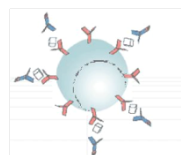
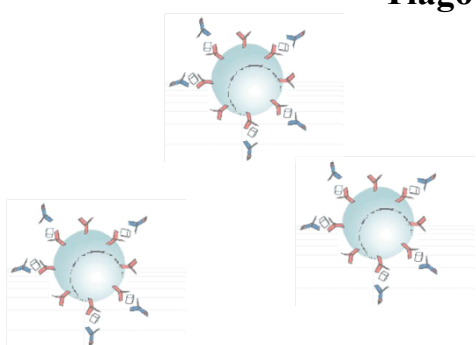


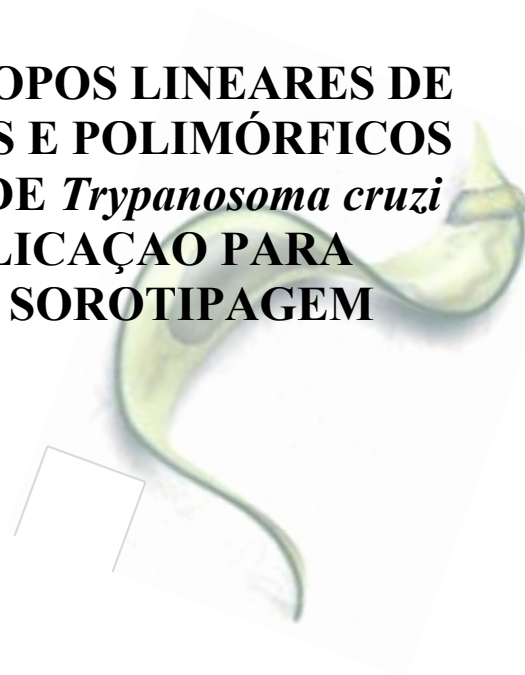
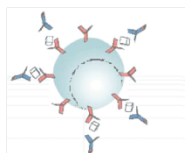
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PARASITOLOGIA



Tiago Antônio de Oliveira Mendes



**IDENTIFICAÇÃO DE EPITOPOS LINEARES DE
CÉLULA B CONSERVADOS E POLIMÓRFICOS
EM DIFERENTES CEPAS DE *Trypanosoma cruzi*
COM POTENCIAL APLICAÇÃO PARA
SORODIAGNÓSTICO E SOROTIPAGEM**



Belo Horizonte
2011

Tiago Antônio de Oliveira Mendes

**IDENTIFICAÇÃO DE EPITOPOS LINEARES DE
CÉLULA B CONSERVADOS E POLIMÓRFICOS
EM DIFERENTES CEPAS DE *Trypanosoma cruzi*
COM POTENCIAL APLICAÇÃO PARA
SOROTIPAGEM**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito para obtenção do título de Mestre em Parasitologia.

Orientadora: Daniella Castanheira Bartholomeu

Área de concentração: Imunoparasitologia

Belo Horizonte
2011

*Aos meus pais, Catarina e Marco Antônio e minha
irmã Débora pelo amor incondicional, apoio
e incentivo durante esta caminhada.*

"Não deixe que a saudade sufoque, que a rotina acomode, que o medo impeça de tentar. Desconfie do destino e acredite em você. Gaste mais horas realizando que sonhando, fazendo que planejando, vivendo que esperando, porque embora quem quase morre esteja vivo, quem quase vive já morreu."

Luis Fernando Veríssimo

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Daniella Castanheira Bartholomeu pela oportunidade e por acreditar em mim. Muito obrigado por sua dedicação a este projeto. Sua ética e competência são exemplos que levarei para minha vida toda.

À minha família, que é a base e a força propulsora de todas as minhas conquistas.

Ao Prof. Ricardo Fujiwara pelos bons conselhos e investimento que tornou este projeto possível.

Aos professores, alunos e funcionários da Pós-graduação em Parasitologia que contribuíram para meu aprimoramento como pesquisador e pessoa e a Fapemig que me concedeu a bolsa.

Ao Prof. Ricardo Gazzinelli, Eneida, Mirinha, Marcus Penido, Mario Giusta e toda a equipe do IMPAR/UFMG pelo valioso auxílio e disponibilidade do laboratório e equipamentos.

Prof.^a Juliana Estanislau, Prof. Mauro Teixeira, Prof. Robert Gilman pelas amostras de soro e sangue e a Prof.^a Andrea Macedo pelas amostras de DNA que contribuíram para este trabalho.

Aos membros da banca pela disponibilidade em avaliarem este trabalho.

Aos antigos e novos colegas do LIGP/UFMG: Michelle, João, Gabi, Chico, Ana Rita, Lucas, Jaqueline, Leandro, Rodrigo, Rondon, Ana Carolina, Carol, Any, Pedro, Sarinha, Natasha, Simara, Patrícia, Ronize, Fernando, Lilian e Jefferson pela boa convivência. Obrigado pelos momentos de discussão e descontração que tornaram esta caminhada mais leve e bem divertida.

Aos meus amigos da Farmácia Aliani, Andréia, Léo, Lili e demais colegas que sonharam comigo em contruir uma profissão sólida e de sucesso. Apesar da jornada apenas ter começado, acredito estarmos no caminho certo...

Aos amigos Viviane, Rafael, Paula, Sara e Michelle do CEFET pelos melhores momentos . E pensar que química era difícil né...

À Rutinha, Luciana e demais colegas da turma de mestrado 2010.

Ao meu amigo Giba que mesmo à 1712 km de distância é uma das pessoas mais presente em minha vida.

Aos portadores da doença de Chagas, ao qual espero que este trabalho contribua de alguma forma para melhoria da qualidade de vida.

SUMÁRIO

RESUMO	1
ABSTRACT	3
1 INTRODUÇÃO	5
1.1 Ciclo de vida do <i>T. cruzi</i> e a doença de Chagas	5
1.2 Diagnóstico da doença de Chagas	8
1.3. Variabilidade genética de <i>T. cruzi</i>	9
1.4 Genotipagem e sorotipagem dos parasitos	11
1.5 O genoma da cepa CL Brener	13
2 JUSTIFICATIVA E MOTIVAÇÃO	16
3 OBJETIVOS	18
3.1 Objetivos Gerais	18
3.2 Objetivos Específicos	18
4 MATERIAIS E MÉTODOS	20
4.1 Reagentes e produtos	20
4.2 Bancos de dados	21
4.3 Identificação <i>in silico</i> de epítopos lineares de células B	22
4.4 Parasitos	24
4.5 Camundongos infectados com <i>T. cruzi</i>	25
4.6 Camundongos infectados com <i>T. rangeli</i>	26
4.7 Soroteca de cobaias infectados com <i>T. cruzi</i>	27
4.8 Soroteca de pacientes chagásicos tipados	27
4.9 Sorotecas de pacientes chagásicos com diferentes formas clínicas da doença	27
4.10 Soroteca de pacientes com leishmaniose	27
4.11 Extração de DNA	28
4.12 Diagnóstico molecular de <i>T. cruzi</i>	28
4.13 Genotipagem dos parasitos	29

4.14 Diagnóstico molecular de <i>L. braziliensis</i>	30
4.15 Diagnóstico molecular de <i>T. rangeli</i>	30
4.16 Spot síntese	31
4.17 Immunoblotting	31
4.18 Síntese dos peptídeos em solução	32
4.19 Preparação do antígeno bruto	33
4.20 ELISA	34
4.21 ELISA de avidéz	34
4.22 Ala scan	35
4.23 Identificação de padrões no proteoma de parasitos	36
4.17 Análise estatística	36
5 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	38
6 RESULTADOS	40
6.1 Seleção in silico de peptídeos polimórficos e conservados na cepa CL Brener utilizando predição de epitopo de célula B	40
6.2 Caracterização dos soros usados neste estudo	42
6.2.1 Soro de camundongos C57BL/6 cronicamente infectados com diferentes cepas de <i>T. cruzi</i>	42
6.4.2 Soro de cobaias (<i>C. porcellus</i>) infectados com a cepa Y após diferentes dias de infecção	45
6.4.3 Soro de camundongos infectados com <i>T. rangeli</i>	46
6.4.4 Pacientes com leishmaniose	47
6.4.5 Pacientes chagásicos tipados e com diferentes formas clínicas da doença de Chagas	49
6.3 Triagem dos peptídeos por “immunoblotting”	50
6.4 Seleção de peptídeos para síntese solúvel	51
6.5 Validação dos peptídeos	54
6.5.1 Validação e caracterização do peptídeo conservado C6_30_cons	54
6.5.2 Validação e caracterização do peptídeo conservado B7_30_cons	59
6.5.3 Validação e caracterização dos peptídeos com reatividade específica para a cepa Colombiana baseado nos experimentos de imunoblotting	65

6.5.4 Validação e caracterização dos peptídeos com reatividade específica para a cepa Y	70
6.5.5 Validação e caracterização dos peptídeos com reatividade específica para a cepa CL Brener	74
7 DISCUSSÃO	78
7.1 Sorodiagnóstico	81
7.2 Sorotipagem	85
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	90
ANEXO 1 – Certificado do Comitê de Ética	104

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Ciclo de vida do <i>T. cruzi</i>	7
FIGURA 2 – Relação filogenética entre as seis linhagens Tc I-VI de <i>T. cruzi</i>	10
FIGURA 3 – Discriminação das linhagens de <i>T. cruzi</i> utilizando três marcadores moleculares	13
FIGURA 4 – Comparação da arquitetura genômica de tripanossomatídeos	15
FIGURA 5 – Pipeline para identificação de epítopos polimórficos e conservados <i>T. cruzi</i> específicos	23
FIGURA 6 – Delineamento experimental	38
FIGURA 7 – Correspondência entre epítopos preditos e experimentalmente mapeados proteína L7a de <i>T. cruzi</i>	40
FIGURA 8 – Genotipagem de tripomastigotas de cultura de três cepas de <i>T. cruzi</i> ..	43
FIGURA 9 – Reconhecimento do antígeno bruto da cepa CL Brener de <i>T. cruzi</i> por IgG presente no soro de camundongos infectados por diferentes cepas do parasito	45
FIGURA 10 – Dinâmica do reconhecimento do antígeno bruto de <i>T. cruzi</i> por soro de cobaias infectados	46
FIGURA 11 – Camundongos C57BL/6 infectados com <i>T. rangeli</i>	47
FIGURA 12 – Amostras de pacientes infectados com <i>L. braziliensis</i>	48
FIGURA 13 – Reconhecimento dos antígeno bruto de <i>T. cruzi</i> por soro de pacientes chagásicos	49
FIGURA 14 – Pacientes não infectados utilizados como controle negativo	50
FIGURA 15 – Padrão de reconhecimento da membrana por soro de animais infectados por diferentes cepas do parasito	52
FIGURA 16 – Distribuição do número de peptídeos reconhecidos por soro de animais infectados por diferentes cepas de <i>T. cruzi</i>	52
FIGURA 17 – Validação e caracterização da reatividade do peptídeo conservado C6_30_cons	55
FIGURA 18 – Avaliação de reação cruzada do peptídeo C6_30_cons com outros tripanossomatídeos	56

FIGURA 19 – Mapeamento dos aminoácidos de importância para interação com anticorpos de animais infectados com diferentes cepas de <i>T. cruzi</i> com o peptídeo conservado C6_30_cons	57
FIGURA 20 – Reatividade do peptídeo conservado C6_30_cons contra soro de pacientes chagásicos	58
FIGURA 21 – Validação e caracterização da reatividade do peptídeo conservado B7_30_cons	60
FIGURA 22 – Avaliação de reação cruzada do peptídeo B7_30_cons com outros tripanossomatídeos	62
FIGURA 23 – Mapeamento dos aminoácidos de importância para interação com anticorpos de animais infectados com <i>T. cruzi</i> e <i>L. braziliensis</i> com o peptídeo conservado B7_30_cons	63
FIGURA 24 – Reatividade do peptídeo conservado B7_30_cons contra soro de pacientes chagásicos	65
FIGURA 25 – Validação e caracterização da reatividade do peptídeo A6_30_col	67
FIGURA 26 – Avaliação de reação cruzada do peptídeo A6_30_col com outros tripanossomatídeos	68
FIGURA 27 – Mapeamento dos aminoácidos que interagem com anticorpos de animais infectados com <i>T. cruzi</i> com o peptídeo A6_30_col	68
FIGURA 28 – Reatividade do peptídeo A6_30_col contra soro de pacientes chagásicos	69
FIGURA 29 – Validação e caracterização da reatividade do peptídeo B2_30_Y	71
FIGURA 30 – Avaliação de reação cruzada do peptídeo B2_30_Y com outros tripanossomatídeos	72
FIGURA 31 – Mapeamento dos Aminoácidos que interagem com anticorpos de animais infectados com <i>T. cruzi</i> com o peptídeo B2_30_Y	73
FIGURA 32 – Reatividade do peptídeo conservado B2_30_Y contra soro de pacientes chagásico	73
FIGURA 33 – Validação e caracterização da reatividade do peptídeo B9_30_cl	75
FIGURA 34 – Avaliação de reação cruzada do peptídeo B9_30_cl com outros tripanossomatídeos	76
FIGURA 35 – Mapeamento dos aminoácidos que interagem com anticorpos de animais infectados com <i>T. cruzi</i> com o peptídeo B9_30_cl	76

FIGURA 36 – Reatividade do peptídeo B9_30_cl contra soro de pacientes chagásicos77

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Pontuação de alinhamento entre proteínas Esmo e Non-esmo de <i>T. cruzi</i>	24
TABELA 2 – Cepas de <i>T. cruzi</i> utilizadas	25
TABELA 3 – Primers e programas utilizados para PCR dos marcadores dos grupos de <i>T. cruzi</i>	29
TABELA 4 – Perfil dos fragmentos esperados dos marcadores moleculares para cada linhagem de <i>T. cruzi</i>	30
TABELA 5 – Parasitemia por exame a fresco dos animais infectados com diferentes cepas de <i>T. cruzi</i>	44
TABELA 6 – Peptídeos reativos com soro de camundongos infectados com diferentes cepas de <i>T. cruzi</i>	52
TABELA 7 – Proteínas de <i>L. braziliensis</i> contendo a sequência RXRQXQQ	64

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de variância
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BSA	Albumina sérica bovina
CCC1	Cardiopatía chagásica de grau 1
CCCG	Cardiopatía chagásica grave
CETEA	Comitê de Ética em Experimentação <i>Animal</i>
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
COII	Citocromo oxidase II
CRA	<i>Cytoplasmic Repetitive Antigen</i>
DCM	Diclorometano
DIC	N,N'-diisopropilcarbodiimida
DMEN	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMF	N,N-dimetilformamida
DNA	Ácido desoxiribonucléico
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
EMBOSS	<i>European Molecular Biology Open Software Suite</i>
Fmoc	Fluorenylmethyloxycarbonyl chloride
FRA	<i>Flagellar Repetitive Antigen</i>
HAI	Hemaglutinação indireta
HOBt	Hidroxibenzotriazol
HPLC	<i>High-performance liquid chromatography</i>
IFI	Imunofluorescência indireta
ITS	<i>Internal transcribed spacer</i>
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
kDNA	DNA do kinetoplasto
LIT	<i>Liver Infusion Triptose</i>
MALDI	<i>Matrix-assisted laser desorption/ionization</i>
OPD	<i>O-phenylenediamine</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PERL	<i>Practical Extraction and Report Language</i>

PVC	Cloreto de polivinila
rDNA	DNA codificante para RNA ribossomal
RNA	Ácido ribonucléico
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SDS	Dodecil sulfato de sódio
TAU	Triatomine <i>Artificial Urine</i>
TFA	Ácido trifluoroacético
TOF	<i>Time-of-flight</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>

RESUMO

Durante a fase crônica da doença de Chagas, devido a baixa parasitemia e altos títulos de anticorpos anti-*T.cruzi*, o diagnóstico é realizado preferencialmente por testes sorológicos. Porém, resultados inconclusivos ou contraditórios principalmente relacionados as características dos antígenos utilizados são observados. Os fatores que influenciam as manifestações clínicas da doença de Chagas não são bem conhecidos, mas ambas as variações genéticas dos hospedeiros e do parasito parecem estar envolvidos. Vários estudos tentando correlacionar a cepa de *T. cruzi* envolvida na infecção com manifestações clínicas da doença, usando hemocultura e/ou genotipagem baseada em PCR dos parasitos originados de tecidos humanos infectados, porém, ambas as técnicas possuem limitações. O objetivo deste trabalho foi identificar epitopos lineares de célula B conservados e polimórficos entre as cepas de *T. cruzi* por predição *in silico* e triagem experimental. Proteínas derivadas de genes cópias simples representados por pares de alelos no genoma de CL Brener foram os alvos deste estudo. Esta estratégia foi utilizada porque CL Brener é um recente híbrido entre as linhagens TcII e Tc III, e epitopos polimórficos existentes entre os pares de alelos de CL Brener podem também ser polimórficos nos genótipos parentais. A reatividade de 150 peptídeos foi avaliada utilizando soro de camundongos C57BL/6 cronicamente infectados com as cepas Y (TcII), Colombiana (TcI) e CL Brener (TcVI) de *T. cruzi*. Um total de 36 peptídeos foram considerado reativos e a reatividade cruzada entre as cepas está em concordância com a origem evolucionária das diferentes linhagens de *T. cruzi*. Dois peptídeos similarmente reativos com as diferentes cepas e três com reatividade específica para cada cepa foram sintetizados em solução e testados em experimentos de ELISA e ELISA de afinidade. Um dos peptídeos com reatividade similar entre as cepas apresentou reatividade sem diferença estatística entre as cepas e foi reconhecido por anticorpos de média afinidade com uma especificidade de 93% e sensibilidade de 87%. Este peptídeo também foi diferencialmente reconhecido por soros de pacientes chagásicos com a forma cardíaca quando comparado com soro de pacientes com a forma indeterminada da doença e poderiam ser usado, além do sorodiagnóstico, para prognóstico ou auxílio na identificação de manifestações clínicas. O outro apresentou baixos valores de especificidade de (35%) e de sensibilidade (58%). O peptídeo reativo com a cepa Y também foi reativo com soro de pacientes infectados com TcI e

os aminoácidos críticos para o reconhecimento por anticorpos foram identificados apenas no par de alelo pertencente ao haplótipo Esmo. De forma contrária, o peptídeo reativo apenas com Colombiana não foi reconhecido por soro de pacientes chagásicos infectados com TcII e o mapeamento dos aminoácidos mostrou que apenas o par de alelo do haplótipo Non-esmo possui o padrão de ligação a anticorpos. O último peptídeo discriminou corretamente a cepa CL Brener. Os três peptídeos polimórficos foram derivados de regiões repetitivas e juntos apresentaram um alto potencial uso para sorotipagem do parasito.

ABSTRACT

During chronic phase of Chagas disease, because of the low parasitemia and high anti-*T. cruzi* antibody titers, the diagnosis is made preferably by serological tests. However, contradictory or inconclusive results mainly related to the characteristics of the antigens used are observed. The factors influencing the variation in the clinical manifestation of Chagas disease have not been elucidated, but it is likely that genetic of the host and parasite is involved. Several studies trying to correlate the parasite strain and clinical manifestation have used hemoculture or PCR-based genotyping. However, both techniques have limitations. The goal of this work is to identify *T. cruzi* conserved and polymorphic B-cell linear epitopes that could be used for serodiagnostic and serotyping using ELISA. We have performed B-cell epitope prediction on proteins derived from single copy genes represented by pair of alleles in the CL Brener genome. The rationale behind this strategy is that because CL Brener is a recent hybrid between TcII and TcIII lineages, it is likely that polymorphic epitopes in its pair of alleles could also be polymorphic in the parental genotypes. The reactivity of 150 peptides has been tested using sera from C57BL/6 mice chronically infected with Colombiana (TcI) and CL Brener (TcVI) clones and Y (TcII) strain. A total of 36 peptides were reactive and the cross-reactivity between the strains is in agreement with the evolutionary origin of the different *T. cruzi* lineages. Two peptides similarly reactive with different strains and three with reactivity specific for each strain were synthesized in solution and tested in ELISA and ELISA affinity experiments. One of the peptides with similar reactivity showed no statistical difference between the strains and was recognized by intermediate affinity antibodies with 93% of specificity and sensitivity of 87%. This peptide was also differentially recognized by sera from chagasic patients with the cardiac form compared with serum from patients with the indeterminate form of the disease. In addition to the serodiagnosis, it could be used to prognosis or to aid in the identification of clinical manifestations. The other peptide had low specificity (35%) and sensitivity (58%) values. The peptide reactive with the Y strain was also reactive with sera from patients infected with TcII and the amino acid critical for recognition by antibodies were identified only in the allele of haplotype Esmo. Conversely, the peptide reactive only with Colombia was not recognized by sera from patients infected with TcII and

mapping of the amino acids showed that only the allele of Non-esmo haplotype has the pattern of antibodies binding. The last peptide correctly discriminated strain CL Brener. The three peptides were derived from polymorphic repetitive regions and together had a high potential use for serotyping of the parasite.

1 INTRODUÇÃO

Doenças infecciosas causadas por protozoários continuam a ser uma das maiores causas de mortalidade em países pobres e em desenvolvimento (WHO, 2007). Dentre elas está a doença de Chagas, uma zoonose causada pelo parasito hemoflagelado *Trypanosoma cruzi* que está presente em 18 países da América Latina, do norte do México ao sul da Argentina. Segundo estimativas, 10 milhões de pessoas estão infectadas, 21.000 mortes ocorrem anualmente e são diagnosticados cerca de 50-200 mil novos casos por ano (WHO, 2010; Dias, 2007). A doença de Chagas é classificada pela Organização Mundial da Saúde no grupo das doenças negligenciadas, uma vez que as companhias farmacêuticas não têm investido no desenvolvimento de novas drogas e vacinas contra estas parasitoses por não ser economicamente atrativo (WHO, 2002). Atualmente não há vacinas disponíveis, e tão pouco há drogas efetivas para o tratamento da doença de Chagas crônica (WHO, 2010).

1.1 Ciclo de vida do *T. cruzi* e a doença de Chagas

O ciclo de vida do parasito encontra-se esquematizado na FIGURA 1. A transmissão se inicia quando os insetos hematófagos infectados da ordem Hemiptera, família *Reduviidae* e sub-família *Triatominae*, após sugarem o hospedeiro vertebrado, defecam e liberam as formas infectivas tripomastigotas metacíclicas do parasito sobre a pele (Chagas, 1909). Estas formas penetram através da pele lesada e mucosas e invadem as células hospedeiras, iniciando o ciclo intracelular. No citoplasma, o parasito se diferencia na forma amastigota que, após sucessivas divisões binárias, se diferencia em tripomastigotas sanguíneos, sendo liberados na corrente sanguínea após o rompimento da célula parasitada. Os tripomastigotas liberados pela ruptura celular são capazes de infectar uma variedade de células nucleadas iniciando um novo ciclo de reprodução assexuada. Eventualmente, as formas amastigotas liberadas pelo rompimento da célula parasitada podem ser fagocitadas ou invadir células não fagocíticas (Fernandes *et al.*, 2007) iniciando um novo ciclo intracelular. Ao picar o hospedeiro infectado, o inseto vetor ingere o sangue contaminado e, as formas

tripomastigotas presentes no trato digestivo do triatomíneo se diferenciam nas formas epimastigotas. Essas formas, não infectivas para o hospedeiro vertebrado, são capazes de multiplicar rapidamente e, uma vez tendo atingido as porções terminais do intestino do vetor, se diferenciam novamente nas formas tripomastigotas metacíclicas (Brener, 1973; Garcia *et al.*, 1991; De-Souza, 2002).

Apesar do progresso das últimas décadas quanto à erradicação do vetor *Triatoma infestans*, a transmissão vetorial da doença de Chagas por esta espécie ainda permanece em outros países da América Latina, e através de outras espécies no Brasil (Dias *et al.*, 2002). Além da transmissão vetorial, também foram observadas outras formas de transmissão do parasito, como a via oral, transfusional, congênita, por transplantes de órgãos, acidentes laboratoriais. A via transfusional é considerada a segunda via mais freqüente de infecção, tendo especial importância epidemiológica, uma vez que pode levar a doença a áreas sem transmissão natural (Dias *et al.*, 2002; Vinhaes *et al.*, 2000).

A doença de Chagas possui duas fases características: aguda e crônica. A fase aguda é caracterizada por uma alta parasitemia que resulta na disseminação do parasito em diversos tecidos do hospedeiro. As manifestações clínicas desta fase podem ser acompanhadas de febre, edema localizado e generalizado, hepatomegalia, esplenomegalia e, às vezes, perturbações neurológicas e insuficiência cardíaca. Esta fase tem uma duração média de 2 a 3 meses. Na fase crônica da doença, caracterizada por baixa parasitemia e persistência da infecção associada à presença de anticorpos contra vários antígenos do parasito, pode haver comprometimento do sistema cardíaco, digestivo ou ambos (Brener, 1973). Doentes nesta fase podem permanecer assintomáticos indefinidamente (Brener *et al.*, 2000), sendo denominados pacientes de fase crônica indeterminada. Entretanto, em cerca de 20 a 30% dos indivíduos infectados, ocorrem manifestações cardíacas e/ou gastrointestinais. A maioria das mortes decorrentes da infecção chagásica ocorre devido à falha congestiva do coração (Brener *et al.*, 2000). Apesar da infecção pelo *T. cruzi* resultar em um amplo espectro de manifestações clínicas, os fatores determinantes destas diferenças clínicas da doença não são bem conhecidos. Acredita-se que a variabilidade genética tanto do parasito quanto do hospedeiro devem influenciar a evolução clínica da doença.

Historicamente, as principais vias de transmissão no Brasil eram a vetorial e a transfusional. Porém, medidas de controle vetorial proporcionaram a eliminação

da transmissão da doença pelo *Triatoma infestans*, principal espécie vetora adaptada ao intradomicílio, e a transmissão transfusional sofreu uma importante redução após a implantação de medidas que visam o controle de doadores de sangue e de hemoderivados (Dias *et al.*, 2002). Atualmente, as vias de transmissão vertical (congenita) e oral ganharam importância epidemiológica, sendo responsáveis pela maior parte dos novos casos identificados (Ministério da Saúde, 2006).

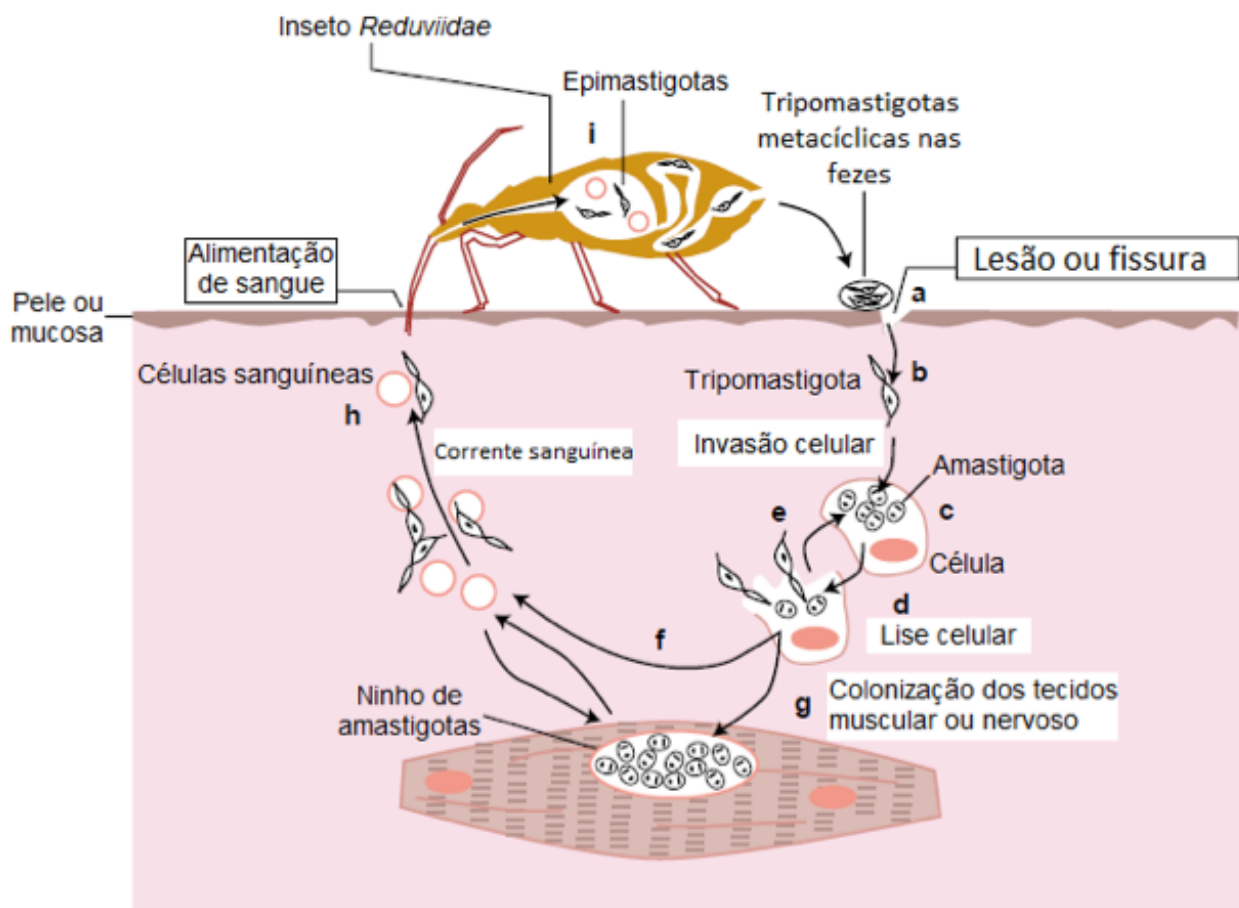


FIGURA 1 - Ciclo de vida do *T. cruzi* (descrição no texto).
 Fonte: adaptado de Macedo *et al.*, 2002.

1.2 Diagnóstico da doença de Chagas

O diagnóstico da doença pode ser realizado de diferentes formas, dependendo do estágio da infecção. Nos casos de suspeita de fase aguda da doença, devido ao elevado número de tripomastigotas circulantes, são priorizados os exames parasitológicos. Já na suspeita de fase crônica, devido à baixa parasitemia e uma forte e persistente resposta humoral induzida pela infecção pelo *T. cruzi*, a pesquisa de anticorpos específicos contra antígenos do parasito deve ser realizada. O diagnóstico seguro na fase crônica da doença é importante do ponto de vista epidemiológico, uma vez que a transmissão do *T. cruzi* por transfusão de sangue, doado por indivíduo assintomático, é um dos principais problemas de saúde pública nos países onde a doença é endêmica. Além disso, na ausência de métodos de diagnóstico efetivos, indivíduos infectados podem não ser identificados e tratados e, mesmo quando tratados, a eficiência do tratamento não pode ser eficientemente avaliada. Além disto, a avaliação da eficiência de qualquer iniciativa de bloqueio da transmissão ou vacinação fica comprometida (Ministério da Saúde, 2006).

Os três testes sorológicos mais utilizados são a hemaglutinação indireta (HAI), a imunofluorescência indireta (IFI) e o teste imunoenzimático (ELISA) (Ministério da Saúde, 2006). Nos testes de ELISA e HAI, pesquisa-se a reação de anticorpos de pacientes contra antígenos do parasito, enquanto que na IFI, pesquisa-se a reação de anticorpos contra epimastigotas fixados em lâminas. A Organização Mundial da Saúde recomenda o uso de pelo menos dois testes sorológicos de princípios diferentes (WHO, 2002). Testes sorológicos inconclusivos ou contraditórios provenientes de diferentes laboratórios têm sido observados. Estas discrepâncias têm sido relacionadas a diferenças em relação ao antígeno utilizado nos testes imunológicos, principalmente quando utilizados extrato bruto ou semi-purificado geralmente das formas epimastigotas, as quais estão presentes no inseto vetor, mas ausentes no hospedeiro mamífero ou a erros técnicos (Gomes, 1997; Tarleton *et al.*, 2007). Além disto, vários autores têm relatado a ocorrência de resultados falso-positivos devido à reatividade cruzada com antígenos de *Leishmania sp.* e *Trypanosoma rangeli* (Guhl *et al.*, 1985; Andrade *et al.*, 1988; Chiller *et al.*, 1990).

Recentemente, o uso de antígenos recombinantes e peptídeos sintéticos têm sido preferencialmente usados em substituição a lisados do parasito. Essas novas metodologias possuem maior reprodutibilidade dos resultados e eliminação de etapas

que envolvam a manutenção e processamento de parasitos vivos (Frasch *et al.*, 1991; Da-Silveira *et al.*, 2001; Meira *et al.*, 2002). Muitos desses antígenos são altamente específicos, mas em alguns casos a sensibilidade não é ideal (Caballero *et al.*, 2007). A fim de se aumentar a sensibilidade dos testes, foi proposto o uso de coquetéis de proteínas recombinantes e peptídeos sintéticos (Da-Silveira *et al.*, 2001). O uso combinado dos antígenos CRA (antígeno repetitivo citoplasmático) e FRA (antígeno repetitivo flagelar) (Frasch *et al.*, 1991) e a mistura de antígenos B13 correspondente a uma proteína de superfície, a proteína flagelar 1F8 e a proteína de citoesqueleto H49 (Umezawa *et al.*, 2003) tem gerado resultados promissores.

Apesar dos avanços obtidos nos últimos anos, os métodos de diagnóstico disponíveis da doença de Chagas ainda possuem diversas limitações. Entre elas, a variabilidade genética do parasito pode ser responsável por casos de falso-negativos na diagnóstico da doença (Bhattacharyya *et al.*, 2010).

1.3 Variabilidade genética de *T. cruzi*

Estudos epidemiológicos, bioquímicos e moleculares têm demonstrado que o táxon *T. cruzi* é extremamente heterogêneo tanto genotipicamente quanto fenotipicamente. Baseado em vários marcadores moleculares, o táxon *T. cruzi* foi dividido inicialmente em duas linhagens geneticamente distintas denominadas *T. cruzi* I e *T. cruzi* II (Souto *et al.*, 1996). Posteriormente foi proposto que a linhagem II fosse subdividida em cinco sub-linhagens nomeadas IIa-IIe (Brisse *et al.*, 2001). Evidências foram então reportadas para a existência de uma terceira linhagem denominada *T. cruzi* III (De-Freitas *et al.*, 2006). Recentemente, houve uma reclassificação das cepas de *T. cruzi* mostrada na FIGURA 2, agora divididas em seis linhagens nomeadas Tc I-VI, com os grupos Tc V e VI englobando cepas híbridas (Zingales *et al.*, 2009). Apesar de sua reprodução ser predominantemente clonal, evidências de raros eventos envolvendo troca de material genético já foram detectadas (Brisse *et al.*, 2001; Machado *et al.*, 2001; Sturm *et al.*, 2003; Westenberger *et al.*, 2006).

