

**Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós - Graduação em Parasitologia**

Tese de Doutorado

**Avaliação da eficácia de antígenos vacinais contra a
infecção de *Trypanosoma cruzi*, em camundongos
C57BL/6 α 1,3-galactosiltransferase knockout**

**Gisele Macêdo Rodrigues da Cunha
Belo Horizonte - MG
2020**

Gisele Macêdo Rodrigues da Cunha

**Avaliação da eficácia de antígenos vacinais contra a
infecção de *Trypanosoma cruzi*, em camundongos
C57BL/6 α 1,3-galactosiltransferase knockout**

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

Área de concentração: Protozoologia

Orientador: Dr. Alexandre Ferreira Marques

Co-Orientador: Dr. Fabrício Marcus Silva Oliveira

Laboratório de Imunoproteoma e Biologia de Parasitos

Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós - Graduação em Parasitologia
Belo Horizonte - MG
2020

043

Cunha, Gisele Macêdo Rodrigues da.

Avaliação da eficácia de antígenos vacinais contra a infecção de *Trypanosoma cruzi*, em camundongos C57BL/6 α 1,3-galactosiltransferase knockout [manuscrito] / Gisele Macêdo Rodrigues da Cunha. – 2020.
191 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Dr. Alexandre Ferreira Marques. Co-Orientador: Dr. Fabrício Marcus Silva Oliveira.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Parasitologia.

1. Parasitologia. 2. *Trypanosoma cruzi*. 3. Doença de Chagas. 4. Vacinas de Subunidades. 5. Resposta imune. I. Marques, Alexandre Ferreira. II. Oliveira, Fabrício Marcus Silva. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 576.88/.89



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICA
COLEGIADO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PARASITOLOGIA

FOLHA DE APROVAÇÃO

**TÍTULO: "AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DE ANTÍGENOS VACINAIS CONTRA A INFECÇÃO DO
TRYPANOSOMA CRUZI, EM CAMUNDONGOS C57BL/6 A1,3-GALACTOSILTRANSFERASE
KNOCKOUT".**

ALUNA: GISELE MACÊDO RODRIGUES DA CUNHA

Tese de Doutorado defendida e aprovada, no dia **15 de junho de 2020**, pela Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação Parasitologia da Universidade Federal de Minas Gerais constituída pelos seguintes doutores:

Jacqueline Araújo Fiúza

IRR/FIOCRU

Silvia Dantas Cangussu

UFOP

Luciana de Oliveira Andrade

UFMG

Luísa Mourão Dias Magalhães

UFMG

Fabício Marcus Silva Oliveira - Coorientador

UFMG

Alexandre Ferreira Marques - Orientador

UFMG

Belo Horizonte, 20 de julho de 2022.



Documento assinado eletronicamente por **Helida Monteiro de Andrade, Coordenador(a)**, em 20/07/2022, às 17:19, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1619679** e o código CRC **48B065BE**.

Referência: Processo nº 23072.243448/2022-91

SEI nº 1619679

COLABORADORES

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Instituto de Ciências Biológicas - Departamento de Parasitologia

Laboratório de Imunologia e Genômica de Parasitos

Dr. Ricardo Toshio Fujiwara
Dra. Denise Silva Nogueira
M.e. Marianna de Carvalho Clímaco

Laboratório de Biologia do *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas

Dr. Egler Chiari
Dra. Lúcia Galvão

Laboratório de Immunoproteoma e Biologia de Parasitos

Dra. Maíra Araújo Azevedo

UNIVERSIDAD DE SAN MARTIN DE PORRES

Facultad de Medicina Humana - Centro de Investigación en Infectología e Inmunología - Instituto de Investigación

Laboratorio de Enfermedades Infecciosas.

Dr. Edward Valencia Ayala

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

Facultad de Ciencias Biológicas - Escuela Profesional de Microbiología y Parasitología

Laboratorio de Parasitología en Fauna Silvestre y Zoonosis.

