

RESSALVA

Atendendo solicitação da autora,
o texto completo desta tese será
disponibilizado somente a partir
de 8/1/2026



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de São José do Rio Preto



Kelly Cristine Borsatto

**Análise da Interação Parasito-Vetor da Doença de Chagas
– Perfil Metabólico –**

São José do Rio Preto

2024

Kelly Cristine Borsatto

**Análise da Interação Parasito-Vetor da Doença de Chagas
– Perfil Metabólico –**

Tese apresentada ao Programa de Pós- Graduação em Microbiologia, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas –UNESP, Campus de São José do Rio Preto, como requisito para a obtenção do título de Doutora em Microbiologia.

Orientador: Prof. Dr. Raghuvir Krishnaswamy Arni
Coorientador: Prof. Dr. Kaio Cesar Chaboli Alevi
Coorientadora: Dra. Mônica Aparecida Coronado
Agência financiadora: CAPES e FAPESP
(2018/25458-3)

São José do Rio Preto

2024

B738a

Borsatto, Kelly Cristine

Análise da Interação Parasito-Vetor da Doença de Chagas – Perfil Metabólico – / Kelly Cristine Borsatto. -- São José do Rio Preto, 2024
118 p.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp),
Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio
Preto

Orientador: Raghuvir Krishnaswamy Arni

Coorientador: Kaio Cesar Chaboli Alevi

1. Triatominae. 2. Metabolômica. 3. Doença de Chagas. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

Kelly Cristine Borsatto

**Análise da Interação Parasito-Vetor da Doença de Chagas
– Perfil Metabólico –**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas – UNESP, Campus de São José do Rio Preto, como requisito para a obtenção do título de Doutora em Microbiologia.

Comissão examinadora

Prof. Dr. Kaio Cesar Chaboli Alevi
IOC/FIOCRUZ
Coorientador

Prof. Dr. Danilo Grunig Humberto da Silva
UFMS

Prof. Dr. Cleber Galvão Ferreira
IOC/FIOCRUZ

Prof. Dr. Jader de Oliveira
FSP/USP

Profª. Dra. Silvana Aparecida Rocco,
LNBio, CNPEM

São José do Rio Preto

08 de janeiro de 2024

Dedicatória

Pelas inúmeras horas de trabalho duro, as noites sem dormir e a persistência que nunca me deixou, dedico esta tese a mim mesma. Agradeço os momentos em que poderia ter desistido, mas optei por seguir em frente. Aprecio a coragem que descobri ter, que me permitiu sair da zona de conforto e buscar a excelência. Esta dedicatória é um lembrete de que a busca dos meus sonhos e objetivos não envolve apenas o resultado final, mas toda a jornada que me levou até ele.

Com esta dedicatória eu celebro a pessoa que me tornei e o crescimento que alcancei através de cada obstáculo durante essa jornada. Sigo acreditando que sou merecedora de todo sucesso, de cada conquista e de cada momento de alegria que meu trabalho trouxe/trará. Nunca desistirei de buscar meus sonhos, ser minha maior defensora, inspiração e, sobretudo, meu apoio inabalável.

Que essa dedicatória não mostre apenas a mim, mas a todos, que podemos ser sempre inspirados pela nossa própria força e, principalmente, que ela nos impulse para os mais belos caminhos que o destino nos reserva.

Agradecimentos

Ao meu orientador Prof. Dr. Raghuvir Krishnaswamy Arni, e meus coorientadores, Prof. Dr. Kaio Cesar Chaboli Alevi e Dra. Mônica Aparecida Coronado, pelas manifestações de incondicional apoio e disponibilidade, pela compreensão, pelo aconselhamento assertivo e pelo estímulo permanente que muito contribuíram para essa etapa da minha formação.

Gostaria de expressar minha profunda gratidão a Profa. Dra. Ljubica Tasic, por sua contribuição substancial ao meu projeto de doutorado. Sua generosidade ao ceder infraestrutura, tempo e equipe foi fundamental para o desenvolvimento do projeto. Sem o seu apoio dedicado, este trabalho não teria sido possível. Muito obrigado pela sua valiosa colaboração.

Minha gratidão ao Prof. Dr. João Aristeu da Rosa por ceder a infraestrutura do insetário e do seu laboratório para o desenvolvimento do meu projeto. Sua colaboração foi fundamental e tornou possível a realização deste trabalho. Muito obrigado pelo seu apoio.

Aos meus colaboradores Dr. Jader de Oliveira, Dr. Raphael Eberle, Erik Sobrinho Braga, Thyerre Santana da Costa, Gonzalo Garcia Delgado e Carolina Gismene, pela substancial contribuição com o projeto desenvolvido, por todo suporte técnico oferecido e por todo conhecimento agregado. A contribuição de vocês foi imprescindível para a execução desse trabalho e para essa etapa da minha formação. Sem o apoio de vocês não seria possível.

Quero expressar minha profunda gratidão ao meu colaborador, Lucas Gelain Martins, pela significativa contribuição no desenvolvimento do projeto. Seu tempo e conhecimento compartilhados foram essenciais para o sucesso desta empreitada. Um agradecimento especial à Rafaela dos Santos Peinado, cujo caminho cruzou o meu na graduação, mas foi no doutorado que nosso vínculo se estreitou. Juntas, enfrentamos essa etapa, sempre ajudando uma a outra, compartilhando conhecimentos e superando as angústias e dificuldades desta jornada desafiadora. Foi verdadeiramente um prazer ter você ao meu lado.

Ao Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas (IBILCE/UNESP), seus docentes e funcionários, que desde 2014, quando ingressei no curso de graduação em Ciências Biológicas, me acompanham na minha jornada acadêmica e que contribuíram para me tornar a bióloga que sou hoje. Ao Instituto de Química da UNICAMP e ao Laboratório de Parasitologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP de Araraquara, por terem cedido infraestrutura, apoio técnico/científico e amparo metodológico para execução do projeto.

O Presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de

Pessoal de Nivel Superior – Brasil – (CAPES) – Código de Financiamento 001 e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela Bolsa de Doutorado (Processo 2018/25458-3) concedida, que possibilitaram a realização desta tese.

Agradeço aos meus pais que sempre priorizaram a minha educação. Obrigado Sr. Dejaime Borsatto e Dona Neiva Borsatto por, além de me oferecerem a oportunidade de estudar, sempre respeitaram minhas escolhas, me ensinaram amor, carinho, respeito e honestidade, e por sempre estarem ao meu lado. Ao meu irmão Matheus Borsatto por ser um ser humano tão incrível, acreditar em mim e estar ao meu lado sempre.

Agradeço os meus amigos, Mayara G. Ferraz, Henrique M. M. Gimenes, Nicoli Rodrigues, Sara Lima, Vinícius Gobbe, Luiz Otávio Maia, Gabriela Faria, Gabriela Harano, Karina Guimarães, Pedro Henrique, Danilo Grünig e Joyce por estarem ao meu lado na vida. Eu acredito que os amigos são a família que escolhemos e vocês são os melhores. Essa etapa foi mais leve com vocês ao meu lado. Agradeço de forma especial ao Kaio Cesar Chaboli Alevi, que além de meu coorientador é um grande amigo. Foi ele quem me introduziu à ciência, conhece profundamente meu percurso, e, diante dos desafios encontrados, esteve ao meu lado, ajudando-me a manter firme e concluir essa etapa. Sua amizade e apoio foram inestimáveis.

A saúde física e mental devem ser uma prioridade na vida de todos, assim as atividades que nos propomos a desenvolver podem ser desempenhadas com estabilidade e equilíbrio. Dessa forma, agradeço ao meu psiquiatra Dr. Marcos Uzelac, minhas psicólogas Dra. Thaissa e Marcela, minha neurologista Dra. Marina Pozzo e ao meu treinador pessoal Lucas Gonçalves, que me ajudaram nos momentos mais difíceis, que não foram raros nesses últimos anos, sempre me auxiliando e me ensinando a manter o equilíbrio para alcançar a estabilidade necessária para passar por essa etapa da minha vida.

E, acima de tudo, quero dedicar um agradecimento especial ao meu marido Tomás Fialho e aos meus leais filhos de quatro patas, Theodoro e Bartolomeu. Especialmente ao meu marido, cuja presença é constante e incondicional, nos momentos mais desafiadores em que a tentação de desistir era intensa, ele não apenas me impediu de desistir, mas também cultivou em mim a crença de que alcançaria o término desta difícil, porém incrivelmente gratificante, jornada. Agradeço por cada demonstração de carinho, resiliência, respeito e compreensão ao longo destes últimos anos.

***“É preciso que eu suporte duas ou três larvas se quiser conhecer as
borboletas.”***

Saint-Exupéry, A. 1966, p.34

Resumo

Os organismos vivos possuem a capacidade de responder a vários sinais intra e extracelulares, o que, por sua vez, cria uma variedade de metabólitos na “sopa” celular. A metabolômica – ciência que lida com a identificação e quantificação de metabólitos num sistema biológico sob um conjunto de condições – está ganhando reconhecimento como uma ferramenta poderosa que ajuda a compreender o efeito de vários fatores de stress e condições ambientais sobre o metaboloma de um determinado sistema biológico. A metabolômica baseada em Ressonância Magnética Nuclear (RMN) está sendo usada em diferentes áreas, incluindo biologia de doenças, medicina, farmácia, toxicologia, alimentos, ciências ambientais, entre outras, contribuindo com uma melhor compreensão de conjuntos de metabólitos de interesse. Além disso, a RMN é aplicada para obter a impressão digital metabólica associada a diferentes sistemas biológicos. Dessa forma, o trabalho realizado neste doutorado se concentrou na análise metabólica do TG de *Triatoma infestans*, um dos mais importantes vetores do protozoário *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico da doença de Chagas (DC). De forma geral, considera-se que este parasito não apresenta patogenicidade aos hospedeiros invertebrados (triatomíneos); no entanto, existem estudos que relatam efeitos negativos causados pela infecção. Assim, neste estudo, abordamos a importância de compreender a relação entre parasito e vetor na DC, por meio da análise comparada do metaboloma do sistema gastrointestinal de exemplares de *T. infestans* infectados e sem infecção pelo *T. cruzi*, por RMN. Identificamos 22 metabólitos, destacando sete (isoleucina, lisina, prolina, colina, betaina, acetato e glicose) como estatisticamente significantes na distinção entre os dois grupos (infectados e sem infecção). Discutimos as implicações fisiológicas desses metabólitos, considerando sua possível relação com fatores epidemiológicos e a interação entre o protozoário e o vetor. Embora nossos achados sugiram alterações no metabolismo do vetor induzidas pela presença do *T. cruzi*, ressaltamos a necessidade de estudos adicionais para determinar se essas mudanças afetam negativamente o inseto. A escassez de dados na literatura sobre o metabolismo do vetor e a interação parasito-vetor destaca a importância de uma compreensão mais aprofundada desses processos, fornecendo *insights* para o desenvolvimento de estratégias de controle de vetores e, por conseguinte, da transmissão da DC.

