



UNESP - UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
INSTITUTO DE QUÍMICA - CAMPUS ARARAQUARA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA



Análise proteômica diferencial de *Trypanosoma cruzi* na presença de substâncias extraídas de plantas da família Piperaceae

Gabriela Alves Licursi Vieira

Araraquara

2011

Gabriela Alves Licursi Vieira

Análise proteômica diferencial de *Trypanosoma cruzi* na presença de substâncias extraídas de plantas da família Piperaceae

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

Orientadora: Profa. Dra. Regina Maria Barretto Cicarelli

Araraquara

2011

FICHA CATALOGRÁFICA

Vieira, Gabriela Alves Licursi
V657a Análise proteômica diferencial de *Trypanosoma cruzi*
na presença de substâncias extraídas de plantas da família
Piperaceae / Gabriela Alves Licursi Vieira. – Araraquara :
[s.n], 2011
89 f. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual
Paulista, Instituto de Química
Orientador: Regina Maria Barretto Cicarelli

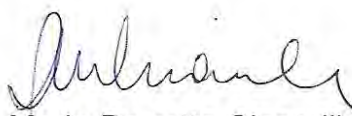
1. Biotecnologia. 2. Proteoma. 3. Alvos terapêuticos.
I. Título.

GABRIELA ALVES LICURSI VIEIRA

Dissertação apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Araraquara, 26 de abril de 2011.

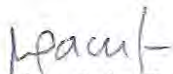
BANCA EXAMINADORA



Profª Drª Regina Maria Barretto Cicarelli (Orientadora)
Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP, Araraquara



Profª Drª Dulce Helena Siqueira Silva
Instituto de Química – UNESP, Araraquara



Prof. Dr. Maurício Bacci Junior
Instituto de Biociências – UNESP, Rio Claro

DADOS CURRICULARES

Nome: Gabriela Alves Licursi Vieira

Nome em citações bibliográficas: VIEIRA, G. A. L.

Sexo: feminino

Filiação: Joel Licursi Vieira e Tereza Alves Licursi Vieira

Nascimento: 29/01/1985 - Franca/SP - Brasil

Endereço profissional: Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho,
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara,
Departamento de Ciências Biológicas
Laboratório de Imunologia
Rodovia Araraquara-Jau, km 01 - Campus
14801-902 – Araraquara, SP – Brasil
Telefone: (16) 33016950
URL da home page: www.unesp.br

Formação Acadêmica

2004 – 2008: Graduação em Bacharelado e Licenciatura em Ciências Biológicas.
Universidade Federal de São Carlos, UFSCAR, São Carlos, Brasil.

Título: Microbiota contaminante em amostras de carne moída adquiridas em estabelecimentos comerciais do município de São Carlos, SP e avaliação da capacidade das cepas isoladas em formar biofilme.

Orientadora: Profa. Dra. Cristina Paiva de Sousa.

2009 – 2011: Mestrado em Biotecnologia.

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, São Paulo, Brasil.

Título: Análise proteômica diferencial de *Trypanosoma cruzi* na presença de substâncias extraídas de plantas da família Piperaceae.

Orientadora: Profa. Dra. Regina Maria Barretto Cicarelli.

Bolsa: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Atuação profissional

Universidade Federal de São Carlos, UFSCAR, Brasil.

Vínculo institucional

2005 - 2008

Carga

Vínculo: Estagiário, Enquadramento Funcional: Estagiário,
horária: 14, Regime: Dedicação exclusiva.

Vínculo institucional

2006 - 2007

Vínculo: Bolsista PIBIC/ CNPq/ UFSCar, Enquadramento
Funcional: Bolsista PIBIC/ CNPq/ UFSCar, Carga horária: 20,
Regime: Dedicação exclusiva.

Atividades

08/2006 - 12/2008 da Pesquisa e desenvolvimento, Centro de Ciências Biológicas e Saúde.

Linhas de pesquisa
Doenças Veiculadas por Alimentos e Saúde Pública

08/2006 - 12/2008 Atividades de Participação em Projeto, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde.

Projetos de pesquisa
Determinação Fenotípica de Microrganismos presentes em amostras de carne moída adquiridas em estabelecimentos comerciais do município de São Carlos, SP

07/2005 - 12/2008 Estágios, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde.
Estágio realizado em Microbiologia Aplicada.

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Brasil.

Vínculo institucional

2009 - Atual Vínculo: Mestranda, Enquadramento Funcional: Mestrado/ Pesquisa, Carga horária: 40. Regime: Dedicção exclusiva.

Atividades

03/2009 - Atual Pesquisa e desenvolvimento, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, Departamento de Ciências Biológicas.
Linhas de pesquisa
Biotecnologia Celular e Molecular

2009 - Atual Atividades de Participação em Projeto, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, Departamento de Ciências Biológicas.

Projetos de pesquisa
Avaliação da atividade tripanocida de substâncias extraídas de plantas da família Piperaceae

Análise proteômica diferencial de *Trypanosoma cruzi* na presença de substâncias extraídas de plantas da família Piperaceae

Produção bibliográfica

Trabalhos publicados em anais de eventos (completo)

1. SARTORI, L. A. A., ODAN, C. N., VIEIRA, G. A. L., NAGAMATI JUNIOR, K., DELABONA, P. DA S., CANEVAROLO, R. R., SILVA, R. A. C.
“Análise da Radioativação na Germinação de *Phaseolus vulgaris*”
XVI Jornadas de Jóvenes Investigadores Asociación Universidades Grupo Montevideo, 2008, Montevideo: UdelaR.
2. VIEIRA, G. A. L., SERRANO, N. F. G., SOUSA, C.P.
“Determinação fenotípica de microrganismos presentes em amostras de carne moída adquiridas em estabelecimentos comerciais do município de São Carlos, SP”
XV Jornadas de Jóvenes Investigadores de la Asociación de Universidades Grupo Montevideo, 2007, Paraguai: UNA.

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

1. VIEIRA, G. A. L., COTINGUIBA, F., SIQUEIRA, M. C., LAURE, H. J., ROSA, J. C., GREENE, L. J., FURLAN, M., CICARELLI, R. M. B.
“Análise proteômica de diferentes cepas de *Trypanosoma cruzi* tratadas com substância de *Piper tuberculatum*”
V Simpósio Iberoamericano de Plantas Medicinais, 2010, Itajaí - SC.
2. VIEIRA, G. A. L., BATISTA JUNIOR, J. M., SIQUEIRA, M. C., LAURE, H. J., ROSA, J. C., GREENE, L. J., FURLAN, M., CICARELLI, R. M. B.
“Influência proteômica de substâncias de *Peperomia obtusifolia* em cepa Y de *Trypanosoma cruzi*”
V Simpósio Iberoamericano de Plantas Medicinais, 2010, Itajaí - SC.
3. SIQUEIRA, M. C., REGASINI, L. O., VIEIRA, G. A. L., ANDREO, R., BOLZANI, V. S., SILVA, D. H. S., CICARELLI, R. M. B.
“Cytotoxicity evaluation of *Pterogyne nitens* substances against two *Trypanosoma cruzi* strains”
Jornada Farmacêutica da Unesp - FCFAR, 2009, Araraquara.
4. SIQUEIRA, M. C., REGASINI, L. O., VIEIRA, G. A. L., ANDREO, R., BOLZANI, V. S., SILVA, D. H. S., CICARELLI, R. M. B.
“Cytotoxicity evaluation of *Pterogyne nitens* substances against two *Trypanosoma cruzi* strains”
Simpósio Internacional Centenário da Descoberta da Doença de Chagas, 2009, Rio de Janeiro.
5. VIEIRA, G. A. L., SOUSA, C.P.
“Determinação fenotípica de microrganismos presentes em amostras de carne moída adquiridas em estabelecimentos comerciais o município de São Carlos, SP”
XV Congresso de Iniciação Científica - 7ª Jornada Científica da UFSCar, 2007, São Carlos.

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo expandido)

1. VIEIRA, G. A. L., SOUSA, C.P.

“Determinação Fenotípica de Microrganismos presentes em amostras de carne moída adquiridas em estabelecimentos comerciais do município de São Carlos, SP”
III SIMBRAVISA, 2006, Florianópolis - SC.

Artigos em jornal de notícias

1. COTINGUIBA, F., VIEIRA, G. A. L.

Pesquisas buscam a cura para a doença de Chagas.
Agência de notícias da Uniara, 2009.

Participação em eventos

1. V Simpósio Iberoamericano de Plantas Medicinais, Itajaí - SC, 2010.

2. I Congresso Regional de Saúde e Meio Ambiente, Araraquara - SP, 2010.

3. Simpósio Internacional Centenário da Descoberta da Doença de Chagas, Rio de Janeiro - RJ, 2009.

4. Workshop 2009 dos Programas de Pós-Graduação em Química e em Biotecnologia - IQ - UNESP, 15 anos do PPG em Biotecnologia, Araraquara - SP, 2009.

5. XV Congresso de Iniciação Científica - 7ª Jornada Científica da UFSCar, São Carlos - SP, 2007.

6. XV Jornadas de Jóvenes Investigadores de la Asociación de Universidades Grupo Montevideo, Assunção – Paraguai, 2007.

7. Semana do Biodiesel da Universidade Federal de São Carlos, São Carlos - SP, 2007.

8. III Simpósio Brasileiro de Vigilância Sanitária - SIMBRAVISA, Florianópolis - SP, 2006.

9. III Semana de Biologia da Universidade Federal de São Carlos, São Carlos - SP, 2004

Dedico mais esta conquista, primeiramente, a Deus pela dádiva da vida;

Aos meus pais, Tereza e Joel, pelas grandes oportunidades que sempre me
proporcionaram e pelo amor incondicional;

Aos meus irmãos, Daniela e Ernane, pela alegria de cada reencontro;

Ao Luiz Carlos, um grande companheiro que tive a felicidade de conhecer,
sempre solícito.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Profa. Dra. Regina Maria Barretto Cicarelli pela oportunidade em realizar este trabalho e pela convivência enriquecedora;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de mestrado concedida para a realização dessa pesquisa;

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio financeiro ao projeto;

Aos colegas de laboratório Rogério, Mariana, Carol, Lis, Danilo, Raquel, Flávia, Aline XuXu, Andréa, Greici, Joyce, Dani e Túlio pelas muitas colaborações, conversas e risos;

À Val, Elisete e Marga pela gentileza;

A todos do NuBBE (Núcleo de Bioensaios Biossíntheses e Ecofisiologia de Produtos Naturais) que disponibilizaram as substâncias para a realização desse trabalho;

À Helen Julie, Prof. César e Prof. Greene pela colaboração com a espectrometria de massas;

Aos meus amigos, presentes ou distantes, pelo simples fato de existirem e trazerem tantas coisas boas à minha vida;

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a conclusão deste trabalho, muito obrigada!

Agradeço todas as dificuldades que enfrentei; não fosse por elas, eu não teria saído do lugar. As facilidades nos impedem de caminhar. Mesmo as críticas nos auxiliam muito.

(Chico Xavier)

Em algum lugar, algo incrível espera para ser conhecido.

(Carl Sagan)

A diferença entre o possível e o impossível está na vontade humana.

(Louis Pasteur)

La vida no es sino una continua sucesión de oportunidades para sobrevivir.

(Gabriel García Márquez)

RESUMO

O protozoário hemoflagelado, *Trypanosoma cruzi*, transmitido principalmente pelo inseto triatomíneo, por infecção congênita ou por transfusão sanguínea, causa a tripanossomíase americana ou doença de Chagas, como é mais conhecida. Essa é uma séria doença parasitária que ocorre na América Latina, com considerável impacto social e econômico. Dois fármacos, nifurtimox e benzonidazol, são indicados no tratamento de pessoas infectadas, mas são pouco eficientes na fase aguda e praticamente ineficientes na fase crônica da doença. Devido a esses fatores, é de extrema importância que se encontre agentes quimioterápicos e/ou quimiopreventivos mais eficientes e eficazes. O presente trabalho objetivou avaliar a influência no proteoma de *T. cruzi* de três substâncias extraídas de plantas da família Piperaceae, peperobtusina A e B de *Peperomia obtusifolia* e piplartina de *Piper tuberculatum*, através da eletroforese bidimensional (2D) – DIGE (*Difference Gel Electrophoresis* - GE Healthcare) associada à espectrometria de massas. O tratamento realizado com peperobtusina A de *Peperomia obtusifolia* em cepa Y de *T. cruzi* identificou proteínas de interesse, como proteína do bastão paraflagelar e triparedoxina peroxidase, importantes na composição flagelar e proteção natural do parasito ao estresse oxidativo, respectivamente. Os resultados obtidos com peperobtusina B de *Peperomia obtusifolia* na mesma cepa de *T. cruzi* mostraram proteínas que podem servir como interessantes alvos potenciais para futuro desenvolvimento de fármacos. São elas: calmodulina, tirosina aminotransferase e arginina quinase. Os resultados obtidos com o tratamento das cepas Y e Bol de *T. cruzi* pela piplartina de *Piper tuberculatum* demonstraram que apesar das diferenças de suscetibilidade dessas cepas em relação ao benzonidazol, a piplartina influenciou de modo semelhante ambas as cepas e alterou a expressão de enzimas envolvidas na proteção do parasito frente ao estresse oxidativo, como triparedoxina peroxidase e metionina sulfóxido redutase, importantes alvos potenciais para uso terapêutico no futuro.

Palavras-chave: *Trypanosoma cruzi*, proteoma, família Piperaceae, alvos terapêuticos, peperobtusina A, peperobtusina B, piplartina.

ABSTRACT

The protozoa hemoflagellate, *Trypanosoma cruzi*, transmitted mainly for the triatomíneo insect, congenital infection or sanguineous transfusion, cause American trypanosomiasis or Chagas disease, as more it is known. This is a serious parasitic illness that occurs in Latin America, with considerable social and economic impact. Two drugs, nifurtimox and benznidazol, are indicated in the treatment of infected people, but they are little efficient in the acute phase and practically inefficient in the chronic phase of the illness. Because of these factors, it is of extreme importance find efficient chemopreventive and/or chemotherapeutic agents. This work aims to evaluate the *T. cruzi* proteome influence of three substances extracted of plants belonging to Piperaceae family, being peperobtusine A and B of *Peperomia obtusifolia* and piplartine of *Piper tuberculatum*, through two dimensional electrophoresis (2D) - DIGE (*Difference Gel Electrophoresis* - GE Healthcare) and mass spectrometry. The treatment carried with peperobtusine A of *P. obtusifolia* in Y strain of *T. cruzi* identified interest proteins, as paraflagellar rod protein and triparedoxin peroxidase, important in the flagella composition and natural protection of oxidative stress, respectively. The results using peperobtusine B of the *P. obtusifolia* in Y strain of *T. cruzi* showed proteins that can be interesting potential targets for future development of drug. They are: calmodulin, tyrosine aminotransferase and arginine kinase. The results with the treatment of Y and Bol strains of *T. cruzi* with piplartine of *P. tuberculatum* demonstrated that although to the differences of susceptibility of these strains related to benznidazol, the piplartine was active for both strains as a similar way and modified the expression of enzymes involved in the protection of the parasitic to the oxidative stress, as triparedoxin peroxidase and methionine sulfoxide reductase, potential targets for therapeutical use in the future.

Key words: *Trypanosoma cruzi*, proteome, Piperaceae family, therapeutics targets, peperobtusine A, peperobtusine B, piplartine.

LISTA FIGURAS

Figura 1: Morfologia de <i>T. cruzi</i> : A) epimastigota, B) tripomastigota e C) amastigota	20
Figura 2: Ciclo biológico de <i>T. cruzi</i>	22
Figura 3: Estrutura química dos compostos em estudo (CI ₅₀ determinada para cepa Y).....	30
Figura 4: Curva de crescimento das formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i> (cepa Y) durante 15 dias (controle sem substâncias).....	45
Figura 5: Curva de crescimento das formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i> (cepa Bol), durante 15 dias (controle sem substâncias).....	46
Figura 6: Curva de crescimento da forma epimastigota de <i>T. cruzi</i> (cepa Y) tratada com peperobtusina A de <i>Peperomia obtusifolia</i>	47
Figura 7: Curva de crescimento da forma epimastigota de <i>T. cruzi</i> (cepa Y) tratada com peperobtusina B de <i>Peperomia obtusifolia</i>	47
Figura 8: Curva de crescimento da forma epimastigota de <i>T. cruzi</i> (cepa Y) tratada com piplartina de <i>Piper tuberculatum</i>	48
Figura 9: Curva de crescimento da forma epimastigota de <i>T. cruzi</i> (cepa Bol) tratada com piplartina de <i>Piper tuberculatum</i>	48
Figura 10: Géis 2D - DIGE marcados com os fluoróforos: A) Padrão interno - Cy 2; B) Controle - Cy 3; e C) Tratado - Cy 5. Sendo o tratamento com: 1) Peperobtusina A de <i>P. obtusifolia</i> (cepa Y). 2) Peperobtusina B de <i>P. obtusifolia</i> (cepa Y). 3) Piplartina de <i>P. tuberculatum</i> (cepa Y). 4) Piplartina de <i>P. tuberculatum</i> (cepa Bol).	49
Figura 11: Gel Preparativo (para recorte dos <i>spots</i>) das amostras (cepa Y) tratadas com peperobtusina A de <i>P. obtusifolia</i> . Os <i>spots</i> em destaque foram os que demonstraram maiores diferenças na expressão de proteínas.....	51
Figura 12: Gel Preparativo (para recorte dos <i>spots</i>) das amostras (cepa Y) tratadas com peperobtusina B de <i>P. obtusifolia</i> . Os <i>spots</i> em destaque foram os que demonstraram maiores diferenças na expressão de proteínas.....	57
Figura 13: Gel Preparativo (para recorte dos <i>spots</i>) das amostras (cepa Y) tratadas com piplartina de <i>P. tuberculatum</i> . Os <i>spots</i> em destaque foram os que demonstraram maiores diferenças na expressão de proteínas.....	63
Figura 14: Gel Preparativo (para recorte dos <i>spots</i>) das amostras (cepa Bol) tratadas com piplartina de <i>P. tuberculatum</i> . Os <i>spots</i> em destaque foram os que demonstraram maiores diferenças na expressão de proteínas.....	68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Concentração inibitória (CI ₅₀) das substâncias puras testadas nas cepas Y e Bol de <i>T. cruzi</i>	29
Tabela 2: Desenho experimental para marcação das amostras com os Cy Dye do kit DIGE.....	38
Tabela 3: Resultados da identificação de proteínas por PMF de <i>T. cruzi</i> (cepa Y) após tratamento com peperobtusina A de <i>P. obtusifolia</i>	52
Tabela 4: Resultados da identificação de proteínas por PMF de <i>T. cruzi</i> (cepa Y) após tratamento com peperobtusina B de <i>P. obtusifolia</i>	58
Tabela 5: Resultados da identificação de proteínas por PMF de <i>T. cruzi</i> (cepa Y) após tratamento com piplartina de <i>P. tuberculatum</i>	64
Tabela 6: Resultados da identificação de proteínas por PMF de <i>T. cruzi</i> (cepa Bol) após tratamento com piplartina de <i>P. tuberculatum</i>	69

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2D	Eletroforese bidimensional
APS	Persulfato de Amônio
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
CHAPS	Ciclohexalamino dimetilamônio propano sulfonado
Cl ₅₀	50% da concentração inibitória
DIGE	<i>Difference Gel Electrophoresis</i>
DMF	N,N - Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
DTT	Ditiotreitol
IEF	Focalização isoeletrica
IPG	<i>Immobilized pH Gradient</i>
LIT	Meio <i>Liver Infusion Tryptose</i>
MS	Espectrometria de massas
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2-5-difeniltetrazólio
MALDI	<i>Matriz Assisted Laser Desorption Ionization</i>
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NTD	<i>Neglected Tropical Diseases</i>
PAGE	<i>Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>
PEPEROBTUSINA B (CR1)	3,4 diidro-5-hidroxi-2,7-dimetil-8 (-2-metil-2-butenil)-2-(4metil-1,3-pentadienil)-2H-1-benzopirano-6-ácido carboxílico (cromano) da fração hexânica da folha de <i>Peperomia obtusifolia</i>
pI	Ponto Isoeletrico
PMF	<i>Peptide Mass Fingerprint</i>
PMSF	Fenilmetilsulfonilfluoreto
SDS	Dodecil sulfato de sódio
TOF	<i>Time of Flight</i>
TEMED	N,N - Tetrametiletlenodiamina

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
1.1. A doença de Chagas.....	18
1.1.1. Fases da doença.....	18
1.1.2. Formas evolutivas e ciclo biológico do parasito	20
1.1.3. Cepas de <i>Trypanosoma cruzi</i>	22
1.1.4. Medicamentos utilizados para o tratamento da doença	23
1.1.4.1. Mecanismo de ação do benzonidazol	24
1.2. Doenças Negligenciadas.....	25
1.3. Uso de plantas para fins medicinais.....	26
1.4. Família Piperaceae	26
1.4.1. Gênero <i>Piper</i>	27
1.4.2. Gênero <i>Peperomia</i>	28
1.5. Substâncias utilizadas para avaliar alterações no proteoma de <i>Trypanosoma cruzi</i>	28
1.6. Eletroforese bidimensional - DIGE (2D - DIGE)	30
1.7. Espectrometria de massas e MALDI - TOF - MS	31
2. OBJETIVOS.....	33
2.1. Geral	33
2.2. Específicos.....	33
3. MATERIAL E MÉTODOS	35
3.1. Cultivo de formas epimastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i>	35
3.2. Padronizações para eletroforese bidimensional.....	35
3.3. Experimento de eletroforese bidimensional (2D - DIGE).....	36
3.3.1. Cultivo dos parasitos e tratamento das células	36
3.3.2. Preparo das amostras	36
3.3.3. Quantificação de proteínas.....	37
3.3.4. Marcação das amostras com os fluoróforos Cy Dye (GE Healthcare) ...	37
3.3.5. Eletroforese em Primeira dimensão	39
3.3.5.1. Reidratação das tiras de gradiente de pH imobilizado	39
3.3.5.2. Focalização isoeletrica (IEF)	40
3.3.6. Equilíbrio das tiras de gradiente de pH imobilizado.....	40
3.3.7. Eletroforese em Segunda dimensão	41
3.3.8. Aquisição de imagem e coloração dos géis preparativos.....	42
3.3.9. Análise estatística dos resultados dos géis	42
3.3.10. Espectrometria de massas dos <i>spots</i> excisados dos géis preparativos	43
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
4.1. Padronizações Iniciais.....	45
4.2. Eletroforese Bidimensional (2D - DIGE).....	49
5. CONCLUSÃO	74
REFERÊNCIAS	76

1. INTRODUÇÃO

1.1. A doença de Chagas

A doença de Chagas é uma doença parasitária endêmica na América Latina, sendo os países mais afetados Brasil, Argentina, Chile, Colômbia e Venezuela (Rey, 2001). É causada por um protozoário hemoflagelado denominado *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909), pertencente ao subfilo Mastigophora, ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae e gênero *Trypanosoma* (Lana; Tafuri, 2000; Rey, 2001), e transmitida pelo inseto triatomíneo conhecido no Brasil como barbeiro, em 80 - 90% dos casos (Carneiro, 1963). *T. cruzi* também pode ser transmitido por transfusão sanguínea (5 – 20% dos casos), via placentária e durante aleitamento materno (0,5 – 8%), através de transplantes e alimentos processados (Mazza et al., 1936; Camandaroba et al., 2002; Coura; Castro, 2002).

