



**Universidade Federal de Ouro Preto**  
**Núcleo de Pesquisa em Ciências Biológicas**

**Maykon Tavares de Oliveira**

**Propriedades biológicas fundamentais de diferentes grupos genéticos do *Trypanosoma cruzi*, e avaliação inicial da investigação da expressão diferencial de proteínas associadas aos grupos genéticos TcI e TcII**

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Marta de Lana

Co-orientador: Prof. Dr. Wiliam de Castro Borges

Ouro Preto, 14 de Abril de 2016.

Maykon Tavares de Oliveira

**Propriedades biológicas fundamentais de diferentes grupos genéticos do *Trypanosoma cruzi*, e avaliação inicial da investigação da expressão diferencial de proteínas associadas aos grupos genéticos TcI e TcII**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas do Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto, como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutor em Ciências Biológicas, Área de concentração, Imunobiologia de Protozoários.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Marta de Lana

Co-orientador: Prof. Dr. Wiliam de Castro  
Borges

Ouro Preto, 14 de Abril de 2016.

O482p

Oliveira, Maykon Tavares de.

Propriedades biológicas fundamentais de diferentes grupos genéticos do *Trypanosoma cruzi* e avaliação inicial da investigação da expressão diferencial de proteínas associadas aos grupos genéticos TcI e TcII [manuscrito] / Maykon Tavares de Oliveira. - 2016.

108f.: il.: color; graf.; tabs.

Orientador: Prof. Dr. Marta de Lana.

Coorientador: Prof. Dr. Willian Castro Borges.

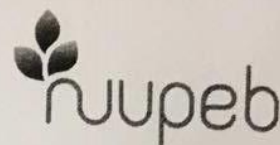
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Ouro Preto. Núcleo de Pesquisa em Ciências Biológicas. DCBI/DEACL. Ciências Biológicas.

Área de Concentração: Imunobiologia de Protozoários.

1. Protozoário - *Trypanosoma cruzi*. 2. Chagas, Doença de. 3. Proteômica. I. Lana, Marta de. II. Borges, Willian Castro. III. Universidade Federal de Ouro Preto. IV. Título.

CDU: 561.24

Catálogo: [www.sisbin.ufop.br](http://www.sisbin.ufop.br)

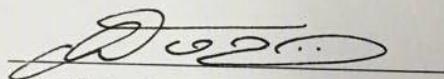


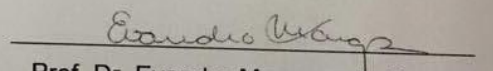
**Ata da Banca Examinadora de Defesa de Tese Intitulada:**

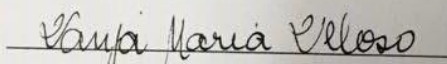
**"Propriedades biológicas fundamentais de diferentes grupos genéticos do Trypanosoma cruzi e avaliação inicial da investigação da expressão diferencial de proteínas associadas aos grupos genéticos TcI e TcII".**

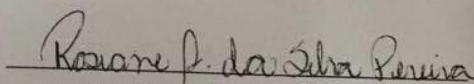
Aos catorze dias do mês de abril de 2016, às 09:00 horas, no Auditório do NUPEB da Universidade Federal de Ouro Preto, reuniu-se a Comissão Examinadora da Tese do aluno Maykon Tavares de Oliveira. A defesa da tese iniciou-se pela apresentação oral feita pelo candidato e, em seguida, arguição pelos membros da banca. Ao final, os membros da banca examinadora reuniram-se e decidiram por ..... APROVAR ..... o candidato. A concessão do título está condicionada ao cumprimento das demais exigências previstas no Regimento deste Programa.

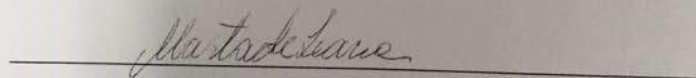
Membros da Banca Examinadora:

  
Prof. Dr. André Talvani Pedrosa da  
Silva Examinador (UFOP)

  
Prof. Dr. Evandro Marques de Menezes  
Machado Examinador (UFOP)

  
Prof.ª Dr.ª Vanja Maria Veloso  
Examinadora (UFOP)

  
Prof.ª Dr.ª Rosiane Aparecida da Silva  
Pereira Examinadora (CPqRR)

  
Prof.ª Dr.ª Marta de Lana Presidente (UFOP)

DATA DA DEFESA: 14/04/2016



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS  
BIOLÓGICAS

NUPEB - Bloco 1 / Universidade Federal de Ouro Preto - Campus Universitário  
Morro do Cruzeiro / CEP 35.400-000 - Ouro Preto - MG - Brasil Tel: 55 (31) 3512-1631

**COLABORADORES:**

**Laboratório de Imunopatologia – NUPEB/UFOP**

Dra. Cláudia Martins Carneiro

Dr. Alexandre Barbosa reis

Dra. Nívia Carolina Nogueira de Paiva

Dra. Kátia Fonseca

**Laboratório de Pesquisas Clínicas – UFMG**

Dra. Rosália Morais Torres

**Laboratório de Doenças Parasitárias – CpqRR**

Dr. João Carlos Pinto Dias

**Laboratório de Biomarcadores – CpqRR**

Dr. Olindo de Assis Martins Filho

**Laboratório de Parasitologia - UEM**

Dr. Max Jean de Ornelas Toledo

**Laboratório de Ezimologia e Proteômica**

Prof. Dr. Willian de Castro Borges

Prof. Dra. Karina Taciana Santos Silva

"O que chamamos de inspiração é a capacidade de reter e ampliar, com um toque próprio e único, um flash ou insight, uma coisinha de nada que atravessa o nosso pensamento e pode fugir. Porém, boa parte dessa inspiração é fruto da nossa capacidade de concentração, de disciplina, de esforço mental e até de teimosia. Precisamos não de um dia bonito de céu azul, mas de uma boa dose de paciência para produzir alguma coisa interessante, para organizar raciocínios, transformar barro em tijolos e tijolos em casas."

**Freitas, 2002.**

**Dedicatória:**

Dedico essa Tese de Doutorado à minha mãe, fonte de inspiração e força, e toda minha família, por terem me incentivado a não desistir nos momentos mais difíceis dessa caminhada... Amo vocês!

Agradeço imensamente a Deus, fonte de luz, força e sabedoria.

À Professora Dra. Marta de Lana pela oportunidade, orientação e por ter me concedido esse projeto, acreditando em minha capacidade. Obrigado pelos ensinamentos transmitidos. Só tenho a agradecer pela força, amizade e pela imensa demonstração de carinho!!! Muito obrigado por tudo, espero que nossa parceria se propague pela eternidade...

Ao Professor Dr. William de Castro Borges pela coorientação, e a todos do laboratório Laboratório de Enzimologia e Proteômica (LEP), em especial ao Leandro e a Luciana, meu sincero agradecimento!

À Professora Dra. Claudia Martins Carneiro e ao Professor Dr. Alexandre Barbosa Reis pela amizade e colaboração.

À Professora Dra. Karina Ticiano da Silva pela orientação e colaboração nas análises de proteômica.

Ao Professor Dr. Jean Toledo pelo fornecimento da cepa representante do genótipo TcI.

Ao Dr. Olindo de Assis Martins Filho, pelo apoio na escrita do manuscrito e colaboração na realização e análise dos resultados da CF-AATV.

À Dra. Nívia Carolina Nogueira de Paiva por todo apoio e amizade, agradeço de coração!

Às grandes amigas, Jaqueline e Renata, a amizade de vocês foi fundamental. Jack e Rê obrigado pelo apoio, incentivo, brincadeiras e momentos de descontração... Tenho certeza que não foi por acaso que o destino fez que nos conhecêssemos, e mesmo que a distância nos separe, nossa amizade vai perdurar para sempre!!!

Ao Professor Dr. Girley (Aufy), pela grande amizade, empenho e força de vontade em isolar os parasitos de seus pacientes. Certamente sem seu trabalho, esse projeto não teria existido...

À minha aluna de iniciação científica Ana Paula Vieira, muito obrigado por tudo!



A todos os amigos do laboratório de Doença de Chagas, em especial a Glaucia, Mari, Feijuada, Matheus, Elô, Gabi, Fernanda, Natália, Clara e Micheline, e a todos que convivi e também aqueles que não estão mais em Ouro Preto, obrigado pela ótima convivência durante todos esses anos!

Aos amigos do laboratório de Imunopatologia, meu eterno agradecimento!

A todos os professores do NUPEB.

Aos secretários do NUPEB.

Ao Marcos pelo apoio incondicional, compreensão e carinho, seu apoio foi fundamental durante a realização desse trabalho, obrigado por tudo!

Aos grandes amigos que Ouro Preto me proporcionou conhecer, em especial ao Heraldo, Wellington (Tom), André, Giulia, Thaís Cosseti e Diego, vocês foram fundamentais nessa conquista. Amo vocês!

Ao CNPQ, Capes e a UFOP, pela concessão de todo financiamento do projeto.

À FAPEMIG pelo financiamento da minha bolsa, sem ela seria impossível concluir esse doutorado.

**Tabela 1:** Identificação das amostras de *Trypanosoma cruzi*, dados dos pacientes dos quais foram isoladas e grupo genético (DTU) a que pertencem. ....15

**Tabela 2:** Média dos parâmetros biológicos avaliados em camundongos infectados com as amostras 728, 501, 452 (TcII) e 1337 (TcVI) de *Trypanosoma cruzi* isoladas de pacientes na fase crônica da doença de Chagas residentes em Berilo, Vale do Jequitinhonha, Minas Gerais, Brasil. ....36

**Tabela 3:** Resultados das técnicas parasitológicas/molecular (Hm, PCR e qPCR), sorológica convencional (ELISA) e sorológica não convencional (CF-AATV), utilizadas como controle de cura nos animais infectados com amostras de *Trypanosoma cruzi* tratados na fase aguda e crônica da infecção. ....46

**Tabela 4:** Proteínas identificadas nos géis referentes às amostras de *T. cruzi* PR150 (TcI) e 452 (TcII) que apresentaram alteração de expressão  $\geq 1,5$  vezes. ....61

**Figura 1:** Organograma de desenvolvimento do projeto.....14

**Figura 2:** A) Curvas de parasitemia observadas em camundongos Swiss inoculados com 10.000 tripomastigotas sanguíneos e não tratados infectados com as amostras de *Trypanosoma cruzi* (452, 501, 728 - TcII e 1337 - TcVI) isoladas de pacientes com infecção chagásica crônica do município de Berilo, Vale do Jequitinhonha, MG, Brasil. B, C, D e E – Curvas de parasitemia comparando os grupos infectados tratados com os isolados infectados não tratados na fase aguda da infecção. (INT: infectado não tratado, ITFA: infectado e tratado na fase aguda). .....34

**Figura 3:** Polimorfismo dos tripomastigotas sanguíneos. A: forma fina; B: forma intermediária; C: forma larga .....38

**Figura 4:** Gel eletrônico apresentando os produtos amplificados de diferentes amostras de DNA extraídas do sangue de camundongos infectados com as diferentes amostras do *Trypanosoma cruzi*. .....40

**Figura 5:** Eletrofenograma demonstrativo das primeiras cinco amostras de *Trypanosoma cruzi* existentes no gel eletrônico, demarcando em vermelho o pico de 330 pb, característico do K-dna do *Trypanosoma cruzi*. .....41

**Figura 6:** Curvas representativas de qPCR: A) Gráfico de amplificação ( $\Delta R_n$  x ciclo) do *Trypanosoma cruzi* demonstrando a amplificação de DNA nas seis diluições seriadas utilizadas ( $1 \times 10^5 - 1 \times 10^0$ ) em escala logarítmica para ajustes do *Threshold* (linha azul). Cada conjunto de linhas coloridas refere-se a um ponto da curva. B) Curva padrão gerada a partir da região linear da curva de amplificação. ....42

**Figura 7:** Leitura da absorbância relativo à sorologia convencional (ELISA) dos camundongos infectados com as quatro cepas de *Trypanosoma cruzi* ( 501, 452, 728 – TcII e 1337 – TcVI), avaliados nos tempos de 90, 180 e 360 dias após o tratamento com o Nifurtimox nas fases aguda e crônica da infecção (ITFA = grupos infectados e tratados na fase aguda da infecção; ITFC = grupos infectados e tratados na fase crônica da infecção; CN = controle negativo; Cutt-of – linha contínua, com valor aproximado de 0,4).....44

**Figura 8:** A) Quantificação do número de células inflamatórias no coração de animais infectados com amostras de *Trypanosoma cruzi*. A linha tracejada no gráfico representa a média entre o número de núcleos celulares encontrados no tecido cardíaco dos animais não infectados. Índices acima da linha tracejada são considerados tecido inflamado. B) Fotomicrografias representativas da avaliação do processo inflamatório da amostra 501 (TcII): aspecto histológico anormal em animais infectados não tratados, com presença de grande quantidade de infiltrado inflamatório no grupo não tratado, tanto na fase aguda, como na fase crônica da infecção. Normalidade histológica em animais infectados e tratados na fase aguda da infecção. C) Fotomicrografias representativas do processo de deposição de colágeno para avaliação de fibrose no tecido cardíaco de animais infectados com a cepa 501 (TcII), (Tricrômico Masson, Bar = 50 mm). .....50

**Figura 9:** A) Curva de crescimento em meio acelular dos seis isolados de *Trypanosoma cruzi* pertencente a genótipos distintos, TcI, TcII e TcVI. B) Comparação entre as áreas sob a curva (AUC) dos dois isolados, 728 (TcII) e PR150 (TcI), que apresentaram a maior e a menor área sob a curva respectivamente. ....52

**Figura 10:** Comportamento diferencial de crescimento médio em cultura acelular em meio LIT ds genótipos TcII (A) e TcVI (B) de *Trypanosma cruzi*. ....53

**Figura 11:** Perfil representativo da infecção em células “Vero” de amostras de *Trypanosoma cruzi* isoladas de pacientes chagásicos crônicos pertencentes a três genótipos distintos (TcI, TcII e TcVI). A - Controle não infectado correspondente às células sem infecção pelo *T. cruzi*. B - Infecção moderada após 48h de infecção pela cepa 1337 (TcVI) apresentando poucas células infectadas e com números reduzidos de amastigotas intracelulares. C - Infecção intensa, correspondente ao período de 72 h após infecção pela cepa 501 (TcII) demonstrando grande número de células infectadas por campo e grande número de amastigotas intracelulares. ....54

**Figura 12:** Perfil comparativo de infecção em células “Vero” de amostra de *Trypanosoma cruzi* pertencentes a três genótipos distintos nos diferentes tempos de infecção. A) Número de células infectadas em cada 100 células contadas. B) Número de formas amastigotas por célula. C) A razão entre o número de amastigotas em relação ao número total de células infectadas. Os símbolos (\* e #) representam os pares que apresentaram diferença estatística significativa entre si ( $p < 0,05$ ). ....55

**Figura 13:** Perfil comparativo de infecção em células “Vero” de amostras de *Trypanosoma cruzi* pertencentes a genótipos distintos em um mesmo intervalo de tempo. A) Número de células infectadas em 100 células contadas. B) Número de formas amastigotas por célula. C) Razão entre o número de amastigotas e número total de células infectadas. As consoantes indicam os pares que apresentaram diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ).57

**Figura 14:** Perfil bidimensional comparativo das amostras de *Trypanosoma cruzi* pertencentes a dois genótipos distintos, 452 (TcII) e PR150 (TcI). Géis corados com Coomassie G-250. Algumas proteínas diferencialmente expressas estão identificadas por setas vermelhas nos dois géis. ....60

**Figura 15:** Diferença nos níveis de expressão das proteínas identificadas nas duas amostras de *Trypanosoma cruzi*, Pr 150 – TcI e 452 – TcII. Os resultados representam a média  $\pm$  erro padrão do aumento ou diminuição de expressão nas triplicatas de géis para cada genótipo. As chaves acima no gráfico indicam quais proteínas pertencem a cada amostra, e o número na frente do nome de cada gene corresponde ao número do spot identificado (exemplo da primeira coluna no gráfico: 22 EF2, 22 corresponde ao número do spot identificado na cepa PR 150 (TcI), e EF2 ao gene que codifica a proteína Elongation Factor 2, conforme descrito na Tabela 4). ....64

AUC Area under curve

BZ, Benznidazol

CCA-UFOP Centro de Ciência Animal da Universidade Federal de Ouro Preto

d.a.t dia após o tratamento

d.p.t Dias pós tratamento

dATP, Desoxinucleotídeo de Adenosina-5'-trifosfato

DC Doença de Chagas

DCh. doença de Chagas

dCTP, Desoxinucleotídeo de Citocina-5'-trifosfato

DNA Ácido desorribonucléico

DNTP 's Quatro bases nitrogenadas

DPMP Dia do pico máximo de parasitemia

dTTP Desoxinucleotídeo de Timina-5'-trifosfato

DTU Discrept typing unit

ELISA Enzyme-linked immunosorbent assay

ESF Exame de sangue a fresco

ESF Exame de sangue a fresco

EUA Estados Unidos da América

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Peróxido de hidrogênio

H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> Ácido sulfúrico

HC Hemocultura

IgG. Imunoglobulina da classe G

IgM Imunoglobulina da classe M

INF infectividade

INT Infectado não tratado

ITFA Infectado tratado fase aguda

ITFC Infectado tratado fase crônica

KCl Cloreto de potássio

LAFEPE Laboratorio Farmacêutico do Estado de Pernambuco

LIT Liver infusion tryptose

MG Minas Gerais

MgCl<sub>2</sub> Cloreto de magnésio

MOR Mortalidade

MS 2005 Ministerio da Saúde

NF Nifurtimox

NUPEB Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas

OMS Organização mundial da saúde

OPD Orto-fenileno-diamino

PAR Parasitemia

PBS Solução salina tamponada

PCR Reação em Cadeia da Polimerase

pH Potencial hidrogeniônico

PMP Pico máximo de parasitemia

PP Período patente

PPP Período pré-patente

RNA Ácido ribonucléico

SFB Soro fetal bovino

*T. cruzi*      *Trypanosoma cruzi*

Tris-HCl      cloridrato de hidroximetilaminometano

UFOP      Universidade Federal de Ouro Preto

WHO      World                      Health                      Organizatio



1.0 INTRODUÇÃO.....	1
<b>1.1 <i>Trypanosoma cruzi</i> e Doença de Chagas: aspectos epidemiológicos, clínicos e patológicos.....</b>	<b>1</b>
<b>1.2 Tratamento etiológico da Doença de Chagas.....</b>	<b>3</b>
<b>1.3 Variabilidade biológica do <i>T. cruzi</i>:.....</b>	<b>4</b>
<b>1.4 Variabilidade genética do <i>Trypanosoma cruzi</i> .....</b>	<b>5</b>
<b>1.5 Expressão de proteínas e aspectos genéticos do <i>Trypanosoma cruzi</i>.....</b>	<b>7</b>
2.0 JUSTIFICATIVA .....	11
3.0 OBJETIVO GERAL:.....	13
<b>3.1 Objetivos específicos: .....</b>	<b>13</b>
4.0 ANIMAIS, MATERIAIS E MÉTODOS: .....	14
<b>4.1 Amostras de <i>T. cruzi</i> em estudo e procedência dos pacientes dos quais foram isoladas.....</b>	<b>15</b>
<b>4.2 Aspectos éticos .....</b>	<b>16</b>
<b>4.3 Avaliação clínica dos pacientes.....</b>	<b>16</b>
<b>4.4 Obtenção dos isolados de <i>T. cruzi</i>.....</b>	<b>17</b>
<b>4.5 Caracterização morfológica e susceptibilidade das amostras ao tratamento específico.....</b>	<b>17</b>
4.5.1 Animais: .....	17
4.5.2 Grupos experimentais:.....	18
4.5.3 Confirmação da infecção: Exame de sangue a fresco (ESF):.....	18
4.5.4 Avaliação morfológica .....	18
4.5.5 Parasitemia (PAR) .....	18
4.5.6 Período Pré-patente (PPP) .....	19
4.5.7 Período Patente (PP).....	19
4.5.8 Pico Máximo de Parasitemia (PMP) .....	19
4.5.9 Dia do Pico Máximo (DPMP) .....	19
4.5.10 Mortalidade (MOR).....	20

<b>4.6 Tratamento dos camundongos:</b> .....	<b>20</b>
4.6.1 Fármaco e Esquema de Tratamento.....	20
<b>4.7 Análises da evolução da infecção e da eficácia terapêutica em camundongos:</b> .....	<b>20</b>
4.7.1 Curva de Parasitemia: .....	20
4.7.2 Mortalidade: .....	20
<b>4.8 Controle de cura:</b> .....	<b>21</b>
4.8.1 Avaliações Parasitológicas: .....	21
4.8.2 Exame de Sangue a Fresco (ESF): .....	21
4.8.3 Hemocultura (Hm):.....	21
4.8.4 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em eluato de sangue .....	21
4.8.5 Avaliação do parasitismo tecidual (coração) por qPCR.....	22
<b>4.9 Avaliações Sorológicas:</b> .....	<b>24</b>
4.9.1 Sorologia Convencional –(ELISA): .....	24
4.9. 2 Sorologia não convencional – Pesquisa por anticorpos anti-tripomastigotas vivos (CF-AATV) .....	25
<b>4.10 Avaliações histopatológicas:</b> .....	<b>26</b>
<b>4.11 Critério de cura.....</b>	<b>27</b>
<b>4.12 Perfil de infecção e desenvolvimento da amostras <i>in vitro</i> (células “VERO”):</b> .....	<b>27</b>
<b>4.13 Curvas de crescimento das formas epimastigotas .....</b>	<b>28</b>
<b>4.14 Análise estatística dos parâmetros biológicos em camundongos e cultivo celular .....</b>	<b>28</b>
<b>4.15 Cultivo acelular de <i>T. cruzi</i> e obtenção de parasitos destinados às análises da proteômica.....</b>	<b>29</b>
<b>4.16 Preparo do extrato proteico.....</b>	<b>30</b>
<b>4.17 Eletroforese bidimensional do extrato proteico das formas epimastigotas.</b>	<b>30</b>
<b>4.18 Identificação das Proteínas pela espectrometria de massas .....</b>	<b>31</b>

5.0 RESULTADOS .....	33
<b>5.1 Parâmetros biológicos .....</b>	<b>33</b>
5.1.1 Infectividade (INF) .....	33
5.1.2 Parasitemia (PAR): .....	33
5.1.3 Período Pre-Patente (PPP):.....	35
5.1.4 Período Patente PP: .....	36
5.1.5 Pico máximo de parasitemia:.....	37
5.1.6 Dia do pico máximo de parasitemia DPMP: .....	37
5.1.7 Mortalidade (MOR).....	38
5.1.8 Caracterização morfológica dos parasitos no sangue periférico .....	38
<b>5.2 Susceptibilidade/Resistência das amostras de <i>T. cruzi</i> ao Nifurtimox.....</b>	<b>38</b>
5.2.1 Avaliações Parasitológicas .....	38
5.2.1.4 Avaliação do parasitismo tecidual (coração) por qPCR.....	41
<b>5.3 Avaliações Sorológicas .....</b>	<b>43</b>
5.3.1 Sorologia Convencional - ELISA.....	43
5.3.2 Sorologia não convencional – CF-AATV .....	45
<b>5.4 Perfis de Susceptibilidade ao Nifurtimox e critério de cura dos animais.....</b>	<b>48</b>
<b>5.6 Avaliação da curva de crescimento em meio de cultura acelular .....</b>	<b>51</b>
<b>5.7 Avaliação dos perfis de infectividade e desenvolvimento <i>in vitro</i>.....</b>	<b>53</b>
<b>5.8 Expressão diferencial de proteínas das formas epimastigota .....</b>	<b>58</b>
6.0 DISCUSSÃO:.....	65
<b>6. 1 Caracterização biológica de <i>T. cruzi</i> e resultados aqui obtidos.....</b>	<b>66</b>
<b>6.2 Proteômica diferencial em <i>T. cruzi</i>.....</b>	<b>75</b>
7.0 CONCLUSÕES .....	81
8.0 PERSPECTIVAS .....	82
9.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	83

**RESUMO:**

A Doença de Chagas (DCh) tem como agente etiológico o protozoário hemoflagelado *Trypanosoma cruzi* que apresenta grande diversidade genética, que por sua vez apresenta-se relacionada à diversidade biológica da espécie. Diversos estudos foram conduzidos ao longo do tempo, na tentativa de relacionar a variabilidade genética do *T. cruzi* com seus parâmetros biológicos resistência ao tratamento e as diferentes manifestações clínicas da DCh, mas até o presente momento sem sucesso. Sabendo-se da importância e necessidade de busca de novos alvos que possam responder a essas questões, a proposta desse projeto foi avaliar os parâmetros biológicos principais de seis amostras do *T. cruzi*, pertencentes a grupos genéticos distintos (TcI, TcII e TcVI), isoladas de pacientes chagásicos crônicos, apresentando formas clínicas distintas da DCh. Foram utilizadas ferramentas proteômicas para determinar o proteoma diferencial de duas amostras do *T. cruzi* (TcI e TcII) para verificar se há correlação entre o perfil proteico com os parâmetros biológicos, evolução da infecção em modelo murino e as formas clínicas da doença humana. Este trabalho avaliou ainda a biologia de todas as seis amostras em meio acelular (LIT), em células “Vero” e camundongos Swiss. Neste modelo animal foi também avaliada a resposta ao tratamento com o Nifurtimox nas fases aguda e crônica da infecção. O conjunto de dados biológicos tais como crescimento em meio acelular, infecção em meio celular e desenvolvimento da infecção em modelo murino, obtidos de cada amostra de *T. cruzi* revelou diferenças significativas entre os genótipos. Em relação à resposta ao tratamento etiológico, o critério de cura clássico (ELISA negativa), demonstrou cura em apenas 6,25% dos animais infectados e tratados na fase aguda (ITFA). Em contrapartida, quando foi adotado um critério mais recente (CF-AATV negativa), o índice de cura foi 10 vezes maior (62.5%), e os mesmos animais considerados curados por este segundo critério foram também negativos na qPCR em tecido cardíaco. Na fase crônica, nenhuma amostra foi curada considerando ambos os critérios de cura, e a qPCR no coração também foi positiva em todos os animais, confirmando a conhecida dificuldade de curar infecções crônicas. Os dados obtidos da proteômica das duas cepas (TcI e TcII) a partir das formas epimastigotas, demonstraram diferenças significativas na expressão diferencial de proteínas, principalmente em relação ao grupo proteico com função de resposta ao estresse. Dessa forma, pode-se concluir com esse trabalho, que a hipótese de correlação entre genética do *T. cruzi* com a biologia das amostras foi confirmada, e que é importante adotar metodologias mais atuais que antecipam a demonstração da cura parasitológica da DCh. Esse trabalho demonstrou ainda a importância de busca de alvos diferencialmente expressos no parasita que sirvam como marcadores de prognóstico da infecção experimental e da DCh humana.

**Abstract**

Chagas disease (CD) has as etiologic agent the hemoflagellate protozoan *Trypanosoma cruzi* that presents great genetic diversity, which in turn is related to the biological diversity of the species. Several studies have been conducted over time as an attempt to correlate the genetic variability of *T. cruzi* with the main biological parameters, resistance to treatment and the different clinical manifestations of CD, but so far without success. Considering the importance and need of to search new targets that may answer these questions, the purpose of this project was to evaluate the main biological parameters of six samples of *T. cruzi* belonging to different genetic groups (TcI, TcII and TcVI), isolated from chronic chagasic patients with different clinical forms of the disease. Proteomics tools were used to determine the proteome of two different *T. cruzi* samples (TcI and TcII) to check for correlation between the protein profile with the biological parameters, resistance to treatment, course of the infection in mice and the clinical forms of human disease. This study also evaluated the biology of all six samples in acellular medium (LIT), "Vero" cells and Swiss mice. In this animal model it was also evaluated the response to treatment with Nifurtimox in the acute and chronic phases of the infection. The set of biological data, such as, growth in acellular medium, infection in "Vero" cells and evolution of the infection in mice obtained from each *T. cruzi* sample showed significant differences between the genotypes. Regarding the response to specific treatment, the classical criteria of cure (ELISA negative) showed cure in only 6.25% of the infected animals and treated in the acute phase (ITAP). In contrast, when a more recent criterion (FC-ALTA negative) was adopted, the cure rate was 10 times higher (62.5%). Interestingly, the same cured animals were also negative in qPCR in the heart. In the chronic phase it was not observed cure when both cure criteria were considered, and the heart was also qPCR negative in all animals, what confirms the known difficulty of to cure chronic infections. Data of proteomics obtained from epimastigotes of two samples (TcI and TcII) showed significant differences in the differential expression of proteins, especially in relation to the protein group with function of response to stress. Thus, it was possible to verify with this work that the hypothesis of correlation between *T. cruzi* genetics and the biology of the samples was confirmed, and that is important to use more current methodologies that anticipate the demonstration of parasitological cure of CD. This work also demonstrated the importance of to search targets differentially expressed in *T. cruzi* that work as prognostic markers of the experimental infection and human disease.

## 1.0 INTRODUÇÃO:

### 1.1 *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas: aspectos epidemiológicos, clínicos e patológicos.

A Doença de Chagas (DCh) ou Tripanossomíase Americana é causada pelo protozoário hemoflagelado *Trypanosoma cruzi*, infecção descoberta em 1909, pelo pesquisador brasileiro Carlos Ribeiro Justiniano das Chagas.

Segundo a Organização Mundial de Saúde (WHO, 2014), 6 a 7 milhões de indivíduos encontram-se infectados pelo parasito em toda a América Latina e cerca de 100 milhões de pessoas estão sobre o risco de infecção. A área de distribuição da DCh é bastante ampla se estendendo desde o Sul dos Estados Unidos até a Argentina (Miles *et al.*, 2004). A DCh ainda hoje representa uma das doenças infecto-parasitárias com maior impacto social e econômico em grande parte do Continente Americano, devido as altas taxas de transmissão principalmente em países andinos (Solari *et al.*, 1998), o grande contingente de indivíduos infectados na maioria dos países da América Latina onde o controle não é devidamente realizado ou não tem sido feito satisfatoriamente (Dias *et al.*, 2004; Coura *et al.*, 2013).

A gravidade das manifestações clínicas são decorrentes da cardiopatia, responsável em parte pela ocorrência de morte súbita, além das manifestações digestivas que ocorrem de forma isolada ou associada às manifestações cardíacas (Rassi *et al.*, 2010).

A transmissão do protozoário *T. cruzi* está amplamente relacionada com seu inseto vetor, um hemíptero hematófago pertencente à família Reduviidae e subfamília *Triatominae*. A transmissão do *T. cruzi* ao homem se dá então através da deposição das fezes e ou urina do inseto vetor contendo as formas tripomastigotas infectantes sobre a pele com ferimentos e/ou mucosa do hospedeiro durante o repasto sanguíneo (Chagas, 1909; Brener, 1979). Além da transmissão vetorial e oral, temos que ressaltar a importância epidemiológica das transmissões por transfusão sanguínea (Dias e Brener, 1984) com sangue contaminado, transplante de órgãos (com órgão ou tecidos contaminados), transmissão congênita (Bittencourt, 2000), e acidentes laboratoriais (Dias, 2007). Além destes mecanismos mais usuais de transmissão, muitos casos de transmissão da DCh continuam acontecendo por via oral em decorrência do extrativismo intenso na região de toda Bacia Amazônica (Aguilar *et al.* 2007; Valente *et al.*, 2009), e ainda silenciosamente por outros mecanismos de transmissão

independentes dos vetores, em diversos países de outros Continentes, onde os métodos de controle usuais entre os países latinoamericanos não são praticados (Schmunis and Yadon, 2010; Carlier, 2011).

Os humanos quando infectados por uma dessas vias de contaminação pelo *T. cruzi* normalmente desenvolvem um período agudo da Doença de Chagas (Dias *et al.*, 1984). A fase aguda pode ser assintomática ou oligossintomática na maioria dos casos ou ser caracterizada por presença de sinais de porta de entrada, como, chagoma de inoculação ou sinal de Romana além de linfadenopatias, febre e presença de parasito no sangue periférico demonstrado no exame de sangue a fresco. Essa fase dura em média de um a quatro meses (Dias *et al.*, 1984). Passada a fase inicial, os pacientes evoluem para a fase crônica que persiste por toda a vida do hospedeiro (Dias *et al.*, 1984). Esta fase é caracterizada pela escassez de parasitos no sangue, resultado da resposta imune específica. Os indivíduos na fase crônica podem permanecer na forma indeterminada quando apresentam ausência de qualquer sinal clínico da doença ou podem desenvolver as formas cardíacas, digestivas e ou mista (manifestações cardíacas e digestivas associadas) - (Rassi *et al.*, 1992).

A forma cardíaca se dá por complicações relacionadas com alterações no ritmo cardíaco e na condução do impulso nervoso no coração do paciente infectado (Amorim *et al.*, 1979; Coura *et al.*, 2012, Rassi *et al.*, 2013). Pode ocorrer hipertrofia ou dilatação das câmaras cardíacas. Em casos avançados de cardiomegalia, fenômenos tromboembólicos e sinais de congestão passiva são os principais achados patológicos, além do aneurisma apical, bastante frequente e característico da cardiopatia chagásica crônica (WHO, 2002). A forma digestiva pode acometer o esôfago e cólon principalmente, ou os dois simultaneamente. As alterações do trato digestivo podem estar associadas à intensa destruição das células nervosas, principalmente do plexo mioentérico de Auerbach e de Meisner, presentes nesses órgãos e aos aspectos imunológicos que geram inflamação no tecido parasitado bem como ao tropismo e aspectos inerentes a cepa do parasito envolvido (Rezende, 1997).

Tanto na forma cardíaca como na digestiva da DCh, admite-se que a cepa do parasito e características biológicas, associadas conjuntamente à sua genética, sejam os maiores e mais importantes fatores envolvidos na gênese da patologia na DCh (Dias, 2000).

## 1.2 Tratamento etiológico da Doença de Chagas

O tratamento da doença de Chagas é uma questão ainda não completamente resolvida, pois tem como objetivo a erradicação da infecção e a prevenção do aparecimento de lesões em órgãos ou do agravamento das lesões presentes (Coura *et al.*, 1997), o que ainda não tem sido atingido satisfatoriamente com os fármacos disponíveis e em estudo (Guedes *et al.*, 2011 e Bahia *et al.*, 2014).

Há várias décadas, pesquisas envolvendo a análise de compostos efetivos para o tratamento da Doença de Chagas (DCh) vêm sendo executadas, tanto experimentalmente quanto clinicamente, porém sem grande sucesso (Brener, 1993; Cançado, 1968; Moreira *et al.*, 1992). Os fármacos Benzonidazol (BZ - Rochagan®) e o nitroderivado Nifurtimox (NF - Lampit®, Bayer) são os clinicamente recomendados e acessíveis para o tratamento humano. O Benzonidazol é produzido no Brasil, em colaboração com o Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco (LAFEPE) e a Organização Mundial da Saúde (OMS), porém em quantidade escassa (Schofield *et al.*, 2006; Romanha *et al.*, 2010).

O Nifurtimox (3-metil-4 {(5-nitrofurfurilidene) amino} tiomorfoline-1-,1-dioxide), produzido pelo Laboratório Bayer foi lançado em 1967 com o nome comercial Lampit®, na forma de comprimidos com 120 mg de princípio ativo, foi a primeira droga usada no tratamento da fase aguda da doença de Chagas (Brener, 2000). Tal medicamento tem mecanismo de ação intermediado por radicais livres gerados pelo fármaco que geralmente são peróxidos de hidrogênio e ânions superóxidos (Docampo & Stoppani, 1979), enquanto o Benzonidazol tem como mecanismo a depreciação da síntese de proteínas e da incorporação de timidina em DNA, além da redução de incorporação dos precursores de RNA, o que ocasiona a diminuição da biossíntese de macromoléculas (polak & Richle, 1978).