Palavras-chave: Triatominae. Metabolômica. Doença de Chagas

Summary

Living organisms can respond to various intra- and extracellular signals, which, in turn, create a variety of metabolites in the cellular "soup". Metabolomics – the science that deals with the identification and quantification of metabolites in a biological system under a set of conditions – is gaining recognition as a powerful tool that helps understand the effect of various stress factors and environmental conditions on the metabolome of a given biological system. Metabolomics based on Nuclear Magnetic Resonance (NMR) is being used in different areas, including disease biology, medicine, pharmacy, toxicology, food, environmental sciences, among others, contributing to a better understanding of sets of metabolites of interest. Furthermore, NMR is applied to obtain the metabolic fingerprint associated with different biological systems. Therefore, the work carried out in this doctorate focused on the metabolic analysis of the TG of *Triatoma infestans*, one of the most important vectors of the protozoan *Trypanosoma cruzi*, the etiological agent of Chagas disease (CD). In general, it is considered that this parasite is not pathogenic to invertebrate hosts (triatomines); however, there are studies that report negative effects caused by the infection. Thus, in this study, we address the importance of understanding the relationship between parasite and vector in CD, through comparative analysis of the metabolome of the gastrointestinal system of specimens of *T. infestans* infected and without *T. cruzi* infection, by NMR. We identified 22 metabolites, highlighting seven (isoleucine, lysine, proline, choline, betaine, acetate and glucose) as statistically significant in distinguishing between the two groups (infected and without infection). We discuss the physiological implications of these metabolites, considering their possible relationship with epidemiological factors and the interaction between the protozoan and the vector. Although our findings suggest changes in the vector's metabolism induced by the presence of *T. cruzi*, we highlight the need for additional studies to determine whether these changes negatively affect the insect. The scarcity of data in the literature on vector metabolism and parasite-vector interaction highlights the importance of a more in-depth understanding of these processes, providing insights for the development of vector control strategies and, therefore, CD transmission.

Keywords: Triatominae. Metabolomics. Chagas disease

Sumário

1. INTRODUÇÃO	12
1.1 Insetos	13
1.2 Metabolômica: uma breve introdução	14
1.3 Fluxo de trabalho	16
1.4 Espectroscopia de ^1H -RMN	17
1.5 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear bidimensional (2D)	20
1.5.1 COSY ^1H - ^1H	22
1.5.2 TOCSY ^1H - ^1H	23
1.5.3 HSQC ^1H - ^{13}C	24
1.6 Ressonância Magnética Nuclear com sonda HR-MAS (<i>High Resolution Magic Angle Spinning</i>), para análise de semissólidos	26
1.7 Quimiometria	26
2. OBJETIVOS	28
2.1 Objetivo Geral	28
2.2 Objetivos específicos	28
3. MATERIAIS E MÉTODOS	28
3.1 Obtenção e procedência dos insetos	28
3.2 Insetos sem infecção	28
3.3 Insetos infectados	30
3.4 Dissecção dos insetos	30
3.5 Preparação das amostras de <i>T. cruzi</i> para os estudos por RMN	30
3.6 Coleta de dados em RMN	31
3.7 Processamentos dos dados	33
3.8 Análises Estatísticas e Quimiométricas	33
3.9 Identificação dos metabólitos	34
4. RESULTADOS	35
4.1 Perfil global de metabólitos usando espectroscopia de RMN	35
4.2 Análises Estatísticas e Quimiométricas	39
5. DISCUSSÃO	45
6. CONCLUSÃO	54
Referências	55
Apêndice	64

1. INTRODUÇÃO

A doença de Chagas (DC) é uma das 20 Doenças Tropicais Negligenciadas (DTN) listadas pela Organização Mundial da Saúde (OMS) (WHO, 2023). Estima-se que sete milhões de pessoas estejam infectadas pelo *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909) (Kinetoplastida, Trypanosomatidae) em todo o mundo, principalmente na América Latina (WHO, 2023). Além disso, pressupõe-se que mais de 10 mil pessoas morram, todos os anos, de manifestações clínicas (WHO, 2023), e cerca de 70 milhões de pessoas vivam em área de risco (GUHL; RAMÍREZ, 2021; DE FUENTES-VICENTE et al., 2023; MARTÍN-ESCOLANO et al., 2022; WHO, 2023). Embora a DC seja endêmica de 21 países latino-americanos (DNDI, 2023), essa moléstia já foi relatada em áreas não endêmicas, como Canadá, Estados Unidos, Japão, Austrália, Nova Zelândia, Suíça, Itália e Espanha (SORIANO-ARANDES et al., 2016).

O protozoário *T. cruzi* é o agente etiológico responsável por esta doença (HOTEZ et al., 2007; WHO, 2023), sendo a principal forma de transmissão por meio das fezes e/ou urina de triatomíneos, pois esses insetos possuem o hábito de defecar durante ou após o repasto sanguíneo e, uma vez infectados pelo *T. cruzi*, podem liberar o parasito sobre a pele do hospedeiro (ALEVI et al., 2021; GIL-SANTANA et al., 2022; OLIVEIRA CORREIA et al., 2022; TÉLLEZ-RENDÓN et al., 2023; ZHAO et al., 2023). Porém, a transmissão pode ocorrer por diversas outras vias, incluindo transmissão oral via alimentos contaminados com o parasito, transfusão de sangue de doadores infectados, transmissão vertical (transplacentária ou durante a amamentação), transplantes de órgãos de doadores chagásicos e, até mesmo, por acidentes laboratoriais (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2006; JACKSON et al., 2010; BERN; MARTIN; GILMAN, 2011; SHIKANAI-YASUDA; CARVALHO, 2012).

O ciclo de vida do *T. cruzi* é complexo e constituído por diferentes fases que acontecem ora nos triatomíneos (vetores), ora nos vertebrados que atuam como hospedeiros/reservatórios (de forma geral, mamíferos) (TYLER; ENGMAN, 2001; BERN, 2015; BARISÓN et al., 2017). Durante o repasto sanguíneo em mamíferos infectados, os insetos ingerem as formas tripomastigotas que passam por uma sequência de transformações ao longo do trato gastrointestinal (TG) do inseto: no estômago, a maioria dos tripomastigotas (forma presente no sangue dos vertebrados) se diferencia em epimastigotas (principal estágio de replicação) e esferomastigotas. Após a passagem para o intestino delgado e reto, os epimastigotas se dividem repetidas vezes e, na porção final do sistema digestório, se transformam em

tripomastigotas metacíclicos (forma infectante para os hospedeiros) que são eliminados nas fezes dos insetos durante o repasto sanguíneo (GARCIA et al., 2010).

Os únicos tratamentos disponíveis para a doença são os antitripanosomatódeos Benznidazol e Nifurtimox, que só são eficazes na fase aguda da doença (HASSLOCHER-MORENO et al., 2012; CRESPILO-ANDÚJAR et al., 2022). A criação de novas abordagens medicinais para o tratamento da DC tem enfrentado muitos desafios. A complexidade da biologia da infecção, a complexidade da patologia e a natureza de longo prazo da doença são as principais barreiras para o desenvolvimento de novos tratamentos (MILES et al., 1981; BERN, 2015; MESSENGER; MILES; BERN, 2015; MARTÍN-ESCOLANO et al., 2022). Consequentemente, o controle vetorial é considerado a estratégia mais eficiente para combater a DC (WHO, 2023). Entretanto, o controle dos vetores apresenta vários obstáculos, pois os triatomíneos apresentam ampla distribuição geográfica, alto grau de domiciliação de algumas espécies e variações significativas entre vetores em termos de morfologia, fisiologia e genética (o que reflete em diferenças na capacidade e competência vetorial e resulta em resistência à inseticidas) (MESSENGER; MILES; BERN, 2015; DE FUENTES-VICENTE et al., 2023). Além disso, os desafios de implantar uma vigilância epidemiológica eficaz, que possua uma cobertura espacial e populacional adequada e que atue na detecção de novos casos de incidência e reincidência dos triatomíneos são as principais barreiras ao controle desse vetor (DE ARIAS et al., 2022).

1.1 Insetos

Atualmente, existem 160 espécies descritas na subfamília Triatominae (157 espécies existentes e três fósseis), agrupadas em 18 gêneros e cinco tribos (ALEVI et al., 2021; GIL-SANTANA et al., 2022; OLIVEIRA CORREIA et al., 2022; TÉLLEZ-RENDÓN et al., 2023; ZHAO et al., 2023). *Triatoma infestans* (Klug, 1834), *T. brasiliensis* Neiva, 1911, *T. pseudomaculata* Corrêa & Espínola, 1964, *T. sordida* (Stål, 1859) e *Panstrongylus megistus* (Burmeister, 1835), apresentam maiores competências vetoriais no Brasil (GALVÃO, 2014). No entanto, todos os triatomíneos, de ambos os sexos e em qualquer fase do desenvolvimento após a eclosão (N1, N2, N3, N4, N5 e adultos), são considerados como potenciais vetores da DC. Entre as espécies descritas, *T. infestans* é considerado um dos principais vetores, principalmente devido às suas características biológicas, tais como o alto grau de antropofilia, adaptação ao ambiente domiciliar, capacidade de suportar longos períodos em jejum e apresentar uma ampla distribuição, tornando-o um grande problema de saúde pública (DUJARDIN; SCHOFIELD; TIBAYRENC, 1998).

Após ações de controle realizadas pela Iniciativa do Cone Sul em que Argentina, Bolívia, Brasil, Chile, Paraguai e Uruguai uniram esforços para a eliminação do principal vetor na América do Sul, *T. infestans* teve sua distribuição reduzida (DIAS; SCHOFIELD, 1999). No entanto, essa espécie se tornou motivo de preocupação novamente devido aos relatos de reinfestação na Argentina, Bolívia e Paraguai (GÜRTLER et al., 2007) evidenciando a dificuldade do controle vetorial dessa espécie, principalmente devido a sua ampla extensão em áreas endêmicas e à dificuldade de implementar uma vigilância epidemiológica eficiente, a fim de evitar a recuperação de populações de insetos previamente tratados com inseticidas (PÉREZ DE ROSAS et al., 2013). Todavia, essa espécie ainda mantém sua importância epidemiológica devido à sua grande capacidade de adaptação ao meio domiciliar e peridomiciliar e, sendo deste modo, um importante vetor do protozoário *T. cruzi* (DUJARDIN; SCHOFIELD; TIBAYRENC, 1998).

De maneira geral, considera-se que o protozoário *T. cruzi* não apresenta patogenicidade aos hospedeiros invertebrados (triatomíneos) (DE OLIVEIRA et al., 2018). No entanto existem estudos que relatam efeitos negativos causados pela infecção, como, por exemplo: menor taxa de oviposição (3,5 vezes menor que em fêmeas sem infecção), de fertilidade e de eclosão dos ovos em *P. megistus* contaminados com o *T. cruzi* (LIMA et al., 1992). Além disso, foram observados tanto prejuízos no desempenho reprodutivo de *Rhodnius prolixus* Stål, 1859 – os quais podem reduzir o *fitness* do inseto e trazer consequências para a sua sobrevivência (FELLET et al., 2014) –, como alterações nos aspectos comportamentais em *Mepraia spinolai* (Porter, 1934) – como a diminuição do tempo entre a alimentação e a defecação, podendo influenciar diretamente na capacidade vetorial (BOTTO-MAHAN; CATTAN; MEDEL, 2006). Nesse contexto, é importante ressaltar que os vetores são comumente explorados pelos parasitos, e conhecer a relação entre eles, é um passo importante para a epidemiologia da DC (ELLIOT et al., 2015).

1.2 Metabolômica: uma breve introdução

A metabolômica é uma das ciências 'ômicas' que tem se expandido rapidamente na era pós genômica, possibilitando o estudo de perfis de metabólitos em um sistema (célula, tecido, organismo ou fluido biológico) em uma determinada condição (ROCHFORD, 2005). Os metabólitos não são apenas o produto da expressão gênica, eles são o resultado da interação do genoma de um determinado sistema biológico com o seu ambiente e servem como assinaturas diretas da atividade bioquímica de um organismo, sendo assim, são mais fáceis de correlacionar com o fenótipo (GOODACRE et al., 2004; ROCHFORD, 2005; SNART;

HARDY; BARRETT, 2015). Nesse contexto, a metabolômica tornou-se uma abordagem poderosa que tem sido amplamente adotada, uma vez que fornece informações do fenótipo metabólico funcional, detectando o metaboloma completo de um tecido ou organismo sob uma determinada condição (PATTI; YANES; SIUZDAK, 2012; SNART; HARDY; BARRETT, 2015).