Atualmente, entre 12 e 14 milhões de pessoas estão infectadas por *T. cruzi* e mais de 100 milhões habitam áreas endêmicas (Dias, 2007). A doença de Chagas é uma das principais doenças consideradas negligenciadas no mundo (Hotez et al., 2007), e foi descoberta em 1909 por Carlos Chagas que observou que a enfermidade afetava basicamente populações rurais extremamente pobres as quais viviam em moradias que permitiam uma condição ideal de domiciliação do inseto transmissor do parasito (Dias; Schofield, 1999).

1.1.1. Fases da doença

Essa doença apresenta duas fases clínicas sequenciais: a fase aguda, que é usualmente assintomática e começa logo que ocorre a infecção pelo parasito, durando algumas semanas e a fase crônica, que de 30 - 40% dos pacientes

infectados desenvolvem danos cardíacos ou digestivos depois de um período silencioso de anos a décadas (Chagas 1916, Laranja et al. 1956).

Em humanos, após a infecção e o período subsequente de incubação, a fase aguda da doença de Chagas se inicia, e na ausência de tratamento específico os sintomas persistem por aproximadamente dois meses, com taxa de mortalidade de 2 – 8%, especialmente entre crianças. *T. cruzi* é capaz de invadir e multiplicar-se dentro de diferentes células do hospedeiro, incluindo macrófagos, músculos liso e estriado, fibroblastos e até mesmo neurônios. A primeira reação ao *T. cruzi* é inflamação mononuclear devido à ruptura das células parasitadas. Dentro de dias a duas semanas pode-se detectar no soro sanguíneo a presença de imuno complexos, além de necrose do foco inflamatório. Inflamações severas geralmente são acompanhadas por necrose de células parasitadas e não parasitadas, especialmente no coração. Acúmulo de plaquetas, degranulação de eosinófilos, patologia microvascular, edema, trombose e isquemia também são encontrados (Andrade, 1999).

Após a infecção aguda, o paciente apresenta forte evidência de imunidade, mas há a tendência de permanecer infectado. Alguns parasitos escapam à resposta imune e lesões inflamatórias severas são vistas em vários órgãos. Formas amastigotas podem ser detectadas por histologia convencional, por imunofluorescência e marcadores genéticos por hibridização *in situ*. Entre as fases aguda e crônica da doença de Chagas ocorre um período de indeterminação da fase da doença na qual combina o aumento da imunidade contra o parasito com supressão imunológica específica de hipersensibilidade e redução da reação inflamatória (Andrade, 1999).

Na fase crônica que segue, a maioria dos pacientes continua assintomática, com 20 – 50% dos casos, de acordo com a área endêmica analisada, desenvolvendo os sintomas característicos dessa fase, nomeados cardíaco, digestivo ou distúrbios neurológicos (Brener et al., 2000).

A elevada positividade do xenodiagnóstico e hemocultura, e reativação da doença crônica por imunossupressão demonstram a presença do parasito em casos crônicos.

1.1.2. Formas evolutivas e ciclo biológico do parasito

T. cruzi apresenta as formas epimastigota, tripomastigota e amastigota (Figura 1). A forma epimastigota caracteriza-se por ser alongada, com cinetoplasto justanuclear e anterior ao núcleo e flagelo livre na porção anterior. Essa é a forma de replicação no hospedeiro invertebrado (triatomíneo) que se encontra na porção posterior do intestino e em cultura em meio líquido (Chagas, 1909; Lana; Tafuri 2000; Rey, 2001).

A forma tripomastigota é alongada, com cinetoplasto posterior ao núcleo, com flagelo que se estende por toda célula e torna-se livre na porção anterior. A forma tripomastigota é encontrada na circulação sanguínea do hospedeiro vertebrado, podendo estar presente também nos espaços intersticiais, no líquido cefalorraquidiano, leite, esperma e em cultura de células. Os tripomastigotas metacíclicos são morfologicamente semelhantes às formas tripomastigotas, sendo as formas infectantes liberadas nas fezes do vetor (Lana; Tafuri, 2000; Rey, 2001).

A forma amastigota é arredondada ou ovalada, com um flagelo curto que não se exterioriza (Lana; Tafuri, 2000). É a forma de replicação no hospedeiro vertebrado, presente no interior de vários tipos de células, mas predominantemente nas fibras musculares estriadas e lisas e no sistema fagocítico mononuclear e em cultura de células (Chagas, 1909; Lana; Tafuri, 2000; Rey, 2001).

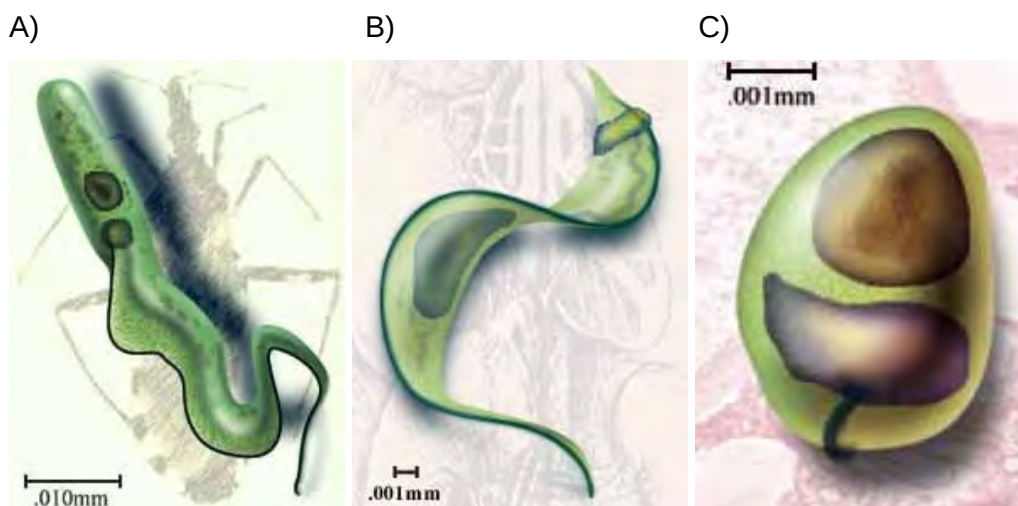


Figura 1: Morfologia de *T. cruzi*: A) epimastigota, B) tripomastigota e C) amastigota

Fonte: <http://www.uta.edu/chagas/html/biolTcru.html>

O ciclo biológico de *T. cruzi* (Figura 2) envolve obrigatoriamente a passagem através de hospedeiros vertebrados (mamíferos, incluindo o homem) e invertebrados (insetos triatomíneos hematófagos, sendo os principais gêneros: *Triatoma*, *Panstrongylus* e *Rhodnius*), em uma série de estágios. A forma tripomastigota ingerida pelo inseto diferencia-se na forma proliferativa epimastigota, que alcançando o intestino posterior, desenvolve-se na forma tripomastigota metacíclico. Essa última, quando invade as células do hospedeiro vertebrado, diferencia-se em amastigotas, que após inúmeros ciclos reprodutivos transforma-se em tripomastigotas, a forma responsável pela disseminação da infecção (Dias, 2000).

Podem ser distinguidos três ciclos de transmissão: o silvestre, que ocorre entre vetores e reservatórios presentes nos ecótopos naturais; o paredoméstico, no qual os animais parasitados vivem próximos das casas e podem ser sinantrópicos, como gambás e ratos; o doméstico, o qual apresenta animais domésticos e o homem, sendo os mamíferos de pequeno porte e que estão em contato com o ser humano, geralmente, reservatórios importantes. Podem ser citados *Canis familiaris* (cão), *Felis domesticus* (gato) e animais por eles ingeridos que pode os infectar, *Rattus rattus* (rato comum), *Rattus norvegicus* (ratazana do esgoto), *Mus musculus* (camundongo) e *Cavia porcellus* (cobaia) (Dias, 2005).

As variações morfológicas e o ciclo de vida se devem a uma adaptação aos distintos habitats e situações biológicas pelos quais passa o parasito (Rey, 1991; Dias, 2005).

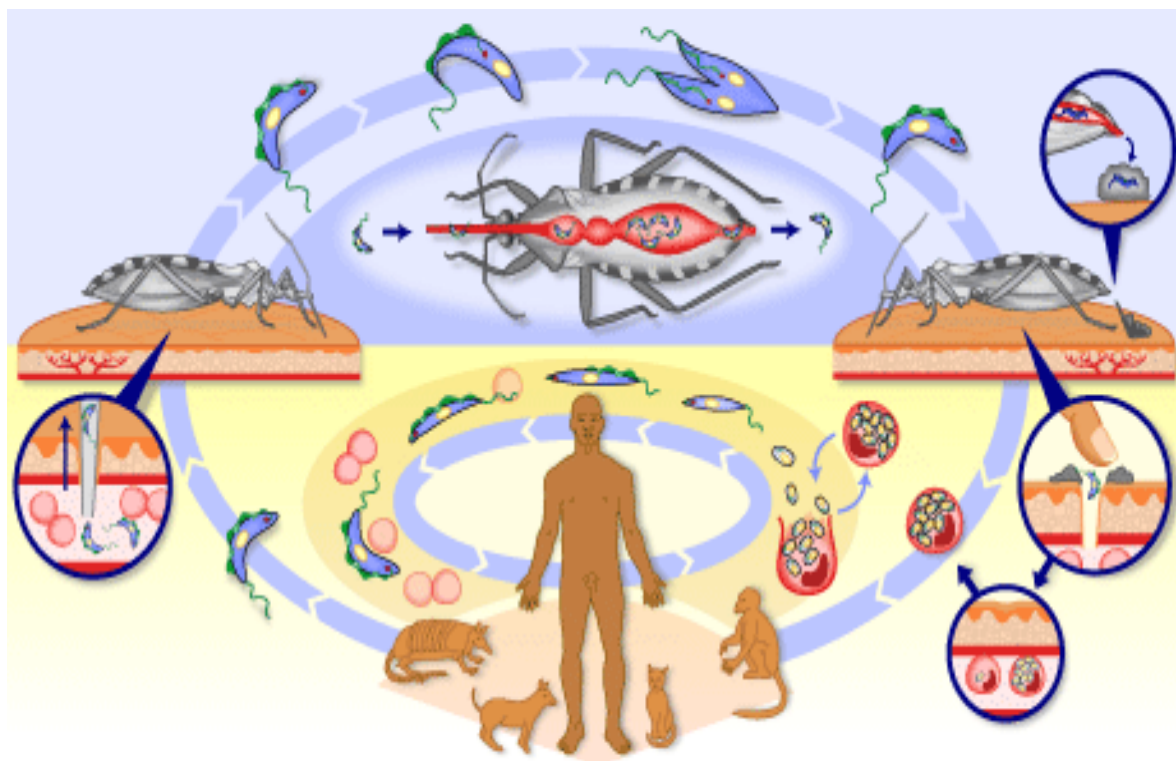


Figura 2: Ciclo biológico de *T. cruzi*

Fonte: <http://www.who.int/tdr/diseases/chagas/lifecycle.htm>

1.1.3. Cepas de *Trypanosoma cruzi*

Trypanosoma cruzi é caracterizado pela grande diversidade genética e fenotípica dentre os isolados (Tibayrenc; Ayala, 1991). Infecções naturais são constituídas por múltiplos clones com diferentes propriedades biológicas, como a virulência, taxa de crescimento, patogenicidade, tropismo tecidual e sensibilidade a compostos tripanocidas (Macedo; Pena, 1998). Baseado em marcadores bioquímicos e moleculares (Zingales et al., 1998), *T. cruzi* tem sido classificado em três diferentes grupos ou zimodemas (Miles et al., 1978) e mais recentemente em dois grandes grupos filogenéticos, designados como TcI, correspondente ao zimodema 1 (Z1) e TcII, correspondente aos zimodemas 2 (Z2) e 3 (Z3) (Souto et al., 1996; Fernandes et al., 1998). Cinco sublinhagens foram definidas dentro da linhagem II (IIa – e), associadas com o ambiente doméstico (IIb, IIc e IId) e selvagem (IIa e IIc) (Brisse et al., 2000; Tibayrenc, 2003).

A grande diversidade encontrada entre as cepas de *T. cruzi* e a resistência natural de algumas cepas a quimioterápicos (Andrade et al., 1985; Filardi; Brener, 1987) aumentam o número de pacientes tratados sem sucesso e limitam grandemente as opções de tratamento para a doença.

As duas cepas utilizadas neste trabalho foram: cepa Y (classificada como TcIIb), isolada de paciente chagásico e descrita por Silva e Nussenzweig (1953) e cepa Bol (TcIIId), isolada de triatomíneo em Vitichi – Bolívia por Funayama e Prado Júnior (1974). Ambas são cultivadas em nosso laboratório.

Por apresentarem diferenças na suscetibilidade frente ao medicamento padrão para o tratamento da doença de Chagas (Benzonidazol), sendo a cepa Y mais suscetível e cepa Bol mais resistente (vide Tabela 1), tais cepas foram selecionadas para realizar os experimentos propostos no presente trabalho.

1.1.4. Medicamentos utilizados para o tratamento da doença

No final de 1960 e início da década de 70, dois fármacos começaram a ser utilizados no tratamento da doença de Chagas: nifurtimox e benzonidazol, comercializados, respectivamente, com os nomes Lampit® e Rochagan® (Coura; Castro, 2002), sendo mais efetivos para eliminar os parasitos na fase aguda da doença, diminuindo o curso da infecção, desde que a doença não tivesse acometido o sistema cardiovascular (Saúde-Guimarães; Faria, 2007), induzindo a cura em 78% dos pacientes em fase aguda (Cançado, 2002). Entretanto, a eficácia de ambos no tratamento da fase crônica da doença limita-se a 8% de cura (Urbina; Docampo, 2003).

Os efeitos colaterais mais frequentes no tratamento com nifurtimox são anorexia, perda de peso, alterações psíquicas, excitabilidade ou sonolência e manifestações digestivas, como náusea, vômito e ocasionalmente cólica intestinal e diarreia. As reações adversas com benzonidazol podem ser classificadas em três grupos: (i) sintomas de hipersensibilidade, dermatite com erupções cutâneas, febre, edema generalizado, dor nas articulações e muscular; (ii) depressão da medula óssea, trombocitopenia púrpura e agranulocitose, a manifestação mais severa; (iii)

polineuropatia, parestesia e polineurite de nervos periféricos. As duas complicações mais sérias induzidas por benzonidazol são agranulocitose, iniciada por neutropenia, dor de garganta, febre e septicemia, e trombocitopenia púrpura caracterizada por redução de plaquetas, petéquias, bolhas hemorrágicas e sangramento de mucosa (Coura; Castro, 2002).

A baixa eficiência desses medicamentos juntamente com os efeitos colaterais indesejados impôs limitações em seu uso (Urbina; Docampo, 2003). Além disso, diferentes cepas de *T. cruzi* apresentam diversos níveis de suscetibilidade ao benzonidazol e nifurtimox (Filardi; Brener, 1987; Murta; Romanha, 1998; Toledo et al., 2004), o que pode explicar, em parte, as diferenças observadas na efetividade da quimioterapia. No Brasil, o nifurtimox foi retirado do mercado devido a seus efeitos colaterais (Lana; Tafuri, 2000; Rey, 2001). Dessa forma, o benzonidazol tornou-se a única alternativa para o tratamento, apesar de muitas críticas devidas também a seus efeitos colaterais e a pouca efetividade na fase crônica da doença. Até o presente, apesar dos estudos, não há vacinas disponíveis para a doença de Chagas. Portanto, a identificação de novos métodos quimioterápicos e vacinas são o maior desafio para o controle da doença (Urbina; Docampo, 2003).

1.1.4.1. Mecanismo de ação do benzonidazol

Um extenso estudo, nas últimas duas décadas, tem ajudado a compreender a base molecular da atividade antichagásica de benzonidazol. O modo de ação do benzonidazol é via intermediários que modificam covalentemente biomacromoléculas, e o mecanismo de ação proposto baseia-se na formação de radicais livres que, quando reduzidos, se ligam a lipídeos, proteínas e DNA lesando a célula (Dias de Toranzo et al., 1988; Urbina, 1999; Maya et al., 2007).

A ação do benzonidazol pode envolver ligações covalentes ou outras interações de intermediários de nitroredução com os componentes do parasito (Polak; Richle, 1978).

1.2. Doenças Negligenciadas

Um a cada seis indivíduos da população global, majoritariamente os mais empobrecidos, sofrem de uma ou mais doenças tropicais negligenciadas (NTDs). Essas doenças podem não resultar diretamente em elevadas taxas de mortalidade, ainda que causem morbidez, sofrimento e pobreza (Ehrenberg; Ault, 2005), podendo representar alto grau de absenteísmo ao trabalho.

Apesar disso, NTDs são de baixa prioridade para a indústria farmacêutica, carecendo de tratamentos seguros e efetivos; sofrem a omissão por parte de agências de saúde globais, recebendo poucos financiamentos; e, muitas vezes, são ignoradas pela mídia, raramente aparecendo como manchetes. Até mesmo autoridades em saúde pública pouco representam as NTDs, e deixam de exigir medidas compulsórias dos órgãos governamentais (Ehrenberg; Ault, 2005).

Recentemente, surgiu um movimento ativista pelas NTDs: *Drugs for Neglected Diseases Initiative* (DNDi), iniciado pelos Médicos sem Fronteiras (*Médecins Sans Frontières* – MSF) e o *Institute of OneWorld Health* (IOWH), ambos estimulando o desenvolvimento de novos medicamentos. Através de parcerias público-privadas, novos projetos tem surgido, sendo 63 em andamento até o final de 2004 (Moran, 2005).

Entre 1975 e 1999, dos 1.393 fármacos desenvolvidos, apenas 1% foi dirigido para tuberculose e doenças tropicais (Barrett; Gilbert, 2002), que estão englobadas entre as doenças negligenciadas e as extremamente negligenciadas, respectivamente.

Um estudo realizado em 2006 diz que nos últimos 30 anos, somente 10 medicamentos foram comercializados para doenças extremamente negligenciadas, esse número aumenta para 21 se medicamentos para malária e tuberculose forem incluídos (Chirac; Torreele, 2006).

Dentre as doenças mais negligenciadas estão; doença do sono, leishmaniose e doença de Chagas, que são doenças parasitárias que afetam pessoas em três continentes.

1.3. Uso de plantas para fins medicinais

O grande incremento do uso de plantas para fins medicinais tem provocado um renovado interesse pelo conhecimento das características das substâncias delas originadas, incluindo sua estrutura, composição química, propriedades farmacológicas e controle de qualidade, especialmente quando se trata de plantas brasileiras considerando a extensa e diversificada flora do país (Yunes et al., 2001).

Devido à imensa flora e aos aspectos culturais do uso de plantas na forma de extratos brutos ou infusões, sua utilização no tratamento de infecções no Brasil tornou-se uma prática muito comum (Calixto, 2000). Essa diversidade de bioatividades das plantas vêm trazendo o desenvolvimento de novos (fito)fármacos (Luize et al., 2005), apesar de no Brasil haver subexploração da flora nativa quanto à busca de novos fármacos.