Dr. Juan Atilio Jimenez Chunga
M.e. Raul Jesus Ynocente La Valle

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE

Centro de Ciências da Saúde - Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas

Laboratório de Biologia de Parasitos e Doença de Chagas

Dr. Carlos Ramon do Nascimento Brito

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

Centro de Pesquisas René Rachou

Dr. Ricardo Gazzinelli

GEORGIA INSTITUTE OF TECHNOLOGY

School of Chemistry and Biochemistry

Dr. M. G. Finn
Dr. Carlos A. Sanhueza
Dr. Craig S. McKay

UNIVERSITY OF TENNESSEE

National Institute for Mathematical and Biological Synthesis

Dr. Clemente Aguilar

ST VINCENT HOSPITAL

Diretor Peter Cowan

Dr. Janda

SUPORTE FINANCEIRO

CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

AGRADECIMENTOS

A Deus, que ilumina minha vida.

À minha mãe Inez Morais Macêdo Cunha, meu pai Marcos Rodrigues da Cunha, às minhas irmãs Gabriela, Mariana e Janaina, minhas sobrinhas Ishamana, Hannah e Maria Valentina pelo incentivo, carinho e amor.

Ao André pelo companheirismo.

Ao meu orientador Dr. Alexandre Ferreira Marques pela oportunidade de poder desenvolver este trabalho junto ao seu grupo de pesquisa.

Ao meu co-orientador Dr. Fabrício Marcus Silva Oliveira por ter colaborado para o desenvolvimento deste trabalho com tanto empenho e dedicação.

Aos colaboradores Dr. Egler Chiari, Dra. Lúcia Galvão, Dr. Ricardo Toshio Fujiwara e demais pelo apoio fornecido, possibilitando o desenvolvimento deste trabalho.

Aos professores e funcionários da UFMG pelo excelente trabalho prestado, em especial ao Departamento de Pós - Graduação em Parasitologia, que tornou possível esta realização.

Aos amigos do Laboratório de Imunoproteoma e Biologia de Parasitos.

RESUMO

Até o presente momento, não existem vacinas disponíveis para a prevenção ou que contribuam com tratamento da doença de Chagas em seres humanos. Assim, buscamos avaliar a eficácia de peptídeos selecionados a partir das proteínas de superfície: TS e MASP, do epítipo α -Gal e suas associações (TS/MASP, TS/ α -Gal, MASP/ α -Gal e TS/MASP/ α -Gal), acoplados ao Q β -VLP, como antígenos vacinais contra a infecção pelo *Trypanosoma cruzi*, em camundongos C57BL/6 α 1,3galactosiltransferase knockout. Estes peptídeos apresentam epítipos que são reconhecidos por linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ de memória. Enquanto, o epítipo α -Gal é capaz de induzir uma forte ativação da resposta mediada por linfócitos B. Por tanto, a associação destes antígenos vacinais provavelmente pode fornecer resistência ao hospedeiro. Uma vez que, estudos já demonstraram que o controle da disseminação de *T. cruzi*, está associada a ativação simultânea de ambos os tipos de resposta adaptativa. Para a realização deste trabalho camundongos fêmeas adultas (5-10), que receberam 3 doses dos antígenos vacinais e suas associações foram inoculados com a cepa Y ou Colombiana. O efeito das vacinações na evolução da infecção foi avaliado através: dos níveis do parasitismo no sangue periférico e tecidos cardíacos, variações da massa corporal inicial e capacidade de sobrevivência. A eficácia das vacinações em prevenir o dano aos tecidos cardíacos associado à infecção, foi avaliada através da análise histopatológica semi-quantitativa do infiltrado celular, das alterações degenerativas e da hipertrofia das fibras musculares do coração. Os níveis de anticorpos IgG total e das citocinas IL-12p40, IFN- γ , IL-4 e IL-10 foram dosados durante a infecção, para avaliação da resposta imune adaptativa. Nossos resultados demonstraram que provavelmente estes antígenos e suas associações são capazes de induzir o desenvolvimento de uma resposta imune efetiva que provocou a redução da carga parasitária no sangue e da inflamação nos tecidos cardíacos durante a fase crônica, o que

conseqüentemente resultará em menores danos ao coração, fornecendo resistência ao hospedeiro. No entanto estes alvos vacinais apresentaram diferentes graus de proteção contra infecção pelo *T. cruzi*, onde a associação Q β -TS/MASP/ α -Gal demonstrou um melhor desempenho. Estes resultados reforçam a idéia de que a associação de antígenos capazes de induzir a ativação da resposta imune adaptativa, mediada tanto por linfócitos T (como os peptídeos TS e MASP), quanto por linfócitos B (como o epítipo α -Gal), provavelmente podem ser mais eficazes em fornecer resistência a infecção pelo *T. cruzi*.