As estratégias para estudos com metabolômica foram divididas em duas abordagens distintas, metabolômica não direcionada e metabolômica direcionada (ALONSO; MARSAL; JULIÃ, 2015), cada uma com suas próprias vantagens e desvantagens, ambas muitas vezes utilizadas em combinação para obter informações mais precisas. A metabolômica não direcionada tem o objetivo de medir o maior número possível de metabólitos em uma amostra, permitindo uma análise abrangente de todos os metabólitos mensuráveis na amostra em estudo (PATTI; YANES; SIUZDAK, 2012; ROBERTS et al., 2012). Os metabólitos observados pela estratégia não direcionada requerem uma identificação minuciosa usando metodologias analíticas adequadas. Essa estratégia permite a descoberta de novos alvos como biomarcadores, pois a cobertura do metaboloma é ampla, entretanto, os principais desafios dessa abordagem estão nos protocolos para preparação das amostras, geração de grandes quantidades de dados, além das dificuldades em identificar e caracterizar os metabólitos encontrados (GOODACRE et al., 2004; ROBERTS et al., 2012; ALONSO; MARSAL; JULIÃ, 2015).

A metabolômica direcionada tem como propósito a medição de conjuntos predefinidos de metabólitos com alto nível de precisão e exatidão, utilizando experimentos baseados em hipóteses bioquímicas específicas que visam identificar ou estudar uma ou mais vias em particular (GOODACRE et al., 2004; PUTRI et al., 2013). Com essa estratégia, a preparação de amostras pode ser otimizada, uma vez que todas as espécies analisadas estão claramente definidas, é possível reduzir a dominância de outras moléculas que poderiam estar presentes nas amostras (ROBERTS et al., 2012; PUTRI et al., 2013).

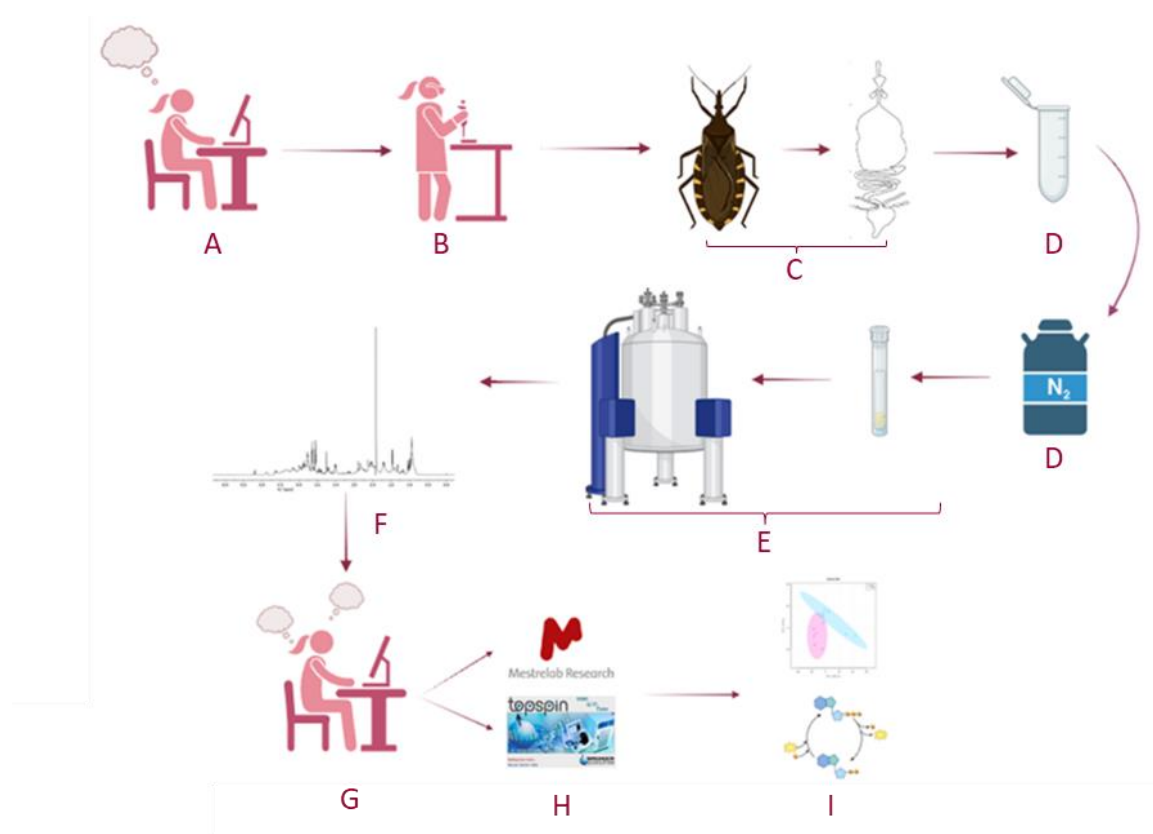
Na entomologia, o uso das técnicas metabolômicas ainda é pouco difundida e tem sido utilizadas para trazer uma variedade de aspectos da biologia dos insetos, incluindo comportamento, infecção, respostas ao estresse térmico, simbiose, etc (SNART; HARDY; BARRETT, 2015). Entretanto, as informações sobre o papel dos metabólitos na regulação do comportamento e dos fenótipos dos insetos permanecem escassas (SNART; HARDY; BARRETT, 2015). Na subfamília Triatominae, os estudos metabolômicos são restritos. A análise do metaboloma fecal de *R. prolixus*, *T. infestans* e *P. megistus* foi realizada e revelou grupos de metabólitos constantes entre as espécies e outros que variam entre elas (ANTUNES

et al., 2013). Recentemente, Eberhard et al. (2021) realizaram um estudo metabolômico do intestino com a proposta de prever a infecção por *T.cruzi*. Os autores observaram uma grande proporção de lipídios e moléculas lipídicas que desempenham um papel importante na regulação do processo metabólico fundamental, e o modelo estatístico utilizado sugeriu que as diferenças observadas no metaboloma do inseto poderiam ser usadas para determinar se ele foi ou não exposto ao parasito (EBERHARD et al., 2021).

1.3 Fluxo de trabalho

Independentemente do campo de aplicação, as investigações metabolômicas precisam seguir um fluxo de trabalho específico e sistemático para alcançar resultados apropriados e confiáveis. O fluxo de trabalho envolvido na obtenção da impressão digital (*fingerprint*) metabolômica do sistema biológico em estudo está apresentado na Figura 1. O primeiro e mais importante passo é a formulação de uma hipótese ou problema biológico a ser resolvido pela metabolômica, seguido pela configuração do projeto experimental em que a amostra em questão é coletada e processada para extrair os metabólitos. Os métodos de extração precisam ser padronizados para cobrir o máximo de metabólitos que podem ser obtidos de uma amostra. Em sequência, os metabólitos extraídos serão analisados usando técnicas que os separam, identificam e quantificam. Isto, por sua vez, leva à geração de grandes conjuntos de dados, que são curados e depois analisados manualmente ou por pacotes de software pré-concebidos, seguidos de processamento rigoroso dos dados e análise.

Figura 1. Fluxo de trabalho envolvido na obtenção de dados metabolômicos de um sistema biológico. A: estruturação do projeto e formulação da hipótese; B: manutenção dos insetos e das cepas de *T. cruzi*; C: Dissecção do *T. infestans* e extração do sistema gastrointestinal; D: armazenamento do material em nitrogênio líquido; E: coleta de dados em aparelho de RMN; F: processamento de dados; G: análise dos dados; H: análise estatística; I: análise dos metabólitos.



Fonte: Autoria própria gerada pelo BioRender.

1.4 Espectroscopia de ^1H -RMN

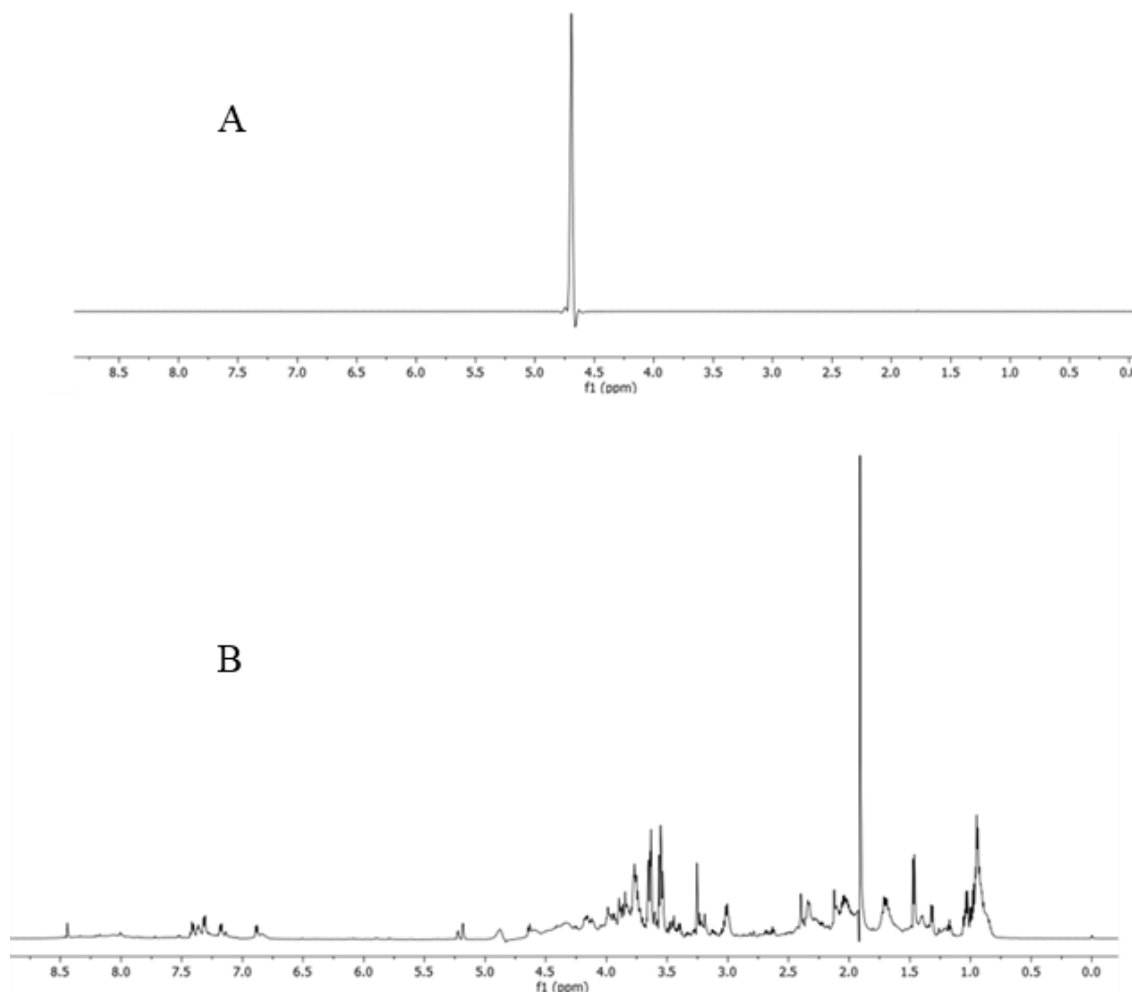
A espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) desempenha um papel crucial nos estudos metabolômicos, oferecendo informações valiosas sobre a composição e estrutura das moléculas presentes nas amostras biológicas. Dentre as técnicas analíticas empregadas nos estudos metabolômicos, a RMN e a espectrometria de massa (EM) se destacam como as mais difundidas (EMWAS, 2015). Nos últimos anos, o uso da RMN nesses estudos tem crescido devido às suas vantagens em relação à EM. Quando comparada a EM, a RMN é uma técnica não destrutiva, permitindo a preservação das amostras durante a análise. Além disso, os metabólitos podem ser quantificados sem a necessidade de adicionar padrões,

e as amostras para análise por RMN requerem pouca ou nenhuma separação cromatográfica, reduzindo o tempo de preparação. A facilidade de identificação de novos compostos é outra vantagem significativa da RMN (EMWAS et al., 2019).