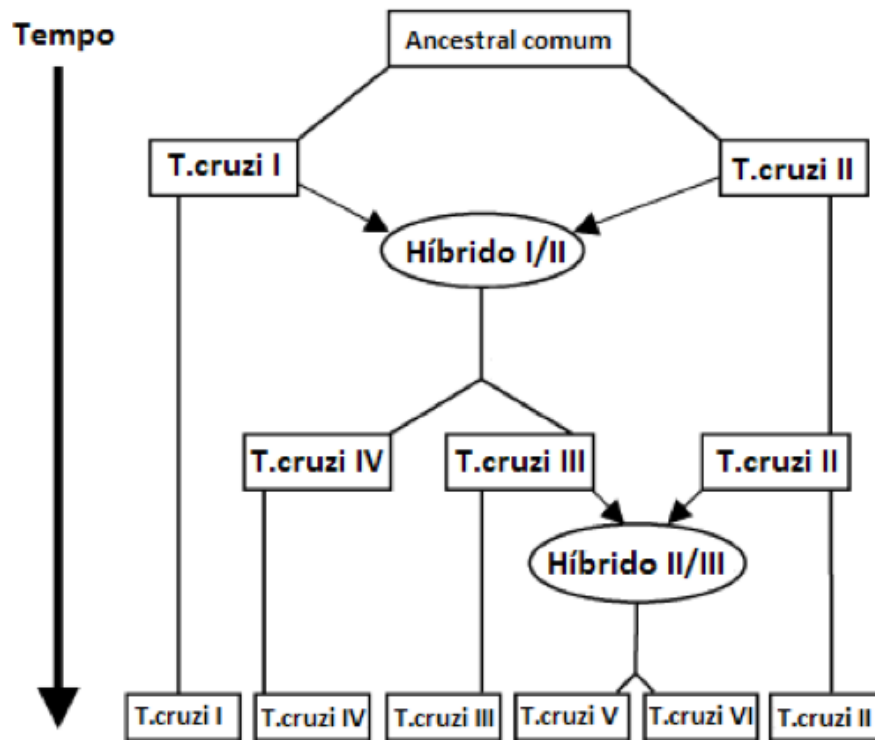


FIGURA 2 – Relação filogenética entre as seis linhagens Tc I-VI de *T. cruzi*.
 Fonte: adaptado de (Sturm *et al.*, 2003)

Diferentes linhagens possuem diferentes características biológicas, susceptibilidade a drogas, bem como tropismo teciduais diferenciados. A sensibilidade *in vivo* das cepas Peru, Sonya e Y de *T. cruzi* a 15 drogas mostrou ser bastante variável quando mensurado a porcentagem de parasitos resistentes (Cover *et al.*, 2004). Quanto ao tropismo, verificou-se um maior número de amastigotas no coração e baço de camundongos com a cepa MORC-1, quando comparado com a cepa MORC-2 e esta diferença parece estar relacionada uma resposta imunológica perfil Th-2 na infecção pela cepa MORC-1, enquanto MORC-2 estimula principalmente um perfil de resposta Th-1 (Caetano *et al.*, 2010). Em um outro trabalho, parasitismo extremo foi observado no baço, fígado e medula óssea de camundongos inoculados com as cepas Y e Berenice. Em contraste, a cepa CL não foi detectada nestes órgãos (Melo *et al.*, 1978). Forma sanguínea destas três cepas aparentemente apresentaram diferenças quanto a taxa de internalização por macrófagos e o parasitismo da musculatura de órgãos cavitários foi maior para a cepa Berenice do que Y e CL (Melo *et al.*, 1978). Outro trabalho mostrou um maior parasitismo da cepa JG em corações de camundongos BALB/c que foram infectados com uma mistura artificial contendo

igual proporção de tripomastigotas das cepas JG e Colombiana (Andrade *et al.*, 1999). Um segundo trabalho deste mesmo grupo mostrou que Colombiana invade com maior eficiência as células cardíacas, mas a multiplicação dos parasitos da cepa JG é mais eficiente, o que explica o maior parasitismo do coração por esta cepa (Andrade *et al.*, 2010). Este trabalho mostrou que o desenvolvimento intracelular é importante para determinar o tropismo tecidual do parasito. As características biológicas das cepas também variam de acordo com o hospedeiro como observado no estudo experimental em roedor *Zygodontomys lasiurus*. Neste hospedeiro, a patência da infecção variou de 26 a 29 dias nos animais inoculados com a cepa Y, enquanto que em camundongos esta patência varia de 14 a 16 dias (Borges *et al.*, 1983).

A grande variabilidade genética entre as linhagens do parasito, sobretudo devido ao tropismo diferencial, poderia ser um dos fatores envolvidos na evolução diferentes manifestações clínicas em pacientes chagásicos. Contudo, nenhum estudo conseguiu identificar claramente um padrão entre linhagem e manifestação clínica da doença de Chagas. Apesar disso, esta hipótese não foi descartada uma vez que correlações entre padrões de distribuição geográfica associadas as diferentes linhagens de *T. cruzi* e manifestações clínicas da doença de Chagas têm sido reportados. Em países do cone sul da América do Sul (Argentina, Bolívia, Brasil, Chile, Paraguai, Uruguai) onde a doença de Chagas é considerada mais severa, *T. cruzi* I (atual Tc I) está associado com o ciclo silvestre de transmissão infectando principalmente mamíferos arbóreos, enquanto que as cepas *T. cruzi* II (atual Tc II, V e VI) predominam no ciclo doméstico infectando homens e outros mamíferos terrestres (Freitas *et al.*, 2005; Yeo *et al.*, 2005). Por outro lado, Tc I predomina na bacia Amazônica e em áreas endêmicas para doença de Chagas na Venezuela. Manifestações patológicas digestivas associadas à infecção pelo *T. cruzi* são mais comuns nas regiões do Brasil Central e sul da América do sul, mas raras ou ausentes no norte da América do Sul e América Central (Buscaglia *et al.*, 2003).

1.4 Genotipagem e sorotipagem dos parasitos

A fim de investigar a correlação entre a variabilidade genética do *T. cruzi* e as diversas manifestações clínicas da doença de Chagas, várias metodologias têm sido usadas para identificar a linhagem do parasito que está causando a infecção. Com a

atual reclassificação das linhagens de *T. cruzi* em Tc I-VI (Zingales *et al.*, 2009), três marcadores moleculares combinados são capazes de discriminar essas linhagens. (FIGURA 3) O primeiro marcador se baseia no polimorfismo de dois sítios de restrições da enzima *AluI* presentes no gene codificador da COII presente nas sequências de maxicírculos do parasito. A região alvo é amplificada por PCR e os “amplicons” são digeridos com a enzima *AluI*. O padrão dos fragmentos obtido permite separar as linhagens de *T. cruzi* em três grupos diferentes (De-Freitas *et al.*, 2006). Outro marcador se baseia na diferença do tamanho de fragmentos obtidos da amplificação por PCR da região intergênica dos genes codificadores de mini-éxon presentes nos minicírculos de *T. cruzi* (Burgos *et al.*, 2007). O último marcador também se baseia na diferença do tamanho de fragmentos obtidos da amplificação por PCR, porém da região codificadora da subunidade 24S α do RNA ribossomal de *T. cruzi* (Souto *et al.*, 1996).

A maioria das técnicas usadas para genotipagem requer o isolamento do parasito a partir de sangue de pacientes e posterior crescimento em meio de cultura ou em animais. Como muitas populações de *T. cruzi* são policlonais, acredita-se que esta estratégia possa selecionar sub-populações de parasitos mais adaptadas às condições de crescimento usadas (Macedo e Pena, 1998). Além disto, em face da ocorrência de tropismo tecidual diferencial em algumas cepas de *T. cruzi* (Andrade *et al.*, 1999), os clones presentes no sangue do paciente podem não ser os mesmos encontrados nas lesões teciduais. Para contornar estas limitações foram desenvolvidas técnicas baseadas em PCR convencional e *real-time* PCR para genotipagem de parasitos diretamente de tecidos humanos cronicamente infectados (Vago *et al.*, 1996; Freitas *et al.*, 2005).

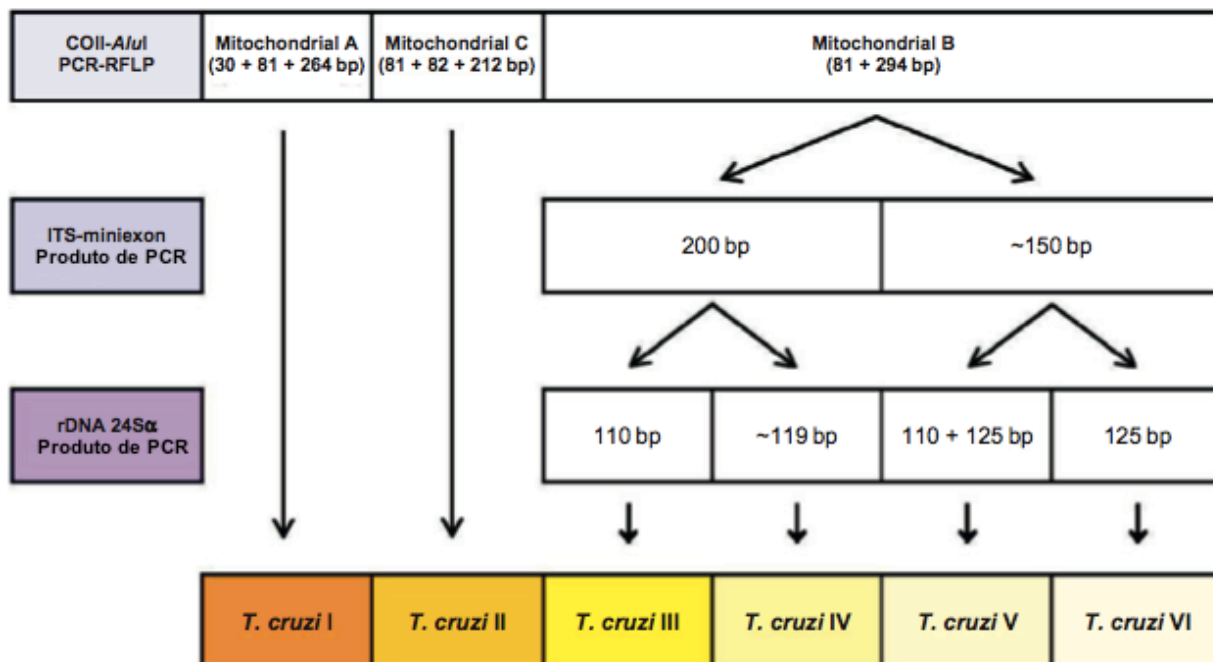


FIGURA 3 – Discriminação das linhagens de *T. cruzi* utilizando três marcadores moleculares. Inicialmente, parasitos devem ser analisados por PCR-RFLP do gene COII seguido por digestão por *AluI* (Freitas *et al.*, 2006), o qual permite a discriminação de Tc I e Tc II entre si e as outras linhagens (Tc III–VI) apresentam o mesmo padrão de fragmentos. A fim de discriminar as linhagens Tc III a VI, são analisados outros dois marcadores. Um deles é região ITS de minixon (Burgos *et al.*, 2007) e resulta em dois distintos “clusters”, um formado por Tc III e Tc IV e outro por Tc V e Tc VI. O passo final compreende a PCR para amplificar rDNA 24S α (Souto *et al.*, 1996). Fonte: extraído de Macedo e Segatto, 2010.

Ainda não existe uma metodologia para sorotipagem de *T. cruzi*. Porém alguns polimorfismos de sequência e de tamanho em proteínas antigênicas entre diferentes cepas do parasito já foram identificados (Pais *et al.*, 2008; Bhattacharyya *et al.*, 2010). Essas diferenças podem resultar em um reconhecimento diferencial por anticorpos presentes no soro de indivíduos infectados por diferentes cepas (Bhattacharyya *et al.*, 2010).

1.5 O genoma da cepa CL-Brener

As sequências completas dos genomas do parasito *T. cruzi* e de outros dois tripanosomatídeos, *T. brucei* e parasitos do gênero *Leishmania*, têm sido elucidadas

(El-Sayed et al., 2005; Berriman et al., 2005; Ivens et al., 2005; Peacock et al., 2007). No caso de *T. cruzi*, o clone CL Brener pertencente a linhagem Tc VI (Zingales et al., 2009) foi escolhido para ter o genoma sequenciado por ser bem caracterizado experimentalmente (Zingales et al., 1997). Sua natureza híbrida e altamente repetitiva dificultou a montagem do genoma resultando em 32746 "contigs" parcialmente agrupados em 638 "scaffolds" (El-Sayed et al., 2005; Weatherly et al., 2009).

Alguns estudos sugerem que a linhagem Tc VI, a qual pertence o clone CL Brener, pode ter se originado a partir de um evento de hibridação envolvendo a linhagem ancestral de Tc II e TcIII conforme mostrado na FIGURA 2 (Sturm et al., 2003). Com o objetivo de se tentar discriminar os dois haplótipos de CL Brener, como parte da iniciativa do projeto genoma de *T. cruzi*, o genoma da cepa Esmeraldo, pertencente a linhagem Tc II, foi também parcialmente sequenciado com uma cobertura de 2,5X. Os "contigs" de CL Brener foram então comparados com as sequências individuais (*reads*) de Esmeraldo, permitindo distinguir os dois haplótipos para algumas regiões do genoma de CL Brener. Assim, para cerca de metade dos genes de CL Brener foi possível determinar qual alelo é mais similar às sequências do genoma de Esmeraldo, sendo denominado Esmeraldo-like. Por outro lado, os alelos menos similares às sequências de Esmeraldo foram denominados Non-Esmeraldo-like. Aproximadamente 22570 genes codificadores de proteínas foram preditos no genoma diplóide, com 6159 representando alelos presentes no haplótipo similar a Tc II (Esmeraldo-like), 6043 genes representando alelos do outro haplótipo (Non-esmeraldo-like) e 10368 representando sequências que não puderam ser classificados para um haplótipo particular. Os dois haplótipos possuem alto nível de sintonia, com as maiores divergências devido a inserção e/ou deleção em regiões intergênicas e subteloméricas e ampliações de sequências repetitivas (FIGURA 4). A média de divergência entre os dois haplótipos é 5,4%, sendo que esta diferença diminui para 2,2% em regiões codificadoras (El-Sayed et al., 2005).

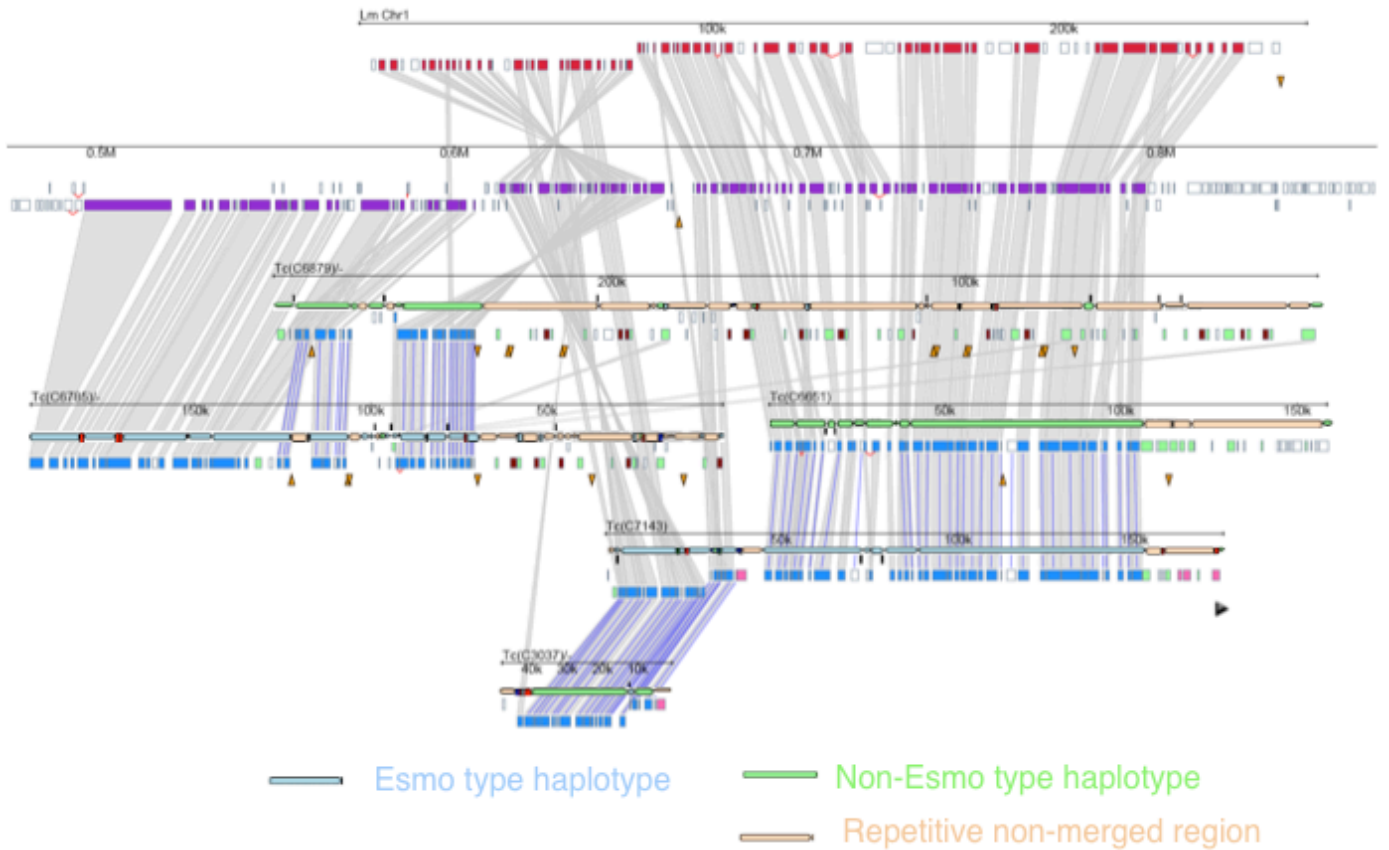


FIGURA 4 – Comparação da arquitetura genômica de tripanossomatídeos. Sequências codificadoras dos cromossomos 7 de *T. brucei* foram alinhadas com sequências codificadoras dos cromossomos 22 de *L. major* e “scaffolds” do genoma da cepa CL Brener de *T. cruzi*. Retângulos vermelhos, roxos de azuis representam genes de *L. major*, *T. brucei* e *T. cruzi*, respectivamente. As linhas cinza conectam genes ortólogos. Linhas azuis conectam pares de alelos nos dois haplótipos de CL Brener. Triângulos laranja representam retroelementos, triângulo preto representa uma região telomérica. Caixas boninas e verdes destacam clusters gênicos codificadores de proteínas de superfície em *T. cruzi*.

2 JUSTIFICATIVA E MOTIVAÇÃO

A doença de Chagas continua sendo um grave problema de saúde pública na América Latina. Não há vacinas contra a doença e o tratamento possui sérias limitações, sendo de eficiência restrita praticamente à fase aguda, quando a infecção pode não ser detectada devido à ocorrência de sintomas pouco específicos. Os métodos de diagnóstico também apresentam problemas. Vários testes utilizam extratos brutos ou semi-purificados de epimastigotas, formas que não são encontradas no hospedeiro mamífero. Além disso, resultados falso-positivos devido à reação cruzada com parasitos do gênero *Leishmania* e *T. rangeli* têm sido reportados. Um outro aspecto importante ainda não elucidado diz respeito aos fatores determinantes da variabilidade clínica da doença de Chagas. Acredita-se que tanto componentes genéticos do parasito quanto do hospedeiro sejam importantes na definição da evolução clínica da doença. Estudos buscando correlacionar as cepas envolvidas na infecção com a manifestação clínica da doença têm utilizado, na maioria das vezes, técnicas de crescimento *in vitro* usando sangue de pacientes como inóculo (hemocultura) e genotipagem do parasito diretamente de tecidos infectados através de técnicas de PCR. Ambas estratégias apresentam limitações. A hemocultura pode levar à seleção de subpopulações de parasitos mais adaptados ao crescimento *in vitro*, enquanto que a identificação do parasito no sítio da infecção pode limitar o número de amostras analisadas já que envolvem técnicas de custos elevados, são laboriosas, são realizadas em equipamentos sofisticados e requerem tecidos de pacientes obtidos por procedimentos cirúrgicos ou autópsias. Nenhuma metodologia de sorotipagem do parasito foi até o momento proposta. Neste contexto, propomos identificar peptídeos derivados de epitopos de célula B conservados e polimórficos entre as diferentes cepas do parasito, visando contribuir para melhorar o sorodiagnóstico e realizar sorotipagem dos parasitos por ELISA, respectivamente. A técnica de ELISA foi escolhida por ser menos invasiva, de fácil execução e automação, permitindo estudos e aplicação em grande número de amostras. A identificação destes alvos foi facilitada com a publicação do genoma do parasito que, conjuntamente com a disponibilidade de algoritmos de predição de epitopos, permite o uso de abordagens em larga escala para a identificação de novos antígenos. Assim, utilizando os dados do proteoma predito de *T. cruzi* e algoritmos de predição de epitopos de célula B, nós nos propusemos a identificar potenciais alvos específicos para sorodiagnóstico e

sorotipagem de *T. cruzi*. Esta estratégia foi utilizada porque CL Brener é um recente híbrido entre as linhagens TcII e Tc III, e epitopos polimórficos existentes entre os pares de alelos de CL Brener podem também ser polimórficos nos genótipos parentais e serem extrapoladas para as linhagens de *T. cruzi* existentes.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Rastrear o proteoma de *T. cruzi* para identificar epitopos de células B usando os dados gerados no projeto genoma de *T. cruzi*, ferramentas de bioinformática e ensaios experimentais de validação com um objetivo de identificar epitopos conservados em diferentes cepas do parasito visando melhorias do diagnóstico sorológico da doença de Chagas e epitopos polimórficos visando a sorotipagem dos parasitos que infectam cada paciente.

3.2 Objetivos específicos:

1. Identificar epitopos polimórficos e conservados entre os pares de alelos de genes cópias simples dos haplótipos Esmo e Non-esmo do proteoma predito da cepa CL Brener de *T. cruzi* utilizando o algoritmo de predição de epitopos lineares de células B BepiPred (Larsen *et al.*, 2006) e análises de polimorfismo.
2. Realizar triagem dos epitopos preditos através da avaliação da reatividade de soros de camundongos C57BL/6 infectados com três cepas de *T. cruzi* pertencentes a diferentes linhagens evolutivas do parasito contra um “array” de peptídeos covalentemente ligados a uma membrana de celulose;
3. Validar por ELISA e ELISA de afinidade a reatividade de soros de camundongos C57BL/6 infectados com diferentes cepas do parasito contra os peptídeos mais promissores para sorotipagem e sorodiagnóstico sintetizados na forma solúvel;
5. Avaliar reconhecimento dos peptídeos selecionados por IgM e IgG em soro de cobaias (*Cavia porcellus*) em diferentes tempos após a infecção com a cepa Y de *T. cruzi*.
4. Testar a reatividade cruzada dos peptídeos selecionados com soros de camundongos C57BL/6 infectados com *Trypanosoma rangeli* e de pacientes

infectados com *Leishmania braziliensis*;

5. Mapear os aminoácidos envolvidos no reconhecimento dos peptídeos pelos soros de camundongos C57BL/6 infectados com as diferentes cepas de *T. cruzi*, *T. rangeli* e soros de pacientes infectados com *L. braziliensis*;

6. Testar a reatividade dos soros de pacientes chagásicos genotipados contra o painel de peptídeos selecionados;

7. Testar a reatividade dos soros de pacientes chagásicos com diferentes formas clínicas da doença contra o painel de peptídeos selecionados.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Reagentes e produtos:

- 4-metilpiperidina – Merck;
- Acetonitrila P.A.-A.C.S.– Synth
- Ácido cítrico – CRQ;
- Ácido sulfúrico A.C.S. – Isofar;
- Ácido trifluoroacético – Merck;
- Albumina sérica bovina – Fitzgerald;
- Agarose ultrapure – Life Technologies;
- Anidrido acético – Merck;
- Anti-IgG humano conjugado com peroxidase – SIGMA ALDRICH;
- Anti-IgG murino conjugado com peroxidase – SIGMA ALDRICH;
- Anti-IgG porquinho-da-índia conjugado com peroxidase – SIGMA ALDRICH;
- Anti-IgM porquinho-da-índia conjugado com peroxidase – SIGMA ALDRICH;
- Azul de bromofenol – SIGMA ALDRICH;
- Bis acrilamida 40% - Bio-Rad
- Carbonato de sódio – SIGMA ALDRICH;
- Cloreto de potássio P.A. – Synth;
- Cloreto de sódio P.A. – Synth;
- Cloreto de cálcio P.A.-A.C.S. – Synth;
- Cloreto de magnésio – Synth;
- DIC – Novabiochem;
- Diclorometano – SIGMA ALDRICH;
- *ECL Plus Western blotting* – GE Healthcare;
- Enzima de restrição *Alu* I – Fermentas;
- Etanol – Merck;
- Éter diisopropílico – Merck;
- Fmoc-aminoácidos – Intavis AG;
- Fosfato básico de sódio P.A. – Nuclear;
- Fosfato bibásico de sódio P.A. – Nuclear;
- GIBCO RPMI – Invitrogen;

- Glicose P.A.-A.C.S. – Vetec;
- GoTaq DNA Polymerase 5X – Promega;
- Hemina – SIGMA ALDRICH;
- Hidróxido de sódio – Merck;
- HOBt – Novabiochem;
- Infusão de Fígado – Difco BD;
- Nitrato de prata – Merck;
- OPD – SIGMA ALDRICH;
- Peróxido de hidrogenia 30 V – Vetec;
- L-Prolina – Merck;
- Resina RINK amidada – Novabiochem;
- Solução Penicilina/Estreptomicina – SIGMA ALDRICH;
- Soro Bovino Fetal – Cultilab;
- Sulfato de cobre – Proquímios;
- Taq polimerase – Phoneutria;
- Tripsina/EDTA – Cultilab
- Triptose – HIMEDIA;
- Triisopropilsilano – Merck;
- Tween 20 U.S.P. – Synth;
- Uréia P.A. – Vetec;

4.2 Bancos de dados

Os dados originados do projeto genoma da cepa CL Brener de *T. cruzi* (El-Sayed *et al.*, 2005) encontram-se em um servidor no Laboratório de Imunologia e Genômica de Parasitos no Departamento de Parasitologia/UFMG. Estes dados estão estruturados em um banco relacional MySQL v5.0. Neste trabalho utilizou-se um banco de dados de sequências nucleotídicas do genoma diplóide, e suas respectivas sequências protéicas preditas de pares de alelos de genes cópia simples, excluindo-se pseudogenes e genes parciais. Os pares de alelos de cada gene foram classificados como Esmeraldo-like (Esmo) e Non-esmeraldo (Non-esmo) por possuírem maior ou menor identidade com sequências da cepa Esmeraldo, respectivamente (El-Sayed *et al.*, 2005).

4.3 Identificação *in silico* de epítopos lineares de células B

O pipeline da análise, resumido na FIGURA 5, foi desenvolvido com scripts em Bash e linguagem PERL. Inicialmente epítopos lineares de célula B foram preditos em todo o proteoma da cepa CL Brener de *T. cruzi* utilizando o programa BepiPred (Larsen *et al.*, 2006). Este programa atribui a cada aminoácido da sequência uma pontuação de predição que se correlaciona positivamente com a probabilidade daquele aminoácido participar de um epítopo linear de célula B. Nesta análise utilizamos uma abordagem conservativa com valor de corte igual a 1.3, o que significa que apenas aminoácidos com pontuação de predição acima de 1.3 foram considerados como prováveis participantes de epítopos. Este valor de corte fornece 96% de especificidade e 13 % de sensibilidade, minimizando a seleção de muitos epítopos falso-positivos (CBS, 2010). Utilizamos dois peptídeos controle correspondente ao epítopo AAKTAAKPAAKSAAKPAAKP previamente mapeado na proteína L7a (Tc00.1047053506401.320) (Pais *et al.*, 2008) e ao epítopo AEPKSAEPKPAEPKS mapeado em um trans-sialidase (Tc00.1047053510307.284) de *T. cruzi* (Peralta *et al.*, 1994). O controle negativo corresponde ao peptídeo PIELVLWMPTLCRAN está presente na região da proteína L7a para a qual não é observada reatividade com o soro de indivíduos infectados (Pais *et al.* 2008).

Utilizando também o proteoma predito de *T. cruzi*, os pares de alelos de genes cópias simples Esmo e Non-esmo previamente identificados (El-Sayed, Myler *et al.* 2005) foram alinhados utilizando o programa Clustal W (Chenna *et al.*, 2003). Cada aminoácido alinhado recebeu uma pontuação, de acordo com a interpretação do seu alinhamento, conforme a TABELA 1. Um script em Perl utilizando a metodologia de janela deslizante percorreu sequências de 15 aminoácidos ao longo de toda a proteína, a fim de correlacionar as pontuações de polimorfismo e de predição de epítopos lineares de célula B. Optou-se por avaliar sequências de 15 aminoácidos, pois este é o tamanho ideal para as metodologias de síntese de peptídeo utilizadas neste trabalho. Sequências com o somatório dos scores de polimorfismo acima de 6 e score médio de predição do Bepipred acima de 1.3 foram consideradas como epítopos polimórficos. Sequências de 15 aminoácidos com score médio de predição de epítopo igual entre as duas sequências e acima de 1.3 e score de polimorfismo igual a zero foram

considerados epítopos conservados (FIGURA 5A).

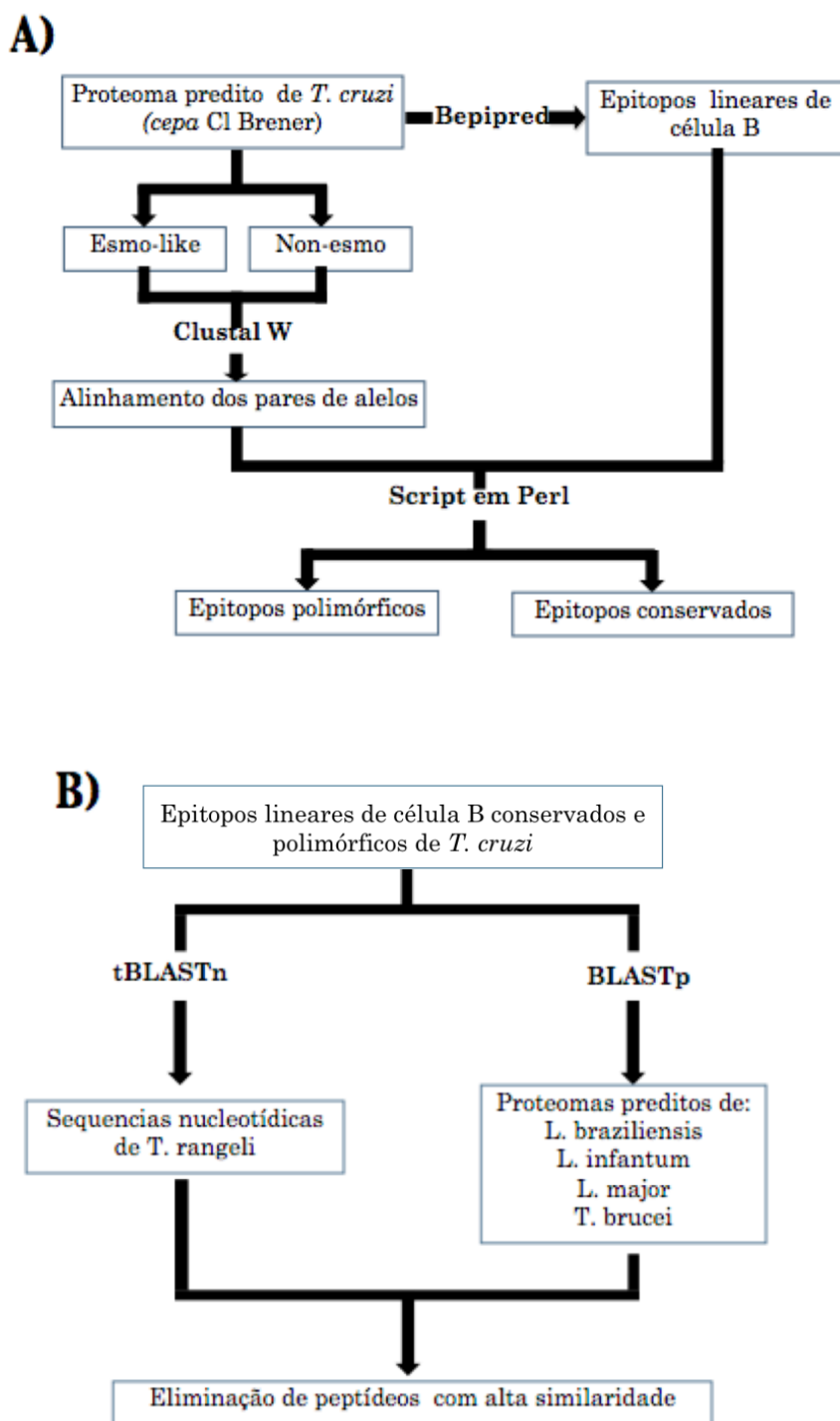


FIGURA 5 – Pipeline para identificação de epítopos polimórficos e conservados *T. cruzi* específicos. A) Epítopos identificados no proteoma predito da cepa CL-Brener de *T. cruzi* foram classificados em polimórficos e conservados de acordo com o alinhamento dos pares de alelos de genes cópias simples que continham sua sequência. B) Epítopos com sequência similar em genomas e proteomas de outros parasito evolutivamente próximos a *T. cruzi* foram eliminados.

TABELA 1 – Pontuação de alinhamento entre proteínas Esmo e Non-esmo de *T. cruzi*.

Interpretação do alinhamento	Pontuação
Aminoácidos idênticos	0
Aminoácidos diferentes com propriedades químicas similares	1
Aminoácidos diferentes com propriedades químicas diferentes	2
Gap em sequência	3

Para minimizar a chance de reação cruzada com outros parasitos filogeneticamente relacionados, sequências de peptídeos com alta similaridade com proteínas de outros tripanossomatídeos foram identificadas utilizando o algoritmo BLAST (Altschul et al., 1990) e descartadas (FIGURA 5B). A versão do algoritmo denominada blastp foi utilizado para comparar epitopos polimórficos e conservados com o proteoma predito de *L. braziliensis*, *L. infantum*, *L. major* e *T. brucei*. Epitopos polimórficos e conservados também foram comparados com “contigs” de *T. rangeli* utilizando a versão tblastn do algoritmo. Epitopos com mais de 70% de identidade ao longo de mais de 70% da sequência foram eliminados das análises subsequentes.

4.4 Parasitos

Foram utilizadas neste estudo cepas pertencentes a três diferentes linhagens de *T. cruzi*, conforme especificado na TABELA 2. Culturas de epimastigotas mantidas a 28°C em meio LIT (Camargo, 1964) suplementado com 10% de soro bovino fetal, 100 ug de estreptomicina/ml e 100 unidades de penicilina/ml. As culturas foram repicadas a cada 3 dias mediante inóculos de 1×10^6 células/ml até a fase logarítmica de crescimento, quando a densidade celular era de aproximadamente 1×10^7 células/ml (Bartholomeu *et al.*, 2002). A fim de se obter formas tripomastigotas metacíclicas para a infecção *in vitro*, formas epimastigotas de cultura em fase logarítmica de crescimento foram submetidas a um estresse nutricional. Para isso, os parasitos foram centrifugados a 3000 rpm (Eppendorf centrifuge 5804 R) por 10 minutos a 4 °C, ressuspensos em meio TAU, na concentração de 1×10^6 células/ml e mantidos a 28°C por 2 horas (Camargo, 1964). Após este período de estresse

nutricional, o meio foi suplementado com 10 mM de L-Prolina (TAUG) e os parasitos foram cultivadas por 72 horas a 28°C. Durante este período os parasitos aderiram às paredes das garrafas de cultivo e diferenciaram-se em formas tripomastigotas metacíclicas, soltando-se então do substrato (Bonardo *et al.*, 1988). Formas tripomastigotas metacíclicos foram recolhidas do sobrenadante e concentradas por centrifugação 3000 rpm (Eppendorf centrifuge 5804 R) a 4 °C por 10 min.

TABELA 2 – Cepas de *T. cruzi* utilizadas.

Cepa	Linhagem
Colombiana	Tc I
Y	Tc II
Cl Brener	Tc VI

Os tripomastigotas metacíclicos obtidos foram utilizados para infectar células L6 (mioblasto de rato) e a infecção mantida em meio RPMI suplementado com 2% de soro fetal bovino, 100 ug de estreptomicina/ml e 100 unidades de penicilina/ml a 37 °C e 5% de CO₂ (Bartholomeu *et al.*, 2002). Os tripomastigotas obtidos de cultura que foram separados do meio por centrifugação 3000 rpm (Eppendorf centrifuge 5804 R) a 4°C por 10 min.

