM. The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. Int J Parasitol, 31, 472-481. 2001.
- Uttenweiler A, Schwarz H, Mayer A. Microautophagic vacuole invagination requires calmodulin in a Ca²⁺-independent function. J Biol Chem, 280(39): 33289-33297, 2005.

- Valente SAS. Epidemiologia da transmissão oral da doença de Chagas. Exposição na Mesa Redonda Situação atual da doença de Chagas na Amazônia. XLI Cong Soc Bras Med Trop, Forianópolis, março de 2005.
- Valente VC, Valente SA, Noireau F, Carrasco HJ, Miles MA. Chagas disease in the Amazon Basin: association of *Panstrongylus geniculatus* (Hemiptera: Reduviidae) with domestic pigs. J Med Entomol, 35: 99-103, 1998.
- Vallejo GA, Guhl F, Schaub GA. Triatominae-*Trypanosoma cruzi*/T. rangeli: Vector-parasite interactions. Acta Trop, 110(2-3): 137-147, 2009.
- Vasile E, Perez T, Nakamura N, Krieger M. Structural Integrity of the Golgi is Temperature Sensitive in Conditional-Lethal Mutants with No Detectable GM130. Traffic, 4: 254-272, 2003.
- Vianna, G. Contribuição para o estudo da anatomia patológica da “Molestia de Carlos Chagas”. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 3, 276-294, 1911.
- Villela MM, Souza JM, Melo VP, Dias JC. Evaluation of the Chagas Disease Control Program and presence of *Panstrongylus megistus* in central-western Minas Gerais State, Brazil. Cad Saude Pública, 25 (4): 907-917, 2009.
- Viotti R, Vigliano C, Armenti A. A risk score for predicting death in Chagas' heart disease. N Engl J Med, 7: 355(23): 2489, 2006.
- Walsh JF, Molyneux DH, Birley MH. Deforestation: effects on vector-borne disease. Parasitology, 106: 55-75, 1993.
- WHO. Chagas disease (American trypanosomiasis) [Internet]. Geneva: World Health Organization; 2015 [citado 2015 Nov 13]. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>
- WHO. Control of Chagas disease Second report of the WHO Expert Committee. Technical Report Series No. 905, Geneva, 96 pp, 2002.
- WHO. Control of chagas disease. Second report of a WHO expert committee. WHO Technical Report Series, 2013.

- Wiame JM. Etude d'une substance polyphosphoree, basophile et metachromatique chez les levures. *Biochim Biophys Acta*, 1: 234–255, 1947.
- Wilkinson SR, Taylor MC, Horn D, Kelly JM, Cheeseman I. A mechanism for cross-resistance to nifurtimox and benznidazole in trypanosomes. *Proc Nat Acad Sci USA*, 105: 5022-5027, 2008.
- Wosniak JJ, Santos CXC, Kowaltowski AJ, Laurindo F. Cross-talk between mitochondria and NADPH oxidase: effects of mild mitochondrial dysfunction on angiotensin II mediated increase in NOX isoform expression and activity in vascular smooth muscle cells. *Antioxid Redox Signaling*, 11: 1265-1278, 2009.
- Yang Z, Huang J, Geng J, Nair U, Klionsky DJ. Atg22 recycles amino acids to link the degradative and recycling functions of autophagy. *Mol Biol Cell*, 17(12): 5094-5104, 2006.
- Yankovskaya V, Horsefield R, Törnroth S, Luna-Chavez C, Miyoshi H, Léger C, Byrne B, Cecchini G, Iwata S. Architecture of succinate dehydrogenase and reactive oxygen species generation. *Science*, 299: 700–704, 2003.
- Yasukawa K. Blood donor screening for *Trypanosoma cruzi* infection in Japan. *Transfusion*, 54: 745-746, 2014.
- Yeo M, Mauricio IL, Messenger LA, Lewis MD, Llewellyn MS, Acosta N, Bhattacharyya T, Diosque P, Carrasco HJ, Miles MA. Multilocus sequence typing (MLST) for lineage assignment and high resolution diversity studies in *Trypanosoma cruzi*. *PLoS Negl Trop Dis*, 5(6): e1049, 2011.
- Yorimitsu T, Klionsky DJ. Autophagy: molecular machinery for self-eating. *Cell Death Differ*, 12 (Suppl 2): 1542-1552, 2005.
- Yoshida N. Molecular mechanisms of *Trypanosoma cruzi* infection by oral route. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 1:101-107, 2009.
- Zhao H, Kalivendi S, Zhang H, Joseph J, Nithipatikom K, Vásquez-Vivar J, Kalyanaraman B. Superoxide reacts with hydroethidine but forms a fluorescent product that is distinctly different from ethidium: potential implications in intracellular fluorescence detection of superoxide. *Free Radic Biol Med*. 34:1359-68, 2003.

- Zhao Z, Lindsay ME, Roy Chowdhury A, Robinson DR, Englund PT. p166, a link between the trypanosome mitochondrial DNA and flagellum, mediates genome segregation. *EMBO J*, 27 (1): 143-154, 2008.
- Zíková A, Panigrahi AK, Uboldi AD, Dalley RA, Handman E, Stuart K. Structural and functional association of *Trypanosoma brucei* MIX protein with cytochrome c oxidase complex. *Eukaryot Cell*, 7: 1994–2003, 2008.
- Zingales B, Miles MA, Campbell, DA, Tibayrenc M, Macedo AM, Teixeira MM, Schijman AG, Llewellyn MS, Lages-Silva E, Machado CR, Andrade SG, Sturm NR. The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: rationale, epidemiological relevance and research applications. *Infect Genet Evol*, 12: 240-253, 2012.