Fundamentalmente, a RMN baseia-se na interação entre ondas de radiofrequência e spins nucleares na presença de um campo magnético externo (B_0). O núcleo mais comumente observado é o do hidrogênio-1 (^1H), devido à sua alta sensibilidade na detecção. Além do ^1H , outros núcleos como ^{13}C , ^{14}N , ^{15}N , ^{18}O e ^{31}P também são observáveis por RMN (MARTINS et al., 2015). Quando um campo magnético externo age sobre os núcleos, eles podem se orientar a favor ou contra o campo, gerando estados de energia diferentes. A diferença entre esses estados gera uma magnetização resultante, detectada como *free induction decay* (FID), que é processado através da Transformada de Fourier para gerar o espectro de RMN.

Na metabolômica baseada em RMN, a supressão de solventes é um dos importantes aspectos que tem o maior impacto na qualidade do espectro em geral. Assim, a supressão de solvente é necessária durante a medição, devido ao grande sinal de água, evitando assim sobreposição de sinais e distorções de linha de base. Em amostras biológicas a água se encontra muito presente, isso faz com que um grande pico seja visto no espectro de RMN, por isso esse sinal precisa ser suprimido para que os componentes restantes possam ser observados, para isso; utiliza-se um experimento com uma sequência de pulso denominada *noesygppr1d* que vai suprimir o sinal da água no espectro e permitir que os metabólitos sejam observados (Figura 2). Os esquemas de supressão de água mais comumente usados em metabolômica baseada em RMN incluem: 1) pré-saturação simples, onde é usado radiofrequência fraca para saturar a ressonância da água durante o atraso de relaxamento; 2) espectroscopia de efeito overhauser nuclear 1-D (NOESY), pré-saturação com gradientes (*noesygppr1d*); 3) supressão de água por WATERGATE, que usa excitação adaptada ao gradiente (SINGH et al., 2023) e para supressão de água. Entre estes, *noesygppr1d* tem sido amplamente utilizado para suprimir o sinal de água de forma eficiente em caso de amostras biológicas.

Figura 2. A: Espectro de RMN de ^1H (600 MHz, D_2O) de uma amostra de *Corynebacterium pseudotuberculosis*. Espectro adquirido utilizando a sequência de pulsos zg, B: Espectro de RMN de ^1H (600 MHz, D_2O) de uma amostra de *C. pseudotuberculosis*. Espectro adquirido utilizando a sequência de pulsos *noesygppr1d*. Ambos os espectros foram obtidos no espectrômetro de RMN Bruker Avance III 600 MHz.



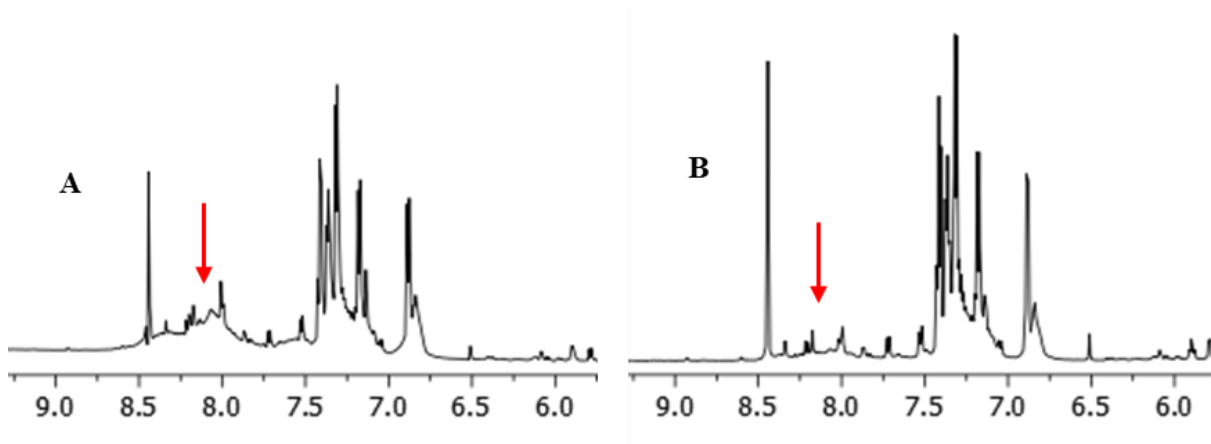
Fonte: Autoria própria obtida com o software MestreNova.

Outro importante experimento 1D comumente usado em metabolômica de RMN é editado por T_2 , o CPMG (*Carr-Purcell-Meiboom-Gill Sequence*) (CARR; PURCELL, 1954) que emprega um filtro T_2 para atenuar os sinais amplos de macromoléculas, principalmente proteínas e lipoproteínas, que possuem curto tempo de relaxamento T_2 em comparação com metabólitos de massa molecular menor que 1,2 kDa.

Além do sinal da água, compostos com alta massa molecular apresentam sinais alargados no espectro de RMN. Esses sinais muitas vezes sobrepõem sinais de menor

intensidade, para que esse problema não ocorra, utiliza-se o experimento CPMG. Esse experimento consiste basicamente na aplicação de uma sequência de pulsos que permite que os sinais das proteínas e lipídios aglomerados sejam filtrados virtualmente e, portanto, não irão aparecer no espectro (Figura 3) (CLARIDGE, 2016).

Figura 3. A: Espectro de RMN de ^1H (600 MHz, D_2O) de uma amostra de *C. pseudotuberculosis*. Espectro adquirido utilizando a sequência de pulsos *noesygprr1d*. B: Espectro de RMN de ^1H (600 MHz, D_2O) de uma amostra de *C. pseudotuberculosis*. Observe que a região apontada pela seta em A possui sinais mais alargados e pouco definidos, enquanto em B os sinais são menos alargados e mais definidos devido a filtragem promovida pelo CPMG. Ambos os espectros foram obtidos no espectrômetro de RMN Bruker Avance III 600 MHz.



Fonte: Autoria própria obtida com o software MestreNova.

1.5 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear bidimensional (2D)

A estrutura geral de um experimento bidimensional é sempre a mesma. Um experimento de RMN 2D consiste em preparação, evolução (t_1), mistura e detecção (t_2). A preparação refere-se à excitação dos spins com uma ou uma sequência de vários pulsos após o relaxamento térmico. Durante a evolução, o spin se desenvolve apenas sob a influência do campo magnético estático e possíveis interações entre si. O *mixing period* seguinte é tal que a magnetização transversal é observada no período de detecção final. Ao variar o tempo de mistura, a correlação entre os spins individuais pode ser estimulada, o que pode finalmente ser detectado. Dependendo da seleção da sequência de mistura, diferentes correlações entre os sinais individuais podem ocorrer através de diferentes mecanismos que levam a uma transferência de magnetização. Existem experimentos de correlação que conectam sinais

especialmente adjacentes (NOESY), ligações químicas adjacentes (COSY) ou mesmo todos os sinais de um sistema de spin inteiro (TOCSY).

Ao analisar espectros de RMN com estruturas químicas muito complexas se observa muitas sobreposições dos sinais dos ^1H no espectro de RMN de ^1H , tornando difícil o processo de identificação das moléculas presentes na amostra. Para driblar esse problema e auxiliar na interpretação dos espectros utilizamos técnicas de ressonância magnética bidimensionais (2D) para analisar as correlações e identificar corretamente as moléculas presentes no espectro de RMN. Essa técnica apresenta muitas vantagens, o que permite análises moleculares complexas, correlacionar informações entre diferentes núcleos e é extremamente útil nas mais diversas áreas que aplicam RMN (JANOVICK et al., 2020). Entretanto, sua principal desvantagem está na sua longa duração experimental, a depender do experimento a coleta dos dados pode levar mais de 30 horas.

De uma forma bem simplista, a técnica de RMN 2D consiste em estabelecer uma correlação entre dois spins interconectados, através de uma série de aquisições de NMR 1D. Isso significa que um experimento 2D nada mais é do que uma série de vários experimentos unidimensionais que diferem na duração do tempo evolutivo t_1 . Você pode imaginar os FIDs registrados sucessivamente como uma matriz bidimensional (veja a Figura 10 à esquerda). Na primeira dimensão, todos os FIDs são alinhados de acordo com o seu tempo evolutivo.

Cada um desses pontos t_1 pode ser registrado com um certo número de transientes (número de varreduras/NS). A transformada de Fourier (TF) agora também pode ser aplicada uma após a outra. Se você primeiro transformar a segunda dimensão, obterá a sequência de espectros unidimensionais de acordo com o tempo evolutivo associado (ver Figura 10 no meio) e poderá ver que os sinais na primeira dimensão são modulados. Portanto, é possível também transformar os espectros ao longo da primeira dimensão. Isto resulta então num espectro que consiste em duas dimensões de frequência (Figura 10 à direita).

Na técnica de RMN convencional o espectro é obtido após a TF, que depende de apenas uma variável de tempo. Na técnica de RMN 2D, duas variáveis de tempo são consideradas, o tempo de evolução e o tempo de detecção. Os sistemas de spins evoluem sobre a influência de variáveis de interação e assumem no final deste intervalo um estado particular que depende dessas variáveis e do tempo decorrido t_1 (AUE; BARTHOLDI; ERNST, 1976; SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2019). Após esse tempo, os sistemas continuam a se desenvolver, durante esse período a magnetização é detectada em função do tempo t_2 . Um FID é obtido e passa pela transformada de Fourier dando origem a um espectro 2D (AUE; BARTHOLDI; ERNST, 1976; SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE,

2019).

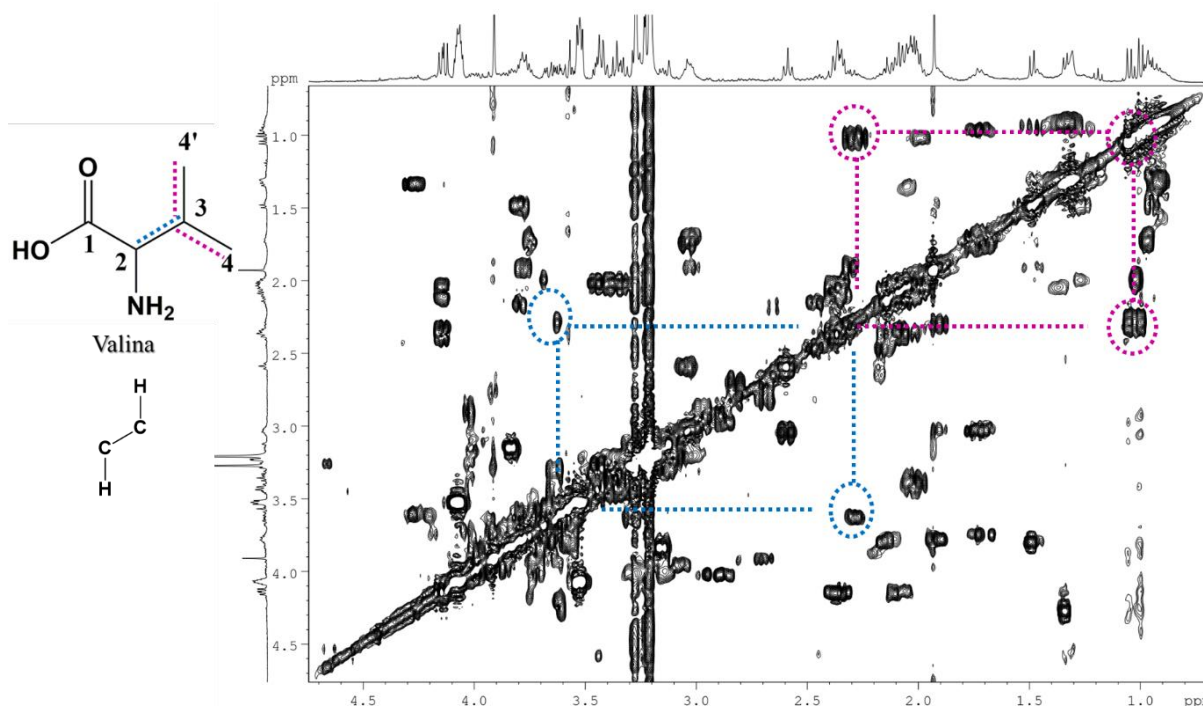
Para este trabalho vamos dar ênfase em três experimentos de correlação: *COSY* ^1H - ^1H (Correlation Spectroscopy), *TOCSY* ^1H - ^1H (Total correlation spectroscopy) e *HSQC* ^1H - ^{13}C (Heteronuclear single quantum coherence).