Epimastigotas da cepa SC-58 de *T. rangeli* mantidos em meio LIT a 28 °C suplementado com 10% de soro bovino fetal, 100 ug de estreptomicina/ml e 100 unidades de penicilina/ml até a fase logarítmica de crescimento (10⁸ parasitos/ml). Ao atingir esta densidade, a cultura era repicada a uma densidade de 10⁶ parasitos/ml. Na fase logarítmica, epimastigotas foram separadas do meio de cultura por centrifugação 3000 rpm (Eppendorf centrifuge 5804 R) a 4°C por 10 min, seguido de três sucessivas lavagens com PBS e centrifugações. Diferenciação das formas epimastigotas para formas tripomastigotas foi induzida em meio DMEM com pH 8, por 6 dias e densidade de 10⁶ parasitos/ml (Koerich *et al.*, 2002).

4.5 Camundongos infectados com *T. cruzi*

Camundongos C57BL/6, machos e de duas a quatro semanas de vida foram infectados intraperitonealmente com diferentes cepas de *T. cruzi*. Cada grupo

experimental era composto de seis animais. Devido a diferença na suscetibilidade e mortalidade causada por cada cepa, diferentes inóculos foram utilizados. Um grupo foi infectado com 50 tripomastigotas da cepa Colombina e outro grupo com 500 tripomastigotas da cepa Y. Para o clone CL Brener, foram utilizados três inóculos diferentes de parasitos, sendo um grupo de animais infectados com 50 tripomastigotas, outro grupo com 100 tripomatigotas e um último grupo com 500 tripomastigotas. Um grupo contendo seis animais não infectados foi utilizado como controle negativo dos experimentos. Dez dias após a inoculação, a infecção foi confirmada através da observação tripomastigotas por exame a fresco. Para isso, 5 uL de sangue coletado da cauda de cada animal foram colocados em lâminas de vidro, cobertos com lamínulas e observadas em microscópio óptico para a identificação e contagem dos parasitos. O sangue dos animais infectados foi coletado por punção cardíaca três meses após a infecção. Destas amostras também foi obtido o soro. Para isso, inicialmente deixou-se as amostras coagularem em repouso por um período de 30 minutos a temperatura ambiente. Seguiu-se uma etapa de centrifugação a 5000 rpm (Eppendorf centrifuge 5424) por 15 minutos e retirada cuidadosa do sobrenadante, denominado soro. Todas as metodologias envolvendo animais estão de acordo com o código de ética do COBEA, foram previamente aprovadas pelo CETEA/UFMG e registrado como protocolo nº 143/2009 (item anexo 1).

4.6 Camundongos infectados com *T. rangeli*

Na ausência de soroteca humana de indivíduos infectados com *T. rangeli* SC-58, soro de animais infectados por este parasito serão utilizados para avaliação da reação cruzada dos peptídeos usados neste trabalho e extratos brutos de *T. cruzi* com esta parasitose. Para isso, foi realizada diferenciação *in vitro* dos parasitos para obter tripomastigotas conforme (Koerich *et al.*, 2002). 1×10^5 parasitos) obtidos após este período foram inoculados intraperitonealmente em seis camundongos C57BL/6, machos e com duas a quatro semanas de vida. Após a inoculação, a infecção foi acompanhada de dois em dois dias através da observação tripomastigotas por exame a fresco, conforme descrito no item 4.5. O sangue dos animais infectados na fase aguda foi coletado por punção cardíaca 45 dias pós-inoculação. O soro foi então obtido, esperando-se um tempo de coagulação de 30 minutos, seguido por centrifugação a

5000 rpm (Eppendorf centrifuge 5804 R) e retirada cuidadosa do soro no sobrenadante.

4.7 Soroteca de cobaias infectados com *T. cruzi*

Soros de cobaias (*Cavia porcellus*) infectados com a cepa Y de *T. cruzi* foram cedidos pelo Dr. Robert Gilman da Universidad Peruana Cayetano Heredia, Lima, Peru e Johns Hopkins Boomborg School of Public Health, EUA. Soros individuais foram obtidos de seis animais infectados com 10^4 parasitos em cinco diferentes tempos: 5, 13, 27, 41, 117 e 167 dias após a infecção. Soro de seis cobaias inoculados apenas com meio RPMI foram utilizados como controle negativo.

4.8 Soroteca de pacientes chagásicos tipados

Dez soros de pacientes chagásicos previamente tipados e pertencentes a linhagem Tc II foram cedidos pela Professora Lucia Maria da Cunha Galvão do Centro de Ciências da Saúde /UFRN. Dez soros de indivíduos não infectados foram utilizados como controle negativo.

4.9 Sorotecas de pacientes chagásicos com diferentes formas clínicas da doença

Duas sorotecas de pacientes com formas clínicas da doença de Chagas caracterizadas foram utilizadas neste trabalho. A primeira, cedida pela Professora Juliana de Assis Gomes Estanislau do Departamento de Morfologia/UFGM, continha cinco amostras de pacientes com a forma indeterminada da doença. A segunda, cedida pelo Professor Mauro Martins Teixeira do Departamento de Bioquímica e Imunologia/UFGM continha soro de cinco indivíduos com a forma indeterminada da doença de Chagas, cinco com cardiopatia chagásica crônica grau 1 e seis com cardiopatia chagásica crônica grave. Dez soros de indivíduos não infectados foram utilizados como controle negativo.

4.10 Soroteca de pacientes com leishmaniose

Amostras de soros e sangue de pacientes infectados com parasitos do gênero *Leishmania* coletados no Centro de Referência em Leishmaniose do município de Januária/MG foram cedidos pelo Professor Ricardo Toshio Fujiwara do Departamento de Parasitologia/UFMG. Soros e sangue foram coletados de 15 indivíduos com leishmaniose cutânea.

4.11 Extração do DNA

Para extração de DNA genômico foi utilizado o kit GFX™ Genomic Blood DNA Purification (GE Healthcare) seguindo o protocolo do fabricante. Foram utilizados em cada extração 10^8 epimastigotas ou 10^5 tripomastigotas ressuspendidos em 300 uL de PBS ou 300 uL de sangue imediatamente coletado de camundongos ou conservado em tampão citrato para amostras humanas. As formas epimastigotas e tripomastigotas foram submetidas à centrifugação a 3.000 rpm (Eppendorf centrifuge 5804 R) a 4°C por 10 minutos. Após essa centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o sedimento lavado duas vezes com 10 mL de PBS com centrifugação a 3.000 rpm (Eppendorf centrifuge 5804 R) a 4°C por 10 minutos em cada lavagem. A 300 uL de cada amostra foi adicionado 20 uL de proteinase K e 400 uL do tampão de lise, seguido de vortexação por 15 segundos e incubação por 10 minutos em temperatura ambiente. DNA genômico foi separado da mistura inicial por sua afinidade a uma coluna de sílica. A coluna com o DNA ligado foi lavada 3 vezes com tampão de lavagem. O DNA extraído foi eluído da coluna de sílica com água milliQ autoclavada, quantificado no espectrofotômetro NanoDrop® Spectrophotometer ND-1000 e armazenado a -20°C até o momento do seu uso.

4.12 Diagnóstico molecular de *T. cruzi*

Diagnóstico de infecção por *T. cruzi* foi realizado por PCR que possui como alvo o DNA satélite 195 SAT (Moser *et al.*, 1989). A amplificação foi realizada utilizando o par de primers TcZ1 (CGAGCTCTTGCCCACACGGGTGCT) e TcZ2 (CCTCCAAGCAGCGGATAGTTCAGG). As reações foram compostas de 1X tampão GoTaq, 1.5 mM MgSO₄, 40 uM dNTPs, 0.75 U Taq e 10 pM de cada

primer. As condições de PCR incluem uma desnaturação inicial a 94 °C por 10 minutos, seguidas de 25 ciclos com desnaturação a 94 °C por 1 minuto, anelamento dos primers a 62 °C por 30 segundos e extensão a 72 °C por 1 minuto e uma extensão final a 72 °C por 10 minutos. Os produtos de PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,2%. A infecção de *T. cruzi* foi considerada positiva pela presença de um rastro de DNA acima de 195 pb.

4.13 Genotipagem dos parasitos.

Genotipagem dos parasitos foram realizadas por PCR utilizando DNA extraído de formas tripomastigotas de cultura e três marcadores conforme descrito previamente (Macedo e Segatto, 2011). Os três marcadores utilizados são: COII (De-Freitas *et al.*, 2006), rDNA 24S α (Souto *et al.*, 1996) e Mini-exon SL-IRac (Burgos *et al.*, 2007). Reações foram compostas de 1X tampão GoTaq, 1.5 mM MgSO₄, 40 uM dNTPs, 0.75 U Taq e 10 pM de cada primer. A sequência dos primers, bem como os programas de PCR utilizados para cada marcador estão resumidos na TABELA 3.

TABELA 3 – Primers e programas utilizados para PCR dos marcadores dos grupos de *T. cruzi*.

Marcador:	COII	Mini-exon	rDNA 24S α
Primer foward	CCATATATTGTTGCATTATT	CGTACCAATATAGTACAGAAACTG	AAGGTGCGTTCGACAGTGTGG
Primer reverse	TTGTAATAGGAGTCATGTTT	CTCCCCAGTGTGGCCTGGG	TTTTCAGAATGGCCGAACAGT
Desnaturação inicial	94 °C por 5 min	94 °C por 3 min	94 °C por 10 min
Desnaturação	94 °C por 45s	94 °C por 1 min	94 °C por 30 s
Anelamento	45 °C por 45s	68 °C por 1 min (2*) 66 °C por 1 min (2*) 64 °C por 1 min (2*) 62 °C por 1 min (2*) 60 °C por 1 min (35*)	60 °C por 30 s
Extensão	72 °C por 1 min	72 °C por 1 min	72 °C por 30 s
Número de ciclos	40	43**	30
Extensão final	72 C por 5 min	72 °C por 10 min	72 °C por 10 min

* Número de ciclos com diferentes temperatura de anelamento.

** Número de ciclos total, somando todos os ciclos com diferentes temperatura de anelamento.

O produto de PCR obtido para o marcador COII foi digerido com a enzima *AluI*, 1U para cada 20 uL, por cerca de 16 horas a 36 °C. Os produtos de PCR dos marcadores Mini-exon SL-IRac e rDNA 24S α e o produto de digestão do marcador COII foram submetidos a eletroforese em gel de poliacrilamida 6%, seguido por

coloração com nitrato de prata. Os fragmentos obtidos para cada amostra foram então comparados com os fragmentos esperados de cada marcador para cada linhagem de *T. cruzi* (TABELA 4).

TABELA 4 – Perfil dos fragmentos esperados dos marcadores moleculares para cada linhagem de *T. cruzi*

Linhagem	Marcadores – fragmentos (pb)		
	COII	Mini-exon SL-IRac	rDNA 24S α
Tc I	30, 81 e 264	150	110
Tc II	81, 82 e 212	150	125
Tc III	81 e 294	200	110
Tc IV	81 e 294	200	125
Tc V	81 e 294	150	110 e 125
Tc VI	81 e 294	150	125

4.14 Diagnóstico molecular de *L. braziliensis*

Diagnóstico de infecção por *L. braziliensis* foi realizado por PCR usando como alvo uma região específica do minicírculo do parasito (De-Bruijn *et al.*, 1992). A amplificação foi realizada utilizando o par de primers B1 (GGGGTTGGTGTAATATAGTGG) e B2 (CTAATTGTGCACGGGGAGG). As reações foram compostas de 1X tampão GoTaq, 1.5 mM MgSO₄, 40 uM dNTPs, 0.75 U Taq e 10 pM de cada primer. As condições de PCR incluem uma desnaturação inicial a 96 °C por 6 minutos, seguidas de 26 ciclos com desnaturação a 93 °C por 30 segundos, anelamento dos primers a 67,5 °C por 1 minuto e extensão a 72 °C por 1 minuto e uma extensão final a 72 °C por 11 minutos. Os produtos de PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,2%. A infecção de *L. braziliensis* foi considerada positiva pela presença de um banda de aproximadamente 750 pb.

4.15 Diagnóstico molecular de *T. rangeli*

Diagnóstico de infecção por *T. rangeli* foi realizado por PCR usando como alvo o gene SnoRNA-cl1 (Morales *et al.*, 2002). A amplificação foi realizada utilizando o par de primers TrF (CGCCCCGTCTTGCCCTGT) e TrR2 (CGCAGCAAGGACAGGAGGGA). As reações foram compostas de 1X tampão

GoTaq, 1.5 mM MgSO₄, 40 uM dNTPs, 0.75 U Taq e 10 pM de cada primer. As condições de PCR incluem uma desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, seguidas de 35 ciclos com desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento dos primers a 63°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 30 segundos e uma extensão final a 72°C por 5 minutos. Os produtos de PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,2%. A infecção de *T. rangeli* foi considerada positiva pela presença de um banda de aproximadamente 650 pb.

4.16 Spot síntese

Um total de 150 peptídeos foram sintetizados em membrana de celulose pré-ativada e derivatizada com um espaçador de 10 resíduos de polietilenoglicol (Intavis AG) conforme Frank, 2002. Duas membranas foram sintetizadas em duplicata, uma possuindo 30 peptídeos em um arranjo de 10 X 3 e a outra com 120, em um arranjo de 10 X 12 utilizando o equipamento MultiPep SPOT (Intavis AG). Inicialmente, os Fmoc-aminoácidos a 0,5 mM foram ativados por 20 minutos com HOBt 0,05 mM e DIC 0,1 mM. Após dispensação de cada Fmoc-aminoácido pré-ativado nas membranas em sua respectiva posição, foi esperado um tempo de reação de 30 minutos. Sítios da membrana que não se ligaram a aminoácidos foram então bloqueados com anidrido acético 10%, seguido pela desproteção dos Fmoc-aminoácidos com 4-metilpiperidina 25%. A desproteção dos aminoácidos foi confirmada corando os spots com solução de azul de bromofenol 2%. Um novo ciclo de dispensação de aminoácidos foi então realizado. Essas etapas se repetem até que o último aminoácido seja incorporado ao peptídeo que está sendo sintetizado. Após o término da síntese dos peptídeos, foi realizada a desproteção das cadeias laterais utilizando 25:25:1,5:1 de TFA, DCM, triisopropilsilano e água e posterior monitoramento da desproteção com azul de bromofenol 2%, que coram resíduos básicos e por isso, confirmam que estes grupos estão livres nos peptídeos sintetizados.

4.17 Immunoblotting

Os experimentos de reatividade das membranas contendo os arranjos de

peptídeos contra diferentes soros foram realizados como previamente descrito por Frank, 2002. Inicialmente, as membranas foram bloqueadas com uma solução 5% BSA e 4% de sacarose em PBS pH 7,4 e incubadas por uma hora sob agitação. Em seguida, as membranas foram incubadas por uma hora sob agitação com soro de camundongo diluído 1:500 em solução de bloqueio. Após lavagem com PBS, as membranas foram incubadas por uma hora sob agitação com anticorpos secundários anti-IgG de camundongo conjugado à peroxidase e diluídos 1:10000 na solução de bloqueio. Novamente realizou-se uma etapa de lavagem com PBS, seguindo a revelação da membrana com *ECL Plus Western blotting* utilizando o fotodocumentador Kodak. Como controle negativo, membranas foram submetidas às mesmas condições experimentais usando soro de camundongos não infectados. Em seguida, para cada cepa foi realizada análise densitométrica de cada “spot” utilizando o software ImageMaster™ 2D Platinum (GE).

Após revelação, as membranas foram regeneradas para retirar qualquer anticorpo ligado a elas. Inicialmente, as membranas foram lavadas três vezes com DMF por 10 minutos cada, seguida de uma lavagem com água deionizada por 1 minuto. Em seguida, foram realizadas três lavagens de 30 minutos cada com uma solução desnaturante de uréia 8 M e SDS 10%, seguida por mais uma lavagem de 1 minuto com água deionizada. As membranas foram submetidas a três lavagens com uma solução ácida de etanol 55% e ácido acético 10%, seguida de uma última lavagem de 1 minuto com água deionizada. As membranas foram colocadas em etanol duas vezes, por 5 minutos cada, para retirar umidade e secas em ar frio. Após este protocolo de regeneração, estavam prontas para serem reutilizadas.

4.18 Síntese dos peptídeos solúveis

Os peptídeos selecionados serão sintetizados em fase sólida pelo método de N-9-fluorenilmetoxicarbonil (Wellings and Atherton, 1997) na escala de 30 μ mol. Toda síntese foi realizada no equipamento PSSM8 (Shimadzu, Kyoto, Japan). Fmoc-aminoácidos foram ativados por 30 minutos com 1 equivalente de HOBT e 2 equivalentes de DIC. Após este tempo, os aminoácidos ativados foram colocados em contato com a resina Rink amidada com grau de substituição de 0,61 por 45 minutos. Os grupos Fmoc foram então removidos com solução de 4-metilpiperidina 25%. A

ativação, incorporação na resina e desproteção do grupo Fmoc foram então repetidas até síntese completa da cadeia dos peptídeos. Depois de terminada a síntese, os peptídeos foram clivados da resina juntamente com a desproteção da cadeia lateral com uma mistura contendo 9,4% de TFA, 2,4% de água e 0,1% de triisopropilsilano. O peptídeo foi precipitado do material bruto com éter diisopropílico por 16 horas a 4 °C, seguido de centrifugação a 3000 rpm (Eppendorf centrifuge 5804 R) por 5 minutos. O sólido obtido foi lavado duas vezes com éter diisopropílico gelado e centrifugado novamente. O precipitado contendo o peptídeo foi então solubilizado em água e liofilizado. Os peptídeos sintetizados foram purificados por cromatografia em fase reversa utilizando-se a coluna Sephasil Peptide C18 (Shimadzu) acoplada a sistema de HPLC (Shimadzu). Primeiramente, a coluna foi lavada com a solução de TFA 1.1% por 10 minutos. Os peptídeos foram eluídos posteriormente utilizando-se um gradiente de 0 a 25% de acetonitrila durante 75 minutos com 0 –10 minutos até 10% de acetonitrila. Após a purificação, os peptídeos foram submetidos à espectrometria de massa em equipamento Autoflex Speed MALDI/TOF (Bruker) para confirmação de sua massa molecular.

4.19 Preparação do antígeno bruto

Antígeno bruto foi preparado através de lise por ultrassom conforme adaptado de (Vitor and Chiari, 1987). Um total de 1×10^{10} epimastigotas obtidas conforme o item 5.3 foram ressuspendidos em 5 mL de PBS pH 7.4. Os parasitos foram então submetidos à ruptura por ultrassom cinco vezes a 25 hertz por 45 segundos cada, com intervalos entre as repetições de 30 segundos. Todo procedimento foi realizado com as amostras no gelo. A concentração de proteínas foi determinada pelo método de Lowry (Lowry *et al.*, 1951). Para a construção da curva de calibração, foi utilizado BSA 4 mg/mL que foram diluídos em diferentes soluções padrões para as seguintes concentrações: 4; 2; 1; 0,5; 0,25; 0,125 mg/mL. Em placas de poliestireno de 96 poços eram aplicadas: 960 uL da solução de Na_2CO_3 3% em NaOH 0,1 N, 20 uL de tartarato de sódio e potássio 4%, 20 uL de sulfato de cobre 2%, 10 μL das amostras ou das soluções padrões de BSA e 90 uL de água. Após agitar, aguardou-se 10 minutos e em seguida adicionou-se 100 μL da solução de Folin 1:3. Após 10 minutos, as amostras foram lidas em um espectrofotômetro a 660 nm. A curva de calibração foi construída

com os valores de absorvância das soluções padrões e as concentrações de proteína da amostra foram determinadas utilizando a curva obtida.

4.20 ELISA

Ensaio de ELISA foram realizados em placas de PVC flexível de 96 poços (BD Falcon). Em cada poço, 2 µg de peptídeo sintético ou de antígeno bruto diluídos em 50 µL de água Milli-Q foi adicionado e as placas incubadas a 37°C até evaporação de todo o líquido. Em seguida, o bloqueio foi realizado tratando-se as placas com tampão de bloqueio 5% de soro bovino fetal em PBS por 1 hora a 37°C. Peptídeos e excesso da solução de bloqueio não ligados foram removidos lavando-se os poços três vezes com tampão PBS-0.05% Tween 20. Após a lavagem das placas, 50 µL dos soros diluídos 1:100 em tampão de bloqueio foram adicionados, seguido de incubação por 1 hora a 37°C. As placas foram novamente lavadas por quatro vezes e anticorpo anti-IgG humano ou murino conjugado a peroxidase diluído 1:2000 no tampão de bloqueio foi adicionado. Após incubação das placas por 1 hora a 37°C, um novo ciclo de quatro lavagens foi realizado e 100 µL da solução substrato contendo ácido cítrico 0,1 M, Na₂PO₄ 0,2 M, OPD 0,05% e H₂O₂ 0,1% foi então adicionada. As placas foram incubadas à temperatura ambiente ao abrigo de luz por cerca de 15 minutos, quando se adicionou 50 µL de H₂SO₄ e a absorvância lida em leitor de ELISA a 492 nm. Os valores de cutoff (C) foram calculados para cada placa como sendo: $C=m+3SD$, onde m é a média da absorvância e SD é o desvio padrão de resultados obtidos com soro de indivíduos saudáveis ou camundongos não infectados.

4.21 ELISA de avides

Ensaio de ELISA de avides foram baseados no método dissociativo usando uréia como agente desnaturante proposta por (Hedman *et al.*, 1989). Também foram realizados em placas de PVC flexível de 96 poços (BD Falcon) e os experimentos realizados em duplicata. Em cada poço, 2 µg de peptídeo sintético ou de antígeno bruto diluídos em 50 µL de água Milli-Q foi adicionado e as placas incubadas a 37°C até evaporação de todo o líquido. O bloqueio foi então realizado tratando-se as placas

com tampão de bloqueio 5% de soro bovino fetal em PBS por 1 hora a 37°C. Peptídeos e excesso da solução de bloqueio não ligados foram removidos lavando-se os poços três vezes com tampão PBS-0.05% Tween 20. Após a lavagem das placas, 50 uL dos soros diluídos 1:100 em tampão de bloqueio foram adicionados, seguido de incubação por 1 hora a 37°C. As placas foram novamente lavadas por quatro vezes. Como o experimento foi feito em duplicata, previamente à adição do anticorpo conjugado com peroxidase, foi adicionado em uma réplica 50 uL de uréia 6 M em PBS e na outra réplica, apenas 50 uL de PBS. Anticorpo anti-IgG humano ou murino conjugado a peroxidase diluído 1:2000 no tampão de bloqueio foi adicionado. Após incubação das placas por 1 hora a 37°C, um novo ciclo de quatro lavagens foi realizado e 100 uL da solução substrato contendo ácido cítrico 0,1 M, Na₂PO₄ 0,2 M, OPD 0,05% e H₂O₂ 0,1% foi então adicionada. As placas foram incubadas à temperatura ambiente ao abrigo de luz por cerca de 15 minutos, quando se adicionou 50 uL de H₂SO₄ e a absorbância lida em leitor de ELISA a 492 nm. Os resultados foram apresentados como índice de avides (IA), determinados pela razão entre os valores de absorbância das amostras tratadas com uréia e os valores de absorbância das amostras não tratadas e expressos em porcentagem. Um IA menor que 40% foi considerado de baixa avides, entre 41 e 70% de média avides e maior que 70% de alta avides.

4.22 Ala scan

O mapeamento dos aminoácidos de epitopos que são importantes nas ligações com anticorpos foi realizada pela técnica de Ala scan (Winkler and Campbell, 2008). Para isso, utiliza-se a técnica de spot síntese descrita no item 5.8 para construção de uma membrana de celulose com peptídeos ligados covalentemente. Na técnica de Ala scan, o aminoácido alanina é usado para substituir sequencialmente cada resíduo de aminoácido do peptídeo original. A substituição de um resíduo crítico no reconhecimento do anticorpo resulta em uma diminuição de reatividade. Após a síntese da membrana, experimentos de imunoblotting foram realizados conforme o item 5.9. Durante a análise por densitometria utilizando o software ImageMaster™ 2D Platinum (GE), os spots que deixaram de ser reconhecidos ou tiveram o nível de reconhecimento diminuído foram identificados.

4.23 Identificação de padrões no proteoma de parasitos

Identificação de padrões de aminoácidos em sequências de proteínas do proteoma de *L. braziliensis* foi realizada utilizando o programa fuzzpro do pacote EMBOSS (Rice *et al.*, 2000). Este programa recebe como entrada um arquivo multifasta contendo as sequências protéicas e um determinado padrão de “strings” com tamanho definido. Para posições variáveis da sequência do padrão é utilizado o caracter X. O programa retorna o identificador de todas as sequências protéicas do arquivo multifasta que contenham o padrão.

4.24 Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando software Prism 5.0. Para cada análise foram obtidos os valores das médias, dos desvios-padrão e erros-padrão para cada grupo experimental e controle. Antes dos testes de comparação entre grupos experimentais e controle, foi utilizado o teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov para identificar se a distribuição dos dados é gaussiana ou não. Caso a distribuição seja gaussiana, a comparação entre dois grupos experimentais foi feita usando o teste T de Student não-pareado enquanto que ANOVA foi utilizado para comparações de mais de dois grupos experimentais. Em distribuições não gaussianas, foi utilizado o teste Mann-Whitney para comparação de grupos experimentais diferentes. Valores $p < 0,05$ foram considerados como diferenças estatisticamente significativas. Para os peptídeos conservados entre as diferentes cepas de *T. cruzi*, foram realizados cálculos de especificidade e sensibilidade para peptídeos conservados com potencial de serem usados para o diagnóstico de *T. cruzi*. A sensibilidade é a fração das amostras que obtiveram resposta positiva no teste entre aqueles infectados com *T. cruzi* e foi calculada pela expressão:

$$S = \frac{VP}{VP + FN}$$

onde S é a sensibilidade, VP é o número de soros de indivíduos infectados com *T. cruzi* que possuem reatividade acima do *cutoff* para um determinado peptídeo e FN é

o número de soros de indivíduos infectados que possuem reatividade abaixo do *cutoff* para o mesmo peptídeo.

A especificidade é a fração das amostras que obtiveram resposta negativa no teste entre aqueles que não estão infectados por *T. cruzi*, mas estavam infectados por *L. braziliensis*:

$$E = \frac{VN}{VN + FP}$$

onde E é a especificidade, VN é o número de soros de indivíduos infectados com *L. braziliensis* e não infectados *T. cruzi* que não possuem reatividade acima do *cutoff* para um determinado peptídeo e FP é o número de soros de indivíduos infectados com *L. braziliensis* e não infectados *T. cruzi* que possuem reatividade acima do *cutoff* para o mesmo peptídeo.

5 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

As principais etapas realizadas neste trabalho são apresentadas na Figura 4.

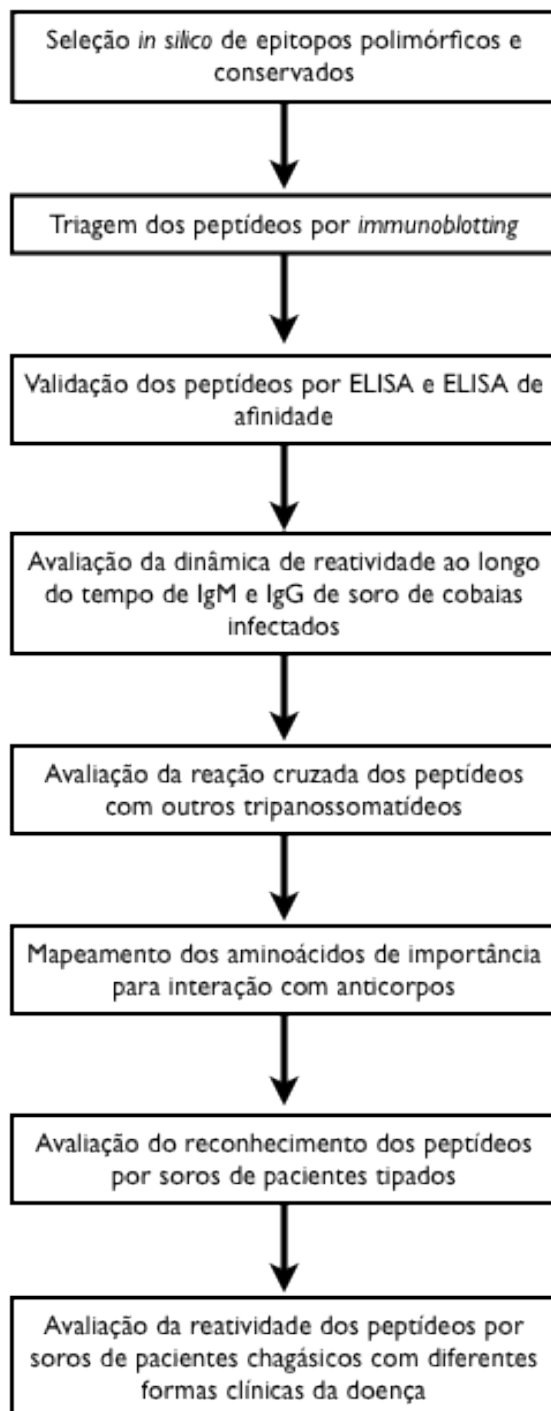


FIGURA 6 – Delineamento experimental. O fluxograma apresenta as principais etapas para identificação de epitopos lineares de célula B polimórficos e conservados de *T. cruzi* e para a caracterização do potencial destes peptídeos para o sorodiagnóstico e sorotipagem do parasito (descrição no texto).

Inicialmente, sequências de aminoácidos com alto potencial de ser um epítipo de célula B no proteoma da cepa CL Brener de *T. cruzi* foram identificadas utilizando ferramentas de bioinformática. As sequências mais promissoras foram então selecionadas e sintetizadas em membrana de celulose para a triagem experimental através da avaliação da reatividade dos epítipos contra “pool” de soros de camundongos C57BL6 infectados com três diferentes cepas de *T. cruzi* por *immunoblotting*. Dois epítipos com reatividade alta e similar entre as três cepas e três peptídeos com reatividade positiva para apenas para uma das três cepas foram selecionados para a síntese solúvel permitindo validação e caracterização do seu potencial no sorodiagnóstico e sorotipagem do parasito. A validação da reatividade dos peptídeos foi realizada utilizando as técnica de ELISA e ELISA de afinidade. Para cada peptídeo, inicialmente foi analisada a reatividade contra os soros individuais de cada animal que compunham o *pool* de soro usado na triagem por *immunoblotting*. Também testou-se o efeito da quantidade de inóculo sobre o reconhecimento dos peptídeos. A avaliação da possível utilização dos peptídeos para diagnóstico durante a fase aguda e crônica da doença de Chagas foi realizado utilizando soro de cobaias (*C. porcellus*) com diferentes tempos após a infecção. Como é freqüente a ocorrência de reação cruzada no sorodiagnóstico de *T. cruzi* principalmente com soro de pacientes infectados com outros tripanossomatídeos, realizamos teste de reação cruzada utilizando soro de pacientes infectados com *L. braziliensis* e camundongos C57BL/6 com infectados com *T. rangeli*. Para melhor entendimento do reconhecimento diferencial dos peptídeos pelas diferentes cepas de *T. cruzi* e reações cruzadas com outras parasitoses, os aminoácidos de importância para interação com anticorpos foram mapeados utilizando a técnica de Ala scan. Após caracterização da reatividade e afinidade utilizando modelos animais, avaliou-se a aplicabilidade destes epítipos para diagnóstico sorológico de amostras de pacientes através da mensuração e caracterização do perfil de reatividade de soro de pacientes chagásicos infectados com parasitos pertencente da linhagem TcII e pacientes com diferentes manifestações clínicas da doença de Chagas. A seguir descrevemos detalhadamente os resultados de cada uma das etapas deste trabalho.

6 RESULTADOS

6.1 Seleção *in silico* de peptídeos polimórficos e conservados na cepa CL Brener utilizando predição de epitopo de célula B

Inicialmente, sequências de aminoácidos com alto potencial de ser um epitopo de célula B no proteoma da cepa CL Brener de *T. cruzi* foram identificadas utilizando o algoritmo Bepipred (Larsen *et al.*, 2006). Este algoritmo calcula um valor de predição para cada aminoácido que se correlaciona positivamente com a probabilidade deste participar de um epitopo linear de célula B. O valor de “*cutoff*” escolhido foi 1.3 para minimizar a identificação de epitopos falso-positivos, pois fornece 96% de especificidade e 13 % de sensibilidade (CBS, 2010). Este valor de “*cutoff*” foi capaz de identificar um epitopo extensivamente caracterizado (Pais *et al.*, 2008), na sequência da proteína L7a (Tc00.1047053506401.320) de *T. cruzi* (FIGURA 7) que foi utilizado como um dos controles positivos na etapa de triagem experimental.

```
>Tc00.1047053506401.320 |||60S ribosomal protein L7a,  
putative|Trypanosoma cruzi|chr unknown69|TIGR||Auto  
MPGKEVKKAA KPAAKTAAKT AAKPAAKSAA KPAAKPAAKP AAKPAAKPAA KTAAKPAKKP  
AVKPTVKPAA KAAAPYKKPA AISPFFVARPK NFGIGHDVPY ARDLSRFMRW PTFVTMQRKK  
RVLQRRLLKVP PALHQFTKVL DRSSRNELLK LVKKYPSETR RARRQRLFDV ATEKKKNPEA  
ASKKAPLSVV TGLQEVTRTI EKKTARLVM I ANNVDPIELV LWMPTLCRAN KVPYAIVKDK  
ARLGDVGRK TATCVAITDV NADEEAALKN LIRSVNARFL ARSDVIRRQW GGLQLSLRSR  
AELRKKRARN AGKDAAAVM
```

FIGURA 7 – Correspondência entre epitopos preditos e experimentalmente mapeados proteína L7a de *T. cruzi*. Os resíduos destacados em cinza foram preditos como parte de um epitopo linear de célula B, enquanto que os resíduos em negrito foram experimentalmente mapeados como participantes de epitopos de célula B (Pais, DaRocha et al. 2008).

Iniciando com 16502 proteínas completas do proteoma predito da cepa CL Brener de *T. cruzi*, foram identificados 3983 pares de alelos Esmo e Non-esmo de acordo com a anotação do genoma do parasito (El-Sayed *et al.*, 2005). Os pares de alelos foram então alinhados globalmente utilizando o algoritmo Clustal W (Chenna

et al., 2003) e os dados de polimorfismo foram correlacionados com os dados de predição de epítopos lineares de célula B obtidos para cada sequência. Em seguida, os peptídeos foram classificados como epítopos preditos polimórficos e conservados utilizando os seguintes critérios:

- (i) sequências de 15 aminoácidos com valor de predição do Bepipred acima de 1.3;
- (ii) para epítopos preditos polimórficos deveria existir um somatório de polimorfismo acima de 6 conforme a TABELA 1 e cada variante deveria ter valor de predição do Bepipred diferencial entre os haplótipos Esmo e Non-esmo;
- (iii) para serem considerados epítopos preditos conservados não deveria existir polimorfismo e variação entre o valor de predição do Bepipred entre sequências dos pares de alelos Esmo e Non-esmo.

Desta seleção foram obtidos 1488 epítopos preditos conservados entre os pares de alelos dos haplótipos Esmo e Non-esmo e 428 epítopos preditos polimórficos entre os dois haplótipos.