Palavras chaves: Parasitologia, *Trypanosoma cruzi*, Doença de Chagas, Vacinas de Subunidades, Resposta imune.

ABSTRACT

To date, there are no vaccines available for prevention or that contribute to the treatment of Chagas disease in humans. Thus, we seek to evaluate the effectiveness of selected peptides from surface proteins: TS and MASP, from the α -Gal epitope and their associations (TS/ MASP, TS/ α -Gal, MASP/ α -Gal and TS/MASP/ α -Gal), coupled with Q β -VLP, as vaccine antigens against infection by *Trypanosoma cruzi*, in C57BL/6 α 1,3galactosyltransferase knockout mice. These peptides have epitopes that are recognized by CD4⁺ and CD8⁺ memory T lymphocytes. Whereas the α -Gal epitope can induce a strong activation of the B lymphocyte-mediated response. Therefore, the association of these vaccine antigens can probably provide resistance to the host. Since studies have already shown that the control of the spread of *T. cruzi* is associated with the simultaneous activation of both types of adaptive response. For this work, adult female mice (5-10), who received 3 doses of vaccine antigens and their associations, were inoculated with the Y or Colombiana strain. The effect of vaccinations on the evolution of the infection was assessed through the levels of parasitism in peripheral blood and cardiac tissues, variations in initial body mass and survivability. The efficacy of vaccinations in preventing cardiac tissue damage associated with infection was assessed through semi-quantitative histopathological analysis of cell infiltrate, degenerative changes, and hypertrophy of muscle fibers in the heart. The levels of total IgG antibodies and cytokines IL-12p40, IFN- γ , IL-4 and IL-10 were measured during infection, to assess the adaptive immune response. Our results demonstrated that these antigens and their associations are probably capable of inducing the development of an effective immune response that caused the reduction of the parasitic load in the blood and inflammation in the cardiac tissues during the chronic phase, which consequently will result in less damage to the heart, providing resistance to the host. However, these vaccine targets

showed different degrees of protection against *T. cruzi* infection, where the association Q β -TS/MASP/ α -Gal demonstrated a better performance. These results reinforce the idea that the association of antigens capable of inducing the activation of the adaptive immune response, mediated both by T lymphocytes (such as TS and MASP peptides) and by B lymphocytes (such as the α -Gal epitope), can probably be more effective in providing resistance to *T. cruzi* infection.

Key-words: Parasitology, *Trypanosoma cruzi*, Chagas Disease, Subunit Vaccines, Immune response.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Distribuição dos casos de doença de Chagas em 2009.....	31
Figura 2. Ciclo biológico de <i>T. cruzi</i>	33
Figura 3. Protocolo de vacinação, infecção pela cepa You Colombiana do <i>T. cruzi</i> e coleta de sangue.....	58
Figura 4. Intervalo de tempo em que a parasitemia foi acompanhada e os grupos avaliados foram eutanasiados após a infecção pela cepa Y.....	60
Figura 5. Intervalo de tempo em que a parasitemia foi acompanhada e os grupos avaliados foram eutanasiados após a infecção pela cepa Colombiana.....	61
Figura 6. Concentração de anticorpos IgG total reativos ao peptídeo selecionado a partir da proteína TS avaliados antes das vacinações (pré-vacinação), 5 dias após a 3ª dose (pré-infecção), 8 e 36 dias após a infecção (DPI) pela cepa Y de <i>T. cruzi</i> , no soro de camundongos C57BL/6 α 1,3GT-KO fêmeas (n=5-10).....	72
Figura 7. Concentração de anticorpos IgG total reativos ao peptídeo selecionado a partir da proteína MASP avaliados antes das vacinações (pré-vacinação), 5 dias após a 3ª dose (pré-infecção), 8 e 36 dias após a infecção (DPI) pela cepa Y de <i>T. cruzi</i> , no soro de camundongos C57BL/6 α 1,3GT-KO fêmeas (n=5-10).....	73