1.5.1 COSY ^1H - ^1H

A espectroscopia de correlação 2D ^1H - ^1H (COSY) é o experimento mais simples de todos os experimentos de RMN 2D usados para identificar correlações homonucleares entre núcleos ^1H acoplados. Ao analisar o espectro COSY de uma amostra, é possível mapear as interações entre prótons de hidrogênio em diferentes metabólitos, facilitando a identificação e a atribuição de sinais específicos a compostos individuais (AUE; BARTHOLDI; ERNST, 1976; SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2019).

Durante o experimento COSY, prótons com correlações mútuas (geralmente até três ligações) de acoplamento spin-spin são observados e exibidos na forma de picos cruzados no espectro de COSY (Figura 4). Em um espectro COSY os eixos F1(Y) e F2(X) representam os hidrogênios e a diagonal contém as informações 1D. Os picos cruzados que aparecem próximos as diagonais mostram os spins que são acoplados uns aos outros, produzindo um sinal na interseção dos dois valores de frequência (Figura 4).

Figura 4. Espectro de correlação COSY ^1H - ^1H (400 MHz, D_2O) de TG de *T. infestans*. Espectro obtido em equipamento Bruker AVANCE III operado a 400 MHz equipado com uma unidade Bruker MAS II (Magic Angle Spinning) e com sonda HR-MAS (High Resolution Magic Angle Spinning). Na imagem podemos observar os sinais dos hidrogênios presentes na valina que acoplam entre si.



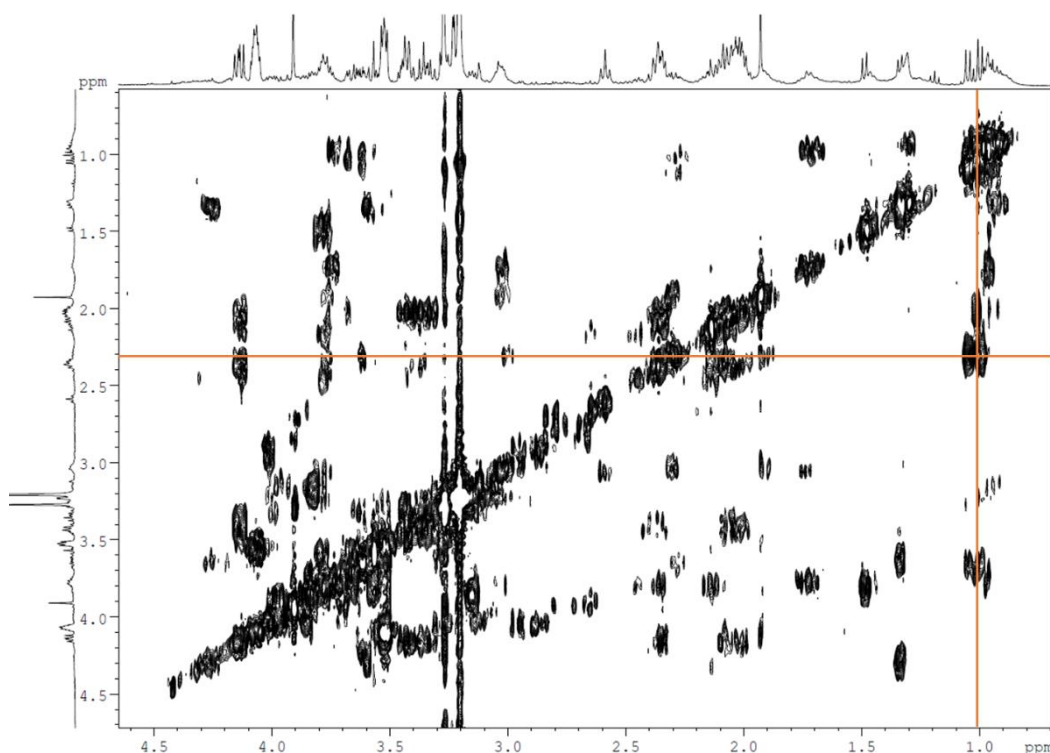
Fonte: Autoria própria obtida com o software MestreNova.

1.5.2 TOCSY ^1H - ^1H

Outra poderosa técnica de espectroscopia de correlação ^1H - ^1H é a Espectroscopia de Correlação Total (TOCSY), também conhecida como experimento homonuclear Hartmann-Hahn (HOHAHA). O experimento TOCSY ^1H - ^1H permite criar correlações entre todos os prótons dentro de um sistema de spin, não apenas entre prótons vizinhos, e são detectados e mostrados no modo 1D ou mais comumente na forma de picos cruzados em 2D. Em um estudo metabolômico, o experimento TOCSY é usado para fornecer a atribuição completa para ressonâncias de prótons de pequenas moléculas, já que todos os prótons correlacionados no mesmo resíduo de um único aminoácido, por exemplo, serão detectados. Essa técnica auxilia na elucidação de estruturas moleculares ao revelar as conexões entre átomos dentro de uma molécula o que é essencial para a identificação correta de compostos, pois muitos metabólitos têm estruturas complexas e, sem a elucidação adequada, a interpretação dos dados

pode ser ambígua (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2019). O aspecto do resultado de um experimento TOCSY é muito semelhante ao COSY, os eixos F1(Y) e F2(X) representam os hidrogênios e a diagonal contém as informações 1D. Entretanto, no COSY os picos cruzados mostram os spins diretamente acoplados, enquanto no TOCSY os picos cruzados não são apenas para spins que estão diretamente acoplados, mas para todos os spins que possuem acoplamento dentro de determinado sistema (Figura 5).

Figura 5. Espectro de correlação TOCSY ^1H - ^1H do TG de *T. infestans*. Espectro obtido em equipamento Bruker AVANCE III operado a 400 MHz equipado com uma unidade Bruker MAS II (Magic Angle Spinning) e com sonda HR-MAS (High Resolution Magic Angle Spinning). As correlações da valina são traçadas com duas linhas laranjas que se cruzam entre o sinal a 1,00 ppm e o sinal a 2,28 ppm (deslocamentos químicos atribuídos à valina).



Fonte: Autoria própria gerada pelo software MestreNova.

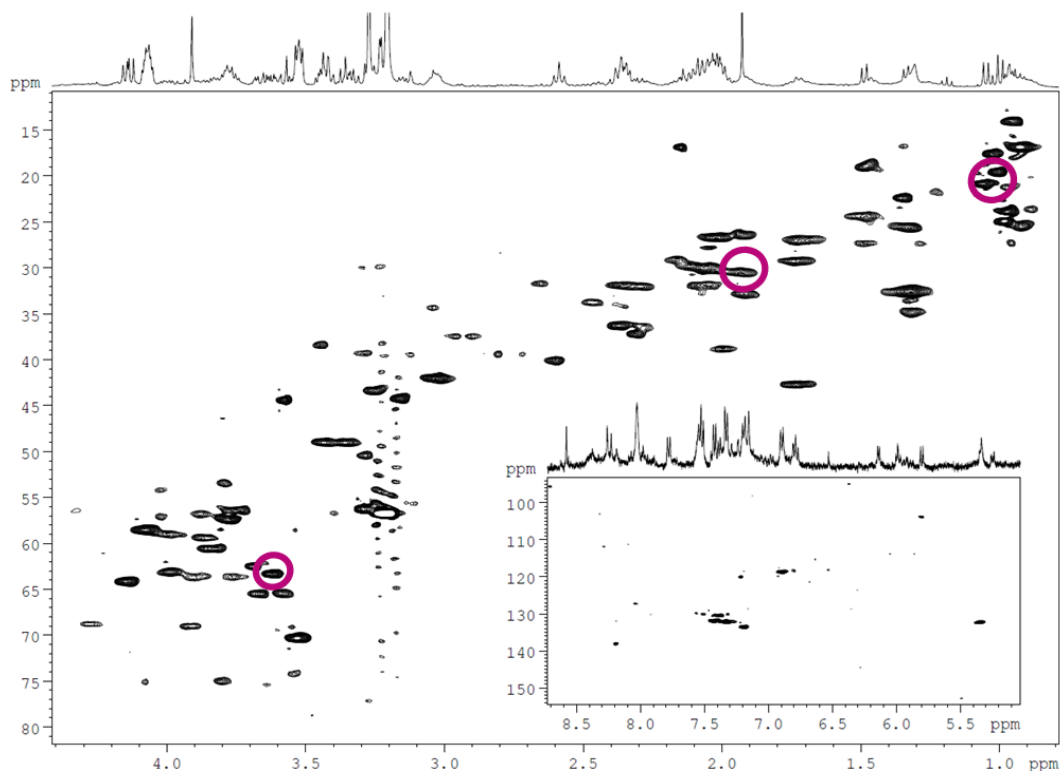
1.5.3 HSQC ^1H - ^{13}C

A espectroscopia de RMN heteronuclear 2D HSQC ^1H - ^{13}C em metabolômica representa uma ferramenta valiosa para resolver e atribuir picos de prótons sobrepostos, especialmente para sinais de metabólitos resultantes de amostras biológicas complexas (MAHROUS; FARAG, 2015). Ao correlacionar os sinais de ^1H e ^{13}C , a HSQC

facilita a distinção entre diferentes tipos de carbono em uma molécula, proporcionando uma visão detalhada da composição química dos metabólitos (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2019). O experimento HSQC fornece a resolução mais alta em comparação com outros experimentos 2D. No entanto, o aumento da resolução está associado a uma redução na sensibilidade, especialmente na abundância natural relativamente baixa de ^{13}C .

HSQC ^1H - ^{13}C permite estabelecer as correlações entre os núcleos ^1H - ^{13}C que estão distantes por uma ligação química (Figura 6). Em um espectro de HSQC ^1H - ^{13}C os carbonos estão ao longo do eixo F1 (Y) e os prótons estão ao longo do eixo F2 (X).

Figura 6. Espectro de correlação HSQC ^1H - ^{13}C do TG de *T. infestans*. Espectro obtido em equipamento Bruker AVANCE III operado a 400 MHz equipado com uma unidade Bruker MAS II (Magic Angle Spinning) e com sonda HR-MAS (High Resolution Magic Angle Spinning). Na imagem podemos observar os sinais dos núcleos de carbono da valina.



Fonte: Autoria própria gerada pelo software TopSpin.