Nos testes de sorodiagnóstico convencionais para identificar infecção por *T. cruzi* frequentemente é observado reações cruzadas com outros parasitos. Para minimizar a chance de ocorrer tal tipo de reação contra os epítopos selecionados *in silico*, eliminou-se peptídeos com sequências similares em outros parasitos filogeneticamente relacionados. Para isso, as sequências dos epítopos preditos foram alinhadas com as sequências do proteoma de *Leishmania major*, *Leishmania braziliensis*, *Leishmania infantum*, *Trypanosoma brucei* e *Trypanosoma rangeli* e aqueles peptídeos com mais que 70% de identidade ao longo de 70% da sequência foram eliminados das análises subsequentes. Ao final da seleção *in silico*, obteve-se 242 epítopos preditos polimórficos e 1086 epítopos preditos conservados, ambos *T. cruzi* específicos baseado nas análises *in silico*. Destas sequências, 49 peptídeos conservados e 98 peptídeos polimórficos (49 Esmo e 49 Non-esmo específicos) foram selecionados utilizando o critério de maior valor de predição de Bepipred. Como controles positivos foram selecionados os peptídeos experimentalmente mapeados

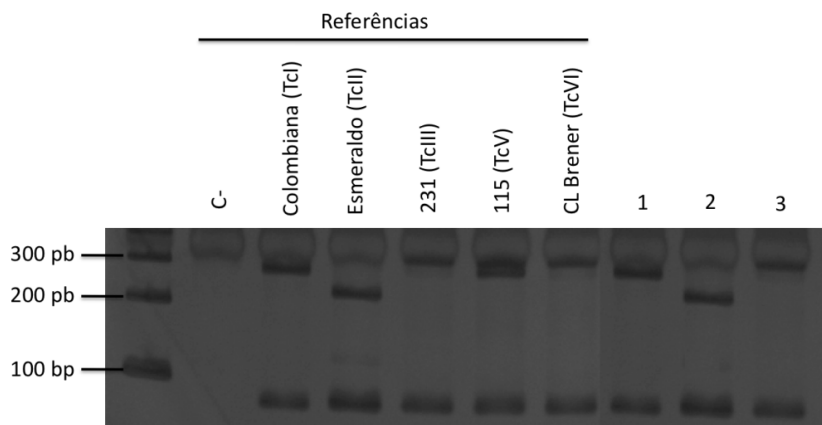
derivados das proteínas L7a (Pais *et al.*, 2008) e trans-sialidase (Peralta *et al.*, 1994). O controle negativo corresponde ao peptídeo PIELVLWMPTLCRAN está presente na região da proteína L7a para a qual não é observada reatividade com o soro de indivíduos infectados (Pais *et al.*, 2008). Os peptídeos foram sintetizados em membrana de celulose pela técnica spot síntese.

6.2 Caracterização dos soros usados neste estudo

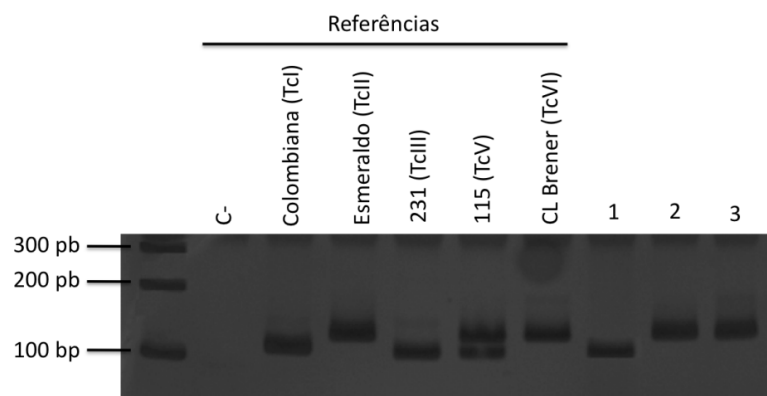
6.2.1 Soro de camundongos C57BL/6 cronicamente infectados com diferentes cepas de *T. cruzi*

Soros de camundongos C57BL6 utilizados neste estudo foram obtidos através da infecção dos animais com três cepas de *T. cruzi* pertencentes a diferentes linhagens evolutivas do parasito: Colombiana (TcI), Y (TcII) e CL Brener (Tc VI). A linhagem de cada cepa foi confirmada utilizando os marcadores moleculares COII, rDNA 24S α e Mini-exon SL-IRac (FIGURA 8). Para a cepa Colombiana foi observado fragmentos de aproximadamente 81 e 264 pb para o marcador COII, 110 pb para o marcador rDNA 24S α e a presença da banda representando um fragmento de aproximadamente 150 pb para o marcador Mini-exon SL-IRac. Estes resultados juntos confirmam que uma das cepas utilizadas neste estudo pertence a TcI, linhagem da cepa Colombiana. Para a cepa Y, obteve-se padrões de fragmentos para os três marcadores característicos da linhagem TcII e são eles: aproximadamente 81 e 212 pares de bases para COII, 125 para 24S α e a presença da banda de 150 para Mini-exon SL-IRac. A linhagem TcVI foi confirmada para a cepa CL Brener, onde foram observados os seguintes fragmentos com aproximadamente 81 e 294 pb para COII, 125 pb para 24S α e a presença da banda de 150 pb para Mini-exon SL-IRac.

A)



B)



C)

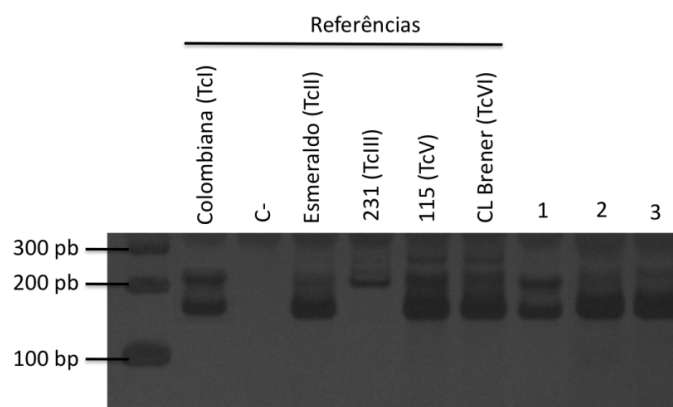


FIGURA 8 – Genotipagem de tripomastigotas de cultura de três cepas de *T. cruzi*. A) Marcador molecular COII após digestão com enzima de restrição *Alu I*. B) Marcador molecular rDNA 24S α . C) Marcador molecular mini-exon SL-IRac. C-, controle negativo. 1, cepa Colombiana. 2, cepa Y. 3, cepa CL Brener usadas neste estudo. Os fragmentos de DNA foram fracionados em gel de poliacrilamida 6% e corado pela prata.

Uma vez tendo sido confirmada a linhagem das cepas selecionadas neste estudo, tripomastigotas de cultura foram utilizados para infectar cronicamente seis camundongos C57BL/6 conforme especificado na TABELA 5. Como as cepas utilizadas apresentam diferentes padrões de virulência em modelo murino, para permitir a cronificação da infecção, foram utilizadas diferentes inóculos de cada cepa. Como controle, obteve-se também soro de C57BL/6 infectados com três diferentes quantidades de tripomastigotas da cepa CL Brener. As infecções foram confirmadas pela observação e contagem dos parasitos no sangue de cada animal após 15 dias de infecção. Após 90 dias de infecção, foi realizada uma nova mensuração de parasitemia de cada animal, além da detecção de anticorpos IgG contra o antígeno bruto do parasito. A negatização da parasitemia (TABELA 5) bem como a soroconversão dos camundongos (FIGURA 9) confirmaram que os animais estavam na fase crônica da infecção. Soro de seis camundongos C57BL/6 não infectados com mesma idade e sexo dos animais infectados foram utilizados como controle negativo.

TABELA 5 – Parasitemia por exame a fresco dos animais infectados com diferentes cepas de *T. cruzi*.

Cepa	Inóculo (tripomastigotas/ animal)	Parasitemia (tripomastigotas/5mL de sangue)	
		15 p.i.	90 p.i.
Colombiana	25	1750 ± 149	NO
Y	1000	908 ± 56	NO
CL Brener	50	742 ± 84	NO
CL Brener	100	954 ± 68	NO
CL Brener	500	636 ± 106	NO

p.i., pós-infecção.

NO, não observado.

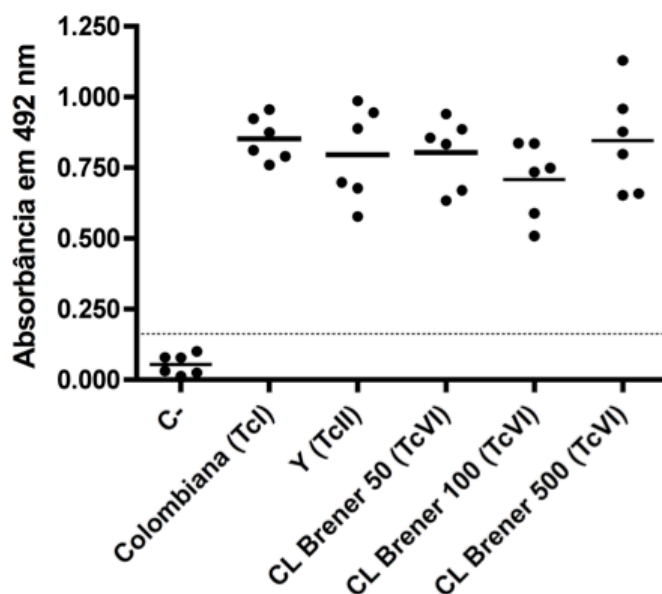


FIGURA 9 – Reconhecimento do antígeno bruto da cepa CL Brener de *T. cruzi* por IgG presente no soro de camundongos infectados por diferentes cepas do parasito. CL Brener 50, 100 e 500 representam camundongos infectados com 50, 100 e 500 tripomastigotas da cepa CL Brener, respectivamente. C-, controle negativo.

6.4.2 Soro de cobaias (*C. porcellus*) infectados com a cepa Y após diferentes dias de infecção

A dinâmica do reconhecimento dos antígeno bruto foi avaliada através da reatividade e afinidade dos anticorpos IgM e IgG de soro de cobaias (*C. porcellus*) infectados por 5, 13, 27, 41, 117 e 167 dias com a cepa Y de *T. cruzi* (FIGURA 10). Para IgM, a partir do 5º dia após infecção observa-se positividade na reatividade (FIGURA 10A) com detecção de anticorpos de baixa afinidade (FIGURA 10C). O pico da reatividade foi obtido aproximadamente no 13º juntamente com a detecção de anticorpos de afinidade média ao antígeno bruto que se mantém com este perfil até o 41 dia após a infecção. A partir deste momento, há um decaimento na reatividade de IgM, que torna-se negativa, abaixo do “cutoff”, 167 dias após a infecção acompanhada pela redução da afinidade dos anticorpos. A reatividade de IgG contra o antígeno bruto torna-se positiva, ou seja, “acima do “cutoff”, a partir do 13º dia com leve tendência a aumentar ao longo dos dias de infecção (FIGURA 10B). Este perfil foi acompanhado pelo aumento da afinidade destes anticorpos (FIGURA 10C).

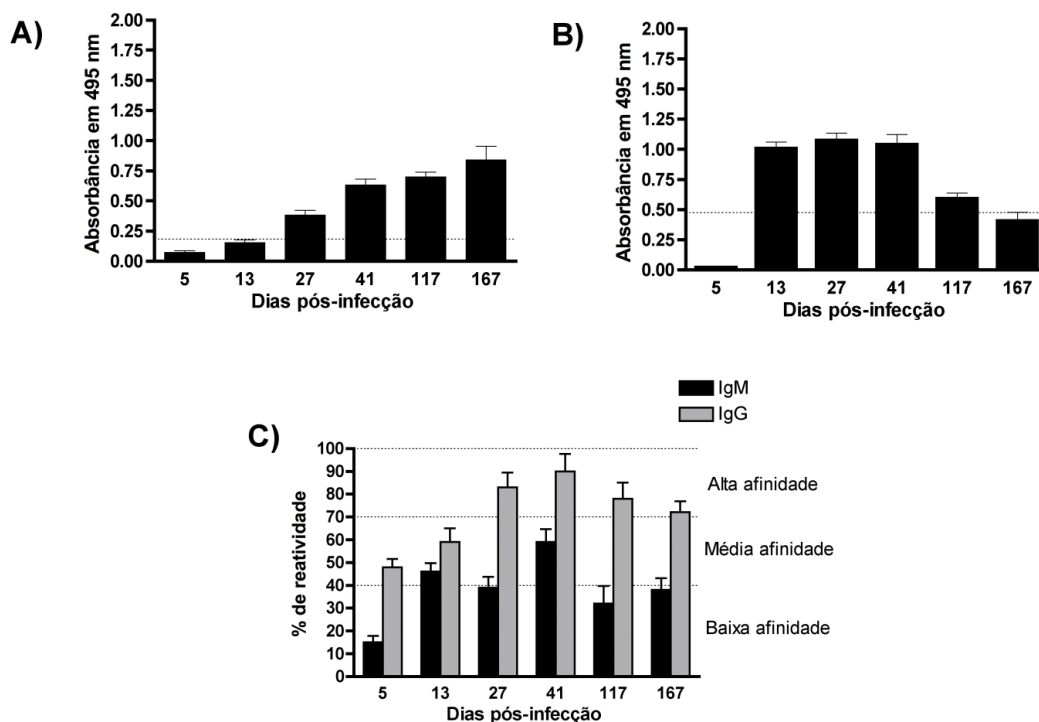


FIGURA 10 – Dinâmica do reconhecimento do antígeno bruto de *T. cruzi* por soro de cobaias infectados. A) Reactividade de IgM. B) Reactividade de IgG. C) Afinidade dos anticorpos da classe IgM e IgG.

6.4.3 Soro de camundongos infectados com *T. rangeli*

Na falta de uma soroteca de humanos infectados com *T. rangeli*, soros de camundongos C57BL/6 infectados com este parasito foram utilizados neste trabalho. Os animais foram infectados com 1×10^5 tripomastigotas metacíclicas de *T. rangeli* e a avaliação de parasitos no sangue foi realizada de dois em dois dias por duas semanas. A parasitemia foi negativa durante todo este período, porém foi possível detectar material genético do parasito em amostras de sangue de todos os animais após 7 dias de infecção. Para tanto, nós realizamos análises de PCR usando iniciadores específicos para um fragmento do gene SnoRNA-cl1 de *T. rangeli* (Morales *et al.*, 2002) resultando um um produto de amplificação de 650 pb (Figura 11A). A reatividade cruzada de IgG contra o antígeno bruto de *T. cruzi* ocorreu com o soro de todos os animais infectados (FIGURA 11B).

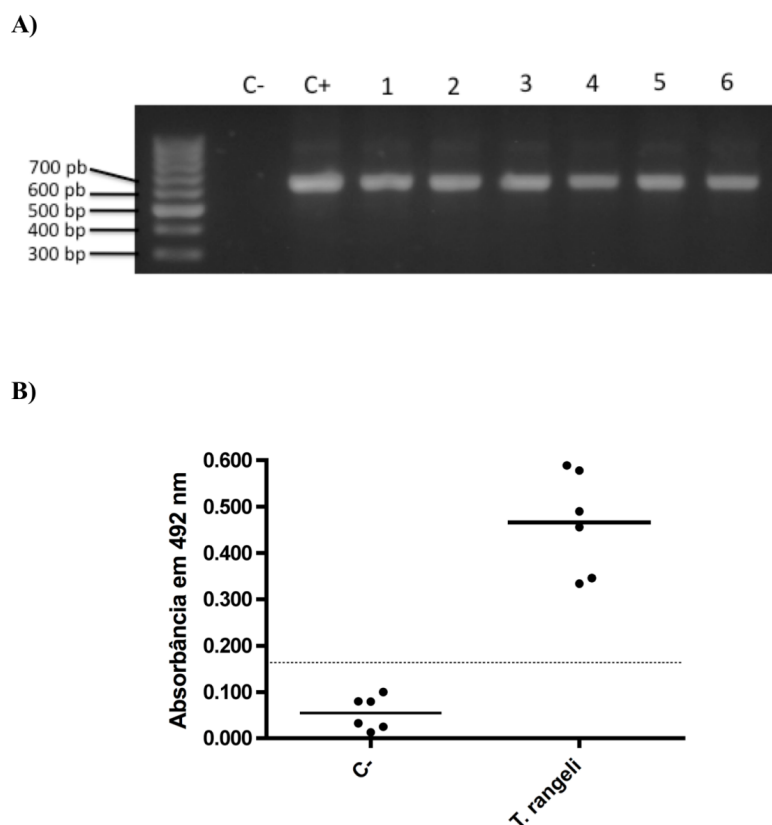


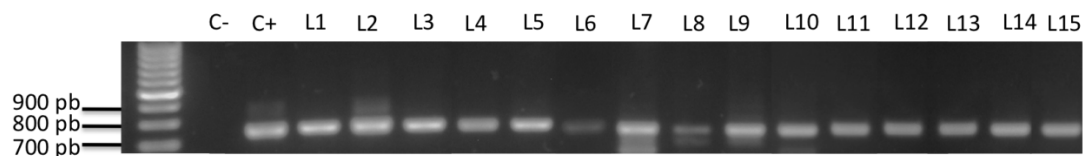
FIGURA 11 – Camundongos C57BL/6 infectados com *T. rangeli*. A) Padrão de amplificação usando amostras de sangue de camundongos após 7 dias de infecção e iniciadores específicos para o gene SnoRNA-cl1 de *T. rangeli* (Morales *et al.*, 2002). Presença de uma banda de 650 pb confirma a infecção. B) Reatividade de IgG contra o antígeno bruto de *T. cruzi* obtida após 90 dias de infecção. C-, controle negativo. C+, controle positivo DNA de epimastigotas de *T. rangeli* cultivadas em meio axênico. 1 a 6, camundongos infectados.

6.4.4 Pacientes com leishmaniose

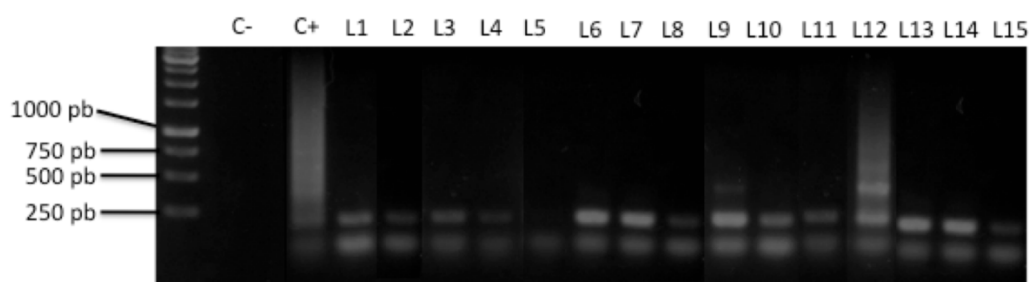
Amostras de soro e sangue de 15 indivíduos com lesão característica e diagnóstico parasitológico de leishmaniose foram submetidas à análise de PCR utilizando “primers” específicos para um fragmento de aproximadamente 750 pb do minicírculo do kDNA de *L. braziliensis* (Maarten *et al.*, 1992) (FIGURA 12A). Além disso, para eliminar reatividade cruzada devido a uma possível co-infecção com *T. cruzi*, as amostras foram submetidas a nova reação de PCR usando primers específicos para a sequência do DNA satélite 195 SAT de *T. cruzi* (Moser *et al.*, 1989) (FIGURA 12B). 195 SAT é uma sequência satélite de 195 pb que se repete em tandem e compreende aproximadamente 5% do genoma do parasito. Uma vez que os primers podem se anelar a diferentes unidades da sequência satélite é esperado que

amplicons de diferentes tamanhos sejam obtidos, produzindo um rastro acima de 195 pb que confirma a positividade da reação.

A)



B)



C)

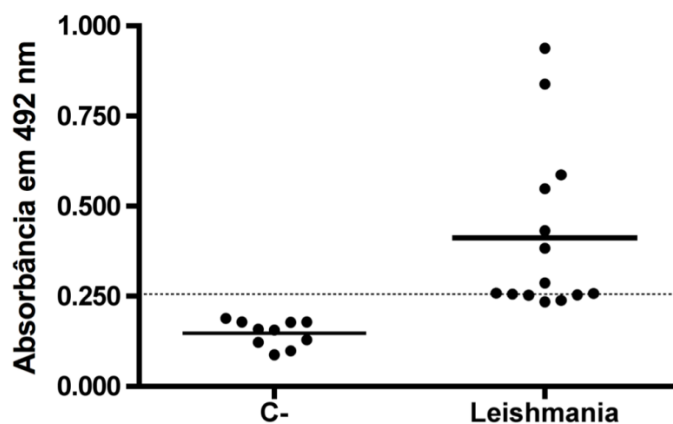


FIGURA 12 – Amostras de pacientes infectados com *L. braziliensis*. A) Padrão de amplificação usando iniciadores específicos para um fragmento de minicírculo de kDNA de *L. braziliensis*. Presença de uma banda de 750 pb confirma a infecção. Como controle positivo foi utilizado DNA de promastigotas de *L. braziliensis* cultivadas em meio axênico. B) Padrão de amplificação usando iniciadores específicos para a sequência de DNA satélite 195 SAT de *T. cruzi*. Presença de um rastro de tamanho acima de 195 pb confirma a infecção. Como controle positivo foi utilizado DNA de formas epimastigotas da cepa CL Brener de *T. cruzi* cultivadas em meio axênico. C) Reconhecimento do antígeno bruto de *T. cruzi* por IgG de soro de pacientes. C-, controle negativo. C+, controle positivo. L1 a L15, pacientes com diagnóstico parasitológico de leishmaniose.

Apenas o indivíduo L12 apresentou confirmação de co-infecção. Esta amostra biológica não foi utilizada nas análises subsequentes. Além da pesquisa dos marcadores moleculares, a reatividade cruzada do soro dos indivíduos selecionados foram avaliados contra o antígeno bruto de *T. cruzi*, resultando em 50% de positividade (FIGURA 12C).

6.4.5 Pacientes chagásicos tipados e com diferentes formas clínicas da doença de Chagas

Inicialmente, testou-se a reatividade de indivíduos mono infectados por parasitos da linhagem TcII identificados pela técnica de genotipagem, os quais os soros foram reativos com antígeno bruto de *T. cruzi* (FIGURA 13A). Soro de pacientes chagásicos com diferentes formas clínicas da doença de Chagas também foram reativos contra o antígeno bruto (FIGURA 13B). Como controle negativo, foram utilizados soro de indivíduos não infectados com *T. cruzi* e *L. braziliensis*. Estas amostras foram negativas na pesquisa dos marcadores moleculares destes parasitos (FIGURA 14).

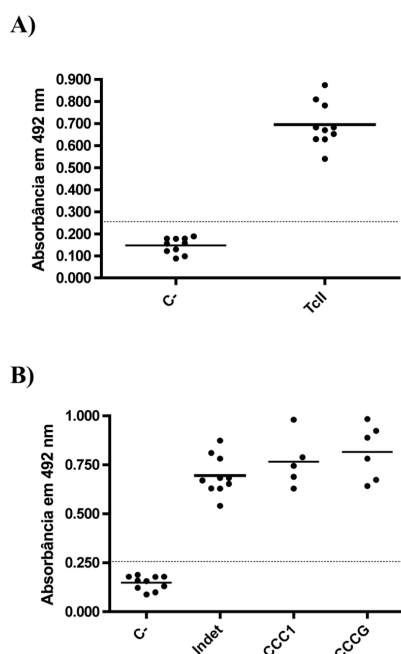
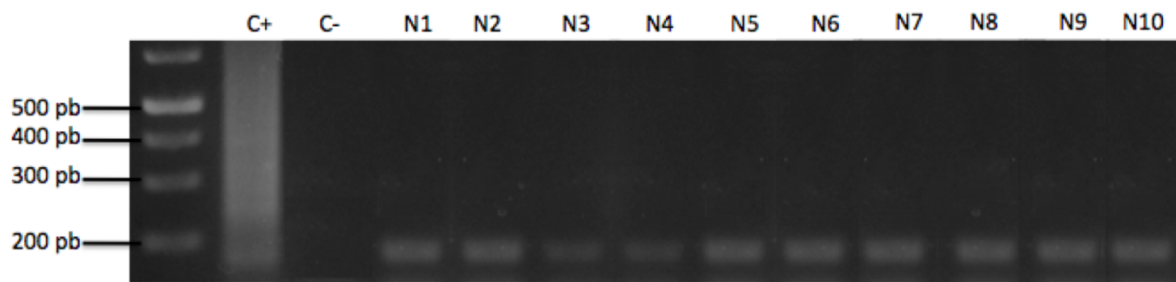


FIGURA 13 – Reconhecimento dos antígeno bruto de *T. cruzi* por soro de pacientes chagásicos. A) Pacientes mono infectados por parasitos pertencente a linhagem TcII de *T. cruzi*. B) Pacientes com diferentes formas clínicas. C-, controle negativo. Indet, soros de pacientes chagásicos com a forma indeterminada da doença de Chagas. CCC1, soros de pacientes chagásicos com cardiopatia chagásica crônica grau 1. CCCG, soros de pacientes chagásicos com cardiopatia chagásica crônica grave.

A)



B)

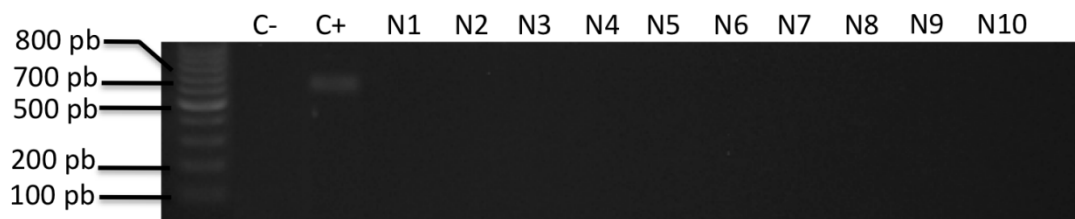


FIGURA 14 – Pacientes não infectados utilizados como controle negativo. A) Marcador molecular DNA satélite 195 SAT de *T. cruzi*. Como controle positivo foi utilizado DNA de formas epimastigotas da cepa CL Brener de *T. cruzi* cultivadas em meio axênico. B) Região do minicírculo de kDNA de 750 pb específicos de *L. braziliensis*. Como controle positivo foi utilizado DNA de promastigotas de *L. braziliensis* cultivadas em meio axênico. C-, controle negativo. C+, controle positivo. N1 a N10, indivíduos não infectados.

6.3 Triagem dos peptídeos por “immunoblotting”

A reatividade dos peptídeos na membrana contra os “pools” de soros de camundongos infectados com cada uma das três diferentes cepas de *T. cruzi* e camundongos não infectados foram então avaliados pela técnica de “immunoblotting”. O perfil de reconhecimento dos peptídeos da membrana por cada cepa é mostrado na FIGURA 15. A quantificação da reatividade de cada peptídeo da membrana foi realizada por análise de densitometria, seguida do cálculo do valor de intensidade relativa para cada “spot” reconhecido pelo soro de animais infectados por cada cepa utilizando a seguinte equação:

$$IR = \frac{VD_i}{VD_n}$$

onde IR é a intensidade relativa, VDi é o valor de densitometria de cada spot com “pool” de soro de animais infectados por cada uma das cepas de *T. cruzi* e VDn é o valor de densitometria de cada spot obtido pelo reconhecimento inespecífico por soro de animais não infectados. Para ser considerado reativo, um “spot” deveria ter IR acima de 2, ou seja, ter duas vezes maior valor de densitometria para o “pool” de soro de animais infectados do que o controle negativo.

Dos 150 peptídeos analisados, 36 foram reativos com “pool” de soros de animais infectados com pelo menos uma cepa de *T. cruzi* (FIGURA 14). Os valores de IR dos peptídeos reativos com soro de animais infectados com cada uma das cepas e anotação das proteínas que contém os epitopos são mostrados na TABELA 6. O controle positivo L7a (A1_120), destacado como vermelho na TABELA 6, foi reativo com soro de camundongos infectados com Y e CL Brener. Já o controle positivo trans-sialidase (B1_30), destacado em azul na TABELA 6, foi reativo apenas para soro de camundongos infectados com Y. Dos 36 peptídeos reativos, 12, 11 e 4 foram reativos com pool de soro de animais infectados apenas com Y, Colombiana e CL Brener, respectivamente. Além disso, 4 peptídeos foram reativos com as três cepas do parasito (FIGURA 16).

6.4 Seleção de peptídeos para síntese solúvel

Como a técnica de “immunoblotting” seguido de análise de densitometria é apenas semi-quantitativa é necessária validação dos resultados por uma técnica quantitativa, como ELISA. Para tanto, 5 dos 36 epitopos reativos foram selecionados para a síntese solúvel e posterior análise de antigenicidade por ELISA (Destacados em amarelo na TABELA 6). Dois destes epitopos (C6_30_cons e B7_30_cons) foram escolhidos por seu potencial para o sorodiagnóstico de *T. cruzi*, pois foram reconhecidos por “pool” de soros de animais infectados por todas as cepas e por isso, foram denominados como conservados. Os outros três peptídeos do parasito foram reconhecidos diferencialmente apenas por uma das cepas em estudo. Assim, os peptídeos A6_30_col, B2_30_Y e B6_30_cl foram escolhidos por ter reatividade preferencial com o “pool” de soros de camundongos infectados com a cepa Colombiana, Y ou CL Brener, respectivamente.

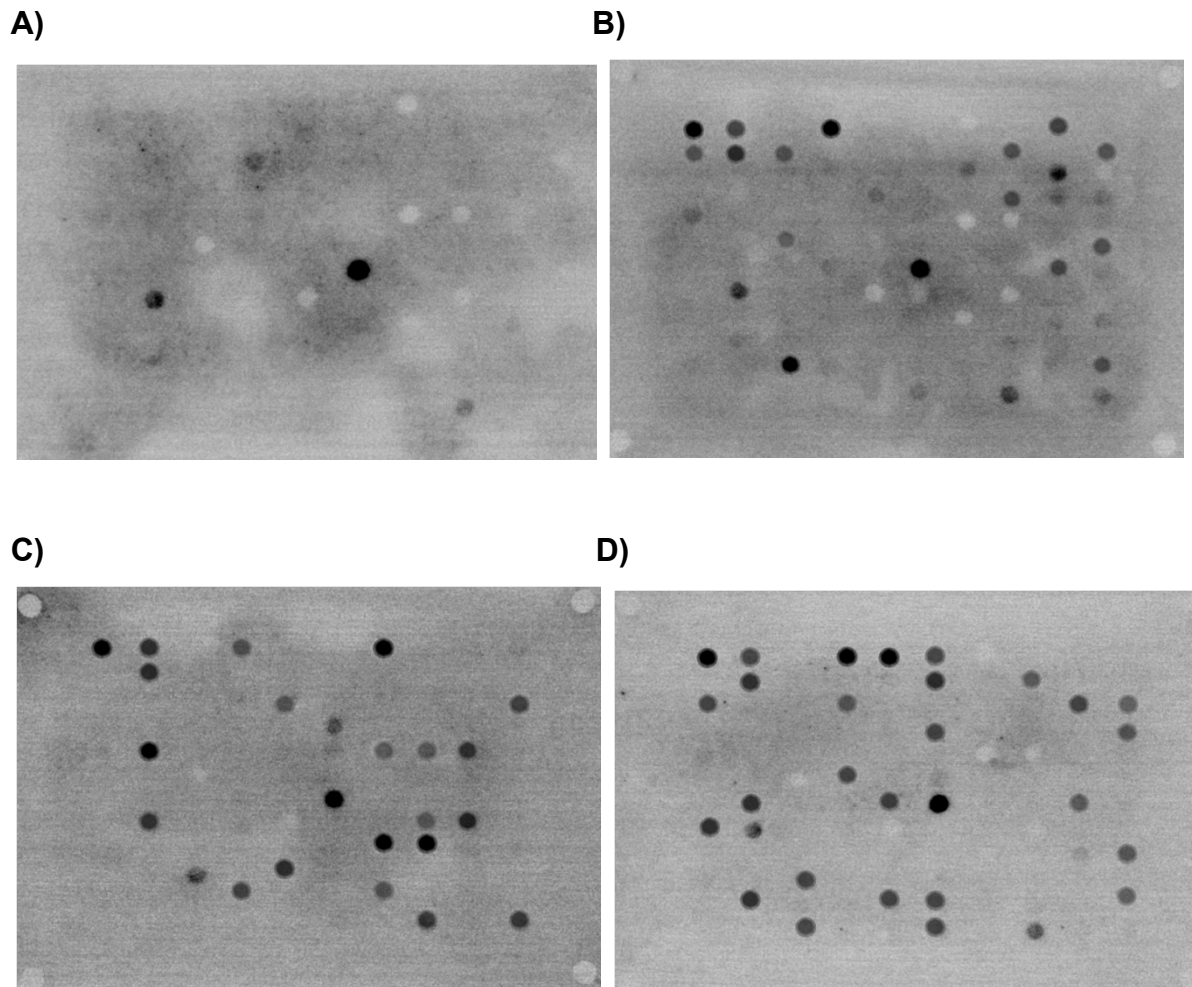


FIGURA 15 – Padrão de reconhecimento da membrana por soro de animais infectados por diferentes cepas do parasito. A) “Pool” de soros de animais não-infectados (controle). B) “Pool” de soros de animais infectados com a cepa CL Brener. C) “Pool” de soros de animais infectados com a cepa Y. D) “Pool” de soros de animais infectados com a cepa Colombiana.

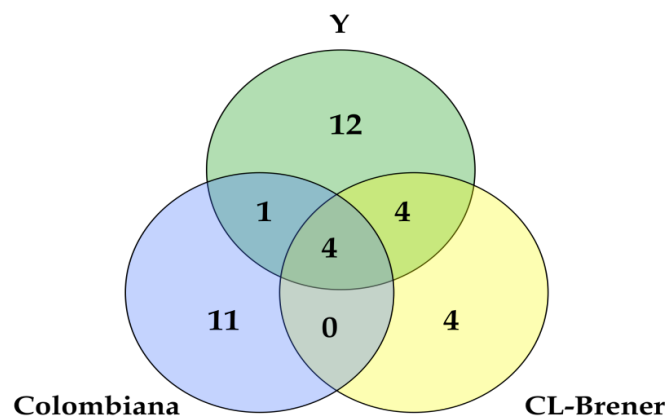


FIGURA 16 – Distribuição do número de peptídeos reconhecidos por soro de animais infectados por diferentes cepas de *T. cruzi*.

TABELA 6 – Peptídeos reativos com soro de camundongos infectados com diferentes cepas de *T. cruzi*.