Figura 8. Concentração de anticorpos IgG total reativos ao epítipo α -Gal avaliados antes das vacinações (pré-vacinação), 5 dias após a 3^odose (pré-infecção), 8 e 36 dias após a infecção (DPI) pela cepa Y de *T. cruzi*, no soro de camundongos C57BL/6 α 1,3GT-KO fêmeas (n=5-10).....74

Figura 9 A, B e C. Concentração de anticorpos IgG total reativos ao peptídeo selecionado a partir da proteína TS em amostras de soro de camundongos que receberam doses de: Q β -TS, Q β -TS/MASP, Q β -TS/ α -Gal e Q β -TS/MASP/ α -Gal. (A) 5 dias após a 3^odose (pré-infecção). (B) 8 dias após a infecção (DPI). (C) 36 dias após a infecção (DPI).....76

Figura 9 D, E e F. Concentração de anticorpos IgG total reativos ao peptídeo selecionado a partir da proteína MASP em amostras de soro de camundongos que receberam doses de: Q β -MASP, Q β -TS/MASP, Q β -MASP/ α -Gal e Q β -TS/MASP/ α -Gal. (D) 5 dias após a 3^odose (pré-infecção), (E) 8 dias após a infecção (DPI) e (F) 36 dias após a infecção (DPI).....77

Figura 9 G, H e I. Concentração de anticorpos IgG total reativos ao epítipo α -Gal em amostras de soro de camundongos que receberam doses de: Q β - α -Gal, Q β -TS/ α -Gal, Q β -MASP/ α -Gal e Q β -TS/MASP/ α -Gal. (G) 5 dias após a 3^odose (pré-infecção). (H) 8 dias após a infecção (DPI). (I) 36 dias após a infecção (DPI).....78

Figura 10. Análise da curva de parasitemia, avaliada diariamente, do 5^o até 8^o ou 15^o dia após a infecção pela cepa Y do *T. cruzi*, em camundongos C57BL/6 α 1,3GT-KO fêmeas que receberam doses de Q β -controle e vacinados (n=5-10).....80

Figura 11. Análise do nível máximo de parasitos detectado por ml de sangue periférico, durante 15 dias após a infecção pela cepa Y do *T. cruzi*, em camundongos C57BL/6

α 1,3GT-KO fêmeas que receberam doses de Q β -controle e vacinados com: Q β -TS, Q β -MASP, Q β - α -Gal, Q β -TS/MASP, Q β -TS/ α -Gal, Q β -MASP/ α -Gal e Q β -TS/MASP/ α -Gal (n=5-10).....82

Figura 12. Análise quantitativa dos ninhos de amastigotas em secções dos corações de camundongos C57BL/6 α 1,3GT-KO fêmeas que receberam doses de Q β -controle e vacinados com: Q β -TS, Q β -MASP, Q β - α -Gal, Q β -TS/MASP, Q β -TS/ α -Gal, Q β -MASP/ α -Gal e Q β -TS/MASP/ α -Gal (n=5-10), infectados pela cepa Y de *T. cruzi*.....84

Figura 13 A. Análise da curva de variação da massa corporal inicial, avaliada antes da infecção pela cepa Y do *T. cruzi* e após, em intervalos de três dias, do 5° até 8° ou 36° dia, em camundongos C57BL/6 α 1,3GT-KO fêmeas que receberam doses de Q β -controle e vacinados com: Q β -TS, Q β -MASP, Q β - α -Gal, Q β -TS/MASP, Q β -TS/ α -Gal, Q β -MASP/ α -Gal e Q β -TS/MASP/ α -Gal (n=5-10).....87

Figura 13 B. Análise da curva de variação da massa corporal inicial, avaliada antes da infecção pela cepa Y do *T. cruzi* e após, em intervalos de três dias, do 5° até 8° ou 36° dia, em camundongos C57BL/6 α 1,3GT-KO fêmeas que receberam doses de Q β -controle e vacinados com: Q β -TS, Q β -MASP, Q β - α -Gal, Q β -TS/MASP, Q β -TS/ α -Gal, Q β -MASP/ α -Gal e Q β -TS/MASP/ α -Gal (n=5-10).....88