1.6 Ressonância Magnética Nuclear com sonda HR-MAS (*High Resolution Magic Angle Spinning*), para análise de semissólidos

A rotação de ângulo mágico de alta resolução (HRMAS) é uma técnica estabelecida para análise de amostras não homogêneas e semissólidas. Com técnicas padrão de RMN em estado de solução, os espectros de tais amostras sofreriam ressonâncias amplas e não resolvidas. Em amostras no estado líquido, as moléculas estão se movimentando de forma rápida e aleatória. Já em amostras sólidas ou semissólidos as moléculas apresentam orientações espaciais muito bem definidas devido ao ambiente mais compacto. Essas moléculas, quando expostas a um campo magnético intenso irão se comportar de formas distintas, os núcleos de uma molécula de meio sólido ou semissólido não sofrerão reorientação molecular. Devido essa ausência total ou parcial de orientação os sinais obtidos nos espectros de amostras sólidas ou semissólidas são muito amplos (STANISIC et al., 2022)

Após estudos realizados por Andrew et al. (1958) e Lowe (1959), uma metodologia que simula o efeito da reorientação molecular para spins nucleares foi estabelecida para melhorar a resolução dos espectros obtidos. Os estudos mostraram que quando o ângulo (θ) entre o eixo de rotação da amostra e o campo magnético externo (B_0) é de $54,74^\circ$ os resultados são melhores. O ângulo θ ficou conhecido como ângulo mágico e a técnica foi denominada *Magic Angle Spinning* (MAS) (ANDREW; BRADBURY; EADES, 1958; LOWE, 1959).

Posteriormente, por volta de 1990 surgiu a técnica de RMN chamada rotação de ângulo mágico de alta resolução (HR-MAS), essa técnica estendeu as aplicações da RMN de alta resolução para amostras que possuem reorientação molecular limitada, como amostras de semissólidos. O HR-MAS resultou em espectros de RMN de semissólidos com uma resolução espectral tão boa quanto RMN de estado líquido (WONG; LUCAS-TORRES, 2018; STANISIC et al., 2022).

1.7 Quimiometria

Os dados de RMN não são facilmente adequados para análise por métodos quimiométricos. Portanto, esses dados precisam ser transformados em um formato adequado à realização de análises multivariadas. Isso pode ser alcançado por meio de várias etapas: categorização, alinhamento, normalização e dimensionamento.

Quimiometria é uma área da química que utiliza métodos matemáticos, estatísticos e computacionais para aplicar a conjuntos de dados de caráter químico (FERREIRA, 2015). Em

conjuntos de dados multivariados como os dados metabolômicos, se faz necessário o uso de métodos quimiométricos para extrair as informações relacionadas ao objetivo principal do estudo. Dentre esses métodos estão o pré-processamento de dados, análises uni e multivariadas e técnicas de reconhecimento de padrão.

Sendo assim, o conjunto de dados metabolômicos passa inicialmente pela etapa de pré-processamento. Essa etapa pode ser realizada com auxílio de alguns softwares como MestreNova. O pré-processamento consiste em eliminar informações que não sejam relevantes quimicamente ou para o objetivo do estudo nessa etapa são feitos pequenos ajustes no espectro como ajuste de fase para promover uma simetria de todos os picos, ajuste da linha de base para remover artefatos espectrais que podem gerar distorções e referenciamento dos espectros para a identificação de compostos, alinhamento de pico e análises estatísticas (EMWAS et al., 2018). Além disso, uma técnica denominada *binning* também é aplicada a fim de solucionar algum desalinhamento existente e reduzir a dimensão da matriz de dados, com essa técnica os espectros são segmentados em regiões de mesma largura em ppm, denominadas *bins* (ENGELSEN; SAVORANI; RASMUSSEN, 2013). Uma das vantagens importantes do *binning* é que ele evita que as variações dos deslocamentos de RMN afetem o processamento estatístico, desde que tais deslocamentos permaneçam dentro dos limites dos compartimentos correspondentes.

Outra técnica empregada nessa etapa é a normalização, onde os dados coletados são transformados em valores comparáveis (STANISIC et al., 2022). A normalização é utilizada para remover qualquer variação nas intensidades do sinal devido às diluições de cada amostra ou à quantidade de material analisado.

Após o pré-processamento, métodos de análise univariada são realizados, esses métodos são os mais usados para análise exploratória de dados e fornecem uma visão geral preliminar sobre as características potencialmente significativas dentro das condições em estudo. Métodos de análise, como *Fold Change*, *T test* e *Volcano plot*, são alguns exemplos de análises que podem ser realizadas.

Os métodos de análise multivariada são cruciais nos estudos metabolômicos, uma vez que todos os metabólitos são considerados simultaneamente, permitindo a detecção de tendências entre amostras e metabólitos. As técnicas multivariadas de reconhecimento de padrão são ferramentas que visam identificar, caracterizar e avaliar semelhanças e diferenças entre as amostras de um conjunto de dados. Para isso utiliza-se análises supervisionadas e não supervisionadas. Como método de análise supervisionada temos o *Partial Least Squares - Discriminant Analysis* (PLS-DA) em que o objetivo é discriminar duas ou mais classes nas

quais as amostras podem ser categorizadas (ENGELSEN; SAVORANI; RASMUSSEN, 2013). Como método de análise não supervisionada podemos citar o *Principal Component Analysis* (PCA) que identifica as direções das maiores variações que melhor explicam a variância em um conjunto de dados sem consultar a classe (STOYANOVA; BROWN, 2001).

6. CONCLUSÃO

Aqui apresentamos o primeiro estudo metabolômico do TG de *T. infestans*, o que nos permitiu caracterizar 22 metabólitos (treonina, alanina, valina, isoleucina, lisina, prolina, glutamato, glutamina, aspartato, leucina, acetato, metionina, asparagina, betaína, colina, glicose, manitol, tirosina, serina, fumarato, fenilalanina e triptofano), sendo sete, a saber, isoleucina, lisina, prolina, colina, betaina, acetato e glicose, significativos para diferenciar os grupos infectados e sem infecção. Este estudo permitiu investigar as intrincadas adaptações metabólicas de *T. infestans* após a infecção pela cepa Y do *T. cruzi*, fornecendo dados importantes para melhor compreensão da interação parasito-vetor. Embora as nossas descobertas ofereçam um primeiro passo a compreensão da dinâmica metabólica desta relação entre *T. infectans* e *T. cruzi*, é importante ressaltar que a escassez de dados metabolômicos sobre esta interação mostra a necessidade de estudos mais abrangentes. A disponibilidade limitada de tais dados destaca uma lacuna crítica para a discussão dos resultados, enfatizando a necessidade de investigações adicionais empregando técnicas complementares. A complexidade das interações entre o vetor e o protozoário exige uma abordagem multidisciplinar para desvendar os caminhos completos das alterações metabólicas observadas. Dessa forma, a incorporação de metodologias adicionais, como genômica, proteômica e transcriptômica proporcionará uma compreensão mais abrangente dos mecanismos moleculares que direcionam essa interação.

Referências

- ALEVI, K. C. C. et al. Trends in Taxonomy of Chagas Disease Vectors (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae): From Linnaean to Integrative Taxonomy. **Pathogens**, v. 10, n. 12, p. 1627, 15 dez. 2021.
- ALONSO, A.; MARSAL, S.; JULIÀ, A. Analytical Methods in Untargeted Metabolomics: State of the Art in 2015. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 3, 5 mar. 2015.
- ANDREW, E. R.; BRADBURY, A.; EADES, R. G. Nuclear Magnetic Resonance Spectra from a Crystal rotated at High Speed. **Nature**, v. 182, n. 4650, p. 1659–1659, dez. 1958.
- ANTUNES, L. C. M. et al. Metabolic Signatures of Triatomine Vectors of *Trypanosoma cruzi* Unveiled by Metabolomics. **PLoS ONE**, v. 8, n. 10, p. e77283, 30 out. 2013.
- ARRESE, E. L.; SOULAGES, J. L. Insect Fat Body: Energy, Metabolism, and Regulation. **Annual Review of Entomology**, v. 55, n. 1, p. 207–225, 1 jan. 2010.
- AUE, W. P.; BARTHOLDI, E.; ERNST, R. R. Two-dimensional spectroscopy. Application to nuclear magnetic resonance. **The Journal of Chemical Physics**, v. 64, n. 5, p. 2229–2246, 1 mar. 1976.
- AVILA, J. L.; PEREZ-KEPP, R.; BRETANA, A. A Minimal Medium For The Cultivation Of Infective *Trypanosoma Cruzi* Epimastigotes. **Microbiology**, v. 129, n. 2, p. 285–291, 1 fev. 1983.
- BARISÓN, M. J. et al. Metabolomic profiling reveals a finely tuned, starvation-induced metabolic switch in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 292, n. 21, p. 8964–8977, maio 2017.
- BARKER, M.; RAYENS, W. Partial least squares for discrimination. **Journal of Chemometrics**, v. 17, n. 3, p. 166–173, 24 mar. 2003.
- BARRETT, M. F.; FRIEND, W. G. Differences in the concentration of free amino acids in the haemolymph of adult male and female *Rhodnius prolixus*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry**, v. 52, n. 3, p. 427–431, nov. 1975.
- BERN, C. Chagas' Disease. **New England Journal of Medicine**, v. 373, n. 5, p. 456–466, 30 jul. 2015.
- BERN, C.; MARTIN, D. L.; GILMAN, R. H. Acute and Congenital Chagas Disease. Em: [s.l: s.n.]. p. 19–47.
- BERRUETA, L. A.; ALONSO-SALCES, R. M.; HÉBERGER, K. Supervised pattern recognition in food analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 1158, n. 1–2, p. 196–214, jul. 2007.
- BOTTO-MAHAN, C.; CATTAN, P. E.; MEDEL, R. Chagas disease parasite induces behavioural changes in the kissing bug *Mepraia spinolai*. **Acta Tropica**, v. 98, n. 3, p. 219–223, jul. 2006.
- BOWMAN, I. B. R.; TOBIE, E. J.; VON BRAND, T. CO₂ fixation studies with the culture form of *Trypanosoma cruzi*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 9, n. 2, p. 105–114, jun. 1963.

- BRIDGES, R. G. Choline Metabolism in Insects. Em: [s.l: s.n.]. p. 51–110.
- BRINGAUD, F.; RIVIÈRE, L.; COUSTOU, V. Energy metabolism of trypanosomatids: Adaptation to available carbon sources. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 149, n. 1, p. 1–9, set. 2006.
- BURSELL, E. Substrates of oxidative metabolism in dipteran flight muscle. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry**, v. 52, n. 2, p. 235–238, out. 1975.
- BURSELL, E. The Role of Proline in Energy Metabolism. Em: **Energy Metabolism in Insects**. [s.l: s.n.]. p. 135–154.
- CANAVOSO, L. E.; RUBIOLO, E. R. Hemolymphatic components in vectors of *Trypanosoma cruzi*: study in several species of the subfamily Triatominae (Hemiptera: Reduviidae). **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 35, n. 2, p. 123–128, abr. 1993.
- CANEPA, G. Biochemical characterization of a low-affinity arginine permease from the parasite *Trypanosoma cruzi*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 236, n. 1, p. 79–84, jul. 2004.
- CANEPA, G. E. et al. Aspartate transport and metabolism in the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 247, n. 1, p. 65–71, jun. 2005.
- CANNATA, J. J. B.; CAZZULO, J. J. The aerobic fermentation of glucose by *Trypanosoma cruzi*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry**, v. 79, n. 3, p. 297–308, jan. 1984.
- CARR, H. Y.; PURCELL, E. M. Effects of Diffusion on Free Precession in Nuclear Magnetic Resonance Experiments. **Physical Review**, v. 94, n. 3, p. 630–638, 1 maio 1954.
- CAZZULO, J. J. et al. End products and enzyme levels of aerobic glucose fermentation in trypanosomatids. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 16, n. 3, p. 329–343, set. 1985.
- CAZZULO, J. J. Energy Metabolism in *Trypanosoma cruzi*. Em: **Intracellular Parasites**. [s.l: s.n.]. p. 235–257.
- CAZZULO, J. J. Intermediate metabolism in *Trypanosoma cruzi*. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, v. 26, n. 2, p. 157–165, abr. 1994.
- CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Chagas Disease After Organ Transplantation --- Los Angeles, California**.
- CLARIDGE, T. D. W. **High-Resolution NMR Techniques in Organic Chemistry**. [s.l.] Elsevier, 2016.
- CÓRDOBA-AGUILAR, A. Chagas bugs and *trypanosoma cruzi*: Puppets and puppeteer? **Acta Tropica**, v. 211, p. 105600, nov. 2020.
- COUSTOU, V. et al. Glucose-induced Remodeling of Intermediary and Energy Metabolism in Procyclic *Trypanosoma brucei*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 24, p. 16342–16354, jun. 2008.
- CRESPILLO-ANDÚJAR, C. et al. Use of benznidazole to treat chronic Chagas disease: An updated systematic review with a meta-analysis. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 16, n. 5, p. e0010386, 16 maio 2022.