Extratos derivados de plantas oferecem possibilidades de obtenção de novos componentes com atividade contra protozoários. Estudos em diferentes países, incluindo Brasil, Argentina, Bolívia, México e Colômbia vêm mostrando muitas plantas com atividade contra o *T. cruzi* (Muelas-Serrano et al., 2000; Weninger et al., 2001; Abe et al., 2002; Felipe et al. 2008; Lopes et al., 2008; Passerini, 2008; Cotinguiba et al., 2009; Regasini et al., 2009). Na literatura atual, existem investigações sobre a atividade tripanocida com uma grande variedade de extratos naturais, especialmente os vegetais, os componentes isolados e os semi-sintéticos (Coura; Castro, 2002; Passerini, 2008).

1.4. Família Piperaceae

A família Piperaceae, que está incluída entre as angiospermas basais e são encontradas nos trópicos como plantas pioneiras, tem sido o sujeito de numerosas investigações fitoquímicas (Felippe et al., 2008). As diversas espécies podem apresentar hábito arbustivo, arbóreo ou herbáceo, crescendo geralmente no interior ou na margem de formações florestais. A maioria das classes descritas inclui

fenilpropanóides (Orjala et al., 1993), lignanas e neolignanas (Martins et al., 2003), pironas (Singh, 1992), amidas alifáticas e aromáticas (Silva et al., 2002), alcalóides (Dodson et al., 2000), policetídeos (Cheng et al., 2003), derivados de ácidos benzóicos (Morandim et al., 2005) e cromenos (Morandim et al., 2005).

De acordo com Jaramillo et al. (2004), a Família Piperaceae compreende quatro gêneros, *Piper*, *Peperomia*, *Manekia* (antigamente *Sarcorrhachis*) e *Zippelia* (Wanke et al., 2007). *Piper* e *Peperomia* representam os mais importantes gêneros da família Piperaceae, com 2000 (Quijano-Abril et al., 2006) e 1700 (Wanke et al., 2006) espécies, respectivamente.

Economicamente, plantas pertencentes à família Piperaceae são empregadas para a produção de pimenta no mercado de condimentos de todo o mundo.

1.4.1. Gênero *Piper*

Com diferentes espécies amplamente distribuídas em regiões subtropicais e tropicais do mundo, o gênero *Piper* é uma das mais diversas linhagens entre as angiospermas (Jaramillo; Manos, 2001). Membros do gênero *Piper* são de importância comercial, econômica e medicinal.

As plantas do gênero *Piper* têm sido utilizadas para muitas aplicações, incluindo medicamentos na medicina tradicional da China, Índia (sistema Ayurvédico) e na América Latina (Ma et al., 2004). Apenas 12% de espécies do gênero *Piper* foram estudadas sob o ponto de vista fitoquímico (Parmar et al., 1997), as quais apresentaram uma grande variedade de metabólitos secundários, como neolignanas, alcalóides, lignanas, lactonas, chalconas, fenilpropanóides, amidas, flavonóides e óleos essenciais (Sengupta; Rey, 1987; Ma et al., 2004).

Espécies do gênero *Piper* são amplamente utilizadas na medicina popular e, dentre as atividades biológicas descritas para este gênero, podem ser citadas as atividades tripanocidas das *P. aduncum*, *P. gaudichaudianum* e *P. tuberculatum* (Batista Jr. et al., 2008), leishmanicida de *P. rangellii* (Luize et al., 2005); antifúngica de *P. regnellii* (Pessini et al., 2005), *P. aduncum*, *P. arboreum* e *P. tuberculatum*

(Navickiene et al., 2006); inseticida de *P. aduncum* e *P. hispidinervum* (Fazolin et al., 2005; Estrela et al., 2006), entre outras.

1.4.2. Gênero *Peperomia*

Algumas espécies e variedades de *Peperomia* são usadas como plantas ornamentais e também na medicina popular, para os mais variados tipos de doenças.

Dentre as atividades biológicas descritas para este gênero, podem ser citadas algumas espécies como *P. glabella*, utilizada na medicina popular como antiasmática (Monache; Compagnone, 1996), *P. dindygulensis* (Wu et al., 2006) e *P. duclouxii* (Li et al., 2006) como antitumorais, *P. vulcânica*, utilizada para tratamento de esterilidade (Mbah et al., 2002), *P. blanda* com ação tripanocida (Felippe et al., 2008; Lopes et al., 2008; Passerini, 2008), entre outras.

1.5. Substâncias utilizadas para avaliar alterações no proteoma de *Trypanosoma cruzi*

Dando continuidade ao trabalho desenvolvido em nosso laboratório com estudos da atividade tripanocida de substâncias isoladas de espécimes da família Piperaceae, foram escolhidas três substâncias (peperobtusinas A e B de *Peperomia obtusifolia* e piplartina de *Piper tuberculatum*) para serem testadas nas formas epimastigotas das cepas Y e Bol de *T. cruzi* quanto à influência nas proteínas do parasito para comparação com o benzonidazol, fármaco de uso corrente para a doença.

Tais substâncias foram estudadas previamente pelo método colorimétrico do MTT, para determinação das suas concentrações inibitórias (CI₅₀) (em µg/mL), que reduz em 50% a viabilidade celular dos parasitos. As CI₅₀ dessas substâncias nas

cepas Y e Bol de *T. cruzi* estão apresentadas na tabela 1 (extraído de Passerini, 2008 – dados não publicados).

Tabela 1: Concentração inibitória (CI₅₀) das substâncias puras testadas nas cepas Y e Bol de *T. cruzi*.

Substâncias	CI ₅₀ – Y		CI ₅₀ – Bol	
	µg/ mL	µM	µg/ mL	µM
Benzonidazol	9,01	34,62	25,00	96,06
Peperobtusina A de <i>P. obtusifolia</i>	6,45	19,76	7,22	22,12
Peperobtusina B de <i>P. obtusifolia</i>	8,64	23,32	22,72	61,33
Piplartina de <i>P. tuberculatum</i>	8,71	27,45	6,65	20,95

Na Figura 3 estão apresentadas as estruturas químicas das substâncias estudadas neste trabalho.

Análises de proteoma de *T. cruzi* após o tratamento com essas substâncias naturais podem ser realizadas utilizando a metodologia de eletroforese bidimensional – DIGE (GE Healthcare) para verificar as alterações na expressão de proteínas do parasito. Nesta técnica, utilizou-se a marcação das amostras (extratos de parasitas tratados e não tratados com as substâncias) com diferentes fluoróforos, tornando a análise dos géis mais segura e eficiente, sendo a captura de imagens realizada pelo *Typhoon™ Variable Mode Imager* (GE Healthcare).

Com esses experimentos, nossa equipe pretende iniciar um novo campo de estudos para avaliação dos efeitos de substâncias tripanocidas na expressão de proteínas em *T. cruzi*.

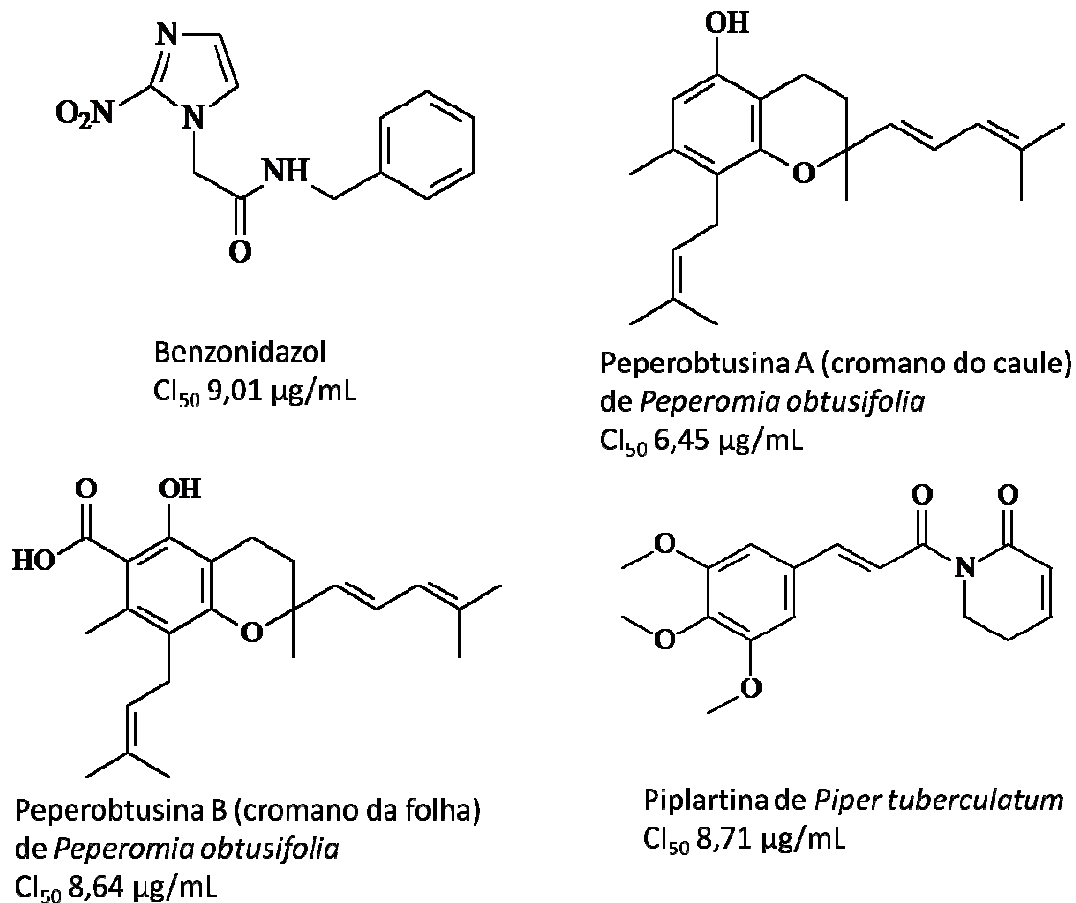


Figura 3: Estrutura química dos compostos em estudo (Cl₅₀ determinada para cepa Y).

1.6. Eletroforese bidimensional - DIGE (2D - DIGE)

“Two Dimensional Difference Gel Electrophoresis” (2D - DIGE) é uma metodologia desenvolvida para determinar com elevada precisão alterações na expressão de proteínas em proteomas de amostras biológicas (Minden et al., 2009). É uma técnica para separação de misturas complexas de proteínas por carga e tamanho, para escaneamento e análise das imagens resultantes dos géis bidimensionais pela busca de diferenças na expressão proteica. A técnica é baseada na marcação de amostras com fluoróforos (CyDye™ DIGE) o que permite a corrida e separação de duas amostras em um mesmo gel, além de um padrão interno. O

padrão interno é preparado misturando-se quantidades iguais de cada amostra do experimento e incluindo essa mistura em cada gel.

Combinando técnicas com propriedades inovadoras em fluorescência, múltiplas amostras e análises de imagens, 2D-DIGE é um sistema que oferece significantes benefícios em relação ao 2D convencional e por isso, essa técnica foi escolhida para os ensaios das substâncias frente ao proteoma de *T. cruzi*.

1.7. Espectrometria de massas e MALDI - TOF - MS

A espectrometria de massas (MS) tem sido utilizada para a análise de proteínas e peptídeos desde 1989, quando duas novas técnicas de ionização de moléculas grandes, polares e altamente carregadas foram introduzidas (Fenn et al., 1989; Karas; Hillenkamp, 1989). Em uma das técnicas, *electrospray ionization* (ESI), íons são formados a partir de uma solução líquida à temperatura e pressão, enquanto na segunda, *matrix assisted laser desorption ionization* (MALDI), um pulso de laser induz a amostra a sublimar a partir de uma matriz seca cristalina.

Há quatro tipos básicos de analisadores de massa utilizados para estudos de proteínas: *ion trap* (IT), *time of flight* (TOF), *quadrupole* (Q), e *Fourier transform ion cyclotron* (FT-ICR).

Experimentos de espectrometria de massas para a identificação de proteínas são baseados principalmente na análise de peptídeos. Espectrometria de massas pode medir a massa de proteínas intactas, mas a sensibilidade do espectrômetro de massa para proteínas é muito inferior quando comparada à análise de peptídeos, além disso, a massa de proteínas inteiras não pode ser medida com precisão suficiente para fins de identificação e, finalmente, proteínas são difíceis de manusear e a maioria das condições de solubilização não é compatível com o MS.

MALDI-TOF-MS tem avançado em suas aplicações de relevância nos últimos 10 anos, combinando resolução, precisão e sensibilidade na utilização de moléculas termolábeis e de elevada massa molecular. MALDI-TOF-MS tornou-se uma técnica popular e versátil para analisar uma série de macromoléculas de origem biológica em amostras complexas incluindo peptídeos, proteínas, oligossacarídeos e oligonucleotídeos.

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

O presente trabalho tem por objetivo analisar e comparar, utilizando a técnica de eletroforese bidimensional – DIGE (2D - DIGE), as alterações proteômicas em duas cepas de *T. cruzi* (Y e Bol), que apresentaram diferente suscetibilidade às seguintes substâncias (p. 30): peperobtusinas A e B de *Peperomia obtusifolia* e pipartina de *Piper tuberculatum*.

2.2. Específicos

1. Testar substâncias extraídas de plantas, cujos CI_{50} apresentaram-se relevantes quando comparados ao benzonidazol, fármaco padrão utilizado no tratamento da doença de Chagas, pela metodologia 2D - DIGE, na expressão de proteínas totais de duas cepas de *T. cruzi* com diferentes suscetibilidades às substâncias em estudo;
2. Analisar estatisticamente a expressão de algumas proteínas obtidas pela técnica de 2D - DIGE com intuito de verificar a influência da substância na expressão das proteínas do parasito, e posteriormente, realizar a excisão e digestão por tripsina dos *spots* de proteínas;
3. Realizar espectrometria de massas de spots excisados (*Peptide Mass Fingerprint* - PMF);
4. Analisar em bancos de dados públicos (NCBI), com auxílio do programa MASCOT, as sequências de peptídeos para identificação das proteínas de *T. cruzi* que sofreram alteração;
5. Inferir tentativamente uma possível influência bioquímica da substância em estudo no metabolismo do parasito.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Cultivo de formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*

As formas epimastigotas de *T. cruzi* foram escolhidas para os experimentos por serem formas não infectantes e de fácil manutenção em cultura em laboratório.

Os parasitos foram cultivados em meio LIT - *Liver Infusion Tryptose* (68,4 mM NaCl; 5,4 mM KCl; 56,3 mM Na₂HPO₄; 111 mM Dextrose; 0,3% *Liver Infusion Broth*; 0,5% *Tryptose*) (Fernandes; Castellani, 1966). O pH foi ajustado para 7,2 e a solução filtrada em papel de filtro e autoclavada. Após resfriada, adicionou-se 10% de soro fetal bovino estéril e inativado e 1% de hemin (2,5 mg/mL) também estéril. A temperatura mantida em estufa B.O.D. (FANEM) foi de 28 °C.

3.2. Padronizações para eletroforese bidimensional

Inicialmente, foi feita contagem de parasitos das cepas Y e Bol para determinar em que momento esses parasitos deveriam ser expostos às substâncias a serem testadas (p. 30), considerando-se o tempo máximo de incubação. A contagem dos parasitos foi feita durante 15 dias consecutivos (em câmara de Neubauer), e os números expressos em parasito/mL ($\times 10^7$). Foi utilizada uma placa de 96 poços e o volume de parasitos por poço foi de 200 μ L. A contagem se deu em triplicata.

Também foram realizadas curvas de crescimento da cepa Y de *T. cruzi* na presença de peperobtusinas A e B de *Peperomia obtusifolia*, respectivamente. Curvas de crescimento das cepas Y e Bol tratadas com pipartina de *Piper tuberculatum* foram realizadas. Todos os testes foram feitos em triplicatas utilizando placas de 96 poços, em volume de 200 μ L para controle (parasitos sem substância) e tratado com metade do CI₅₀ de cada substância. Esses testes auxiliaram na avaliação do tempo mais adequado para o preparo dos extratos protéicos.

3.3. Experimento de eletroforese bidimensional (2D - DIGE)

3.3.1. Cultivo dos parasitos e tratamento das células

Inicialmente, as substâncias (p. 30) foram solubilizadas em DMSO resultando em uma solução estoque na concentração de 20 mg/mL.

Culturas de parasitos com quatro dias de crescimento, em volume de 50 ml e 1×10^7 parasitos/ml foram tratadas com metade da concentração inibitória (CI_{50}) pré-determinada das seguintes substâncias: cepa Y com peperobtusina A de *Peperomia obtusifolia* por 48 h; cepa Y com peperobtusina B de *Peperomia obtusifolia* por 24 h; cepas Y e Bol tratadas com pipartina de *Piper tuberculatum* por 48 h. As culturas foram mantidas a 28°C.

Controles sem tratamento com as substâncias foram realizados. Os cultivos do parasito foram feitos em triplicata biológica, tanto para as amostras tratadas como para os controles.

Cada tratamento e os demais procedimentos com as amostras deram origem a quatro experimentos, cujos resultados foram detalhados separadamente.

3.3.2. Preparo das amostras

Passado o tempo de tratamento com as substâncias, as culturas foram centrifugadas (3000 g, 5 min, 4°C), o sobrenadante descartado e os pellets lavados três vezes em *trypsin wash* (100 mM NaCl, 3 mM $MgCl_2$, 20 mM Tris-HCl, pH 7,5) para a retirada do meio de cultura e ressuspensos em 0,5 mL de tampão de lise (Uréia 7M; Tiouréia 2M; CHAPS 4%; Tris 40 mM) contendo inibidores de protease (PMSF 0,1 mg/ml; 1 μ L DTT (1M), 1 μ L Pepstatina (1 mg/mL), 1 μ L Aprotinina (10 mg/mL) e 1 μ L Leupeptina (10 mg/mL)). A lise dos parasitos se deu por 2h, à temperatura ambiente e rotação constante. As amostras foram centrifugadas (14000 g, 10 min, 4°C) para a retirada de componentes insolúveis e o

sobrenadante, contendo as proteínas solúveis, teve seu pH medido em tiras para teste de pH (faixa 4,5 – 10,0) (Sigma-Aldrich) e depois foi armazenado a - 80°C até o momento do uso.

3.3.3. Quantificação de proteínas

Após a lise, a quantificação das proteínas foi feita pelo método de Bradford (1976), tendo BSA como padrão. A partir de uma solução de BSA na concentração de 2mg/mL foram feitas diluições seriadas em água Milli-Q até a concentração de 0,125 mg/mL. A cada diluição foi adicionado: 10 µL tampão de eluição da proteína, 780 µL de água Milli-Q e 200 µL de reagente de Bradford. O preparo da amostra foi da seguinte forma: 10 µL de amostra, 790 µL de água Milli-Q e 200 µL de reagente de Bradford. As reações foram incubadas por 5 min em temperatura ambiente. As absorbâncias foram lidas em espectrofotômetro (Beckman DU 530 – Life Science UV/Vis Spectrophotometer) a 595 nm. A comparação da absorbância das amostras com a curva padrão gerada pelas diluições seriadas permitiu a determinação da concentração de proteínas.

3.3.4. Marcação das amostras com os fluoróforos Cy Dye (GE Healthcare)

Inicialmente, os fluoróforos do kit DIGE, *Cy Dye 2, 3 e 5 (Cy Dye Minimal Label* – GE Healthcare) foram solubilizados em DMF (Sigma), sendo de 5 nmol/µL a concentração dessa solução estoque. A solução de trabalho foi diluída em DMF, a partir da solução estoque, para atingir a concentração de 400 pmol/µL.

Alíquotas referentes a 50 µg de proteínas de cada réplica do experimento (com e sem tratamento) foram tomadas e marcadas com os fluoróforos do kit DIGE em pH de 8,5 (ideal), por 30 min, em gelo, ao abrigo da luz. A reação foi terminada

por Lisina 10 mM, por 10 min, em gelo, ao abrigo da luz. As triplicatas biológicas foram marcadas com os fluoróforos conforme tabela 2.

Tabela 2: Desenho experimental para marcação das amostras com os *Cy Dye* do kit DIGE.

Marcação das amostras			
	Padrão interno 1	Controle 1	Tratado 1
GEL 1	(50 µg proteínas – 1 µL de Cy2)	(50 µg proteínas – 1 µL de Cy3)	(50 µg proteínas – 1 µL de Cy5)
	Padrão interno 2	Controle 2	Tratado 2
GEL 2	(50 µg proteínas – 1 µL de Cy2)	(50 µg proteínas – 1 µL de Cy5)	(50 µg proteínas – 1 µL de Cy3)
	Padrão interno 3	Controle 3	Tratado 3
GEL 3	(50 µg proteínas – 1 µL de Cy2)	(50 µg proteínas – 1 µL de Cy3)	(50 µg proteínas – 1 µL de Cy5)
GEL 4	PREPARATIVO (gel de recorte de <i>spots</i>) (500 µg de proteínas)		

Os padrões internos, que correspondem à mistura de todas as amostras, foram utilizados para minimizar a variação que ocorre de um gel para outro. Depois da marcação com os fluoróforos, as amostras foram misturadas, uma vez que, cada gel deve conter um padrão interno (marcado com Cy2), um controle e a amostra tratada, conforme apresentado na tabela 2. Cada fluoróforo possui comprimento de onda específico de excitação para haver a captura das imagens de cada *Cy Dye*; Cy2 Laser *Blue* 488 nm; Cy3 Laser *Green* 532 nm; Cy5 Laser *Red* 633 nm.

Também foram feitos géis preparativos para cada experimento contendo 500 µg de proteínas (não marcadas com fluoróforos) representando todas as amostras, tanto controles como tratadas. Esses géis foram corados pelo *Coomassie Blue G* (0,1%), dos quais foram recortados, posteriormente, os *spots* de interesse.