Conforme o Consenso Brasileiro em doença de Chagas (2005), o tratamento etiológico da doença é indicado para todos os infectados na fase aguda, infecção congênita, infecção crônica recente, infecção crônica na forma indeterminada e formas digestivas e cardíacas leves. O tratamento também é recomendado para receptores e doadores de sangue com sorologia positiva, pacientes imunossuprimidos e em caso de infecção acidental (MS, 2005, WHO, 2010). Sabe-se que a eficiência do tratamento é melhor quanto mais precoce for realizado o diagnóstico da doença e o início da



terapêutica, por outro lado, a maior limitação dos fármacos é sua baixa atividade antiparasitária na fase crônica da doença (Coura & Castro, 2002).

### **1.3 Variabilidade biológica do *T. cruzi*:**

O *T. cruzi* é uma espécie que possui variabilidade morfológica (Andrade & Andrade, 1966; Andrade, 1985) e extensa variabilidade biológica, relacionadas ao seu crescimento em cultivo celular e acelular, virulência (Brenner & Chiari, 1963; Brenner, 1977) tropismo tecidual (Vago *et al.*, 2000), suscetibilidade a drogas (Toledo *et al.*, 2003; Toledo *et al.*, 2004) e à composição antigênica (Krettli & Brenner, 1982). Carlos Chagas, em 1909, já descrevia algumas diferenças na biologia do parasito. Este autor, observando a morfologia das formas tripomastigotas sanguíneas verificou a existência de formas largas e delgadas do parasito, achado que foi posteriormente muito estudado por outros pesquisadores (Brenner, 1965; Silva, 1959). Foi então verificado que as formas delgadas predominavam em cepas de alta virulência com macrofagotropismo, desenvolviam parasitemia precoce e eram mais suscetíveis aos anticorpos circulantes. As formas largas por sua vez, eram miotrópicas, apresentavam baixa virulência e maior resistência aos anticorpos do hospedeiro (Andrade, 1974; Brenner, 1965; Brenner, 1969).

Devido à variabilidade biológica da espécie, foi proposto por Andrade em 1974, o primeiro critério de subdivisão das populações do *T. cruzi* em grupos que apresentavam padrões de comportamento biológicos semelhantes em camundongos, baseado em parâmetros tais como: predomínio das formas largas ou delgadas, curva de parasitemia, morfologia dos tripomastigotas sanguíneos, tropismo tecidual, taxa de mortalidade, e lesões histopatológicas. Foram inicialmente definidos três grupos denominados de Tipos I, II e III. Posteriormente, Andrade & Magalhães (1997), avançando nesses estudos e associando a classificação dos parasitos pelo perfil isoenzimático, propuseram o termo “biodema” denominados I, II e III, respectivamente para esses grupos.

Essa heterogeneidade poderia contribuir para explicar diferenças regionais quanto à variabilidade das manifestações clínicas, resposta ao tratamento, e até mesmo à transmissibilidade do parasito.

Em 1988, Tibayrenc & Ayala analisando um grande número de isolados de *T. cruzi* procedentes de diferentes países, ecótopos, ambientes e hospedeiros humano, reservatórios e vetores, verificaram que esta espécie apresentava estrutura e evolução predominantemente clonal, na qual os eventos de hibridização são raros (Tibayrenc *et*

*al.*, 1989), mantendo-se o parasita geneticamente estável ao longo do tempo e espaço, até que pressões maiores causem alterações. A hipótese subjacente ao modelo clonal é que a divergência filogenética desta espécie é diretamente proporcional às diferenças biológicas (Tibayrenc & Brenière, 1988), ou seja, amostras dos parasitos geneticamente mais próximos seriam mais semelhantes entre si, diferentemente de amostras geneticamente mais distantes que apresentariam características biológicas mais distintas. A teoria clonal explicaria a existência das diferenças genéticas regionais do parasito (Zingales *et al.* 2012) com repercussão nas características clínicas regionais da doença.

Diversos autores têm explorado a hipótese subjacente ao modelo clonal apresentado por esta espécie. A associação entre a biologia do parasito e a sua genética tem sido efetivamente comprovada com amostras clonadas ou não, tanto *in vitro* em relação a sua capacidade de crescimento e metacicloênese em cultivo acelular (Laurent *et al.*, 1997), infectividade, multiplicação e resposta ao tratamento em cultivo celular (Revollo *et al.* 1998), ou *in vivo* tal como infectividade, crescimento e metacicloênese no vetor (Lana *et al.*, 1998), e infectividade, parasitemia, mortalidade, tropismo celular, resposta ao tratamento e resposta humoral em camundongos (Lana *et al.*, 2001, Toledo *et al.*, 2002, Santos *et al.*, 2010), e resistência ao tratamento *in vivo* (Toledo *et al.*, 2003).

#### **1.4 Variabilidade genética do *Trypanosoma cruzi***

A variabilidade dos isolados do *T. cruzi* pode ser observada tanto em nível biológico como demonstrado por Andrade *et al.* (1985), estudando o comportamento de cepas do parasito em modelo murino ou em nível genético, com base na análise do DNA e a expressão de proteínas como as isoenzimas (Miles *et al.*, 1978).

Estudos pioneiros realizados por Toyé (1974) analisando o perfil de isoenzimas gerados por dois sistemas enzimáticos, ASAT (aspartato aminotransferase) e ALAT (alanina aminotransferase), demonstraram primeiramente a existência de variabilidade genética intra-específica do parasito. O extrato enzimático bruto obtido de isolados do parasito submetidos a reações enzimáticas com substratos das enzimas gerou perfis de bandas diferenciados para os grupos analisados, sugerindo assim a existência da diversidade genética na espécie.

Posteriormente, diversos estudos foram realizados na tentativa de demonstrar e comprovar a variabilidade genética da espécie. Empregando a mesma metodologia utilizada por Toyé em 1974, mas, avaliando locus enzimáticos em números cada vez maiores e de maior complexidade, diversos autores chegaram a confirmação da variabilidade genética intra-específica do *T. cruzi*, e puderam classificar a espécie de acordo com a semelhança dos perfis isoenzimáticos, em agrupamentos distintos (Miles *et al.*, 1977 e 1978; Romanha *et al.*, 1979; Tibayrenc e Ayala 1986).

Com o advento da biologia molecular, diversos trabalhos também foram realizados com a utilização da PCR, na tentativa de explorar a análise tanto do DNA nuclear como o do mitocondrial para classificar a espécie de acordo com sua identidade genética. Um breve histórico sobre diversidade genética do protozoário será descrito, iniciando com os estudos de RFLP-PCR por Morel *et al.* (1980), passando pelos clássicos trabalhos de genética de populações utilizando o RAPD propostos pelo grupo de Tibayrenc *et al.* (1993) e Steindel *et al.* (2007), até chegar ao primeira tentativa de unificação da classificação da espécie em três grupos genéticos distintos (TcI, TcII e os híbridos), utilizando como trabalhos de referência para a divisão das linhagens, algumas metodologias proposta por Milles *et al.*, (1977 e 1978); Zingales & Souto (1993) e Souto *et al.* (1996).

Entretanto, com o avanço das metodologias de análise multilocus sobre a diversidade genética do parasito, outras classificações da espécie foram propostas em ordem cronológica, e uma das análises mais importantes que influenciaram novamente a divisão da espécie em seis linhagens foi a apresentada por Brisse *et al.* (2000). Os autores apresentaram claras evidências sobre a existência de variabilidade genética dentre a linhagem *T. cruzi* II de Souto *et al.* (1996), propuseram então, a divisão da mesma em subgrupos classificados como DTU IIa, IIb, IIc, IId e IIe, sendo cada subdivisão representada por um clone de referência. Algumas DTUs apresentam correlações com denominações anteriores, por exemplo, o DTU IId e IIe são isolados que apresentaram perfil híbridos na metodologia proposta por Souto *et al.* (1996). A DTU IIb corresponde ao Zimodema 2 (Miles *et al.*, 1977), as DTU IIc ao Zimodema 3 (Miles *et al.*, 1977). Nesse estudo, os autores ainda sugeriram que as DTUs IId e IIe foram consideradas produtos de um evento ancestral de hibridização entre DTUs IIb e IIc (Brisse *et al.*, 2000; Westemberger *et al.*, 2005 e Freitas *et al.*, 2006).

Recentemente novos aspectos da estrutura populacional da espécie do *T. cruzi* foram descritas. Freitas *et al.* (2006), propuseram a existência de uma terceira linhagem

ancestral da espécie, o *T. cruzi* III. Essa linhagem, conforme descrito pelos autores, apresenta forte correlação com as cepas correspondentes ao zimodema Z3 (Miles *et al.*, 1978), subgrupo IIC (Brisse *et al.*, 2000) e principalmente, incluindo as cepas híbridas, até então sem uma clara identificação de grupo.

Com a crescente descoberta de mais variabilidade intra-específica em *T. cruzi*, mais uma vez, em 2009 durante a realização do encontro satélite sobre Protozoologia, realizado na cidade de Buzios, RJ, foi definida a nova classificação consenso adotada para a identificação de todos os isolados do *T. cruzi* e utilizada até o presente momento. A nova classificação (Zingales *et al.*, 2009) foi proposta seguindo os critérios adotados por diferentes autores (Miles *et al.*, 1977 e 1978; Romanha 1979; Souto e Zingales 1993; Souto *et al.*, 1996 e Brisse *et al.*, 2000 e Freitas *et al.*, 2006), e a espécie foi dividida em seis grupos, classificados como: TcI, TcII, TcIII, TcIV, TcV e TcVI.

Com a unificação da classificação dos isolados, vários trabalhos sobre a epidemiologia molecular e manifestações clínicas da Doença de Chagas foram publicados na literatura após os devidos encontros satélites, relacionando as linhagens do parasito com a infecção em humanos e ou reservatórios silvestres (Zingales *et al.*, 2012).

Diferenças entre a genética do parasito influenciando as propriedades biológicas intra-específicas também foram analisadas ao longo do tempo. Com a decorrente necessidade de respostas sobre as correlações entre a genética do parasito com seus parâmetros biológicos e manifestações clínicas apresentada na Doença de Chagas, alguns trabalhos foram propostos com a finalidade de se chegar a genotipagem dos isolados em seus seis DTU's distintas a fim de estabelecer as devidas correlações (Lewis *et al.*, 2009 e D'Ávilla *et al.*, 2009). Esses trabalhos tornam-se cada vez mais importantes, visto que a classificação por apenas uma metodologia pode não ter a eficiência de analisar as diferenças intra-específicas quando se é comparado com técnicas que utiliza diferentes marcadores para acessar a genotipagem da espécie.

### **1.5 Expressão de proteínas e aspectos genéticos do *Trypanosoma cruzi***

A análise proteômica é definida como um conjunto de metodologias empregadas para caracterizar qualitativamente e quantitativamente um proteoma. Ela pode ser utilizada, tanto para identificar os componentes de complexos proteicos de pequenas ou grandes organelas, ou de todo um organismo, como para identificar modificações pós-

traducionais e interações proteínas-proteína (Tate *et al.*, 2008). A proteômica hoje em dia, utiliza técnicas cada vez mais modernas e sensíveis, permit a identificação de uma proteína pelo conhecimento da sua estrutura primária, sequência de aminoácidos, identificação de modificações pós e co-traducionais e a localização e quantificação de expressão de proteínas.

O termo proteoma foi descrito Wilkins e Williams tendo como significado todas as proteínas expressas por um genoma. Dois enfoques principais têm sido empregados para analisar o conjunto de proteínas que atuam em um organismo em seu estado normal. De um lado, a Eletroforese Bidimensional em Gel (2D-PAGE) e de outro, a Cromatografia Líquida acoplada a Espectrometria de Massas, sendo esta técnica mais promissora para análise de mistura complexas (Mann & Kelleher, 2008).

Em *T. cruzi*, todos os genes codificadores de proteínas estão organizados em grandes unidades de transcrição policistrônicas que geram RNAs mensageiros policistrônicos precursores, os quais são processados em mRNA monocistrônicos através de um mecanismo chamado de trans-splicing (Vanhamme & Pays, 1995). O trans-splicing é uma reação intermolecular da qual participam uma espécie doadora (RNA da sequência líder) e um aceptor, que é o mRNA que está sendo sintetizado. A reação envolve a clivagem das duas espécies de RNAs e a transferência da sequência líder para o mRNA. A sequência líder confere estabilidade ao mRNA, impedindo sua degradação, auxiliando também a interação do mRNA com os ribossomos (Vanhamme & Pays, 1995).

Devido a complexa regulação pós-transcricional em *T. cruzi* e a conseqüente baixa correlação entre níveis de mRNA e proteínas, é evidente a importância da proteômica para o estudo da expressão proteica nesse parasito. O estudo do proteoma das várias formas evolutivas do parasito também pode fornecer informações complementares, tais como modificações pós-traducionais de proteínas, que certamente desempenham um papel crucial na modulação da função proteica nestes parasitas.

Uma análise em larga escala de todo o proteoma do microorganismo foi descrita por Sodré *et al.* (2009), onde a cepa CL (TcV), que havia sido referência para o projeto genoma do *T. cruzi*, teve seu mapa proteômico analisado e descrito pela primeira vez (EL Sayed *et al.*, 2005). Depois disto, poucos trabalhos têm sido publicados na literatura avaliando o perfil proteico de cepas geneticamente conhecidas e isoladas de pacientes portadores da infecção por esta espécie, na tentativa de encontrar marcadores de prognóstico para as alterações clínicas dos pacientes.

Assim, diversos estudos vêm tentando ao longo do tempo correlacionar à forma clínica com a variabilidade genética do parasito, mas até o momento sem grande sucesso (Macedo *et al.*, 2004). Uma das características marcantes do *T. cruzi* e que poderia explicar esta difícil correlação, é o fato de esta espécie apresentar uma elevada variabilidade genética. Considera-se que a população natural da espécie se distribui atualmente em seis subdivisões genéticas ou DTU's distintas, (Zingales *et al.*, 2009) e a análise e correlação entre essa variabilidade genética (denominada DTU) e a existência das diferentes formas clínicas, até o momento, são bastante controversos (Vago *et al.*, 2000; Lages-Silva, 2001; Lages-Silva *et al.*, 2006; D'Ávila *et al.*, 2006; D'ávila *et al.*, 2009).

Diferentes hipóteses têm sido propostas para explicar a falta de sucesso em estabelecer essa correlação. A primeira delas está relacionada ao fato de que os pacientes poderiam ser infectados por várias populações ou subpopulações do parasito. Outras hipóteses que poderiam estar relacionadas a esse insucesso são, provavelmente, o fato de a doença ser um processo multifatorial, em que tanto aspectos do parasito como do hospedeiro estão inter-relacionados, ou ainda a escolha inadequada de alvos no genoma do parasito utilizados como marcadores de patogenicidade na tentativa de verificar a existência da tão desejada correlação entre as formas clínicas da DCh com a variabilidade genética de seu agente etiológico.

Análises proteômicas diferenciadas dependente da classificação genética da espécie sugerem a expressão de proteínas cepas específicas para cada um dos seis grupos do protozoário (Telleria *et al.*, 2010). Estas evidências levantam a hipótese de que métodos mais eficazes para analisar e comparar o proteoma das populações de *T. cruzi* podem ser fundamentais para demonstrar correlação entre as manifestações clínicas da doença em relação ao genótipo do parasito, principalmente devido ao fato da regulação gênica nos *Trypanosomatídeos* ser pós-transcricional. Esta característica do *T. cruzi* pode tornar tal abordagem mais vantajosa quando comparada a estudos de análise do genoma em relação às variações existentes no DNA das DTU's desta espécie (Zingales *et al.* 2012).

Diante destas considerações, a proposta desse trabalho é avaliar os parâmetros biológicos principais e a resposta ao tratamento específico da doença de Chagas, de seis cepas do *T. cruzi*, pertencentes a grupos genéticos distintos (TcI, TcII e TcVI), isoladas de pacientes chagásicos crônicos, apresentando formas clínicas distintas da doença de Chagas, além de utilizar ferramentas proteômicas para determinar o proteoma

diferencial de duas das amostras do *T. cruzi*, para verificar se há correlação entre o perfil proteico com os parâmetros biológicos, resistência ao tratamento e diferenças nas formas clínicas da doença, com a finalidade de identificar futuros marcadores de prognóstico desta infecção.

Desse modo, a análise da expressão proteica dos isolados de *T. cruzi*, poderá ser uma ferramenta importantíssima no intuito de evidenciar a associação entre a variabilidade genética de *T. cruzi* com aspectos clínicos e epidemiológicos da doença observados na região em estudo, e estabelecer perfis de expressão proteica cepa específicos que possam orientar sobre o prognóstico, diagnóstico ou até mesmo manejo e tratamentos clínico e etiológico dos pacientes acometidos pela doença de Chagas.

## 2.0 JUSTIFICATIVA

Nosso grupo tem explorado e corroborado, ao longo dos últimos 20 anos, a hipótese subjacente ao modelo clonal de *T. cruzi* de “associação entre a genética do parasito e suas características biológicas fundamentais”. Com a evolução da tecnologia para a análise em larga escala de proteínas (proteômica) e o conhecimento do genoma do *T. cruzi*, hoje é possível realizar investigações criteriosas sobre alterações específicas nos níveis proteicos do parasito, bem como apontar seus principais mecanismos de regulação.

Desse modo, a proposta deste projeto se justifica ao avaliar os parâmetros biológicos principais e resposta ao tratamento etiológico, de seis amostras do *T. cruzi*, pertencentes a grupos genéticos distintos (TcI, TcII e TcVI), isoladas de pacientes chagásicos crônicos apresentando formas clínicas distintas da doença de Chagas. Além de utilizar ferramentas proteômicas para determinar o proteoma diferencial de duas das amostras do *T. cruzi*, para verificar se há correlação entre o perfil proteico com os parâmetros biológicos da espécie, resistência ao tratamento e diferenças na evolução da infecção em modelo murino e nas formas clínicas da doença humana. Um estudo completo da biologia dos isolados de *T. cruzi* será realizado em modelo murino e em cultivo celular e acelular. No modelo animal será avaliada ainda a suscetibilidade/resistência dos isolados ao tratamento etiológico com uma das drogas empregadas para o tratamento humano, o Nifurtimox.

Nossa expectativa foi corroborada com o possível encontro de importantes correlações entre a proteômica com diversas outras características biológicas do parasito, evolução da infecção em modelo murino e evolução clínica da doença em humanos e ainda sua resposta ao tratamento em modelo murino uma vez que esta associação já foi constatada com o proteoma dos mesmos clones de *T. cruzi* (Telleria *et al.* 2010) estudados por nosso grupo em modelo murino (Toledo *et al.*, 2002), vetor (*T. infestans* – Lana *et al.*, 1998) e em relação a susceptibilidade ao tratamento com o benzonidazol (Toledo *et al.*, 2003).

A literatura registra até o momento, poucos trabalhos com esta abordagem. Um deles que visou à caracterização do proteoma de duas cepas de *T. cruzi* (DTU I) isoladas de pacientes apresentando cardiopatia chagásica, sem a comparação com os demais grupos genéticos do parasita e com as demais formas clínicas da doença (Diaz *et al.*, 2013).



Acredita-se que este estudo dará contribuições importantes, revelando a importância do proteoma relacionada com a variabilidade genética no estudo de microorganismos, sua biologia e clínica da doença por eles causada.

### **3.0 OBJETIVO GERAL:**

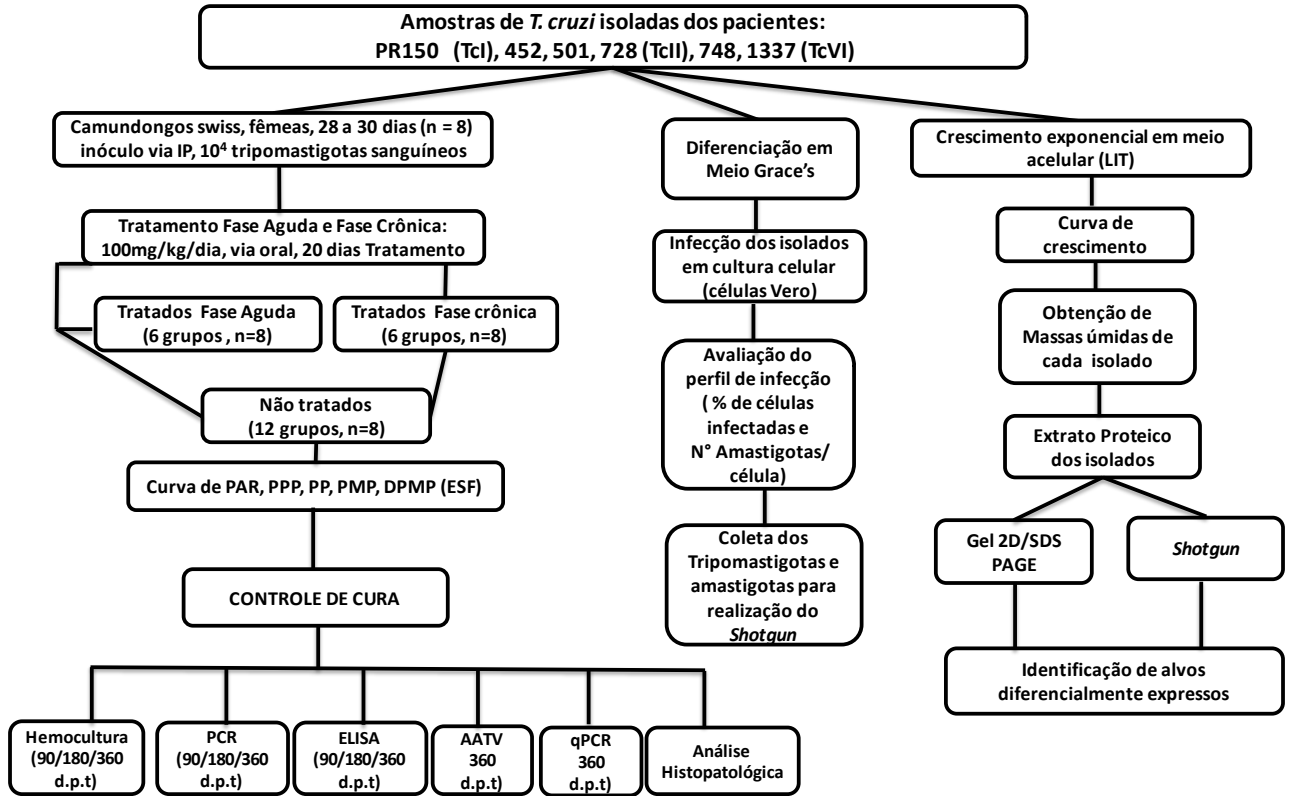
Avaliar os parâmetros biológicos principais e resposta ao tratamento específico da doença de Chagas, de seis amostras de *T. cruzi*, pertencentes a grupos genéticos distintos (TcI, TcII e TcVI), isoladas de pacientes chagásicos crônicos, apresentando formas clínicas distintas da doença de Chagas e tentar correlacioná-los ao proteoma destes parasitos.

### **3.1 Objetivos específicos:**

- Caracterização biológica das amostras de *T. cruzi* em modelo murino e resposta ao tratamento etiológico;
- Caracterização biológica das amostras de *T. cruzi* em cultivo celular e acelular.
- Realização de eletroforese 2D – SDS PAGE das formas epimastigotas, afim de identificar a existência de alvos proteicos diferencialmente expressos nos isolados pertencentes a linhagens genéticas TcI e TcII;
- Identificação e comparação do perfil de expressão de proteínas entre duas amostras pertencentes às DTUs TcI e TcII.

#### 4.0 ANIMAIS, MATERIAIS E MÉTODOS:

O projeto foi desenvolvido seguindo o cronograma apresentado na **Fig. 1** abaixo:



**Figura 1:** Organograma de desenvolvimento do projeto.

#### 4.1 Amostras de *T. cruzi* em estudo e procedência dos pacientes dos quais foram isoladas

As amostras de *T. cruzi* avaliadas neste trabalho foram isoladas de pacientes na fase crônica da doença de Chagas. Cinco deles nascidos e residentes até então nos municípios de Berilo, portanto simpátricos, Vale do Jequitinhonha, Minas Gerais, Brasil, e um paciente nascido em Januária, MG, situado a 502 km do município de Berilo e residindo atualmente no Paraná (**Tabela 1**).

O município de Berilo está localizado no Vale do Jequitinhonha, MG, a uma distância média de 700 quilômetros de Belo Horizonte, capital do Estado de Minas Gerais. Januária situa-se na região do médio São Francisco, Vale do Jequitinhonha.

**Tabela 1:** Identificação das amostras de *Trypanosoma cruzi*, dados dos pacientes dos quais foram isoladas e grupo genético (DTU) a que pertencem.

<b>Código</b>	<b>Sexo do</b>	<b>Idade</b>	<b>Local de</b>	<b>Forma</b>	<b>Grupo de</b>
<b>Amostra</b>	<b>Paciente</b>	<b>(Anos)</b>	<b>Nascimento</b>	<b>Clínica</b>	<b><i>T. cruzi</i> (DTU)</b>
PR150	Mas	57	Januária/MG	Cardíaca	TcI
452	Fem	61	Berilo/MG	Cardíaca	TcII
501	Fem	22	Berilo/MG	Indeterminada	TcII
728	Mas	72	Berilo/MG	Mista	TcII
748	Fem	58	Berilo/MG	Mista	TcVI
1337	Fem	52	Berilo/MG	Indeterminada	TcVI

As seis amostras de *T. cruzi* foram devidamente genotipadas (Oliveira *et al.*, 2015) e pertencem a grupos genéticos distintos. Uma delas (PR150) pertence ao genótipo TcI. Ela foi isolada de paciente que apresentava a forma cardíaca da DCh, nascido na cidade de Januária, MG, a 502 km de Berilo, que mudou para o estado do Paraná. Este paciente foi escolhido por ter adquirido a infecção em outra região endêmica próxima de Berilo e apresentar infecção por parasito de um grupo genético muito importante de *T. cruzi*, predominante na região amazônica e em países da América Central e filogeneticamente distante do grupo genético TcII. Parasitos deste genótipo apresentam diversas características biológicas distintas de TcII e dos grupos

híbridos (inclusive TcVI) (Toledo *et al.*, 2002; Macedo *et al.*, 2010) ainda não detectado no Vale do Jequitinhonha, que em pacientes apresentam evolução clínica benigna em geral e resposta ao tratamento etiológico distinta (mais resistentes ou totalmente resistentes aos fármacos usuais) dos demais grupos. Três das outras seis amostras foram identificadas como pertencentes à DTU TcII e isoladas de pacientes apresentando as formas clínicas digestiva, cardíaca, e indeterminada, respectivamente. Duas outras amostras foram genotipadas como pertencentes ao genótipo TcVI e isoladas de pacientes apresentando as formas clínicas mista e indeterminada da DCh, respectivamente.

#### **4.2 Aspectos éticos**

A inclusão dos pacientes no Programa de Doença de Chagas ocorreu após assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Humanos do Centro de Pesquisas René Rachou, Fiocruz, Belo Horizonte, MG, protocolo: 007/2002 e da Universidade Estadual de Maringá, Pr. A confirmação do diagnóstico sorológico para infecção pelo *T. cruzi*, foi realizada segundo as diretrizes da Organização Mundial de Saúde, que recomenda o emprego de dois testes com princípios diferentes.

#### **4.3 Avaliação clínica dos pacientes**

Todos os pacientes de Berilo incluídos no projeto foram submetidos a diversas avaliações clínicas realizadas pela equipe regional de saúde do SUS (Sistema Único de Saúde) sobre supervisão da Dr. Rosália Moraes Torres, cardiologista e professora Adjunto da Escola de Medicina da UFMG e Dr. João Carlos Pinto Dias (CPqRR, FIOCRUZ, Belo Horizonte, MG), integrantes e colaboradores do Projeto “guarda chuva” de Doença de Chagas no Vale do Jequitinhonha, MG, sob a coordenação da Prof. Dr<sup>a</sup>. Marta de Lana.

A avaliação clínica dos pacientes foi realizada por anamnese, exame clínico, Raio X do tórax em PA, Raio X contrastado do esôfago e cólon, além do eletrocardiograma e ecocardiograma. Os pacientes após análise dos resultados dos exames clínicos e laboratoriais foram classificados clinicamente segundo o Consenso Brasileiro de Doença de Chagas (Consenso Brasileiro, 2005). O paciente procedente de

Januária e residente em Maringá, PR, foi avaliado da mesma maneira pela equipe de pesquisa do Prof. Dr. Max Jean de Ornelas Toledo da UEM/PR.

#### **4.4 Obtenção dos isolados de *T. cruzi***

Para o isolamento dos parasitos dos pacientes foi empregada a técnica de hemocultura descrita por Chiari *et al.* (1989). O volume de sangue coletado de cada paciente foi de 30 mL, em tubo estéril contendo heparina (Vacuntainer BD) via intravenosa. O sangue coletado foi transferido para tubo cônico plástico e imediatamente centrifugado a 3000 rpm por 10 minutos à temperatura ambiente. O plasma foi separado e posteriormente adicionado de 5mL de meio LIT (Camargo, 1964), seguido de nova centrifugação nas mesmas condições anteriores. Em seguida, o tubo contendo a papa de hemácias foi novamente lavado com meio LIT e centrifugado como anteriormente. Após a centrifugação, o sobrenadante foi desprezado e a camada leucocitária removida para um tubo cônico e suspensa em 5mL de meio LIT. Posteriormente, as hemácias foram distribuídas em dois tubos cônicos contendo 5mL de LIT cada. Estes tubos foram incubados em estufa a 28°C e homogeneizados 3 vezes na semana. Uma gota do sedimento de cada preparação foi analisada ao microscópio óptico aos 30, 60, 90 e 120 dias após a coleta para a detecção de parasitos.

Após a positivação da hemocultura, os parasitos foram mantidos em crescimento exponencial à 28°C em meio LIT. Essas amostras foram criopreservadas em nitrogênio líquido (-196°C) e armazenadas no laboratório em nosso banco de cepas.

#### **4.5 Caracterização morfológica e susceptibilidade das amostras ao tratamento específico**

##### **4.5.1 Animais:**

Foram utilizados para caracterização biológica das 6 amostras de *T. cruzi*, camundongos Swiss, fêmeas, com 28-30 dias de idade, num total de 192 animais, provenientes do Centro de Ciência Animal da Universidade Federal de Ouro Preto (CCA-UFOP), MG, Brasil. Esses animais foram mantidos no CCA-UFOP segundo as diretrizes estabelecidas pelo Conselho Nacional de controle de experimentação animal

(CONCEA). Em função destes experimentos este estudo foi submetido ao Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP), e aprovado como protocolo N° 26/2014.

#### **4.5.2 Grupos experimentais:**

Para cada amostra de *T. cruzi* quatro grupos de oito animais (total de 192) foram inoculados por via intraperitoneal com 10.000 formas tripomastigotas sanguíneos/animal, quantificados segundo Brener (1962). Um grupo foi destinado à caracterização biológica e como controle não tratado da fase aguda, e outros dois ao tratamento durante a fase aguda (tratamento iniciado no período pré-patente da infecção) e crônica (tratamento iniciado no 90° dias após a confirmação da infecção) cujos resultados foram avaliados comparativamente. O outro grupo foi utilizado como controle infectado não tratado da fase crônica da infecção.

#### **4.5.3 Confirmação da infecção: Exame de sangue a fresco (ESF):**

A pesquisa de tripomastigotas sanguíneos foi feita por exame de sangue a fresco (ESF), coletado da veia caudal do animal e analisado diariamente entre o 4° e 30° dia após a inoculação (d.a.i.) para a confirmação da infecção (Brener, 1962).

#### **4.5.4 Avaliação morfológica**

Esta avaliação só foi possível em amostras do parasita de média a alta virulência. Ela foi realizada em lâminas de microscópio preparadas com 5µl de sangue a fresco coletado como descrito anteriormente e avaliados segundo a metodologia empregada por Chiari e Brener (1963). Foram registrados o percentual de tripomastigotas sanguíneos delgados, intermediários, largos e muito largos, encontrados no exame ao microscópio (aumento de 100 X) de esfregaços sanguíneos realizados durante a fase aguda da infecção, em animais com parasitemia patente.

#### **4.5.5 Parasitemia (PAR)**

A contagem da parasitemia pelo ESF do sangue periférico permitiu avaliar a curva de parasitemia dos animais ao longo da fase aguda da infecção e foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Brener (1962).

A contagem dos parasitos teve início no 4<sup>o</sup> dia após a inoculação e nos dias consecutivos, até que não fossem observados mais parasitos no ESF por cinco dias consecutivos, ou até a morte dos camundongos. As infecções de camundongos por cepa de baixa virulência foram acompanhadas pelo menos até o 30<sup>o</sup> (d.a.i.) quando então foi realizada a hemocultura.

As curvas de parasitemia representam as médias diárias do número de parasitos observados no sangue periférico dos camundongos de cada grupo experimental e sua avaliação permitiu determinar os seguintes parâmetros:

#### **4.5.6 Período Pré-patente (PPP)**

O PPP correspondente ao período compreendido entre a inoculação e o dia anterior ao primeiro dia em que foi detectado parasito no sangue periférico do animal através do exame a fresco. O resultado foi expresso em dias.

#### **4.5.7 Período Patente (PP)**

O PP correspondente ao período compreendido entre o primeiro e o último dia de exame a fresco positivo, e expresso em dias.

#### **4.5.8 Pico Máximo de Parasitemia (PMP)**

O PMP corresponde ao pico máximo de parasitemia e foi expresso em número de tripomastigotas sangüíneos/0.01mL de sangue, detectado pelo ESF segundo a metodologia de Brener (1962).

#### **4.5.9 Dia do Pico Máximo (DPMP)**



O DPMP corresponde ao dia de ocorrência do máximo de parasitemia e expresso em dias.

#### **4.5.10 Mortalidade (MOR)**

A mortalidade dos animais foi avaliada diariamente até o 90º d.a.i, e semanalmente até a necropsia dos animais, e expressa em porcentagem cumulativa.

### **4.6 Tratamento dos camundongos:**

#### **4.6.1 Fármaco e Esquema de Tratamento**

O fármaco utilizado para o tratamento dos animais infectados com as amostras de *T. cruzi* isoladas dos pacientes foi o nitrofurano (NIFURTIMOX, NF) Lampit® produzido pela Bayer Health Care. O tratamento com NF foi iniciado no primeiro dia do período patente da infecção nos grupos de camundongos infectados por cada amostra tratados na fase aguda (primeiro dia de parasitemia patente) e na fase crônica (90º dia de após a infecção). Para ambos, uma dose diária de 100mg/Kg de peso corporal foi utilizada. O fármaco foi administrado por gavagem na forma de suspensão em goma arábica, durante 20 dias consecutivos.

### **4.7 Análises da evolução da infecção e da eficácia terapêutica em camundongos:**

#### **4.7.1 Curva de Parasitemia:**

A quantificação da parasitemia pelo ESF dos animais infectados permitiu definir o perfil da curva de parasitemia das amostras de *T. cruzi* antes, durante e após o tratamento na fase aguda da infecção. Esta avaliação foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Brener (1962).

#### **4.7.2 Mortalidade:**

A mortalidade dos animais foi avaliada diariamente até o 90º d.a.i e semanalmente até a necropsia dos animais, expressa em porcentagem cumulativa. A

taxa de mortalidade foi calculada considerando a mortalidade cumulativa no período avaliado sendo expressa em porcentagem.

#### **4.8 Controle de cura:**

##### **4.8.1 Avaliações Parasitológicas:**

##### **4.8.2 Exame de Sangue a Fresco (ESF):**

O exame de sangue a fresco foi empregado no controle de cura após tratamento entre o 90°, 180° e 360° dias após infecção em todos os grupos de animais (Brenner, 1962).