Figura 14. Análise semi-quantitativa do infiltrado inflamatório, em secções dos corações de camundongos C57BL/6 α 1,3GT-KO fêmeas que receberam doses de Q β -controle e foram vacinados com: Q β -TS, Q β -MASP, Q β - α -Gal, Q β -TS/MASP, Q β -TS/ α -Gal, Q β -MASP/ α -Gal e Q β -TS/MASP/ α -Gal (n=5-10), infectados pela cepa Y de *T. cruzi* e não infectados.....93

Figura 15. Fotomicrografia de corte histológico do coração de camundongos C57BL/6 α 1,3GT-KO, fêmeas que receberam doses de Q β -controle e foram vacinados, eutanasiados após 8 dias de infecção pela cepa Y de *T. cruzi*.....94

Figura 16. Fotomicrografia de corte histológico do coração de camundongos C57BL/6 α 1,3GT-KO, fêmeas que receberam doses de Q β -controle e foram vacinados, eutanasiados após 36 dias de infecção pela cepa Y de *T. cruzi*.....95

Figura 17. Análise semi-quantitativa das alterações degenerativas, em secções dos corações de camundongos C57BL/6 α 1,3GT-KO fêmeas que receberam doses de Q β -controle e foram vacinados com: Q β -TS, Q β -MASP, Q β - α -Gal, Q β -TS/MASP, Q β -TS/ α -Gal, Q β -MASP/ α -Gal e Q β -TS/MASP/ α -Gal (n=5-10), infectados pela cepa Y de *T. cruzi*.....97

Figura 18. Análise semi-quantitativa da hipertrofia das fibras musculares em secções dos corações de camundongos C57BL/6 α 1,3GT-KO fêmeas que receberam doses de Q β -controle e foram vacinados com: Q β -TS, Q β -MASP, Q β - α -Gal, Q β -TS/MASP, Q β -TS/ α -Gal, Q β -MASP/ α -Gal e Q β -TS/MASP/ α -Gal (n=5-10), infectados pela cepa Y de *T. cruzi*.....99

Figura 19. Avaliação do perfil de citocinas teciduais pró-inflamatórias IL-12p40 e IFN- γ em camundongos C57BL/6 α 1,3GT-KO fêmeas que receberam doses de Q β -controle e vacinados com: Q β -TS, Q β -MASP, Q β - α -Gal, Q β -TS/MASP, Q β -TS/ α -Gal, Q β -MASP/ α -Gal e Q β -TS/MASP/ α -Gal, infectados pela cepa Y de *T. cruzi* e não infectados (n=5-6 por grupo).....101

Figura 20. Avaliação do perfil de citocinas teciduais anti-inflamatórias/moduladoras IL-4 e IL-10 em camundongos C57BL/6 α 1,3GT-KO fêmeas que receberam doses de Q β -controle e vacinados com: Q β -TS, Q β -MASP, Q β - α -Gal, Q β -TS/MASP, Q β -TS/ α -Gal, Q β -MASP/ α -Gal e Q β -TS/MASP/ α -Gal, infectados pela cepa Y de *T. cruzi* e não infectados (n=5-6 por grupo).....102

Figura 21. Concentração de anticorpos IgG total reativos ao peptídeo selecionado a partir da proteína TS avaliados antes das vacinações (pré-vacinação), 5 dias após a 3^odose (pré-infecção), 22 e 190 dias após a infecção (DPI) pela cepa Colombiana de *T. cruzi*, no soro de camundongos C57BL/6 α 1,3GT-KO fêmeas (n=5-6).....104

Figura 22. Concentração de anticorpos IgG total reativos ao peptídeo selecionado a partir da proteína MASP avaliados antes das vacinações (pré-vacinação), 5 dias após a 3^odose (pré-infecção), 22 e 190 dias após a infecção (DPI) pela cepa Colombiana de *T. cruzi*, no soro de camundongos C57BL/6 α 1,3GT-KO fêmeas (n=5-6).....105