3.3.5. Eletroforese em Primeira dimensão

A eletroforese em primeira dimensão consiste na separação da amostra em tiras (*Immobiline DryStrip* - GE Healthcare) de gradiente de pH imobilizado (ou IPG) baseando-se no ponto isoelétrico das proteínas. A faixa de pH utilizado foi de 3 – 10 em tiras de 13 cm. As tiras de IPG foram reidratadas e seguiram para a focalização isoelétrica, como descrito a seguir.

3.3.5.1. Reidratação das tiras de gradiente de pH imobilizado

Após a marcação das amostras com os fluoróforos *Cy Dye*, as alíquotas foram misturadas e o volume completado com tampão de reidratação (*DeStreak Rehydration Solution* - GE Healthcare) para um total de 250 µL acrescido de 1 µL de anfólitos (*IPG Buffer* pH 3-10 – GE Healthcare), capacidade tolerável da tira de IPG de 13 cm para absorção total da amostra durante a reidratação, de acordo com o fabricante.

Para reidratação, procedeu-se da seguinte forma: em um suporte composto por canaletas (IPG Box – GE Healthcare) foi adicionado à amostra próximo à extremidade da canaleta. O plástico protetor da tira de IPG foi retirado cuidadosamente com auxílio de pinça. Então, a tira, com o gel voltado para baixo, foi deslizada sobre a amostra com o devido cuidado para não haver formação de bolhas. O suporte de canaletas foi fechado para manter as tiras ao abrigo da luz devido à fluorescência e mantido em temperatura ambiente por 20 h para que o gel da tira de IPG absorvesse toda a amostra contendo as proteínas de *T. cruzi*.

O mesmo processo foi repetido para todas as amostras, inclusive para as tiras contendo amostras sem marcação por fluorescência, para que as condições fossem as mesmas em cada experimento.

3.3.5.2. Focalização isoeletrica (IEF)

Após a reidratação das tiras de IPG, estas foram transferidas para um suporte de cerâmica (*Ettan IPGphor Manifold* – GE Healthcare) também composto por canaletas, que compõe o aparelho *Ettan IPGphor II Isoelectric Focusing System* (GE Healthcare), responsável pela focalização isoeletrica.

As tiras foram posicionadas no *manifold* com o gel voltado para cima e todas as canaletas do *manifold* foram cobertas com óleo mineral (*Dry Strip Cover Fluid* – GE Healthcare). Papéis de filtro umedecidos (*Paper wicks* – GE Healthcare) foram colocados nas extremidades das tiras e somente então foram posicionados os eletrodos sobre os papéis de filtro, fazendo contato com as tiras de IPG.

A focalização isoeletrica se deu a temperatura de 20°C e amperagem de 50 µA por tira. Para a IEF foi utilizado o seguinte protocolo, de quatro etapas: 200 V, 12 h; 1000 V, 1000 Vh; 8000 V, 8000 Vh; 8000 V, 20000 Vh, acumulando 31400 Vh.

Após a IEF, as tiras foram colocadas em tubos de ensaio com tampa e armazenadas imediatamente em freezer -80°C, até prosseguir o experimento. Os tubos com tiras contendo amostras marcadas por fluorescência foram envolvidos por papel alumínio, para mantê-los ao abrigo da luz.

3.3.6. Equilíbrio das tiras de gradiente de pH imobilizado

Para dar prosseguimento com a segunda dimensão, as tiras de IPG submetidas anteriormente à focalização isoeletrica foram equilibradas adicionando 5mL de tampão de equilíbrio (6 M uréia, 50 mM Tris-HCl 1,5 M, pH 8,8, 30% glicerol, 2% SDS, gotas de azul de bromofenol 1%) contendo 50mg de DTT (10 mg/mL), durante 15 min, sob agitação suave. Essa solução foi substituída por 5 mL de solução de equilíbrio acrescida de 125 mg de iodoacetamida (25 mg/mL), também por 15 min e agitação suave.

Após essa etapa de equilíbrio, as tiras foram submersas duas vezes em tampão Tris-glicina (25 mM Tris base, 250 mM glicina, 0,1% SDS 10%) e submetidas imediatamente à eletroforese vertical em SDS-PAGE.

Utiliza-se DTT nessa etapa, para romper as pontes dissulfeto desestabilizando a estrutura tridimensional das proteínas e a iodoacetamida pode alquilar grupos sulfidril e prevenir sua reoxidação. A utilização desses compostos garante a separação das proteínas para que interajam com o SDS (Görg et al., 2004).

3.3.7. Eletroforese em Segunda dimensão

A eletroforese em SDS-PAGE para a separação das proteínas por massa molecular, que consiste na eletroforese em segunda dimensão, foi realizada com o auxílio da cuba *SE 600 Ruby* (GE Healthcare), placas de vidro 16 x 18 cm e espaçadores de 1 cm x 16 cm x 1,5 mm. A separação das proteínas foi realizada em SDS-PAGE 12,5% (41,67% Solução de acrilamida 30%, 25% Tris-HCl 1,5 M pH 8,8, 1% SDS 10%, 1% APS 10%, 0,04% TEMED) e preparados no dia anterior à corrida para garantir a polimerização completa. As tiras de IPG submetidas à focalização isoelétrica e equilíbrio foram posicionadas horizontalmente e em contato com o topo de cada gel. As tiras foram mantidas nessa posição utilizando 1 mL de agarose *sealing* (0,5% agarose M em tampão Tris-glicina adicionado de gotas de azul de bromofenol) para cada gel. Na cuba de eletroforese foram adicionados 4 L de tampão Tris-glicina (25 mM Tris base, 250 mM glicina, 0,1% SDS 10%).

Durante a eletroforese, a corrente utilizada foi de 10 mA/ gel por 45 min, e 30 mA/ gel até que o azul de bromofenol atingisse 1cm da parte inferior do gel; além de 100 W e 600 V, sob refrigeração em câmara fria (4°C).

3.3.8. Aquisição de imagem e coloração dos géis preparativos

As imagens dos géis contendo as amostras marcadas com os fluoróforos foram capturadas imediatamente após o término da segunda dimensão pelo equipamento *Typhoon™ Variable Mode Imager* (GE Healthcare), utilizando o programa *Typhoon Scanner Control* (GE Healthcare).

O gel preparativo (contendo amostras não marcadas com fluoróforos) foi colocado em um recipiente em contato com solução fixadora (45% etanol e 10% ácido acético glacial) durante 15 min, em agitação. Essa solução foi descartada e então o gel foi encoberto por solução de *Coomassie Blue G* (0,1%) (Sigma-Aldrich) (preparada conforme recomendações do fabricante), permanecendo durante a noite (*overnight*) em agitação. O gel foi descorado com solução descorante (40% etanol e 10% ácido acético glacial) sob agitação, sendo a solução substituída até que fosse possível a visualização dos *spots*. O gel descorado foi mantido em água (Milli-Q) e sob refrigeração até o recorte dos *spots* de interesse.

3.3.9. Análise estatística dos resultados dos géis

Após a digitalização das imagens dos géis as análises estatísticas das imagens foram processadas com o auxílio do programa *ImageMaster™ 2D Platinum*, com o qual foi possível observar diferenças na expressão das proteínas, ou seja, aquelas que se apresentaram mais ou menos expressas na presença das substâncias. Com esse software foi possível detectar diferenças no volume dos *spots* de menos de 10% entre as amostras com 95% de confiança estatística (GE Healthcare Handbook).

Após essas análises foram selecionados e excisados manualmente do gel preparativo com o auxílio de um bisturi, 10 *spots*, sendo cinco em que o tratado mostrou maior expressão em relação ao controle e outros cinco *spots* em que a expressão foi menor, para cada experimento.

3.3.10. Espectrometria de massas dos *spots* excisados dos géis preparativos

Os *spots* de interesse excisados do gel preparativo foram descorados com 50% acetonitrila/ 0,1 M bicarbonato de amônio, pH 8,0. Os géis foram desidratados com acetonitrila pura e secos em *Speed-vac* (Savanti, NY) por 30 min. Os géis foram intumescidos com 0,5 µg de tripsina modificada (Promega, Madison, WI) em 20 µL de 0,1 M bicarbonato de amônio, pH 8,0 e cobertos com mais 100 µL de 0,1 M bicarbonato de amônio, pH 8,0 por 22 h a 37°C. A hidrólise por tripsina foi paralisada com 5 µL de ácido fórmico puro. Os peptídeos tripsinizados foram extraídos e dessalinizados em microponteira obstruídas com lã de vidro POROS 50 R2 (PerSeptive Biosystems) previamente equilibradas em 0,2% ácido fórmico e eluídas com 60% metanol/ 5% ácido fórmico para análises por espectrometria de massas. As amostras foram diluídas em matriz CHCA 5 mg/mL (alfa-cyano-4-hydroxycinnamic acid, Sigma, USA) com 50% acetonitrila/ 0,1% TFA (ácido trifluoroacético) e 2-3 µL foram depositados em placas Maldi utilizando o método da gota seca. Análises por espectrometria de massas foram feitas em MALDI-TOF/TOF (AXIMA PERFORMANCE, Kratos-Shimadzu, Manchester, UK) e os espectros MS/MS dos peptídeos tripsinizados foram submetidos diretamente ao programa MASCOT contra o banco de dados NCBI para identificação das proteínas de *T. cruzi*.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Padronizações Iniciais

Os gráficos apresentados nas figuras 4 e 5 mostram as curvas de crescimento na fase logarítmica (7 dias) e estacionária (8-14 dias) das cepas Y e Bol de *T. cruzi*, respectivamente. Optou-se por incubar os parasitos (ambas as cepas) durante quatro dias em meio LIT (*Liver Infusion Tryptose*), para garantir que eles estivessem em fase “log” exponencial de crescimento, e somente depois adicionar a substância, incubando pelo tempo máximo de três dias. O número de células inicial adequado para os experimentos foi de 1×10^7 parasitos/mL.

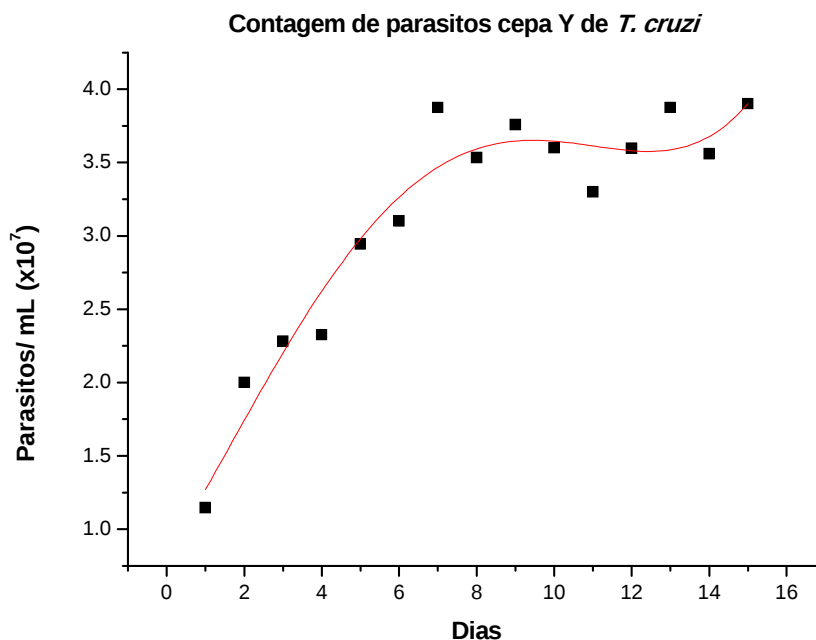


Figura 4: Curva de crescimento das formas epimastigotas de *T. cruzi* (cepa Y) durante 15 dias (controle sem substâncias).

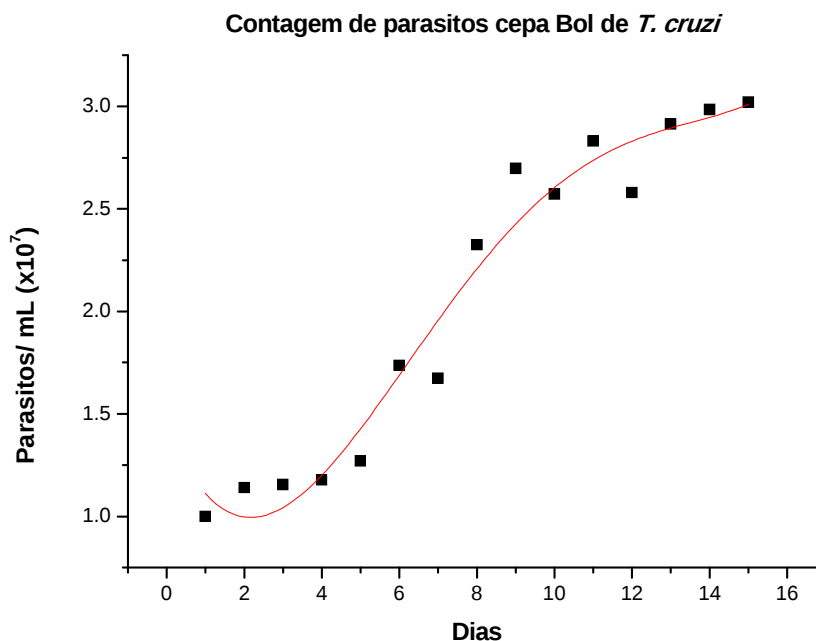
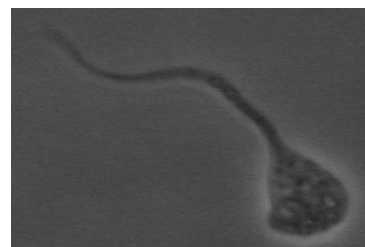
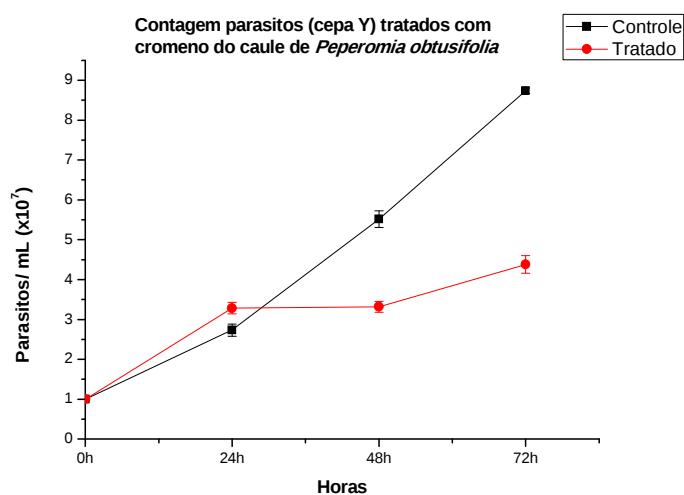


Figura 5: Curva de crescimento das formas epimastigotas de *T. cruzi* (cepa Bol), durante 15 dias (controle sem substâncias).

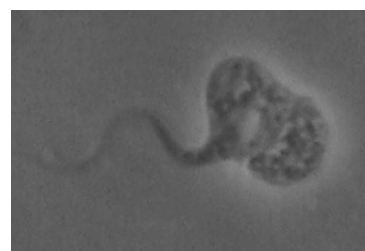
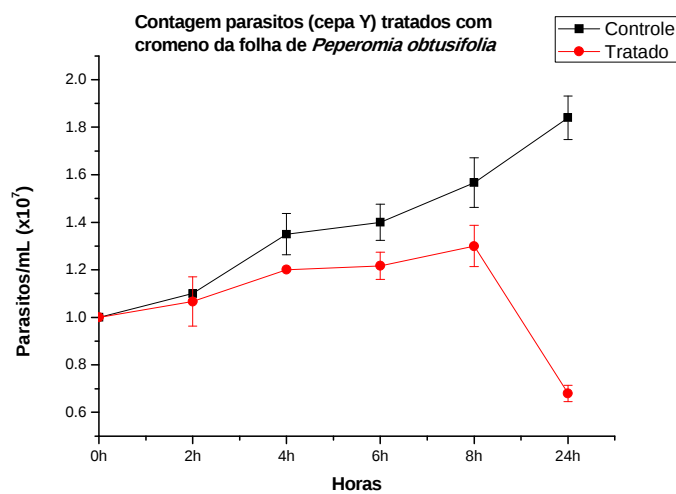
A figura 6 ilustra o padrão de crescimento da cepa Y de *T. cruzi* tratada com peperobtusina A (p. 30) de *Peperomia obtusifolia* após 48 h de contato do parasito com a substância houve queda na viabilidade celular além da observação de modificações morfológicas. Para o tratamento da cepa Y com peperobtusina B de *Peperomia obtusifolia* (Figura 7), o tempo de 24 h pareceu o mais adequado para proceder com os experimentos de 2D-DIGE, uma vez que foi possível observar queda na viabilidade dos parasitos e diminuição de movimento dos flagelos. O tempo de 48 h de exposição à substância pareceu ser o mais indicado para realizar os experimentos de 2D-DIGE para as cepas Y e Bol de *T. cruzi* tratadas com piplartina de *Piper tuberculatum* (Figuras 8 e 9, respectivamente). Ao lado dos gráficos da curva de crescimento do parasito tratado com as substâncias citadas são apresentadas fotos obtidas por microscopia de contraste de fase das modificações morfológicas ocorridas com os parasitos ainda vivos após tratamento com a respectiva substância (as figuras foram extraídas de Passerini, 2008).



48h de tratamento.

Fonte: Passerini, 2008.

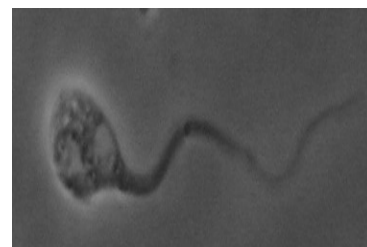
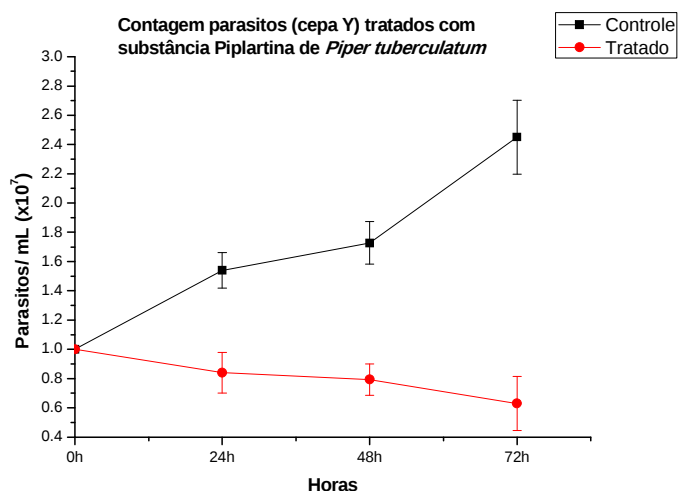
Figura 6: Curva de crescimento da forma epimastigota de *T. cruzi* (cepa Y) tratada com peperobtusina A de *Peperomia obtusifolia*.



24h de tratamento.

Fonte: Passerini, 2008.

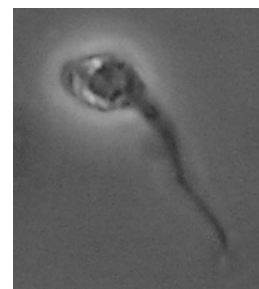
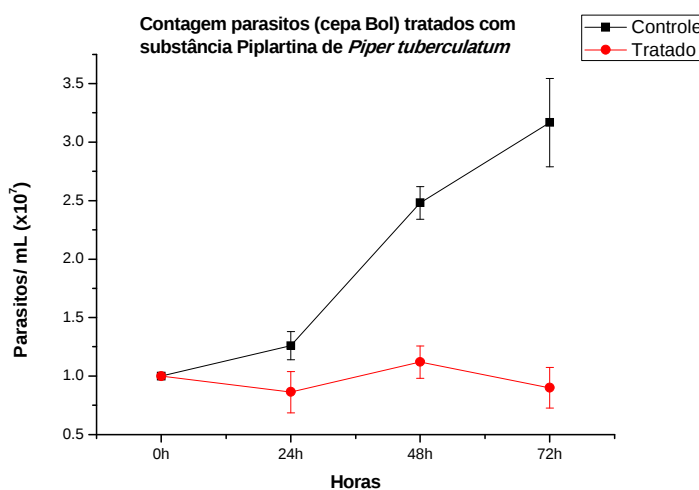
Figura 7: Curva de crescimento da forma epimastigota de *T. cruzi* (cepa Y) tratada com peperobtusina B de *Peperomia obtusifolia*.



48h de tratamento.

Fonte: Passerini, 2008.

Figura 8: Curva de crescimento da forma epimastigota de *T. cruzi* (cepa Y) tratada com piplartina de *Piper tuberculatum*.



48h de tratamento.

Fonte: Passerini, 2008.

Figura 9: Curva de crescimento da forma epimastigota de *T. cruzi* (cepa Bol) tratada com piplartina de *Piper tuberculatum*.

A concentração escolhida das substâncias (p. 30) para os testes de 2D-DIGE foi a metade da CI_{50} , previamente determinada, uma vez que, a intenção foi deixar o parasito em contato com a substância, pelo menor tempo possível, a fim de não matar o parasito, mas que fosse suficiente para manter uma quantidade de células que possibilitasse a observação de diferenças na expressão das proteínas relativamente às substâncias.