##### **4.8.3 Hemocultura (Hm):**

Todos os animais foram submetidos à Hm 90, 180 e 360 dias após o término do tratamento para verificar a eficácia terapêutica do NF. A técnica foi realizada segundo Filardi & Brenner (1987).

##### **4.8.4 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em eluato de sangue**

Para realização da PCR, as amostras de sangue dos animais foram coletadas 90, 180 e 360 dias após o término do tratamento em todos os grupos experimentais.

Na execução da técnica foram utilizadas alíquotas de 200 microlitros ( $\mu\text{L}$ ) de sangue coletadas do plexo venoso retro-orbital. O sangue foi conservado em 200  $\mu\text{L}$  de solução de cloridrato de guanidina (Guanidina-HCl) 6M/ácido etilenodietildinitrotetracético (EDTA) 0,2M/pH 8,0 como descrito por Ávila *et al.* (1991). Essa mistura de sangue/Guanidina-HCl/EDTA foi fervida sete dias após a coleta, a 100°C, durante sete minutos. O lisado foi estocado à temperatura ambiente até o momento de uso.

A extração de DNA foi realizada pela metodologia proposta por Gomes *et al.* (1998) com algumas modificações. Uma alíquota do lisado foi submetida à extração do DNA utilizando o kit Wizard™ Genomic DNA Purification kit (Cat #A1125 Lot #262870) Promega, seguindo todas as recomendações do fabricante.

A mistura reacional para a PCR, foi preparada contendo 10 mM cloridrato de hidroximetilaminometano (Tris-HCl)/pH 9,0, 0,1% de Triton X-100 (Tampão PCR 10x,

Invitrogen São Paulo, SP, Brasil), 75mM de cloreto de potássio (KCl - Tampão PCR 10x , Invitrogen, São Paulo, SP, Brasil), 3,5mM cloreto de magnésio (MgCl<sub>2</sub> – Invitrogen, São Paulo, SP, Brasil), 0,2mM de cada desoxinucleotídeo (dATP, dCTP, dGTP, dTTP – Sigma, St. Louis, MO, EUA ), 0,5U de Taq Platinum DNA polimerase (Invitrogen, São Paulo, SP, Brasil), 10 pmoles de cada iniciador #121 (AAATAATGTACGGGTGAGATGCATGA) e #122 (GGTTCGATTGGGGTTGGTGTAATATA) (Invitrogen, São Paulo, SP, Brasil) descritos por Degraive *et al.*, (1988), gerando um fragmento de banda de 330pb. A hipótese de contaminação foi eliminada através da utilização de um controle negativo da reação e da extração, bem como um controle de reagentes da extração e da PCR.

A amplificação foi processada em um termociclador PTC-150 (MJ Research, Ramsey, MA, EUA) nas seguintes condições: 35 ciclos assim descritos: uma fase inicial de desnaturação a 95 °C, 5 min, seguida pelo anelamento a 65°C por 1 min e etapa final de extensão a 72°C por 1 min; seguidos de 33 ciclos. Um último ciclo com temperatura de desnaturação de 95°C por 1 min, uma etapa de anelamento a 65°C por 1 min e uma etapa final de extensão por 10 min. O DNA amplificado foi visualizado por eletroforese em gel eletrônico (QIAXEL/Qiagen). Controles positivos, negativos e de reagentes foram incluídos em cada um dos ensaios realizados.

#### **4.8.5 Avaliação do parasitismo tecidual (coração) por qPCR**

Para a quantificação do parasitismo tecidual no coração de animais infectados com as diferentes cepas de *T. cruzi*, nas fases aguda e crônica da infecção, a técnica da reação em cadeia da polimerase quantitativa (qPCR) foi também utilizada. Todos os animais foram necropsiados 360 dias pós-tratamento e fragmentos de 30 mg dos corações avaliados. Foram também analisados os corações de animais infectados e não tratados com as mesmas cepas de *T. cruzi*.

#### **4.8.6 Método Molecular - Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa (qPCR)**

O protocolo padronizado por Caldas *et al.*, (2013) foi utilizado para realização da técnica. Os fragmentos do coração dos camundongos, previamente armazenados a -80°C, foram cortados com auxílio de lâmina de bisturi, pesados, obtendo-se fragmentos de aproximadamente 25-30 mg. As amostras foram transferidas para tubos de 1,5 ml e

em seguida foram realizados os procedimentos de extração do DNA total utilizando o kit Wizard™ Genomic DNA Purification (Promega), seguindo as recomendações do fabricante e com a adição de 20,0 µL de Proteinase K (Sigma-Aldrich®, USA) na concentração de 20,0 mg/ml. Para realizar a quantificação do parasitismo tecidual em coração de camundongos por qPCR, fez-se necessário construir uma curva padrão para determinar o número de cópias do DNA do parasito existente na amostra a ser analisada. Utilizou-se formas epimastigotas da cepa Y do *T. cruzi*, crescidas em meio de cultura (LIT), até atingir o número total de  $1,0 \times 10^8$  parasitos contados em câmara de Neubauer, os quais foram submetidos ao protocolo de extração de DNA utilizando o kit Wizard™ Genomic DNA Purification (Promega) seguindo todas as recomendações do fabricante, com a adição de 20,0 µL de Proteinase K (Sigma-Aldrich®, USA) na concentração de 20,0 mg/ml (idem ao realizado com as amostras teste).

Em seguida, a concentração e a pureza do DNA obtido foram determinadas por espectrofotômetro (Nanodrop, GE Healthcare Products). Cada amostra foi analisada em duplicata para amplificação do DNA de *T. cruzi* e em cada reação de qPCR foram utilizados 3,0 µL da amostra de DNA extraída diluída, contendo 30,0 ng de DNA genômico e 7,0 µL de “SYBER Green PCR Mastermix” (Applied Biosystems). Os iniciadores para o DNA do *T. cruzi* foram: TCZ - F 5' - GCTCTTGCCACAMGGGTGC - 3', em que M = A ou C, e TCZ - R 5' - CCAAGCAGCGGATAGTTCAGG - 3'; amplificando um produto de 182 pb (Cummings e Tarleton, 2006). Separadamente para cada amostra, foi também realizada uma reação para dosagem do fator de necrose tumoral murino-específico (TNF- $\alpha$ ), utilizado como controle endógeno contendo 3,0 µL da amostra extraída, 30,0 ng de DNA genômico e 7,0 µL de “SYBR Green PCR Mastermix” (Applied Biosystems). Os iniciadores para o TNF- $\alpha$  foram: TNF-5241 5'-TCCCTCTCATCAGTTCTATGGCCCA-3', e TNF-5411 5'-CAGCAAGCATCATAGCACTTAGACCCC-3' - R 5' - CCAAGCAGCGGATAGTTCAGG - 3'; amplificando um produto de 170 pb (Cummings e Tarleton, 2006). Cada placa de reação de 96 poços continha a curva padrão, criada a partir de uma solução obtida pela extração de DNA na concentração de  $1,0 \times 10^8$  epimastigotas da cepa Y do *T. cruzi*. Dessa solução, procederam-se diluições seriadas em água ultra-pura autoclada (1:10) para obter os pontos da curva, que foi medida a partir de DNA equivalente a  $1,0 \times 10^6$  até de um parasito. A placa continha controles negativos que foram submetidos à reação com os iniciadores específicos do *T.*

*cruzi* e TNF- $\alpha$  de camundongos. Também foram utilizados como controle negativo da reação poços com iniciadores específicos do *T. cruzi* e água, sem a presença de DNA. Cada amostra de DNA foi quantificada em triplicata (duplicata para *T. cruzi* e unicata para TNF- $\alpha$ ). As reações foram distribuídas em placas de 96 poços (Fast 96-Well Reaction Plate, 0,1 ml, MicroAmp™). O programa de termociclagem consistiu em aquecimento a 95 °C por 10min, 40 ciclos: 94 °C por 15 segundos e 64,0 °C por 1 minuto. A amplificação foi seguida por um programa de “melting” com desnaturação inicial a 95 °C por 15 segundos, resfriamento a 60 °C por 1 minuto e aumento gradual da temperatura de 0,3 °C/s até 95 °C.

#### **4.9 Avaliações Sorológicas:**

##### **4.9.1 Sorologia Convencional –(ELISA):**

Para avaliação pela técnica de ELISA amostras de soro dos animais foram coletadas aos três (90 d.p.t.), seis meses (180° d.p.t.) e um ano (360° d.p.t.) após tratamento específico com NF durante a fase aguda, e com os mesmos intervalos de tempo pós-tratamento nos animais tratados na fase crônica. A reação de ELISA para detecção de anticorpos IgG anti-*T. cruzi* foi realizada segundo a metodologia de Voller *et al.*(1975) modificada e padronizada no Laboratório de Doença de Chagas da UFOP (Santos *et al.*, 2009). Para a realização da reação foram utilizadas microplacas de poliestireno com 96 poços de fundo chato, sensibilizadas com 2,5 $\mu$ g/mL de antígeno alcalino da cepa Y de *T. cruzi*, e incubadas “over-night” em geladeira (4° C).

Após o período de incubação as placas foram lavadas quatro vezes com solução salina contendo Tween-20 a 0,05% (solução de lavagem) para eliminação da solução diluente do antígeno e de seu excesso, bloqueadas com 100 $\mu$ L/poço de solução salina tamponada (PBS) com soro fetal bovino e incubadas a 37°C, por 45 minutos. Após esta etapa as placas foram novamente lavadas quatro vezes com a solução de lavagem e incubadas por 45 minutos a 37°C com 100 $\mu$ L/poço das amostras de soros diluídas a 1:80. Após a incubação as placas foram novamente lavadas e incubadas por 45 minutos a 37°C com 100 $\mu$ L/poço do conjugado anti-IgG humano (SIGMA, St. Louis, EUA) marcado com peroxidase e diluído a 1: 8000 em solução salina tamponada com 0,05% de Tween 20 (PBS-Tween). Após a incubação, as placas foram lavadas quatro vezes com solução de lavagem e adicionadas 100 $\mu$ L/poço de solução contendo 3mg do substrato orto-fenileno-diamino (OPD), 3 $\mu$ L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30 volumes) e 15mL tampão citrato-

fosfato e incubadas a 37°C, durante 5 minutos. A reação foi interrompida com a adição de 32µL/poço de solução de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2,5 M.

A leitura da reação foi realizada em um leitor de ELISA (Bio-Rad Model 680 - microplate manager 5.2.1) com filtro a 490nm. As amostras contendo valores de absorvância iguais ou superiores ao ponto de corte (média das absorvâncias de 10 soros padrões não reativos + 2 vezes o desvio padrão) foram consideradas reativas. As que apresentaram valores de absorvância abaixo do ponto de corte foram consideradas não reativas. Todas as amostras foram testadas em duplicata, sendo o valor final da absorvância a média da leitura das duplicatas.

#### **4.9. 2 Sorologia não convencional – Pesquisa por anticorpos anti-tripomastigotas vivos (CF-AATV)**

A pesquisa de anticorpos anti-tripomastigotas vivos por meio da citometria de fluxo foi realizada em amostras de soro coletadas 360 dias pós-tratamento, segundo a metodologia de Martins-Filho *et al.*(1995) adaptada para microplacas por Cordeiro *et al.*(2001). Como antígeno foi utilizado à cepa CL do *T. cruzi*, mantida no Laboratório de Biomarcadores de Diagnóstico e Monitoração (LBDM/CPqRR/FIOCRUZ). As formas tripomastigotas de cultura de tecido foram obtidas a partir do sobrenadante de culturas de células LLCMK2 infectadas com *T. cruzi* da cepa CL. Os parasitos foram separados por centrifugação diferencial. Para a obtenção da massa de parasitos, a suspensão de células foi centrifugada a temperatura ambiente, 200rpm por 10 min. Posteriormente, os tubos foram mantidos a 33°C por 30 minutos para que as formas flageladas pudessem se deslocar do sedimento para o sobrenadante. O sobrenadante foi coletado e centrifugado a 4°C, 2.200 r.p.m. por 10 minutos. Os parasitos foram lavados em PBS- 10% SBF, três vezes, por centrifugação nas condições anteriores. As preparações de tripomastigotas apresentando contaminação com formas amastigotas superior a 5% foram descartadas. A suspensão de parasitos foi então quantificada em câmara de Neubauer e ajustada para o ensaio de imunofluorescência por citometria de fluxo na concentração de 5 x 10<sup>6</sup> parasitos/mL. Em placas de 96 poços com fundo em “U”, 50µL do soro diluído em PBS-3% SFB (1:128/1:256 e 1:512) foram incubados a 37°C por 30 minutos e ao abrigo de luz, na presença de 50µL da suspensão de parasitos (2,5 x 10<sup>5</sup> parasitas/mL/poço). Após a incubação, os parasitos foram lavados duas vezes com PBS-3% SFB, por centrifugação (2.200 rpm, 10min, 18°C) e o sobrenadante

desprezado. Para análise de IgG total, os parasitos foram novamente incubados (na mesma condição anterior) na presença de 50µL de anticorpo anti-IgG marcado com isotiocianato de fluoresceína – FITC (Sigma) diluídos em PBS-3% SFB. Os parasitos foram novamente lavados duas vezes com PBS-3% SBF (2.200 rpm, 10min, 18°C) e o sobrenadante desprezado. Após a incubação os parasitos foram novamente lavados duas vezes e fixados com 200 µL de solução fixadora para citometria - MFF (Para 10mL; 5mL de Paraformaldeído 20X e 5 mL de Cacodilato 20X e o pH ajustado para 7,2). As amostras foram mantidas durante pelo menos 30 minutos, a 4°C e ao abrigo de luz até o momento da leitura no citômetro de fluxo (FACScan-Becton Dickson, San Jose, CA, EUA), empregando-se o software Cell Quest. As leituras das amostras foram realizadas num período máximo de 24 horas após a fixação dos parasitos. Para cada ensaio de imunofluorescência por citometria de fluxo foi feito um controle interno da reação (controle do conjugado) onde os parasitos foram incubados na ausência de soro humano, porém na presença de anticorpo secundário, para monitorar ligações inespecíficas. Em todos os testes foram incluídas amostras controles de soros positivo e negativo para a doença de Chagas. As amostras de soro foram consideradas negativas quando a porcentagem de parasitos fluorescentes positivos (PPFP) foi menor que 20% e positivas, quando a PPFP foi maior que 20%.

#### **4.10 Avaliações histopatológicas:**

As análises histopatológicas foram feitas nos animais não tratados e tratados, nas fases aguda e crônica. Em ambas as situações a necropsia foi realizada 360° dias pós-tratamento e comparadas aos animais controle não infectados e infectados não tratados.

Durante a necropsia foram retirados todos os órgãos ou parte deles, os quais foram imersos em solução de formalina tamponada. O material foi processado como rotineiramente em autotécnico. Cortes do órgão de infecção principal para o *T. cruzi*, coração, foram incluídos em parafina, cortados em micrótomo (5 µm) e corados com hematoxilina-eosina (que permitiram demonstrar os processos e lesões inflamatórias) e tricrômico da Masson para melhor análise da existência e intensidade da fibrose. A frequência e o número de cortes foram executados como rotineiramente em estudos similares, assim como a análise das preparações.

O estudo morfométrico envolveu a análise de inflamação de 20 campos ao acaso (area total  $0,8 \times 10^6 \mu\text{m}^2$ ) de cortes de uma única lâmina por animal. O infiltrado inflamatório dos órgãos foi quantificado pela contagem das células nucleadas. O processo inflamatório foi determinado pela diferença entre o número de células nucleadas presentes num determinado órgão de animais infectados com *T. cruzi* e o número de células nucleadas observadas em animais não infectados  $\pm$  o desvio padrão (Maltos *et al.* 2004). As imagens foram analisadas com o Leica QWin software (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany). Para análise pelo Tricrômico de Masson, foi utilizada a comparação qualitativa dos tecidos.

#### 4.11 Critério de cura

Neste trabalho foram adotados dois critérios de cura pós-tratamento para os animais:

O "critério de cura clássico" (WHO, 2002; e Consenso Brasileiro em Doença de Chagas, 2005) que considera como curados aqueles animais que apresentaram três metodologias com princípios distintos negativos, sendo os métodos parasitológico (Hm e PCR no sangue) e sorológico convencional (ELISA).

O outro critério considerado mais recente (Galvão *et al.*, 2003; Krettli, 2009, Lana & Martins-Filho, 2015), que considera como curados os animais que apresentaram negatificação dos métodos parasitológicos (Hm e PCR no sangue), qPCR no tecido cardíaco, além da negatificação da sorologia não convencional (CF-AATV) mesmo na presença da sorologia convencional (ELISA) positiva.

#### 4.12 Perfil de infecção e desenvolvimento da amostras *in vitro* (células “VERO”):

Para o cultivo celular as células “VERO” foram descongeladas e semeadas em garrafas estéreis de  $75 \text{ cm}^2$  contendo 10,0mL de meio DEMEN (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Invitrogen), suplementado de 5% de soro fetal bovino inativado a  $56^\circ\text{C}$  por 30min (SFB, *Nutricell*), 2,5% HEPES pH 7,2 1M, 1% de glutamina 2mM/ml, 0,1% de mercaptortanol 50mM/ml, 0,2% de sulfato de gentamicina 200  $\mu\text{g/ml}$  (*Shering-Plough*) e incubadas a  $37^\circ\text{C}$  em 5% de  $\text{CO}_2$  com atmosfera umidificada 95%. As células em monocamadas semi-confluentes foram infectadas com formas tripomastigotas das amostras estudadas e lavadas utilizando PBS estéril, 24 horas após a



infecção. Nestas células foram avaliadas a infectividade expressa em percentual de células infectadas e número de parasitos (amastigotas) por célula. O perfil de infecção e desenvolvimento *in vitro* dos isolados das seis amostras foram avaliados após 24, 48 e 72 horas, em triplicatas, segundo adaptações da metodologia utilizada por Andrade *et al.* (2010). Após 24 horas de cultura, monocamadas semiconfluentes de células “VERO” ( $10^4$ ), fixadas em lamínulas, foram incubadas em estufa a 5% de CO<sub>2</sub> e à 37 °C, durante 18 horas (*overnight*), com formas tripomastigotas metacíclicas de culturas axênicas das diferentes subpopulações do *T. cruzi* ( $10^5$ ), previamente submetidas à metaciclogênese em meio Grace, a uma MOI (*multiplicity of infection*) de 10.

Após lavagem com tampão salina-fosfato (PBS-*Phosphate Buffered Saline*) para eliminação de parasitos extracelulares, as culturas foram mantidas nas mesmas condições de incubação anteriores até o momento da coleta das células (24, 48 e 72 horas após o inóculo). Em seguida, as culturas foram fixadas em metanol, coradas pelo Panótico Rápido e as taxas de infecção e desenvolvimento ou multiplicação foram analisadas por microscopia óptica em aumento de 1000x.

Foi registrada a taxa de infecção como número de células infectadas em relação a 100 células contadas, enquanto a taxa de desenvolvimento foi avaliada como número de parasitos em relação ao número de células infectadas.

#### **4.13 Curvas de crescimento das formas epimastigotas**

O comportamento das curvas de crescimento *in vitro* dos isolados em meio de cultura acelular LIT-10% SFB (*Liver Infusion Tryptose-10% Soro Fetal Bovino*) foi determinado a partir de um inóculo padrão de  $1 \times 10^7$  parasitos/mL em um volume final de 3mL. Para isso, o volume utilizado no inóculo referente a cada cultura foi determinado com auxílio de câmara de Neubauer, e as culturas, em triplicata, foram mantidas em estufa biológica refrigerada BOD (FANEM® modelo 347) à temperatura de  $28^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$  durante o período de avaliação. O crescimento numérico foi acompanhado diariamente através de contagem em câmara de Neubauer, em aumento de 40x ao longo de 20 dias.

#### **4.14 Análise estatística dos parâmetros biológicos em camundongos e cultivo celular**

Os dados dos parâmetros biológicos (PP, PMP, DPMP e área sobre a curva de parasitemia) foram analisados empregando o programa Prisma for Windows, versão 5.0. O teste de normalidade Kolmogorov-Sminorv foi empregado para todos os dados parâmetros biológicos. Para aqueles dados que apresentaram distribuição normal a avaliação foi feita pelo ANOVA seguido do pós-teste Newman-Keuls. Para os dados que não apresentaram distribuição normal foi realizado o teste não paramétrico Mann Whitney.

A análise dos parâmetros mortalidade e infectividade foi realizada pelo teste Chi-Quadrado. Para avaliação dos perfis de crescimento em meio de cultura axênico foi considerada a análise da área sob a curva (*area under the curve*-AUC) através do teste de análise de variância Kruskal-Wallis adotado para dados não-paramétricos. Quando as alterações foram significativas, o pós-teste de Dunns foi realizado para determinar as diferenças específicas entre as medianas dos dados referentes aos diferentes genótipos do *T. cruzi*.

Em relação ao ensaio de infecção *in vitro* em culturas de células “Vero”, considerando as subpopulações do parasito utilizadas na infecção e os tempos de incubação avaliados, as diferenças significativas foram determinadas usando análise de variância, ANOVA two-way.

A comparação do número médio de células inflamatórias dos grupos não tratados com os grupos tratados foi realizada pelo teste não paramétrico Mann Whitney. A comparação do parasitismo tecidual foi feita pelo teste de Chi- Quadrado. A fibrose foi analisada pela presença e extensão que atinge no tecido observando-se as imagens comparativamente.

A comparação do número médio de células inflamatórias nos grupos de animais infectados e não infectados foi também analisada pelo teste de Mann Whitney.

As diferenças foram consideradas significativas quando o nível P de significância for menor ou igual a 0,05, adotando um nível de confiança de 95%.

#### **4.15 Cultivo acelular de *T. cruzi* e obtenção de parasitos destinados às análises da proteômica**

Os isolados de *T. cruzi* foram mantidos em crescimento por adição sucessiva de meio LIT até a obtenção de aproximadamente 35,0 mL de cultura (fase exponencial). A cultura foi transferida para tubos cônicos e centrifugada a 3.500 rpm, a 4°C, por 30

minutos. Após a centrifugação o sobrenadante foi desprezado cuidadosamente por inversão e, ao sedimento foi adicionado 10 mL de solução salina tamponada estéril (PBS) e a mistura submetida a nova centrifugação, nas mesmas condições descritas anteriormente, por 15 min. Após repetição desse procedimento, o sedimento foi transferido para um tubo de microcentrifugação de 1,5 mL previamente pesado. Nova lavagem deste sedimento com PBS estéril foi feita, seguida de centrifugação a 10.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi eliminado cuidadosamente, o tubo foi novamente pesado, sendo a massa úmida armazenada a  $-70^{\circ}\text{C}$  para as análises proteômicas.

#### **4.16 Preparo do extrato proteico**

Aproximadamente 100 mg de pellet das formas epimastigotas mantidas em crescimento exponencial, pertencentes aos grupos genéticos TcI e TcII foram utilizados para a extração de proteínas totais. As amostras foram homogeneizadas em 500  $\mu\text{L}$  de solução de re-hidratação (7 M de ureia, 2 M tiourea, 2% p / v de CHAPS, 0,002% p / v de azul de bromofenol, todos de Sigma-Aldrich, MO, EUA) contendo  $1 \times$  Coquetel inibidor de protease (Sigma - Aldrich) a uma diluição final de 1/25, durante 10 min em banho de gelo. As amostras foram então sonicadas em gelo por meio de três séries de pulsos de 5 a 15 s cada, com 45 s de descanso entre as séries. Os homogenatos foram centrifugados durante 1,5 horas a 20.000 g a  $4^{\circ}\text{C}$  para remover debris celulares. O pellet contendo a fração membranar foi congelado a  $-80^{\circ}$ , para posterior avaliação. Os perfis electroforéticos 1 D, do extrato contendo a fração solúvel de proteínas, foram usados para verificar a qualidade do extrato e para normalizar, através de análise densitométrica, a quantidade do total proteína presente em cada amostra. Resumidamente, uma alíquota de 5  $\mu\text{l}$  de cada amostra foi separada em condições desnaturantes utilizando 12% de SDS-PAGE, após 30 min em solução de fixação (etanol a 40% / 7% de ácido acético), o gel foi corado em solução 0,02% Coomassie Blue G-250 (Sigma-Aldrich) durante 2 h. Para analisar a quantidade de proteínas existente em cada extrato, foi usado o software *Quantity one* para a quantificação de proteína presente em cada canaleta do gel.

#### **4.17 Eletroforese bidimensional do extrato proteico das formas epimastigotas**

Para a obtenção de géis foram empregados cerca de 150 µg de proteínas solúveis que passaram por um processo de precipitação em TCA/Acetona (ácido tricloroacético e acetona, na proporção de 1:1:8) de cada isolado, diluídas 1:4 em tampão de hidratação. A primeira dimensão foi realizada utilizando tiras de gel de 13 centímetros (pH 3-10NL, GE Healthcare). Resumidamente, para cada amostra individual aproximadamente 150 µg de proteína total foram diluídas em solução de rehidratação, contendo 1% de DTT e 0,8% anfólitos (Tampão de pH 3-10NL IPG) a um volume final de 250 µL. As proteínas foram isoeletrofocalizadas usando IPGphor 3 (GE, Healthcare) sob o seguinte protocolo: passo 1, 14 h rehidratação passiva; passo 2, constante de 500 V / h; passo 3, gradiente de 1000 V / h; passo 4, gradiente de 8000 V / 2,5 h; e um passo final de 5, constante de 8000 V / h, perfazendo um total de 29.500 V / h). A temperatura foi ajustada para 23 ° C. Após, as proteínas isoeletrofocalizadas foram reduzidas e, em seguida, alquilado utilizando DTT a 1% e 4% de iodoacetamida, respectivamente, em solução de equilíbrio (6 M de ureia, 75 mM Tris-HCl pH 8,8, 29,3% de glicerol, 2% de SDS, 0,002% de azul de bromofenol). A segunda dimensão foi realizada a 5 ° C usando uma cuba de eletroforese com gel de 18 x 16 centímetros a 20 mA / gel, durante aproximadamente 6 h. Os géis foram fixados em uma solução de 2% v / v ácido ortofostórico e etanol, 30% v / v solução de etanol e ácido ortofostórico durante a noite, em seguida, lavou-se 3 x 10 min, com 2% v / v de ácido fosfórico. A coloração foi realizada em 2% v / v de ácido ortofostórico, 18% v / v de etanol, 15% p / v de sulfato de amônio e 0,002% p / v solução de azul de Coomassie G-250 (Sigma-Aldrich) durante 48 h. Os géis foram descorados em 20% v / v de etanol, durante 5 min. Os mesmos foram digitalizados usando ImageScanner III (GE, Healthcare). As análises bidimensionais (2D) de cada gel, foram realizadas utilizando o software SameSpots (TotalLab Ltd., v. 20, Reino Unido) de acordo com as recomendações do fabricante. Análise quantitativa foram realizadas com os spots que apresentaram  $\geq 1.5$  vezes de alteração de expressão em relação aos respectivos spots presentes na cepa utilizada como referência; os mesmos foram considerados de interesse e selecionados para a espectrometria de massas para identificação.

#### **4.18 Identificação das Proteínas pela espectrometria de massas**

A seleção dos spots protéicos diferencialmente expressos nos géis de amostras de *T.cruzi* isoladas de pacientes com a forma cardíaca, foi realizada por meio do

software Samespots utilizando as imagens obtidas após coloração dos géis com Coomassie. Os spots individuais foram manualmente excisados e submetidos ao processo de digestão segundo o protocolo de Helman *et al.* (1994). Os peptídeos presentes no sobrenadante foram analisados em espectrômetro de massas Q-Exactive LC-MS/MS (Thermo) disponível no Núcleo de Pesquisa em Ciências Biológicas da UFOP. Foram utilizados como parâmetros de identificação peptídeos com valores esperado menor ou igual a 0,05, FDR menor ou igual a 3% e porcentagem de cobertura maior ou igual a 8%, com pelo menos um peptídeo único para cada proteína identificada. Como parâmetros de busca, foram utilizados a carbonila metilação de cisteína com modificação fixa, oxidação de metionina com modificação variável, isotipo permitido de perda de clivagem, tolerância de 0,1 Da para tanto o íon precursor e o fragmentado. Espectros MS e MS/MS foram obtidos em modo reflector positivo. Os dados provenientes dos espectros MS/MS foram analisados na plataforma Proteome Discoverer v.1.4 (Thermo), o qual através da utilização do algoritmo SEQUEST, forneceu dados sobre a identidade das seqüências peptídicas/protéicas. O banco de dados utilizado para as buscas foi o do *T. cruzi* obtido na base de dados UNIPROT. A tolerância de massa foi  $\pm 0.1$  Da para os íons precursores e  $\pm 0.15$  Da para os íons provenientes de fragmentações. As buscas permitiram no máximo 1 sítio de não clivagem pela tripsina, a carbamidometilação de cisteínas e a possível oxidação de metioninas.

## 5.0 RESULTADOS

### 5.1 Parâmetros biológicos

#### 5.1.1 Infectividade (INF)

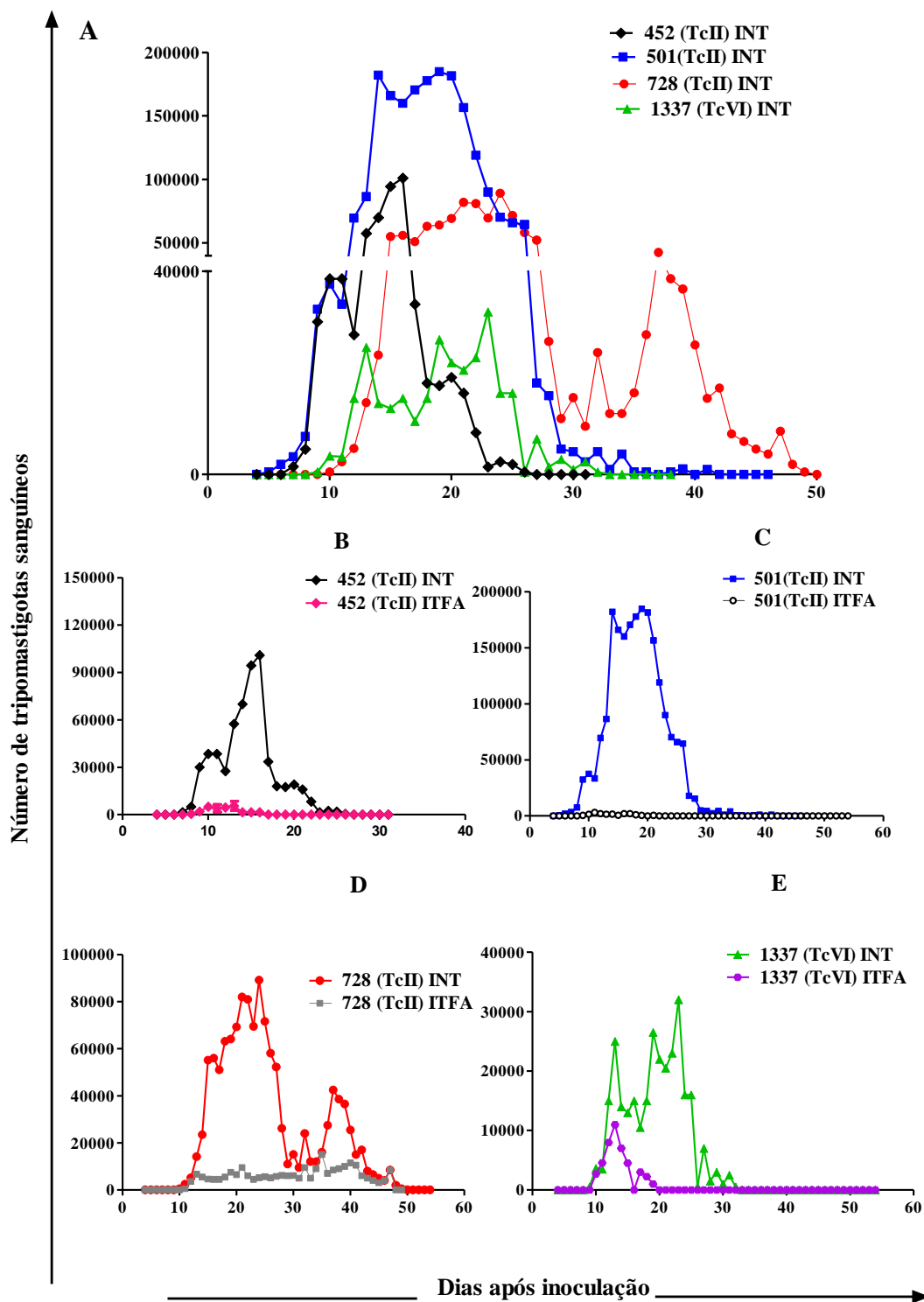
Das seis amostras de *T. cruzi* estudadas neste trabalho ( PR150 – TcI, 452, 501 e 728 – TcII, 748 e 1337 – TcVI), apenas quatro delas ( 452, 501, 728 - TcII e 1337 - TcVI) foram capazes de apresentar parasitemia patente em camundongos Swiss. Os outros dois isolados foram submetidos a diversas tentativas de diferenciação das formas epimastigota em tripomastigota (metacicloênese) e sua posterior inoculação em camundongos das linhagens Swiss e Balb/C, não resultaram em parasitemia patente. O percentual de infectividade para esses quatro isolados foram de 100% e todos os animais infectados apresentaram exame de sangue a fresco positivo, ou seja, parasitemia patente.

#### 5.1.2 Parasitemia (PAR):

Animais infectados não tratados (INT) com as cepa 728 ( $1,2 \times 10^6 \pm 1,1 \times 10^6$  mm<sup>2</sup>) e 501 INT ( $2,1 \times 10^6 \pm 1,0 \times 10^6$  mm<sup>2</sup>), representantes do genótipo TcII, foram os que apresentaram maiores áreas sob a curva (AUC) de parasitemia, mas não houve diferenças estatísticas entre elas (**Figura 2A**). Essas mesmas duas cepas apresentaram após as análises, o maior número de parasitos no sangue periférico (**Figura 2**). A amostra que apresentou a menor área sob a curva foi o 1337 ( $2,8 \times 10^5 \pm 2,7 \times 10^5$ ), pertencente ao genótipo TcVI.

Comparativamente, em relação aos animais infectados e tratados na fase aguda da infecção (ITFA), as amostras que apresentaram as maiores áreas sob a curva foram: 1337- TcVI ( $4,4 \times 10^4 \pm 3,6 \times 10^4$  mm<sup>2</sup>) e 728 - TcII ( $2,6 \times 10^4 \pm 1,2 \times 10^4$  mm<sup>2</sup>), ambas pertencentes aos genótipos TcVI e TcII, respectivamente. A amostra isolada de animais infectados e tratados na fase aguda que apresentou a menor área sob a curva foi o 501 - TcII ( $1,6 \times 10^4 \pm 1,4 \times 10^4$  mm<sup>2</sup>) (**Figura 2**). Não houve diferença estatística entre os pares de amostras 728 - TcII (ITFA) vs 501 - TcII (ITFA), 728 - TcII (ITFA) vs 501 - TcII (ITFA), 728 - TcII (ITFA) vs 501 - TcII (ITFA) com  $P > 0.05$ . Já os pares de isolados 501 - TcII (ITFA) vs 1337 - TcVI (ITFA), 501 - TcII (ITFA) vs 452 - TcII

(ITFA), 1337 - TcVI (ITFA) VS 452 - TcII (ITFA) apresentaram diferenças significativas ( $P < 0.05$ ).