DADD, R. H. Amino acid requirements of the mosquito *Culex pipiens*: Asparagine essential. **Journal of Insect Physiology**, v. 24, n. 1, p. 25–30, jan. 1978.

DADD, R. H.; KRIEGER, D. L.; MITTLER, T. E. Studies on the artificial feeding of the aphid *Myzus persicae* (Sulzer)—IV. Requirements for water-soluble vitamins and ascorbic acid. **Journal of Insect Physiology**, v. 13, n. 2, p. 249–272, fev. 1967.

DARLYUK, I. et al. Arginine Homeostasis and Transport in the Human Pathogen *Leishmania donovani*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 30, p. 19800–19807, jul. 2009.

DE ARIAS, A. R. et al. Chagas disease control-surveillance in the Americas: the multinational initiatives and the practical impossibility of interrupting vector-borne *Trypanosoma cruzi* transmission. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 117, 2022.

DE FUENTES-VICENTE, J. A. et al. What Do You Need to Know before Studying Chagas Disease? A Beginner's Guide. **Tropical Medicine and Infectious Disease**, v. 8, n. 7, p. 360, 10 jul. 2023.

DE OLIVEIRA, A. B. B. et al. Parasite–Vector Interaction of Chagas Disease: A Mini-Review. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 98, n. 3, p. 653–655, 7 mar. 2018.

DE-SIMONE, S. G. et al. Metabolic Alteration of *Trypanosoma cruzi* during Differentiation of Epimastigote to Trypomastigote Forms. **Pathogens**, v. 11, n. 2, p. 268, 19 fev. 2022.

DEVERA, R. et al. Biodemas de cepas do *Trypanosoma cruzi* isoladas de humanos de três áreas endêmicas de Minas Gerais. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 35, n. 4, p. 323–330, ago. 2002.

DIAS, J.; SCHOFIELD, C. The evolution of Chagas disease (American Trypanosomiasis) control after 90 years since Carlos Chagas discovery. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94, n. suppl 1, p. 103–121, set. 1999.

DNDI. **Chagas Disease**.

DUJARDIN; SCHOFIELD; TIBAYRENC. Population structure of Andean *Triatoma infestans*: allozyme frequencies and their epidemiological relevance. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 12, n. 1, p. 20–29, 4 jan. 1998.

EBERHARD, F. E. et al. Metabolites as predictive biomarkers for *Trypanosoma cruzi* exposure in triatomine bugs. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, v. 19, p. 3051–3057, 2021.

ELLIOT, S. L. et al. *Trypanosoma cruzi*, Etiological Agent of Chagas Disease, Is Virulent to Its Triatomine Vector *Rhodnius prolixus* in a Temperature-Dependent Manner. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 3, p. e0003646, 20 mar. 2015.

EMWAS, A.-H. et al. Recommended strategies for spectral processing and post-processing of 1D ¹H-NMR data of biofluids with a particular focus on urine. **Metabolomics**, v. 14, n. 3, p. 31, 12 mar. 2018.

EMWAS, A.-H. et al. NMR Spectroscopy for Metabolomics Research. **Metabolites**, v. 9, n. 7, p. 123, 27 jun. 2019.

EMWAS, A.-H. M. The Strengths and Weaknesses of NMR Spectroscopy and Mass Spectrometry with Particular Focus on Metabolomics Research. Em: [s.l.: s.n.]. p. 161–193.

ENGELSEN, S. B.; SAVORANI, F.; RASMUSSEN, M. A. Chemometric Exploration of Quantitative NMR Data. Em: **eMagRes**. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2013.

FELLET, M. R. et al. Effects of Infection by *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* on the Reproductive Performance of the Vector *Rhodnius prolixus*. **PLoS ONE**, v. 9, n. 8, p. e105255, 19 ago. 2014.

FERREIRA, C. M. et al. Modulation of mitochondrial metabolism as a biochemical trait in blood feeding organisms: the redox vampire hypothesis redux. **Cell Biology International**, v. 42, n. 6, p. 683–700, 23 jun. 2018.

FERREIRA, M. M. C. **Quimiometria: conceitos, métodos e aplicações**. [s.l.] Editora da Unicamp, 2015.

FIGON, F.; CASAS, J. Ommochromes in invertebrates: biochemistry and cell biology. **Biological Reviews**, v. 94, n. 1, p. 156–183, 10 fev. 2019.

FUCHS, S. et al. Phenylalanine Metabolism Regulates Reproduction and Parasite Melanization in the Malaria Mosquito. **PLoS ONE**, v. 9, n. 1, p. e84865, 7 jan. 2014.

GALVÃO, C. **Vetores da doença de Chagas no Brasil**. [s.l.] Sociedade Brasileira de Zoologia, 2014.

GARCIA, E. S. et al. Interactions between intestinal compounds of triatomines and *Trypanosoma cruzi*. **Trends in Parasitology**, v. 26, n. 10, p. 499–505, out. 2010.

GARCIA, E. S.; AZAMBUJA, P. Development and interactions of *Trypanosoma cruzi* within the insect vector. **Parasitology Today**, v. 7, n. 9, p. 240–244, jan. 1991.

GEER, B. W.; OLANDER, R. M.; SHARP, P. L. Quantification of dietary choline utilization in adult *Drosophila melanogaster* by radioisotope methods. **Journal of Insect Physiology**, v. 16, n. 1, p. 33–43, jan. 1970.

GIL-SANTANA, H. R. et al. *Panstrongylus noireaudi*, a remarkable new species of Triatominae (Hemiptera, Reduviidae) from Bolivia. **ZooKeys**, v. 1104, p. 203–225, 14 jun. 2022.

GIRONÈS, N. et al. Global Metabolomic Profiling of Acute Myocarditis Caused by *Trypanosoma cruzi* Infection. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 11, p. e3337, 20 nov. 2014.

GOODACRE, R. et al. Metabolomics by numbers: acquiring and understanding global metabolite data. **Trends in Biotechnology**, v. 22, n. 5, p. 245–252, maio 2004.

GUHL, F.; RAMÍREZ, J. D. Poverty, Migration, and Chagas Disease. **Current Tropical Medicine Reports**, v. 8, n. 1, p. 52–58, 11 mar. 2021.

GÜRTLER, R. E. et al. Sustainable vector control and management of Chagas disease in the Gran Chaco, Argentina. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 41, p. 16194–16199, 9 out. 2007.

HASSLOCHER-MORENO, A. M. et al. Safety of benznidazole use in the treatment of chronic Chagas' disease. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 67, n. 5, p. 1261–1266, 1 maio 2012.

- HOMSY, J. J.; GRANGER, B.; KRASSNER, S. M. Some Factors Inducing Formation of Metacyclic Stages of *Trypanosoma cruzi*. **The Journal of Protozoology**, v. 36, n. 2, p. 150–153, 30 mar. 1989.
- HOTEZ, P. J. et al. Control of Neglected Tropical Diseases. **New England Journal of Medicine**, v. 357, n. 10, p. 1018–1027, 6 set. 2007.
- INBAR, E. et al. Lysine transporters in human trypanosomatid pathogens. **Amino Acids**, v. 42, n. 1, p. 347–360, 18 jan. 2012.
- JACKSON, Y. et al. Prevalence, Clinical Staging and Risk for Blood-Borne Transmission of Chagas Disease among Latin American Migrants in Geneva, Switzerland. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 2, p. e592, 2 fev. 2010.
- JANOVICK, J. et al. Nuclear magnetic resonance. Em: **Chemical Analysis of Food**. [s.l.] Elsevier, 2020. p. 135–175.
- KANEHISA, M. KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. **Nucleic Acids Research**, v. 28, n. 1, p. 27–30, 1 jan. 2000.
- KOLLIEN, A. H.; SCHMIDT, J.; SCHAUB, G. A. Modes of association of *Trypanosoma cruzi* with the intestinal tract of the vector *Triatoma infestans*. **Acta Tropica**, v. 70, n. 2, p. 127–141, jun. 1998.
- KOLLIEN, A.; SCHAUB, G. The Development of *Trypanosoma cruzi* in Triatominae. **Parasitology Today**, v. 16, n. 9, p. 381–387, set. 2000.
- LIMA, M. M. et al. Development and Reproduction of *Panstrongylus megistus* (Hemiptera: Reduviidae) Infected with *Trypanosoma cruzi*, Under Laboratory Conditions. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 85, n. 4, p. 458–461, 1 jul. 1992.
- LINZEN, B. The Tryptophan → Ommochrome Pathway in Insects. Em: [s.l.: s.n.]. p. 117–246.
- LOCKEY, K. H. Lipids of the insect cuticle: origin, composition and function. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry**, v. 89, n. 4, p. 595–645, jan. 1988.
- LOWE, I. J. Free Induction Decays of Rotating Solids. **Physical Review Letters**, v. 2, n. 7, p. 285–287, 1 abr. 1959.
- MAHROUS, E. A.; FARAG, M. A. Two dimensional NMR spectroscopic approaches for exploring plant metabolome: A review. **Journal of Advanced Research**, v. 6, n. 1, p. 3–15, jan. 2015.
- MANCHOLA, N. C. et al. Biochemical Characterization of Branched Chain Amino Acids Uptake in *Trypanosoma cruzi*. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 63, n. 3, p. 299–308, 13 maio 2016.
- MANTILLA, B. S. et al. Role of $\Delta 1$ -Pyrroline-5-Carboxylate Dehydrogenase Supports Mitochondrial Metabolism and Host-Cell Invasion of *Trypanosoma cruzi*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 290, n. 12, p. 7767–7790, mar. 2015.
- MARTÍN-ESCOLANO, J. et al. An Updated View of the *Trypanosoma cruzi* Life Cycle: Intervention Points for an Effective Treatment. **ACS Infectious Diseases**, v. 8, n. 6, p. 1107–1115, 10 jun. 2022.

MARTINS, L. et al. USO DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE ALTA RESOLUÇÃO PARA ESTUDOS DE INTERAÇÕES RECEPTORES-LIGANTES: FUNDAMENTOS, MÉTODOS E APLICAÇÕES. Em: [s.l: s.n.].

MARTINS, R. M. et al. Use of γ -Proline and ATP Production by *Trypanosoma cruzi* Metacyclic Forms as Requirements for Host Cell Invasion. **Infection and Immunity**, v. 77, n. 7, p. 3023–3032, jul. 2009.

MESSENGER, L. A.; MILES, M. A.; BERN, C. Between a bug and a hard place: *Trypanosoma cruzi* genetic diversity and the clinical outcomes of Chagas disease. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, v. 13, n. 8, p. 995–1029, 3 ago. 2015.