4.2. Eletroforese Bidimensional (2D - DIGE)

A seguir, a título de exemplo, a figura 10 apresenta as imagens capturadas de um dos géis de cada experimento realizado, contendo padrão interno (A), amostra controle (B) e tratada (C) com peperobtusina A e B de *P. tuberculatum* (ambas em cepa Y) e piplartina de *P. obtusifolia* (cepas Y e Bol) marcados com os fluoróforos do kit DIGE.

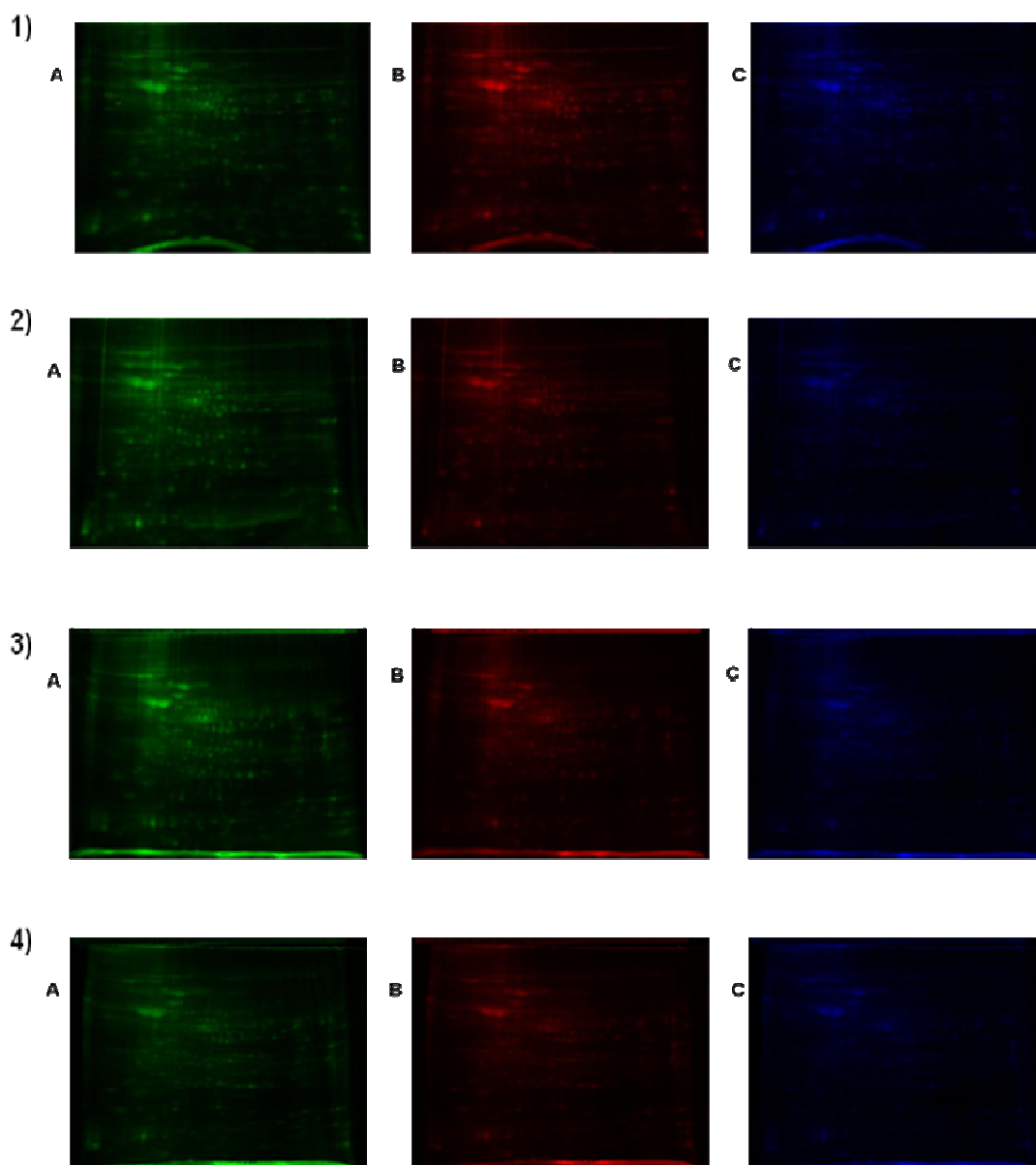


Figura 10: Géis 2D - DIGE marcados com os fluoróforos: A) Padrão interno - Cy 2; B) Controle - Cy 3; e C) Tratado - Cy 5. Sendo o tratamento com: 1) Peperobtusina A de *P. obtusifolia* (cepa Y). 2) Peperobtusina B de *P. obtusifolia* (cepa Y). 3) Piplartina de *P. tuberculatum* (cepa Y). 4) Piplartina de *P. tuberculatum* (cepa Bol).

Os géis preparativos (para recorte dos *spots*) (Figuras 11 a 14) referem-se àqueles representativos das amostras tratadas com peperobtusinas A e B de *P. tuberculatum* (ambas em cepa Y) e piplartina de *P. obtusifolia* (em cepa Y e Bol) (p. 30), respectivamente. Após as análises das imagens digitalizadas dos géis foram detectados 387 *spots* (Figura 11) relativos o tratamento com peperobtusina A de *P. tuberculatum* em cepa Y de *T. cruzi*, sendo destacados aqueles que demonstraram diferenças significativas na expressão de proteínas, após as análises estatísticas com o auxílio do programa *ImageMaster™ 2D Platinum*. Foram determinados 416 *spots* relativos ao tratamento com peperobtusina B (Figura 12) de *P. tuberculatum* em cepa Y de *T. cruzi*. Enquanto para as cepas Y e Bol tratadas com piplartina de *P. tuberculatum* foram, respectivamente, 360 e 371 *spots* identificados (Figuras 13 e 14, respectivamente).

De cada um dos géis preparativos foram selecionados e excisados manualmente 10 *spots*, sendo cinco que mostraram maior expressão da proteína em relação ao controle e outros cinco *spots* em que a expressão foi menor. Tais *spots* (destacados por círculos vermelhos em cada gel preparativo) foram submetidos à espectrometria de massas e os resultados estão apresentados nas Tabelas 3 a 6.

A espectrometria de massas é uma metodologia de alto custo e que ainda não está disponibilizada na Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Unesp - Araraquara, onde esse trabalho foi desenvolvido, por essa razão foi realizada na colaboração com o Centro de Química de Proteínas da FMRP-USP, sob coordenação dos Drs. José Cesar Rosa e Lewis Joel Greene. Assim, apenas foi possível realizar a análise de 10 *spots* relativos a cada um dos tratamentos.

A figura 11 e a tabela 3 apresentam os resultados do tratamento da cepa Y de *T. cruzi* com peperobtusina A de *P. obtusifolia* (p. 30).

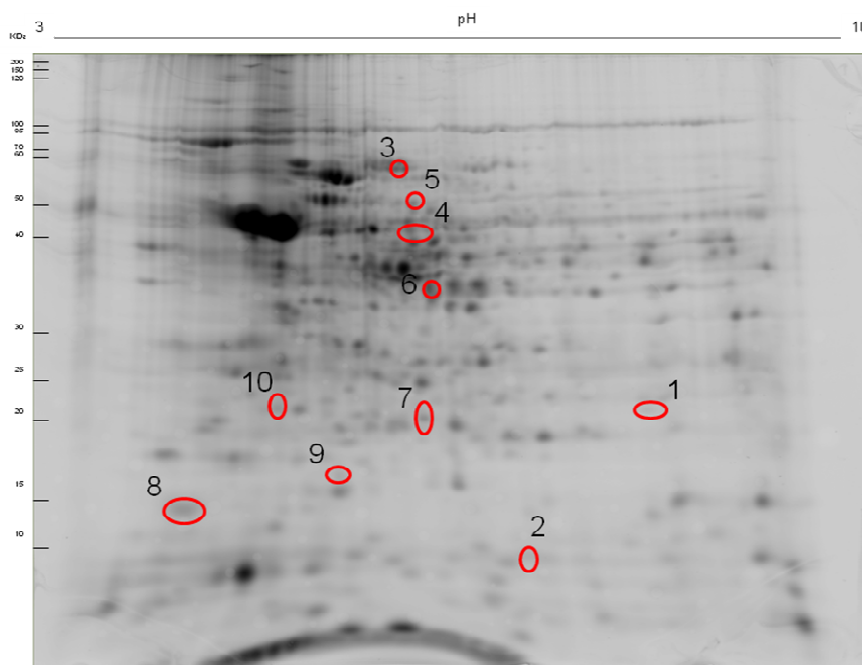


Figura 11: Gel Preparativo (para recorte dos *spots*) das amostras (cepa Y) tratadas com peperobtusina A de *P. obtusifolia*. Os *spots* em destaque foram os que demonstraram maiores diferenças na expressão de proteínas.

Tabela 3: Resultados da identificação de proteínas por PMF de *T. cruzi* (cepa Y) após tratamento com peperobutrina A de *P. obtusifolia*

Spot ^a	Volume (%)			NCBI		MASCOT				
	Controle	Tratado	Proteína	Número de acesso	Peptídeos	Massa (Da)	Score ^b	pI	Cobertura (%) ^c	Função
1	+ 1,13785		2 – hidroxí – 3 – oxopropionato reductase	gij71656155	AGFLVWFNR LFAGNREPFGK GGAAQCWTLDVVKPQR EGVYSGISPGAIFIDNSTIK	32216	313	8,19	18,50	Processo metabólico de D-galactarato
2	+ 1,14360		Ribose 5 – fosfato isomerase	gij71403000	TAESVDYDPDFASR IHNDANIVCVGER EAGDEFVPVYCGPK AALCHDHYTAAMSR AALCHDHYTAAMSR EIIITFLQTPFSGEER	17590	466	6,65	44,00	Desvio das pentoses, braço não oxidativo
3	+ 1,15095		Proteína bastão do paraflagelar	gij162179	FIQENLDR AQELLSSVEGGTK LQVHOEYLEAFR IGQTEDENKPFGR LLELSVYNCDLAMR SQLDASEMAQVPVAVLK NVAIADGEMAIAEEOYIK EASGAVGPADQQQPAVPEVT DVTLEAAR	70004	679	5,85	20,80	Composição flagelar
4	+ 1,15198		Imidazolonepropio -nase	gij71407562	LNGASYMDVQR WADVLLHAPR VLLPGFVDATHPVWDGDR GMLLFHNAEQVVQVCGGER	47303	251	5,75	14,20	Catabolismo da histidina (atividade de hidrolase)
5	+ 1,16445		Proteína hipotética	gij71661816	LIINYDVDPAR INVAAALEKPVNLTR IPGHNENAYTMAATATLR IGFLGLGTESTSDNSAGSIIVR	55153	388	6,17	13,20	--
6	+ 1,13706		Proteína D - isômero específico 2 – hidroxíácido desidrogenase	gij71420052	GASVDVFER TANLVPSVR FIGLVNEYAK RLDTYLVDPVR GITQNEDDLACALR VLWIYSLTAGVDVYR AEHKWDPFLMVELR ESDFVWNILPGTEETIKR	38795	579	6,04	29,40	Reoxidação do NADH citosólico

Tabela 3: Resultados da identificação de proteínas por PMF de *T. cruzi* (cepa Y) após tratamento com o peperobtusina A de *P. obtusifolia* – **Continuação**

7	+ 1,15039	Piruvato diquinase	fosfato	gij 71658999	ATAEAWIR FVYDSYR FVYFGGQK KFVYFGGQK ELTEEYLVLFQR RVEADMGTFNFGDVENPLL FSVR	101705	373	8,42	6,50	Fosforilação
8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9	+ 1,19623	Proteína ligação 1	de	gij 71657614	FDEGENQWK YEVWWQETAK FAPVDVQSGEEK DYTDDEEGFPENFVMR	18089	300	5,46	29,90	Transporte nuclear (inibição da GDP- dissociação)
10	+ 1,23882	Triparedoxina peroxidase		gij 71408703	WQAFQYVDK HITVNDLPVGR DYGVLIEEQGISLR NKGGLGEMSIPLVSLDLTK NGDVIPCNCNWRPGKPTMK NGDVIPCNCNWRPGKPTMK INTQWAVAVSCDSQYSHLA WINTPR	25734	557	5,96	41,60	Resposta ao estresse oxidativo

a - Número dos spots correspondendo àqueles indicados na Figura 5

b - Probabilidade baseada em MOWSE (*Molecular Weight Search*) na identificação de proteínas pelo programa MASCOT

c- Porcentagem de cobertura prevista da sequência proteica por correspondência de peptídeos através do programa MASCOT

Para a amostra (cepa Y) tratada com peperobtusina A de *P. obtusifolia* (p. 30) somente foram identificadas nove dos dez *spots* analisados, pois uma amostra foi perdida durante o preparo para a espectometria de massas.

Foi possível destacar a proteína do bastão paraflagelar e triparedoxina peroxidase (Tabela 3: *spots* 3 e 10), ambas importantes para o parasito, na composição flagelar e proteção natural ao estresse oxidativo, respectivamente.

Proteína do bastão flagelar teve sua expressão diminuída após o tratamento com a substância, enquanto que para a enzima triparedoxina peroxidase foi observado um aumento de sua expressão na amostra tratada. Como ocorre com o benzonidazol, a substância utilizada nesse experimento, provavelmente, gerou espécies reativas de oxigênio, o que fez aumentar a expressão da enzima triparedoxina peroxidase, envolvida na detoxificação celular no parasito. Devido à composição flagelar do parasito, a diminuição na formação do bastão flagelar pode torná-lo mais suscetível à morte.

As proteínas identificadas são descritas a seguir.

- **Triparedoxina peroxidase**

Trypanosomatídeos apresentam peculiaridades bioquímicas dentre os organismos vivos, como um exclusivo metabolismo redox (Irigoien et al., 2008). Projeto de sequenciamento do genoma de *T. cruzi* (El-Sayed et al., 2005) e *Trypanosoma brucei* revelou que nesses tripanosomatídeos faltam genes codificadores para glutathione redutase, tioredoxina redutase, catalase e glutathione peroxidase (contendo selenocisteína).

Em tripanosomatídeos, a principal via enzimática que regula o estado redox intracelular é baseada em triparedoxina (TXN) e triparedoxina peroxidase (TXNPx). Nessa via, glutathione é convertida em N,N8-bis(glutathionil) espermidina, nomeada tripanotiona. A forma oxidada de tripanotiona, que é reduzida por tripanotiona redutase (TR), reduz triparedoxina (TXN). TXN reduzida reduz por sua vez TXNPx, um membro da família das peroxiredoxinas. A função conhecida de TXNPx é degradar peróxido de hidrogênio, defendendo a célula do estresse oxidativo (Budde; Flohe, 2003; Castro et al., 2002).

Peroxiredoxina (Prx) é uma família de proteínas antioxidantes, que se caracteriza por conter um domínio conservado redutor ativo de cisteínas. A função principal é a proteção contra os danos causados por peróxidos, levando à redução dos mesmos (Andrade et al., 2008). Em tripanosomatídeos, Prx ocorre no citosol ou na mitocôndria, podendo utilizar como substrato diferentes espécies reativas do oxigênio, como peróxido de hidrogênio, hidroperóxidos e peroxinitrito (Harder et al., 2006; Andrade et al., 2008).

De acordo com Piacenza e colaboradores (2008), *T. cruzi* protege-se do ambiente oxidante por meio de peroxiredoxinas. Para estabelecer a infecção, tripomastigotas metacíclicos devem invadir macrófagos e sobreviver às condições altamente oxidativas dentro do fagossomo. Peroxiredoxinas apresentam um papel principal na minimização da formação de radicais derivados de peroxinitritos, como ânions de OH, NO₂ e CO₃ (Piacenza et al., 2008).

- **Proteína de bastão paraflagelar**

Um típico flagelo é formado por axonema composto por um sistema de 9+2 pares de microtúbulos envoltos pela membrana flagelar. Um complexo sistema de pequenas projeções feitas de proteínas formam os braços internos e externos dos pares periféricos e as estruturas radiais. Adicionalmente, complexos de proteínas formando partículas intraflagelares podem ser vistos entre os pares periféricos de microtúbulos e a membrana flagelar (Wilson et al., 2008). O flagelo de tripanosomatídeos apresenta outra estrutura conhecida como bastão paraflagelar, organizado em um complexo entrelaçado de filamentos, com três distintos domínios; proximal, intermediário e distal, que corre por todo o comprimento do flagelo ao longo do axonema da maioria dos kinetoplastídeos flagelados (Abdille et al., 2008).

Diferentemente do axonema, que é conservado dentre os eucariotos, o bastão paraflagelar é restrito a kinetoplastídeos, euglenóides e dinoflagelados e é importante para a motilidade celular (Ralston; Hill, 2008) e para a adesão do parasito a tecidos específicos do inseto vetor (Tetley; Vickerman, 1985). Essa estrutura é encontrada somente nesses organismos e seus componentes proteicos são estruturalmente e imunologicamente distintos de qualquer sistema filamentar da

célula hospedeira, incluindo microfilamentos, microtúbulos ou filamentos intermediários (Saborio et al., 1989). A dinâmica da movimentação flagelar em tripanosomatídeos envolve mudanças conformacionais intensas dos microtúbulos do axonema, estruturas associadas e presumivelmente do bastão paraflagelar. Essa proteína tem sido estudada extensivamente nos parasitos hemoflagelados *T. cruzi*, *Trypanosoma brucei*, *Leishmania mexicana* e *Leishmania amazonensis* (Fouts et al., 1998)

A figura 12 e a tabela 4 apresentam os resultados do tratamento da cepa Y de *T. cruzi* com peperobtusina B de *P. obtusifolia* (p. 30).

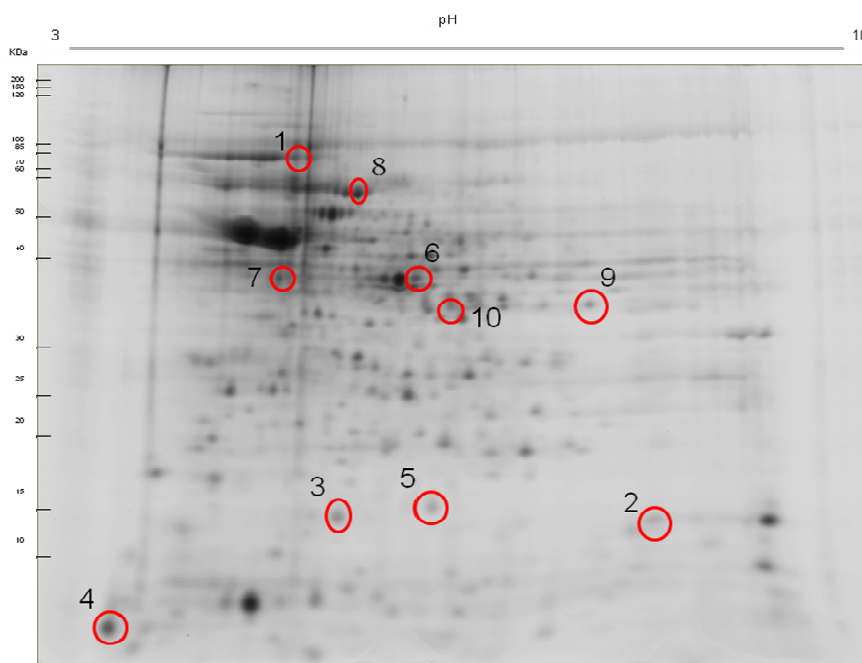


Figura 12: Gel Preparativo (para recorte dos spots) das amostras (cepa Y) tratadas com peperobtusina B de *P. obtusifolia*. Os spots em destaque foram os que demonstraram maiores diferenças na expressão de proteínas.