**Figura 2:** A) Curvas de parasitemia observadas em camundongos Swiss inoculados com 10.000 tripomastigotas sanguíneos e não tratados, infectados com as amostras de *Trypanosoma cruzi* (452, 501, 728 - TcII e 1337 - TcVI) isoladas de pacientes com infecção

chagásica crônica do município de Berilo, Vale do Jequitinhonha, MG, Brasil. B, C, D e E – Curvas de parasitemia comparando os grupos infectados tratados com os isolados infectados não tratados na fase aguda da infecção. (INT: infectado não tratado, ITFA: infectado e tratado na fase aguda).

### 5.1.3 Período Pre-Patente (PPP):

O PPP corresponde ao tempo em dias após o inóculo em que se observa a presença das formas tripomastigotas no sangue periférico do camundongo, expresso em dias pós-infecção. Os PPPs avaliados nesse trabalho, variaram de  $6,75 \pm 0,82$  a  $12,25 \pm 0,45$  dias nas amostras de camundongos infectados não tratados, e de  $8,50 \pm 0,3273$  a  $12,88 \pm 0,79$  dias nas amostras de animais infectados e tratados na fase aguda da infecção. A amostra que apresentou maior PPP foi a 728 - TcII, com a média do período pré-patente de  $12,88 \pm 0,79$  dias. A amostra que mostrou o menor PPP foi o 501 também TcII, com média de  $6,75 \pm 0,82$  dias (**Tabela 2**). Ao avaliar a existência de diferença significativa ( $P < 0,05$ ) entre as duplas de um mesmo isolado (INT vs ITFA), observou-se a existência de diferenças apenas entre as amostras pertencentes ao genótipo TcII (isolados 452 e 501) - (**Tabela 2**).



**Tabela 2:** Média dos parâmetros biológicos avaliados em camundongos infectados com as amostras 728, 501, 452 (TcII) e 1337 (TcVI) de *Trypanosoma cruzi* isoladas de pacientes na fase crônica da doença de Chagas residentes em Berilo, Vale do Jequitinhonha, Minas Gerais, Brasil.

Amostras de <i>T. cruzi</i> /DTUs	PPP		PP		PMP		DPMP	
	INT/ITFA	<i>p</i>	INT/ITFA	<i>p</i>	INT/ITFA	<i>p</i>	INT/ITFA	<i>p</i>
<b>452 (TcII)</b>	6,87 ± 0,29/ 8,50 ± 0,3273	0,002*	13,00 ± 1,87/ 3,62 ± 0,37	0,013*	112500 ± 44887/ 16125 ± 4768	0,036*	13,25 ± 1,31/ 12,00 ± 0,75	0,398
<b>501 (TcII)</b>	6,75 ± 0,82/ 9,37 ± 0,37	0,019*	21,25 ± 3,31/ 4,12 ± 0,85	0,0*	200000 ± 40525/ 5063 ± 993	0,0*	17,50 ± 1,35/ 11,00 ± 0,53	0,008*
<b>728 (TcII)</b>	12,25 ± 0,45/ 12,88 ± 0,79	0,91	28,88 ± 2,05/ 16,13 ± 5,76	0,14	111000 ± 49128/ 25000 ± 7474	0,015*	12,88 ± 1,28/ 11,88 ± 0,74	0,512
<b>1337 (TcVI)</b>	10,25 ± 0,88/ 9,50 ± 0,42	0,658	11,13 ± 2,37/ 4,00 ± 0,80	0,082*	38500 ± 16474/ 17625 ± 4367	0,031*	16,50 ± 1,43/ 12,75 ± 0,88	0,043*

PPP: período pré-patente; PP: período patente; PMP: pico máximo de parasitemia; DPMP: dia do pico máximo da parasitemia; INT: infectado não tratado; ITFA: infectado tratado fase aguda; DTU: *Discrete Typing Unity*; \*apresenta diferença significativa.

#### 5.1.4 Período Patente PP:

O período patente corresponde ao período compreendido entre o primeiro dia em que se observou a existência do parasito no sangue periférico do camundongo até o ultimo dia antes de zerar a parasitemia, verificada por pelo menos cinco dias consecutivos após a primeira negatização do exame de sangue a fresco. Para este parâmetro, a amostra não tratada, que apresentou maior média do PP, foi a 728 (TcII) com 28,88 ± 2,05 dias. A amostra não tratada, que apresentou a menor média do PP, foi a 1337, única amostra TcVI que apresentou parasitemia patente em modelo murino com

média de PP de  $11,13 \pm 2,37$  dias. Entre as amostras de *T. cruzi* inoculadas em animais tratados na fase aguda da infecção, a 728 (TcII) também foi a que apresentou a maior média do PP, de  $16,13 \pm 5,76$  dias. A amostra que demonstrou a menor média de PP foi a 452 (TcII), com  $3,62 \pm 0,37$  dias. Foram observadas diferenças significativas ( $P < 0,05$ ) no parâmetro PP quando foram comparadas as amostras 452, 501 (TcII) e 1337 (TcVI) nos grupos INT vs ITFA (**Tabela 2**).

### 5.1.5 Pico máximo de parasitemia:

A amostra que apresentou maior PMP nos camundongos foi a 501 (TcII), com média de  $200000 \pm 40525$  tripomastigotas/0,1mL de sangue no 17º dia de infecção. Os animais infectados com a amostra 1337 (TcIV) foram os que apresentaram o menor PMP, com média de  $38500 \pm 16474$  tripomastigotas/0,1mL no 16º dia de infecção. Já nos grupos dos camundongos infectados e tratados na fase aguda da infecção, a amostra que apresentou maior média de PMP foi 728 (TcII), de  $25000 \pm 7474$  tripomastigotas/0,1mL de sangue no 11º dia de infecção. A amostra que apresentou a menor média de PMP no grupo de animais tratados foi a 501 (TcII), com  $5063 \pm 993$  tripomastigotas/0,1mL de sangue no 11º dia de infecção.

Na análise do parâmetro PMP, foram encontradas diferenças significativas ( $P \leq 0,05$ ) entre os pares 501 (TcII) INT vs 501 TFA e 1337 (TcVI) INT vs 1337 ITFA, como demonstrado na **Tabela 2**. Não foram encontradas diferenças significativas ( $P > 0,05$ ) entre os pares de amostras 728 (TcII) e 452 (TcII) comparando-se os grupos tratados e não tratados (**Tabela 2**).

### 5.1.6 Dia do pico máximo de parasitemia DPMP:

A média do DPMP variou entre 12º e 17º dias nos grupos de animais não tratados, e do 11º ao 12º dias nos grupos de animais tratados na fase aguda. O par de amostras 501 (TcII) e 1337 (TcVI) (**Tabela 2**) foi o único que apresentou diferenças significativas ( $P > 0,05$ ) na comparação entre os grupos de animais tratados e não tratados. Não houve variação significativa no DPMP comparando os isolados não tratados, diferentemente do observado na comparação dos grupos tratados. (**Tabela 2**).

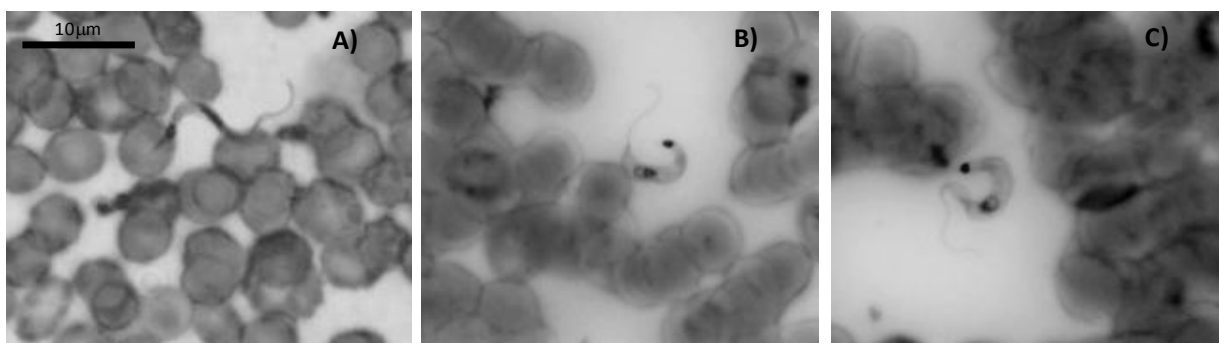
### 5.1.7 Mortalidade (MOR)

Nos grupos de camundongos inoculados com as diferentes amostras do *T. cruzi* não foram detectadas mortalidade até o 360<sup>o</sup> dia pós-tratamento, período que os animais foram mantidos sob observação no biotério.

### 5.1.8 Caracterização morfológica dos parasitos no sangue periférico

Em todas as amostras de *T. cruzi* avaliadas foi demonstrada uma predominância de formas intermediárias durante todo o PP, exceto na amostra 1337 (TcVI) na qual foi verificada predominância de formas delgadas no início da infecção, posteriormente substituídas por formas intermediárias e largas ao longo do período de observação.

Na **Figura 3** está demonstrada a avaliação do polimorfismo dos parasitos no sangue periférico de camundongos infectados com a amostra 1337 (TcVI), representadas em percentual de formas finas, intermediárias e largas observadas durante os dias em que a parasitemia encontrava-se mais elevada durante a fase aguda da infecção (**Figura 3**).



**Figura 3:** Polimorfismo representativo dos tripomastigotas sanguíneos provenientes dos camundongos infectados com a amostra de *T. cruzi* 1337 (TcVI) . A: forma delgada; B: forma intermediária; C: forma larga.

## 5.2 Susceptibilidade/Resistência das amostras de *T. cruzi* ao Nifurtimox.

### 5.2.1 Avaliações Parasitológicas

#### 5.2.1.1 Exame a fresco (ESF)

No grupo de animais **ITFA** (infectados e tratados na fase aguda) a positividade global no ESF pós-tratamento foi de 0% (0/32) e a positividade desta técnica nos diferentes grupos de animais não apresentou variação. Este exame não foi capaz de detectar parasitos em animais infectados com as amostras Pr 150 (TcI) e 748 (TcVI). No grupo dos animais INT o ESF foi capaz de detectar parasitos em 100% (32/32) dos animais.

O ESF não foi realizado em animais ITFC (infectados e tratados na fase crônica), uma vez que na fase crônica da infecção, este exame é quase sempre negativo devido a parasitemia subpatente resultante da resposta imune que o animal já desenvolveu.

### **5.2.1.2 Hemocultura (Hm)**

A positividade da hemocultura pós-tratamento realizada no grupo de animais **ITFA** variou de 0 a 46.9%, dependendo do grupo experimental, tempo de avaliação pós-tratamento e do genótipo de cada cepa. A Hm aumentou a taxa de detecção de fracasso terapêutico na maioria dos animais quando comparada ao ESF, exceto em animais infectados com as amostras 1337 (TcVI) e 452 (TcII), nos quais não foi observada positividade por esta técnica. No grupo de animais **INT**, a realização da hemocultura foi desnecessária, pois todos os animais foram positivos no ESF (dados não mostrados individualmente).

Amostras de sangue de animais do grupo **ITFC** (n=32) foram submetidas à Hm e esta foi positiva em 31,25% (10/32) dos animais. A positividade desta técnica nos diferentes grupos experimentais variou de 0 a 50%. No grupo de animais **INT** a Hm foi capaz de detectar parasitos em 93,75% (30/32) dos animais, e a positividade desta técnica nos diferentes grupos de animais variou de 90 a 100% (dados não mostrados). Animais infectados com as amostras 501 e 728 (ambas TcII) não tratados apresentaram 100% de positividade nesta técnica (dados não mostrados).

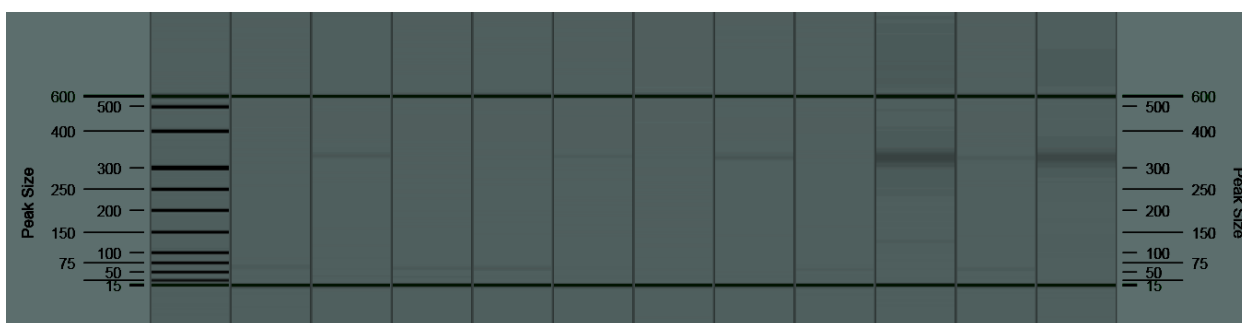
### **5.2.1.3 Reação da cadeia da polimerase - PCR**

Entre os 32 animais **ITFA**, 19 (59,3%), 27 (84,3%) e 32 (100%) apresentaram resultados negativos na PCR, 90, 180 e 360 dias após o tratamento, respectivamente. A positividade global na PCR foi de 41,7% (13/32) em animais infectados com as

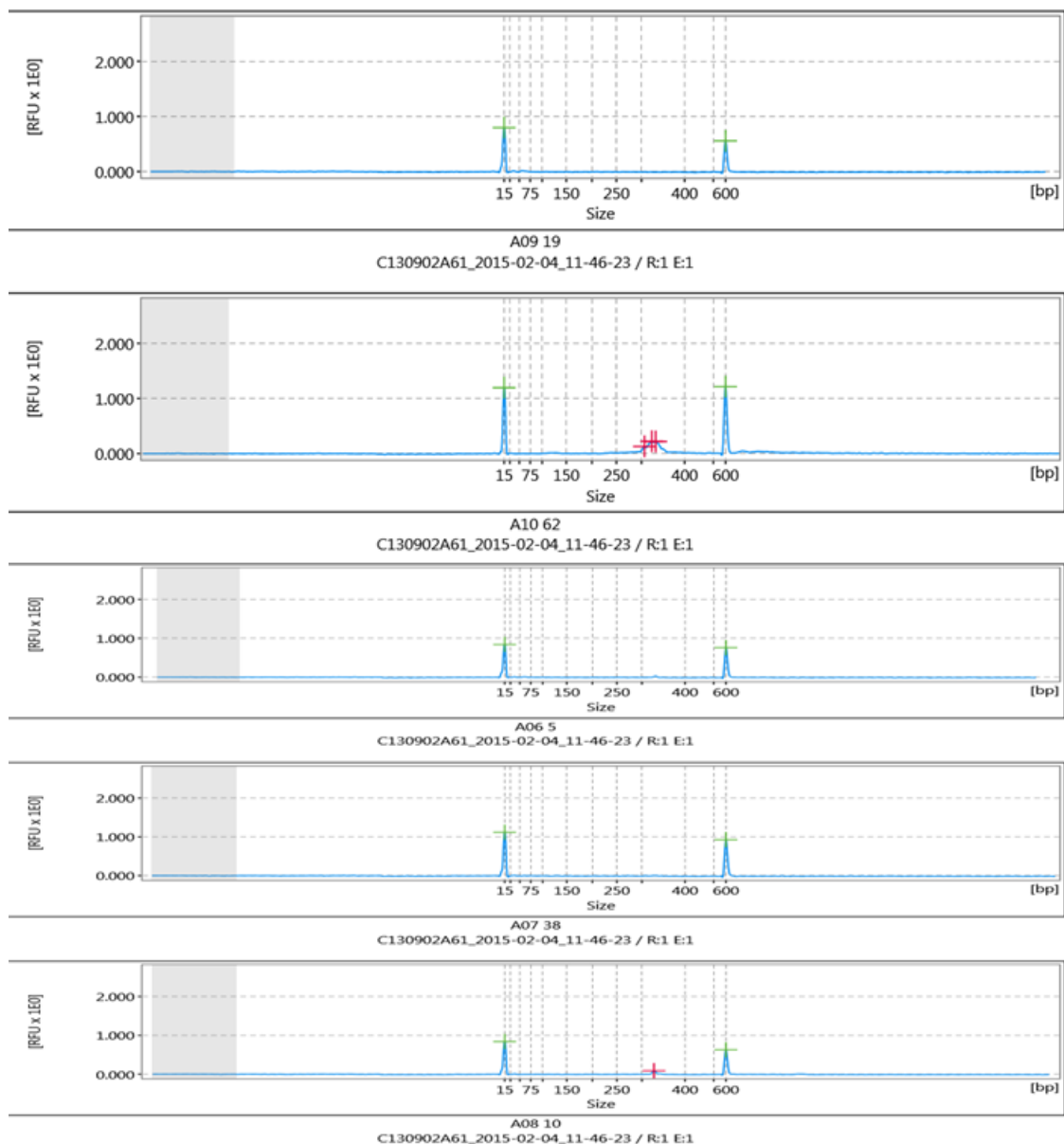
diferentes cepas de *T. cruzi* tratados na fase aguda da infecção. A PCR demonstrou sucesso terapêutico em todos os grupos experimentais, tratados na fase aguda da infecção, uma vez que essa metodologia foi negativa em todos os grupos 360 (d.p.t). Vale ressaltar, que a PCR foi diminuindo sua positividade ao longo das avaliações (**Tabela 3**). Não foi necessária a realização da PCR em amostras de sangue de animais infectados e não tratados com todas as cepas, uma vez que estas apresentaram resultados positivos no ESF (dados não mostrados).

Entre os 32 animais **ITFC**, apenas 8 apresentaram resultados positivos na PCR 180 (d.p.t), e nenhum animal apresentou PCR positiva na avaliação de 360 (d.p.t). A positividade da PCR neste grupo foi de 25% (8/32) em animais infectados com as diferentes cepas de *T. cruzi*. A positividade desta técnica nos diferentes grupos de animais ITFC variou de 0 a 40%. Animais infectados com as cepas 1337 (TcVI) e 452 (TcII) e negativos na Hm, foram também negativos na PCR. Amostras de sangue de animais **INT**, negativos na Hm, apresentaram cerca 70% de positividade na PCR (dados não mostrados). Entre os diferentes grupos de animais INT a positividade da PCR variou de 15 a 100% (dados não mostrados).

Abaixo está demonstrado um gel eletrônico representativo dos resultados de amostras de *T. cruzi* após a realização da PCR, bem como os dados do tamanho de pares de bases apresentado por cada amostra no eletrofenograma (**Figuras 4 e 5**).



**Figura 4:** Gel eletrônico representativo, demonstrando os produtos amplificados (330 pb) de diferentes amostras de DNA, extraídas do sangue de camundongos infectados com as diferentes amostras do *Trypanosoma cruzi* utilizadas nesse estudo.



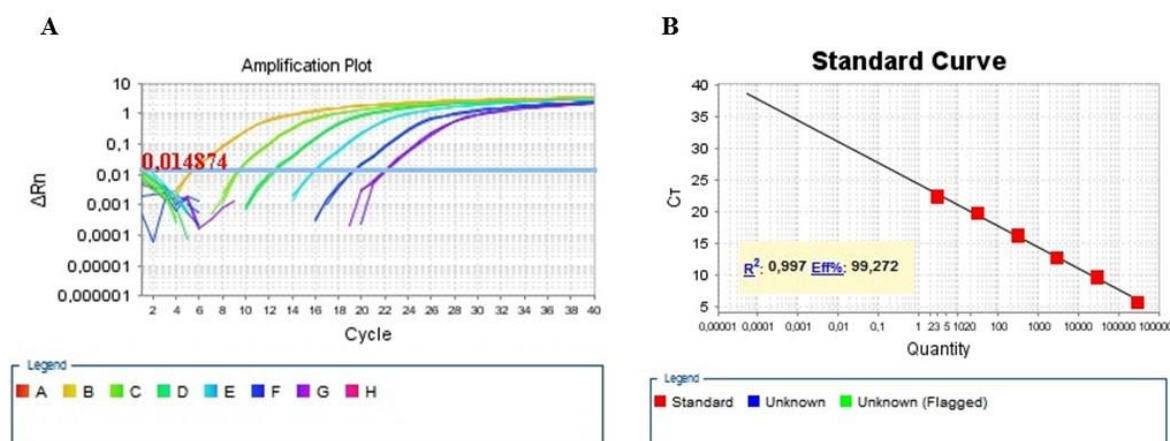
**Figura 5:** Eletrofentograma demonstrativo das primeiras cinco amostras de *Trypanosoma cruzi* existentes no gel eletrônico, demarcando em vermelho o pico de 330 pb, característico do K-dna do *Trypanosoma cruzi*.

#### 5.2.1.4 Avaliação do parasitismo tecidual (coração) por qPCR

Para a realização da metodologia de PCR para quantificação do parasitismo em tecido cardíaco de animais infectados com as diferentes amostra de *T. cruzi* utilizadas nesse trabalho, foi necessário gerar uma curva padrão para cada placa. A **Figura 6A** ilustra um gráfico de amplificação “ $\Delta Rn$ ” x Ciclo na apresentação logarítmica das seis diluições seriadas utilizadas para determinação da curva padrão. As linhas coloridas

representam as curvas de amplificação de DNA do *T. cruzi*. A magnitude do sinal de fluorescência normalizada ( $\Delta R_n$ ) foi calculada a cada ciclo, obtida pela razão entre o “Syber® Green”/ROX (corante) subtraída do baseline - “ $\Delta R_n$ ” =  $R_n$  (ciclo) - *baseline*. O “ $R_n$ ” ou repórter normalizado corresponde ao sinal de fluorescência do corante “Syber® Green” normalizado pelo sinal de fluorescência da referência passiva (corante ROX) existente na mistura da reação de PCR. A *baseline* é ajustada em cada amostra automaticamente durante os estágios iniciais da PCR, quando há poucas variações no sinal. A linha azul claro na horizontal corresponde ao *threshold*, que é ajustado automaticamente ou manualmente, mas quando necessário, para ser considerada a região de crescimento exponencial da amplificação localizada acima do *baseline*.

A **Figura 6B** apresenta uma curva padrão gerada a partir da região linear da curva de amplificação das seis diluições utilizadas. Os valores da eficiência (E) foram maiores que 97,5% e do coeficiente de correlação ( $R^2$ ) foram todos maiores que 0,99 (**Figura 6B**).



**Figura 6:** Curvas representativas de qPCR: A) Gráfico de amplificação ( $\Delta R_n$  x ciclo) do *Trypanosoma cruzi* demonstrando a amplificação de DNA nas seis diluições seriadas utilizadas ( $1 \times 10^6 - 1 \times 10^0$ ) em escala logarítmica para ajustes do *Threshold* (linha azul). Cada conjunto de linhas coloridas refere-se a um ponto da curva. B) Curva padrão gerada a partir da região linear da curva de amplificação.

Após confecção da curva padrão, foram avaliadas amostras dos corações dos animais dos grupos tratados e não tratados de cada cepa. Amostras de animais dos grupos infectados não tratados (controles) de cada cepa apresentaram qPCR com intenso parasitismo, tanto na fase aguda como na fase crônica da infecção.

No grupo dos animais infectados e tratados na fase aguda, o parasitismo tecidual detectado indiretamente por esta técnica foi de 37,5% (12/32) (**Tabela 3**). Apesar deste fato, todas as amostras amplificaram corretamente o gene endógeno (TNF- $\alpha$ ), o que confirma a correta realização da técnica e permitindo a confiabilidade nos resultados obtidos.

Nos grupos de camundongos infectados e tratados na fase crônica, 100% dos tecidos cardíacos dos animais amplificaram o fragmento de DNA característico para o *T. cruzi*. Após quantificação do DNA, foi observada positividade tecidual na PCR com índices bem mais elevados quando comparados com os animais infectados pelas mesmas amostras de *T. cruzi* tratados na fase aguda da infecção (**Tabela 3**).

Vale chamar atenção que o parasitismo cardíaco foi sempre mais intenso nos tecidos dos grupos de animais infectados e não tratados na fase crônica da infecção.

### 5.3 Avaliações Sorológicas

#### 5.3.1 Sorologia Convencional - ELISA

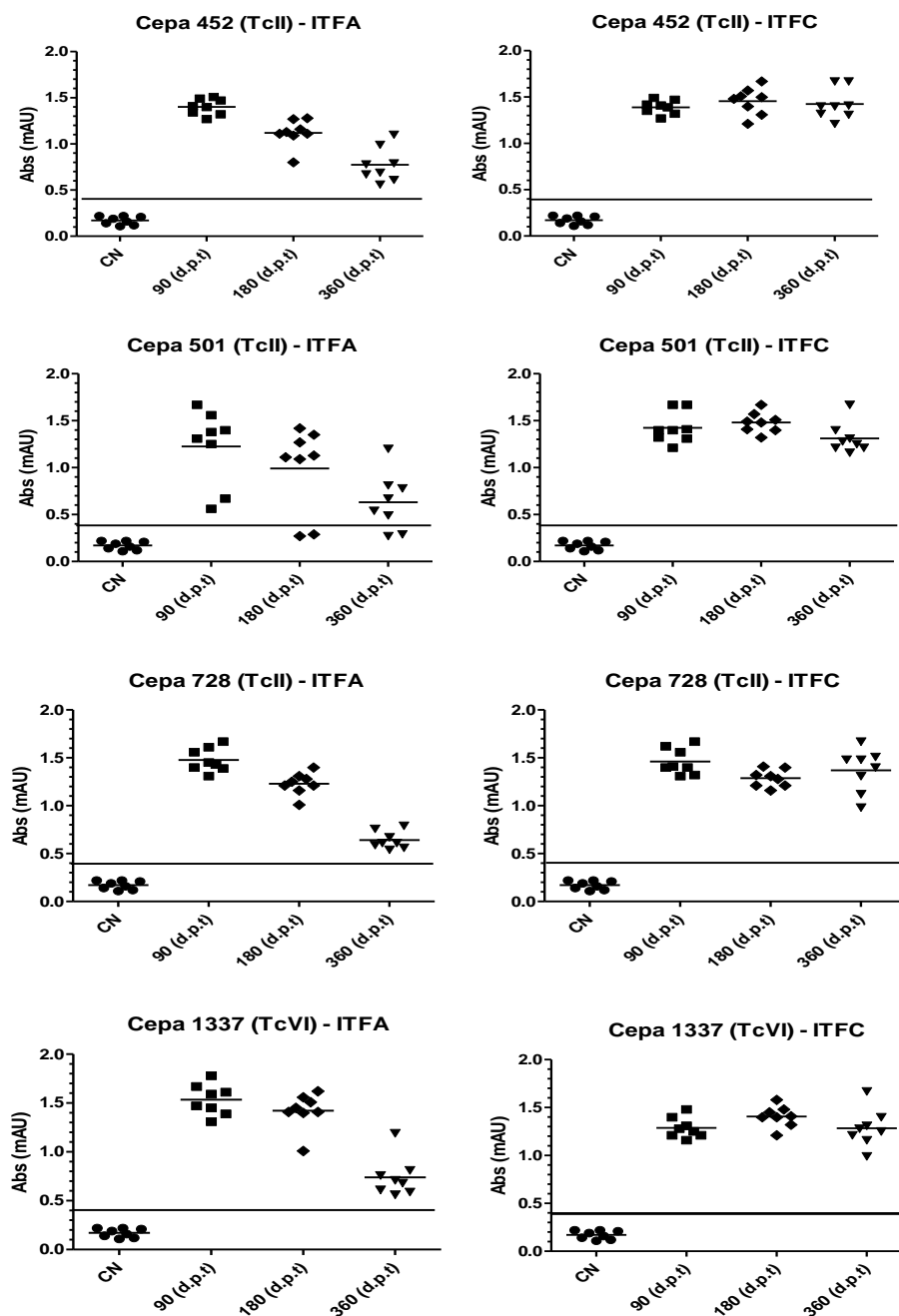
No grupo de animais INTFA a ELISA detectou 100% de positividade em amostras coletadas de animais infectados com todas as cepas e coletadas três (64/64), seis (62/62) meses e um ano após o tratamento (dados não apresentados).

No grupo de animais ITFA a ELISA foi positiva em 100% (32/32) dos animais infectados com as amostras coletadas de camundongos com três meses após o tratamento (**Figura 7 e Tabela 3**). Em amostras coletadas seis meses após o tratamento, a ELISA foi positiva na maioria (93,75% - 30/32), exceto em dois animais infectados com a cepa 501 (TcII) que apresentaram resultado negativo, o mesmo resultado aconteceu na avaliação de 360 (d. p.t) (**Figura 7 e Tabela 3**).

No grupo de animais ITFC a ELISA foi positiva em animais infectados com todas as amostras coletadas três (32/32), seis (32/32) meses e um ano após o tratamento (**Figura 6 e Tabela 3**). No grupo de animais INTFC a ELISA também detectou 100% de positividade nas amostras coletadas em todos os três tempos após o tratamento (dados não demonstrados).

Em geral houve queda significativa na absorbância dos grupos ITFA nos três tempos de coleta (90, 180 e 360 d.p.t), já para os grupos infectados e tratados na fase crônica da infecção, essa queda não foi observada (**Figura 7**).





**Figura 7:** Absorbância observada na sorologia convencional (ELISA) dos camundongos infectados com as quatro cepas de *Trypanosoma cruzi* (501, 452, 728 – TcII e 1337 – TcVI), avaliados nos tempos de 90, 180 e 360 dias após o tratamento com o Nifurtimox nas fases aguda e crônica da infecção. ITFA = grupos infectados e tratados na fase aguda da infecção; ITFC = grupos infectados e tratados na fase crônica da infecção; CN = controle negativo; Cutt-of – linha contínua, com valor aproximado de 0,4.

### 5.3.2 Sorologia não convencional – CF-AATV

Na pesquisa de anticorpos anti-tripomastigotas vivos pela citometria de fluxo a negatividade global observada em ambos os grupos de camundongos infectados e tratados na fase aguda da infecção foi de 62,5% em animais na avaliação feita 360 dias pós-tratamento (Tabela 3). Os animais que apresentaram o maior índice de negatividade para essa metodologia foi o grupo infectado pela cepa 452 pertencente ao genótipo TcII, negativo em 87,5% (7/8) dos camundongos. A amostra de *T. cruzi* que demonstrou a maior resistência ao fármaco foi a 728 (TcII), com 25% (2/8) animais com CF-AATV negativa (Tabela 3).

No grupo de animais infectados e tratados na fase crônica da infecção (ITFC), a metodologia de CF-AATV foi positiva em 100% dos grupos. **(Tabela 3).**

**Tabela 3:** Resultados das técnicas parasitológicas/molecular (Hm, PCR e qPCR), sorológica convencional (ELISA) e sorológica não convencional (CF-AATV), utilizadas como controle de cura nos animais infectados com amostras de *Trypanosoma cruzi* tratados na fase aguda e crônica da infecção.

Resultados Negativos (ITFA)												
Cepas de <i>T. cruzi</i>	Métodos parasitológicos/molecular (%)							Sorologia convencional (%)			Sorologia não convencional (%)	Cura Total (%)
	HC (%)			PCR no sangue (%)			qPCR (%)	ELISA (%)			FC-ALTA (%)	
	90 (d.a.t)	180 (d.a.t)	360 (d.a.t)	90 (d.a.t)	180 (d.a.t)	360 (d.a.t)	360 (d.a.t)	90 (d.a.t)	180 (d.a.t)	360 (d.a.t)	360 (d.a.t)	
<b>452 (TcII)</b>	100 (8/8)	100 (8/8)	100 (8/8)	25 (2/8)	100 (8/8)	100 (8/8)	87,5 (7/8)	0 (0/8)	0 (0/8)	0 (0/8)	87,5 (7/8)	87,5 (7/8)
<b>501 (TcII)</b>	62,5 (5/8)	12,5 (1/8)	100 (8/8)	12,5 (1/8)	100 (8/8)	100 (8/8)	75 (6/8)	0 (0/8)	25 (2/8)	25 (2/8)	75 (6/8)	75 (6/8)
<b>728 (TcII)</b>	100 (8/8)	100 (8/8)	100 (8/8)	100 (8/8)	62,5 (5/8)	100 (8/8)	25 (2/8)	0 (0/8)	0 (0/8)	0 (0/8)	25 (2/8)	25 (2/8)
<b>1337 (TcVI)</b>	100 (8/8)	100 (0/8)	100 (8/8)	100 (8/8)	75 (6/8)	100 (8/8)	62,5 (5/8)	0 (0/8)	0 (0/8)	0 (0/8)	62,5 (5/8)	62,5 (5/8)
<b>Total (n)</b>	90,6 (29/32)	53,1 (17/32)	100 (32/32)	59,3 (19/32)	84,37 (27/32)	100 (32/32)	62,5 (20/32)	0 (0/32)	6,25 (2/32)	6,25 (2/32)	62,5 (20/32)	62,5 (20/32)

Resultados Negativos (ITFC)												
Cepas de <i>T. cruzi</i>	HC (%)			PCR no sangue (%)			qPCR (%)	ELISA (%)			AATV (%)	Cura Total (%)
	90 (d.a.t)	180 (d.a.t)	360 (d.a.t)	90 (d.a.t)	180 (d.a.t)	360 (d.a.t)	360 (d.a.t)	90 (d.a.t)	180 (d.a.t)	360 (d.a.t)	360 (d.a.t)	360 (d.a.t)
<b>452</b> (TcII)	100 (8/8)	100 (8/8)	100 (8/8)	100 (8/8)	100 (8/8)	100 (8/8)	0 (0/8)	0 (0/8)	0 (0/8)	0 (0/8)	0 (0/8)	0 (0/32)
<b>501</b> (TcII)	25 (2/8)	100 (8/8)	100 (8/8)	50 (4/8)	50 (4/8)	100 (8/8)	0 (0/8)	0 (0/8)	0 (0/8)	0 (0/8)	0 (0/8)	0 (0/32)
<b>728</b> (TcII)	100 (8/8)	100 (8/8)	100 (8/8)	100 (8/8)	50 (4/8)	100 (8/8)	0 (0/8)	0 (0/8)	0 (0/8)	0 (0/8)	0 (0/8)	0 (0/32)
<b>1337</b> (TcVI)	50 (4/8)	100 (8/8)	100 (8/8)	100 (8/8)	100 (8/8)	100 (8/8)	0 (0/8)	0 (0/8)	0 (0/8)	0 (0/8)	0 (0/8)	0 (0/32)
<b>Total (n)</b>	68,75 (22/32)	100 (32/32)	100 (32/32)	87,5 (28/32)	75 (24/32)	100 (32/32)	0 (0/32)	0 (0/32)	0 (0/32)	0 (0/32)	0 (0/32)	0 (0/32)

**ITFA:** infectado tratado fase aguda, **ITFC:** infectado tratado fase crônica, **ESF:** exame de sangue a fresco, **Hm:** hemocultura, **PCR:** Reação da cadeia da Polimerase, **qPCR:** reação de PCR quantitativa realizada nos tecidos cardíacos dos animais.

#### 5.4 Perfis de Susceptibilidade ao Nifurtimox e critério de cura dos animais.

Considerando o critério de cura clássico proposto pelo Consenso Brasileiro de doença de Chagas em 2005, que visa a negatificação de todos os testes parasitológicos e sorológico convencional, o índice de cura encontrado na avaliação final de 360 (d.p.t) para o grupo de animais ITFA foi muito baixo, apenas 6,25%. Ao longo das três avaliações foi observado um aumento progressivo na negatificação dos métodos parasitológicos (Hm e PCR no sangue) chegando a 100% de negatificação na última avaliação (360 d. p. t). Também pode ser observada uma queda na absorbância da sorologia convencional ao longo das três avaliações em todos os grupos ITFA. (**Figura 7**). Na avaliação feita no 360° (d.p.t), a absorbância dos soros de todos os grupos experimentais (ITFA) estava bem próximo ao cutt-off. Vale ressaltar, que outras avaliações não foram possíveis, pois os camundongos possuem em média dois anos de vida, e não teríamos tempo suficiente para esperar essa soroconversão nos grupos experimentais uma vez que estes animais foram necropsiados para avaliações histopatológicas e qPCR em tecido cardíaco destes mesmos animais.