Membrana ID	Intensidade Relativa			Gene	Peptídeo	Anotação
	Colombiana	CL Brener	Y			
A1_120	1,67	2,09	2,15	Tc00.1047053506401.320	AAKTAAPPAKSAAPPAKP	60S ribosomal protein L7a, putative
A5_120	1,23	1,23	2,83	Tc00.1047053508831.140	PSPFGIAAAGDKPSPFGQA	surface antigen 2 (CA-2), putative
C9_120	1,02	4,80	1,85	Tc00.1047053511529.150	KENEEGASGPDDASAG	hypothetical protein, conserved
C10_120	2,24	1,26	1,79	Tc00.1047053506531.40	GGSNEEKDPGETPAC	hypothetical protein, conserved
D6_120	2,09	0,93	1,60	Tc00.1047053503813.10	SPSEKTTTPGQPSLE	hypothetical protein, conserved
E2_120	2,00	0,96	1,02	Tc00.1047053506825.150	VGESNNNGTPDEERE	hypothetical protein, conserved
E7_120	2,10	1,30	1,48	Tc00.1047053508539.50	EANGSCSDYAQSADD	hypothetical protein, conserved
F10_120	2,31	2,22	2,64	Tc00.1047053506825.30	PHAASPTGTGANRST	hypothetical protein, conserved
G2_120	1,10	2,90	2,47	Tc00.1047053505807.120	SLSSSPLEPKKPR	lysyl-tRNA synthetase, putative
G10_120	1,28	1,03	2,86	Tc00.1047053503853.10	TPNDTANETTNELED	hypothetical protein, conserved
H2_120	2,02	1,08	0,81	Tc00.1047053504431.10	SDRDRDQRSREGPEE	hypothetical protein, conserved
I4_120	2,14	1,36	1,46	Tc00.1047053511907.190	PADPGGEDATDSSFR	hypothetical protein
I8_120	2,50	0,88	0,95	Tc00.1047053508857.90	PAGKHTAERGEEKT	hypothetical protein, conserved
J3_120	3,35	1,26	2,21	Tc00.1047053511859.50	SRGESGGVAPSDGVA	hypothetical protein, conserved
J10_120	1,52	1,64	2,00	Tc00.1047053509937.220	STGDAPQGAPSAPPM	protein kinase, putative
K3_120	1,32	2,64	0,93	Tc00.1047053510219.10	KRTTSPQISPEKSAS	hypothetical protein, conserved
K4_120	2,41	1,67	1,26	Tc00.1047053511291.40	QNRDSGVLEGPTATT	protein kinase, putative
K5_120	1,53	1,07	3,23	Tc00.1047053508153.300	ERTSSTEGSQPHLPG	hypothetical protein, conserved
L3_120	1,80	1,50	2,03	Tc00.1047053506509.50	AGGTSAGPAAGNSTQ	hypothetical protein, conserved
L4_120	1,37	1,03	2,63	Tc00.1047053508175.20	KGGTTKSAVGTFFSS	hypothetical protein, conserved
L6_120	2,13	2,21	3,00	Tc00.1047053506303.150	ALAEPPGGERNASD	hypothetical protein, conserved
L8_120	2,07	1,61	1,37	Tc00.1047053511907.220	VSRRVSGDGGDDGGVG	hypothetical protein, conserved
A2_30	1,39	1,00	2,95	Tc00.1047053507221.30	NGSGKGGTDREGDDDFN	hypothetical protein, conserved
A5_30	1,09	2,73	3,30	Tc00.1047053510857.40	FEGPSPGDPDKDF	RNA-editing complex protein, putative
A6_30	2,61	1,71	0,73	Tc00.1047053511837.129	ENSANPPPPDRSLPTP	RNA-binding protein, putative

A8_30	1,10	1,10	2,83	Tc00.1047053506401.330	GDDNDDDDGEEGDNTAL	hypothetical protein, conserved
B1_30	1,26	1,45	3,92	Tc00.1047053510307.284	AEPKSAEPKPAEPKS	trans-sialidase, putative
B2_30	1,39	1,77	4,26	Tc00.1047053511589.70	FFQPQPQPQPQPQQF	ADP-ribosylation factor GTPase activating protein, putative
B3_30	1,64	1,06	2,38	Tc00.1047053506251.40	ATAASGGGGGGGRNPSE	hypothetical protein
B4_30	1,68	2,87	2,89	Tc00.1047053508675.20	KVDDDDDDDKN	DNA excision repair protein, putative
B6_30	2,50	1,33	1,50	Tc00.1047053511041.20	FSDGAHGSASRGSGR	hypothetical protein, conserved
B7_30	2,97	2,82	3,32	Tc00.1047053506661.120	KRRKRQQQQQQ	hypothetical protein
B9_30	0,78	2,43	1,30	Tc00.1047053510359.320	MDDDDERTGGG	DNA-directed RNA polymerase III subunit, putative
B10_30	0,92	2,20	1,25	Tc00.1047053506859.150	VGAEGEGEKNDVPSEEQ	hypothetical protein
C6_30	2,59	2,70	2,31	Tc00.1047053510421.310	QRMSNASGGGGGGMRQNE	hypothetical protein, conserved
C7_30	1,34	2,11	2,97	Tc00.1047053511153.100	ARKNEDVNKADEEREI	RNA-binding protein, putative

Os peptídeos controle positivos estão destacados em azul(proteína L7a) e vermelho (trans-sialidase). Peptídeos selecionados para a síntese solúvel estão destacados em amarelo

6.5 Validação dos peptídeos

6.5.1 Validação e caracterização do peptídeo conservado C6_30_cons

O peptídeo C6_30_cons, originado de uma proteína hipotética de *T. cruzi* (Tc00.1047053510421.310), durante a etapa de triagem apresentou intensidade relativa de reatividade acima de 2 com “pools” de soros de animais infectados por todas as cepas de *T. cruzi* utilizadas (TABELA 6). Validação este peptídeo contra soros individuais de camundongos C57BL/6 por ELISA mostraram que para as três cepas houve reconhecimento acima do “cutoff” e sem diferença estatística (FIGURA 17A). Além disso, para a maioria das amostras, os anticorpos possuíam média afinidade pelo peptídeo, com algumas amostras possuindo anticorpos de alta afinidade (FIGURA 17A). Este perfil de reatividade dos soros e afinidades dos anticorpos foram independentes da quantidade de inóculo utilizado na infecção dos animais, uma vez que não foi observado diferença estatística entre os soros de camundongos C57BL/6 infectados com diferentes quantidades de inóculos da cepa CL Brener (FIGURA 17 B).

Acompanhando temporalmente a reatividade de IgM do soro de cobaias infectados com a cepa Y de *T. cruzi* foi possível observar reatividade acima do “cutoff” entre os dias 13 e 117 após a infecção (FIGURA 17C). Além disso, durante o período, estes anticorpos apresentaram média afinidade. Quanto aos anticorpos da classe IgG, a reatividade foi também considerada positiva a partir do 13º dia e foi mantida durante todo período avaliado. Entre os dias 13 e 41 a afinidade dos anticorpos destas amostras foi classificada como média e após este período foram observados anticorpos de alta afinidade (FIGURA 17C).

Nenhuma amostra de soro de camundongos C57BL/6 infectados com *T. rangeli* apresentou reatividade acima do “cutoff” com o peptídeo conservado C6_30_cons (FIGURA 18A). Em relação às 14 amostras de pacientes infectados com *L. braziliensis* e não infectados com *T. cruzi*, apenas uma apresentou reatividade acima do valor de “cutoff” e esta reatividade é associada a anticorpos de alta afinidade (FIGURA 18B).

Como o peptídeo apresentou reatividade similar para as três cepas de *T. cruzi*, identificou-se quais os aminoácidos seriam importantes para interação com anticorpos produzidos por camundongos infectados com cada uma destas cepas utilizando a

técnica de Ala scan (Winkler e Campbell, 2008). Observou-se um padrão conservado GXXXXMRQNE na região carboxi-terminal do peptídeo que sugere ser a principal sequência à qual os anticorpos provenientes das três cepas se ligariam (FIGURA 19).

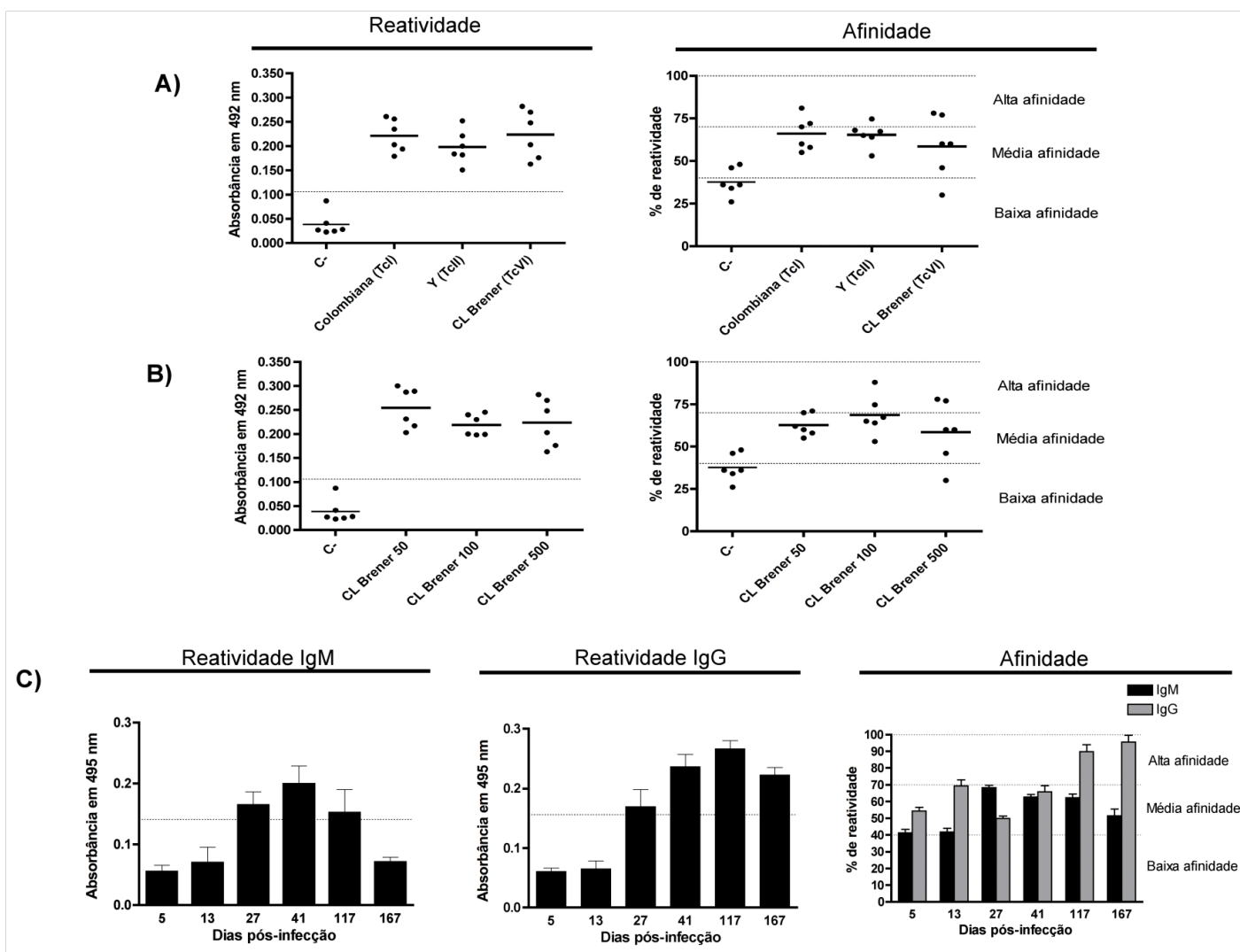


FIGURA 17 – Validação e caracterização da reatividade do peptídeo conservado C6_30_cons. A) Soro de camundongos C57BL/6 infectados com diferentes cepas de *T. cruzi*. Pannel à esquerda, ELISA convencional; Pannel à direita, ELISA de afinidade. B) Soro de camundongos C57BL/6 infectados com diferentes inóculos da cepa CL Brener. C) Dinâmica de reconhecimento por soro de cobaias com diferentes tempos de infecção com a cepa Y. C-, controle negativo.

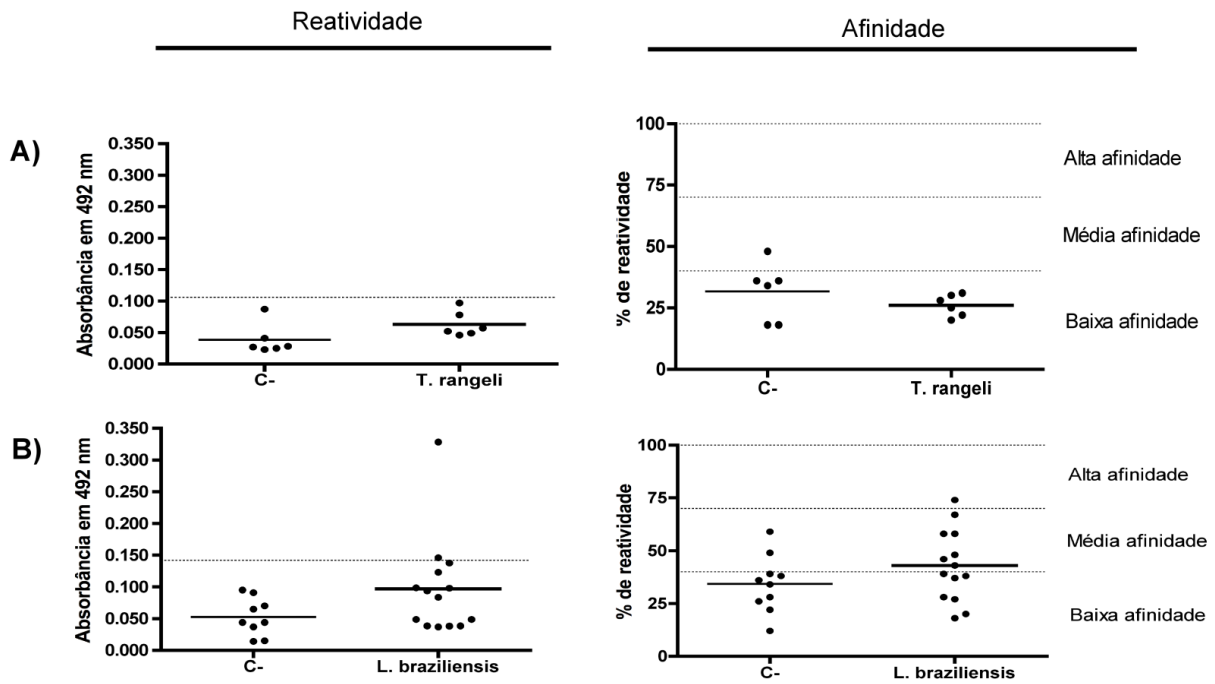


FIGURA 18 – Avaliação de reação cruzada do peptídeo C6_30_cons com outros tripanossomatídeos. A) Soro de camu camu C57BL/6 infectados com *T. rangeli*. B) Soro de pacientes infectados com *L. braziliensis* e não infectados por *T. cruzi*. C-, controle negativo. Painéis à esquerda, ELISA convencional; Painéis à direita, ELISA de afinidade.

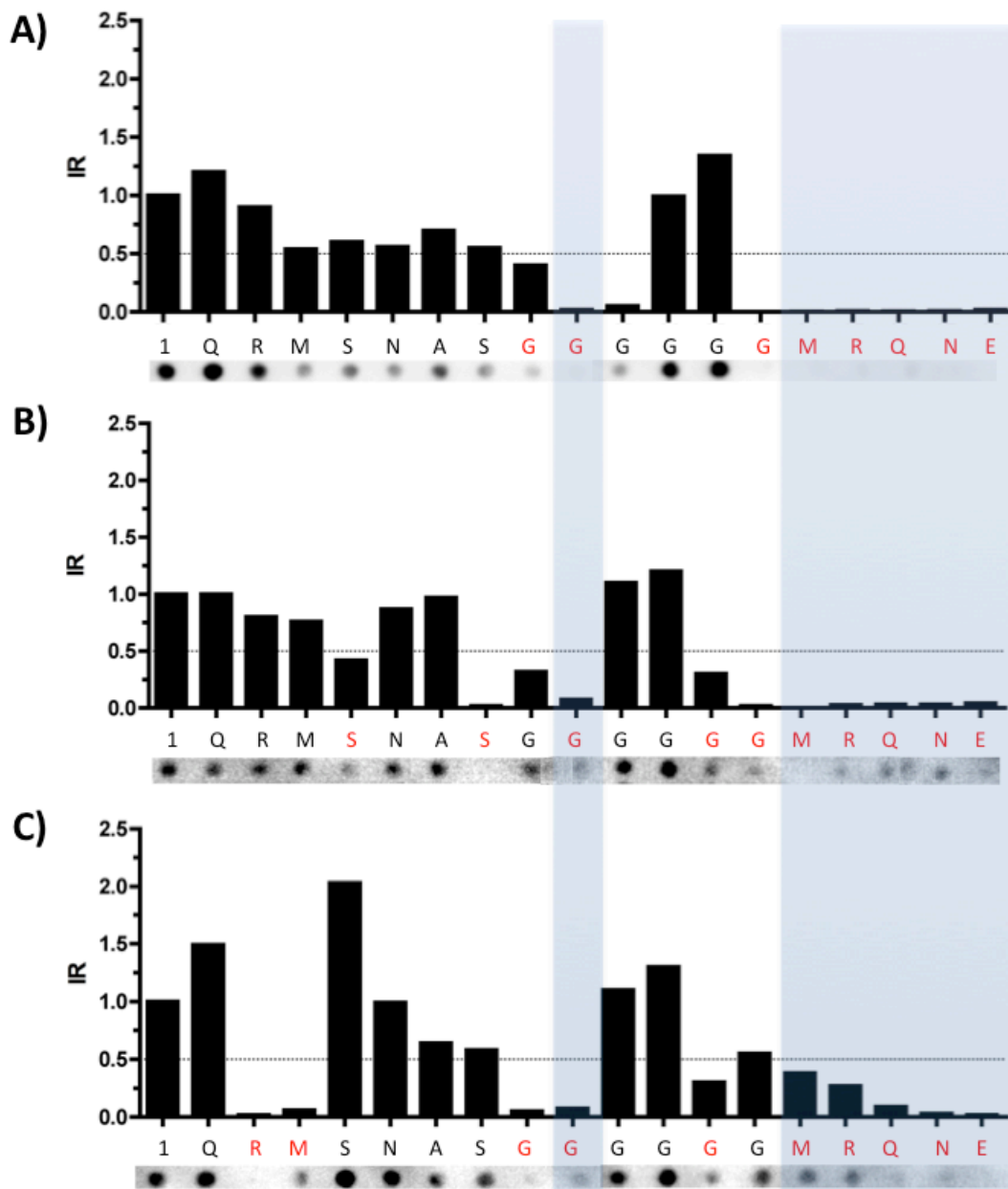


FIGURA 19 – Mapeamento dos aminoácidos de importância para interação com anticorpos de animais infectados com diferentes cepas de *T. cruzi* com o peptídeo conservado C6_30_cons. A) “pool” de soros de camundongos C57BL/6 infectados com a cepa Colombiana. B) “pool” de soros de camundongos C57BL/6 infectados com a cepa Y. C) “pool” de soros de camundongos C57BL/6 infectados com a cepa CL Brener. No eixo das abscissas, 1 representa a sequência original do peptídeo C6_30_cons e os demais símbolos de aminoácidos (conforme IUPAC) indicam que o respectivo aminoácido foi substituído por alanina na sequência do epítipo. A intensidade relativa (IR) foi calculada pela razão do valor de densitometria do peptídeo alterado pelo valor de densitometria do peptídeo nativo. Em vermelho estão os aminoácidos que apresentaram IR menor que 0.5. Em azul estão destacados os aminoácidos de importância para interação com anticorpos produzidos por animais infectados pelas três cepas de *T. cruzi*.

Além de modelos animais, a reatividade do peptídeo C6_30_cons foi avaliada utilizando soro de pacientes chagásicos. Oito de dez soros de pacientes chagásicos com parasitos genotipados pertencentes a linhagem TcII apresentaram reatividade acima com valor de “*cutoff*” (FIGURA 20A). Os anticorpos destas amostras possuíam de média a alta afinidade. Além destas amostras, a reatividade e afinidade de anticorpos presentes em soro de pacientes chagásicos com diferentes formas clínica da doença foram também mensurados. Dos 20 soros de pacientes chagásicos, 18 possuíam reatividade acima do valor de “*cutoff*” (FIGURA 20B). Soro de pacientes sintomáticos com cardiopatia chagásica crônica apresentaram significativamente maiores níveis de reatividade do que pacientes com a forma clínica indeterminada. Porém, para todas as amostras, os anticorpos possuíam afinidades baixas e médias. O peptídeo solúvel conservado C6_30_cons apresentou uma especificidade de 93% (13/14) e sensibilidade de 87% (27/31) para soros humanos.

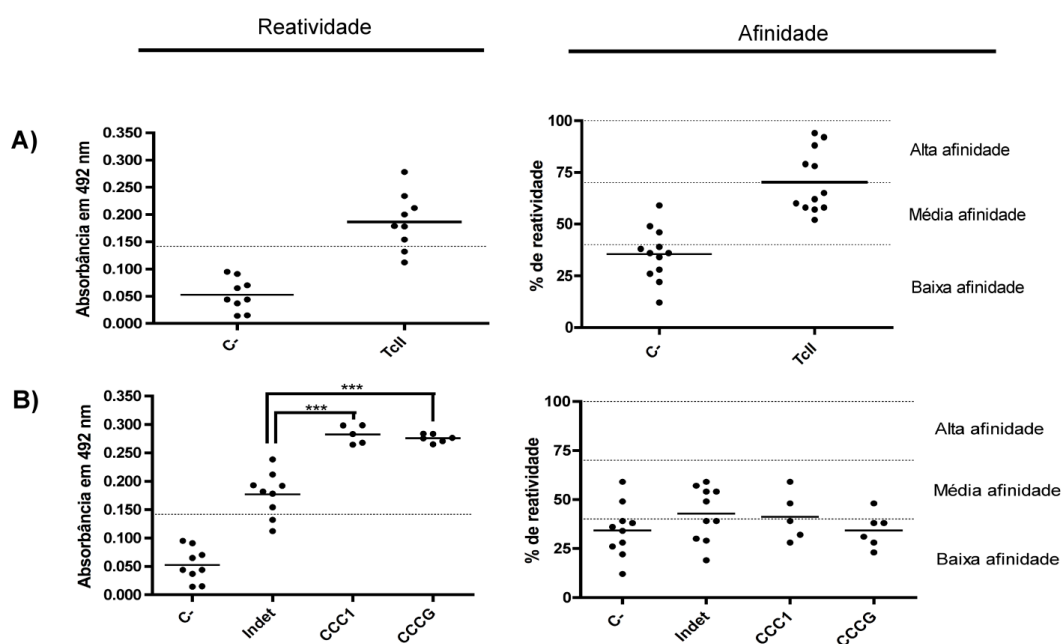


FIGURA 20 – Reatividade do peptídeo conservado C6_30_cons contra soro de pacientes chagásicos. A) Soro de pacientes chagásicos infectados com a linhagem TcII. B) Soro de pacientes chagásicos com diferentes formas clínicas da doença. C-, controle negativo. Indet, pacientes com forma clínica indeterminada. CCC1, pacientes com cardiopatia chagásica crônica de grau 1. CCCG, pacientes com cardiopatia chagásica crônica grave. Painéis à esquerda, ELISA convencional; Painéis à direita, ELISA de afinidade.

6.5.2 Validação e caracterização do peptídeo conservado B7_30_cons

O segundo peptídeo conservado analisado foi o B7_30_cons originado de uma proteína hipotética de *T. cruzi* (Tc00.1047053506661.120). Este peptídeo também apresentou intensidade relativa de reatividade acima de 2 com “pools” de soros de animais infectados por todas as cepas Colombiana, Y e CL Brener de *T. cruzi* (TABELA 6). Validação deste peptídeo contra soros individuais de camundongos C57BL/6 por ELISA mostraram que para as cepas Colombiana e Y houve reconhecimento acima do “cutoff” para todas as amostras (FIGURA 21A). Para a cepa CL Brener, apenas um soro dos seis testados apresentou reatividade abaixo do valor de “cutoff” e não houve diferença estatística entre as cepas estudadas (FIGURA 21A). Os anticorpos das amostras de Colombiana possuíam média e alta afinidade pelo peptídeo com a média dos valores significativamente maior que a encontrada para as amostras de Y, que apresentaram na maioria das vezes baixa afinidade pelo epitopo (FIGURA 21A). Já os anticorpos dos soros provenientes de animais infectados com CL Brener possuíam variáveis afinidades e sem diferença estatística com as outras duas cepas (FIGURA 21A). O perfil de reatividade dos soros e afinidades dos anticorpos foram independentes da quantidade de inóculo utilizado na infecção dos animais como observado para reatividade os soro de camundongos C57BL/6 infectados com diferentes números de tripomastigotas da cepa CL Brener (FIGURA 21B).

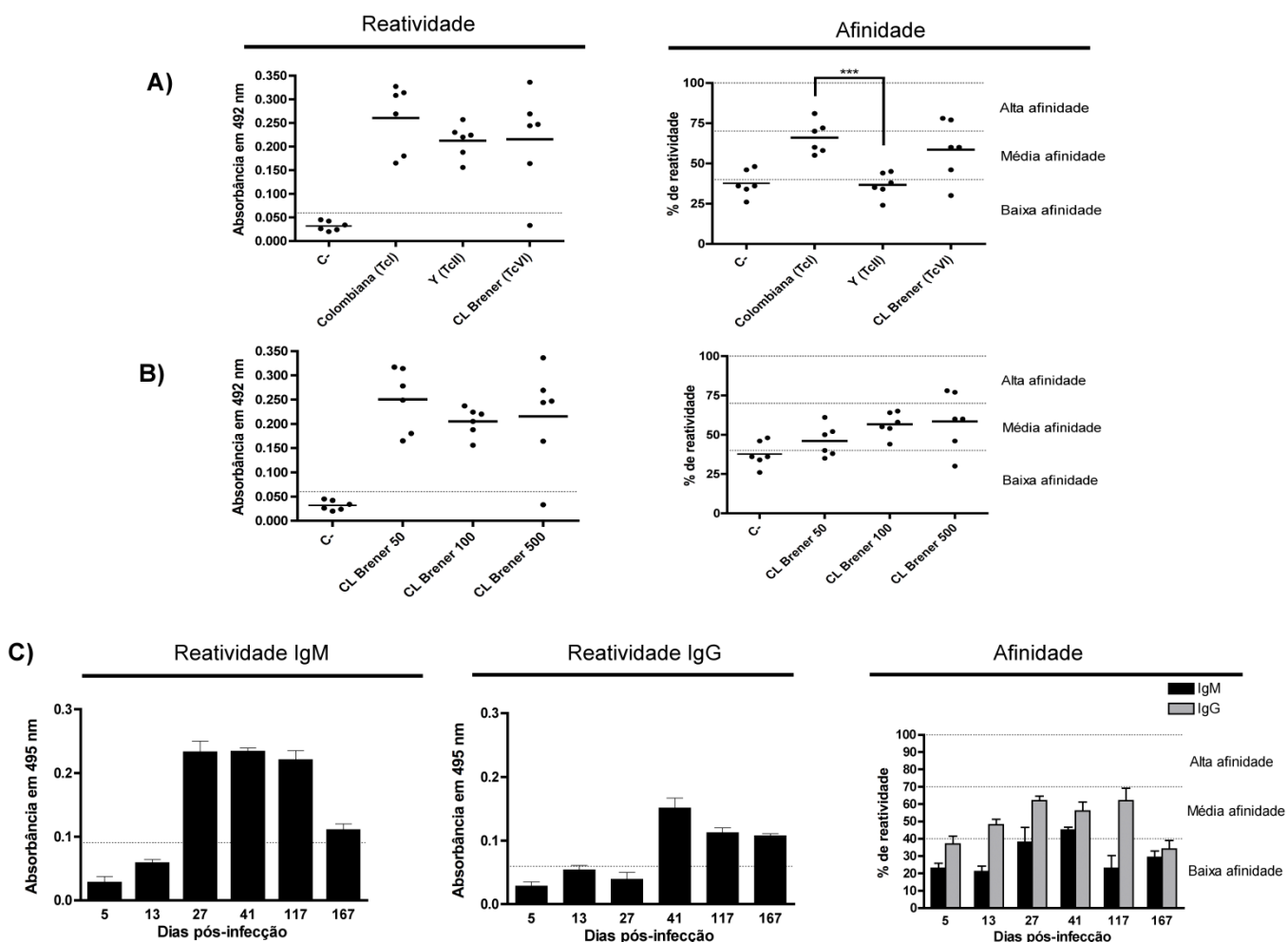


FIGURA 21 – Validação e caracterização da reatividade do peptídeo conservado B7_30_cons. A) Soro de camundongos C57BL/6 infectados com diferentes cepas de *T. cruzi*. B) Soro de camundongos C57BL/6 infectados com diferentes inóculos da cepa CL Brener. C) Dinâmica de reconhecimento por soro de cobaias com diferentes tempos de infecção com a cepa Y. C-, controle negativo.

A dinâmica de reatividade de IgM do soro de cobaias infectados com a cepa Y de *T. cruzi* mostrou-se positiva, acima do “*cutoff*”, a partir do 27º dia após a infecção e coincide com o pico de reatividade desta classe de anticorpos (FIGURA 21C). A reatividade destes IgM prosseguiu como positiva até o final do experimento, porém com tendência a redução dos valores ao longo do tempo. Este perfil de curva de reatividade de IgM foi acompanhado pelo aumento da afinidade destes anticorpos pelo peptídeo, que passou de baixa para média afinidade quando a absorbância foi acima do “*cutoff*” e torna-se novamente baixa com o decréscimo da reatividade (FIGURA 21C). Os anticorpos da classe IgG apresentaram reatividade positiva a

partir do 41º dia e manteve-se positiva ao longo da evolução da infecção (FIGURA 21C). Os anticorpos desta classe possuíam baixa afinidade pelo peptídeo, alcançando níveis de média afinidade apenas no 41º dia após a infecção, período que coincide com o pico de reatividade de IgG (FIGURA 21C).

As seis amostras de soro de camundongos C57BL/6 infectados com *T. rangeli* apresentaram reatividade acima do “*cutoff*” com o peptídeo conservado B7_30_cons e os anticorpos possuíam média afinidade (FIGURA 22A). Nove das quatorze amostras de pacientes infectados com *L. braziliensis* e não infectados com *T. cruzi* também apresentaram reatividade positiva acima do valor de “*cutoff*” com este peptídeo (FIGURA 22B). A maioria destas amostras possuíam anticorpos de baixa e média afinidade (FIGURA 22B).

Como o peptídeo apresentou reatividade cruzada com soro de animais e pacientes infectados com outros tripanossomatídeos, o mapeamento dos aminoácidos importantes para interação com anticorpos além de ser realizado para as cepas de *T. cruzi*, foi também executado para *L. braziliensis*. Correlacionando o resultado de mapeamento entre todas as amostras, observou-se um padrão conservado RXR que sugere ser a sequência a qual anticorpos provenientes das amostras interagem (FIGURA 23A-C). Além disso, para as cepas Colombiana e CL Brener foi identificado um outro aminoácido que também parece ser importante para a interação resultando em uma sequência consenso RXRXXXXXQ (FIGURA 23A e 23C). A utilização de soro de pacientes infectados com *L. braziliensis* possibilitou a identificação do padrão RXRQXQQ (FIGURA 23D). A busca por este padrão no proteoma predito de *L. braziliensis* identificou 21 proteínas que contêm esta subsequência (TABELA 7).

Oito de dez soros de pacientes chagásicos com parasitos genotipados pertencentes a linhagem TcII apresentaram reatividade positiva com o peptídeo solúvel conservado B7_30_cons (FIGURA 24A). A maioria destas amostras possuíam anticorpos de baixa

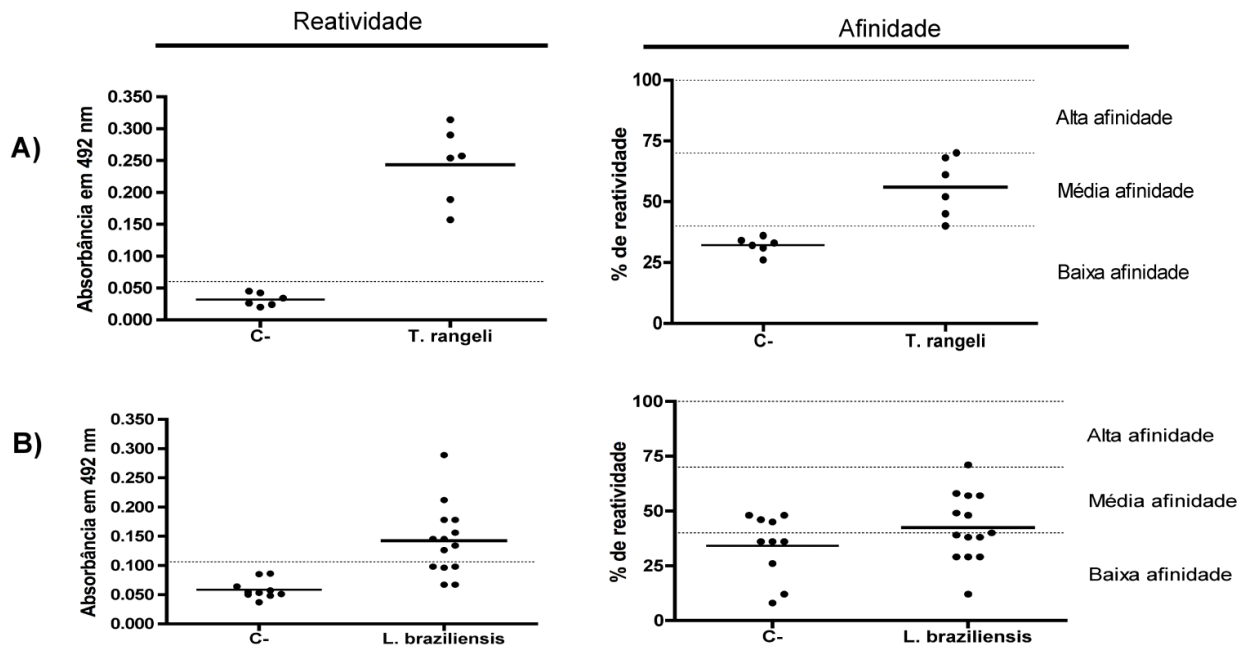


FIGURA 22 – Avaliação de reação cruzada do peptídeo B7_30_cons com outros tripanossomatídeos. A) Soro de camundongos C57BL/6 infectados com *T. rangeli*. B) Soro de pacientes infectados com *L. braziliensis* e não infectados por *T. cruzi*. C-, controle negativo. Painéis à esquerda, ELISA convencional; Painéis à direita, ELISA de afinidade.

afinidade contra o epitopo. Quanto as 21 amostras de pacientes com diferentes formas clínicas, 11 soros de pacientes chagásicos apresentaram reatividade negativa abaixo do valor de “cutoff” (FIGURA 24B). Para todas estas amostras, os anticorpos possuíam afinidades baixas e médias. Para soro de humanos, a especificidade e a sensibilidade do peptídeo solúvel conservado B7_30_cons foi 35% (5/14) e 58% (18/31), respectivamente.

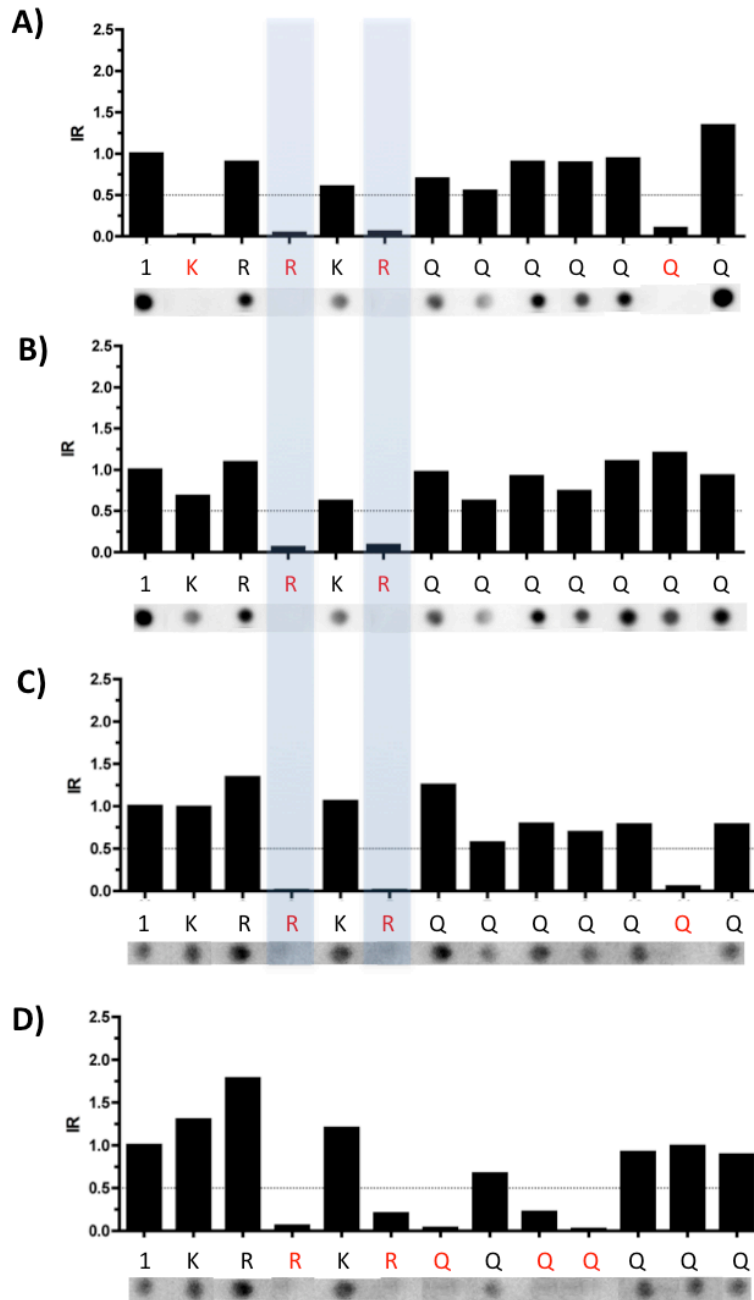


FIGURA 23 – Mapeamento dos aminoácidos de importância para interação com anticorpos de animais infectados com *T. cruzi* e *L. braziliensis* com o peptídeo conservado B7_30_cons. A) “pool” de soro de camundongos C57BL/6 infectados com a cepa Colombiana. B) “pool” de soro de camundongos C57BL/6 infectados com a cepa Y. C) “pool” de soro de camundongos C57BL/6 infectados com a cepa CL Brener D) “pool” de soro de pacientes infectados com *L. braziliensis*. No eixo das abscissas, 1 representa a sequência original do peptídeo B7_30_cons e os demais símbolos de aminoácidos (conforme IUPAC) indicam que o respectivo aminoácido foi substituído por alanina na sequência do epítipo. A intensidade relativa (IR) foi calculada pela razão do valor de densitometria do peptídeo alterado pela valor de densitometria do peptídeo nativo. Em vermelho estão os aminoácidos que apresentaram IR menor que 0.5. Em azul estão destacados os aminoácidos de importância para interação com anticorpos produzidos por animais infectados pelas três cepas de *T. cruzi*.