Tabela 4: Resultados da identificação de proteínas por PMF de *T. cruzi* (cepa Y) após tratamento com peperobutina B de *P. obtusifolia*

Spot ^a	Volume (%)		NCBI		MASCOT				Função		
	Controle	Tratado	Proteína	Número de acesso	Peptídeos	Massa (Da)	Score ^b	pI		Cobertura (%) ^c	
1	+ 1,05171		Proteína do choque térmico 85 kDa	gi 71403337	FYEQFGK HKPLWTR RAPDFMEPSK EDQEYLEER HFSVEGQLEFR KLETSPRIEQAR DVTKEEYAAFYK GWDSIEDPLNISR VKEVTQERVQNK YQSLTNQAVLGDESHLR IVLHLKEDQEQYLEER FHSESGEDMTLLKDYR	81182	861	5,07	19,70	Resposta a proteínas desenoveladas	
2	+ 1,06604		Glutathiona peroxidase like	gi 71424445	AHPLYEFMK FKADPIMEK GGYETAATLYK WNFTSLIDR GHPLLIYNVAR	18463	324	7,68		32,30	Resposta ao estresse oxidativo
3	+ 1,09319		D- isomer specific 2 – hydroxyacid dehydrogenase- protein	gi 71420052	FIGLVNEYAK LDTYLVDPVR RFIGLVNEYAK RLDTYLVDPVR GITQNEDDLACALR ESDFVWNLPGTEETKR GASVDVFEREPLPAESPLWDISK	38795	495	6,04		22,90	Reoxidação do NADH citosólico
4	+ 1,13493		Calmodulina	gi 71405209	LTDEEVDEMIR VFDDKDGNGFISAAELR VFDDKDGNGFISAAELR EAFSLFDKDGDTITTK EADVDDGQINYEETF	16824	408	4,10		40,90	Ligante de íon cálcio
5	+ 1,14996		Metionina sulfóxido reductase	gi 71405176	QGVDDVGTQYR AFGDAQVWTSLEK SAIFYHDDQQLK LHVAEDYHQMYLEK LHVAEDYHQMYLEK LHVAEDYHQMYLEKNPDR FGDALLSHEVGYMGGAESDEVVTYPYK	20204	568	6,12		45,80	Resposta ao estresse oxidativo
6	+ 1,07420		Tirosina aminotransferase	gi 71659493	NLWVPGWR EAVATWWR LTTTRPVEVYR LLVITNPSPNPGSNFSR GKDPNATFTSVADFETTVP EADDSQECNGYFPTVGSPEAR LKEAIDSQECNGYFPTVGSPEAR	46723	486	5,82		20,90	Atividade de transaminase
7	+ 1,07935		Arginina Quinase	gi 71407949	TFLVWVNEEDHLR FLQAAHACEFWPTR LGFLTFCPTNLGTTIR	40483	168	6,29		12,30	Fosforilação

Tabela 4: Resultados da identificação de proteínas por PMF de *T. cruzi* (cepa Y) após tratamento com peperobtusina B de *P. obtusifolia* - Continuação

8	+ 1,07986	Proteína do choque término 70 kDa, precursor mitocondrial	gij71407515	MKETAENFLGR EISEVVLVGGMTR EISEVVLVGGMTR VSNVAVTCTPAYFENDAQR EMAADNQMMNGQFDLVGIPPAR VICOGITGK KPWVSEIGGMTAPPGR KPWVSHGGMTAPPGR HGTYHTQQAIEYGTK LIGPNCPGIIRPEECK KAGMNYLGLPVFGTVTEAK	71503	371	5,75	9,60	Enovelamento proteico
9	+ 1,08266	Succinil-CoA sintetase subunidade	gij71667777	FIGLVNEYAK RLDTYLVDPVR LDTYLVDPVRGY GITQNEDDLACALR ESDFVAVNILPGTEETKR	32196	393	8,40	25,10	Intermediário do ciclo de Krebs
10	+ 1,09248	Proteína D- isômero específico 2 – hidroxíácido desidrogenase	gij71420052		38795	343	6,04	15,90	Reoxidação do NADH citossólico

a - Número dos spots correspondendo àqueles indicados na Figura 4

b - Probabilidade baseada em MOWSE (*Molecular Weight Search*) na identificação de proteínas pelo programa MASCOT

c- Porcentagem de cobertura prevista da sequência proteica por correspondência de peptídeos através do programa MASCOT

A técnica 2D - DIGE mostrou-se eficiente na determinação de diferenças na expressão de proteínas de *T. cruzi* após tratamento com peperobtusina B de *P. obtusifolia* (p. 30). A espectrometria de massas permitiu identificar quais foram as proteínas de *T. cruzi* presentes em cada um dos dez *spots* recortados.

Para a amostra (cepa Y) tratada com peperobtusina B de *P. obtusifolia*, foram identificadas as proteínas referentes aos 10 (dez) *spots* analisados, das quais podemos destacar proteínas que são alvos potenciais para o desenvolvimento de fármacos, como calmodulina, tirosina aminotransferase e arginina quinase (Tabela 4: *spots* 4, 6 e 7, respectivamente), indicando que essa substância possivelmente influenciou a expressão dessas proteínas.

Calmodulina teve sua expressão diminuída após o tratamento com a substância, enquanto que para tirosina aminotransferase e arginina quinase observou-se aumento da expressão após tratamento.

Algumas considerações interessantes sobre essas proteínas estão descritas a seguir:

- **Calmodulina**

Calmodulina (CaM) é uma das proteínas mais ubíquas no reino animal; sua função tem sido associada ao controle de muitos processos celulares, de acordo com oscilações no Ca^{2+} intracelular (Chin; Means, 2000).

Em relação aos tripanosomatídeos, CaM foi encontrada em *T. brucei* (Ruben et al., 1983) e *T. cruzi* (Benaïm et al., 1991), assim como em *Leishmania donovani* (Mazmuder et al., 1992), *L. braziliensis* e *L. mexicana* (Benaïm et al., 1987). Essa proteína foi associada a diversas funções em tripanosomatídeos, como regulação do crescimento em *T. brucei* (Eid; Sollner-Webb, 1991), estimulação da fosfodiesterase cAMP-dependente em *T. cruzi* (Tellez-Iñon et al., 1985), proteína quinase CaM-dependente em *T. cruzi* (Ogueta et al., 1994), transdução de sinal na via cGMP-óxido nítrico em *T. cruzi* (Paveto et al., 1995) e estímulo da membrana plasmática

Ca²⁺-ATPase de *L. braziliensis* (Benaim; Romero, 1990), *L. mexicana* (Benaim, 1996), *T. cruzi* (Benaim et al., 1995) e *T. brucei* (Benaim et al., 1993).

Diferenças significativas na seqüência de aminoácidos da calmodulina foram encontradas entre *T. cruzi* (Chung; Swindel, 1990) e em mamíferos. Uma análise na seqüência da CaM demonstrou 15 substituições nos aminoácidos em *T. cruzi* quando comparado à seqüência em mamíferos. Essas importantes diferenças entre CaM de tripanosomatídeos e vertebrados torna essa proteína um interessante objeto de estudo terapêutico seletivo/específico para *T. cruzi*. Os resultados mostraram uma diminuição na expressão da calmodulina, demonstrando que a substância utilizada interferiu na sua expressão.

- **Tirosina aminotransferase**

Aminotransferases pertencem à família alfa de enzimas dependentes de vitamina B6 (Alexander et al., 1994), que possuem um importante papel na biossíntese de aminoácidos e no metabolismo de carboidratos em procariotos e eucariotos.

Trypanosoma cruzi possui tirosina aminotransferase (TAT) abundante e estável (Montemartini et al., 1993) e tal proteína apresenta similaridade de 40% com a seqüência com TAT de mamíferos (Rego et al., 2008). Em *T. cruzi*, tirosina aminotransferase participa no metabolismo da metionina, tirosina, triptofano e fenilalanina e também tem sido sugerido um papel na reoxidação do NADH glicolítico (Noble; Song, 2008). O estudo das regiões da seqüência em que aparecem as diferenças pode ser interessante no futuro.

Tripanosomatídeos expressam um variado grupo de aminotransferases. Acredita-se que aminoácidos podem prover intermediários essenciais para alimentar o ciclo de Krebs ou a rota da gliconeogênese. A maioria dessas aminotransferases exibe notavelmente ampla especificidade ao substrato quando comparadas às enzimas de mamíferos, sendo reguladas em nível de expressão de proteína durante o ciclo de vida desses parasitos (Nowicki; Cazzulo, 2008; Marciano et al., 2008). Os dados apresentados na Tabela 3 demonstram um aumento na sua expressão, que

pode estar relacionado com a necessidade de produção de mais energia pelos parasitas para suportar o estresse causado pela ação da substância. Essa enzima pode também ser relevante na busca de outros alvos terapêuticos no parasito.

- **Arginina quinase**

Essa enzima está envolvida no suprimento de energia para o parasito, uma vez que catalisa a produção de fosfoarginina, permitindo que o ATP seja produzido rapidamente quando necessário (Silber et al., 2005).

Sistemas baseados em fosfagenes (fosfocreatinina e fosfoarginina) mantêm a homeostase do ATP durante elevada ou flutuante demanda de energia pela célula. Arginina quinase sintetiza fosfoarginina, que é o principal reservatório de compostos fosfóricos altamente energéticos em uma grande variedade de invertebrados; entretanto, em vertebrados somente fosfocreatinina foi encontrada. Arginina quinase catalisa a transfosforilação reversível entre N-fosfo-L-arginina e ATP (Ellington, 2001). Super expressão de arginina quinase em *T. cruzi* melhora a capacidade de parasitas transfectantes em crescer e sobreviver sob condições de estresse nutricional e de pH (Pereira et al., 2003). O aumento da expressão dessa enzima observado nos resultados da Tabela 3 (*spot 7*) parece favorecer essa hipótese. Tendo em vista que nesses parasitas fosfagene e sua via biossintética tem comportamento totalmente diferente em relação ao que ocorre em hospedeiros mamíferos, a arginina quinase também pode figurar como mais um possível alvo para estudos terapêuticos (Pereira et al., 2000).

A figura 13 e a tabela 5 apresentam os resultados do tratamento da cepa Y de *T. cruzi* com piplartina de *P. tuberculatum* (p. 30).

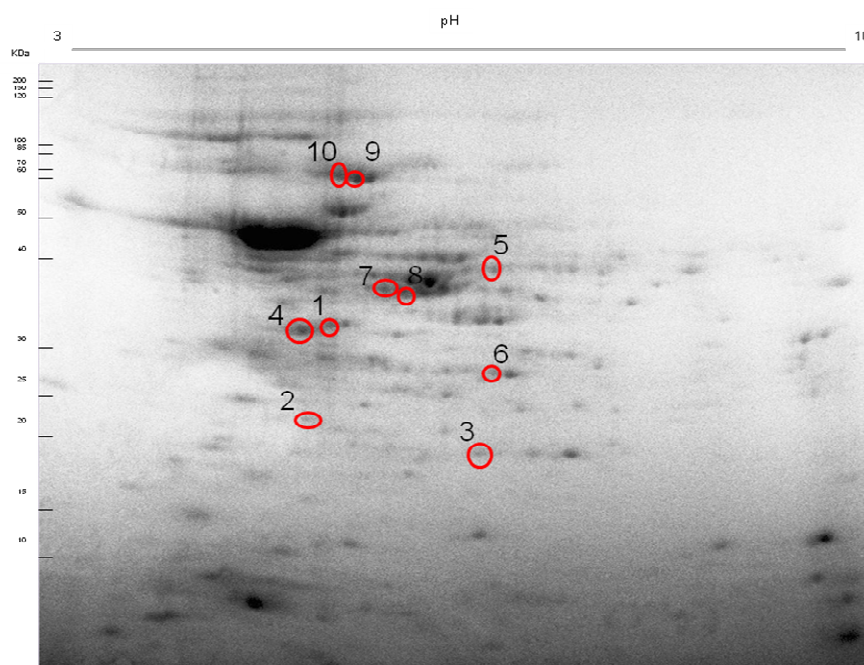


Figura 13: Gel Preparativo (para recorte dos *spots*) das amostras (cepa Y) tratadas com piplartina de *P. tuberculatum*. Os *spots* em destaque foram os que demonstraram maiores diferenças na expressão de proteínas.

Tabela 5: Resultados da identificação de proteínas por PMF de *T. cruzi* (cepa Y) após tratamento com piplartina de *P. tuberculatum*

Spot ^a	Volume (%)			NCBI		MASCOT				Função
	Controle	Tratado	Proteína	Número de acesso	Peptídeos	Massa (Da)	Score ^b	pI	Cobertura (%) ^c	
1	+ 2,11076		Citocromo C oxidase subunidade IV	gi 71660419	FTGEPPSWMR ACTDLNQLLEWSR	39119	123	5,72	6,90	Transporte de elétrons
2	+ 2,19413		Triparedoxina peroxidase	gi 71408703	ANEYFEK EAAPEWAGK VVQAFQYVDK HITVNDLPVGR DYGVLIEEQGISLR	25734	338	5,96	22,60	Resposta ao estresse oxidativo
3	+ 2,34873		Triparedoxina peroxidase	gi 17224953	QITVNDLPVGR SYGVLKEEDGVAYR HGEVCPANWKPGDK	22660	183	5,96	19,60	Resposta ao estresse oxidativo
4	+ 2,48312		Beta-tubulina	gi 1220547	LREEYPDR LAVNLVPFPR FPGQLNSDLR KLAVNLVPFPR FPGQLNSDLRK INVVFDEATGGR AVLIDLEPGTMDSVR AVLIDLEPGTMDSVR GHYTEGAELIDSVLDVR	50126	513	4,74	16,70	Estrutural
5	+ 2,85288		Cistationina beta-sintase	gi 71404306	GYVLLDQYR SADKESFALASEVHR AHYEGTAQEYDQCGK	47830	308	6,43	9,60	Biossíntese da cisteína
6	+ 1,89051		Metiltoadenosina fosforilase	gi 71655964	VGGVDCAFLLPR TFPGLAAGTEGWR HGVGHVLPSEVNYR LHEQGTSVTMEGPQFSTK LHEQGTSVTMEGPQFSTK YYAIEPTFGRPSGDICVK YDFEEADQQIR	33523	456	6,34	24,80	Recuperação de aminoácidos
7	+ 1,95135		Prostaglandina F2a sintase	gi 25006239	ETYGVPEELTDDEV AQQNWPLNEPRPETYR	42489	235	5,83	11,60	FMN ligante
8	+ 1,96161		Prostaglandina F2a sintase	gi 25006239	FIANPDLVER YDFEEADQQIR KIEPLSLAYLHYLR ETYGVPEELTDDEV AQQNWPLNEPRPETYR	42489	391	5,83	17,90	FMN ligante

Tabela 5: Resultados da identificação de proteínas por PMF de *T. cruzi* (cepa Y) após tratamento com pipilarina de *P. tuberculatam* – **Continuação**

9	+ 1,98229	Proteína do choque térmico 70 kDa, precursor mitocondrial	gi 71407515	DAGTIAGLNVR EISEVLVGGMTR EISEVLVGGMTR RFEDSNQHDIK KVSNAVVTCPAYFENDAQR	71503	242	5,75	8,40	Enovelamento protéico
10	+ 2,02368	Proteína do choque térmico 70 kDa	gi 119394467	FEELCGDLFR AVHDLVVGSTR TTPSYVAFDTER	72428	238	5,37	5,40	Enovelamento protéico

a - Número dos *spots* correspondendo àqueles indicados na Figura 6

b - Probabilidade baseada em MOWSE (*Molecular Weight Search*) na identificação de proteínas pelo programa MASCOT

c- Porcentagem de cobertura prevista da sequência proteica por correspondência de peptídeos através do programa MASCOT

Para a amostra (cepa Y) tratada com piplartina de *P. tuberculatum* (p. 30), foram identificados os dez *spots* analisados, dos quais podemos destacar as proteínas triparedoxina peroxidase e beta tubulina (Tabela 5: *spots* 2, 3 e 4), importantes para o parasito como proteção natural ao estresse oxidativo e para a composição estrutural. Triparedoxina peroxidase foi identificada em dois *spots* analisados. As diferentes proteínas destacadas tiveram sua expressão diminuída na amostra tratada com a substância piplartina.

Segue uma breve descrição sobre beta-tubulina, pois triparedoxina peroxidase já foi descrita anteriormente nesse trabalho.

- **Beta tubulina**

Recentemente, o componente microtubular do citoesqueleto de Kinetoplastida tem se tornado um potencial sítio para o ataque de agentes quimioterápicos. Microtúbulos são heterodímeros formados por quantidades iguais de α e β polipeptídeos de tubulina. A estrutura primária das tubulinas foram altamente conservadas através da evolução (Little, 1981). Entretanto, a participação de tubulinas em diversos eventos celulares guiou em 1976 à hipótese de que diferentes polipeptídeos de tubulinas podem formar microtúbulos distintos funcionalmente (Fulton; Simpson, 1976). Tripanosomas apresentam três classes de microtúbulos: o flagelar, o mitótico e a forma subpelicular. Microheterogeneidade da tubulina em tripanosoma pode ser sobreposta à heterogeneidade intra-específica bioquímica, imunológica e genética predominante em populações de *T. cruzi*.

Espécies do parasito do gênero *Trypanosoma* exibem uma variedade particular de formas celulares que são definidas pelo citoesqueleto interno. O citoesqueleto é caracterizado por um cinto de microtúbulos que são cruzados entre si e com a membrana plasmática. Células de tripanosomatídeos possuem extrema precisão na organização de microtúbulos e filamentos, com algumas de suas organelas, como mitocôndria, cinetoplastos, corpos basais e flagelo, presentes em cópia única em cada célula. A duplicação dessas estruturas e mudanças em suas

posições durante diferenciações no ciclo de vida proporcionam marcadores envolvidos na determinação da forma celular e divisão (Gull, 1999).

O citoesqueleto representa uma estrutura básica da arquitetura de células eucarióticas. Durante o curso da evolução, muitos componentes do citoesqueleto, por exemplo, as tubulinas, permaneceram conservadas em grau notável. Entretanto, apesar de haver muitas similaridades entre o citoesqueleto de hospedeiros (mamíferos) e parasitos (tripanosomatídeos), diferenças significantes também existem em suas respectivas estruturas, funções e bioquímica. Muitas dessas características espécie- específicas do citoesqueleto de tripanosomatídeos podem representar alvo potencial para ataque quimioterapêutico.

Assim, melhor entendimento da estrutura e função do citoesqueleto pode direcionar o desenvolvimento de novas e efetivas drogas tripanocidas e já que os microtúbulos são componentes estruturais predominantes do citoesqueleto de tripanosomatídeos, eles representam uma área de exploração para o desenvolvimento de quimioterápicos (Hemphill et al., 1991).

A figura 14 e a tabela 6 apresentam os resultados do tratamento da cepa Bol de *T. cruzi* com piplartina de *P. tuberculatum* (p. 30).

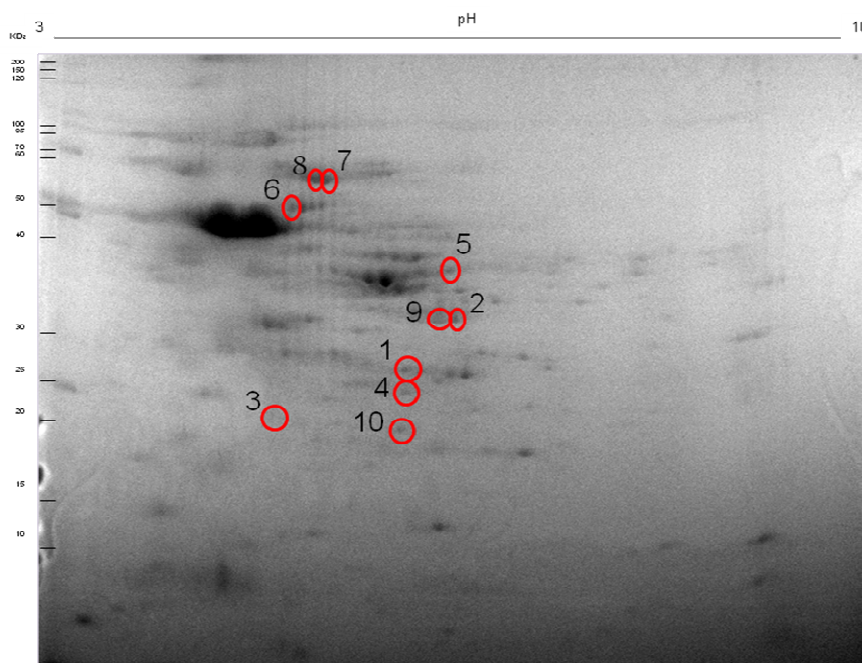


Figura 14: Gel Preparativo (para recorte dos spots) das amostras (cepa Bol) tratadas com piplartina de *P. tuberculatum*. Os *spots* em destaque foram os que demonstraram maiores diferenças na expressão de proteínas

Tabela 6: Resultados da identificação de proteínas por PMF de *T. cruzi* (cepa Bol) após tratamento com piplartina de *P. tuberculum*

Spot ^a	Volume (%)		NCBI		MASCOT					Função
	Controle	Tratado	Proteína	Número de acesso	Peptídeos	Massa (Da)	Score ^b	pI	Cobertura (%) ^c	
1	+ 1,31039		Triparedoxina peroxidase	gi 17224953	QITVNDLPVGR SYGLKEEDGVAYR HGEVCPANWKPGDK	22660	219	5,96	19,60	Resposta ao estresse oxidativo
2	+ 1,79587		Metiloadenosina fosforilase	gi 71655964	VGGVDCAFPLR TFPGLAAGTEGWR HGVGHVLPNPSEVNYR YYAETPFGRPSPGDCVAK	33523	398	6,34	18,90	Recuperação de aminoácidos
3	+ 1,92845		Proteína D-isômero específico hidroxácido desidrogenase	gi 71420052	EVDEYGVGR TANLVPDSVR FIGLVNEYAK TANLVPDSVRR RLDTYLVDPVR GITQNEDDLACALR ESDFVWNLPGTEETKR	38795	479	6,04	20,90	Reoxidação do NADH citosólico
4	+ 1,98251		Triparedoxina peroxidase	gi 17224953	QITVNDLPVGR SYGLKEEDGVAYR HGEVCPANWKPGDK	22660	221	5,96	19,60	Resposta ao estresse oxidativo
5	+ 2,14455		Cistationina beta-sintase	gi 71404306	GYVLLDQYR SADKESFALASEVHR AHYEGTAQEYDQCCKG TETALPWHDPDSLIGMAR	47830	421	6,43	13,80	Biossíntese da cisteína
6	+ 1,52906		Chaperonina HSP60, proteína mitocondrial	gi 3023478	NVIEQSYGAPK GLIDGETSDYNR GYISPYFVTDAK AVGVILQSVAEQSR YVNMFEAGIDIPAR AAVQEGIVPGGGVALLR ALDSLIGDSSLTADQR VLENDVTVGYDAQR KVTSTENIVQVATISANGDEELGR	59639	801	5,38	24,20	Enovelamento protéico

Tabela 6: Resultados da identificação de proteínas por PMF de *T. cruzi* (cepa Bol) após tratamento com piplartina de *P. tuberculatam* – **Continuação**

7	+ 1,54376	Proteína do choque térmico 70 kDa, precursor mitocondrial	gij71407515	EISEVLVGGMTR RFEDSNIQHDIK KVSNAVVTCPAYFNDAQR	71503	184	5,75	6,60	Enovelamento proteico
8	+ 1,68282	Proteína do choque térmico 70 kDa	gij10626	TPSYVAFTDTER ARFEELCGDLFR AVVTVPAYFNDSQR DCHLLGTFDLSGPPAPR SQIFSTYADNQPGVHIQVFEGER	74564	437	5,64	11,80	Enovelamento proteico
9	+ 1,86407	Metiltoadenosina fosforilase	gij71655964	VGGVDCAFLLPR TFPGLAAGTEGWR HGVGHVLPSEVNYR LHEQGTSVTMEGPOFSTK YYAIETPFGRPSPGDCIVAK	33523	516	6,34	24,80	Recuperação de aminoácidos
10	+ 2,57049	Metionina sulfoxido redutase	gij71405176	IHDPTTVNR QGVDVGTQYR AFGDAQVWTSLEK SAIFYHDDQQLK LHVAEDYHQWYLEK LHVAEDYHQWYLEK	20204	386	6,12	32,80	Resposta ao estresse oxidativo

a - Número dos *spots* correspondendo àqueles indicados na Figura 7

b - Probabilidade baseada em MOWSE (*Molecular Weight Search*) na identificação de proteínas pelo programa MASCOT

c- Porcentagem de cobertura prevista da sequência proteica por correspondência de peptídeos através do programa MASCOT

No experimento 4, em que a amostra (cepa Bol) foi tratada com piplartina de *P. tuberculatum* (p. 30), foram identificados e analisados dez *spots*, dos quais podemos destacar as proteínas triparedoxina peroxidase e metionina sulfóxido redutase (Tabela 6: *spots* 1, 4 e 10), importantes para o parasito como proteção natural ao estresse oxidativo. Triparedoxina peroxidase foi identificada em dois *spots* analisados e, em ambos, teve sua expressão diminuída na amostra tratada por piplartina, enquanto que metionina sulfóxido redutase teve maior expressão na amostra tratada em relação ao controle. A enzima triparedoxina peroxidase já foi descrita anteriormente.