Na avaliação da resposta ao tratamento na fase crônica da infecção considerando o critério clássico de cura, não foi observada cura em nenhum dos animais infectados e tratados, tão pouco queda na absorbância da sorologia convencional nos três tempos de avaliação.

Por outro lado e considerando o critério de cura mais atual que considera como curado o animal que apresenta a negatificação de métodos sorológico não convencional, aqui representando por metodologia análoga à Lise Mediada por Complemento (LMC<sup>o</sup>), a AATV juntamente com a negatificação dos testes parasitológicos, agora acrescido da PCR no sangue e principalmente da qPCR em tecidos, foi verificado um índice de cura parasitológica de 62,5% (20/32) dos animais, ou seja, dez vezes maior que o observado no critério de cura clássico.

A sorologia não convencional (CF-AATV), avaliada 360 d. p.t, demonstrou uma alta taxa de negatificação em relação à sorologia convencional (ELISA) no mesmo tempo de avaliação. Os mesmos animais que apresentaram a CF-AATV negativa, apresentaram a qPCR quantitativa no tecido cardíaco além da Hm e PCR no sangue, também negativos, o que não foi observado nos grupos controles INT com cada uma das amostras estudadas.

No grupo de animais ITFC, não foi observada cura em nenhum dos animais infectados por todas as amostras de *T. cruzi*. A AATV e qPCR feitas na avaliação de 360 d. p.t, apresentaram resultados positivos em 100% dos animais.

Com essas análises, podemos afirmar que as quatro amostras avaliadas nesse trabalho, foram consideradas resistentes ao fármaco Nifurtimox, pelo critério de cura clássico, e parcialmente sensíveis ao tratamento por este fármaco pelo critério de cura mais atual.

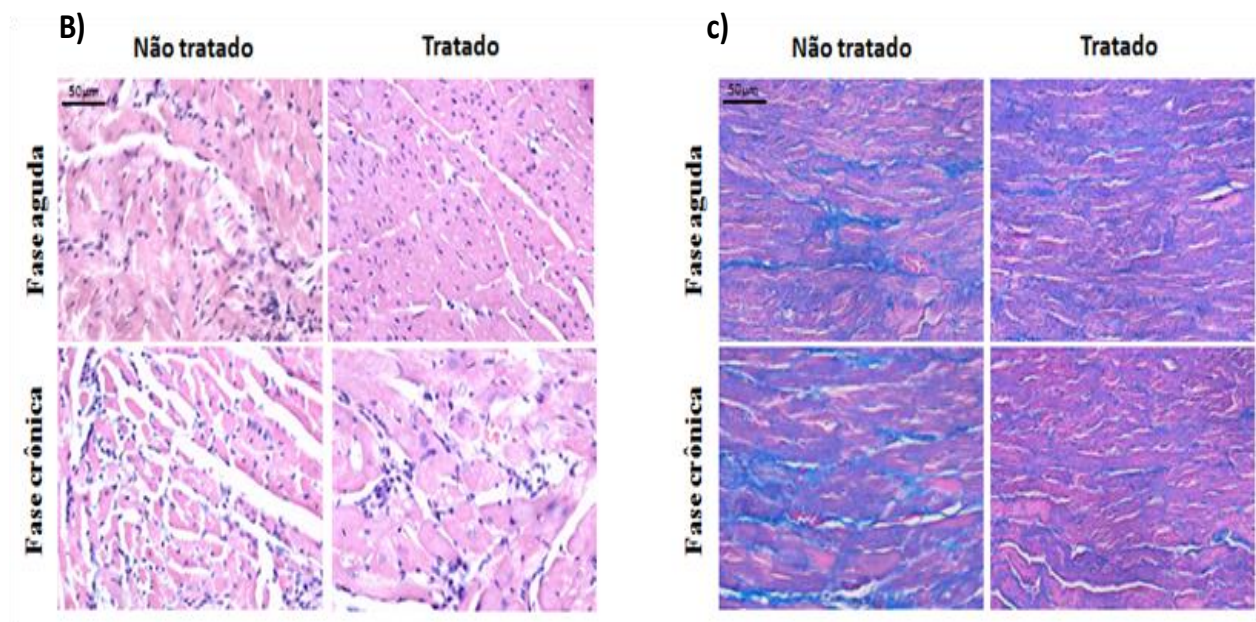
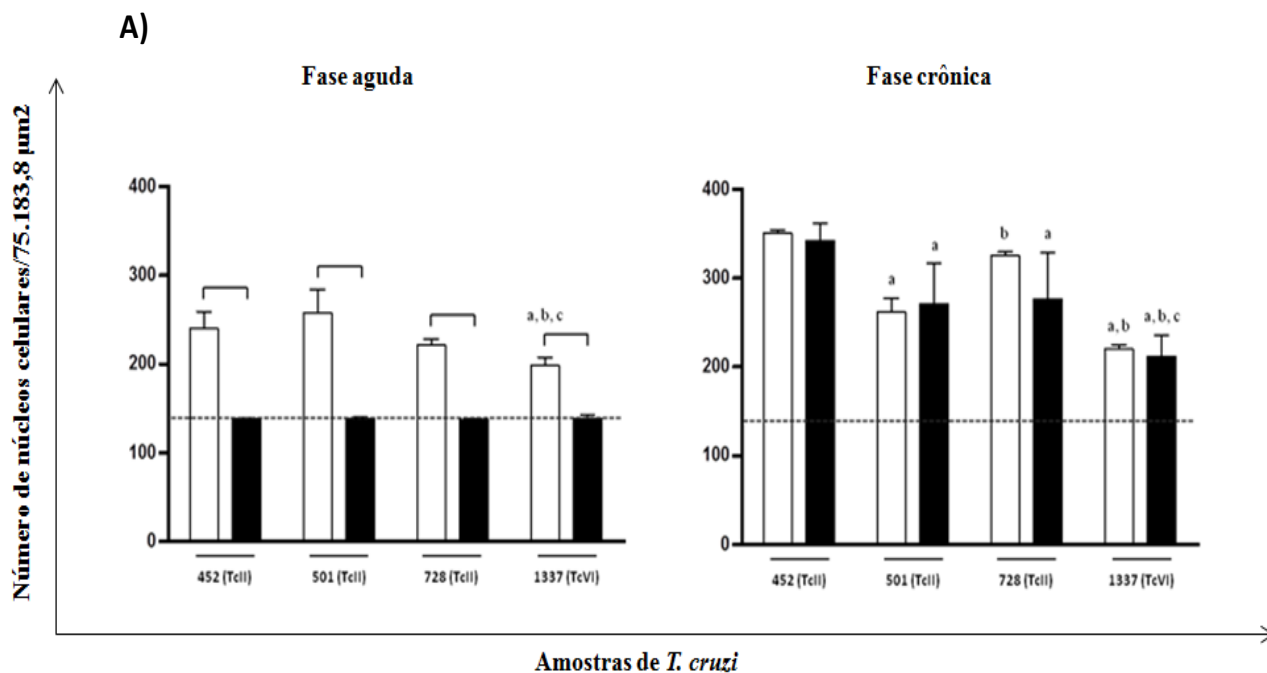
### 5.5 Avaliações histopatológicas:

A avaliação quantitativa do processo inflamatório cardíaco em camundongos do grupo INT foi realizada paralelamente ao grupo ITFA e ITFC, um ano após o término do tratamento. Os animais dos grupos INT que apresentaram os maiores índices de infiltrado inflamatório no tecido cardíaco foram os infectados com amostras do genótipo TcII (**Figura 8 A**). O grupo de animais INT com a amostra 501 (TcII), apresentou o maior índice de inflamação no tecido cardíaco. O grupo de animais INT que demonstraram menos inflamação, foi o infectado pela amostra 1337, pertencente ao genótipo híbrido, TcVI. Esta amostra apresentou diferenças significativas entre o número de infiltrado inflamatório em relação a todos os outros grupos experimentais (**Figura 8A e B**). Todos os grupos de animais INT demonstraram diferenças significativas em relação ao grupo infectado e tratado com a mesma amostra de parasito, considerando o processo inflamatório (**Figura 8A**).

Em relação aos grupos de animais ITFA da infecção, não foram observados processos inflamatórios exacerbados no tecido cardíaco, e a contagem dos núcleos do infiltrado inflamatório, ficou bem próxima ao dos grupos controles não infectados como demonstrado na **Figura 8A**.

Já para os grupos de animais na fase crônica da infecção, não houve diferença significativa entre os grupos tratados e não tratados infectados pela mesma amostra (INT vs ITFC), ou seja, o tratamento não foi capaz de reduzir o processo inflamatório no tecido cardíaco dos animais. Entretanto, foi observada diferença significativa entre os animais infectados com amostras pertencentes a grupos genéticos distintos. A amostra 1337 (TcVI), assim como na fase aguda da infecção, também apresentou as menores taxas de infiltrado inflamatório no tecido cardíaco dos animais, e diferenças significativas quando comparada aos demais grupos experimentais (**Figura 8A**).

Na avaliação da deposição de colágeno no tecido cardíaco de animais infectados com as diferentes amostras de *T. cruzi*, verificou-se neoformação discreta de colágeno nos grupos de animais INT em relação aos tratados, independentemente do tratamento ter sido realizado nas fases agudas ou crônica infecção (**Figura 8C**).



**Figura 8:** A) Quantificação do número de células inflamatórias no coração de animais infectados com amostras de *Trypanosoma cruzi*. A linha tracejada no gráfico representa a média entre o número de núcleos celulares encontrados no tecido cardíaco dos animais não

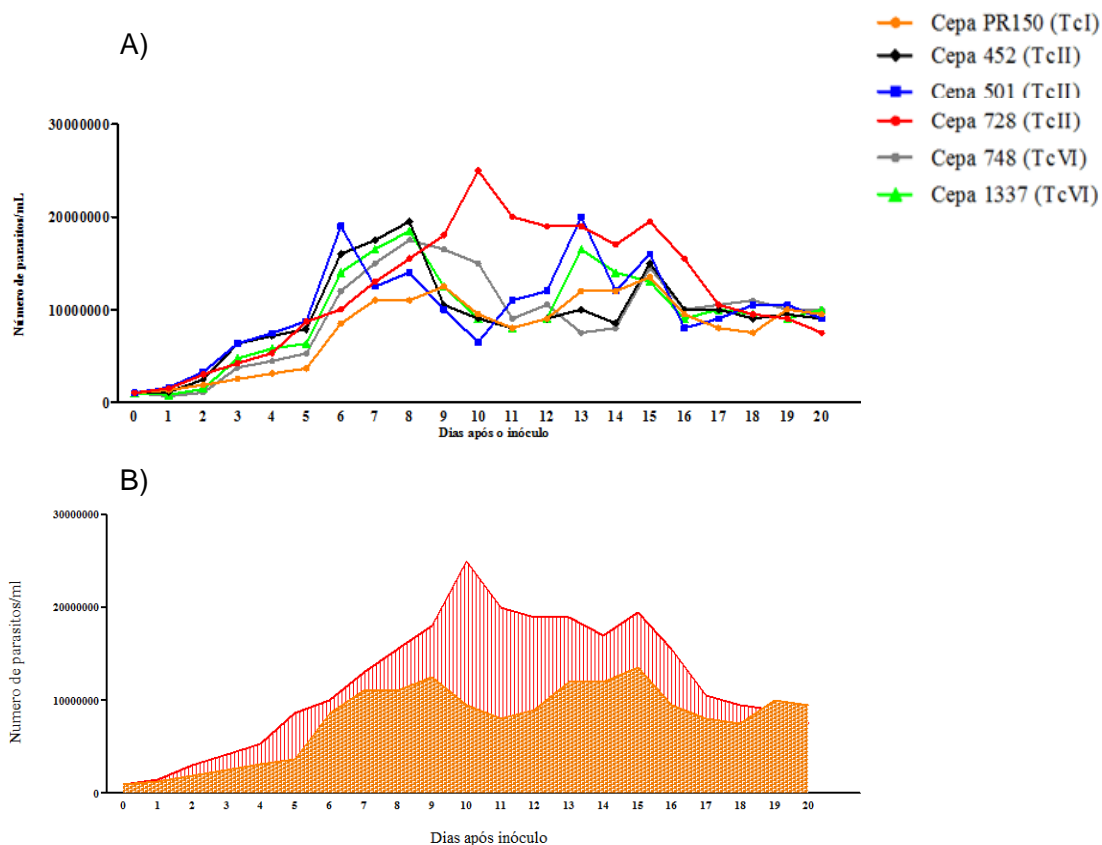
infectados. Índices acima da linha tracejada são considerados tecido inflamado. **B)** Fotomicrografias representativas da avaliação do processo inflamatório da amostra 501 (TcII): aspecto histológico anormal em animais infectados não tratados, com presença de grande quantidade de infiltrado inflamatório no grupo não tratado, tanto na fase aguda, como na fase crônica da infecção. Normalidade histológica em animais infectados e tratados na fase aguda da infecção. **C)** Fotomicrografias representativas do processo de deposição de colágeno para avaliação de fibrose no tecido cardíaco de animais infectados com a cepa 501 (TcII), (Tricrômico Masson, Bar = 50 mm).

### **5.6 Avaliação da curva de crescimento em meio de cultura acelular**

Os perfis de crescimento dos seis isolados em meio de cultura acelular (LIT) estão apresentados comparando amostras de cada genótipo de *T. cruzi* entre si (**Figura 9A**).

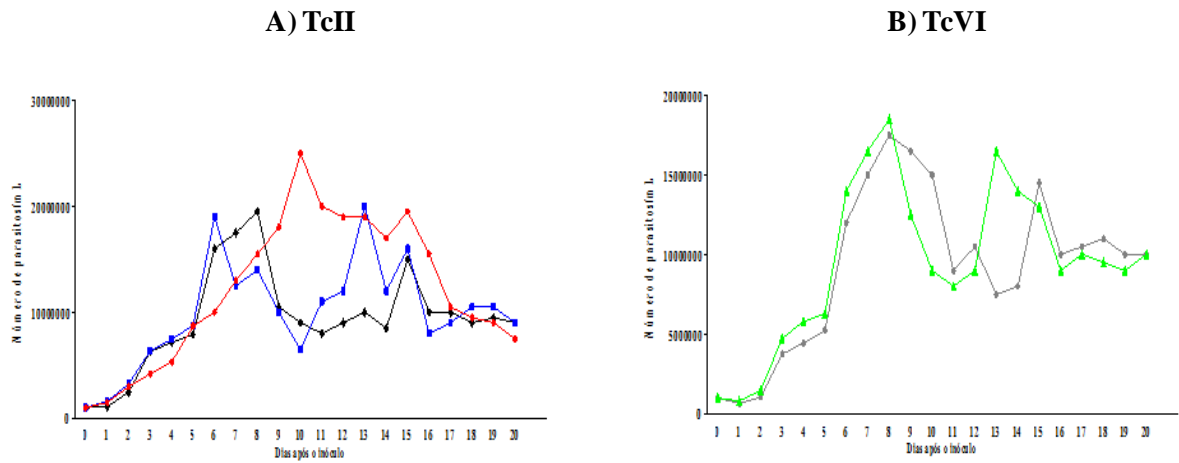
Foi observada redução significativa na mediana da área sob a curva (*Area Under the Curve* AUC) apenas entre os isolados PR150 (TcI) e 728 (TcII). Os Isolados, PR150 (TcI) e 728 (TcII) apresentaram a menor e a maior AUC, respectivamente, e diferença significativa no crescimento em cultura acelular. (**Figura 9B**).





**Figura 9:** A) Curva de crescimento em meio acelular dos seis isolados de *Trypanosoma cruzi* pertencente a genótipos distintos, TcI, TcII e TcVI. B) Comparação entre as áreas sob a curva (AUC) dos dois isolados, 728 (TcII) e PR150 (TcI), que apresentaram a maior e a menor área sob a curva respectivamente.

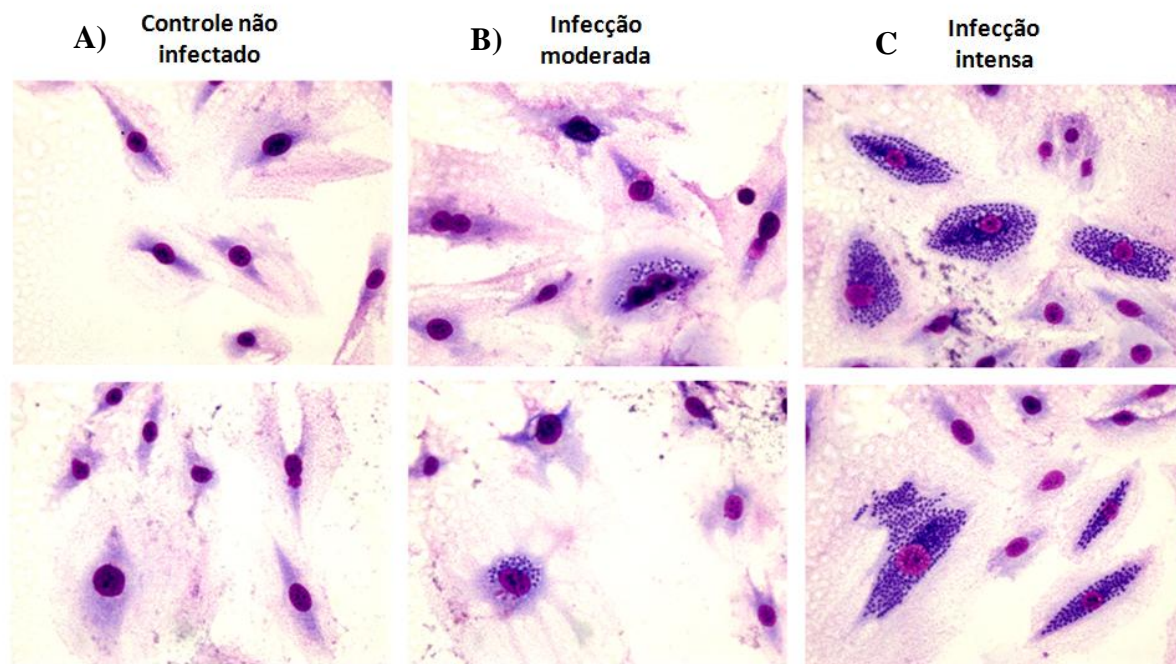
Na comparação da média de resultados das duas amostras do genótipo TcVI (1337 e 748) com as três amostras pertencente ao genótipo TcII (501, 452 e 728), foi possível observar que a amostra que apresentou a maior capacidade de crescimento em meio LIT foi a 728 (TcII). Amostras de um mesmo genótipo mantiveram crescimento em meio LIT com perfis muito semelhante ao longo dos vinte dias de avaliação (**Figura 10**).



**Figura 10:** Comportamento diferencial de crescimento médio em cultura acelular em meio LIT ds genótipos TcII (A) e TcVI (B) do *Trypanosoma cruzi*.

### 5.7 Avaliação dos perfis de infectividade e desenvolvimento *in vitro*

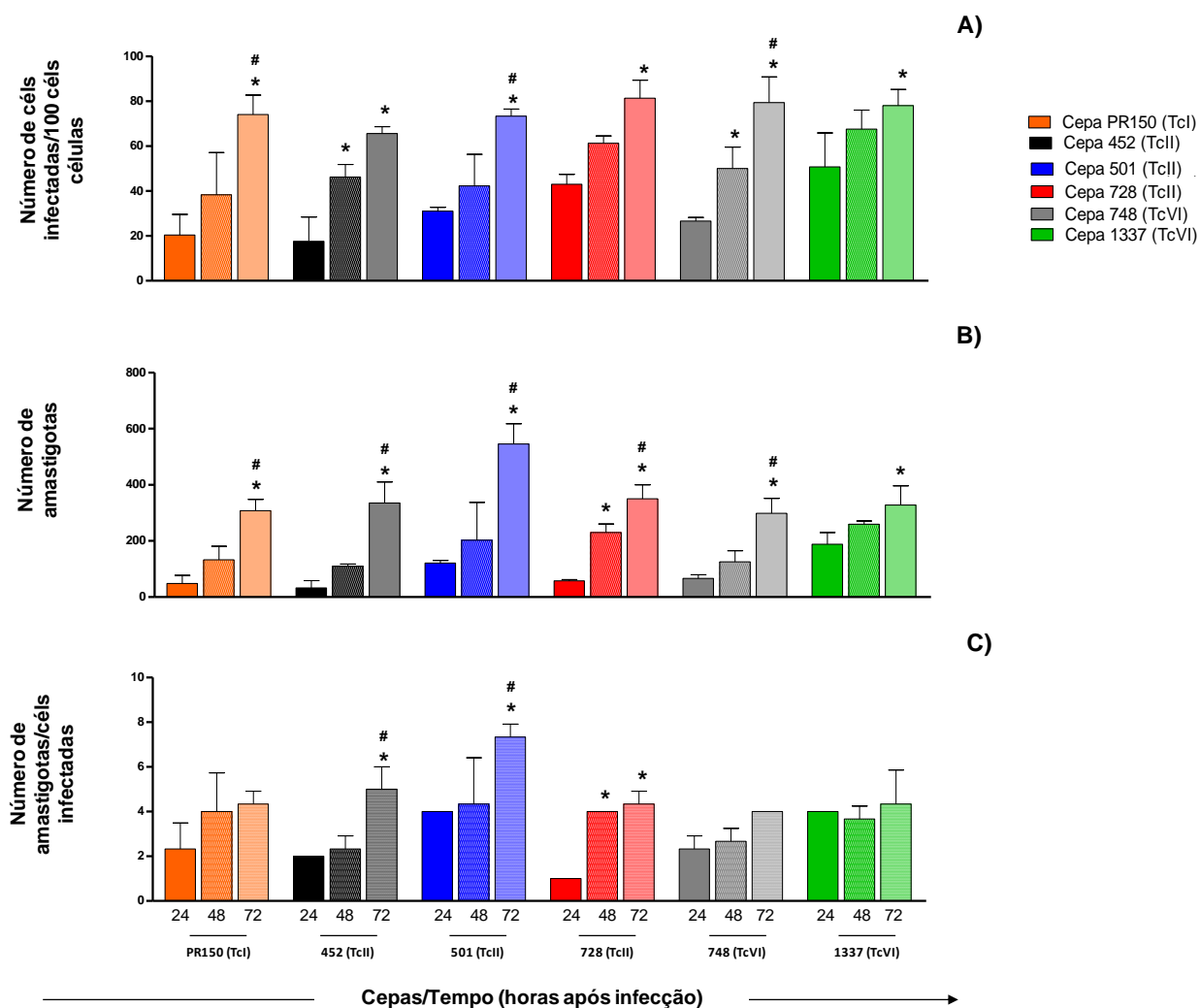
O comportamento biológico dos seis isolados de *T. cruzi* em meio celular, quando submetidos à avaliação dos perfis de infectividade e multiplicação em cultura em células “Vero” após 24, 48 e 72 horas de incubação está mostrado na (**Figura 11**).



**Figura 11:** Perfil representativo da infecção em células “Vero” de amostras de *Trypanosoma cruzi* isoladas de pacientes chagásicos crônicos pertencentes a três genótipos distintos (TcI, TcII e TcVI). A) Controle não infectado correspondente às células sem infecção pelo *T. cruzi*. B) Infecção moderada após 48h de infecção pela cepa 1337 (TcVI) apresentando poucas células infectadas e com números reduzidos de amastigotas intracelulares. C) Infecção intensa, correspondente ao período de 72 h após infecção pela cepa 501 (TcII) demonstrando grande número de células infectadas por campo e grande número de amastigotas intracelulares.

A **Figura 12** representa as taxas de infecção e desenvolvimento das amostras de *T. cruzi* em células Vero ao longo das 72 horas avaliadas. Foi avaliadas em todas as amostras a capacidade de infectar estas células após 24 horas de incubação. De forma geral, as taxas de infectividade duplicaram a partir de 48 horas após o inóculo, correspondendo ao período de multiplicação do parasito no interior da célula hospedeira. Já o isolado 1337 (TcVI) apresentou perfis de infectividade e desenvolvimento intracelular três vezes mais elevado do que os demais genótipos, no tempo de 24 horas, mantendo-se estável nos demais tempos avaliados (**Figura 12**). Entre 48 e 72 horas após a incubação, as taxas de infectividade e multiplicação das amostras de *T. cruzi* permaneceram estáveis, com exceção do aumento na taxa de multiplicação intracelular observado na amostra 501 (TcII). Todos os outros isolados

apresentaram perfil ascendente em relação ao número de células infectadas, variando as taxas de multiplicação das amostras ao longo do tempo, significativamente ou não (Figura 12).

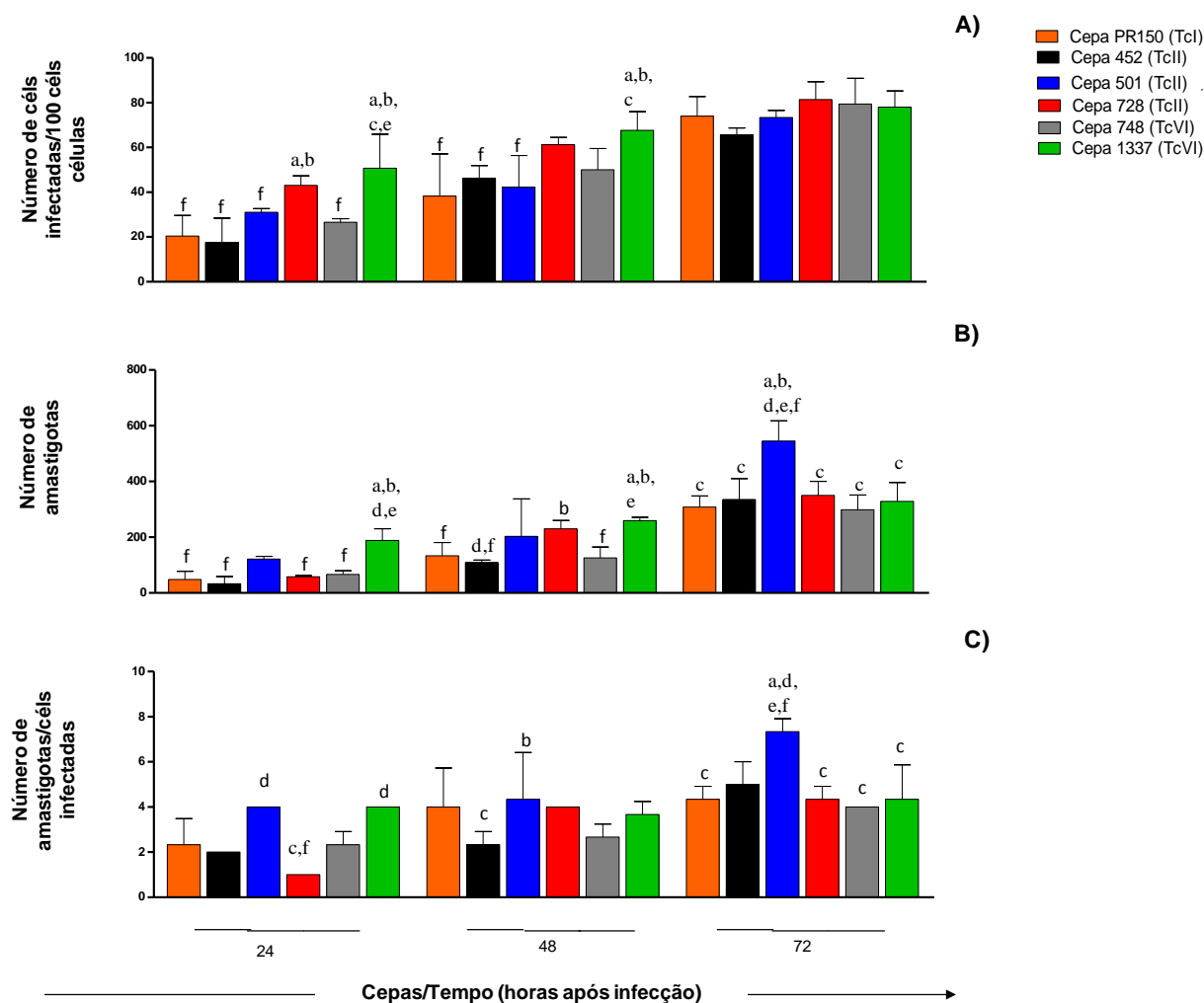


**Figura 12:** Perfil comparativo de infecção em células “Vero” de amostra de *Trypanosoma cruzi* pertencentes a três genótipos distintos nos diferentes tempos de infecção. A) Número de células infectadas em cada 100 células contadas. B) Número de formas amastigotas por célula. C) A razão entre o número de amastigotas em relação ao número total de células infectadas. Os símbolos (\* e #) representam os pares que apresentaram diferença estatística significativa entre si ( $p < 0,05$ ).

A **Figura 13** representa as taxas de infecção e desenvolvimento *in vitro* das diferentes amostras avaliadas em relação ao seu genótipo e em cada tempo de avaliação.

As amostras 1337 (TcVI) e 728 (TcII) foram capazes de parasitar mais células em relação as cepas PR150 (TcI), 748 (TcVI), 452 e 501 (TcII), 48 horas após o inóculo. No entanto, o número de amastigotas por célula infectada foi semelhante entre as duas cepas, refletindo, nesse momento, habilidade de infecção semelhante em parasitos dos dois genótipos (TcII e TcVI). Após 72h de incubação, embora não tenha sido observada diferença entre o número de células infectadas, a taxa de multiplicação das formas amastigotas da amostra 501 (TcII) foi superior à observada para o restante dos isolados, apresentando variação significativa entre elas ( $p < 0,05$ ). Esses dados mostram que as cepas 728 (TcII) e 1337 (TcVI) apresentaram infectividade mais precoce. Em contrapartida, a maior capacidade replicativa *in vitro* de todas as cepas avaliadas foi apresentada pela amostra 501 (TcII), pois esta apresentou o maior número de amastigotas por células após 72h de infecção (**Figura 13**).

Os isolados 501 (TcII) e 1337 (TcVI) apresentaram maior taxa de infectividade do que as outras amostras no tempo de 24h, mantendo-se estável ao longo das 72 horas avaliadas. O número de amastigotas total apresentado pela amostra 501 (TcII) foi maior em comparação à amostra 1337 (TcVI), nos tempos de 24 e 48h. O maior número de células infectadas observado na amostra 501 mostra ser esta de rápida infectividade, pois 72h após o inóculo o número de amastigotas por célula infectada deste isolado foi muito superior a todas as outras amostras (**Figura 13**).



**Figura 13:** Perfil comparativo de infecção em células “Vero” de amostras de *Trypanosoma cruzi* pertencentes a genótipos distintos em um mesmo intervalo de tempo. A) Número de células infectadas em 100 células contadas. B) Número de formas amastigotas por célula. C) Razão entre o número de amastigotas e número total de células infectadas. As letras indicam os pares que apresentaram diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ).

Os demais isolados não apresentaram alteração significativa no perfil de infectividade em comparação a cepa 501 (TcII), e ainda, mantiveram o número de amastigotas por célula inferior à esta amostra em todos os tempos avaliados, sendo todas as amostras consideradas isolados com baixas taxas de replicação (**Figura 13**). Uma exceção, entretanto, é o aumento na taxa de desenvolvimento intracelular dos isolados 1337 (TcVI) e PR150 (TcI) observado 48 horas após o inóculo, em comparação a amostra 501 (TcII).

## 5.8 Expressão diferencial de proteínas das formas epimastigota

Neste trabalho foi realizada inicialmente a análise da expressão diferencial da fração solúvel de proteínas das formas epimastigotas de duas amostras do *T. cruzi*, Pr 150 pertencente ao genótipo TcI, e 452 pertencente a DTU TcII, ambas isoladas de pacientes chagásicos crônicos apresentando forma clínica cardíaca e procedentes de dois municípios de áreas endêmicas distintas, ambos do estado de Minas Gerais.

Para tal avaliação os extratos proteicos retirados de três *pellets* distintos de cada cepa, foram submetidos à isoeletrofocalização e posterior eletroforese em gel de 13 cm, pH 3 a 10, para separação dos *spots* de acordo com a massa molecular de cada um (**Figura 14**).

Após a corrida, os seis géis (três de cada cepa) foram analisados pelo programa Samespots. Vale ressaltar, que já na observação visual dos géis é possível observar claramente diferenças de composição proteica entre as duas amostras avaliadas (**Figura 14**).

Nessa primeira etapa do trabalho identificamos mais de 200 *spots* com *fold* ou diferença de expressão, acima de 1,5 em cada dupla de gel sobreposto, totalizando mais de 500 *spots* identificados nas três duplas analisadas. Em uma avaliação mais rigorosa, com os *spots* identificados nos três géis, foi possível identificar nas três triplicatas de cada gel 48 *spots* comuns, todos com *fold* acima de 1,5, como demonstrado na **Figura 15**.

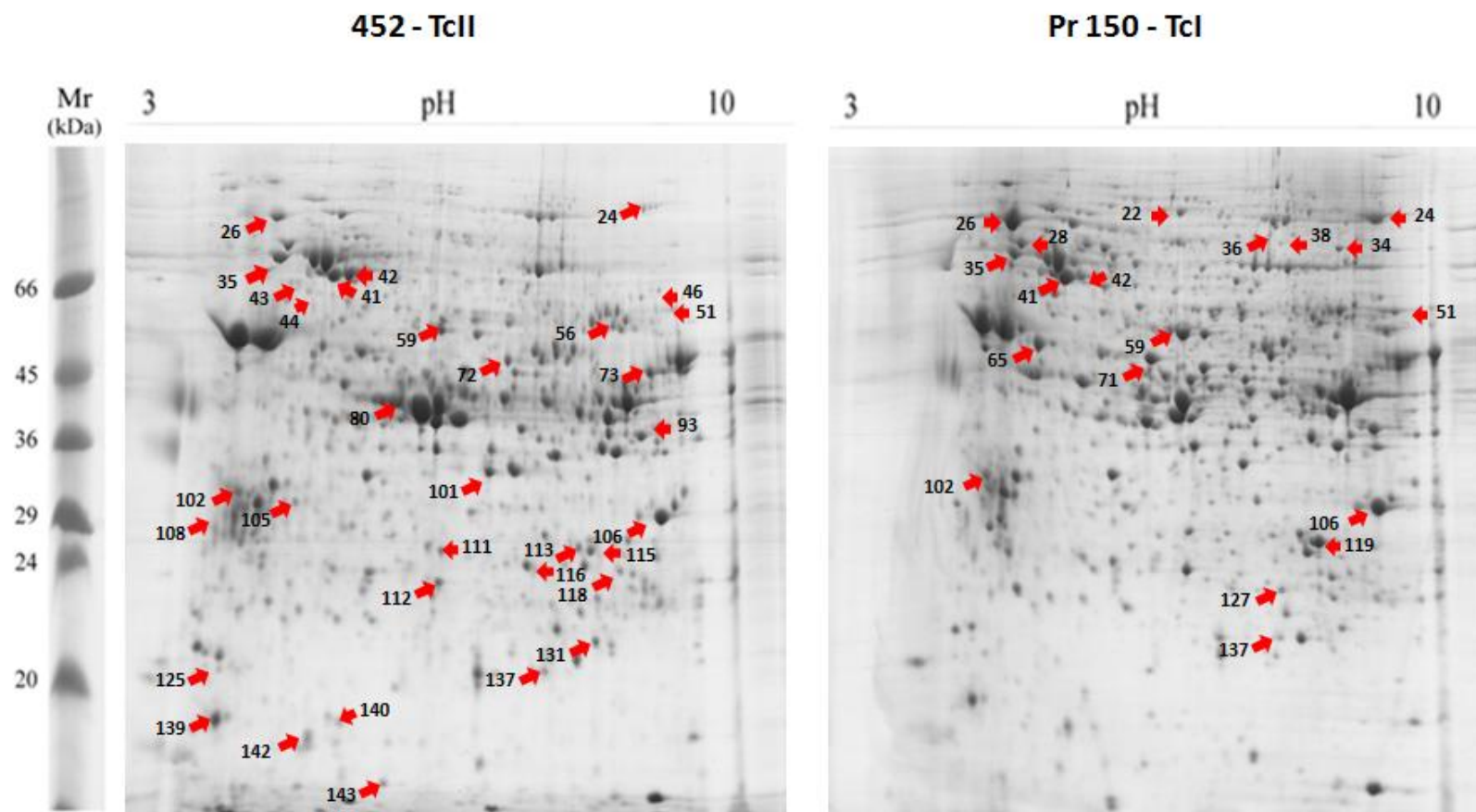
Dos 48 *spots* retirados, 18 eram exclusivos do extrato proveniente da amostra representante do genótipo TcI, Pr 150, e 19 exclusivos do extrato proteico do isolado 452 (TcII). Onze *spots* foram comuns entre as duas amostras de *T. cruzi* nas três triplicatas distintas.