Figura 23. Concentração de anticorpos IgG total reativos ao epítipo α -Gal avaliados antes das vacinações (pré-vacinação), 5 dias após a 3^odose (pré-infecção), 22 e 190 dias após a infecção (DPI) pela cepa Colombiana de *T. cruzi*, no soro de camundongos C57BL/6 α 1,3GT-KO fêmeas (n=5-6).....106

Figura 24 A, B e C. Concentração de anticorpos IgG total reativos ao peptídeo selecionado a partir da proteína TS em amostras de soro de camundongos que receberam doses de: Q β -TS, Q β -TS/MASP, Q β -TS/ α -Gal e Q β -TS/MASP/ α -Gal. (A) 5 dias após a 3^odose (pré-infecção). (B) 22 dias após a infecção (DPI). (C) 190 dias após a infecção (DPI)..... 107

Figura 24 D, E e F. Concentração de anticorpos IgG total reativos ao peptídeo selecionado a partir da proteína MASP em amostras de soro de camundongos que receberam doses de: Q β -MASP, Q β -TS/MASP, Q β -MASP/ α -Gal e Q β -TS/MASP/ α -Gal. (D) 5 dias após a 3^odose (pré-infecção), (E) 22 dias após a infecção (DPI) e (F) 190 dias após a infecção (DPI).....108

Figura 24 G, H e I. Concentração de anticorpos IgG total reativos ao epítipo α -Gal em amostras de soro de camundongos que receberam doses de: Q β - α -Gal, Q β -TS/ α -Gal, Q β -MASP/ α -Gal e Q β -TS/MASP/ α -Gal. (G) 5 dias após a 3^odose (pré-infecção). (H) 22 dias após a infecção (DPI). (I) 190 dias após a infecção (DPI).....109

Figura 25 A. Análise da curva de parasitemia, avaliada diariamente, do 6^o até 22^o ou 46^o dia após a infecção pela cepa Colombiana do *T. cruzi*, em camundongos C57BL/6 α 1,3GT-KO fêmeas que receberam doses de Q β -controle e vacinados com: Q β -TS, Q β -MASP e Q β - α -Gal (n=5-6).....112

Figura 25 B. Análise da curva de parasitemia, avaliada diariamente, do 6^o até 22^o ou 46^o dia após a infecção pela cepa Colombiana do *T. cruzi*, em camundongos C57BL/6 α 1,3GT-KO fêmeas que receberam doses de Q β -controle e vacinados com as associações: Q β -TS/MASP, Q β -TS/ α -Gal, Q β -MASP/ α -Gal e Q β -TS/MASP/ α -Gal (n=5-6).....113

Figura 26. Análise do nível máximo de parasitos detectado por ml de sangue periférico, durante 46 dias após a infecção pela cepa Colombiana do *T. cruzi*, em camundongos C57BL/6 α 1,3GT-KO fêmeas que receberam doses de Q β -controle e vacinados com: Q β -TS, Q β -MASP, Q β - α -Gal, Q β -TS/MASP, Q β -TS/ α -Gal, Q β -MASP/ α -Gal e Q β -TS/MASP/ α -Gal (n=5-6).....115

Figura 27. Análise quantitativa dos ninhos de amastigotas em secções dos corações de camundongos C57BL/6 α 1,3GT-KO fêmeas que receberam doses de Q β -controle, Q β -TS, Q β -MASP, Q β - α -Gal, Q β -TS/MASP, Q β -TS/ α -Gal, Q β -MASP/ α -Gal e Q β -TS/MASP/ α -Gal (n=5-6), 22 dias após a infecção pela cepa Colombiana de *T. cruzi*.....117

Figura 28 A. Análise da curva de variação da massa corporal inicial, avaliada antes da infecção e após pela cepa Colombiana do *T. cruzi*, em intervalos de três dias, do 5° até 22° ou 190° dia, em camundongos C57BL/6 α 1,3GT-KO fêmeas que receberam doses de Q β -controle e vacinados com: Q β -TS, Q β -MASP, Q β - α -Gal, Q β -TS/MASP, Q β -TS/ α -Gal, Q β -MASP/ α -Gal e Q β -TS/MASP/ α -Gal.....120