- **Metionina sulfóxido redutase (MSR)**

Os aminoácidos mais suscetíveis à oxidação são cisteína, histidina, triptofano, tirosina e metionina. A oxidação da metionina (Met) em metionina sulfóxido (MetSO) afeta a função biológica de proteínas oxidadas (Friguet, 2006). Consequentemente, a ocorrência de um sistema para a redução de MetSO a Met é importante para a célula. Essa reação é catalisada pela enzima metionina sulfóxido redutase (MSR), que está presente em praticamente todos os organismos (Moskovitz, 2005; Boschi-Muller et al., 2008). A enzima protege o organismo do estresse oxidativo, sendo essencialmente envolvida na resistência a estresse abiótico e biótico em plantas e animais (Moskovitz et al., 1998; Bechtold et al., 2004).

Apesar da relevância de MSR na bioquímica e fisiologia celular de vários organismos, essa enzima nunca foi caracterizada em protozoa, especialmente aqueles de importância médica e veterinária.

Arias e colaboradores (2011) estudaram metionina sulfóxido redutase em *T. cruzi* e *T. brucei* e a pesquisa indica uma função chave dessa enzima no metabolismo redox em tripanosomatídeos. A pesquisa guiou o grupo a concluir que em *T. cruzi*, assim como em *T. brucei*, MSR pode ajudar os parasitos a enfrentar o estresse oxidativo. Essa enzima não participa diretamente na eliminação de agentes oxidantes, mas no reparo de proteínas oxidadas para a manutenção da funcionalidade celular.

Os mesmos pesquisadores observaram que a reversão do estado oxidado de MSR recombinante era dependente da presença de triparedoxina (TXN) reduzida, um substrato redutor potencial fisiologicamente a MSR. Esse achado sustenta uma nova via redox, com a participação de diferentes substratos fisiológicos.

Apesar de não ser uma enzima exclusiva de tripanosomatídeos, metionina sulfóxido redutase é uma enzima participante do processo de defesa do parasito frente ao estresse oxidativo, indicando que a substância utilizada nesse ensaio, a pipartina de *P. tuberculatum*, causou esse estresse, e por isso a expressão dessa enzima aumentou na amostra tratada.

Embora a cura ou controle da doença de Chagas no indivíduo chagásico ainda não esteja totalmente elucidada até este momento, destarte o enorme empenho de Carlos Chagas no seu estudo, devido às diferenças nas cepas e nas reações dos indivíduos infectados, e ainda que o alvo da triparedoxina peroxidase seja um dos mais promissores, não se descartam outros que poderiam ser estudados concomitantemente. Em outras palavras, assim como em algumas outras doenças infecciosas, como a AIDS, por exemplo, possivelmente um coquetel de substâncias, potencialmente ativas, também deva ser avaliado na doença de Chagas.

Além disso, embora alguns estudiosos sugiram a necessidade de avaliar as substâncias potencialmente tripanocidas em outras formas do parasito (amastigotas e tripomastigotas) (Moreno et al., 2010), torna-se difícil e complexo realizar um rastreamento de substâncias em sistemas *in vivo*, que utilizam células ou animais (normais e/ou infectados), devido às dificuldades inerentes dos procedimentos de automação que posam testar várias substâncias ao mesmo tempo.

Portanto, entende-se que ainda existem várias lacunas a serem preenchidas e que os resultados desse trabalho podem auxiliar na busca de novos enfoques para estudo dessas moléculas.

5. CONCLUSÃO

A técnica utilizada nesse trabalho, 2D-DIGE, mostrou-se viável para a análise proteômica em *T. cruzi*;

Através da espectrometria de massas foi possível identificar todos os *spots* recortados que demonstravam diferenças de expressão, com exceção de uma amostra perdida durante o seu preparo para essa técnica;

Para a cepa Y tratada com peperobtusina A de *P. obtusifolia* identificou-se a proteína de bastão paraflagelar e triparedoxina peroxidase, envolvidas com a composição flagelar e com a resposta ao estresse oxidativo no parasito, respectivamente;

Para o experimento realizado com a cepa Y de *T. cruzi* tratada com peperobtusina B de *P. obtusifolia* foram identificadas as proteínas calmodulina, tirosina aminotransferase e arginina quinase, interessantes como possível alvo de estudo terapêutico;

Os resultados obtidos com o tratamento das cepas Y e Bol de *T. cruzi* pela piplartina de *Piper tuberculatum* demonstraram que, embora as cepas testadas apresentem diferente suscetibilidade em relação ao benzonidazol, a substância piplartina, ao contrário, não apresentou ação seletiva em relação a essas cepas, provocando alteração na expressão de enzimas envolvidas na proteção do parasito frente ao estresse oxidativo, como triparedoxina peroxidase e metionina sulfóxido redutase, importantes alvos potenciais para estudos terapêuticos.

Os dados apresentados são interessantes e inovadores, pois a técnica 2D-DIGE nunca antes foi utilizada para esse tipo de análise em *T. cruzi*.

REFERÊNCIAS

ABDILLE, M. H.; LI, S. Y.; JIA, Y.; SUO, X.; MKOJI, G. Evidence for the existence of paraflagellar rod protein 2 (PFR2) gene in *Trypanosoma evansi* and its conservation among other kinetoplastid parasites. **Exp. Parasitol.**, v. 118, p. 614-618, 2008.

ABE, F.; NAGAFUJI, S.; YAMAUCHI, T.; OKABE, H.; MAKI, J.; HIGO, H.; AKAHANE, H.; AGULAR, A.; JIMENEZ-ESTRADA, M.; REYES-CHILPA, R. Trypanocidal constituents in plants. 1 Evaluation of some Mexican plants for their trypanocidal activity and active constituents in guaco, roots of *Aristolochia taliscana*. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 25, n. 9, p. 1188-1191, 2002.

ALEXANDER, F. M.; SANDMEIER, E.; MEHTA, P. K.; CHRISTEN, P. Evolutionary relationships among pyridoxal-5-phosphate-dependent enzymes. Region-specific alfa, beta and gama families. **Eur. J. Biochem.**, v. 219, p. 953-960, 1994.

ANDRADE, H. M.; MURTA, S. M. F.; CHAPEAUROUGE, A.; PERALES, J.; NIRDÉ, P.; ROMANHA, A. J. Proteomic analysis of *Trypanosoma cruzi* resistance to benznidazole. **J. Proteome Res.**, v. 7, p. 2357-2367, 2008.

ANDRADE, S. G.; MAGALHÃES, J. B.; PONTES, A. L. Evaluation of chemotherapy with benznidazole and nifurtimox in mice infected with *Trypanosoma cruzi* strains of different types. **Bull. World Health Organ.**, v. 63, p. 721-726, 1985.

ANDRADE, Z. A. Immunopathology of Chagas disease. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 94, p. 71-80, 1999. Suplemento 1.

ARIAS, D. G.; CABEZA, M. S.; ERBEN, E. D.; CARRANZA, P. G.; LUJAN, H. D.; TÉLLEZ IÑÓN, M. T.; IGLESIAS, A. A.; GUERRERO, S. A. Functional characterization of methionine sulfoxide reductase A from *Trypanosoma* spp. **Free Radical Biol. Med.**, v. 50, p. 37-46, 2011.

BARRETT, M. P.; GILBERT, I. H. Perspectives for new drugs against trypanosomiasis and leishmaniasis. **Curr. Top. Med. Chem.**, v. 2, n. 5, p. 471-482, 2002.

BATISTA JUNIOR, J. M.; LOPES, A. A.; AMBRÓSIO, D. L.; REGASINI, L. O.; KATO, M. J.; BOLZANI, V. S.; CICARELLI, R. M. B.; FURLAN, M. Natural chromenes and chromene derivatives as potential anti-trypanosomal agents. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 31, n. 3, p. 538-540, 2008.

BECHTOLD, U.; MURPHY, D. J.; MULLINEAUX, P. M. Arabidopsis peptide methionine sulfoxide reductase2 prevents cellular oxidative damage in long nights. **Plant Cell.**, v. 16, p. 908-919, 2004.

BENAIM, G. Intracellular calcium signaling and regulation in Leishmania. In: TAPIA, F. J.; CACERES-DITTMAR, G.; SÁNCHEZ, M. A. (Ed.). **Molecular and immune mechanism in the pathogenesis of cutaneous Leishmania**. Austin: R. G. Landes, 1996. v. 5, p. 89-106.

BENAIM, G.; ROMERO, P. J. A calcium pump in plasma membrane vesicles from *Leishmania braziliensis*. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1027, p. 79-84, 1990.

BENAIM, G.; SZABO, V.; CORNIVELLI, L. Isolation and characterization of calmodulin from *Leishmania braziliensis* and *Leishmania mexicana*. **Acta Cient. Venez.**, v. 38, p. 289-291, 1987.

BENAIM, G.; LOPEZ-ESTANÑO, C.; DOCAMPO, R.; MORENO, S. N. J. A calmodulin stimulated Ca^{2+} pump in plasma membrane vesicles from *Trypanosoma brucei*. Selective inhibition by pentamidine. **Biochem. J.**, v. 296, p. 759-763. 1993.

BENAIM, G.; LOSADA, S.; GADELHA, F. R.; DOCAMPO, R. A calmodulin-activated (Ca^{2+})- Mg^{2+} -ATPase is involved in Ca^{2+} transport by plasma membrane vesicles from *Trypanosoma cruzi*. **Biochem. J.**, v. 280, p. 715-720, 1991.

BENAIM, G.; MORENO, S. N. J.; HUTCHINSON, G.; CERVINO, V.; HERMOSO, T.; ROMERO, P. J.; RUIZ, F.; SOUZA, W. de; DOCAMPO, R. Characterization of the plasma membrane calcium pump from *Trypanosoma cruzi*. **Biochem. J.**, v. 306, p. 299-303, 1995.

BOSCHI-MULLER, S.; GAND, A.; BRANLANT, G. The methionine sulfoxide reductases: catalysis and substrate specificities. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 474, p. 266-273, 2008.

BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRENER, Z.; ANDRADE, Z.; BARRAL NETTO, M. **Trypanosoma cruzi e doença de Chagas**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. 431 p.

BRISSE, S.; DUJARDIN, J. C.; TIBAYRENC, M. Identification of six *Trypanosoma cruzi* lineages by sequence-characterised amplified region markers. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 111, p. 95-105, 2000.

BUDDE, H.; FLOHE, L. Enzymes of the thiol-dependent hydroperoxide metabolism in pathogens as potential drug targets. **Biofactors**, v. 17, p. 83-92, 2003.

CALIXTO, J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 33, n. 2, p. 179-189. 2000.

CAMANDAROBA, E. L. P.; LIMA, C. M. P.; ANDRADE, S. G. Oral transmission of Chagas disease: importance of *Trypanosoma cruzi* biotype in the intragastric experimental infection. **Ver. Inst. Med. Trop.**, v. 44, n. 2, p. 97-103, 2002.

CANÇADO, J. R. Long term evaluation of etiological treatment of Chagas disease with benznidazole. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, v. 44, p. 29-37, 2002.

CARNEIRO, M. **História da doença de Chagas**. Curitiba: [s. n.], 1963. 91 p.

CASTRO, H.; SOUSA, C.; SANTOS, M.; CORDEIRO-DA-SILVA, A.; FLOHE, L.; TOMAS, A. M. Complementary antioxidant defense by cytoplasmic and mitochondrial peroxiredoxins in *Leishmania infantum*. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 33, p. 1552-1562, 2002.

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

CHAGAS, C. Processos patogênicos da tripanosomíase americana. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 8, p. 5-35, 1916.

CHENG, M.; LEE, S.; CHANG, Y.; WU, S.; TSAI, I.; JAYAPRAKASAM, B.; CHEN, I. Chemical and cytotoxic constituents from *Peperomia sui*. **Phytochemistry**, v. 63, n. 5, p. 603-608, 2003.

CHIN, D.; MEANS, A. R. Calmodulin: a prototypical calcium sensor. **Trends Cell Biol.**, v. 10, p. 322-328, 2000.

CHIRAC, P.; TORREELE, E. Global framework on essential health. **Lancet**, v. 367, n. 9522, p. 1560-1561, 2006.

CHUNG, S. H.; SWINDEL, J. Linkage of the calmodulin and ubiquitin loci in *Trypanosoma cruzi*. **Nucleic Acids Res.**, v. 18, p. 4561-4569, 1990.

COTINGUIBA, F.; REGASINI, L. O.; DEBONSI, H. M.; PASSERINI, G. D.; CICARELLI, R. M. B.; BOLZANI, V. S.; KATO, M. J.; FURLAN, M. Piperamides and their derivatives as potential anti-trypanosomal agents. **Med. Chem. Res.**, v. 18, p. 703-711, 2009.

COURA, J. R.; CASTRO, S. L. A critical review on Chagas disease chemotherapy. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 97, p. 3-24, 2002. Suplemento 1.

DIAS, J. C. P. Epidemiologia. In: BRENER, Z.; ANDRADE, Z.; BARRAL NETTO, M. (Ed.). **Trypanosoma cruzi e doença de Chagas**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p. 48-74.

DIAS, J. C. P. Doença de Chagas. In: CIMERMAN, B.; CIMERMAN, S. (Ed.). **Parasitologia humana e seus fundamentos gerais**. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 2005. Cap. 11, p. 81-94.

DIAS, J. C. P. Southern cone initiative for the elimination of domestic populations of *Triatoma infestans* and the interruption of transfusional Chagas disease. Historical aspects, present situation and perspectives. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 102, p. 11-18, 2007.

DIAS, J. C. P.; SCHOFIELD, C. J. The evolution of Chagas disease (american trypanosomiasis) control after 90 years since Carlos Chagas discovery. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 94, p. 103-121, 1999. Suplemento 1.

DÍAZ de TORANZO, E. G.; CASTRO, J. A.; FRANKE de CAZZULO, B. M.; CAZZULO, J. J. Interaction of benznidazole reactive metabolites with nuclear and kinetoplastic DNA, proteins and lipids from *Trypanosoma cruzi*. **Experientia**, v. 44, p. 880-881, 1988.

DODSON, C. D.; DYER, L. A.; SEARCY, J.; WRIGHT, Z.; LETOURNEAU, D. K. Cenocladamide, a dihydropyridone alkaloid from *Piper cenocladum*. **Phytochemistry**, v. 53, n. 1, p. 51-54, 2000.

EHRENBERG, J.; AULT, S. Neglected diseases of neglected populations: thinking to reshape the determinants of health in Latin America and the Caribbean. **BMC Pub. Health**, v. 5, p. 119-131, 2005.

EID, J. E.; SOLLNER-WEBB, B. Homologous recombination in the tandem calmodulin genes of *Trypanosoma brucei* yields multiples products: compensation for deleterious deletions by gene amplification. **Genes Dev.**, v. 5, p. 2024-2032, 1991.

ELLINGTON, W. R. Evolution and physiological roles of phosphagen systems. **Annu. Rev. Physiol.**, v. 63, p. 289-325, 2001.

EL-SAYED, N. M.; MYLER, P. J.; BARTHOLOMEU, D. C.; NILSSON, D.; AGGARWAL, G.; TRAN, A. N.; GHEDIN, E.; WORTHEY, E. A.; DELCHER, A. L.; BLANDIN, G.; WESTENBERGER, S. J.; CALER, E.; CERQUEIRA, G. C.; BRANCHE, C.; HAAS, B.; ANUPAMA, A.; ARNER, E.; ASLUND, L.; ATTIPOE, P.; BONTEMPI, E.; BRINGAUD, F.; BURTON, P.; CADAG, E.; CAMPBELL, D. A.; CARRINGTON, M.; CRABTREE, J.; DARBAN, H.; DA SILVEIRA, J. F.; DE JONG, P.; EDWARDS, K.; ENGLUND, P. T.; FAZELINA, G.; FELDBLYUM, T.; FERELLA, M.; FRASCH, A. C.; GULL, K.; HORN, D.; HOU, L.; HUANG, Y.; KINDLUND, E.; KLINGBEIL, M.; KLUGE, S.; KOO, H.; LACERDA, D.; LEVIN, M. J.; LORENZI, H.; LOUIE, T.; MACHADO, C. R.; McCULLOCH, R.; McKENNA, A.; MIZUNO, Y.; MOTTRAM, J. C.; NELSON, S.; OCHAYA, S.; OSOEGAWA, K.; PAI, G.; PARSONS, M.; PENTONY, M.; PETTERSSON, U.; POP, M.; RAMIREZ, J. L.; RINTA, J.; ROBERTSON, L.; SALZBERG, S. L.; SANCHEZ, D. O.; SEYLER, A.; SHARMA, R.; SHETTY, J.; SIMPSON, A. J.; SISK, E.; TAMMI, M. T.; TARLETON, R.; TEIXEIRA, S.; VANAKEN, S.; VOGT, C.; WARD, P. N.; WICKSTEAD, B.; WORTMAN, J.; WHITE, O.; FRASER, C. M.; STUART, K. D.; ANDERSSON, B. The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. **Science**, v. 309, p. 409-415, 2005.

ESTRELA, J. L. V.; FAZOLIN, M.; CATANI, V.; ALÉCIO, M. R.; LIMA, M. S. Toxicity of essential oils of *Piper aduncum* and *Piper hispidinervum* against *Sitophilus zeamais*. **Pesq. Agropec. Bras.**, v. 41, n. 2, p. 217-222, 2006.

FAZOLIN, M.; ESTRELA, J. L. V.; CATANI, V.; LIMA, M. S.; ALÉCIO, M. R. Toxicity of *Piper aduncum* oil to adults of *Cerotoma tingomarianus* Bechyné (Coleóptera: Chrysomelidae). **Neotrop. Entomol.**, v. 34, n. 3, p. 484-489, 2005.

FELIPPE, L. G.; BALDOQUI, D. C.; KATO, M. J.; BOLZANI, V. S.; GUIMARÃES, E. F.; CICARELLI, R. M. B.; FURLAN, M. Trypanocidal tetrahydrofuran lignans from *Peperomia blanda*. **Phytochemistry**, v. 69, p. 445-450, 2008.

FENN, J. B.; MANN, M.; MENG, C. K.; WONG, S. F.; WHITEHOUSE, C. M. Electrospray ionization for the mass spectrometry of large biomolecules. **Science**, v. 246, p. 64-71, 1989.

FERNANDES, C.; SOUTO, R. P.; CASTRO, J. A.; PEREIRA, J.; FERNANDES, N.; JUNQUEIRA, A.; NAIFE, R.; BARRET, T.; DEGRAVE, W.; ZINGALES, B.; CAMPBELL, D.; COURA, J. Brazilian isolates of *Trypanosoma cruzi* from humans and triatomines classified into two lineages using mini-exon and ribosomal RNA sequences. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 58, p. 807-811, 1998.

FERNANDES, J. F.; CASTELLANI, O. Growth characteristics and chemical composition of *Trypanosoma cruzi*. **Exp. Parasitol.**, v. 18, p. 195-202, 1966.

FILARDI, L.; BRENER, Z. Susceptibility and natural resistance of *Trypanosoma cruzi* strains to drugs used clinically in Chagas disease. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 81, p. 755-759, 1987.