Após o término dessa análise, os *spots* foram excisados nas triplicadas, digeridos com tripsina e submetidos a identificação das proteínas na plataforma **Q-Exactive LC-MS / MS - Thermo Scientific**. Para as buscas de identidade utilizou-se o banco de sequências proteicas para o *T. cruzi* do **UNIPROT**, com 53.369 seqüências descritas e 25.989.068 resíduos.

Foram identificadas cinco proteínas relacionadas com o processo de transcrição e tradução, sete relacionadas com a resposta ao estresse, duas com o processo de sinalização celular, uma com o modelamento de proteínas, quatro com síntese e degradação proteica, duas com o processo de metabolismo de carboidratos, duas com

metabolismo de nucleotídeos, sete com metabolismo de aminoácidos, quatro com metabolismo de lipídeos e três proteínas relacionadas com a função estrutural, como demonstrado na **Tabela 4**.





**Figura 14** Perfil bidimensional comparativo das amostras de *Trypanosoma cruzi* pertencentes a dois genótipos distintos, 452 (TcII) e PR150 (TcI). Géis corados com Coomassie G-250. Algumas proteínas diferencialmente expressas estão identificadas por setas vermelhas nos dois géis.

**Tabela 4:** Proteínas identificadas nos géis referentes às amostras de *T. cruzi* PR150 (TcI) e 452 (TcII) que apresentaram alteração de expressão  $\geq 1,5$  vezes.

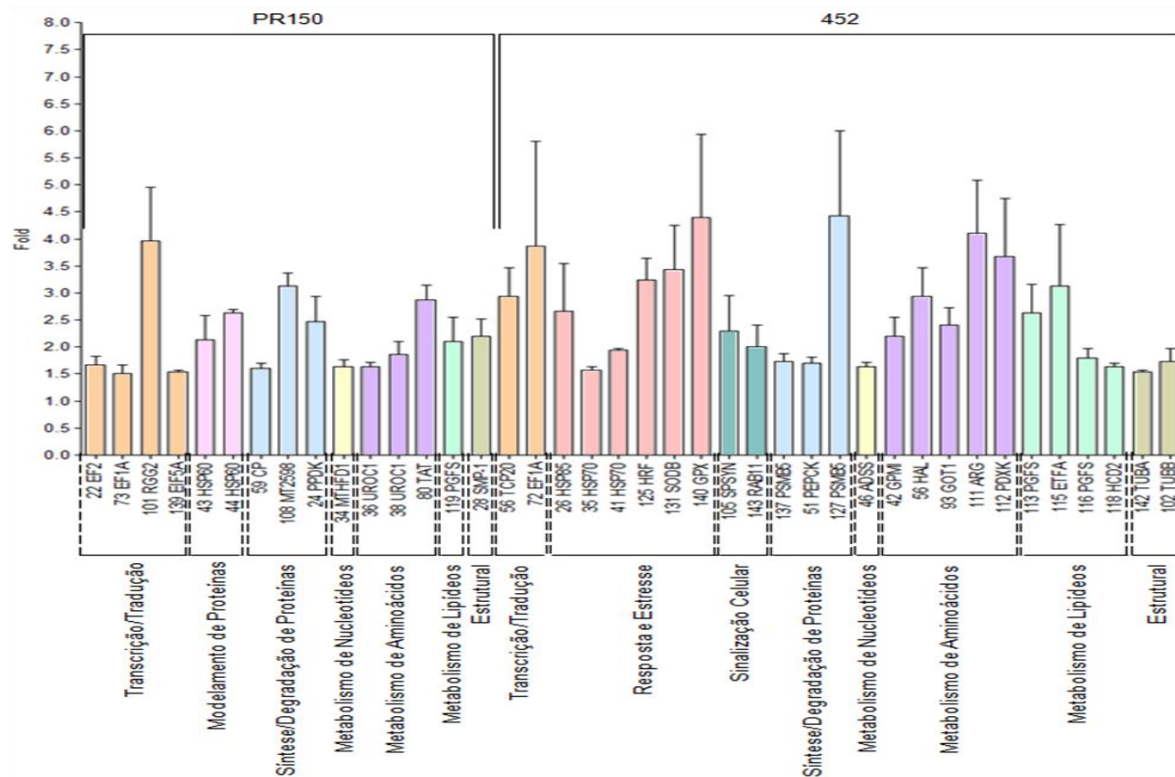
N° Spot/Cepa	Gene	Proteína Identificada	Acesso	Peptídeos Únicos	% Cobertura	pI	Massa Molecular Esperada (kDa)	Massa Molecular Observada (kDa)
<b>Transcrição/Tradução</b>								
22-PR150	EF2	Elongation factor 2	K4DM24	21	30,02	6,04	94,1	66,33
56-452	TCP20	Chaperonin TCP20	Tc00.1047053509583.10	24	43,46	7,69	59	51,52
72-452	EF1A	Elongation factor 1-alpha (EF-1-alpha)	Tc00.1047053510119.20	1	51,89	8,76	49,1	43,99
73-PR150	EF1A	Elongation factor 1-alpha (EF-1-alpha)	Tc00.1047053510119.20	1	55,9	8,76	49,1	43,52
101- PR150	RGG2	RNA-binding protein RGGm	Tc00.1047053509105.90	7	23,26	8,76	33,4	34,89
139- PR150	EIF5A	Eukaryotic initiation factor 5a	Tc00.1047053506925.120	11	63,47	5	18	22,86
<b>Resposta a estresse</b>								
26-452	HSP85	Heat shock protein 85	Tc00.1047053507713.30	51	49,43	5,15	80,7	65,09
26- PR150	HSP85	Heat shock protein 85	P06660	35	46,16	5,15	80,7	65,28
35-452	HSP70	Heat shock protein 70 (HSP70)	Tc00.1047053511211.170	6	49,93	5,57	73,3	56,29
35- PR150	HSP70	Heat shock protein 70 (HSP70)	Tc00.1047053511211.170	7	38,85	5,57	73,3	55,14
41-452	HSP70	Heat shock 70 kDa protein	Tc00.1047053507029.30	13	50,23	5,97	70,9	58,63
41- PR150	HSP70	Heat shock 70 kDa protein	Tc00.1047053507029.30	30	56,79	5,97	70,9	58,10
71- PR150	TDR1	Thiol-dependent reductase 1	Tc00.1047053509105.70	3	31,69	5,97	50,7	44,43
125-452	HRF	IgE-dependent histamine-releasing factor	Tc00.1047053506207.50	4	16,47	4,64	19,6	28,05
131-452	SODB	Iron superoxide dismutase	Tc00.1047053509775.40	2	63,95	8,6	26,1	26,57
140-452	GPX	Glutathione peroxidase-like protein	Tc00.1047053503899.130	7	38,76	6	19,6	23,19
<b>Sinalização Celular</b>								
105-452	SPSYN	Spermidine synthase	Tc00.1047053503855.20	1	37,84	5,41	33,1	34,01
143-452	RAB11	Small GTP-binding protein Rab11	Tc00.1047053506151.30	10	53,46	8,13	23,8	20,58
<b>Modelamento de Proteínas</b>								
43- PR150	HSP60	Chaperonin HSP60	Tc00.1047053507641.290	47	69,95	5,5	59,1	52,49
44- PR150	HSP60	Chaperonin HSP60	Tc00.1047053507641.290	38	78	5,5	59,1	51,87
<b>Síntese/Degradação Proteínas</b>								
59- PR150	CP	Carboxypeptidase	Tc00.1047053504153.160	21	43,74	6,3	57,6	47,36
108- PR150	MT2598	Peptidase M20/M25/M40	Tc00.1047053509213.120	7	16,46	5,58	51,2	34,57
127-452	PSMB2	Proteasome beta 2 subunit	Tc00.1047053508461.430	10	26,82	8,95	33,2	28,05
137-452	PSMB5	Proteasome beta 5 subunit	Tc00.1047053503781.70	6	17,36	5,9	34,9	25,39
137- PR150	PSMB5	Proteasome beta 5 subunit	Tc00.1047053503781.70	9	27,01	5,9	34,9	24,73

<b>Metabolismo de Carbohidratos</b>									
24- PR150	PPDK	Pyruvate phosphate dikinase	Q9GN79	14	44,58	8,4	100,7	65,28	
51-452	PEPCK	Glycosomal phosphoenolpyruvate carboxykinase	Tc00.1047053507547.90	20	42,86	8,37	58,8	50,30	
51- PR150	PEPCK	Glycosomal phosphoenolpyruvate carboxykinase	Tc00.1047053508441.20	35	60,76	8,48	58,5	50,08	
<b>Metabolismo de Nucleotídeos</b>									
34- PR150	MTHFD1	Tetrahydrofolate synthase	Tc00.1047053511517.60	2	14,95	7,2	70,4	56,58	
46-452	ADSS	Adenylosuccinate synthetase	Tc00.1047053508731.60	4	50,81	8,21	68,4	53,45	
<b>Metabolismo de Aminoácidos</b>									
36- PR150	UROC1	Urocanate hydratase	Tc00.1047053504045.110	12	17,19	6,77	74,7	55,85	
38- PR150	UROC1	Urocanate hydratase	Tc00.1047053504045.110	31	38,37	6,77	74,7	55,85	
42-452	GPMT	2,3-Bisphosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase	Tc00.1047053506247.330	22	56,14	5,92	60,3	53,45	
42- PR150	GPMT	2,3-Bisphosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase	Tc00.1047053506247.330	28	62,27	5,92	62,27	53,13	
56-452	HAL	Histidine ammonia-lyase	Tc00.1047053506247.220	24	39,89	7,91	58	51,52	
80- PR150	TAT	Tyrosine aminotransferase	Tc00.1047053510187.30	24	49,52	6,21	46,1	40,58	
93-452	GOT1	Aspartate aminotransferase	Tc00.1047053510945.70	20	47,85	8,32	46	38,91	
111-452	ARG	Arginase	Tc00.1047053507031.90	13	56,82	6,18	33,5	32,16	
112-452	PDXK	Pyridoxal kinase	Tc00.1047053509059.50	5	41	6,38	33,3	29,35	
<b>Metabolismo de Lipídeos</b>									
113-452	PGFS	Prostaglandin F synthase	Tc00.1047053511287.49	14	57,09	7,84	32,5	31,87	
115-452	ETFA	Electron-transfer-flavoprotein, alpha polypeptide	Tc00.1047053503559.109	19	69,78	8,54	33,5	31,87	
116-452	PGFS	Prostaglandin F synthase	Tc00.1047053511287.49	14	51,77	7,84	32,5	32,16	
118-452	HCD2	Short chain 3-hydroxyacyl-coa dehydrogenase	Tc00.1047053509717.90	2	57,19	8,79	35,5	31,58	
119- PR150	PGFS	Prostaglandin F synthase	Tc00.1047053511287.49	18	54,96	7,84	32,5	31,88	
<b>Estrutural</b>									
28- PR150	SMP-1	Calpain-like cysteine peptidase	Tc00.1047053506563.210	1	13,73	4,97	78,2	63,29	
102-452	TUBB	Beta tubulin	Tc00.1047053506563.40	18	43,44	4,81	49,47	34,99	
102- PR150	TUBB	Beta tubulin	Tc00.1047053506563.40	6	12,44	4,81	49,47	35,21	
142-452	TUBA	Alpha tubulin	Tc00.1047053411235.9	9	18,4	5,06	49,8	21,68	

Os níveis de alteração na expressão para cada proteína descrita nas Tabelas anteriores podem ser observados na **Figura 15**. As moléculas identificadas foram categorizadas de acordo com sua função biológica em proteínas envolvidas na resposta a transcrição e tradução, resposta ao estresse, processo de sinalização celular, modelamento de proteínas, síntese e degradação proteica, metabolismo de carboidratos, metabolismo de nucleotídeos, metabolismo de aminoácidos, metabolismo de lipídeos e proteínas relacionadas com a função estrutural.

A amostra representante do genótipo TcII, 452, demonstrou maior expressão de proteínas relacionadas com a resposta ao estresse (**Figura 15**). Muitas das proteínas desse grupo estão relacionadas com a proteção no processo de replicação, transcrição e tradução, e podem gerar certa resistência à cepa em relação ao processo de degradação proteica. Outras proteínas expressas nesta mesma amostra e importantes em relação à proteção contra o estresse oxidativo são a Glutathione peroxidase-like protein, Iron superoxide dismutase e Thiol-dependent reductase 1. As demais proteínas estão relacionadas com o metabolismo basal do *T. cruzi*.

Em relação a amostra PR150 (TcI), em geral, houve maior expressão de proteínas relacionadas com o metabolismo basal do parasito e função estrutural (**Figura 15**). Foram encontrados para essa amostra, poucos grupos proteicos relacionados com a resposta ao estresse.



**Figura 15:** Diferença nos níveis de expressão das proteínas identificadas nas duas amostras de *Trypanosoma cruzi*, Pr 150 – TcI e 452 – TcII. Os resultados representam a média ± erro padrão do aumento ou diminuição de expressão nas triplicatas de géis para cada genótipo. As chaves acima no gráfico indicam quais proteínas pertencem a cada amostra, e o número na frente do nome de cada gene corresponde ao número do spot identificado (exemplo da primeira coluna no gráfico: 22 EF2, 22 corresponde ao número do spot identificado na cepa PR 150 (TcI), e EF2 ao gene que codifica a proteína Elongation Factor 2, conforme descrito na Tabela 4).

## 6.0 DISCUSSÃO:

A espécie *T. cruzi* é dividida em seis linhagens genéticas distintas, mais conhecidas como DTUs identificadas como TcI, TcII, TcIII, TcIV, TcV e TcVI (Zingales *et al.*, 2009). Sabendo-se então que esta espécie é predominantemente clonal (Tibayrenc *et al.*, 1986; Tibayrenc & Brenière, 1988) e que nela a ocorrência de fenômenos de hibridização são raros (Westenberg *et al.*, 2005), a hipótese subjacente ao modelo clonal é a existência de correlação entre a sua genética com suas propriedades biológicas já foi comprovada em relação ao seu desenvolvimento em cultivo celular e acelular (Laurent *et al.*, 1997; Revollo *et al.*, 1998), na evolução da infecção em hospedeiro vertebrado (Lana *et al.*, 1998; Toledo *et al.*, 2002) e invertebrado (Lana *et al.*, 1998) e susceptibilidade às drogas (Andrade *et al.*, 1992; Murta *et al.*, 1998; Toledo *et al.*, 2003, 2004), inclusive em infecções mistas em vertebrados (Lana *et al.*, 2000; Martins *et al.*, 2007) e hospedeiros invertebrados (Pinto *et al.*, 1998).

Presume-se assim que parasitos mais próximos ou geneticamente semelhantes apresentariam propriedades biológicas mais parecidas, ao passo que parasitos menos semelhantes ou geneticamente distintos apresentariam propriedades mais diversas (Tibayrenc and Brenière, 1988), dentre elas a resposta ao tratamento etiológico, infectividade e virulência, conforme demonstrado experimentalmente por vários autores (Lana *et al.*, 1998; Toledo *et al.*, 2002, 2003). Porém, há controvérsias entre autores na determinação destas correlações (Buscaglia *et al.*, 2006) o que estimula a continuidade de estudos neste sentido.

Vários estudos que exploram essa hipótese têm sido cruciais para o conhecimento da correlação entre a genética e as propriedades biológicas do *T. cruzi*, extendendo-se à epidemiologia da doença, morbidade, curso clínico e resposta ao tratamento específico em modelo experimental (Luquetti *et al.*, 1986; Andrade *et al.*, 1992; Coura e Castro, 2002).

Andrade, (1974) e Andrade & Magalhaes, (1997), demonstraram pioneiramente que o comportamento biológico e a relação parasito-hospedeiro pode ser essencial na determinação das manifestações clínicas e patológicas da Doença de Chagas. Esses mesmos autores, demonstraram que diferentes populações de *T. cruzi* provenientes de distintas localidades, podiam ser agrupadas em três tipos de Biodemas (I, II e III), cada um apresentando características bem distintas em relação aos parâmetros

morfobiológicos e histopatológicos em camundongos Swiss. O Biodema I com as cepas representantes (Y e Peruviana), apresentando alta virulência, picos de parasitemia altos, predominância de formas sanguíneas finas e reticulotrópica ou macrofagotrópica. Já o Biodema II (cepas representativas isoladas do Recôncavo Baiano, Ba) com multiplicação lenta, picos de parasitemia irregulares e tardios, predominância de formas sanguíneas largas ao longo da infecção, com baixa porcentagem de formas finas no início da infecção e miotropismo; e o Biodema III (cepa Colombiana como representante) que apresenta multiplicação lenta, altos picos de parasitemia e predominância de formas largas ao longo da infecção, com tropismo para musculatura esquelética.

Nosso trabalho se propôs a estudar amostras de *T. cruzi* de três grupos genéticos ou DTUs distintas (TcI, TcII e TcVI), isoladas de pacientes chagásicos crônicos do Vale do Jequitinhonha, que apresentam formas clínicas distintas da doença de Chagas, tanto em relação aos parâmetros biológicos *in vivo* e *in vitro*, inclusive a resposta ao tratamento com o Nifurtimox em modelo murino, na fase aguda e crônica da infecção.

## 6. 1 Caracterização biológica de *T. cruzi* e resultados aqui obtidos

Estudo prévio de caracterização genética das amostras aqui estudadas comprovou que três delas pertencem à DTU TcII, enquanto duas amostras são pertencentes à linhagem TcVI (Oliveira *et al.*, 2015), e apenas uma à DTU TcI (Abolis *et al.*, 2011). Todas estas DTUs são muito associadas a infecções humanas e às manifestações clínicas comuns da doença de Chagas no Brasil Central (TcII) e Norte e diversos países do Norte da América Latina (TcI), além de países do Cone Sul (TcII e TcVI) (Zingales *et al.*, 2012).

Das seis amostras de *T. cruzi* avaliadas nesse trabalho, apenas quatro delas apresentaram parasitemia patente suficiente para viabilizar os diversos grupos experimentais em camundongos. As amostras PR150 (TcI) e 748 (TcVI) não demonstraram infectividade em camundongos Swiss, porém com parasitemia muito baixa ou subpatente.

Todas as outras quatro amostras de *T. cruzi* (452, 501 e 728 – TcII e 1337 – TcVI) apresentaram 100% de infectividade em camundongos Swiss, avaliados pelo exame de sangue a fresco (ESF) ao longo de todo período patente da infecção. Dessa forma, foi possível demonstrar as características biológicas das amostras e a evolução

da infecção em camundongos Swiss, incluindo os diversos parâmetros biológicos da curva de parasitemia como, período pré-patente (PPP), período patente (PP), dia do pico máximo de parasitemia (DPMP), pico máximo de parasitemia (PMP), morfologia dos parasitos no sangue periférico, taxa de mortalidade e resistência ou susceptibilidade ao tratamento com o nifurtimox.

Trabalhos semelhantes têm sido realizados em humanos por nossa equipe de estudo na Região do Vale do Jequitinhonha. Silva JC *et al.*, (2013), avaliando os parâmetros biológicos principais de 8 amostras de *T. cruzi* (TcII) isoladas de crianças com infecção chagásica na mesma região, demonstraram predominância de isolados com baixa virulência, alta infectividade e baixos índices de parasitemia no sangue periférico em modelo murino. Esses dados corroboram os resultados encontrados neste trabalho com amostras aqui estudadas apresentando perfil genético idêntico. Nesse estudo, não foram identificadas isolados que apresentassem picos de parasitemia elevados, e a maioria apresentou baixa virulência e durante o período patente da infecção predomínio de formas intermediárias a largas.

Anteriormente, diversos autores já haviam demonstrado com estudos prévios que amostras de *T. cruzi*, isoladas de casos humanos da Doença de Chagas em diferentes áreas endêmicas, geralmente apresentam virulência baixa a média, além de amostras com parasitemia subpatente como apresentado por duas amostras neste estudo (PR150 TcI e 748 TcVI). Existem raras exceções na literatura como no caso da cepa VL-10, também isoladas de um caso humano de Virgem da Lapa, MG, considerada altamente virulenta e inflamatória, causando intensas lesões cardíacas em modelo murino e em cães (Andrade, 1974, Carneiro *et al.*, 1991; Oliveira *et al.*, 1997; Devera *et al.*, 2002, Caldas *et al.*, 2013). Outros exemplos são a cepa Y (Silva & Nussenzweig, 1953) e Be-62 que, no entanto, também apresentava baixa virulência quando recém isolada e nas suas primeiras 20 passagens sucessivas em modelo murino (Lana et al. 1986).

Teston *et al.*, (2013), avaliando os parâmetros biológicos do isolado PR150 (TcI), incluído em nosso trabalho, em camundongos Swiss, já haviam observados que essa amostra de *T. cruzi* apresentava índices extremamente baixos de parasitos no sangue periférico, com parasitemia subpatente na maioria dos animais. Incluímos esta amostra em nosso estudo por entendermos a grande importância de avaliar isolados de *T. cruzi* proveniente de paciente chagásico do genótipo TcI, tão presente em humanos



em vasta área da América latina, e principalmente na tentativa de correlacionar os dados biológicos das amostras de *T. cruzi* com a expressão diferencial de proteínas.

Corroborando ainda nossos achados, Devera *et al.*, (2002), estudando o comportamento morfobiológicos de nove amostras de *T. cruzi* isoladas de casos humanos da doença de Chagas de três áreas endêmicas de Minas Gerais (Pains, Iguatama e algumas delas isolada de pacientes de Berilo, município onde está sendo realizando o presente estudo, tais autores também observaram o predomínio de biotemas II e III na avaliação em modelo murino. Ainda foi verificada associação entre alta parasitemia com as cepas isoladas de pacientes apresentando a forma cardíaca da doença de Chagas, e baixa parasitemia nas amostras isoladas de pacientes apresentando forma indeterminada da doença. Tais comparações não puderam ser realizadas no presente trabalho, já que todos os isolados avaliados apresentaram baixa parasitemia durante todo período patente da infecção.

Na análise dos aspectos morfobiológicos com a genética dos parasitos, Toledo *et al.*, (2002), avaliando clones de diferentes genótipos (19, 20, 39 e 32 de Tibayrenc & Ayala 1988), equivalentes a TcI, TcII e híbridos, concluíram que os isolados pertencentes as DTU's II e híbridos, foram menos virulentas em camundongos, corroborando os resultados desse trabalho.

Por sua vez, Andrade *et al.*, (2010), estudando o comportamento biológico em modelo murino e a genotipagem das amostras de *T. cruzi* isoladas dos pacientes envolvidos no acidente com a transmissão oral da doença de Chagas em Santa Catarina, Brasil, puderam confirmar que todos os isolados pertencentes a DTU TcII, pertenciam ao Biotema II, baixas parasitemia, virulência, taxa de mortalidade, patogenicidade e lesões histopatológicas com tropismo tecidual apresentado por cada isolado.

Os resultados obtidos demonstraram que amostras de uma mesma linhagem são homogêneas em relação ao comportamento biológico (infectividade, PPP, PP, curva de parasitemia), morfologia dos tripomastigotas sanguíneos e mortalidade em camundongos.

No tocante aos parâmetros biológicos (PPP, PP, PMP, DPMP) de genótipos distintos, todos os isolados apresentaram diferenças significativas entre os dois genótipos (TcII e TcVI). Os isolados caracterizados como pertencentes ao genótipo TcII apresentaram resultados semelhantes, conforme encontrado por Oliveira-Silva *et al.*, (2015), que avaliaram amostras de *T. cruzi* isoladas de crianças da mesma região também caracterizadas geneticamente como pertencentes ao genótipo TcII. Em relação

à amostra 1337 (TcVI), todos os parâmetros demonstraram diferenças significativas em relação a TcII, conforme observado por Andrade *et al.*; (2009), que avaliaram amostras de parasito genotipados como TcVI, isolados dos pacientes que ingeriram caldo de cana contaminado com as formas tripomastigotas metacíclicas do parasito em Santa Catarina.

Neste trabalho não foi observada mortalidade nos animais infectados, salientando assim a baixa virulência das amostras estudadas. Estes resultados estão de acordo com outros estudos prévios que também demonstraram baixa virulência de cepas isoladas de humanos residentes no centro e no sul do Brasil (Andrade, 1974; Carneiro *et al.*, 1991; Araújo *et al.*, 1999; Oliveira-Silva *et al.*, 2015).

Em relação aos outros parâmetros avaliados, todas as curvas de parasitemia obtidas em camundongos Swiss inoculados com as quatro amostras de *T. cruzi* apresentaram evolução lenta, com dias de pico máximo de parasitemia (DPMP) medianos a tardios, observados entre 11 e 27 dias após a infecção dependendo da cepa avaliada.

As amostras 501 e 728 (TcII), as mais virulentas, foram significativamente distintas das demais em relação ao período pré-patente e dia do pico máximo de parasitemia, ambos mais precoces, além de possuírem os maiores picos de parasitemia quando comparadas com as demais. Por outro lado, a cepa 1337 (TcVI) apresentou um dos maiores PPP (11 dias) e DPMP mediano (16 dias), além de ter apresentado período patente (PP) e pico máximo de parasitemia (PMP) menores em relação às demais. Assim, a demora na confirmação da infecção dos camundongos infectados por esta cepa e o menor e tardio pico de parasitemia observado nestes animais são aspectos indicativos de sua menor virulência em relação às demais cepas (TcII) estudadas.

O estudo da morfologia dos tripomastigotas no sangue periférico foi possível de ser realizado nas quatro amostras estudadas, tendo sido verificado um predomínio de formas largas do parasito na fase aguda. O porcentual destas formas foi crescente ao longo da infecção, aspecto este esperado para cepas de baixa virulência como demonstrado por Andrade (1974). Este dado corrobora outros trabalhos (Carneiro *et al.*, 1991; Devera *et al.*, 2002) nos quais foi observada correlação entre a parasitemia e morfologia dos parasitos.

A cepa 501, que apresentou maior parasitemia, apresentou também maior porcentual de formas intermediárias no início da infecção em relação às demais amostras de *T. cruzi* avaliadas. Além disso, a ascensão da curva de parasitemia nesta amostra coincidiu com a predominância destas formas que são presentes em cepas com

intensa multiplicação parasitária (Pizzi,1953; Andrade, 1974). Entretanto, as formas intermediárias foram finalmente sendo substituídas por formas largas no decorrer da infecção, o que foi verificado também para as demais amostras do parasito.

Já a cepa 1337 (TcVI), demonstrou predomínio de formas delgadas no início do período patente, sendo substituídas pelas formas intermediárias e largas ao longo de toda infecção. Estes resultados corroboram outros estudos de caracterização morfológica de *T. cruzi* que envolvem esta DTU ou tipo biológico ou Biodema da amostra de *T. cruzi* equivalente (Brener, 1965; Andrade 1974; Brener, 1977; Andrade & Magalhães,1997, Devera *et al.*, 2002).

Em relação à avaliação do comportamento dos quatro isolados *in vitro*, foi observado que em relação às amostras de *T. cruzi* em meio acelular (LIT) e celular (células “Vero”), houve diferenças significativas no crescimento e infectividade dos isolados, principalmente relacionadas ao grupo genético de cada amostra. As amostras pertencentes ao genótipo TcII (452, 501 e 728), apresentaram crescimento exponencial em meio LIT e infectividade semelhantes, e significamente diferentes dos isolados da DTU TcVI (748 e 1337). Esses dados corroboram e reforçam a hipótese da correlação entre a genética e a biologia da espécie *T. cruzi* (Andrade *et al.*, 1997).

Utilizando a mesma metodologia e com o mesmo objetivo, Rimoldi *et al.*, (2012) avaliaram amostras de *T. cruzi* isoladas de gatos domésticos e vetores da doença de Chagas com intuito de verificar a diferença genótipo específica frente ao crescimento em meio acelular (LITOs autores puderam confirmar também a hipótese de correlação genética com aspecto biológico da cepa; no caso, a curva de crescimento exponencial em meio LIT, semelhante ao verificado em nossos resultados.

Nogueira-Paiva *et al.*, (2015), utilizando a mesma metodologia de curva de crescimento e infecção realizada neste trabalho e avaliando o perfil de diferenciação ou troca genética entre os isolados da cepa Be-62 e Be-78, submetidos ao isolamento por hemocultura após passagem em camundongos Swiss, observaram diferenças significativas entre os perfis de crescimento dos isolados em meio LIT e em células “Vero”. Os isolados geneticamente próximos apresentaram crescimento em meio acelular e infecção em células semelhantes, e os isolados mais distantes geneticamente, apresentaram crescimento e infectividade significativamente diferentes entre si, ou seja, estes resultados foram semelhantemente ao encontrado nesse estudo e confirmam a hipótese de estudo aqui explorada.

Em relação ao tratamento, quando se avaliou os resultados de animais infectados e tratados na fase aguda (ITFA) da infecção, foi verificada redução significativa da parasitemia, da área sob a curva de parasitemia e do pico máximo de parasitemia, corroborando com resultados obtidos em outros trabalhos de quimioterapia experimental em modelo murino (Toledo *et al.*, 2004; Caldas *et al.*, 2008; Olivieri *et al.*, 2010; Teston *et al.*, 2013).

A definição do padrão de susceptibilidade ou resistência das amostras de *T. cruzi* ao NF foi obtida após a realização de técnicas parasitológicas (Hm, PCR no sangue) e sorológicas (ELISA), seguindo o critério de cura estabelecido no Consenso Brasileiro de 2005, que considera como curado aqueles animais que apresentaram todos os exames citados negativos, além de um critério mais atual (Lana e Martins-Filho, 2015), que considera como curado animais com negatização dos métodos parasitológicos/molecular (Hm, PCR no sangue e qPCR no tecido cardíaco) juntamente com a sorologia não-convencional (CF-AATV).

Analisando detalhadamente os resultados obtidos no ESF, foi observado que esta técnica não foi capaz de detectar fracasso terapêutico em animais infectados tratados na fase aguda da infecção, demonstrando então a sua limitação em detectar parasitos em animais tratados não curados, corroborando com outros trabalhos (Brener, 1962; Toledo *et al.*, 2003; Martins *et al.*, 2008; Teston *et al.*, 2013) por ser de baixa sensibilidade em relação aos demais testes parasitológicos em modelo murino.

Por outro lado, a hemocultura realizada em animais negativos no ESF, foi capaz de detectar parasitos no sangue dos animais tratados na fase aguda, apresentando percentuais variados (0 a 30%) de acordo com o grupo experimental e a DTU da cada amostra. Já na fase crônica, 68,75% (22/32) dos animais tratados apresentaram resultados negativos na hemocultura 90 dias após o tratamento. Diminuição na porcentagem de positividade na hemocultura em animais infectados com alguns genótipos do *T. cruzi* e tratados nas fases aguda e crônica da infecção também foram demonstrados por Toledo *et al.* (2003), que observaram percentuais de cura mais elevados em clones de *T. cruzi* pertencentes à DTU TcII em relação aos grupos híbridos (onde se inclui parasitos TcVI) e principalmente da DTU TcI. Por esta razão, não é recomendado que esta técnica seja utilizada sozinha no controle de cura, já que sua sensibilidade é baixa e dependente do estoque de *T. cruzi* envolvido na infecção (Lana *et al.*, 2000; Toledo *et al.*, 2002; Martins *et al.*, 2007, 2008).

Animais tratados, tanto na fase aguda quanto crônica da infecção e com hemocultura negativa, foram a seguir, avaliados pela PCR no sangue. Esta técnica detectou 40,3% (13/32) de fracasso terapêutico em animais infectados tratados na fase aguda e em 25% (8/32) dos animais tratados na fase crônica. Maior sensibilidade da PCR na detecção de fracasso terapêutico em relação ao ESF e a hemocultura tem sido sistematicamente verificada em camundongos (Martins *et al.*, 2007, 2008; Miyamoto *et al.*, 2008; Caldas *et al.*, 2008), cães (Guedes *et al.*, 2004) e inclusive em humanos (Machado-de Assis *et al.* 2012).

A sorologia convencional – ELISA nos animais tratados nas fases aguda e crônica demonstrou o possível fracasso terapêutico. Todavia, dois animais infectados com a cepa 501, tratados na fase aguda e avaliados seis meses pós-tratamento, apresentaram resultados negativos nesta técnica. Tais discrepâncias entre métodos sorológicos e parasitológicos foram igualmente descritas neste modelo experimental (Martins *et al.*, 2008; Miyamoto *et al.*, 2008; Oliveira-Silva *et al.*, 2015). Tais implicações derivam do fato de que algumas cepas de *T. cruzi* não provocam alta produção de anticorpos dificultando a sua constatação, como abordado por Brenière *et al.* (1989) e Santos *et al.* (2009). Portanto, faz-se necessário realizar avaliações mais tardias nos animais a fim de se averiguar a soronegativação, à semelhança do que se observa em humanos (Castro *et al.*, 2002; Lana & Martins-Filho, 2015).

Em uma recente revisão sobre critério de cura pós-tratamento, Lana & Martins-Filho, (2015), abordaram a necessidade de realização de testes sorológicos capazes de apresentar soronegativação mais rapidamente frente à sorologia convencional. Um destes testes é a CF-AATV, sorologia não convencional que pesquisa anticorpos anti-tripomastigotas vivos, indicativos de infecção ativa (Krettli e Brener, 1982). Diversos trabalhos publicados utilizando essa metodologia tem demonstrado a capacidade desta técnica apresentar após o tratamento específico resultados sorológicos negativos antes da sorologia convencional, tanto em humanos, como em animais de experimentação (Martins *et al.*, 2015; Oliveira-Silva 2015; Lana & Martins-Filho, 2015). Neste trabalho, 62,5% dos animais tratados na fase aguda e avaliados 360 dias pós-tratamento, apresentaram resultados negativos na CF-AATV, sendo o mesmo observado na qPCR, técnica de mais elevada sensibilidade, realizada no tecido cardíaco dos animais. Vale ressaltar aqui que os testes parasitológicos (Hemocultura e PCR) foram sempre negativos e de maneira decrescente nas avaliações sucessivas (90, 180 e 360 d.p.t.), além de não apresentarem inflamação e depósito de colágeno no tecido cardíaco na

análise histopatológica. Em contrapartida apenas 6,25% apresentaram sorologia convencional (ELISA) negativa. Resultados semelhantes em camundongos foram publicados por Martins *et al.*, (2008), quando os autores verificaram a eficiente capacidade da sorologia não convencional FC-AATV em agrupar os animais infectados tratados e não curados ou dissociados pelo critério clássico de cura, no grupo do animais tratados e curados.