TABELA 7 – Proteínas de *L. braziliensis* contendo a sequência RXRQXQQ.

Gene	Sequência	Anotação
LbrM.11.0390	RKRQQQQ	hypothetical protein, conserved
LbrM.24.0250	RHRQRQQ	hypothetical protein, conserved
LbrM.10.0260	RFRQSQQ	hypothetical protein, conserved
LbrM.04.0290	RQRQQQQ	RNA pseudouridylate synthase-like protein
LbrM.28.1470	RTRQQQQ	hypothetical protein, conserved
LbrM.33.2940	RXRQXQQ	hypothetical protein, conserved
LbrM.29.0210	RVRQHQQ	hypothetical protein, conserved
LbrM.29.1300	RARQRQQ	hypothetical protein, conserved
LbrM.34.1470	RHRQQQQ	hypothetical protein, conserved
LbrM.17.0150	RQRQAQQ	hypothetical protein, conserved
LbrM.20.2010	RKRQCQQ	hypothetical protein, conserved
LbrM.03.0500	RRRQQQQ	DNA repair helicase, putative
LbrM.15.0570	RKRQMQQ	hypothetical protein, conserved
LbrM.13.1230	RGRQSQQ	hypothetical protein, conserved
LbrM.24.0970	RARQRQQ	hypothetical protein, conserved
LbrM.20.1530	RHRQAQQ	hypothetical protein, conserved
LbrM.04.1100	RSRQTQQ	hypothetical protein, conserved
LbrM.26.1300	RMRQQQQ	hypothetical protein, conserved
LbrM.22.1070	RQRQHQQ	hypothetical protein, conserved
LbrM.22.1090	RQRQRQQ	hypothetical protein, conserved
LbrM.34.0980	RLRQEQQ	hypothetical protein, conserved

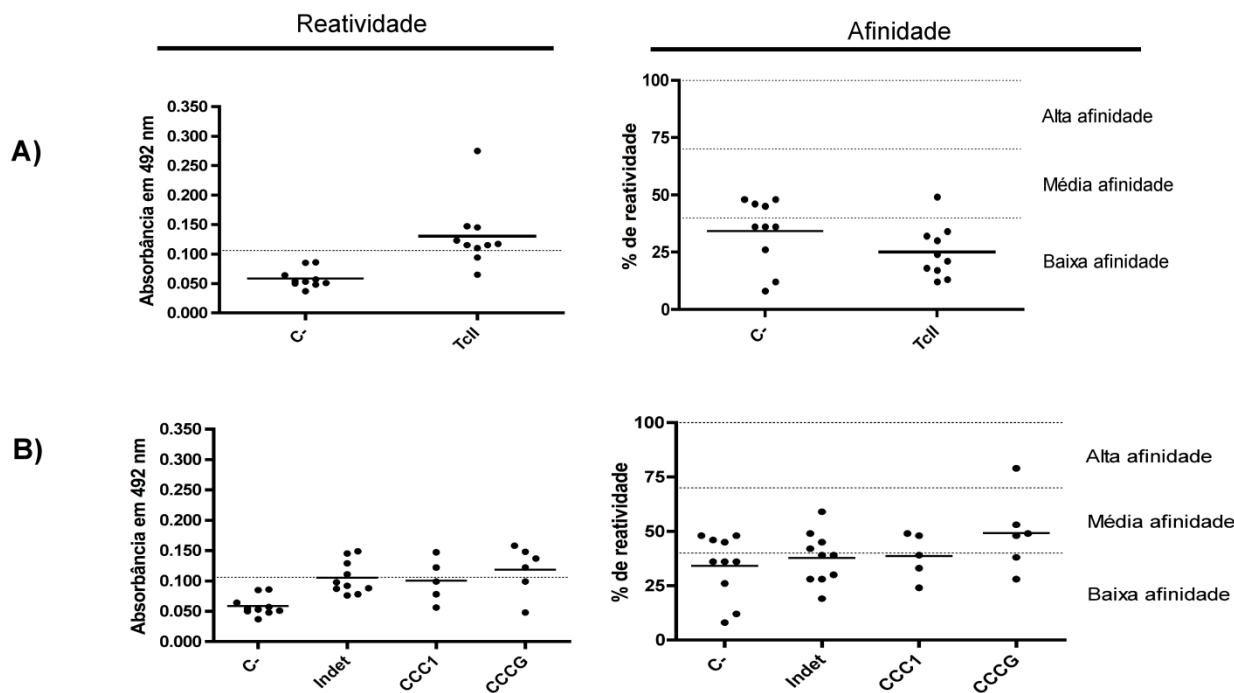


FIGURA 24 – Reatividade do peptídeo conservado B7_30 cons contra soro de pacientes chagásicos. A) Soro de pacientes chagásicos infectados com a linhagem TcII. B) Soro de pacientes chagásicos com diferentes formas clínicas da doença. C-, controle negativo. Indet, pacientes com forma clínica indeterminada. CCC1, pacientes com cardiopatia chagásica crônica de grau 1. CCCG, pacientes com cardiopatia chagásica crônica grave. Painéis à esquerda, ELISA convencional; Painéis à direita, ELISA de afinidade.

6.5.3 Validação e caracterização dos peptídeos com reatividade específica para a cepa Colombiana baseado nos experimentos de imunoblotting

O peptídeo polimórfico A6_30_col presente em uma proteína anotada como “RNA-binding protein” de *T. cruzi* (Tc00.1047053511837.129) foi selecionado por ter intensidade relativa de reatividade acima de 2 apenas com “pools” de soros de animais infectados com a cepa Colombiana de *T. cruzi* durante a fase de triagem (TABELA 6). Validação deste peptídeo contra soros individuais de camundongos C57BL/6 por ELISA mostraram que a reatividade do peptídeo com amostras de animais infectados com a cepa Colombiana foi significativamente maior que a reatividade com soro de animais infectados com a cepa Y (FIGURA 25A). A afinidade dos anticorpos das amostras de Colombiana foram classificadas como alta e significativamente maior que aquelas de Y e CL Brener (FIGURA 25A). Entre

amostras de camundongos infectados com diferentes inóculos de tripomastigotas não foi observado diferença significativa no reconhecimento do peptídeo A6_30_col (FIGURA 25B).

A reatividade de IgM e IgG do soro de cobaias infectados com a cepa Y de *T. cruzi* foi abaixo do “*cutoff*” durante todo período de experimento (FIGURA 25C).

Metade das amostras de soro de camundongos C57BL/6 infectados com *T. rangeli* apresentaram reatividade acima do “*cutoff*” com o peptídeo A6_30_col e os anticorpos possuíam em sua maioria média afinidade (FIGURA 26A). Para amostras de pacientes infectados com *L. braziliensis* e não infectados com *T. cruzi*, três dos quatorze soros também apresentaram reatividade positiva com este peptídeo e os anticorpos apresentavam baixa afinidade (FIGURA 26B).

O mapeamento dos aminoácidos importantes para interagir com anticorpos de soro de animais infectados com a cepa Colombiana de *T. cruzi* identificou o padrão PPXDXSLXXP (FIGURA 27A). Este padrão está presente na sequência sintetizada obtida do alelo pertencente ao haplótipo Non-esmo do genoma da cepa CL Brener de *T. cruzi* e quando comparados com o alelo pertencente ao haplótipo Esmo observa-se a ausência de aminoácidos importantes para o reconhecimento pelo anticorpo (FIGURA 27B).

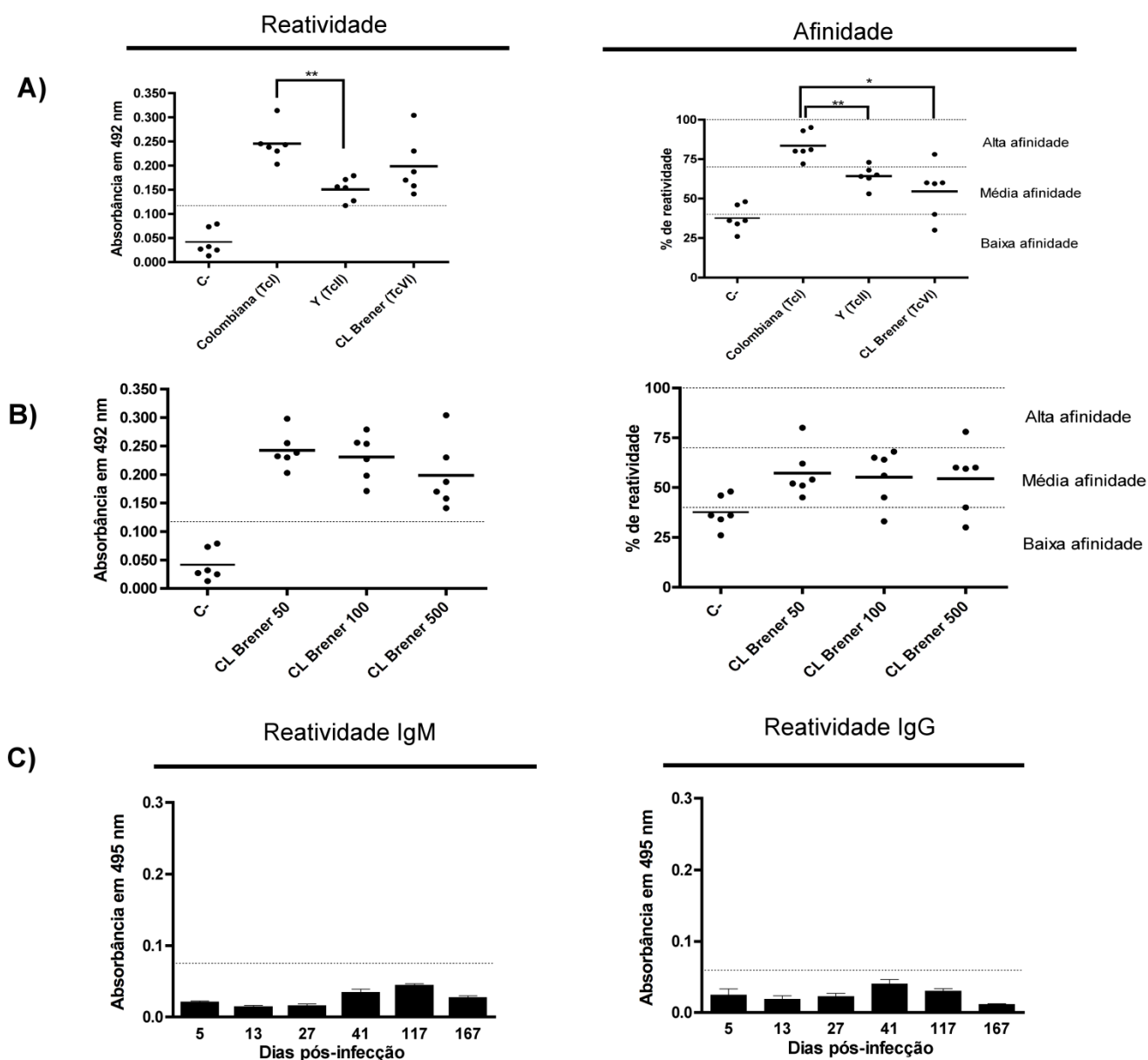


FIGURA 25 – Validação e caracterização da reatividade do peptídeo A6_30_col. A) Soro de camundongos C57BL/6 infectados com diferentes cepas de *T. cruzi*. B) Soro de camundongos C57BL/6 infectados com diferentes inóculos da cepa CL Brener. C) Dinâmica de reconhecimento por soro de cobaias com diferentes tempos de infecção com a cepa Y. C-, controle negativo.

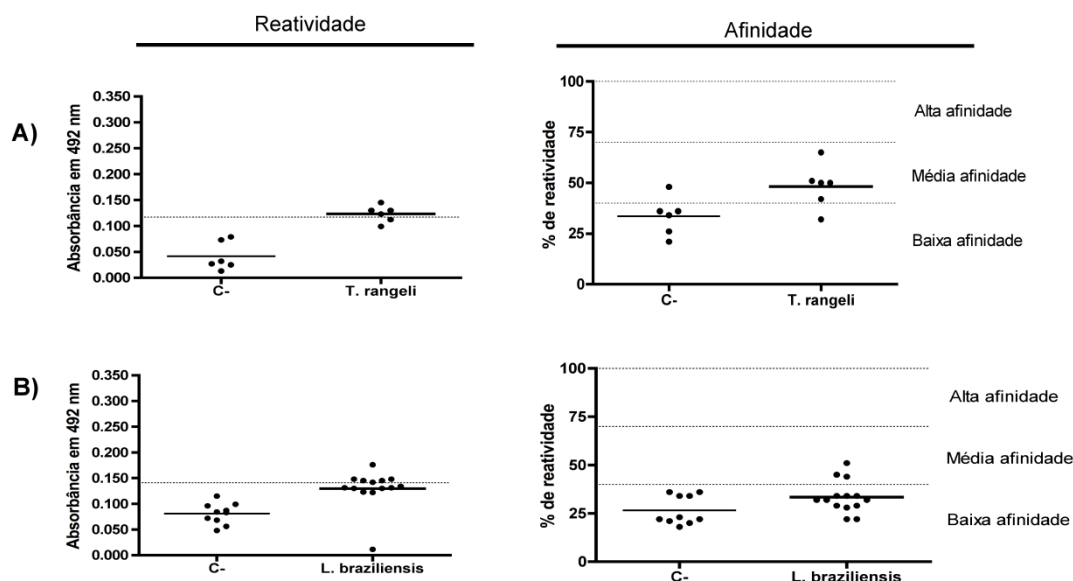


FIGURA 26 – Avaliação de reação cruzada do peptídeo A6_30_col com outros tripanossomatídeos. A) Soro de camundongos C57BL/6 infectados com *T. rangeli*. B) Soro de pacientes infectados com *L. braziliensis* e não infectados por *T. cruzi*. C-, controle negativo. Painéis à esquerda, ELISA convencional; Painéis à direita, ELISA de afinidade.

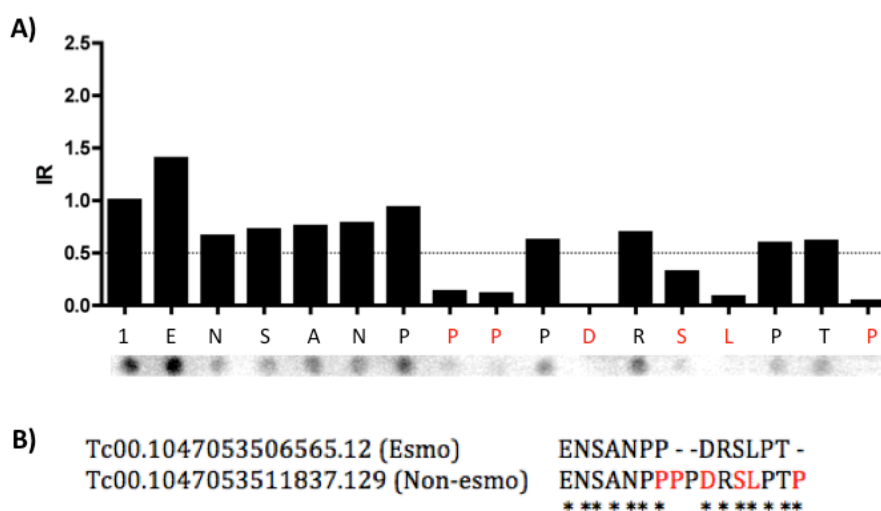


FIGURA 27 – Mapeamento dos aminoácidos de importância para interação com anticorpos de animais infectados com *T. cruzi* com o peptídeo A6_30_col. A) mensuração de densitometria da interação de anticorpos do “pool” de soro de camundongos C57BL/6 infectados com a cepa Colombiana com o peptídeo por Ala scan. B) Comparação dos aminoácidos importantes para interação com anticorpo entre as sequências dos pares de alelos dos dois haplótipos de *T. cruzi*. No eixo das abscissas, 1 representa a sequência original do peptídeo A6_30_col e os demais símbolos de aminoácidos (conforme IUPAC) indicam que o respectivo aminoácido foi substituído por alanina na sequência do epitopo. A intensidade relativa (IR) foi calculada pela razão do valor de densitometria do peptídeo alterado pelo valor de densitometria do peptídeo nativo. Em vermelho estão os aminoácidos que apresentaram IR menor que 0.5.

Apenas dois soros de pacientes chagásicos com parasitos genotipados pertencentes a linhagem TcII apresentaram reatividade positiva acima do “*cutoff*” com o peptídeo solúvel conservado A6_30_col e a maioria das amostras possuíam anticorpos possuíam baixa afinidade (FIGURA 28A). Um perfil semelhante de reatividade e afinidade foi observado para soro de pacientes com diferentes formas clínicas da doença e não houve diferença estatística entre as amostras de pacientes com a forma indeterminada e os dois graus de cardiopatia chagásica crônica analisados (FIGURA 28B).

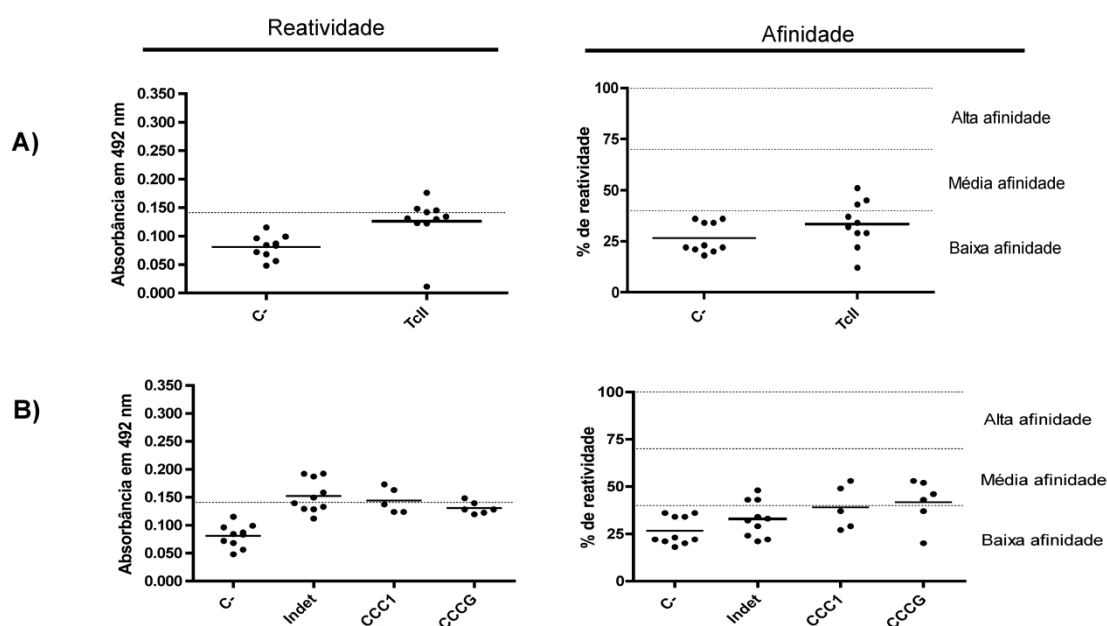


FIGURA 28 – Reatividade do peptídeo A6_30_col contra soro de pacientes chagásicos. A) Soro de pacientes chagásicos infectados com a linhagem TcII. B) Soro de pacientes chagásicos com diferentes formas clínicas da doença. C-, controle negativo. Indet, pacientes com forma clínica indeterminada. CCC1, pacientes com cardiopatia chagásica crônica de grau 1. CCCG, pacientes com cardiopatia chagásica crônica grave. Painéis à esquerda, ELISA convencional; Painéis à direita, ELISA de afinidade.

6.5.4 Validação e caracterização do peptídeo com reatividade específica para a cepa Y

O peptídeo polimórfico B2_30_Y identificado de uma sequência protéica anotada como “*ADP-ribosylation factor GTPase activating protein*” de *T. cruzi* (Tc00.1047053511589.70) foi escolhido por ter intensidade relativa de reatividade acima de 2 somente com “*pool*” de soros de animais infectados com a cepa Y de *T. cruzi* durante o “*immunoblotting*” dos peptídeos ligados a membrana de celulose (TABELA 6). A reatividade do peptídeo por ELISA com o soro de camundongos C57BL/6 infectados com a cepa Y foi estatisticamente maior que a reatividade com soros de animais infectados com a cepa Colombiana (FIGURA 29A). A afinidade dos anticorpos de todas amostras de Y foram altas e significativamente maior que aquela para Y e CL Brener, que possuíram anticorpos em suas amostras classificadas como de média afinidade (FIGURA 29A). Entre amostras murinas infectadas com diferentes quantidades de tripomastigotas não foi observado diferença significativa no reconhecimento do peptídeo (FIGURA 29B).

A reatividade de IgM do soro de cobaias infectados com a cepa Y de *T. cruzi* foi abaixo do “*cutoff*” durante todo período de experimento. (FIGURA 29C). Para anticorpos da classe IgG, observou-se positividade do reconhecimento do peptídeo 117 dias após a infecção, com tendência a aumento da mensuração ao longo do tempo (FIGURA 27C). Anticorpos de alta afinidade desta classe de imunoglobulinas foram encontrados durante todo o período experimental.

Os soros de camundongos C57BL/6 infectados com *T. rangeli* apresentaram pouca reatividade com o peptídeo conservado B2_30_Y com apenas um soro com mensuração acima do valor de “*cutoff*” e estes anticorpos possuíam baixa afinidade pelo epitopo (FIGURA 29A). Apenas uma amostra de pacientes infectados com *L. braziliensis* e não infectados com *T. cruzi* foi reativa com este peptídeo (FIGURA 29B). Os anticorpos da maioria destes pacientes apresentaram média afinidade.

O mapeamento dos aminoácidos importantes para interagir com anticorpos de soro de animais infectados com a cepa Y de *T. cruzi* utilizando a técnica de Ala scan identificou o padrão QPQPXPQXXXQP (FIGURA 30A). Este padrão está presente na subsequência sintetizada do alelo pertencente ao haplótipo Esmo do genoma da cepa CL Brener de *T. cruzi*. Quando comparado com o alelo pertencente ao haplótipo Non-esmo, observa-se a ausência de aminoácidos importantes para o reconhecimento

pelo anticorpo (FIGURA 30B).

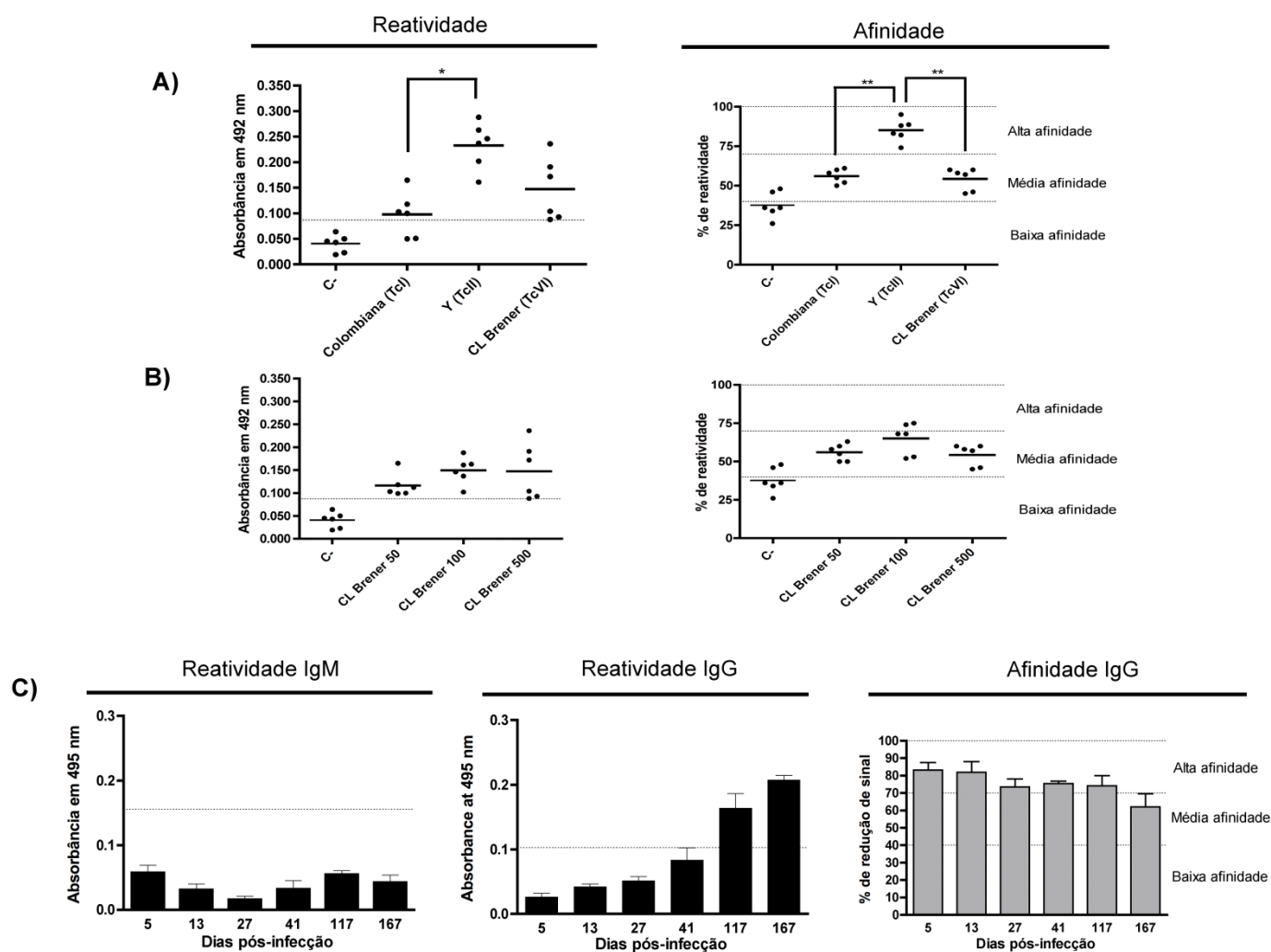


FIGURA 29 – Validação e caracterização da reatividade do peptídeo B2_30_Y. A) Soro de camundongos C57BL/6 infectados com diferentes cepas de *T. cruzi*. B) Soro de camundongos C57BL/6 infectados com diferentes inóculos da cepa CL Brener. C) Dinâmica de reconhecimento por soro de cobaias com diferentes tempos de infecção com a cepa Y. C-, controle negativo. Painéis à esquerda, ELISA convencional; Painéis à direita, ELISA de afinidade.

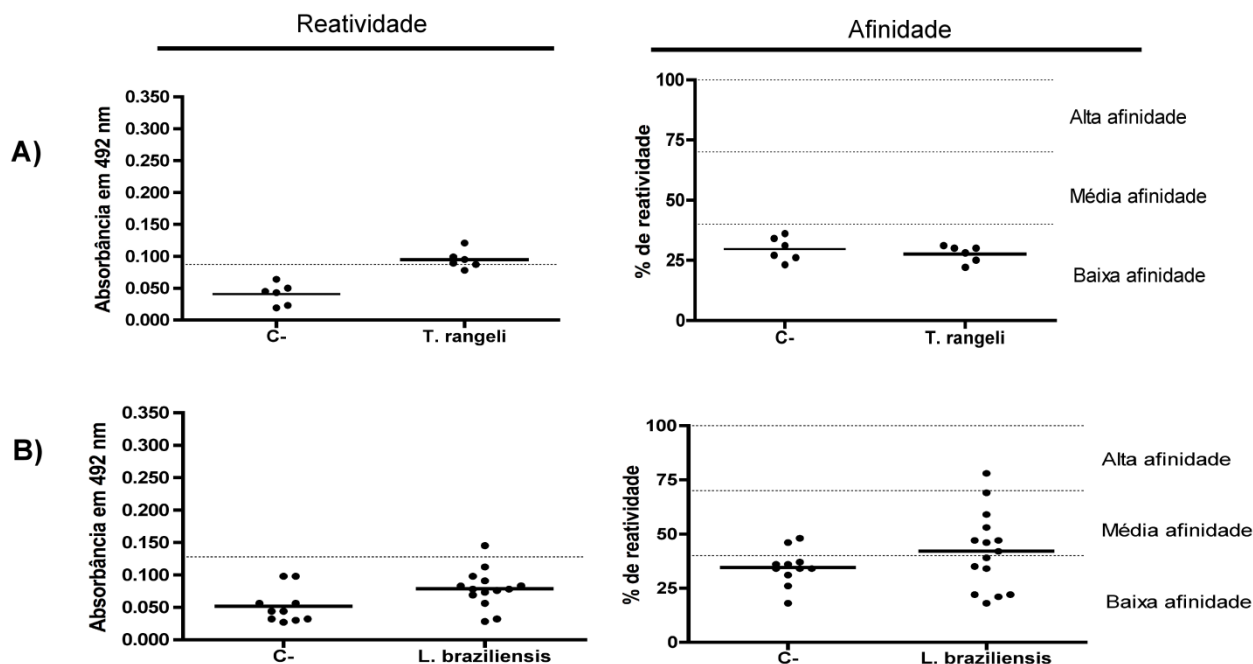


FIGURA 30 – Avaliação de reação cruzada do peptídeo B2_30_Y com outros tripanossomatídeos. A) Soro de camudongos C57BL/6 infectados com *T. rangeli*. B) Soro de pacientes infectados com *L. braziliensis* e não infectados por *T. cruzi*. C-, controle negativo. Painéis à esquerda, ELISA convencional; Painéis à direita, ELISA de afinidade.

O peptídeo B3_30_Y foi capaz de identificar sete dos dez soros de pacientes chagásicos com parasitos genotipados pertencentes a linhagem TcII e os anticorpos destes soros apresentaram de média a alta afinidade pelo epítipo (FIGURA 30A). Seis de dez, quatro de cinco e cinco de seis soros de pacientes com as respectivas formas clínicas indeterminadas, cardiopatia crônica chagásica de grau 1 e de grau grave apresentaram reatividade positiva acima do “*cutoff*” (FIGURA 30B). Houve diferença estatisticamente significativa entre os pacientes com cardiopatia grau 1 e com forma clínica indeterminada com estes últimos possuindo menor valor médio de reatividade. Os anticorpos dos pacientes com a forma indeterminada apresentaram em média menor afinidade do que os anticorpos dos pacientes sintomáticos que foram classificados como de alta afinidade (FIGURA 30B).

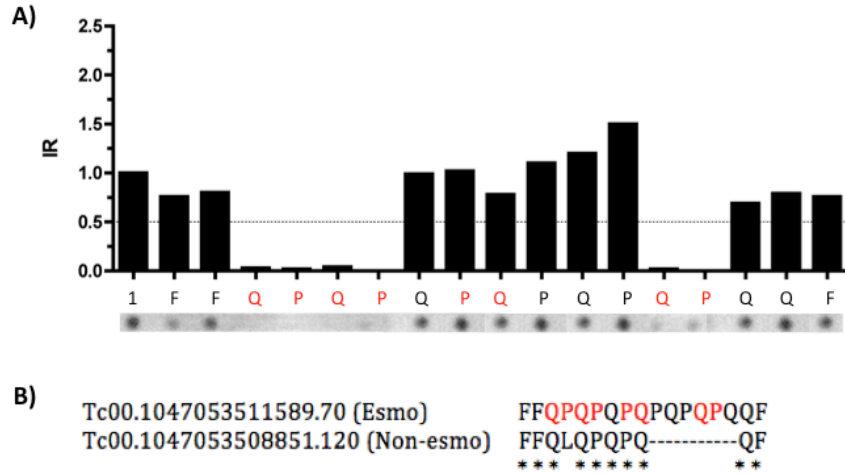


FIGURA 31 – Mapeamento dos aminoácidos de importância para interação com anticorpos de animais infectados com *T. cruzi* com o peptídeo B2_30_Y. A) mensuração de densitometria da interação de anticorpos do “pool” de soro de camundongos C57BL/6 infectados com a cepa Y com o peptídeo por Ala scan. B) Comparação dos aminoácidos importantes para interação com anticorpo entre as sequências dos pares de alelos dos dois haplótipos de *T. cruzi*. No eixo das abscissas, 1 representa a sequência original do peptídeo B2_30_Y e os demais símbolos de aminoácidos (conforme IUPAC) indicam que o respectivo aminoácido foi substituído por alanina na sequência do epitopo. A intensidade relativa (IR) foi calculada pela razão do valor de densitometria do peptídeo alterado pelo valor de densitometria do peptídeo nativo. Em vermelho estão os aminoácidos que apresentaram IR menor que 0.5.

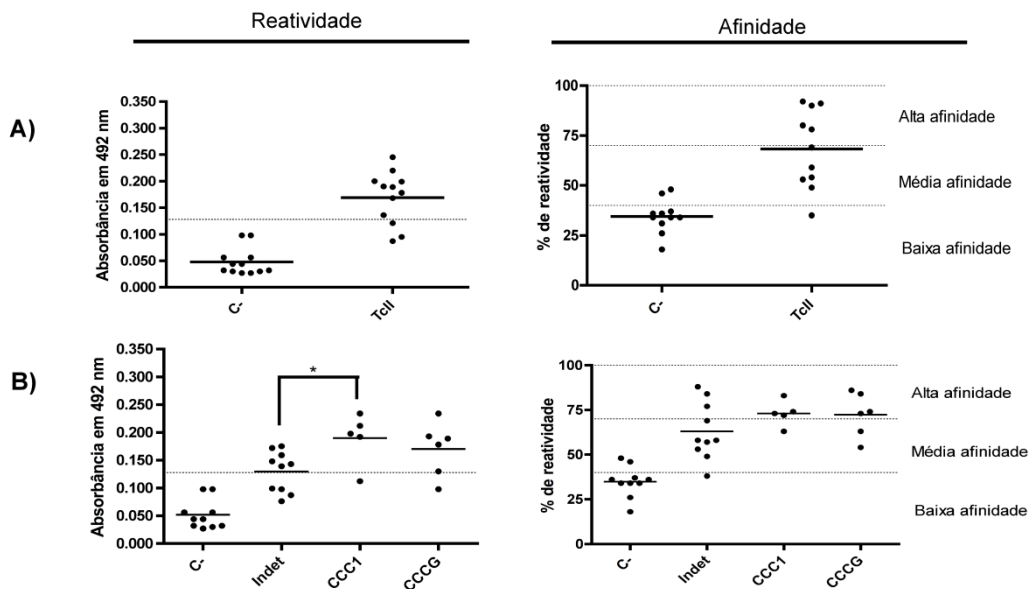


FIGURA 32 – Reatividade do peptídeo conservado B2_30_Y contra soro de pacientes chagásicos. A) Soro de pacientes chagásicos infectados com a linhagem TcII. B) Soro de pacientes chagásicos com diferentes formas clínicas da doença. C-, controle negativo. Indet, pacientes com forma clínica indeterminada. CCC1, pacientes com cardiopatia chagásica crônica de grau 1. CCCG, pacientes com cardiopatia chagásica crônica grave. Painéis à esquerda, ELISA convencional; Painéis à direita, ELISA de afinidade.