FOUTS, D. L.; STRYKER, G. A.; GORSKI, K. S.; MILLER, M. J.; NGUYEN, T. V.; WRIGHTSMAN, R. A.; MANNING, J. E. Evidence for four distinct major protein components in the paraflagellar rod of *Trypanosoma cruzi*. **J. Biol. Chem.**, v. 273, n. 34, p. 21846-21855, 1998.

FRIGUET, B. Oxidized protein degradation and repair in ageing and oxidative stress. **FEBS Lett.**, v. 580, p. 2910-2916, 2006.

FULTON, C.; SIMPSON, P. Selective synthesis and utilization of flagellar tubulin. The multi-tubulin hypothesis. In: GOLDMAN, R.; POLLARD, T.; ROSENBAUM, J. (Ed.). **Cell motility**. New York: Cold Spring Harbor, 1976. p. 987-1005.

FUNAYAMA, G. K.; PRADO JUNIOR, J. C. Estudo dos caracteres de uma amostra boliviana do *T. cruzi*. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 8, p. 75-81, 1974.

FURUYA, Y.; TOMIDA, A.; TSURUO, T.; ANDO, M. Bioactive dibenzylbutyrolactone and dibenzylbutanediol lignans from *Peperomia duclouxii*. **J. Nat. Prod.**, v. 69, n. 2, p. 234-239, 2006.

GÖRG, A.; WEISS, W.; DUNN, M. J. Current two dimensional electrophoresis technology for proteomics. **Proteomics**, v. 4, p. 3665-3685, 2004.

GULL, K. The cytoskeleton of Trypanosomatid parasites. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 53, p. 629-655, 1999.

HARDER, S.; BENTE, M.; ISERMANN, K.; BRUCHHAUS, I. Expression of a mitochondrial peroxiredoxin prevents programmed cell death in *Leishmania donovani*. **Eukaryot. Cell**, v. 5, n. 5, p. 861-870, 2006.

HEMPHILL, A.; LAWSON, D.; SEEBECK, T. The Cytoskeletal architecture of *Trypanosoma brucei*. **J. Parasitol.**, v. 77, n. 4, p. 603-612, 1991.

HOTEZ, P. J.; MOLYNEUX, D. H.; FENWICK, A.; KUMARESAN, J.; EHRLICH SACHS, S. Control of neglected tropical diseases. **N. Engl. J. Med.**, v. 357, p. 1018-1027, 2007.

IRIGOIN, F.; CIBILS, L.; COMINI, M. A.; WILKINSON, S. R.; FLOHE, L.; RAD, R. Insights into the redox biology of *Trypanosoma cruzi*: trypanothione metabolism and oxidant detoxification. **Free Radical Biol. Med.**, v. 45, p. 733-742, 2008.

JARAMILLO, M. A.; MANOS, P. S. Phylogeny and patterns of floral diversity in the genus *Piper* (Piperaceae). **Amer. J. Bot.**, v. 88, p. 706-716, 2001.

JARAMILLO, M. A.; MANOS, P. S.; ZIMMER, E. A. Phylogenetic relationship of the perianth-less Piperales: reconstructing the evolution of floral development. **Int. J. Plant. Sci.**, v. 165, p. 403-416, 2004.

KARAS, M.; HILLENKAMP, F. Laser desorption ionization of proteins with molecular mass exceeding 10000 daltons. **Anal. Chem.**, v. 60, p. 2299-2301, 1989.

LANA, M.; TAFURI, W. L. *Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas. In: NEVES, D. P. (Ed). **Parasitologia humana**. 10. ed. São Paulo: Atheneu, 2000. p. 73-96.

LARANJA, F. S.; DIAS, E.; NÓBREGA, G.; MIRANDA, A. Chagas' disease; a clinical, epidemiologic and pathologic study. **Circulation**, v. 14, p. 1035-1060, 1956.

LI, N.; WU, J. L.; HASEGAWA, T.; SAKAI, J. I.; WANG, L. I. Y.; KAKUTA, S.; FURUYA, Y.; TOMIDA, A.; TSURUO, T.; ANDO, M. Bioactive dibenzylbutyrolactone and dibenzylbutanediol lignans from *Peperomia duclouxii*. **J. Nat. Prod.**, v. 69, n. 2, p. 234-239, 2006.

LITTLE, M.; LUDUENA, R.; LANGFORD, G.; ASNES, C.; FARRELL, K. Comparison of proteolytic cleavage patterns of alpha-tubulins and beta tubulins from taxonomically distant species. **J. Mol. Biol.**, v. 149, p. 95-107, 1981.

LOPES, A. A.; LÓPEZ, S. N.; REGASINI, L. O.; BATISTA JUNIOR, J. M.; AMBRÓSIO, D. L.; KATO, M. J.; BOLZANI, V. S.; CICARELLI, R. M. B.; FURLAN, M. *In vitro* activity of compounds isolated from *Piper crassinervium* against *Trypanosoma cruzi*. **Nat. Prod. Res.**, v. 22, p. 1040-1046, 2008.

LUIZE, P. S.; TIUMAN, T. S.; MORELLO, L. G.; MAZA, P. K.; UEDA-NAKAMURA, T.; DIAS FILHO, B. P.; CORTEZ, D. A. G.; MELLO, J. C. P.; NAKAMURA, C. V. Effects of medicinal plant extracts on growth of *Leishmania (L.) amazonensis* and *Trypanosoma cruzi*. **Rev. Bras. Cienc. Farm.**, v. 41, n. 1, p. 85-94, 2005.

MA, J.; JONES, S. H.; MARSHALL, R.; JOHNSON, R. K.; HECHT, S. M. A DNA damaging oxoaporphine alkaloid from *Piper caninum*. **J. Nat. Prod.**, v. 67, n. 7, p. 1162-1164, 2004.

MBAH, J. A.; TCHUENDEM, M. H. K.; FANE, P.; STERNER O. Two chromenes from *Peperomia vulcanica*. **Phytochemistry**, v. 60, n. 8, p. 799-801, 2002.

MACEDO, A. M.; PENA, S. D. J. Genetic variability of *Trypanosoma cruzi*: implications for the pathogenesis of Chagas disease. **Parasitol. Today**, v. 14, p. 119-123, 1998.

MARCIANO, D.; LLORENTE, C.; MAUGERI, D. A. Biochemical characterization of stagespecific isoforms of aspartate aminotransferases from *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma brucei*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 161, p. 12-20, 2008.

MARTINS, R. C.; LAGO, J. H. G.; KATO, M. J. Trypanocidal tetrahydrofuran lignans from *Piper solmsianum*. **Phytochemistry**, v. 64, n. 2, p. 667-670, 2003.

MAYA, J. D.; CASSELS, B. K.; ITURRIAGA-VASQUEZ, P.; FERREIRA, J.; FAUNDEZ, M.; GALANTI, N.; FERREIRA, A.; MORELLO, A. Mode of action of natural and synthetic drugs against *Trypanosoma cruzi* and their interaction with the mammalian host. **Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.**, v. 146, p. 601-620, 2007.

MAZMUDER, S.; MUKHERJEE, T.; GOSH, J.; RAY, M.; BHADURI, A. Allosteric modulation of *Leishmania donovani* plasma membrane Ca^{2+} -ATPase by endogenous calmodulin. **J. Biol. Chem.**, v. 267, p. 18440-18446, 1992.

MAZZA, S.; MONTANA, A.; BENITEZ, C.; JUZIN, E. Transmisión de *Schizotrypanum cruzi* al niño por leche de la madre con enfermedad de Chagas. **MEPRA**, v. 28, p. 41-46. 1936.

MILES, M. A.; SOUZA, A.; POVOA, M.; SHAW, J. J.; LAINSON, R.; TOYE, P. J. Isozymic heterogeneity of *Trypanosoma cruzi* in the first autochthonous patients with Chagas disease in Amazonian Brazil. **Nature**, v. 272, p. 819-821, 1978.

MINDEN, J. S.; DOWD, S. R.; MEYER, H. E.; STUHLER, K. Difference gel electrophoresis. **Electrophoresis**, v. 30, p. 156-161, 2009.

MONACHE, F. D.; COMPAGNOSE, R. S. A secolignan from *Peperomia glabella*. **Phytochemistry**, v. 43, n. 5, p. 1097-1098, 1996.

MONTEMARTINI, M.; SANTOME, J. A.; CAZZULO, J. J.; NOWICKI, C. Purification and partial structural and kinetic characterization of tyrosine aminotransferase from epimastigotes of *Trypanosoma cruzi*. **Biochem. J.**, v. 292, p. 901-906, 1993.

MORAN, M. Breakthrough in R&D for neglected diseases: new ways to get the drugs we need. **PLoS Med.**, v. 2, n. 2, p. 828-832, 2005.

MORANDIM, A. A.; BERGAMO, D. C. B.; KATO, M. J.; CAVALHEIRO, A. J.; BOLZANI, V. S.; FURLAN, M. Circadian rhythm of anti-fungal prenylated chromene in leaves of *Piper aduncum*. **Phytochem. Anal.**, v. 16, n. 4, p. 282-286, 2005.

MORENO, M.; D'AVILA, D. A.; SILVA, M. N.; GALVÃO, L. M. C.; MACEDO, A. M.; CHIARI, E.; GONTIJO, E. D.; ZINGALES, B. *Trypanosoma cruzi* benznidazole susceptibility *in vitro* does not predict the therapeutic outcome of human Chagas disease. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 105, n. 7, p. 918-924, 2010.

MOSKOVITZ, J. Methionine sulfoxide reductases: ubiquitous enzymes involved in antioxidant defense, protein regulation, and prevention of aging-associated diseases. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1703, p. 213-219, 2005.

MOSKOVITZ, J.; FLESCHER, E.; BERLETT, B. S.; AZARE, J.; POSTON, J. M.; STADTMAN, E. R. Overexpression of peptide-methionine sulfoxide reductase in *Saccharomyces cerevisiae* and human T cells provides them with high resistance to oxidative stress. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 95, p. 14071-14075, 1998.

MUELAS-SERRANO, S.; NOGAL-RUIZ, J. J.; GÓMEZ-BARRIO, A. Setting of a colorimetric method to determine the viability of *Trypanosoma cruzi* epimastigotas. **Parasitol. Res.**, v. 86, n. 12, p. 999-1002, 2000.

MURTA, S. M.; ROMANHA, A. J. *In vivo* selection of a population of *Trypanosoma cruzi* and clones resistant to benznidazole. **Parasitology**, v. 116, p. 165-171, 1998.

NAVICKIENE, H. M. D.; MORANDIM, A. A.; ALÉCIO, A. C.; REGASINI, L. O.; BERGAMO, C. B.; TELASCREA, M.; CAVALHEIRO, A. J.; LOPES, M. N.; BOLZANI, V. S.; FURLAN, M.; MARQUES, M. O. M.; YOUNG, M. C. M.; KATO, M. J. Composition and antifungal activity of essential oils from *Piper aduncum*, *Piper arboreum* and *Piper tuberculatum*. **Quím. Nova**, v. 29, n. 3, p. 467-470, 2006.

NOBLE, C. G.; SONG, H. Structural studies of elongation and release factors. **Cell Mol. Life Sci.**, v. 65, p. 1335-1346, 2008.

NOWICKI, C.; CAZZULO, J. J. Aromatic amino acid catabolism in trypanosomatids. **Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.**, v. 151, p. 381-390, 2008.

OGUETA, S. B.; SOLARI, A.; TELLEZ-IÑON, M. T. *Trypanosoma cruzi* epimastigotes forms possess a Ca^{2+} -calmodulin dependent protein kinase. **FEBS Lett.**, v. 337, p. 293-297, 1994.

ORJALA, J.; ERDELMEIER, C. A. J.; WRIGHT, A. D.; RALI, T.; STICHER, O. Two chromenes and a prenylated benzoic acid derivative from *Piper aduncum*. **Phytochemistry**, v. 34, p. 813-818, 1993.

PARMAR, V. S.; JAIN, S. C.; BISHT, K. S.; JAIN, R.; TANEJ, A. P.; JHA, A.; TYAGI, O. D.; PRASAD, A. K.; WENGEL, J.; OLSEN, C. E.; BOLL, P. M. Phytochemistry of the genus *Piper*. **Phytochemistry**, v. 46, n. 4, p. 596-597, 1997.

PASSERINI, G. D. **Avaliação do potencial tripanocida de substâncias extraídas da família Piperaceae em formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi***. 2008. 119 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) -Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2008.

PAVETO, C.; PEREIRA, C.; ESPINOSA, J.; MONTANGA, A. E.; FARBER, M.; ESTEVA, M.; FLAWIÁ, M. M.; TORRES, H. N. The nitric oxide transduction pathway in *Trypanosoma cruzi*. **J. Biol. Chem.**, v. 270, p. 16576-16579, 1995.

- PEREIRA, C. A.; ALONSO, G. D.; IVALDI, S.; SILBER, A. M.; ALVES, M. J.; TORRES, H. N.; FLAWIA, M. M. Arginine kinase overexpression improves *Trypanosoma cruzi* survival capability. **FEBS Lett.**, v. 554, p. 201-205, 2003.
- PEREIRA, C. A.; ALONSO, G. D.; PAVETO, M. C.; IRIBARREN, A.; CABANAS, M. L.; TORRES, H. N.; FLAWIA, M. M. *Trypanosoma cruzi* arginine kinase characterization and cloning. A novel energetic pathway in protozoan parasites. **J. Biol. Chem.**, v. 275, p. 1495-1501, 2000.
- PESSINI, G. L.; DIAS FILHO, B. P.; NAKAMURA, C. V.; CORTEZ, D. A. G. Antifungal activity of the extracts and neolignans from *Piper regnellii* (Miq.) C. DC. var. *pallenscens* (C. DC.) Yunck. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 16, p. 1130-1133, 2005.
- PIACENZA, L.; PELUFFO, G.; ALVAREZ, M. N.; KELLY, J. M.; WILKINSON, S. R.; RADI, R. Peroxiredoxins play a major role in protecting *Trypanosoma cruzi* against macrophage-and endogenously-derived peroxynitrite. **Biochem. J.**, v. 410, n. 2, p. 359-368, 2008.
- POLAK, A.; RICHLE, R. Mode of action of 2-nitroimidazole derivative benznidazole. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, v. 72, p. 228-232, 1978.
- QUIJANO-ABRIL, M. A.; CALLEJAS-POSADA, R.; MIRANDA-ESQUIVEL, D. R. Areas of endemism and distribution patterns for neotropical *Piper* species (Piperaceae). **J. Biogeogr.**, v. 33, n. 7, p. 1266-1278. 2006.
- RALSTON, K. S.; HILL, K. L. The flagellum of *Trypanosoma brucei*: new tricks from an old dog. **Int. J. Parasitol.**, v. 38, p. 869-884, 2008.
- REGASINI, L. O.; COTINGUIBA, F.; PASSERINI, G. D.; CICARELLI, R. M. B.; BOLZANI, V. S.; KATO, M. J.; FURLAN, M. Trypanocidal activity of *Piper arboreum* and *Piper tuberculatum* (Piperaceae). **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 19, p. 199-203, 2009.
- REGO, J. V.; MURTA, S. M.; NIRDÉ, P.; NOGUEIRA, F. B.; ANDRADE, H. M.; ROMANHA, A. J. *Trypanosoma cruzi*: characterisation of the gene encoding tyrosine aminotransferase in benznidazole-resistant and susceptible populations. **Exp. Parasitol.**, v. 118, p. 111-117, 2008.
- REY, L. **Parasitologia**: parasitos e doenças parasitárias do homem nas Américas e África. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991. 731 p.

REY, L. **Parasitologia**: parasitos e doenças parasitárias do homem nas Américas e na África. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. 856 p.

RUBEN, L.; EGWUAGU, C.; PATTON, C. African trypanosomes contain calmodulin which is distinct from host calmodulin. **Biochem. Biophys. Acta**, v. 758, p. 104-113, 1983.

SABORIO, J. L.; HERNANDEZ, J. M.; NARAYANSWAMI, S.; WRIGHTSMAN, R. A.; PALMER, E.; MANNING, J. E. Isolation and characterization of paraflagellar proteins from *Trypanosoma cruzi*. **J. Biol. Chem.**, v. 264, n. 7, p. 4071-4075, 1989.

SAÚDE-GUIMARÃES, D. A.; FARIA, A. R. Substâncias da natureza com atividade anti-*Trypanosoma cruzi*. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 17, n. 3, p. 455-465, 2007.

SENGUPTA, S.; RAY, A. B. The chemistry of *Piper* species: a review. **Fitoterapia**, v. 38, n. 3, p. 147-166, 1987.

SILBER, A. M.; COLLI, W.; ULRICH, H.; ALVES, M. J. M.; PEREIRA, C. A. Amino acid metabolic routes in *Trypanosoma cruzi*: possible therapeutic targets against Chagas disease. **Curr. Drug. Targets Infect. Disord.**, v. 5, p. 53-64, 2005.

SILVA, L. H. P.; NUSSENZWEIG, V. Sobre uma cepa de *Trypanosoma cruzi* altamente virulenta para o camundongo branco. **Fol. Clín. Biol.**, v. 20, p. 191-208, 1953.

SILVA, R. V.; NAVICKIENE, H. M. D.; KATO, M. J.; BOLZANI, V. S.; MEDA, C. I.; YOUNG, M. C. M.; FURLAN, M. Antifungal amides from *Piper arboreum* and *Piper tuberculatum*. **Phytochemistry**, v. 59, n. 5, p. 521-527, 2002.

SINGH, Y. N. Kava: an overview. **J. Ethno.**, v. 37, n. 1, p. 13-45, 1992.

SOUTO, R. P.; FERNANDES, O.; MACEDO, A.; CAMPBELL, D.; ZINGALES, B. DNA markers define two major phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 83, p. 141-152, 1996.

TELLEZ-IÑON, M. T.; ULLOA, R. M.; TORRUELA, M.; TORRES, H. N. Calmodulin and Ca^{2+} dependent cyclic AMP phosphodiesterase activity in *Trypanosoma cruzi*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 17, p. 143-154, 1985.

TETLEY, L.; VICKERMAN, K. Differentiation in *Trypanosoma brucei*: Host-parasite cell junctions and their persistence during acquisition of the variable antigen coat. **J. Cell Sci.**, v. 74, p. 1-19, 1985.

TIBAYRENC, M. Genetic subdivisions within *Trypanosoma cruzi* (Discrete Typing Units) and their relevance for molecular epidemiology and experimental evolution. **Kinetoplastid Biol. Dis.**, v. 2, n.12, p. 1-6, 2003.

TIBAYRENC, M.; AYALA, F. Towards a population genetics of microorganisms: the clonal theory of parasitic protozoa. **Parasitol. Today**, v. 7, p. 228-232, 1991.

TOLEDO, M.; TAFURI, W.; BAHIA, M. T.; TIBAYRENC, M.; LANA, M. Genetic diversity and drug resistance in *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 4, p. 11-22, 2004.

URBINA, J. A. Parasitological cure of Chagas disease: is it possible? Is it relevant? **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 94, p. 349-355, 1999.

URBINA, J. A.; DOCAMPO, R. Specific chemotherapy of Chagas disease: controversies and advances. **Trends Parasitol.**, v. 19, p. 495-501, 2003.

WANKE, S.; JARAMILLO, M. A.; BORSCH, T.; SAMAIN, M. S.; QUANDT, D.; NEINHUIS, C. Evolution of Piperales – matK gene and trnK intron sequence data reveal lineage specific resolution contrast. **Mol. Phylog. Evol.**, v. 42, p. 477-497, 2007.

WANKE, S.; SAMAIN, M. S.; VANDERSCHAEVE, L.; MATHIEU, G.; GOETGHEBEUR, P.; NEINHUIS, C. Phylogeny of the genus *Peperomia* (Piperaceae) inferred from the trnK/matK region (cpDNA). **Plant Biol.**, v. 8, n. 1, p. 93-102, 2006.

WENINGER, B.; ROBLEDO, S.; ARANGO, G. J.; DEHARO, E.; ARAGÓN, R.; MUÑOZ, V.; CALLAPA, J.; LOBSTEIN, A.; ANTON, R. Antiprotozoal activities of Colombian plants. **J. Ethnopharmacol.**, v. 78, n. 2-3, p. 193-200, 2001.

WILSON, N. F.; IYER, J. K.; BUCHHEIM, J. A.; MEEK, W. Regulation of flagellar length in *Chlamydomonas*. **Semin. Cell Dev. Biol.**, v. 19, p. 494-501, 2008.

WU, J. L.; LI, N.; HASEGAWA, T.; SAKAI, J. I.; MITSUI, T.; OGURA, H.; KATAOKA, T.; OKA, S.; KIUCHI, M.; TOMIDA, A.; TURUO, T.; LI, M.; TANG, W.; ANDO, M. Bioactive secolignans from *Peperomia dindygulensis*. **J. Nat. Prod.**, v. 69, n. 5, p. 790-794, 2006.

YUNES, R. A.; PEDROSA, R. C.; CECHINEL FILHO, V. Fármacos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. **Quim. Nova**, v. 24, n. 1, p. 147-152, 2001.

ZINGALES, B.; SOUTO, R. P.; MANGIA, R. M.; LISBOA, C. V.; COURA, J. R.; JANSEN, A.; FERNANDES, O. Molecular epidemiology of American trypanosomiasis in Brazil based on dimorphisms of rRNA and mini-exon gene sequences. **Inst. J. Parasitol.**, v. 28, p. 105-120, 1998.