Krettli e Brener (1982) já haviam descrito em camundongos, a capacidade de métodos sorológicos não convencionais (LMC<sup>o</sup>) associados a métodos parasitológicos (xenodiagnostico) consistentemente negativos em demonstrar soronegativação antecipadamente em relação à sorologia convencional (ELISA) em pacientes chagásicos crônicos submetidos ao tratamento com Nifurtimox ou Benzonidazol. Semelhantemente, Galvão et al, (1993) reafirmaram a hipótese anterior. Estes autores fizeram acompanhamento dos pacientes utilizando a lise mediada pelo complemento (LMC<sup>o</sup>) associado com a hemocultura, de um grupo de pacientes tratados por cerca de dez anos, observando também, a capacidade de métodos sorológicos não convencionais, juntamente com parasitológico consistentemente negativos, demonstrar cura parasitológica anterior a sorologia convencional (ELISA), pois estes testes quando negativos indicam a ausência de infecção ativa pelo *T. cruzi*.

Martins-Filho et al., (1995) demonstraram a capacidade de um novo método sorológico não convencional lido por citometria de fluxo (CF-AATV), em separar o soro de pacientes chagásicos em grupos tratados e não curados, dissociados e curados, anteriormente à sorologia convencional (ELISA). Dados semelhantes foram obtidos por Wendling *et al.*, (2011) que avaliando a sorologia por CF-AATV de pacientes naturalmente infectados pelo *T. cruzi*, demonstraram um percentual de cura mais elevado pela sorologia não convencional em comparação com a ELISA. Esses dados corroboram com a revisão de Lana & Martins-Filho (2015), que abordaram a crescente necessidade de busca por novas metodologias de controle de cura que apresentem rápida negativação, ao contrário do indicado pelo critério clássico de controle de cura proposto pelo Consenso Brasileiro de Doença de Chagas (2005) uma vez que a sorologia não convencional (ELISA, HAI e IFI) detecta anticorpos não necessariamente relacionados à presença do parasito, incluindo dentre eles os anticorpos de memória como bem revisto e discutido por Krettli (2009).

Sendo assim, foi demonstrado que todas as amostras estudadas seriam resistentes ao fármaco NF pelo critério clássico de controle de cura, tanto na fase aguda quanto na

fase crônica da infecção em modelo murino, exceto o isolado 501 (TcII), que apesar de resistente ao tratamento apresentou cura em 6,25% dos animais (exames parasitológicos e sorológicos negativos na avaliação de 180 e 360 dias pós-tratamento). Esses resultados estão de acordo com os dados obtidos por Oliveira-Silva *et al.*, (2015), que avaliando amostras da mesma região do presente estudo encontraram percentual de cura relativamente baixo.

Entretanto quando avaliamos o processo de cura dos animais infectados pelo critério mais atual e moderno, foi demonstrada uma porcentagem de cura dez vezes maior que o critério clássico (62,5%), indicando assim, que a aplicação de metodologias mais modernas, eficazes e com capacidade de antecipar os indicadores de cura em relação a sorologia convencional (ELISA), é de extrema importância e necessidade. O interessante é que os animais foram também negativos na qPCR .

Ainda foi verificado que dentro de uma mesma linhagem (TcII) as amostras são homogêneas em relação ao comportamento biológico (infectividade, PPP, PP, curva de parasitemia, morfologia dos tripomastigotas sanguíneos e mortalidade) em camundongos enquanto a única amostra da linhagem TcVI foi diferente das amostras TcII. Este trabalho demonstrou ainda que foi possível diferenciar as amostras de *T. cruzi* em relação à resposta ao tratamento específico com o Nifurtimox na fase aguda e crônica da infecção em modelo murino, pois parasitos de ambas DTUs foram sensíveis ao tratamento pelo critério de cura mais recente, embora pelo critério de cura clássico, tenha sido observado um índice de cura muito baixo, de apenas 6,25% nos animais da linhagem TcII tratados na fase aguda.

Sendo assim, a ausência de correlação entre a genética do parasita e a resposta ao tratamento aqui observada pode ser entendida, uma vez que parasitos TcVI podem ser resultantes de fenômenos de hibridização entre TcI e TcII (Westenberger *et al.*, 2005) e que a amostra desta DTU aqui estudada apresenta-se semelhante e geneticamente mais próxima de TcII do que de TcI, que infelizmente não foi avaliada neste sentido por não ter sido possível obter parasitos suficientes da amostra Pr 150, representante desta DTU, para se fazer esta avaliação. No entanto, a mesma amostra foi avaliada por Teston *et al.*, (2013) em relação a resposta ao tratamento em modelo murino com o fármaco Benzonidazol na fase aguda da infecção, e foi verificado que este isolado é parcialmente resistente ao tratamento (51,7 % de cura), semelhante as amostras de outros genótipos estudadas nesse trabalho na fase aguda da infecção. No entanto a literatura registra inúmeros resultados demonstrando a resistência de clones (Toledo *et al.*, 2003),

amostras e cepas de *T.cruzi* (Filardi e Brener, 1987; Garcia et al., 2005) pertencentes a este genótipo resistentes ao tratamento com os fármacos usuais, uma realidade também presente na população de países da América Central onde TcI é predominante (Risso et al., 2011; Zingales et al., 2012; Blanchet et al., 2014).

Em relação ao tratamento na fase crônica da infecção, 100% dos animais de todos os grupos, demonstraram fracasso terapêutico considerando ambos os critérios de cura adotados nesse estudo. Diversos autores já demonstraram que na fase crônica da infecção chagásica, tanto em animais como em humanos, que os índices de cura são baixos ou ausentes, tanto na avaliação utilizando animais como modelo experimental, como em pacientes humanos (Toledo et al., 2004; Garcia et al., 2005; Martins *et al.*, 2008; Abollis et al., 2011; Oliveira-Silva *et al.*, 2015; Viotti et al., 2006; Zingales et al., 2012 e Machado de Assis et al., 2012). Esta realidade explica a ausência de correlação entre a genética das amostras de *T. cruzi* aqui estudadas e a resposta ao tratamento.

Toledo et al. (2003), avaliando a resposta ao tratamento com Benzonidazol em camundongos Swiss, infectados com clones de diferentes genótipos principais (19, 20, 39 e 32), observaram índices de cura na fase crônica da infecção sempre inferiores a fase aguda, principalmente com os animais infectados com os clones correspondentes ao genótipo TcII, semelhante ao observado neste trabalho.

Por outro lado, Oliveira-Silva et al. (2015) já haviam demonstrado que todos os animais infectados com as diferentes cepas isoladas de pacientes da mesma região e pertencentes ao genótipo TcII, tratados na fase crônica da infecção, apresentavam métodos parasitológicos negativos (Hm e PcR), e ELISA e ATTV positivos na avaliação de 180 d.p.t, corroborando os resultados desse estudo que demonstrou ausência de cura parasitológica nos animais infectados e tratados na fase crônica da infecção.

No entanto, por se tratar de infecção crônica, talvez fosse necessário fazer avaliações bem mais tardias nestes animais no intuito de verificar soronegativação, à semelhança do que se observa em humanos (Luquetti & Rassi, 2002; Lana & Martins-filho, 2009).

## **6.2 Proteômica diferencial em *T. cruzi***



Em relação à expressão de proteínas do *T. cruzi*, Atwood *et al.*, (2005) e Sodr e *et al.*, (2009) descreveram o mapa proteômico da cepa CL do *T. cruzi*, e após estas publicações começaram a surgir os primeiros trabalhos de proteômica deste protozoário.

Telleria *et al.*, (2010), avaliaram pioneiramente a expressão diferencial de clones do parasito pertencente às seis DTUs distintas e observaram a correlação entre a expressão diferencial e as linhagens genéticas do protozoário. Os autores realizaram um mapeamento da expressão diferencial nos diferentes grupos filogenéticos em 26 estoques clonais do *Trypanosoma cruzi*. Foi observado um alto nível de correlação entre distância genética, conforme estabelecido pelos marcadores isoenzimáticos (multilocus enzimático), e as diferenças de expressão proteica avaliadas pelos proteomas das amostras.

Uma diferença importante desse nosso estudo para o trabalho de Telleria *et al.*, (2010), foi a utilização de amostras do parasito isolados de pacientes chagásicos crônicos pertencentes a dois grupos genéticos distintos e filogeneticamente distantes (TcI e TcII), ambos apresentando a forma clínica cardíaca da doença de Chagas, e não a utilização de clones do parasito. Os clones são originários de apenas um único organismo que foi separado individualmente por micromanipulação ao microscópio e mantidos em processo de crescimento exponencial em meio de cultura acelular (LIT), todos iguais biológica e geneticamente. Por sua vez, uma amostra ou cepa do *T. cruzi* pode ser constituída por conjunto de subpopulações diferentes geneticamente contidas numa mesma amostra, que podem apresentar diferenças biológicas, dentre elas a resposta ao tratamento, e capacidade de causar alterações patológicas que resultam no desenvolvimento das diferentes manifestações clínicas da doença de Chagas .

No trabalho de Telleria *et al.*, (2010) várias proteínas foram identificadas e puderam ser associadas a determinados grupos genéticos ou DTUs. No presente trabalho, foi encontrado um padrão semelhante de expressão. Certos grupos de proteínas foram mais expressos no genótipo TcI e outros no genótipo TcII. Os autores ainda sugeriram que estudos como esse abrem caminho para a procura de novos alvos diferencialmente expressos que possam servir como biomarcadores específicos em nível subespecífico de diferentes patógenos.

Diante desta perspectiva, um dos objetivos específicos principais desse trabalho foi avaliar se realmente é possível verificar a existência de expressão diferencial de proteínas nos diferentes grupos genéticos do *T. cruzi*.

Na literatura, trabalhos como esse são extremamente raros. Uma abordagem semelhante foi realizada por Nakayasu *et al.*, (2009) na qual os autores avaliaram a expressão proteica das formas epimastigotas da cepa Y do *T. cruzi* (TcII), isolada de uma paciente chagásica, e muito utilizada como parâmetro em testes de drogas, por ser uma cepa parcialmente resistente ao tratamento etiológico da doença de Chagas. Os autores verificaram uma alta expressão de proteínas relacionadas com o metabolismo do parasito, motilidade, transporte, patogênese, ligantes de DNA/RNA, proteína, e sinalização celular.

Diaz *et al.*, (2011) avaliaram a expressão diferencial de proteínas em duas amostras de *T. cruzi* pertencentes ao genótipo TcI, isoladas de dois pacientes colombianos, um na fase aguda da infecção e outro na fase crônica e com miocardite. De forma semelhante ao nosso trabalho, os autores encontraram um enorme percentual de proteínas relacionadas ao metabolismo basal do parasito, além de demonstrar a presença de proteínas relacionadas com o a resposta ao estresse mais expressas na amostra de *T. cruzi* isolada do paciente na fase aguda da infecção, não sendo observada associação entre a expressão diferencial com as manifestações clínicas ou fase da doença apresentada pelos pacientes. As 29 proteínas identificadas foram agrupadas em sete categorias funcionais: metabolismo 31%, citoesqueleto 13,7%, endereçamento de proteínas 13,7%, defesas antioxidantes 20,6%, síntese protéica e ciclo celular 13,7%, catabolismo 6,8%, e adesão celular 3,4%.

Um grupo de proteínas diferencialmente expresso e muito importante para a correlação genética versus aspectos biológicos encontrados neste trabalho foi o de moléculas relacionadas com a resposta ao estresse. Dez proteínas foram identificadas no grupo de amostras aqui estudadas, quatro identificadas na amostra PR150 (TcI) (o grupo de Heat shock protein, contendo três proteínas e Thiol-dependent reductase 1), além de seis identificadas na cepa 452 (TcII) (Heat shock protein, IgE-dependent histamine-releasing factor, Iron superoxide dismutase, Glutathione peroxidase-like protein).

Quanto às proteínas *Heat shock*, Urményi *et al.*, (2014) publicaram uma importante revisão na literatura sobre a relevância dessas proteínas no contexto da biologia do *T. cruzi*. É sabido que esse protozoário tem um ciclo de vida complexo que envolve hospedeiros invertebrados e vertebrados. Durante seu ciclo de vida o parasito está sujeito a diversos tipos de estresse, particularmente o estresse térmico (Contreras *et al.*, 1985). Para lidar com esse desafio ambiental os autores acima observaram que,

chaperonas moleculares e proteases são altamente expressas no parasito relacionadas à resposta ao estresse térmico (Urményi *et al.*, 2014).

Várias famílias de HSPs são sintetizadas pelo *T. cruzi* (Urményi *et al.*, 2014), incluindo membros das principais classes HSP como HSP70, HSP90, Hsp100, Hsp40, e pequenas HSPs, que mostram características conservadas e únicas para a espécie (Urményi *et al.*, 2014). Na revisão citada anteriormente, foram descritos os padrões de expressão gênica desse grupo de proteínas e discutiu-se sua relevância na biologia do parasito, principalmente em relação à resistência ao tratamento.

HSPs e a resposta ao estresse térmico de protozoários têm sido objeto de vários comentários recentes. Parasitos digenéticos são submetidos freqüentemente à mudanças de temperatura durante os seus ciclos de vida e HSPs são, como esperado, partes importantes na resposta ao a esse estresse (Folgueira e Requena 2007; Vonlaufen et al., 2008; Shonhai *et al.*, 2011). Assim, tem sido demonstrado que parasitos que expressam maior quantidade de proteínas HSPs possuem maior capacidade de transitar entre o ciclo silvestre e o doméstico da doença de Chagas, além de possuírem maior capacidade de infecção nos diferentes reservatórios vertebrados e até mesmo no homem (Urményi *et al.*, 2014). HSPs em *T. cruzi* também foram associadas aos mecanismos de sobrevivência intracelular do parasito, metaciclogênese e virulência (Folgueira e Requena 2007;. Shonhai *et al.*, 2011).

Segundo Richter *et al.*, (2010) o estresse térmico pode provocar alterações em diversas organelas do parasito. Dentre elas se incluem modificações no citoesqueleto, fragmentação do retículo endoplasmático e complexo de Golgi, diminuição do número de lisossomos e mitocôndrias, alterações na permeabilidade da membrana e diminuição da tradução (Richter *et al.*, 2010). Parasitos que expressam uma maior quantidade dessas proteínas podem ser mais resistentes a esses danos, principalmente durante o processo de invasão celular. As duas amostras avaliadas nesse estudo (PR150 e 452), demonstraram uma expressão elevada desse grupo proteico, o que pode indicar ou sugerir, infectividade em células de vertebrados, insetos vetores e possível resistência ao tratamento específico para a doença de Chagas.

As duas amostras ( PR150 – TcI e 452 – TcII) infectaram muito bem células Vero. Entretanto quando comparamos a infecção em modelo murino, somente a cepa 452 (TcII) foi capaz de infectar camundongos e gerar parasitemia patente, o que talvez pode ser explicado pela maior expressão de proteínas *Heat Shock* como aqui demonstrado no estudo da proteômica. Essas proteínas, além de proteger o parasito

contra o estresse térmico, exercem papel de proteção contra o estresse oxidativo, muito importante no processo de infecção de células de mamíferos pelo *T. cruzi* (Richter *et al.*, 2010; Urményi *et al.*, 2014). Durante esse processo, o parasito é fagocitado pelos macrófagos, ficam retidos nos vacúolos parasitários, recebem agressões das enzimas lisossomais e espécies reativas de oxigênio. Cepas que expressam altos níveis de proteínas HSPs, como ocorreu na cepa 452 (TcII), podem escapar do vacúolo parasitário com maior facilidade, infectar o citoplasma, garantindo assim o seu ciclo de vida (Urményi *et al.*, 2014) multiplicando-se mais intensamente no hospedeiro e resultando consequentemente em parasitemias mais elevadas.

Uma outra proteína pertencente ao grupo de resposta ao estresse e identificada na cepa PR150 (TcI) foi a Thiol-dependent reductase 1, homóloga a proteína TC52 do *T. cruzi* segundo Silva *et al.*, (2012). Essa proteína está relacionada com o processo de proteção do parasito contra o estresse oxidativo durante a infecção da célula hospedeira (Silva *et al.*, (2012).

Murta *et al.*, (2008) avaliando a expressão proteica em diferentes cepas do *T. cruzi* submetidas ao tratamento com o benzonidazol, observaram maior expressão da Thiol-dependent reductase 1 em cepas consideradas resistentes ao tratamento específico. Os mesmos autores sugeriram ainda que cepas que possuem superexpressão dessa proteína podem escapar mais facilmente do sistema imune e apresentar alta virulência. Infelizmente, a amostra TcI aqui estudada (PR 150) por não apresentar parasitemia que permitisse fazer a avaliação em camundongos comparada a amostras TcII, e contrapondo alguns dos resultados publicados na literatura referentes a TcI e seus clones que demonstram que amostras pertencentes a esse genótipo, apresentam predominância de formas largas ao longo da infecção, multiplicação lenta, altos picos de parasitemia, tropismo para musculatura esquelética e alta resistência ao tratamento etiológico em modelo murino (Andrade, 1974; Andrade & Magalhães, 1997 e Toledo *et al.*, 2002, 2003 e 2004), também não permitiu avaliar sua resposta ao tratamento .

De maneira similar, Garzón *et al.*, (2013) observaram que parasitos geneticamente modificados com a supressão do gene Tc52 eram menos virulentos em camundongos BALB-C quando comparados aos protozoários que superexpressavam tal gene. Os autores observaram que os camundongos infectados com os parasitos que superexpressavam a proteína específica, apresentavam parasitemia mais elevada, causavam maiores danos inflamatórios no tecido cardíaco dos animais, além de supressão da produção de IL-2 e inibição da proliferação de células T reguladoras.

Uma outra importante proteína identificada na cepa 452 (TcII) foi a IgE-dependent histamine-releasing factor. Essa proteína está relacionada com a alta capacidade de gerar inflamação crônica (Macdonald *et al.*, 1997). Talvez essa expressão possa justificar maior capacidade dessa cepa em gerar uma das maiores taxas de inflamação no tecido cardíaco dos camundongos infectados, tanto na fase aguda como na fase crônica da infecção e inclusive em humanos entre as quatro amostras estudadas, três delas TcII. Não foram encontrados artigos na literatura que demonstram a identificação dessa proteína associada à infecção por *T. cruzi*. No homem, a expressão desse gene está relacionada a processos inflamatórios crônicos, principalmente das vias aéreas, como respostas alérgicas e quadro asmático (Kashiwakura *et al.*, 2012).

De todas as proteínas identificadas nesse trabalho, o grupo relacionado com a resposta ao estresse possui a maior importância em relação ao processo de infectividade, proteção térmica e resistência ao tratamento. O restante dos grupos de proteínas está relacionado com o metabolismo basal do parasito, sendo ainda demonstradas importantes diferenças genótipo específica (TcI x TcII)

## 7.0 CONCLUSÕES

Podemos concluir com esse trabalho, que a hipótese de correlação entre genética versus aspectos biológicos das amostras de *T. cruzi* foi corroborada. Foi verificado que dentro de uma mesma linhagem (TcII), as amostras são homogêneas em relação ao comportamento biológico (infectividade, PPP, PP, curva de parasitemia, morfologia dos tripomastigotas sanguíneos e mortalidade) em camundongos, parâmetros biológicos *in vitro* (crescimento em meio LIT, infecção e replicação e em células “Vero”), enquanto a amostra da linhagem TcVI foi significativamente diferente das amostras TcII em relação aos mesmos parâmetros avaliados.

Conclui-se ainda que todas as amostras estudadas são resistentes ao fármaco NF (6,25% de cura) pelo critério clássico de controle de cura, tanto na fase aguda quanto na fase crônica da infecção em modelo murino. Entretanto, quando foi avaliado o processo de cura dos animais infectados pelo critério mais recente, foi demonstrada uma porcentagem de cura dez vezes maior em comparação ao critério clássico (62,5%), indicando assim, que a aplicação de metodologias mais modernas, eficazes e com capacidade de antecipar os indicadores de cura em relação à sorologia convencional (ELISA), é de extrema importância e necessidade.

A abordagem de análise de proteômica utilizada permitiu a identificação de alvos diferencialmente expressos entre essas duas cepas (TcI e TcII). A busca continuada de tais moléculas, particularmente em estágios associadas à infecção do hospedeiro vertebrado (formas amastigotas e tripomastigotas), poderão revelar importantes marcadores de prognóstico da infecção chagásica.

## 8.0 PERSPECTIVAS

- Avaliar a expressão diferencial em larga escala (*Shotgun*) das formas amastigotas e tripomastigotas de todas as amostras de *T. cruzi* utilizadas neste trabalho e entre amostras de um mesmo genótipo;
- Identificar as proteínas diferencialmente expressas nos pares de cepas pertencentes a grupos genéticos distintos;
- Identificar os alvos diferencialmente expressos que possam servir como marcadores de prognóstico da infecção ou doença causada pelo *T. cruzi*.
- Publicação dos trabalhos que essa tese irá gerar.

## 9.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABOLIS NG, ARAÚJO SM, TOLEDO MJ, FERNANDEZ MA, GOMES ML. *Trypanosoma cruzi* I-III in southern Brazil causing individual and mixed infections in humans, sylvatic reservoirs and triatomines. *Acta Trop.* 2011 Dec;120(3):167-72. doi: 10.1016/j.actatropica.2011.08.001. Epub 2011 Aug 9.

AGUILAR HM, ABAD-FRANCH F, DIAS JC, JUNQUEIRA AC, COURA JR (2007) Chagas disease in the Amazon region. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 102: Suppl 1:47-56

AMORIN DS, MELLO DE OLIVEIRA JA, MEIRA DE OLIVEIRA JS, MANCO JC, GALLO L JR, MARIN NETO JA, KOBERLE F (1979). Heart block in Chagas' disease. *Arq Bras Cardiol* 28: 79-82.

ANDRADE S.G. & ANDRADE Z.A. (1966). Doença de Chagas e alterações neuronais no plexo de Auerbach (estudo experimental em camundongos). *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo* 8: 219 -224.

ANDRADE S.G. & FIGUEIRA R.M. (1977). Estudo sobre a ação terapêutica da droga Ro 7-1051 na infecção por diferentes cepas do *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo* 19: 335-341.

ANDRADE S.G. & MAGALHÃES J.B. (1997). Biodemes and zymodemes of *Trypanosoma cruzi* strains: correlations with clinical data and experimental pathology. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 30: 27-35.

ANDRADE S.G. (1974). Caracterização de cepas de *Trypanosoma cruzi* isoladas no Recôncavo Baiano. *Rev. Pat. Trop.* 65-121.

ANDRADE S.G., FREITAS L.A.R, PEYROL S., PIMENTEL A.R., SADIGURSKY M. (1988). *Trypanosoma cruzi* antigens detected by immunoelectron microscopy in the spleen of mice serologically positive but parasitologically cured by chemotherapy (preliminary report). *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 21: 41- 42.

ANDRADE S.G., FREITAS L.A.R, PEYROL S., PIMENTEL A.R., SADIGURSKY M. (1991). Experimental chemotherapy of *Trypanosoma cruzi* infection: persistence of parasite antigens and positive serology in parasitologically cured mice. *Bull. World Health Organ* 69: 191-197.



ANDRADE S.G., MAGALHÃES J.B., PONTES A.L. (1985). Evaluation of chemotherapy with benznidazole and nifurtimox in mice infected with *T. cruzi* of different types. Bull. World Health Organization, 63: 721-726.

ANDRADE S.G., MAGALHAES J.B., PONTES A.L. (1989). Therapy of the chronic phase of the experimental infection by *Trypanosoma cruzi* with benzonidazole and nifurtimox. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 22: 113-118.

ANDRADE S.G., RASSI A., MAGALHAES J.B., FERRIOLLI F.F., LUQUETTI A.O. (1992). Specific chemotherapy of Chagas disease: a comparison between the response in patients and experimental animals inoculated with the same strains. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 86: 624-626.

ANDRADE SG, CAMPOS RF, STEINDEL M, GUERREIRO ML, MAGALHÃES JB, ALMEIDA MC, REIS JN, SANTOS VC, VALADARES HM, REIS MG, MACEDO AM. Biological, biochemical and molecular features of *Trypanosoma cruzi* strains isolated from patients infected through oral transmission during a 2005 outbreak in the state of Santa Catarina, Brazil: its correspondence with the new *T. cruzi* Taxonomy Consensus (2009). Mem Inst Oswaldo Cruz. 2011 Dec;106(8):948-56.

ANDRADE SG, MAGALHÃES JB, PONTES AL. Evaluation of chemotherapy with benznidazole and nifurtimox in mice infected with *Trypanosoma cruzi* strains of different types. Bull World Health Organ. 1985;63(4):721-6.

ANDRADE SG, RASSI A, MAGALHAES JB, FERRIOLLI FILHO F, LUQUETTI AO. Specific chemotherapy of Chagas disease: a comparison between the response in patients and experimental animals inoculated with the same strains. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1992 Nov-Dec;86(6):624-6.

ANDRADE ZA, ANDRADE SG, SADIGURSKY M, WENTHOLD RJ JR, HILBERT SL, FERRANS VJ. The indeterminate phase of Chagas' disease: ultrastructural characterization of cardiac changes in the canine model. Am J Trop Med Hyg. 1997 Sep;57(3):328-36.

ARAÚJO Z, EL BOUHDIDI A, HEREMANS H, VAN MARCK E, CASTÉS M, CARLIER Y. Vaccination of mice with a combination of BCG and killed *Leishmania* promastigotes reduces acute *Trypanosoma cruzi* infection by promoting an IFN-gamma response. *Vaccine*. 1999 Feb 26;17(7-8):957-64.

ATWOOD JA 3RD, WEATHERLY DB, MINNING TA, BUNDY B, CAVOLA C, OPPERDOES FR, ORLANDO R, TARLETON RL. The *Trypanosoma cruzi* proteome. *Science*. 2005 Jul 15;309(5733):473-6.

ÁVILA H.A., PEREIRA J.B., THIEMANN O., DE PAIVA E., DEGRAVE W., MOREL C.M., SIMPSON L. (1993). Detection of *Trypanosoma cruzi* in blood specimens of chronic chagasic patients by polymerase chain reaction amplification of kinetoplast minicircle DNA: comparison with serology and xenodiagnosis. *J.Clin.Microbiol.* 31: 2421-2426.

BAHIA, MT, DINIZ, LF, MOSQUEIRA, VCF 2014. Therapeutical approaches under investigation for treatment of Chagas disease. *Expert Opinion Investigation Drugs*, Downloaded from informahealthcare.com by 200.239.163.63 on 05/27/14

BITTENCOURT AL. TRANSMISSÃO VERTICAL DA DOENÇA DE CHAGAS. IN: BRENER Z, ANDRADE ZA, BARRAL-NETO M, editors. *Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2000. p. 16-20.

BLANCHET D, BRENIÈRE SF, SCHIJMAN AG, BISIO M, SIMON S, VÉRON V, MAYENCE C, DEMAR-PIERRE M, DJOSSOU F, AZNAR C. First report of a family outbreak of Chagas disease in French Guiana and posttreatment follow-up. *Infect Genet Evol.* 2014 Dec;28:245-50.

BRENER Z. (1962). Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo* 4: 389-396.

BRENER Z. (1965). Terapêutica experimental da doença de Chagas. In JR Cançado, *Doença de Chagas*, Belo Horizonte. Imprensa Oficial de Minas Gerais, Minas Gerais, 510-516.

BRENER Z. (1969). The behavior of slender and stout forms of *Trypanosoma cruzi* in the blood-stream of normal and immune mice. *Ann.Trop.Med.Parasitol.* 63, 215-220.

BRENER Z. (1979). Intraespecific variations in *Trypanosoma cruzi*: two types of parasite populations presenting distinct characteristics. *Scientific Publication* 11-21.

BRENER Z. (2000). Host-parasite relations in Chagas disease: mechanisms of infection and disease. *Ann.Soc.Belg.Med.Trop.* 65 Suppl 1, 9-13.

BRENER Z. [Symposium on new approaches in research on American trypanosomiasis]. *Bol Oficina Sanit Panam.* 1977 Aug;83(2):106-18.

BRENIÈRE S.F., BOSSENO M.F., TELLERIA J., BASTRENTA B., YACSIK N., NOIREAU F., ALCAZAR J.L., BARNABÉ C., WINCKER P. & TIBAYRENC M. (1998). Different behavior of two *Trypanosoma cruzi* major clones: transmission and circulation in young Bolivian patients. *Exp.Parasitol.* 89, 285-295.

BRENIÈRE SF, BOSSENO MF, NOIREAU F, YACSIK N, LIEGEARD P, AZNAR C, HONTEBEYRIE M (1963). Integrate study of a Bolivian population infected by *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 97: 289-95.

BRENIÈRE SF<sup>1</sup>, CARRASCO R, REVOLLO S, APARICIO G, DESJEUX P, TIBAYRENC M. Chagas' disease in Bolivia: clinical and epidemiological features and zymodeme variability of *Trypanosoma cruzi* strains isolated from patients. *Am J Trop Med Hyg.* 1989 Nov;41(5):521-9.

BRISSE S, BARNABÉ C, TIBAYRENC M. Identification of six *Trypanosoma cruzi* phylogenetic lineages by random amplified polymorphic DNA and multilocus enzyme electrophoresis. *Int J Parasitol.* 2000 Jan;30(1):35-44.

BRITTO C1, CARDOSO MA, WINCKER P, MOREL CM (1993). *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 88: 171-2. A simple protocol for the physical cleavage of *Trypanosoma cruzi* kinetoplast DNA present in blood samples and its use in polymerase chain reaction (PCR)-based diagnosis of chronic Chagas disease.

BURGOS JM, ALTCHER J, BISIO M, DUFFY T, VALADARES HM, SEIDENSTEIN ME, PICCINALI R, FREITAS JM, LEVIN MJ, MACCHI L,

MACEDO AM, FREILIJ H, SCHIJMAN AG (2007). Direct molecular profiling of minicircle signatures and lineages of *Trypanosoma cruzi* bloodstream populations causing congenital Chagas disease. *Int J Parasitol.* 37: 1319-27.

BUSCAGLIA CA, CAMPO VA, FRASCH AC, DI NOIA JM. *Trypanosoma cruzi* surface mucins: host-dependent coat diversity. *Nat Rev Microbiol.* 2006 Mar;4(3):229-36. Review.

CALDAS IS, DA MATTA GUEDES PM, DOS SANTOS FM, DE FIGUEIREDO DINIZ L, MARTINS TA, DA SILVA DO NASCIMENTO AF, AZEVEDO MA, DE LIMA WG, NETO RM, TORRES RM, TALVANI A, BAHIA MT. Myocardial scars correlate with eletrocardiographic changes in chronic *Trypanosoma cruzi* infection for dogs treated with Benznidazole. *Trop Med Int Health.* 2013 Jan;18(1):75-84

CALDAS IS, TALVANI A, CALDAS S, CARNEIRO CM, DE LANA M, DA MATTA GUEDES PM, BAHIA MT. Benznidazole therapy during acute phase of Chagas disease reduces parasite load but does not prevent chronic cardiac lesions. *Parasitol Res.* 2008 Jul;103(2):413-21.

CANÇADO JR 2002. Long term evaluation of etiological treatment of Chagas disease with benznidazole. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 44: 29-37.

CARLIER Y (2011). Globalization of Chagas disease (American trypanosomiasis): the situation in Europe and Belgium. *Bull Mem Acad R Med Belg.*;166: 347-55

CARNEIRO M, ROMANHA AJ, CHIARI E. Biological characterization of *Trypanosoma cruzi* strains from different zymodemes and schizodemes. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1991 Oct-Dec;86(4):387-93.

CASTRO AM, LUQUETTI AO, RASSI A, RASSI GG, CHIARI E, GALVÃO LM. Blood culture and polymerase chain reaction for the diagnosis of the chronic phase of human infection with *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol Res.* 2002 Oct;88(10):894-900. Epub 2002 Jun 15.

CASTRO-BORGES, WILLIAM ; CARTWRIGHT, JARED ; ASHTON, PETER D. ; BRASCHI, SIMON ; GUERRA SA, RENATA ; RODRIGUES, VANDERLEI ; WILSON, R.

CASTRO-BORGES, WILLIAM ; DOWLE, ADAM ; CURWEN, RACHEL S. ; THOMAS-OATES, JANE ; WILSON, R. ALAN (2011). Enzymatic Shaving of the Tegument Surface of Live Schistosomes for Proteomic Analysis: A Rational Approach to Select Vaccine Candidates. *Plos Neglected Tropical Diseases* 5: e993,

CASTRO-BORGES, WILLIAM ; SIMPSON, DEBORAH M. ; DOWLE, ADAM ; CURWEN, RACHEL S. ; THOMAS-OATES, JANE ; BEYNON, ROBERT J. ; WILSON, R. ALAN (2011). Abundance of tegument surface proteins in the human blood fluke *Schistosoma mansoni* determined by QconCAT proteomics. *Journal of Proteomics*, 74: 1519-1533.

CEVALLOS AM<sup>1</sup>, SEGURA-KATO YX, MERCHANT-LARIOS H, MANNING-CELA R, ALBERTO HERNÁNDEZ-OSORIO L, MÁRQUEZ-DUEÑAS C, AMBROSIO JR, REYNOSO-DUCOING O, HERNÁNDEZ R. 2010. *Trypanosoma cruzi*: multiple actin isoforms are observed along different developmental stages. *Exp Parasitol*. 2011 Jan;127(1):249-59.

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

CONSENSO BRASILEIRO EM DOENÇA DE CHAGAS (2005). *Rev. Soc. Bras. de Med. Trop.* 38 Suppl (III), 29pp.

CONTRERAS VT, NAVARRO MC, DE LIMA AR, ARTEAGA R, DURAN F, ASKUE J, FRANCO Y 2002. Production of amastigotes from metacyclic trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2002 Dec;97(8):1213-20. Epub 2003 Jan 20.

CONTRERAS VT, SALLES JM, THOMAS N, MOREL CM, GOLDENBERG S. In vitro differentiation of *Trypanosoma cruzi* under chemically defined conditions. *Mol Biochem Parasitol*. 1985 Sep;16(3):315-27.

CORDEIRO FD, MARTINS-FILHO OA, DA COSTA ROCHA MO, ADAD SJ, CORRÊA-OLIVEIRA R, ROMANHA AJ. Anti-*Trypanosoma cruzi* immunoglobulin G1 can be a useful tool for diagnosis and prognosis of human Chagas'disease. Clin Diagn Lab Immunol. 2001 Jan;8(1):112-8.

COURA J.R., JUNQUEIRA A.C., FERNANDES O., VALENTE S.A. e MILES M.A. (2007). Emerging Chagas disease in Amazonian Brazil. Trends Parasitol. 18, 171-176.

COURA JR, CASTRO SL 2002. A critical review on Chagas disease chemotherapy. Mem Inst Oswaldo Cruz 97: 3-24.

COURA JR, JUNQUEIRA AC (2012). Chagas disease. What is known and what should be improved: a systemic review. Rev Soc Bras Med Trop 45: 286-96.

COURA JR, VIÑAS PA, BRUM-SOARES LM, DE SOUSA AS, XAVIER SS (2013). Morbidity of Chagas heart disease in the microregion of Rio Negro, Amazonian Brazil: a case-control study. Mem Inst Oswaldo Cruz. 108: 1009-13.

COURA JR, DE CASTRO SL. A critical review on Chagas disease chemotherapy. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2002 Jan;97(1):3-24. Review.

D'ÁVILA, D. A.; ANDRE'A MARA MACEDO, HELDER MAGNO SILVA VALADARES, ELIANE DIAS GONTIJO, ANA MARIA DE CASTRO, CARLOS RENATO MACHADO, EGLER CHIARI, AND LU'CIA MARIA CUNHA GALVÃO 2009. Probing Population Dynamics of *Trypanosoma cruzi* during Progression of the Chronic Phase in Chagasic Patients. JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, June 2009, p. 1718–1725

D'ÁVILA, D. A.; GONTIJO, E. D.; LAGES-SILVA, E.; MEIRA, W. S. F.; CHIARI, E.; GALVÃO, L. M. C. Random amplified polymorphic DNA profiles of *Trypanosoma cruzi* isolates from chagasic patients with different clinical forms. Parasitology Research, v. 98, p. 455-461, 2006.