6.5.5 Validação e caracterização do peptídeo com reatividade específica para a cepa CL Brener

O peptídeo polimórfico B9_30_cl identificado de uma sequência protéica anotada como “*DNA-directed RNA polymerase III subunit*” de *T. cruzi* (Tc00.1047053510359.320) foi escolhida por ter intensidade relativa de reatividade acima de 2 somente com “pool” de soros de animais infectados com a cepa CL Brener de *T. cruzi* durante a etapa de triagem (TABELA 6). Os soros individuais de camundongos C57BL/6 infectados com a cepa CL Brener foram significativamente mais reativos com o peptídeo do que soros de animais infectados com as outras duas cepas (FIGURA 33A). Os anticorpos das amostras das três cepas possuíam em sua maioria de média a alta, sem diferença estatística entre elas (FIGURA 33A). Para amostras de soros de camundongos infectados com diferentes quantidades de tripomastigotas de CL Brener não foi observado diferença significativa na reatividade com o peptídeo, bem como entre as afinidades dos anticorpos, que também possuíam de média a alta afinidade (FIGURA 33B).

A reatividade dos anticorpos da classe IgM do soro de cobaias infectados com a cepa Y de *T. cruzi* tornou-se acima do “*cutoff*” apenas nos dias 27 e 41 após a infecção (FIGURA 33C). Apesar disso os anticorpos presentes nestes soros apresentaram variável afinidade, sendo considerados na maioria dos pontos de mensuração de baixa a média (FIGURA 33C). A reatividade dos anticorpos da classe IgG apresentaram reatividade abaixo do “*cutoff*” durante todo o período do experimento (FIGURA 33C).

Todas as amostra de soro de camundongos C57BL/6 infectados com *T. rangeli* apresentaram reatividade abaixo do “*cutoff*” (FIGURA 34A). Apenas dois dos dez soros de pacientes infectados com *L. braziliensis* e não infectados com *T. cruzi* apresentaram reatividade positiva com este peptídeo e maioria das amostras possuíam anticorpos com média afinidade ao epitopo (FIGURA 34B).

O mapeamento do aminoácidos importantes para interagir com anticorpos de soro de animais infectados com a cepa CL Brener de *T. cruzi* identificou o padrão DEXXXG (FIGURA 35A). O padrão está presente na sequência sintetizada obtida do alelo pertencente ao haplótipo Esmo do genoma da cepa CL Brener de *T. cruzi* e quando comparados com o alelo pertencente ao haplótipo Non-esmo observa-se a existência de expansão de repetição do aminoácido aspartato na regiões onde estes

importantes aminoácidos estão presentes (FIGURA 35B).

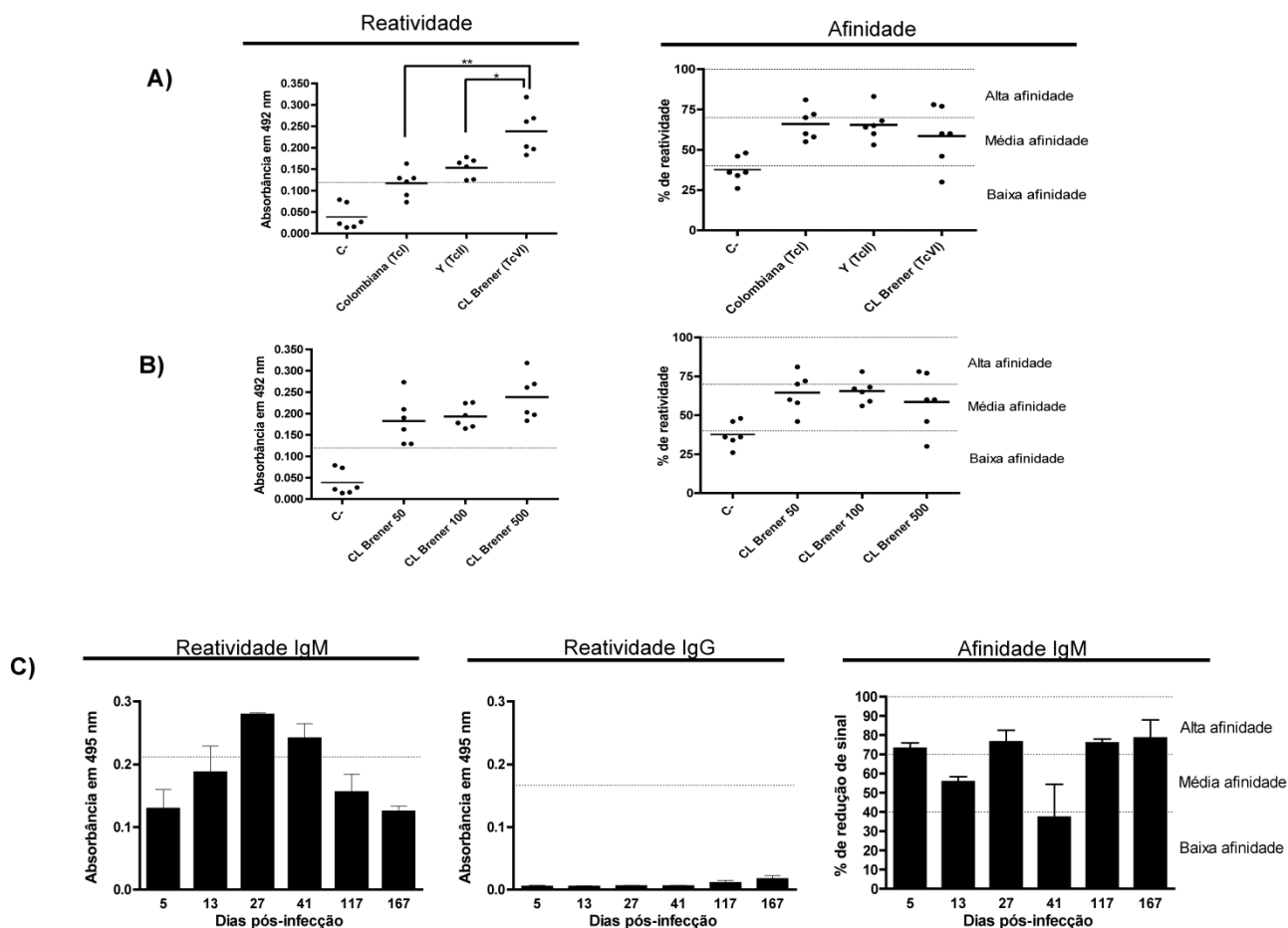


FIGURA 33 – Validação e caracterização da reatividade do peptídeo B9_30_cl.

A) Soro de camundongos C57BL/6 infectados com diferentes cepas de *T. cruzi*. B) Soro de camundongos C57BL/6 infectados com diferentes inóculos da cepa CL Brener. C) Dinâmica de reconhecimento por soro de cobaias com diferentes tempos de infecção com a cepa Y. C-, controle negativo. Painéis à esquerda, ELISA convencional; Painéis à direita, ELISA de afinidade.

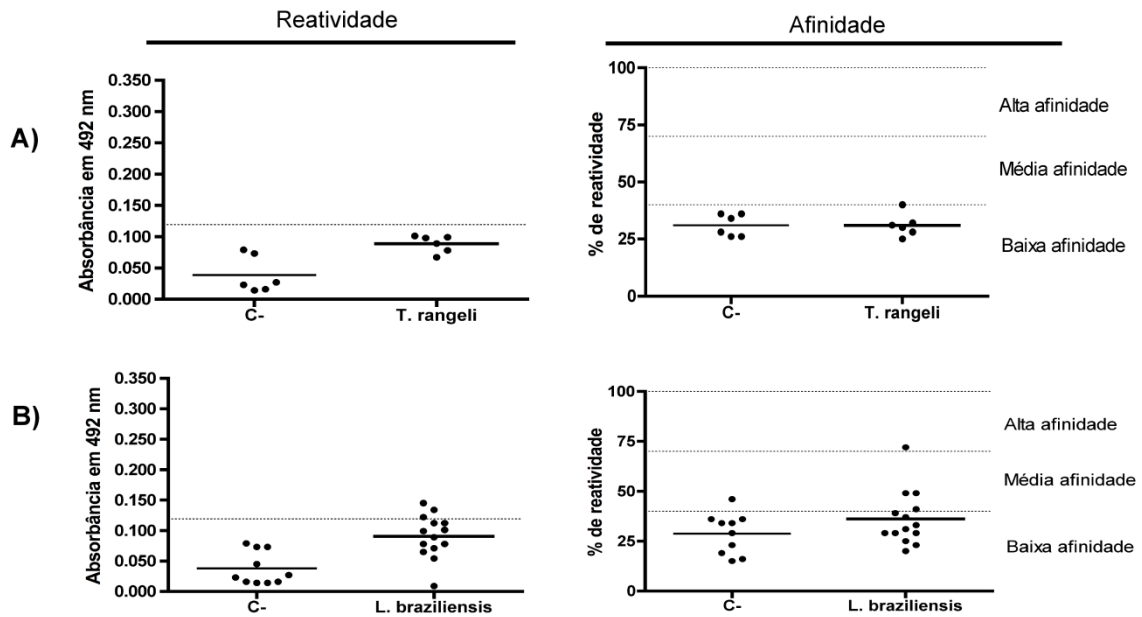


FIGURA 34 – Avaliação de reação cruzada do peptídeo B9_30_cl com outros tripanossomatídeos. A) Soro de camundongos C57BL/6 infectados com *T. rangeli*. B) Soro de pacientes infectados com *L. braziliensis* e não infectados por *T. cruzi*. C-, controle negativo. Painéis à esquerda, ELISA convencional; Painéis à direita, ELISA de afinidade.

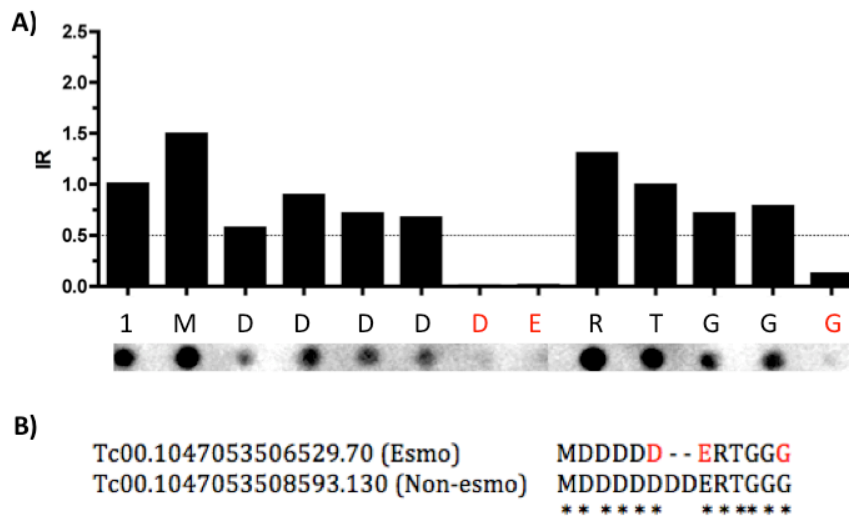


FIGURA 35 – Mapeamento dos aminoácidos de importância para interação com anticorpos de animais infectados com *T. cruzi* com o peptídeo B9_30_cl. A) mensuração de densitometria da interação de anticorpos do “pool” de soro de camundongos C57BL/6 infectados com a cepa CL Brener com o peptídeo por Alascan. B) Comparação dos aminoácidos importantes para interação com anticorpo entre as sequências dos pares de alelos dos dois haplótipos de *T. cruzi*. No eixo das abscissas, 1 representa a sequência original do peptídeo B9_30_cl e os demais símbolos de aminoácidos (conforme IUPAC) indicam que o respectivo aminoácido foi substituído por alanina na sequência do epítipo. A intensidade relativa (IR) foi calculada pela razão do valor de densitometria do peptídeo alterado pelo valor de densitometria do peptídeo nativo. Em vermelho estão os aminoácidos que apresentaram IR menor que 0.5.

Apenas um soro de pacientes chagásicos com parasitos genotipados pertencentes a linhagem TcII apresentaram reatividade positiva acima do “*cutoff*” com o peptídeo solúvel B9_30_cl (FIGURA 36A).. Para soro de pacientes com diferentes formas clínicas da doença, dez amostras foram reativas com o epitopo e não houve diferença estatística entre as amostras de pacientes com a forma indeterminada e os dois graus de cardiopatia chagásica crônica analisados (FIGURA 36B). Os anticorpos destas amostras possuíam de baixa a média afinidade ao peptídeo.

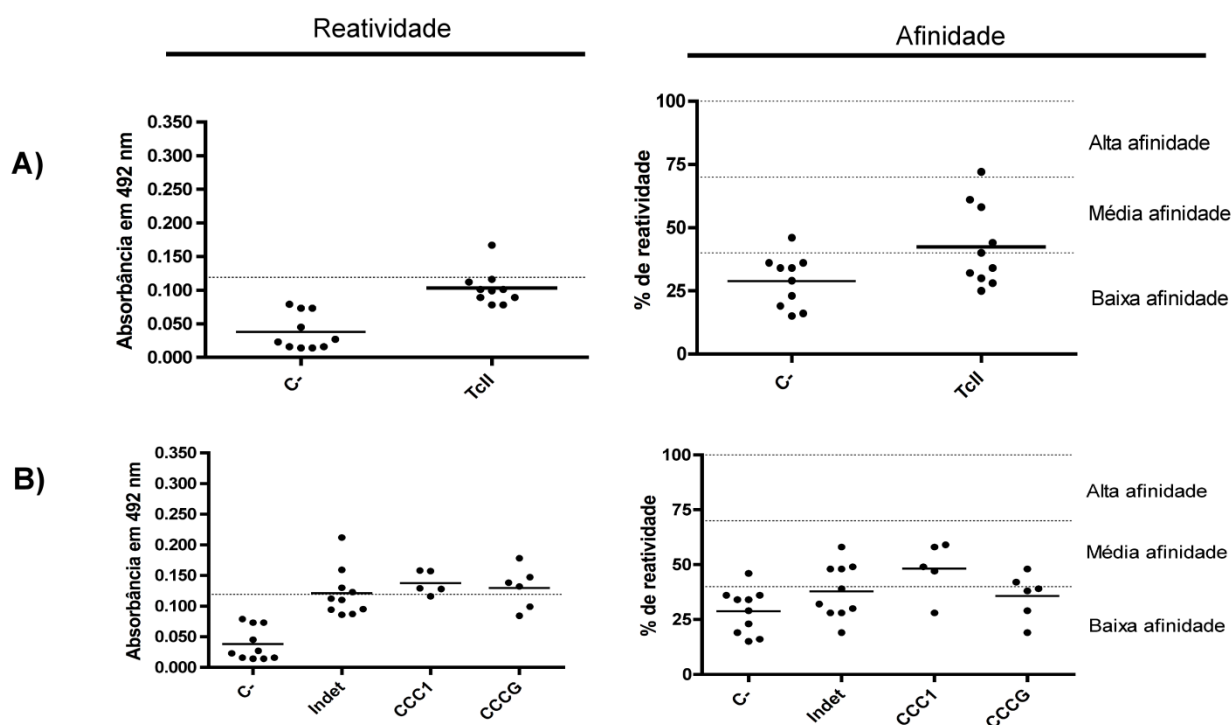


FIGURA 36 – Reatividade do peptídeo B9_30_cl contra soro de pacientes chagásicos. A) Soro de pacientes chagásicos infectados com a linhagem TcII. B) Soro de pacientes chagásicos com diferentes formas clínicas da doença. C-, controle negativo. Indet, pacientes com forma clínica indeterminada. CCC1, pacientes com cardiopatia chagásica crônica de grau 1. CCCG, pacientes com cardiopatia chagásica crônica grave. Painéis à esquerda, ELISA convencional; Painéis à direita, ELISA de afinidade.

7 DISCUSSÃO

Diagnóstico parasitológico durante a fase crônica da doença de Chagas apresenta baixos níveis de sensibilidade variando entre 50-65% (Brofen *et al.*, 1989; Portela-Lindoso *et al.*, 2003). Como os títulos de anticorpos contra o parasito *Trypanosoma cruzi*, principalmente da classe IgG, estão altos nesta fase da doença, métodos de diagnóstico baseado em sorologia são escolhidos para detectar infecção pelo parasito nesta fase da doença de Chagas através da pesquisa de anticorpos anti-*T. cruzi*. Entre estes métodos, o ELISA possui maior potencial para automatização, permitindo a triagem de grandes quantidades de amostra quando comparado com os primeiros métodos comercialmente avaliados baseados em reação de imunofluorescência indireta (IFI) e hemoaglutinação indireta (HAI) (Peralta *et al.*, 1994) e por isso foi o método selecionado para o teste de novos antígenos neste estudo. A OMS preconiza e o Brasil acata a utilização de pelo menos dois testes sorológicos baseado em princípios distintos para confirmação de infecção pelo parasito (WHO, 1991; Ministério da Saúde, 2006) porque as preparações de antígenos freqüentemente apresentam importantes problemas como resultados discrepantes e significativas taxas de falso positivos e negativos (Sáez-Alquézar, 2003). Por isso, a identificação e validação de melhores alvos para diagnóstico se faz necessária.

De fato, os primeiros testes comerciais baseados em antígeno bruto obtido da lise do parasito possuíam alta reação cruzada principalmente com outros tripanossomatídeos e dificuldade na padronização de seus componentes que comprometem a reprodutibilidade dos resultados (Sáez-Alquézar *et al.*, 2000). Uma segunda geração de antígenos baseia-se na purificação de proteínas de *T. cruzi* utilizando metodologias bioquímicas clássicas. Apesar da melhoria na especificidade e reprodutibilidade dos testes sorológicos utilizando estes antígenos, as metodologias de purificação são caras e laboriosas, dificultando a produção em grande escala destes (Da-Silveira *et al.*, 2001). O uso da tecnologia do DNA recombinante para expressão de proteínas de *T. cruzi* em bactérias e leveduras permitiu obtenção antígenos de alta qualidade e em grande quantidade para o diagnóstico da doença de Chagas (Da-Silveira *et al.*, 2001). Porém, antígenos provenientes da expressão heteróloga podem conter componentes protéicos de bactérias ou leveduras que podem contribuir para reação cruzada com outras enfermidades. Nos últimos anos, a síntese química de pequenos peptídeos vem apresentando alta especificidade e sensibilidade com

resultados promissores, bem como facilidade para produção em alta escala de produtos altamente purificados (Peralta *et al.*, 1994; Aguirre *et al.*, 2006; Macipar *et al.*, 2005). Assim, uma abordagem baseada em peptídeos sintéticos foi escolhida para estudo de um grande número de alvos.

Neste trabalho, nós propusemos identificar peptídeos derivados de novos epitopos de célula B do *T. cruzi*. Dois tipos de epitopos foram pesquisados. Primeiro, peptídeos *T. cruzi*-específicos potencialmente reativos com diferentes cepas do parasito visando contribuir para otimizar o sorodiagnóstico da doença de Chagas. Outro grupo de peptídeos compreende sequências com potencial aplicação para sorotipagem. Usando ferramentas de bioinformática, estes epitopos conservados e polimórficos foram preditos nas proteínas dos pares de alelos de genes cópias simples do proteoma da cepa híbrida CL Brener de *T. cruzi*. Posteriormente os peptídeos selecionados foram validados por “imunoblotting” e ELISA. A premissa que usamos para buscar *in silico* epitopos polimórficos no proteoma do parasito é que diferenças entre os pares de alelos da cepa híbrida CL Brener (Tc VI) poderiam refletir diferenças entre estes epitopos de cepas de outros grupos de *T. cruzi*, uma vez que os haplótipos do genoma híbrido de CL Brener se originaram de ancestrais do grupo Tc II e Tc III (Sturm *et al.*, 2003). Especula-se ainda que Tc II e Tc III possam ter se originado de um evento de hibridação envolvendo linhagens ancestrais de Tc I e Tc II (Westenberger *et al.*, 2005). Desta forma, é possível que polimorfismos presentes nas diferentes linhagens de *T. cruzi* possam estar impressos nos haplótipos de CL Brener.

Durante a etapa de triagem dos peptídeos por “immunoblotting” duas sequências controles provenientes da proteína L7a e de uma trans-sialidase foram utilizadas. Estas sequências foram anteriormente caracterizadas e mapeadas e por isso foram selecionadas. O peptídeo proveniente da proteína L7a foi reativo com soro de animais infectados as cepas Y e CL Brener e não foi observado reatividade contra a cepa Colombiana do parasito. Este peptídeo representa uma porção repetitiva altamente antigênica da proteína e os autores do trabalho observaram expansão destas repetições em sequências do antigo grupo II de *T. cruzi* (atual TcII-VI). A linhagem TcI não possui expansão desta sequência repetitiva e isso provavelmente pode induzir uma resposta humoral mais fraca, resultando em baixa reatividade contra o peptídeo. Já o peptídeo proveniente da trans-sialidase foi reativo apenas para cepa Y (Tc II). Esse dado pode ser relacionado ao fato de durante a identificação deste epitopo, foram usados soros de animais infectados apenas com a cepa Y, bem como soro de pacientes

da cidade de Virgem da Lapa em Minas Gerais, região endêmica da doença de Chagas onde ocorre infecção de predominantemente por linhagem Tc II (Devera *et al.*, 2002; D'Avila *et al.*, 2009). Estes exemplos pontuam as implicações da variabilidade genética de *T. cruzi* durante o desenvolvimento de um método de diagnóstico. Como controle negativo foi utilizado uma subsequência não reconhecida por anticorpos contra a proteína L7a. Como esperado, este peptídeo não foi considerado reativo para nenhuma das cepas de *T. cruzi*.

Interessantemente, apesar dos peptídeos terem sido identificados no proteoma da cepa CL Brener, quando analisados os peptídeos na triagem inicial por “imunoblotting”, o “pool” de soros de animais infectados com a cepa CL Brener foi de maneira geral menos reativo quando comparado com os “pools” de soros de animais infectados com Colombiana e Y, respectivamente. Diversas hipóteses foram levantadas sobre este fato. Uma delas é que o alelo para o qual o peptídeo foi desenhado poderia ter menor expressão, principalmente nas formas evolutivas presentes no hospedeiro vertebrado, fenômeno conhecido como “*Allelic imbalance*”. Um exemplo de proteína que sofre este fenômeno é a caseína quinase 1 que possui dois alelos no genoma de *T. cruzi*. Um destes alelos é mais expresso na forma tripomastigota, enquanto o outro é mais expresso em amastigotas (Spadafora *et al.*, 2002). A menor expressão da proteína resultaria em menor indução do sistema imune do hospedeiro devido a baixa abundância do peptídeo e consequentemente menores valores de reatividade contra o epítipo seriam mensurados. Por outro lado, uma expressão semelhante de dois alelos com epítipos polimórficos podem levar a uma resposta imune menos direcionada e eficiente para produção de anticorpos específicos para cada alelo. Esta ideia é compatível com hipótese de “*smoke screen*” que postula que o parasito utiliza de uma variedade de proteínas altamente polimórfica em sua superfície para induzir uma resposta menos direcionadas a alvos essenciais e por isso menos eficiente na eliminação do parasito (Ibañez *et al.*, 1988). Além disso, polimorfismos ao longo da proteína podem alterar sua conformação (Silla *et al.*, 2011; Zhou *et al.*, 2010), aumentando ou diminuindo a exposição de um epítipo e por isso, alterando sua reatividade.

O perfil de epítipos reconhecidos pelas três cepas de *T. cruzi* usadas neste estudo, mostrados na FIGURA 8, refletiu a distância provável as cepas estudadas conforme apresentado na FIGURA 2. Assim, a cepa de referência do genoma CL Brener possui mais epítipos compartilhados com a cepa Y do que com a cepa

Colombiana. A maioria dos peptídeos reativos são proteínas hipotéticas, sem função definida para o parasito. Um segundo grupo protéico contendo peptídeos identificados nesta análise são proteínas envolvidas no processamento e manutenção de ácidos nucleicos. Um trabalho de triagem de antígenos de amastigota de *T. cruzi* utilizando bibliotecas de expressão também identificou sequência protéicas de ligação ao DNA e RNA, bem como proteínas ribossomais, flagelares e “*heat-shock*” como antigênicas (DaRocha *et al.*, 2002). Estas sequências geralmente formam complexos nucleoprotéicos que são essenciais para estes parasitos bem como para outros organismos e por isso são evolutivamente bastante conservadas. Assim, a resposta imune dominante contra várias destas proteínas pode ser o resultado de vários fatores tais como sua abundância e alta estabilidade como partículas nucleoprotéicas, bem como sua aumentada capacidade para ser fagocitada e processada por células apresentadoras de antígenos. Além disso, exposição prévia a similares antígenos de outros microrganismos também contribuem para a geração de rápida e forte resposta imune contra estes epitopos conservados (Requena *et al.*, 2000).

A seguir iremos discutir os resultados obtidos na caracterização de peptídeos selecionados para sorodiagnóstico e, posteriormente, os resultados relacionados com peptídeos com potencial aplicação para o sorotipagem.

7.1 Sorodiagnóstico

A motivação para a busca de um peptídeo conservado para melhoria do sorodiagnóstico da doença de Chagas baseia-se no fato de que o táxon *T. cruzi* possuir grande variabilidade genética e por isso um antígeno ideal para sorodiagnóstico deve ser necessariamente conservado entre todas as cepas, evitando resultados falso-negativos. De fato, algumas falhas na reatividade de soro de pacientes chagásicos contra proteínas e peptídeos triados para testes sorológicos foram associados à variabilidade entre cepas que infectavam estes indivíduos (Umezawa *et al.*, 1999). Por outro lado, a comparação de sequências de proteínas usadas no sorodiagnóstico como FRA, Ag1, J17 e H49 são muitas vezes idênticas entre as cepas estudadas, indicando que o domínio que interage com anticorpos destes antígenos é altamente conservado (Cotrim *et al.*, 2005). A triagem dos peptídeos por “immunoblotting” permitiu a identificação de quatro peptídeos com reatividade semelhante com soro da três cepas

de *T. cruzi* utilizadas e por isso são potenciais candidatos para o sorodiagnóstico da doença de Chagas. Dois deste peptídeos foram sintetizados e caracterizados neste trabalho.

O peptídeo C6_30_cons conservado entre as cepas Colombiana, Y e CL Brener, mostrou boas características para o sorodiagnóstico. Primeiro apresentou reatividade acima do “*cutoff*”, sem diferença estatística entre as cepas, tendo sido reconhecidos por anticorpos de média afinidade. A quantidade inicial de inóculo também não influenciou o reconhecimento do peptídeo, um fato importante uma vez que a quantidade de inóculo em infecções naturais deve ser bastante variável (Coura, 2007). Observou-se que assim como este reconhecimento independente da quantidade de inóculo, a parasitemia entre estes animais foi muito próxima. Isso pode ser explicado pelo fato de *T. cruzi* ter uma multiplicação rápida e por isso, mesmo iniciando de uma população pequena é capaz de alcançar densidade populacional suficiente para induzir a resposta imune e o reconhecimento de tal epitopo. O mapeamento do epitopo pela metodologia de Ala scan sugere que aminoácidos situados principalmente na região carboxiterminal do peptídeo são importantes para interação com anticorpos independente da cepa do parasito, fortalecendo a hipótese que este peptídeo é conservado entre elas.

Quanto à análise de diferentes classes de imunoglobulinas, tanto IgM quanto IgG foram detectadas, sugerindo que o peptídeo poderia ter utilidade no diagnóstico tanto na fase aguda quanto crônica na doença de Chagas. O perfil de reconhecimento de IgG iniciou no mesmo período que se observa IgG acima do valor de “*cutoff*” contra o antígeno total do parasito, sugerindo os anticorpos são produzidos logo no início da fase aguda e se manteve persistente por todo tempo analisado. Esta precocidade na produção de anticorpos é importante em um diagnóstico pois pode ter função preventiva, uma vez que as formas clínicas aparecem mais tardiamente ao longo da infecção (Coura, 2007). Este peptídeo se mostrou específico, sendo reativo com apenas um soro de paciente infectado com *L. braziliensis*.

Apesar do modelo animal fornecer uma boa alternativa para estudos em condições padronizadas de infecção, como quantidade de inóculo e confiabilidade de infecção por apenas uma cepa do parasito, existem diferenças na resposta imune destes animais contra *T. cruzi* quando comparados com o homem. Assim se faz necessário a validação dos resultados obtidos em modelo animal e em humanos. Para o peptídeo C6_30_cons, amostras de pacientes chagásicos infectados por parasitos da

linhagem Tc II previamente tipadas reconheceram o epitopo, similarmente ao que observamos para amostras murinas infectadas com a mesma linhagem.

Interessantemente, o peptídeo foi capaz de discriminar formas clínicas sintomática cardíaca de pacientes de amostras de forma indeterminada assintomática. Esta maior reatividade pode estar relacionada a fatores induzidos pela resposta imune contra os parasitos que têm importância na patogênese da miocardite chagásica, como, por exemplo, alterações dos mecanismos de imunorregulação. A mobilização do sistema imune é importante na redução da carga parasitária, mas, por outro lado, pode contribuir para o aparecimento das manifestações crônicas (Vago *et al.*, 1996; Higuchi *et al.*, 1997, Añez *et al.*, 1999, Palomino *et al.*, 2000; Tarleton, 2001). Por exemplo, em avaliação histopatológica de cortes de tecido de cólon de pacientes infectados pelo *T. cruzi*, portadores de megacólon, observa-se um alto percentual de células B (Corbett *et al.*, 2001, Da-Silveira *et al.*, 2008). Além disso, se observou um alto percentual das células B na circulação de pacientes sintomáticos (Dutra *et al.*, 1994). Este aumento no percentual de determinados clones de células B poderia ser acompanhado do aumento da produção de anticorpos contra determinados epitopos e consequentemente maior reatividade ser encontrada em amostras de pacientes sintomáticos. A identificação de um peptídeo que detecta este perfil diferencial entre pacientes assintomáticos e sintomáticos poderiam auxiliar no prognóstico da doença, bem como auxiliar na triagem de indivíduos que irão necessitar de tratamento específico.

Resumindo, este peptídeo apresentou uma especificidade de 93% e sensibilidade de 87%. Estes valores são superiores ao encontrado para outros peptídeos (Peralta *et al.*, 1994; Aguirre *et al.*, 2006) e compatíveis com metodologias que utilizam mistura de antígenos recombinantes (Da-Silveira *et al.*, 2001). Quando realizado dois testes para diagnóstico da doença de Chagas, como recomendados pela OMS, se ambos os testes forem realizados por técnicos treinados com kits de boa qualidade é possível uma sensibilidade de 98%. Entretanto, na rotina de laboratórios de diagnóstico, hospitais e bancos de sangue com o uso de kits comercialmente disponíveis pode-se obter valores de sensibilidade bem menores do que o mencionado (Salles *et al.*, 1996). Porém a maioria destes trabalhos não avaliaram o impacto da variabilidade das cepas no reconhecimento destes antígenos. O uso de amostras de pacientes na etapa de triagem de antígenos e na validação do potencial de sorodiagnóstico sobre um grande painel soro de uma mesma região geográfica pode

não refletir a variabilidade de *T. cruzi*. Isso porque determinadas regiões possuem predominância de uma ou poucas linhagens como no caso de Tc II em Minas Gerais (Devera *et al.*, 2002; D'Avila *et al.*, 2009; Freitas *et al.*, 2005).

Diferente do que foi observado para o primeiro epítipo, o peptídeo B7_30_cons não apresentou características satisfatórias para o uso de sorodiagnóstico. Apesar dos resultados promissores durante a etapa de triagem, a validação por ELISA mostrou que os anticorpos contra este peptídeo em soros de camundongos infectados com a cepa Y apresentaram em média baixa afinidade, resultado também observado com o soro de cobaias infectados pela mesma cepa. Este peptídeo também foi reativo tanto para a fase aguda, quanto para a fase crônica da infecção. A afinidade dos anticorpos em soro de indivíduos infectados com parasitos da linhagem Tc II foi semelhante ao resultado do modelo murino e de cobaia e 52% do soro de pacientes de com diferentes formas clínicas apresentaram reatividade negativa. Especula-se que este resultado possa refletir o fato de que maior parte destes soros é possivelmente de indivíduos infectados por linhagem Tc II, uma vez que estes pacientes são residentes de Minas Gerais e exista predominância desta linhagem neste Estado (Devera *et al.*, 2002; D'Avila *et al.*, 2009). Quando comparado com as outras cepas, o mapeamento de aminoácidos de importância para interação mostrou que apenas uma pequena região de importância é compartilhada. Por outro lado, as cepas Colombiana e CL Brener possuem outros aminoácidos de importância para a interação antígeno-anticorpo e provavelmente, o soro de animais infectados por estas cepas teriam maior reatividade e afinidade com este peptídeo.

Outro importante problema com o peptídeo B7_30_cons foi a observada reação cruzada com outros tripanossomatídeos, mesmo após as análises *in silico* para eliminar sequências similares com parasitos do gênero *Leishmania* e *T. rangeli*. O mapeamento do epítipo utilizando soro de pacientes infectados com *L. braziliensis* identificou um padrão de aminoácidos de importância maior para interação do que o visto para *T. cruzi*, inclusive englobando o padrão observado para este último. Este perfil de reconhecimento cruzado mostra que apenas a eliminação de sequências semelhantes entre organismos por análises *in silico* pode não resultar em eliminação da reação cruzada, uma vez que a estrutura padrão de reconhecimento de anticorpos ocupa pequena porcentagem da sequência e pode aparecer em proteínas com baixa similaridade dos demais tripanossomatídeos e outros organismos, como foi visto com *L. braziliensis*.

Todos estes problemas resultaram em baixos valores de especificidade de (35%) e de sensibilidade (58%) do peptídeo B7_30_cons. Estes valores são bem inferiores àqueles encontrados para a primeiro peptídeo testado neste trabalho e antígenos testados por outros grupos de pesquisa. Por isso, este peptídeo não seria indicado para compor um painel de peptídeos para melhorar o sorodiagnóstico da doença de Chagas.

7.2 Sorotipagem

Acredita-se que as manifestações patológicas, tanto na fase aguda quanto na fase crônica da doença de Chagas, sejam consequência de mecanismos multifatoriais relacionados tanto ao parasito quanto ao hospedeiro vertebrado, como a variabilidade das cepas, o tropismo, a antigenicidade e o tamanho do inóculo bem como a faixa etária, e fatores imunológicos do hospedeiro (Dias, 2000). Os mecanismos envolvidos no desenvolvimento das formas graves da doença de Chagas e sua morbidade são ainda pouco compreendidos. Dentro deste quadro, a grande variabilidade genética de *T. cruzi* sempre apresentou uma sedutora característica que poderia estar associada a este espectro de manifestações clínicas. Apesar de não ser observada clara correlação entre cepa ou linhagem e a sintomatologia da doença (D'Avila *et al.*, 2009), alguns indícios de possíveis correlação foram observados. Por exemplo, Tc I parece estar associado a ocorrência de cardiopatia chagásica na América Central e norte da América do Sul, enquanto Tc II, V e VI no cone sul é correlacionado com cardiopatia e a presença de megasíndromes chagásicas do colon e esôfago (Prata, 2001).

Para identificação das diferentes linhagens de *T. cruzi*, a principal metodologia baseia-se na genotipagem, onde é necessária obtenção do material genético do parasito (Devera *et al.*, 2002; Freitas *et al.*, 2005; D'Avila *et al.*, 2009). Na fase crônica, devido a baixa parasitemia, conseguir DNA suficiente para o trabalho é muito difícil e algumas metodologias tem sido usadas para facilitar essa obtenção, onde destaca-se a hemocultura (Chiari *et al.*, 1989; Miyamoto *et al.*, 2006) e a obtenção de material genético diretamente do tecido (Freitas *et al.*, 2005). Hemocultura pode ser negativa quando a parasitemia é baixa e também fornece chance de seleção de populações de parasitos, comprometendo a identificação de co-infecções (Marcelo e Pena, 1998; Luz *et al.*, 1994). Biopsia de tecido infectado é um

método muito invasivo que necessita de cuidados médicos e por isso, inviabiliza estudos que requerem um grande número de amostras (Lescure *et al.*, 2010). Desta maneira, acreditamos que a identificação de peptídeos que possam ser empregados em testes de sorotipagem constitui-se em uma estratégia interessante e promissora. Primeiro, a obtenção de soro para realização das análises é uma abordagem muito menos invasiva que a obtenção de tecidos infectados. Segundo, a técnica de ELISA permite automação o que resultaria em um teste adequado para testar grande números de amostra, como é necessário em grandes estudos epidemiológicos.