MILES, M. A. et al. DO RADICALLY DISSIMILAR TRYPANOSOMA CRUZI STRAINS (ZYMODEMES) CAUSE VENEZUELAN AND BRAZILIAN FORMS OF CHAGAS' DISEASE? **The Lancet**, v. 317, n. 8234, p. 1338–1340, jun. 1981.

NEEDHAM, A. E. Zoochromes in Other Aspects of Metabolism. Em: **The Significance of Zoochromes**. [s.l: s.n.]. p. 241–246.

OLIVEIRA CORREIA, J. P. S. et al. *Triatoma guazu* Lent and Wygodzinsky Is a Junior Synonym of *Triatoma williamsi* Galvão, Souza and Lima. **Insects**, v. 13, n. 7, p. 591, 28 jun. 2022.

PANG, Z. et al. MetaboAnalyst 5.0: narrowing the gap between raw spectra and functional insights. **Nucleic Acids Research**, v. 49, n. W1, p. W388–W396, 2 jul. 2021.

PATTI, G. J.; YANES, O.; SIUZDAK, G. Metabolomics: the apogee of the omics trilogy. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 13, n. 4, p. 263–269, 22 abr. 2012.

PENNINGTON, J. E.; GOLDSTROHM, D. A.; WELLS, M. A. The role of hemolymph proline as a nitrogen sink during blood meal digestion by the Mosquito *Aedes aegypti*. **Journal of Insect Physiology**, v. 49, n. 2, p. 115–121, fev. 2003.

PEREIRA, C. A. et al. L-Arginine Uptake and L-Phosphoarginine Synthesis In *Trypanosoma Cruzi*. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 46, n. 6, p. 566–570, 2 nov. 1999.

PEREIRA, C. A. et al. Arginine metabolism in *Trypanosoma cruzi* is coupled to parasite stage and replication. **FEBS Letters**, v. 526, n. 1–3, p. 111–114, 28 ago. 2002.

PÉREZ DE ROSAS, A. R. et al. Fine-scale genetic structure in populations of the Chagas' disease vector *Triatoma infestans* (Hemiptera, Reduviidae). **Genetica**, v. 141, n. 1–3, p. 107–117, 7 mar. 2013.

PHALARAKSH, C. et al. A metabonomic analysis of insect development: ¹H-NMR spectroscopic characterization of changes in the composition of the haemolymph of larvae and pupae of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. **ScienceAsia**, v. 34, n. 3, p. 279, 2008.

PICKETT, C.; FRIEND, W. G. FREE AMINO ACIDS IN THE HAEMOLYMPH OF RHODNIUS PROLIQUS STÅHL (HEMIPTERA: REDUVIIDAE). **Canadian Journal of Zoology**, v. 44, n. 2, p. 241–249, 1 mar. 1966.

PUTRI, S. P. et al. Current metabolomics: Practical applications. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 115, n. 6, p. 579–589, jun. 2013.

RASSO, S. C.; FRAENKEL, G. The Food Requirements of the Adult Female Blow-Fly, *Phormia Regina* (Meigen), in Relation to Ovarian Development. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 47, n. 4, p. 636–645, 1 dez. 1954.

- REINA-SAN-MARTÍN, B. et al. A B-cell mitogen from a pathogenic trypanosome is a eukaryotic proline racemase. **Nature Medicine**, v. 6, n. 8, p. 890–897, ago. 2000.
- REN, S. et al. Computational and statistical analysis of metabolomics data. **Metabolomics**, v. 11, n. 6, p. 1492–1513, 28 dez. 2015.
- RIBEIRO, J. M. C. et al. An Insight into the Transcriptome of the Digestive Tract of the Bloodsucking Bug, *Rhodnius prolixus*. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 1, p. e2594, 9 jan. 2014.
- ROBERTS, L. D. et al. Targeted Metabolomics. **Current Protocols in Molecular Biology**, v. 98, n. 1, 15 abr. 2012.
- ROCHFORD, S. Metabolomics Reviewed: A New “Omics” Platform Technology for Systems Biology and Implications for Natural Products Research. **Journal of Natural Products**, v. 68, n. 12, p. 1813–1820, 1 dez. 2005.
- ROHLOFF, P.; DOCAMPO, R. A contractile vacuole complex is involved in osmoregulation in *Trypanosoma cruzi*. **Experimental Parasitology**, v. 118, n. 1, p. 17–24, jan. 2008.
- SANCHEZ-MORENO, M. et al. Metabolic studies by ¹ H NMR of different forms of *Trypanosoma cruzi* as obtained by “in vitro” culture. **FEMS Microbiology Letters**, v. 133, n. 1–2, p. 119–125, nov. 1995.
- SCARAFFIA, P. Y. et al. Ammonia metabolism in *Aedes aegypti*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 35, n. 5, p. 491–503, maio 2005.
- SCARAFFIA, P. Y.; WELLS, M. A. Proline can be utilized as an energy substrate during flight of *Aedes aegypti* females. **Journal of Insect Physiology**, v. 49, n. 6, p. 591–601, jun. 2003.
- SCHAUB, G. A.; SCHMIDT, A.; ULLRICH, J. The effect of moulting and of infection with *Blastocrithidia triatoma* (Trypanosomatidae) on the concentration of free amino acids in the haemolymph of the reduviid bug *Triatoma infestans*. **Journal of Insect Physiology**, v. 36, n. 11, p. 843–853, jan. 1990.
- SHAMIM, G. et al. Biochemistry and biosynthesis of insect pigments. **European Journal of Entomology**, v. 111, n. 2, p. 149–164, 5 maio 2014.
- SHIKANAI-YASUDA, M. A.; CARVALHO, N. B. Oral Transmission of Chagas Disease. **Clinical Infectious Diseases**, v. 54, n. 6, p. 845–852, 15 mar. 2012.
- SILBER, A. et al. Amino Acid Metabolic Routes in *Trypanosoma cruzi*: Possible Therapeutic Targets Against Chagas Disease. **Current Drug Target -Infectious Disorders**, v. 5, n. 1, p. 53–64, 1 mar. 2005.
- SILBER, A. M. et al. Active Transport of L-Proline in *Trypanosoma cruzi*. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 49, n. 6, p. 441–446, 11 nov. 2002.
- SILBER, A. M. et al. Glucose uptake in the mammalian stages of *Trypanosoma cruzi*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 168, n. 1, p. 102–108, nov. 2009.
- SILVA, L. H. P. Sobre uma cepa de *Trypanosoma cruzi* altamente virulenta para o camundongo branco. **Fol Clin Biol**, p. 191–207, 1953.
- SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. **IDENTIFICAÇÃO ESPECTROMÉTRICA DE COMPOSTOS ORGÂNICOS**. [s.l: s.n.].

- SINGH, U. et al. Compound-Specific 1D ^1H NMR Pulse Sequence Selection for Metabolomics Analyses. **ACS Omega**, v. 8, n. 26, p. 23651–23663, 4 jul. 2023.
- SNART, C. J. P.; HARDY, I. C. W.; BARRETT, D. A. Entometabolomics: applications of modern analytical techniques to insect studies. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 155, n. 1, p. 1–17, 14 abr. 2015.
- SOLOMONS, T. W. G. **Química Organica**. 12. ed. [s.l: s.n.]. v. 1
- SORIANO-ARANDES, A. et al. Control and management of congenital Chagas disease in Europe and other non-endemic countries: current policies and practices. **Tropical Medicine & International Health**, v. 21, n. 5, p. 590–596, 17 maio 2016.
- STANISIC, D. et al. High-Resolution Magic-Angle Spinning NMR Spectroscopy for Evaluation of Cell Shielding by Virucidal Composites Based on Biogenic Silver Nanoparticles, Flexible Cellulose Nanofibers and Graphene Oxide. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 10, 12 maio 2022.
- STEELE, J. E. Glycogen phosphorylase in insects. **Insect Biochemistry**, v. 12, n. 2, p. 131–147, jan. 1982.
- STERKEL, M. et al. Tyrosine Detoxification Is an Essential Trait in the Life History of Blood-Feeding Arthropods. **Current Biology**, v. 26, n. 16, p. 2188–2193, ago. 2016.
- STERKEL, M.; OLIVEIRA, P. L. Developmental roles of tyrosine metabolism enzymes in the blood-sucking insect *Rhodnius prolixus*. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 284, n. 1854, p. 20162607, 17 maio 2017.
- STOREY, K. B. Organic Solutes in Freezing Tolerance. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology**, v. 117, n. 3, p. 319–326, jul. 1997.
- STOYANOVA, R.; BROWN, T. R. NMR spectral quantitation by principal component analysis. **NMR in Biomedicine**, v. 14, n. 4, p. 271–277, 12 jun. 2001.
- SYLVESTER, D.; KRASSNER, S. M. Proline metabolism in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry**, v. 55, n. 3, p. 443–447, jan. 1976.
- TAHORI, A. S.; HAZAN, A. Rearing of the black citrus aphid *Toxoptera aurantii* on chemically defined diets. **Journal of Insect Physiology**, v. 16, n. 10, p. 1975–1981, out. 1970.
- TÉLLEZ-RENDÓN, J. et al. *Triatoma yelapensis* sp. nov. (Hemiptera: Reduviidae) from Mexico, with a Key of *Triatoma* Species Recorded in Mexico. **Insects**, v. 14, n. 4, p. 331, 29 mar. 2023.
- TONELLI, R. R. et al. l-Proline is essential for the intracellular differentiation of *Trypanosoma cruzi*. **Cellular Microbiology**, v. 6, n. 8, p. 733–741, 4 maio 2004.
- TYLER, K. M.; ENGMAN, D. M. The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. **International Journal for Parasitology**, v. 31, n. 5–6, p. 472–481, maio 2001.
- ULRICH, E. L. et al. BioMagResBank. **Nucleic Acids Research**, v. 36, n. Database, p. D402–D408, 23 dez. 2007.

VAN WEELDEN, S. W. H. et al. New Functions for Parts of the Krebs Cycle in Procyclic *Trypanosoma brucei*, a Cycle Not Operating as a Cycle. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 13, p. 12451–12460, abr. 2005.

VANDERZANT, E. S.; RICHARDSON, C. D. Nutrition of the adult boll weevil: Lipid requirements. **Journal of Insect Physiology**, v. 10, n. 2, p. 267–272, abr. 1964.

VAN HELLEMOND, J. J.; OPPERDOES, F. R.; TIELENS, A. G. M. The extraordinary mitochondrion and unusual citric acid cycle in *Trypanosoma brucei*. **Biochemical Society Transactions**, v. 33, n. 5, p. 967, 1 out. 2005.

VAVRICKA, C. J. et al. Tyrosine metabolic enzymes from insects and mammals: A comparative perspective. **Insect Science**, v. 21, n. 1, p. 13–19, 11 fev. 2014.

WATANABE, M. et al. Mechanism allowing an insect to survive complete dehydration and extreme temperatures. **Journal of Experimental Biology**, v. 205, n. 18, p. 2799–2802, 15 set. 2002.

WHO. **WORLD HEALTH ORGANIZATION**.

WISHART, D. S. et al. HMDB: the Human Metabolome Database. **Nucleic Acids Research**, v. 35, n. Database, p. D521–D526, 3 jan. 2007.

WONG, A.; LUCAS-TORRES, C. NMR-based Metabolomics. Em: **NMR-based Metabolomics**. [s.l: s.n.]. p. 133–150.

ZELEDON, R. Comparative Physiological Studies on Four Species of Hemoflagellates in Culture. II. Effect of Carbohydrates and Related Substances and Some Amino Compounds on the Respiration. **The Journal of Parasitology**, v. 46, n. 5, p. 541, out. 1960.

ZHAO, Y. et al. Review of Kissing Bugs (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) from China with Descriptions of Two New Species. **Insects**, v. 14, n. 5, p. 450, 10 maio 2023.

ZINGALES, B. et al. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 7, p. 1051–1054, nov. 2009.

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