DEGRAVE W1, FRAGOSO SP, BRITTO C, VAN HEUVERS WYN H, KIDANE GZ, CARDOSO MA, MUELLER RU, SIMPSON L, MOREL CM (1988). Mol Biochem Parasitol. 27: 63-70. Peculiar sequence organization of kinetoplast DNA minicircles from *Trypanosoma cruzi*.

DEVERA R, ILLARRAMENDI X, MONTOYA-ARAÚJO R, PIRMEZ C, FERNANDES O, COURA JR. [Biodemes of *Trypanosoma cruzi* strains isolated from humans from three endemic areas in Minas Gerais State]. Rev Soc Bras Med Trop. 2002 Jul-Aug;35(4):323-30.

DIAS J. & SCHOFIELD C. (1999). The evolution of Chagas disease (American trypanosomiasis) control after 90 years since Carlos Chagas discovery. Mem.Inst.Oswaldo Cruz 94 Suppl 1, 103-121.

DIAS J.C. (2006). Chagas disease: successes and challenges. Cad.Saude Publica 22, 2020-2021.

DIAS J.C. (2007). 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 102 Suppl 1, 11-18.

DIAS J.C., LOYOLA C.C. & BRENER S. (1985). Chagas' disease in Minas Gerais: current status and perspectives. Rev.Bras.Malariol.Doencas.Trop. 37, 7-28.

DIAS J.C., PRATA A. & CORREIA D. (2007). Problems and perspectives for Chagas disease control: in search of a realistic analysis. Rev.Soc.Bras.Med.Trop. 41, 193-196.

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

DIAS J.C., SILVEIRA A.C. & SCHOFIELD C.J. (2002b). The impact of Chagas disease control in Latin America: a review. Mem.Inst.Oswaldo Cruz 97, 603-612.

DIAS J.C.P (1992). Epidemiology of Chagas disease (American trpanosomiasis): Its impact on Transfusion and Clinical Medicine. ISBT, São Paulo 49-80.

DIAS J.C.P. (1982). Doença de Chagas em Bambuí, Minas Gerais, Brasil. Estudo clínico epidemiológico a partir da fase aguda, entre 1940 e 1982. Tese de Doutorado, Faculdade de Medicina de Minas Gerais 401pp.

DIAS J.C.P. (2000a). Epidemiological surveillance of Chagas disease. Cad. Saúde Publica 16 Suppl 2, 43-59.

DIAS JC., BRENER 1984; General aspects of the prevention of Chagas' disease in Brazil]. Rev Paul Med. 1984 Nov-Dec;102(6):279-81. Portuguese

DIAS JCP 2004. Ecological aspects of the vectorial control of Chagas' disease in Brazil. Cad Saude Publica;10 Suppl 2:352-8. Epub 2004 Mar 19.

Díaz ML, Solari A, González CI. Differential expression of *Trypanosoma cruzi* I associated with clinical forms of Chagas disease: overexpression of oxidative stress proteins in acute patient isolate. J Proteomics. 2011 Aug 24;74(9):1673-82.

DOCAMPO R, STOPPANI AO (1979). Mechanism of the trypanocidal action of nifurtimox and other nitro-derivatives on *Trypanosoma cruzi*. Medicina (B Aires) 40 Suppl 1, 10-16.

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

FOLGUEIRA C, REQUENA JM. A postgenomic view of the heat shock proteins in kinetoplastids. FEMS Microbiol Rev. 2007 Jul;31(4):359-77. Epub 2007 Apr 25.

FREITAS JM, AUGUSTO-PINTO L, PIMENTA JR, BASTOS-RODRIGUES L, GONÇALVES VF, TEIXEIRA SM, CHIARI E, JUNQUEIRA AC, FERNANDES O, MACEDO AM, MACHADO CR, PENA SD (2006). Ancestral genomes, sex, and the population structure of *Trypanosoma cruzi*. PLoS Pathog. 2: e24.

GALVÃO LM, CHIARI E, MACEDO AM, LUQUETTI AO, SILVA SA, ANDRADE AL. PCR assay for monitoring *Trypanosoma cruzi* parasitemia in childhood after specific chemotherapy. J Clin Microbiol. 2003 Nov;41(11):5066-70.

GARCIA S, RAMOS CO, SENRA JF, VILAS-BOAS F, RODRIGUES MM, CAMPOS-DE-CARVALHO AC, RIBEIRO-DOS-SANTOS R, SOARES MB. Treatment with benznidazole during the chronic phase of experimental Chagas' disease decreases cardiac alterations. Antimicrob Agents Chemother. 2005 Apr;49(4):1521-8.



GARZÓN M, GARCÍA-FRUCTUOSO G, GUILLÉN A, SUÑOL M, MORA J, CRUZ O. Brain stem tumors in children and adolescents: single institutional experience. Childs Nerv Syst. 2013 Aug;29(8):1321-31.

GOMES ML, MACEDO AM, VAGO AR, PENA SD, GALVÃO LM, CHIARI E (1998). *Trypanosoma cruzi*: optimization of polymerase chain reaction for detection in human blood. Exp Parasitol. 88: 28-33.

GUEDES PM, SILVA GK, GUTIERREZ FR, SILVA JS 2011. Current status of Chagas disease chemotherapy. Expert Rev Anti Infect Ther. 2011 May;9(5):609-20. doi: 10.1586/eri.11.31. Review

GUEDES PM, URBINA JA, DE LANA M, AFONSO LC, VELOSO VM, TAFURI WL, MACHADO-COELHO GL, CHIARI E, BAHIA MT. Activity of the new triazole derivative albaconazole against *Trypanosoma* (*Schizotrypanum*) *cruzi* in dog hosts. Antimicrob Agents Chemother. 2004 Nov;48(11):4286-92.

HERNANDEZ-OSORIO, L. A. 2010.. Improved method for *in vitro* secondary amastigogenesis of *Trypanosoma cruzi*: morphometrical and molecular analysis of intermediate developmental forms. J Biomed Biotechnol, v. 2010, p. 283842,

KASHIWAKURA J, OKAYAMA Y, FURUE M, KABASHIMA K, SHIMADA S, RA C, SIRAGANIAN RP, KAWAKAMI Y, KAWAKAMI T. Most Highly Cytokinergic IgEs Have Polyreactivity to Autoantigens. Allergy Asthma Immunol Res. 2012 Nov;4(6):332-40.

KRETTLI AU, BRENER Z 1982 . Resistance against *Trypanosoma cruzi* associated to anti-living trypomastigote antibodies. J Immunol. May;128(5):2009-12.

KRETTLI AU, CANÇADO JR, BRENER Z. Effect of specific chemotherapy on the levels of lytic antibodies in Chagas's disease. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1982;76(3):334-40.

KRETTLI AU. The utility of anti-trypomastigote lytic antibodies for determining cure of *Trypanosoma cruzi* infections in treated patients: an overview and perspectives. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2009 Jul;104 Suppl 1:142-51.

LAGES-SILVA E, CREMA E, RAMIREZ LE, MACEDO AM, PENA SD, CHIARI E (2001). Relationship between *Trypanosoma cruzi* and human chagasic megaesophagus: blood and tissue parasitism. *Am J Trop Med Hyg.* 65: 435-41.

LAGES-SILVA E, RAMÍREZ LE, PEDROSA AL, CREMA E, DA CUNHA GALVÃO LM, JUNHO PENA SD, MACEDO AM, CHIARI E (2006). Variability of kinetoplast DNA gene signatures of *Trypanosoma cruzi* II strains from patients with different clinical forms of Chagas' disease in Brazil. *J Clin Microbiol.* 44:2167-71.

LANA M. & MARTINS-FILHO, O.A. (2009). Serological methods as a tool to monitor post-therapeutic cure in Chagas disease. 25a Reunião Anual de Pesquisa Aplicada em Doença de Chagas *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 42: 54-56.

LANA M., CHIARI E. & TAFURI W.L. (1992). Experimental Chagas' disease in dogs. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz,* 87: 59-71.

LANA M., DA SILVEIRA P.A., BARNABÉ C., QUESNEY V., NOEL S., TIBAYRENC M. (1998). *Trypanosoma cruzi*: compared vectorial transmissibility of three major clonal genotypes by *Triatoma infestans*. *Exp. Parasitol.* 90: 20-25.

LANA M., DA SILVEIRA P.A., BASTRENTA B., BARNABÉ C., NOEL S., TIBAYRENC M. (2001). *Trypanosoma cruzi*: infectivity of clonal genotype infections in acute and chronic phases in mice. *Exp. Parasitol.* 96: 61-66.

LANA M., LOPES L.A., MARTINS H.R., BAHIA M.T., MACHADO-DE-ASSIS G.F., WENDLING A.P., MARTINS-FILHO A.O., MONTOYA R.A., DIAS J.C.P., ALBAJAR-VIÑAS P., COURA J.R. (2009). Clinical and laboratory status of patients with chronic Chagas disease living in a vector-controlled área in Minas Gerais, Brazil, before and nine years after aetiological treatment. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 104: 1-9.

LANA M., TAFURI W.L., CALIARI M.V., BAMBIRRA E.A., CHIARI C.A., LEITE V. H. R., BARBOSA A. J. A., TOLEDO M. J. O., CHIARI E. (1988). Fase crônica cardíaca fibrosante da tripanosomíase cruzi experimental no cão. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo,* 21: 113-121.

LANA M, CHIARI CA. [Comparative biological characterization of Berenice and Berenice-78 strains of *Trypanosoma cruzi* isolated from the same patient at different times]. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1986 Jul-Sep;81(3):247-53.

LANA M, DA SILVEIRA PINTO A, BARNABÉ C, QUESNEY V, NOËL S, TIBAYRENC M. *Trypanosoma cruzi*: compared vectorial transmissibility of three major clonal genotypes by *Triatoma infestans*. Exp Parasitol. 1998 Sep;90(1):20-5.

LANA M, DA SILVEIRA PINTO A, BASTRENTA B, BARNABÉ C, NOËL S, TIBAYRENC M. *Trypanosoma cruzi*: infectivity of clonal genotype infections in acute and chronic phases in mice. Exp Parasitol. 2000 Oct;96(2):61-6.

LANA M, MARTINS-FILHO OA. Revisiting the Posttherapeutic Cure Criterion in Chagas Disease: Time for New Methods, More Questions, Doubts, and Polemics or Time to Change Old Concepts? Biomed Res Int. 2015;2015:652985

LAURENT J.P., BARNABE C., QUESNEY V., NOEL S., TIBAYRENC M. (1997). Impact of clonal evolution on the biological diversity of *Trypanosoma cruzi*. Parasitology 114: 213-218.

LEWIS, M, D; JONATHAN MA, MATTHEW YEO, HERNÁN J. CARRASCO, MARTIN S. LLEWELLYN, AND MICHAEL A. MILES (2009). Genotyping of *Trypanosoma cruzi*: Systematic Selection of Assays Allowing Rapid and Accurate Discrimination of All Known Lineages. Am J Trop Med Hyg. 2009 December ; 81(6): 1041–1049.

LUQUETTI AO, MILES MA, RASSI A, DE REZENDE JM, DE SOUZA AA, PÓVOA MM, RODRIGUES I. *Trypanosoma cruzi*: zymodemes associated with acute and chronic Chagas' disease in central Brazil. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1986;80(3):462-70.

MACDONALD SM. Human recombinant histamine-releasing factor. Int Arch Allergy Immunol. 1997 May-Jul;113(1-3):187-9.

MACEDO A.M., MACHADO C.R., OLIVEIRA R.P. & PENA S.D. (2004). *Trypanosoma cruzi*: genetic structure of populations and relevance of genetic variability to the pathogenesis of chagas disease. Mem.Inst.Oswaldo Cruz 99, 1-12.

MACEDO A.M., SEGATTO, M. (2010) In: American Trypanosomiasis Chagas Disease: One Hundred Years of Research. Elsevier, London. Implications of *Trypanosoma cruzi* Intraspecific Diversity in the Pathogenesis of Chagas Disease, 489-508

MACHADO-DE-ASSIS GF, SILVA AR, DO BEM VA, BAHIA MT, MARTINS-FILHO OA, DIAS JC, ALBAJAR-VIÑAS P, TORRES RM, LANA M. Posttherapeutic cure criteria in Chagas' disease: conventional serology followed by supplementary serological, parasitological, and molecular tests. Clin Vaccine Immunol. 2012 Aug;19(8):1283-91.

MALTOS KL, MENEZES GB, CALIARI MV, ROCHA OA, SANTOS JM, ALVES DL, DUARTE ID, FRANCISCHI JN. Vascular and cellular responses to pro-inflammatory stimuli in rat dental pulp. Arch Oral Biol. 2004 Jun;49(6):443-50.

MANN ML, KELLEHER NL (2008). Precision proteomics: the case for high resolution and high mass accuracy. Proc Natl Acad Sci U S A. 105: 18132-8.

MARCILI A., VALENTE, V.C., VALENTE S.A., JUNQUEIRA A.C., DA SILVA F.M., PINTO A.Y., *et al.*,(2009b). *Trypanosoma cruzi* in Brazilian Amazonia: lineages TCI and TCIIa in wild primates, *Rhodnius* spp. and in humans with Chagas disease associated with oral transmission. Int. J. Parasitol. 39: 615-623.

MARTINS HR, FIGUEIREDO LM, VALAMIEL-SILVA JC, CARNEIRO CM, MACHADO-COELHO GL, VITELLI-AVELAR DM, BAHIA MT, MARTINS-FILHO OA, MACEDO AM, LANA M. Persistence of PCR-positive tissue in benznidazole-treated mice with negative blood parasitological and serological tests in dual infections with *Trypanosoma cruzi* stocks from different genotypes. J Antimicrob Chemother. 2008 Jun;61(6):1319-27.

MARTINS HR, SILVA RM, VALADARES HM, TOLEDO MJ, VELOSO VM, VITELLI-AVELAR DM, CARNEIRO CM, MACHADO-COELHO GL, BAHIA

MT, MARTINS-FILHO OA, MACEDO AM, LANA M. Impact of dual infections on chemotherapeutic efficacy in BALB/c mice infected with major genotypes of *Trypanosoma cruzi*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007 Sep;51(9):3282-9. Epub 2007 Jul 16.

MARTINS K, ANDRADE CDE M, BARBOSA-SILVA AN, DO NASCIMENTO GB, CHIARI E, GALVÃO LM, DA CÂMARA AC. *Trypanosoma cruzi* III causing the indeterminate form of Chagas disease in a semi-arid region of Brazil. *Int J Infect Dis*. 2015 Oct;39:68-75.

MARTINS-FILHO OA, PEREIRA ME, CARVALHO JF, CANÇADO JR, BRENER Z. Flow cytometry, a new approach to detect anti-live trypomastigote antibodies and monitor the efficacy of specific treatment in human Chagas' disease. *Clin Diagn Lab Immunol*. 1995 Sep;2(5):569-73.

MILES MA, POVOA MM, DE SOUZA AA, LAINSON R, SHAW JJ, KETTERIDGE DS (2004). Chagas's disease in the Amazon Basin: Ii. The distribution of *Trypanosoma cruzi* zymodemes 1 and 3 in Para State, north Brazil. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg*. 75, 667-674.

MILES MA, SOUZA A, POVOA M, SHAW JJ, LAINSON R, TOYE PJ. Isozymic heterogeneity of *Trypanosoma cruzi* in the first autochthonous patients with Chagas'disease in Amazonian Brazil. *Nature*. 1978 Apr 27;272(5656):819-21.

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

MIYAMOTO CT, GOMES ML, MARANGON AV, DE ARAÚJO SM, BAHIA MT, MARTINS-FILHO OA, DE LANA M, DE ORNELAS TOLEDO MJ. Usefulness of the polymerase chain reaction for monitoring cure of mice infected with different *Trypanosoma cruzi* clonal genotypes following treatment with benznidazole. *Exp Parasitol*. 2008 Sep;120(1):45-9.

MOREIRA AA, DE SOUZA HB, AMATO NETO V, MATSUBARA L, PINTO PL, TOLEZANO JE, NUNES EV, OKUMURA 1992. [Evaluation of the therapeutic activity of itraconazole in chronic infections, experimental and human, by *Trypanosoma cruzi*]. M. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 1992 Mar-Apr;34(2):177-80.

MOREL C, CHIARI E, CAMARGO EP, MATTEI DM, ROMANHA AJ, SIMPSON L. Strains and clones of *Trypanosoma cruzi* can be characterized by pattern of restriction endonuclease products of kinetoplast DNA minicircles. Proc Natl Acad Sci U S A. 1980 Nov;77(11):6810-4.

MURTA SM, NOGUEIRA FB, DOS SANTOS PF, CAMPOS FM, VOLPE C, LIARTE DB, NIRDÉ P, PROBST CM, KRIEGER MA, GOLDENBERG S, ROMANHA AJ. Differential gene expression in *Trypanosoma cruzi* populations susceptible and resistant to benznidazole. Acta Trop. 2008 Jul;107(1):59-65.

MURTA SM, ROMANHA AJ. In vivo selection of a population of *Trypanosoma cruzi* and clones resistant to benznidazole. Parasitology. 1998 Feb;116 ( Pt 2):165-71.

NAKAYASU ES, GAYNOR MR, SOBREIRA TJ, ROSS JA, ALMEIDA IC. Phosphoproteomic analysis of the human pathogen *Trypanosoma cruzi* at the epimastigote stage. Proteomics. 2009 Jul;9(13):3489-506.

NOGUEIRA-PAIVA NC, VIEIRA PM, OLIVERI LM, FONSECA KDA S, POUND-LANA G, DE OLIVEIRA MT, DE LANA M, VELOSO VM, REIS AB, TAFURI WL, CARNEIRO CM. Host-Parasite Interactions in Chagas Disease: Genetically Unidentical Isolates of a Single *Trypanosoma cruzi* Strain Identified In Vitro via LSSP-PCR. PLoS One. 2015 Sep 11;10(9):e0137788.

OLIVEIRA MT, DE ASSIS GF, OLIVEIRA E SILVA JC, MACHADO EM, DA SILVA GN, VELOSO VM, MACEDO AM, MARTINS HR, DE LANA M. *Trypanosoma cruzi* Discret Typing Units (TcII and TcVI) in samples of patients from two municipalities of the Jequitinhonha Valley, MG, Brazil, using two molecular typing strategies. Parasit Vectors. 2015 Oct 31;8:568.

OLIVEIRA EC, STEFANI MM, CAMPOS DE, ANDRADE AL, SILVA SA, RASSI A, LUQUETTI AO. *Trypanosoma cruzi* stocks isolated from acute Chagas disease patients lead to lethal murine infection. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1997 Jan-Feb;91(1):25-7.

OLIVEIRA-SILVA JC, MACHADO-DE-ASSIS GF, OLIVEIRA MT, PAIVA NC, ARAÚJO MS, CARNEIRO CM, MARTINS-FILHO OA, MARTINS HR, LANA MD. Experimental benznidazole treatment of *Trypanosoma cruzi* II strains isolated from children of the Jequitinhonha Valley, Minas Gerais, Brazil, with Chagas disease. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2015 Feb;110(1):86-94

PINTO AS, DE LANA M, BASTRENTA B, BARNABÉ C, QUESNEY V, NOËL S, TIBAYRENC M. Compared vectorial transmissibility of pure and mixed clonal genotypes of *Trypanosoma cruzi* in *Triatoma infestans*. Parasitol Res. 1998 May;84(5):348-53.

PIZZI T. [Predominant pancreatic localization and phenomena of steatonecrosis in mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*]. Bol Inf Parasit Chil. 1953 Jan-Mar;8(1):11-13.

POLAK A, RICHLE R 1978. Mode of action of the 2-nitroimidazole derivative benznidazole. Ann Trop Med Parasitol. 1978 Feb;72(1):45-54.

RASSI A (1992). Etiological treatment of Chagas' disease. Arq Bras.Cardiol. 38, 277-281.

RASSI A JR, RASSI A (2013). Letter by Rassi and Rassi regarding article, "Ten-year incidence of Chagas cardiomyopathy among asymptomatic, *Trypanosoma cruzi*-seropositive former blood donors". Circulation. 128: e135.

RASSI A JR, RASSI A, MARIN-NETO JA (2010). CHAGAS DISEASE. Lancet. 375: 1388-402. Review.

REVOLLO S., OURY B., LAURENT J.P., BARNABE C., QUESNEY V., CARRIERE V., NOEL S., TIBAYRENC M. (1998). *Trypanosoma cruzi*: impact of clonal evolution of the parasite on its biological and medical properties. *Exp. Parasitol.* 89: 30-39.

REZENDE J.M. & MOREIRA H. (1997). Megacolon chagásico. In: Porto, JAF, ed. *Clínica das doenças intestinais*. Atheneu 481-474.

RICHTER K, HASLBECK M, BUCHNER J (2010) The heat shock response: life on the verge of death. *Mol.*

RIMOLDI A, TOMÉ ALVES R, AMBRÓSIO DL, FERNANDES MZ, MARTINEZ I, DE ARAÚJO RF, CICARELLI RM, DA ROSA JA. Morphological, biological and molecular characterization of three strains of *Trypanosoma cruzi* Chagas, 1909 (Kinetoplastida, Trypanosomatidae) isolated from *Triatoma sordida* (Stal) 1859 (Hemiptera, Reduviidae) and a domestic cat. *Parasitology*. 2012 Jan;139(1):37-44.

RISSO MG, SARTOR PA, BURGOS JM, BRICEÑO L, RODRÍGUEZ EM, GUHL F, CHAVEZ OT, ESPINOZA B, MONTEÓN VM, RUSSOMANDO G, SCHIJMAN AG, BOTTASSO OA, LEGUIZAMÓN MS. Immunological identification of *Trypanosoma cruzi* lineages in human infection along the endemic area. *Am J Trop Med Hyg*. 2011 Jan;84(1):78-84.

ROMANHA AJ, CASTRO SL, SOEIRO MDE N, LANNES-VIEIRA J, RIBEIRO I, TALVANI A, BOURDIN B, BLUM B, OLIVIERI B, ZANI C, SPADAFORA C, CHIARI E, CHATELAIN E, CHAVES G, CALZADA JE, BUSTAMANTE JM, FREITAS-JUNIOR LH, ROMERO LI, BAHIA MT, LOTROWSKA M, SOARES M, ANDRADE SG, ARMSTRONG T, DEGRAVE W, ANDRADE ZDE A 2010. *In vitro* and *in vivo* experimental models for drug screening and development for Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2010 Mar;105(2):233-8.

ROMANHA AJ, DA SILVA PEREIRA AA, CHIARI E, KILGOUR V. Isoenzyme patterns of cultured *Trypanosoma cruzi*: changes after prolonged subculture. *Comp Biochem Physiol B*. 1979;62(2):139-42.



SANTOS DM, MARTINS TA, CALDAS IS, DINIZ LF, MACHADO-COELHO GL, CARNEIRO CM, OLIVEIRA RDE P, TALVANI A, LANA M, BAHIA MT. Benznidazole alters the pattern of Cyclophosphamide-induced reactivation in experimental *Trypanosoma cruzi*-dependent lineage infection. *Acta Trop*. 2010 Feb;113(2):134-8.

SANTOS DM, TALVANI A, GUEDES PM, MACHADO-COELHO GL, DE LANA M, BAHIA MT (2009). *Trypanosoma cruzi*: Genetic diversity influences the profile of immunoglobulins during experimental infection. *Exp Parasitol*.121: 8-14.

SANTOS LDA S, TORRES RM, MACHADO-DE-ASSIS GF, BAHIA MT, MARTINS HR, TEIXEIRA-CARVALHO A, COELHO-DOS-REIS JG, ALBAJAR-VIÑAS P, MARTINS-FILHO OA, LANA MD (2012). In-house ELISA method to analyze anti-*Trypanosoma cruzi* IgG reactivity for differential diagnosis and evaluation of Chagas disease morbidity. *Rev Soc Bras Med Trop* 45:35-44.

SCHMUNIS GA, YADON ZE (2010). Chagas disease: a Latin American health problem becoming a world health problem. *Acta Trop*115: 14-21.

SCHOFIELD CJ, JANNIN J, SALVATELLA R (2006). The future of Chagas disease control. *Trends Parasitol*. 22, 583-588.

SHONHAI A, MAIER AG, PRZYBORSKI JM, BLATCH GL. Intracellular protozoan parasites of humans: the role of molecular chaperones in development and pathogenesis. *Protein Pept Lett*. 2011 Feb;18(2):143-57.

SILVA JC, ASSIS GF, OLIVEIRA MT, VALADARES HM, VALLE IF, PAIVA NC, MARTINS HR, LANA Md. Molecular and biological characterization of *Trypanosoma cruzi* strains isolated from children from Jequitinhonha Valley, State of Minas Gerais, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2013 Jul-Aug;46(4):433-40.

SILVA, J. TAVARES, R. SILVESTRE, A. OUAISSI, G. H. COOMBS<sup>3</sup> & A. CORDEIRO-DA-SILVA<sup>1,2</sup> Characterization of *Leishmania infantum* thiol-dependent reductase 1 and evaluation of its potential to induce immune protection. *Parasite Immunology*, 2012, 34, 345–350.

SILVA, L.H.P.; NUSSENZWEIG, V. Sobre uma cepa de *Trypanosoma cruzi* altamente virulenta para o camundongo branco. *Folia Clin. Biol.*, v.20, p.191-203, 1953.

SODRÉ CL, CHAPEAUROUGE AD, KALUME DE, DE MENDONÇA LIMA L, PERALES J, FERNANDES O. (2009). Proteomic map of *Trypanosoma cruzi* CL Brener: the reference strain of the genome project. *Arch Microbiol.* 191: 177-84.

SOLARI A, WALLACE A, ORTIZ S, VENEGAS J, SANCHEZ G (1998) Biological characterization of *Trypanosoma cruzi* stocks from Chilean insect vectors. *Exp Parasitol.* 89: 312-22.

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

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

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

STEINDEL M, KRAMER PACHECO L, SCHOLL D, SOARES M, DE MORAES MH, EGER I, KOSMANN C, SINCERO TC, STOCO PH, MURTA SM, DE CARVALHO-PINTO CJ, GRISARD EC. Characterization of *Trypanosoma cruzi* isolated from humans, vectors, and animal reservoirs following an outbreak of acute human Chagas disease in Santa Catarina State, Brazil. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2008 Jan;60(1):25-32. Epub 2007 Sep 24.

TANOWITZ HB, KIRCHHOFF LV, SIMON D, MORRIS SA, WEISS LM, WITTNER M (1992). Chagas' disease. *Clin Microbiol Rev.* 5 : 400-19.

TATE EW (2008). Recent advances in chemical proteomics: exploring the post-translational proteome. *J Chem Biol.* 1:17-26.

TELLERIA J, BIRON DG, BRIZARD JP, DEMETTRE E, SÉVENO M, BARNABÉ C, AYALA FJ, TIBAYRENC M. Phylogenetic character mapping of proteomic diversity shows high correlation with subspecific phylogenetic diversity in *Trypanosoma cruzi*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2010 Nov 23;107(47):20411-6. Epub 2010 Nov 8.

TESTON AP, MONTEIRO WM, REIS D, BOSSOLANI GD, GOMES ML, DE ARAÚJO SM, BAHIA MT, BARBOSA MG, TOLEDO MJ. In vivo susceptibility to benznidazole of *Trypanosoma cruzi* strains from the western Brazilian Amazon. Trop Med Int Health. 2013 Jan;18(1):85-95.

TIBAYRENC M, BRENIERE SF. *Trypanosoma cruzi*: major clones rather than principal zymodemes. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1988 Nov;83 Suppl 1:249-55.

TIBAYRENC M., BRENIÈRE S.F. (1989). *Trypanosoma cruzi*: major clones rather than principal zymodemes. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 83: 249-255.

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

TIBAYRENC M, WARD P, MOYA A, AYALA FJ. Natural populations of *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease, have a complex multiclonal structure. Proc Natl Acad Sci U S A. 1986 Jan;83(1):115-9.

TOLEDO M.J., BAHIA M.T., CARNEIRO C.M., MARTINS-FILHO O.A., TIBAYRENC M., BARNABE C., TAFURI W.L., LANA M. (2003). Chemotherapy with benznidazole and itraconazole for mice infected with different *Trypanosoma cruzi* clonal genotypes. Antimicrob. Agents Chemother. 47: 223-230.

TOLEDO M.J., BAHIA M.T., VELOSO V.M., CARNEIRO C.M., MACHADO-COELHO G.L., ALVES C.F., MARTINS H.R., CRUZ R.E., TAFURI W.L. & LANA M. (2004a). Effects of specific treatment on parasitological and histopathological

parameters in mice infected with different *Trypanosoma cruzi* clonal genotypes. J. Antimicrob. Chemother. 53: 1045-1053.

TOLEDO M.J., GUILHERME A.L., DA SILVA J.C., DE GASPERI M.V., MENDES A.P., GOMES M.L., DE ARAUJO S.M. (1997). *Trypanosoma cruzi*: chemotherapy with benznidazole in mice inoculated with strains from Parana state and from different endemic areas of Brazil. Rev. Inst. Med. Trop. 39: 283-290.

TOLEDO M.J., LANA M., CARNEIRO C.M., BAHIA M.T., MACHADO-COELHO G.L., VELOSO V.M., BARNABE C., TIBAYRENC M., TAFURI W.L. (2002). Impact of *Trypanosoma cruzi* clonal evolution on its biological properties in mice. Exp. Parasitol. 100: 161-172.

TOLEDO M.J.O., TAFURI W.L., BAHIA M.T., TIBAYREC M., LANA M. (2004b). Genetic diversity and drug resistance in *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease. Antimicrob. Agents Chemother. 11- 22.

TOLEDO MJ, BAHIA MT, CARNEIRO CM, MARTINS-FILHO OA, TIBAYRENC M, BARNABÉ C, TAFURI WL, DE LANA M. Chemotherapy with benznidazole and itraconazole for mice infected with different *Trypanosoma cruzi* clonal genotypes. Antimicrob Agents Chemother. 2003 Jan;47(1):223-30.

TOLEDO MJ, BAHIA MT, VELOSO VM, CARNEIRO CM, MACHADO-COELHO GL, ALVES CF, MARTINS HR, CRUZ RE, TAFURI WL, LANA M. Effects of specific treatment on parasitological and histopathological parameters in mice infected with different *Trypanosoma cruzi* clonal genotypes. J Antimicrob Chemother. 2004 Jun;53(6):1045-53. Epub 2004 Apr 21.

TOLEDO MJ, DE LANA M, CARNEIRO CM, BAHIA MT, MACHADO-COELHO GL, VELOSO VM, BARNABÉ C, TIBAYRENC M, TAFURI WL. Impact of *Trypanosoma cruzi* clonal evolution on its biological properties in mice. Exp Parasitol. 2002 Mar;100(3):161-72.

TOMLINSON, S. *et al.* The induction of *Trypanosoma cruzi* trypomastigote to amastigote transformation by low pH. Parasitology, v. 110 ( Pt 5), p. 547-54, Jun 1995.

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

URMÉNYI TP, SILVA R, RONDINELLI E. The heat shock proteins of *Trypanosoma cruzi*. *Subcell Biochem.* 2014;74:119-35.

VAGO AR, ANDRADE LO, LEITE AA, D'AVILA REIS D, MACEDO AM, ADAD SJ, TOSTES S JR, MOREIRA MC, FILHO GB, PENA SD (2000). Genetic characterization of *Trypanosoma cruzi* directly from tissues of patients with chronic Chagas disease: differential distribution of genetic types into diverse organs. *Am J Pathol.* May;156(5):1805-9.

VALENTE SA, DA COSTA VALENTE V, DAS NEVES PINTO AY, DE JESUS BARBOSA CÉSAR M, DOS SANTOS MP, MIRANDA CO, CUERVO P, FERNANDES O (2009). Analysis of an acute Chagas disease outbreak in the Brazilian Amazon: human cases, triatomines, reservoir mammals and parasites. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 103(3): 291-7.

VANHAMME, L.; PAYS, E 1995. Control of gene expression in trypanosomes. *Microbiol Rev*, v. 59, n. 2, p. 223-40, Jun 1995.

VIOTTI R, VIGLIANO C, LOCOCO B, BERTOCCHI G, PETTI M, ALVAREZ MG, POSTAN M, ARMENTI A. Long-term cardiac outcomes of treating chronic Chagas disease with benznidazole versus no treatment: a nonrandomized trial. *Ann Intern Med.* 2006 May 16;144(10):724-34.

VOLLER A., DRAPER C., BIDWELL D.E., BARTLETT A.A. (1975). Microplate enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for Chagas disease. *Lancet* 305: 426-428.

VONLAUFEN N, KANZOK SM, WEK RC, SULLIVAN WJ (2008) Stress response pathways in protozoan.

WENDLING AP, VITELLI-AVELAR DM, SATHLER-AVELAR R, GEIGER SM, TEIXEIRA-CARVALHO A, GONTIJO ED, ELÓI-SANTOS SM, MARTINS-FILHO OA. The use of IgG antibodies in conventional and non-conventional

immunodiagnostic tests for early prognosis after treatment of Chagas disease. J Immunol Methods. 2011 Jul 29;370(1-2):24-34.

WESTENBERGER SJ, STURM NR, CAMPBELL DA. *Trypanosoma cruzi* 5S rRNA arrays define five groups and indicate the geographic origins of an ancestor of the heterozygous hybrids. Int J Parasitol. 2006 Mar;36(3):337-46. Epub 2005 Dec 5.

WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION 2014. Chagas disease (American trypanosomiasis) Fact sheet N°340

WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION) (2002) Control of Chagas disease. WHO technical report series 905, World Health Organization, Geneva.

WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION) (2010). Working to overcome the global impact of neglected tropical diseases First WHO report on neglected tropical diseases.

ZINGALES B., ANDRADE S.G., BRIONES M.R.S., CAMPBELL D.A., CHIARI E., FERNANDES O., GUHL F., LAGES-SILVA E., MACEDO A.M., MACHADO C.R., MILES M.A., ROMANHA A.J., STURM N.R., TIBAYRENC M., SCHIJMAN A.G. (2009). A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraespecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 104: 1051-1054.

ZINGALES B, GOLGHER DB, MARMORATO PG, SOUTO RP, GRUBER A. Molecular approaches to diagnosis of Chagas' disease: use of defined antigens and a target ribosomal RNA sequence. Biol Res. 1993;26(1-2):89-100.

ZINGALES, B., MILES M.A., CAMPBELL D.A., TIBAYRENC M., MACEDO A.M., TEIXEIRA, M.M.G., SCHIJMAN A.G., LLEWELLYN, M.S., LAGES-SILVA, E., MACHADO, C.R., ANDRADE, S.G., STURM N.R. (2012). The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: Rationale, epidemiological relevance and research applications. Infect. Gene t. Evolut. 12: 240-253.

**10.0 ANEXOS:**

The screenshot shows the Editorial Manager interface for the journal *Parasites & Vectors*. The user is logged in as 'Author' with the username 'delana'. The page displays 'Submissions Being Processed for Author Marta Lana, PhD'.

Page: 1 of 1 (1 total submissions)      Display 10 results per page.

Action	Manuscript Number	Title	Initial Date Submitted	Status Date	Current Status
<a href="#">Action Links</a>	PARV-D-16-00334	Biological properties of TcI, TcVI and TcII Trypanosoma cruzi isolates from Chagas disease patients with distinct clinical forms: a critical analysis of in vitro and in vivo behavior besides the response to treatment.	23 Mar 2016	28 Mar 2016	Under Review

Page: 1 of 1 (1 total submissions)      Display 10 results per page.

<< Author Main Menu