É do nosso conhecimento apenas um trabalho sugerindo a utilização de um antígeno nomeado TSSA (“*trypomastigote small surface antigen*”), pertencente a família TcMUC III, para discriminar pacientes infectados com Tc I de pacientes infectados com Tc II-VI (Di Noia *et al.*, 2002). Porém estudos moleculares posteriores mostraram que este antígeno seria capaz de agrupar Tc I com Tc III e Tc IV, separando estas linhagens de Tc II, V e VI (Bhattacharyya *et al.*, 2010). Por isso, identificar epitopos linhagem-específica ainda é um desafio e teria um grande impacto para o diagnóstico da doença de Chagas.

Durante a etapa de triagem, 32 dos peptídeos reativos dos 98 epitopos classificados como polimórficos nas análises *in silico* apresentaram reconhecimento abaixo do “cutoff” para pelo menos uma cepa de *T. cruzi*, mostrando que o embasamento teórico deste trabalho para seleção de peptídeos para sorotipagem foi bem sucedida. De fato, os três peptídeos polimórficos selecionadas para síntese solúvel juntos foram capazes de discriminar as três linhagens do parasito utilizadas.

Como esperado, o peptídeo A6_30_col foi mais reativo com soro de animais infectados com a cepa Colombiana. Observamos reatividades diferenciais para este peptídeo nos modelos animal e humano. Soro de humanos infectados com Tc II foram negativos contra o peptídeo A6_30_col reconhecido por animais infectados com Colombiana e esse mesmo peptídeo é reativo com soro de animais infectados com a cepa Y. Essa diferença pode estar associada por exemplo ao tipo e à quantidade de inóculo da transmissão, tripomastigotas de cultura em camundongos e provavelmente tripomastigotas metacíclicos em humano. Além disso, os pacientes podem estar em fase crônica mais tardia da doença, enquanto que os animais estavam no início da fase crônica. O mapeamento mostra que a sequência reconhecida por estes anticorpos está presente no par de alelo do haplótipo Non-esmo da cepa CL Brener, o que pode justificar a maior reatividade deste peptídeo com soro de animais infectados com a

cepa Colombiana quando comparado com as outras cepas analisadas. O seqüenciamento da cepa Sylvio X10/1 pertencente a linhagem TcI confirmou que o genoma desta linhagem é mais similar ao haplótipo Non-esmo do que o Esmo e comparado a CL Brener, 23% das diferenças de nucleotídeos foram não sinônimas e foram associadas com mudanças radicais de aminoácidos (Franzén et al., 2011). Esses achados fortalecem nossa estratégia de busca de peptídeos polimórficos entre as cepas de *T. cruzi* e apontam para uma real possibilidade de se construir um robusto painel de peptídeos que possam ser usados com sucesso em métodos de sorotipagem do parasito.

Como esperado, o peptídeo reativo com a cepa Y, B2_30_Y, foi reativo com soro de pacientes infectados com Tc II. Assim como o peptídeo conservado C6_30_cons, o peptídeo B2_30_Y foi também capaz de diferenciar formas clínicas sintomáticas de não sintomática. Desta forma, este peptídeo poderia ser usado para prognóstico ou auxílio na identificação de manifestações clínicas juntamente com o peptídeo conservado. Somente anticorpos da classe IgG foram detectados contra o peptídeo sugerindo que a produção de anticorpos seja mais tardia contra este peptídeo. O mapeamento do epitopo e a comparação entre os pares de alelos confirmam que a proximidade do genoma da linhagem Tc II com o haplótipo Esmo da cepa híbrida, uma vez que os aminoácidos críticos para o reconhecimento pelo anticorpo estão ausentes no haplótipo non-Esmo.

O peptídeo B9_30_cl também discriminou corretamente a cepa CL Brener de camundongos infectados. Diferenças entre modelos animais também foi visto para este peptídeo uma vez que camundongos infectados com a cepa Y possuiu reatividade acima do “cutoff” para este peptídeo, enquanto soro de cobaia infectado com a mesma cepa apresentou reatividade negativa quando mensurado anticorpos da classe IgG. Por outro lado, houve reatividade de IgM contra este peptídeo em dois tempos após a infecção de cobaias. Nestes tempos observa-se que a afinidade dos anticorpos são média e baixa, podendo representar uma reatividade com anticorpos inespecíficos. Apesar deste peptídeo ser classificado como Esmo, não houve reatividade com soro de animais infectados com a cepa Y (TcII). Uma possível explicação para isso é que esta sequência pode ter divergido da sequência originada de TcII e o polimorfismo pode estar presente na região de ligação de anticorpos.

Interessantemente, os três peptídeos polimórficos são derivados de regiões repetitivas. Um fator que pode ter contribuído para isso é que geralmente

polimorfismo em extensão de regiões repetitivas entre os pares de alelos são alinhados como “gaps” e a estes nós admitimos o maior valor de pontuação de polimorfismo entre pares de alelos Esmo e Non-esmo utilizados neste projeto (Tabela 1). Como nosso critério de seleção de epitopos polimórficos privilegia peptídeos com os mais altos valores de pontuação de polimorfismo, nossos epitopos contendo polimorfismo em sequências repetitivas foram mais bem ranqueados entre aqueles selecionados. A identificação de antígenos de amastigota através de biblioteca de cDNA mostrou que este fato é comum para antígenos de *T. cruzi*, já que 70% dos clones reativos codificavam proteínas com sequência repetitiva de aminoácidos (DaRocha *et al*, 2002). Este trabalho também sugere que proteínas ribossomais contendo repetições de aminoácidos são um dos imunógenos mais proeminentes presentes na forma intracelular do parasito. A alta frequência com que antígenos contendo domínios repetitivos são identificados pode ser explicada pelos altos títulos de anticorpos específicos contra estas sequências, o que pode ser consequência da abundância destas unidades repetitivas no proteoma e pelo fato de tais anticorpos se ligarem com alta afinidade a estes epitopos (Da-Silveira *et al*, 2001). Estas sequências repetitivas também evoluem rapidamente (Carlton *et al.*, 2008) e isto pode ter consequência no reconhecimento diferencial entre as cepas do parasito. Assim, expansão ou depleção destas regiões repetitivas pode alterar a estrutura de um epitopo de forma que anticorpos se liguem mais fraca ou fortemente a ele.

Quatro dos cinco peptídeos testados neste trabalho apresentaram boas características para o uso no sorodiagnóstico ou sorotipagem de *T. cruzi* demonstrando que a mineração de genomas pode ser um bom ponto de partida para pesquisa de antígenos. A técnica de “immunoblotting” foi uma ferramenta experimental bastante útil para a validação experimental dos resultados de triagem *in silico*. Os peptídeos identificados neste trabalho apresentaram especificidade e sensibilidade alta para o uso no diagnóstico do parasito e após estudos mais aprofundados, principalmente com grandes quantidade de amostras de diferentes regiões geográficas, teriam o potencial para ser incorporados na rotina laboratorial. Entre outros estudos que necessitam ser feitos está a avaliação do comportamento da reatividade e afinidade dos peptídeos com o soro de animais e principalmente humanos infectados com as outras linhagens de *T. cruzi*. Além disso, a hipótese do modelo histotrópico clonal sugere que a heterogeneidade e multiclonalidade de uma cepa determinam tropismo tissular diferente e consequentemente variações na

apresentação clínica da doença (Macedo e Pena, 1998). Devido a este tropismo tecidual diferenciado, em co-infecções, a cepa circulante pode não ser a mesma presente no tecido e responsável pela determinada manifestação clínica e por isso, seria interessante a avaliação dos peptídeos utilizando soro de animais e pacientes co-infectados.

Outra importante contribuição deste trabalho foi identificar outros potenciais antígenos identificados na etapa de análise *in silico* e triagem experimental e que não foram ainda caracterizados e validados por ELISA. A metodologia utilizada aqui também poderia ser aplicada para identificar novos antígenos por comparação de genomas entre diferentes linhagens de *T. cruzi*, que estão sendo atualmente sequenciadas. O mapeamento de aminoácidos críticos para o reconhecimento pelo anticorpo poderá permitir a manipulação das sequências para otimização da interação com anticorpos e/ou construção de peptídeos quiméricos contendo aminoácidos importantes de diferentes epitopos maximizando a interação com diferentes anticorpos de uma mesma amostra (Aguirre et al., 2006). Estas abordagens permitirão desenvolvimento de antígenos mais específicos e sensíveis. O uso combinado de peptídeos também seria boa opção principalmente para melhorar a sensibilidade do teste. Como exemplo, nenhum dos nove antígenos JL7, H49, Ag2 e A13 utilizados individualmente foram capazes de detectar anticorpos específicos no soro de todos os pacientes chagásicos crônicos, indicando que um único antígeno não será suficiente para diagnóstico sorológico (Da-Silveira, 2001). Os antígenos CRA e FRA testados em mistura apresentaram 98,3% de sensibilidade e 100% de especificidade e estes valores foram superiores aos testes utilizando os antígenos separadamente (Da-Silveira, 2001). Acreditamos que outros epitopos polimórficos e conservados possam ser identificados dentre os peptídeos reativos na etapa inicial de triagem por imunoblot. O uso combinado destes com os outros epitopos caracterizados neste trabalho e outros disponíveis na literatura poderá viabilizar a construção de um painel robusto de epitopos com potencial aplicabilidade para sorodiagnóstico e sorotipagem na doença de Chagas.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aguirre S, Silber AM, Brito ME, Ribone ME, Lagier CM, Marcipar IS 2006. Design, construction, and evaluation of a specific chimeric antigen to diagnose chagasic infection. *J Clin Microbiol* 44(10):3768-74.

Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol.* 1990 Oct 5;215(3):403-10.

Andrade CR, Andrade PP, Wright EP 1988. *Leishmania donovani donovani* antigens recognized by kala-azar patient sera and identification of cross-reacting antigens to Chagas' disease. *Braz J Med Biol Res* 21(3):511-515.

Andrade LO, Machado CR, Chiari E, Pena SD, Macedo AM 1999. Differential tissue distribution of diverse clones of *Trypanosoma cruzi* in infected mice. *Mol Biochem Parasitol* 100: 163-172.

Andrade LO, Galvão LM, Meirelles Mde N, Chiari E, Pena SD, Macedo AM. Differential tissue tropism of *Trypanosoma cruzi* strains: an in vitro study. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2010 Sep;105(6):834-7.

Añez N, Carrasco H, Parada H, Crisante G, Rojas A, Fuenmayor C, Gonzalez N, Percoco G, Borges R, Guevara P, Ramirez JL. Myocardial parasite persistence in chronic chagasic patients. *Am J Trop Med Hyg.* 1999 May;60(5):726-32.

Bartholomeu DC, Silva RA, Galvão LM, el-Sayed NM, Donelson JE, Teixeira SM. *Trypanosoma cruzi*: RNA structure and post-transcriptional control of tubulin gene expression. *Exp Parasitol.* 2002 Nov-Dec;102(3-4):123-33.

Berriman M, Ghedin E, Hertz-Fowler C, Blandin G, Renauld H, Bartholomeu DC, Lennard NJ, Caler E, Hamlin NE, Haas B, Böhme U, Hannick L, Aslett MA, Shallom J, Marcello L, Hou L, Wickstead B, Alsmark UC, Arrowsmith C, Atkin RJ, Barron AJ, Bringaud F, Brooks K, Carrington M, Cherevach I, Chillingworth TJ, Churcher C,

Clark LN, Corton CH, Cronin A, Davies RM, Doggett J, Djikeng A, Feldblyum T, Field MC, Fraser A, Goodhead I, Hance Z, Harper D, Harris BR, Hauser H, Hostetler J, Ivens A, Jagels K, Johnson D, Johnson J, Jones K, Kerhornou AX, Koo H, Larke N, Landfear S, Larkin C, Leech V, Line A, Lord A, Macleod A, Mooney PJ, Moule S, Martin DM, Morgan GW, Mungall K, Norbertczak H, Ormond D, Pai G, Peacock CS, Peterson J, Quail MA, Rabbinowitsch E, Rajandream MA, Reitter C, Salzberg SL, Sanders M, Schobel S, Sharp S, Simmonds M, Simpson AJ, Tallon L, Turner CM, Tait A, Tivey AR, Van Aken S, Walker D, Wanless D, Wang S, White B, White O, Whitehead S, Woodward J, Wortman J, Adams MD, Embley TM, Gull K, Ullu E, Barry JD, Fairlamb AH, Opperdoes F, Barrell BG, Donelson JE, Hall N, Fraser CM, Melville SE, El-Sayed NM. The genome of the African trypanosome *Trypanosoma brucei*. *Science*. 2005 Jul 15;309(5733):416-22.

Bhattacharyya T, Brooks J, Yeo M, Carrasco HJ, Lewis MD, Llewellyn MS, Miles MA. Analysis of molecular diversity of the *Trypanosoma cruzi* trypomastigote small surface antigen reveals novel epitopes, evidence of positive selection and potential implications for lineage-specific serology. *Int J Parasitol*. 2010 Jul;40(8):921-8.

Bonaldo MC, Souto-Padron T, de Souza W, Goldenberg S. Cell-substrate adhesion during *Trypanosoma cruzi* differentiation. *J Cell Biol*. 1988 Apr;106(4):1349-58.

Borges MM, Mello DA, Teixeira ML, da Silva JD. [Experimental study of *Zygodontomys lasiurus* (Rodentia-Cricetidae) with strains of *Trypanosoma cruzi*]. *Rev Saude Publica*. 1983 Oct;17(5):387-93.

Brener, Z.. Biology of *Trypanosoma cruzi*. *Annu. Rev. Microbiol.*, v.27, p.347-382, 1973.

Brener Z, Andrade ZA 2000. *Trypanosoma cruzi* e a Doença de Chagas. Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 431 pp.

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

Brofen E, de Assis-Rocha FS, Machado EB, Perillo MM, Romanha AN, Chiari E. Isolation of *Trypanosoma cruzi* samples by xenodiagnosis and hemoculture from patients with chronic Chagas' disease. 1989. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 84:237-240.

Buscaglia CA, Di Noia JM. *Trypanosoma cruzi* clonal diversity and the epidemiology of Chagas' disease. *Microbes Infect*. 2003 Apr;5(5):419-27.

Caballero ZC, Sousa OE, Marques WP, Saez-Alquezar A, Umezawa ES. Evaluation of serological tests to identify *Trypanosoma cruzi* infection in humans and determine cross-reactivity with *Trypanosoma rangeli* and *Leishmania* spp. *Clin Vaccine Immunol*. 2007 Aug;14(8):1045-9.

Caetano LC, do Prado JC Jr, Toldo MP, Abrahão AA. *Trypanosoma cruzi*: do different sylvatic strains trigger distinct immune responses? *Exp Parasitol*. 2010 Feb;124(2):219-24.

Camargo EP. Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi* I. Origin of Metacyclic Trypanosomes in Liquid Media. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1964 May-Jun;6:93-100.

Carlton JM, Adams JH, Silva JC, Bidwell SL, Lorenzi H, Caler E, Crabtree J, Angiuoli SV, Merino EF, Amedeo P, Cheng Q, Coulson RM, Crabb BS, Del Portillo HA, Essien K, Feldblyum TV, Fernandez-Becerra C, Gilson PR, Gueye AH, Guo X, Kang'a S, Kooij TW, Korsinczky M, Meyer EV, Nene V, Paulsen I, White O, Ralph SA, Ren Q, Sargeant TJ, Salzberg SL, Stoeckert CJ, Sullivan SA, Yamamoto MM, Hoffman SL, Wortman JR, Gardner MJ, Galinski MR, Barnwell JW, Fraser-Liggett CM. Comparative genomics of the neglected human malaria parasite *Plasmodium vivax*. *Nature*. 2008 Oct 9;455(7214):757-63.

CBS. BepiPred 1.0 Server. <<http://www.cbs.dtu.dk/services/BepiPred/output.php>>. 2010. Acessado em 11 Feb. 2011, 2011.

Chagas, C (1909). Nova tripanosomiase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n.sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 1, 159-218.

Chenna R, Sugawara H, Koike T, Lopez R, Gibson TJ, Higgins DG, Thompson JD. Multiple sequence alignment with the Clustal series of programs. Nucleic Acids Res. 2003 Jul 1;31(13):3497-500.

Chiari E, Dias JC, Lana M, Chiari CA. Hemocultures for the parasitological diagnosis of human chronic Chagas' disease. Rev Soc Bras Med Trop. 1989 Jan-Mar;22(1):19-23.

Chiller, T. M., Samudio, M. A. and Zoulek, G. IgG antibody reactivity with *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania* antigens in sera of patients with Chagas' disease and leishmaniasis. Am. J. Trop. Med. Hyg., v.43, n.6, p.650-656,1990.

Corbett CE, Ribeiro U Jr, Prianti MG, Habr-Gama A, Okumura M, Gama-Rodrigues J. Cell-mediated immune response in megacolon from patients with chronic Chagas' disease. Dis Colon Rectum. 2001 Jul;44(7):993-8.

Cotrim PC, Paranhos-Baccala G, Santos MR, Mortensen C, Cano MI, Jolivet M, Camargo ME, Mortara RA, Da Silveira JF. Organization and expression of the gene encoding an immunodominant repetitive antigen associated to the cytoskeleton of *Trypanosoma cruzi*. Mol Biochem Parasitol. 1995 Apr;71(1):89-98.

Coura JR. Chagas disease: what is known and what is needed--a background article. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2007 Oct 30;102 Suppl 1:113-22.

Cover B, Gutteridge WE. Comparison of drug sensitivities of three strains of *Trypanosoma cruzi* in inbred A/Jax mice. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1981;75(2):274-81.

DaRocha WD, Bartholomeu DC, Macêdo CD, Horta MF, Cunha-Neto E, Donelson JE, Teixeira SM. Characterization of cDNA clones encoding ribonucleoprotein antigens expressed in *Trypanosoma cruzi* amastigotes. *Parasitol Res.* 2002 Apr;88(4):292-300.

Da-Silveira JF, Umezawa ES, Luquetti AO. Chagas disease: recombinant *Trypanosoma cruzi* antigens for serological diagnosis. *Trends Parasitol.* 2001 Jun;17(6):286-91.

Da-Silveira AB, Freitas MA, de Oliveira EC, Neto SG, Luquetti AO, Furness JB, Correa-Oliveira R, d'Avila Reis D. Neuronal plasticity of the enteric nervous system is correlated with chagasic megacolon development. *Parasitology.* 2008 Sep;135(11):1337-42.

D'Avila DA, Macedo AM, Valadares HM, Gontijo ED, de Castro AM, Machado CR, Chiari E, Galvão LM. Probing population dynamics of *Trypanosoma cruzi* during progression of the chronic phase in chagasic patients. *J Clin Microbiol.* 2009 Jun;47(6):1718-25.

De-Bruijn MH, Barker DC. Diagnosis of New World leishmaniasis: specific detection of species of the *Leishmania braziliensis* complex by amplification of kinetoplast DNA. *Acta Trop.* 1992 Sep;52(1):45-58.

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

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.

De-Souza, W. Basic cell biology of *Trypanosoma cruzi*. *Curr. Pharm. Des.*, v.8, n.4, p.269-285, 2002.

Dias JC. [Epidemiological surveillance of Chagas disease]. *Cad Saude Publica*. 2000;16 Suppl 2:43-59.

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

Dias JC. 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*. 2007 Oct 30;102 Suppl 1:11-8.

Di Noia JM, Buscaglia CA, De Marchi CR, Almeida IC, Frasch AC. A *Trypanosoma cruzi* small surface molecule provides the first immunological evidence that Chagas' disease is due to a single parasite lineage. *J Exp Med*. 2002 Feb 18;195(4):401-13.

Dutra WO, Martins-Filho OA, Cançado JR, Pinto-Dias JC, Brener Z, Freeman Júnior GL, Colley DG, Gazzinelli G, Parra JC. Activated T and B lymphocytes in peripheral blood of patients with Chagas' disease. *Int Immunol*. 1994 Apr;6(4):499-506.

El-Sayed NM, Myler PJ, Blandin G, Berriman M, Crabtree J, Aggarwal G, Caler E, Renauld H, Worthey EA, Hertz-Fowler C, Ghedin E, Peacock C, Bartholomeu DC, Haas BJ, Tran AN, Wortman JR, Alsmark UC, Angiuoli S, Anupama A, Badger J, Bringaud F, Cadag E, Carlton JM, Cerqueira GC, Creasy T, Delcher AL, Djikeng A, Embley TM, Hauser C, Ivens AC, Kummerfeld SK, Pereira-Leal JB, Nilsson D, Peterson J, Salzberg SL, Shallom J, Silva JC, Sundaram J, Westenberger S, White O, Melville SE, Donelson JE, Andersson B, Stuart KD, Hall N. Comparative genomics of trypanosomatid parasitic protozoa. *Science*. 2005 Jul 15;309(5733):404-9.

Fernandes MC, Cortez M, Geraldo Yoneyama KA, Straus AH, Yoshida N, Mortara RA. Novel strategy in *Trypanosoma cruzi* cell invasion: implication of cholesterol and host cell microdomains. *Int J Parasitol.* 2007 Nov;37(13):1431-41.

Frank R. The SPOT-synthesis technique. Synthetic peptide arrays on membrane supports--principles and applications. *J Immunol Methods.* 2002 Sep 1;267(1):13-26.

Franzén O, Ochaya S, Sherwood E, Lewis MD, Llewellyn MS, Miles MA, Andersson B. Shotgun sequencing analysis of *Trypanosoma cruzi* I Sylvio X10/1 and comparison with *T. cruzi* VI CL Brener. *PLoS Negl Trop Dis.* 2011 Mar 8;5(3):e984.

Frasch AC, Cazzulo JJ, Aslund L, Pettersson U. Comparison of genes encoding *Trypanosoma cruzi* antigens. *Parasitol Today.* 1991 Jun;7(6):148-51.

Freitas JM, Lages-Silva E, Crema E, Pena SD, Macedo AM. Real time PCR strategy for the identification of major lineages of *Trypanosoma cruzi* directly in chronically infected human tissues. *Int J Parasitol.* 2005 Apr 1;35(4):411-7.

Garcia ES, Azambuja P. Development and interactions of *Trypanosoma cruzi* within the insect vector. *Parasitol Today.* 1991 Sep;7(9):240-4.

Gomes YM. PCR and sero-diagnosis of chronic Chagas' disease. *Biotechnological advances. Appl Biochem Biotechnol.* 1997 May;66(2):107-19.

Guhl, F., Hudson, L., Marinkelle, C. J., Morgan, S. J. and Jaramillo, C. J.. Antibody response to experimental *Trypanosoma rangeli* and its implications for immunodiagnosis of South American trypanosomiasis. *Acta Trop.*, v.42, n.4, 1985.

Hedman K, Hietala J, Tiilikainen A, Hartikainen-Sorri AL, Rähkä K, Suni J, Väänänen P, Pietiläinen M. Maturation of immunoglobulin G avidity after rubella vaccination studied by an enzyme linked immunosorbent assay (avidity-ELISA) and by haemolysis typing. *J Med Virol.* 1989 Apr;27(4):293-8.

Higuchi MD, Ries MM, Aiello VD, Benvenuti LA, Gutierrez PS, Bellotti G, Pileggi F. Association of an increase in CD8+ T cells with the presence of *Trypanosoma cruzi* antigens in chronic, human, chagasic myocarditis. *Am J Trop Med Hyg.* 1997 May;56(5):485-9.

Hughes, A.L. and H. Piontkivska, *Molecular phylogenetics of Trypanosomatidae: contrasting results from 18S rRNA and protein phylogenies.* *Kinetoplastid Biol Dis,* 2003. 2(1): p. 15.

Ibañez CF, Affranchino JL, Macina RA, Reyes MB, Leguizamon S, Camargo ME, Aslund L, Pettersson U, Frasch AC. Multiple *Trypanosoma cruzi* antigens containing tandemly repeated amino acid sequence motifs. *Mol Biochem Parasitol.* 1988 Jul;30(1):27-33.

Koerich LB, Emmanuelle-Machado P, Santos K, Grisard EC, Steindel M. Differentiation of *Trypanosoma rangeli*: high production of infective Trypomastigote forms in vitro. *Parasitol Res.* 2002 Jan;88(1):21-5.

Larsen JE, Lund O, Nielsen M. Improved method for predicting linear B-cell epitopes. *Immunome Res.* 2006 Apr 24;2:2.

Lescure FX, Le Loup G, Freilij H, Develoux M, Paris L, Brutus L, Pialoux G. Chagas disease: changes in knowledge and management. *Lancet Infect Dis.* 2010 Aug;10(8):556-70.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951 Nov;193(1):265-75.

Macedo AM, Pena SD. Genetic Variability of *Trypanosoma cruzi*: Implications for the Pathogenesis of Chagas Disease. *Parasitol Today.* 1998 Mar;14(3):119-24.

Macedo AM, Oliveira RP, Pena SD. Chagas disease: role of parasite genetic variation in pathogenesis. *Expert Rev Mol Med*. 2002 Mar 5;4(5):1-16.

Macedo AM and Segatto M. Implications of *Trypanosoma cruzi* Intraspecific Diversity in the Pathogenesis of Chagas Disease. In: *American Trypanosomiasis Chagas Disease: One Hundred Years of Research*. Telleria J, Tibayrenc M, editors. 2010. London: Elsevier. p489

Machado CA, Ayala FJ. Nucleotide sequences provide evidence of genetic exchange among distantly related lineages of *Trypanosoma cruzi*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Jun 19;98(13):7396-401.

Marcipar IS, Roodveldt C, Corradi G, Cabeza ML, Brito ME, Winter LM, Marcipar AJ, Silber AM. Use of full-length recombinant calflagin and its c fragment for improvement of diagnosis of *Trypanosoma cruzi* infection. *J Clin Microbiol*. 2005 Nov;43(11):5498-503.

Meira WS, Galvão LM, Gontijo ED, Machado-Coelho GL, Norris KA, Chiari E. *Trypanosoma cruzi* recombinant complement regulatory protein: a novel antigen for use in an enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of Chagas' disease. *J Clin Microbiol*. 2002 Oct;40(10):3735-40.

Melo RC, Brener Z. Tissue tropism of different *Trypanosoma cruzi* strains. *J Parasitol*. 1978 Jun;64(3):475-82.

Ministério da Saúde. *Doenças Infecciosas e Parasitárias: guia de bolso*. Brasília. 2006.

Miyamoto CT, Gomes ML, Marangon AV, Araújo SM, Bahia MT, Lana M, Toledo MJ. *Trypanosoma cruzi*: sensitivity of the polymerase chain reaction for detecting the parasite in the blood of mice infected with different clonal genotypes. *Exp Parasitol*. 2006 Mar;112(3):198-201.

Morales L, Romero I, Diez H, Del Portillo P, Montilla M, Nicholls S, Puerta C. Characterization of a candidate *Trypanosoma rangeli* small nucleolar RNA gene and its application in a PCR-based parasite detection. *Exp Parasitol*. 2002 Oct;102(2):72-80.

Moser DR, Kirchhoff LV, Donelson JE. Detection of *Trypanosoma cruzi* by DNA amplification using the polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol*. 1989 Jul;27(7):1477-82.

Pais FS, DaRocha WD, Almeida RM, Leclercq SY, Penido ML, Fragoso SP, Bartholomeu DC, Gazzinelli RT, Teixeira SM. Molecular characterization of ribonucleoproteic antigens containing repeated amino acid sequences from *Trypanosoma cruzi*. *Microbes Infect*. 2008 Jun;10(7):716-25.

Palomino SA, Aiello VD, Higuchi ML. Systematic mapping of hearts from chronic chagasic patients: the association between the occurrence of histopathological lesions and *Trypanosoma cruzi* antigens. *Ann Trop Med Parasitol*. 2000 Sep;94(6):571-9.

Peacock CS, Seeger K, Harris D, Murphy L, Ruiz JC, Quail MA, Peters N, Adlem E, Tivey A, Aslett M, Kerhornou A, Ivens A, Fraser A, Rajandream MA, Carver T, Norbertczak H, Chillingworth T, Hance Z, Jagels K, Moule S, Ormond D, Rutter S, Squares R, Whitehead S, Rabinowitsch E, Arrowsmith C, White B, Thurston S, Bringaud F, Baldauf SL, Faulconbridge A, Jeffares D, Depledge DP, Oyola SO, Hilley JD, Brito LO, Tosi LR, Barrell B, Cruz AK, Mottram JC, Smith DF, Berriman M. Comparative genomic analysis of three *Leishmania* species that cause diverse human disease. *Nat Genet*. 2007 Jul;39(7):839-47.

Peralta JM, Teixeira MG, Shreffler WG, Pereira JB, Burns JM Jr, Sleath PR, Reed SG. Serodiagnosis of Chagas' disease by enzyme-linked immunosorbent assay using two synthetic peptides as antigens. *J Clin Microbiol*. 1994 Apr;32(4):971-4.

Potela-Lindoso A, Shikanai-Yasuda M. Chronic Chagas disease: from xenodiagnosis and hemoculture to polymerase chain reaction. *Rev Saude Pub* 2003; 37: 107-115.

Prata A. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. *Lancet Infect Dis*. 2001 Sep;1(2):92-100.

Requena JM, Alonso C, Soto M. Evolutionarily conserved proteins as prominent immunogens during *Leishmania* infections. *Parasitol Today*. 2000 Jun;16(6):246-50.

Rice P, Longden I, Bleasby A. EMBOSS: the European Molecular Biology Open Software Suite. *Trends Genet*. 2000 Jun;16(6):276-7.

Sáez-Alquézar A, Sabino EC, Salles N, Chamone DF, Hulstaert F, Pottel H, Stoops E, Zrein M. Serological confirmation of Chagas' disease by a recombinant and peptide antigen line immunoassay: INNO-LIA chagas. *J Clin Microbiol*. 2000 Feb;38(2):851-4.

Sáez-Alquézar A, Murta M, Pereira Marques W, Rodrigues da Silva G. The results of an external quality control program for serological screening for antibodies against *Trypanosoma cruzi* in blood donors in Brazil. *Rev Panam Salud Publica* 2003; 13(2/3):129-137.

Salles NA, Sabino EC, Cliquet MG, Eluf-Neto J, Mayer A, Almeida-Neto C, Mendonça MC, Dorliach-Llacer P, Chamone DF, Saéz-Alquézar A. Risk of exposure to Chagas' disease among seroreactive Brazilian blood donors. *Transfusion*. 1996 Nov-Dec;36(11-12):969-73.

Silla Y, Chandamouli B, Maiti S, Sengupta S. A single nucleotide polymorphism in transcobalamin II (I5V) induces structural changes in the protein as revealed by molecular modeling studies. *Biochemistry*. 2011 Mar 1;50(8):1396-402.

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.

Spadafora C, Repetto Y, Torres C, Pino L, Robello C, Morello A, Gamarro F, Castanys S. Two casein kinase 1 isoforms are differentially expressed in *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol*. 2002 Sep-Oct;124(1-2):23-36.

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

Tarleton RL, Reithinger R, Urbina JA, Kitron U, Gürtler RE. The challenges of Chagas Disease-- grim outlook or glimmer of hope. *PLoS Med*. 2007 Dec;4(12):e332.

Tarleton RL. Parasite persistence in the aetiology of Chagas disease. *Int J Parasitol*. 2001 May 1;31(5-6):550-4.

Umezawa ES, Bastos SF, Camargo ME, Yamauchi LM, Santos MR, Gonzalez A, Zingales B, Levin MJ, Sousa O, Rangel-Aldao R, da Silveira JF. Evaluation of recombinant antigens for serodiagnosis of Chagas' disease in South and Central America. *J Clin Microbiol*. 1999 May;37(5):1554-60.

Umezawa ES, Bastos SF, Coura JR, Levin MJ, Gonzalez A, Rangel-Aldao R, Zingales B, Luquetti AO, da Silveira JF. An improved serodiagnostic test for Chagas' disease employing a mixture of *Trypanosoma cruzi* recombinant antigens. *Vinhaes MC, Dias JC. [Chagas disease in Brazil]. Cad Saude Publica*. 2003;16 Suppl 2:7-12.

Vago AR, Macedo AM, Oliveira RP, Andrade LO, Chiari E, Galvão LM, Reis D, Pereira ME, Simpson AJ, Tostes S, Pena SD. Kinetoplast DNA signatures of *Trypanosoma cruzi* strains obtained directly from infected tissues. *Am J Pathol*. 1996 Dec;149(6):2153-9.

Vinhaes MC, Dias JC. [Chagas disease in Brazil]. *Cad Saude Publica*. 2000;16 Suppl 2:7-12.

Vitor RW, Chiari E. [Evaluation of *Trypanosoma cruzi* antigens for the indirect hemagglutination reaction. I. Different antigenic extracts]. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1987 May-Jun;29(3):178-82.

Zhou T, Zhang Y, Macchiarulo A, Yang Z, Cellanetti M, Coto E, Xu P, Pellicciari R, Wang L. Novel polymorphisms of nuclear receptor SHP associated with functional and structural changes. *J Biol Chem*. 2010 Aug 6;285(32):24871-81.

Zingales B, Pereira ME, Almeida KA, Umezawa ES, Nehme NS, Oliveira RP, Macedo A, Souto RP. Biological parameters and molecular markers of clone CL Brener--the reference organism of the *Trypanosoma cruzi* genome project. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1997 Nov-Dec;92(6):811-4.

Zingales B, Andrade SG, Briones MR, Campbell DA, Chiari E, Fernandes O, Guhl F, Lages-Silva E, Macedo AM, Machado CR, Miles MA, Romanha AJ, Sturm NR, Tibayrenc M, Schijman AG; Second Satellite Meeting. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009 Nov;104(7):1051-4.

Weatherly DB, Boehlke C, Tarleton RL. Chromosome level assembly of the hybrid *Trypanosoma cruzi* genome. *BMC Genomics*. 2009 Jun 1;10:255.

Wellings DA, Atherton E. Standard Fmoc protocols. *Methods Enzymol*. 1997;289:44-67.

Westenberger SJ, Barnabé C, Campbell DA, Sturm NR. Two hybridization events define the population structure of *Trypanosoma cruzi*. *Genetics*. 2005 Oct;171(2):527-43.

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.

Winkler DF, Campbell WD. The spot technique: synthesis and screening of peptide macroarrays on cellulose membranes. *Methods Mol Biol.* 2008;494:47-70.

WHO. Strategic emphases for tropical diseases research: a TDR perspective. 2002. Disponível em: <<http://www.who.int/tdr/diseases/chagas/default.htm>>. Acesso em: 9 Feb. 2011.

WHO. WHO expands fight against Chagas disease with support from Bayer. 2007. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/news/notes/2007/np16/en/>>. Acesso em: 9 Feb. 2011.

WHO. Control of Chagas disease. WHO technical report Series 1991; 811:38-47.

WHO. Weekly epidemiological Record. No. 34, 2010, 85, 329–336.

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

ANEXO 1
CERTIFICADO DE COMITÊ DE ÉTICA



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
- C E T E A -

CERTIFICADO

Certificamos que o **Protocolo nº 143/2009**, relativo ao projeto intitulado "**Mineração genômica em *T. cruzi*: identificação de antígenos repetitivos em diferentes linhagens do parasito**", que tem como responsável(is) **Daniella Castanheira Bartholomeu**, está(ão) de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo **Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG)**, tendo sido aprovado na reunião de **9/ 09/2009**.

Este certificado expira-se em **9/ 09/ 2014**.

CERTIFICATE

We hereby certify that the **Protocol nº 143/2009**, related to the project entitled "**Mining the *T. cruzi* genome: identification of repeat antigens in different parasite strains**", under the supervisors of **Daniella Castanheira Bartholomeu**, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the **Ethics Committee in Animal Experimentation (CETEA/UFMG)**, and was approved in **September 9, 2009**.

This certificate expires in **September 9, 2014**.

Belo Horizonte, 30 de Novembro de 2009.

Prof. Humberto Pereira Oliveira
Coordenador do CETEA/UFMG

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 - Campus Pampulha
Unidade Administrativa II - 2º Andar, Sala 2005
31270-901 - Belo Horizonte, MG - Brasil
Telefone: (31) 3499-4516 - Fax: (31) 3499-4592
www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@pprc.ufmg.br

(Mod.Cert. v1.0)