Figura 28 B. Análise da curva de variação da massa corporal inicial, avaliada antes da infecção e após pela cepa Colombiana do *T. cruzi*, em intervalos de três dias, do 5° até 22° ou 190° dia, em camundongos C57BL/6 α 1,3GT-KO fêmeas que receberam doses de Q β -controle e vacinados com: Q β -TS, Q β -MASP, Q β - α -Gal, Q β -TS/MASP, Q β -TS/ α -Gal, Q β -MASP/ α -Gal e Q β -TS/MASP/ α -Gal..... 121

Figura 29. Análise semi-quantitativa do infiltrado inflamatório, em secções dos corações de camundongos C57BL/6 α 1,3GT-KO fêmeas que receberam doses de Q β -controle e que foram vacinados com: Q β -TS, Q β -MASP, Q β - α -Gal, Q β -TS/MASP, Q β -TS/ α -Gal, Q β -MASP/ α -Gal e Q β -TS/MASP/ α -Gal (n=5-6), infectados pela cepa Colombiana de *T. cruzi*.....124

- Figura 30.** Fotomicrografia de corte histológico do coração de camundongos C57BL/6 $\alpha 1,3GT-KO$, fêmeas que receberam doses de Q β -controle e foram vacinados, eutanasiados após 22 dias de infecção pela cepa Colombiana de *T. cruzi*.....125
- Figura 31.** Fotomicrografia de corte histológico do coração de camundongos infectados com a cepa Colombiana de *T. cruzi* e eutanasiados após 190 dias de infecção.....126
- Figura 32.** Análise semi-quantitativa das alterações degenerativas, em secções dos corações de camundongos C57BL/6 $\alpha 1,3GT-KO$ fêmeas que receberam doses de Q β -controle e que foram vacinados com: Q β -TS, Q β -MASP, Q β - α -Gal, Q β -TS/MASP, Q β -TS/ α -Gal, Q β -MASP/ α -Gal e Q β - TS/MASP/ α -Gal (n=5-6), infectados pela cepa Colombiana de *T. cruzi* e eutanasiados 22 dias após.....128
- Figura 33.** Análise semi-quantitativa da hipertrofia das fibras musculares, em secções dos corações de camundongos C57BL/6 $\alpha 1,3GT-KO$ fêmeas que receberam doses de Q β -controle e que foram vacinados com: Q β -TS, Q β -MASP, Q β - α -Gal, Q β -TS/MASP, Q β -TS/ α -Gal, Q β -MASP/ α -Gal e Q β - TS/MASP/ α -Gal (n=5-6), infectados pela cepa Colombiana de *T. cruzi*.....130
- Figura 34.** Avaliação do perfil de citocinas pró-inflamatórias IL-12p40 e IFN- γ no tecido cardíaco de camundongos C57BL/6 $\alpha 1,3GT-KO$ fêmeas que receberam doses de Q β -controle e vacinados com: Q β -TS, Q β -MASP, Q β - α -Gal, Q β -TS/MASP, Q β -TS/ α -Gal, Q β -MASP/ α -Gal e Q β -TS/MASP/ α -Gal, infectados pela cepa Colombiana de *T. cruzi* e não infectados (n=5-6 por grupo).....133

Figura 35. Avaliação do perfil de citocinas anti-inflamatórias/moduladoras IL-4 e IL-10 no tecido cardíaco de camundongos C57BL/6 α 1,3GT-KO fêmeas que receberam doses de Q β -controle e vacinados com: Q β -TS, Q β -MASP, Q β - α -Gal, Q β -TS/MASP, Q β -TS/ α -Gal, Q β -MASP/ α -Gal e Q β -TS/MASP/ α -Gal, infectados pela cepa Colombiana de *T. cruzi* e não infectados (n=5-6 por grupo).....135

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Descrição esquemática dos protocolos de vacinação dos camundongos.....	62
Tabela 2. Eficácia da vacinação com: Q β -TS, Q β -MASP, Q β - α -Gal, Q β -TS/MASP, Q β -TS/ α -Gal, Q β -MASP/ α -Gal e Q β -TS/MASP/ α -Gal, na supressão ou redução da mortalidade de camundongos C57BL/6 α 1,3GT-KO fêmeas, infectados pela cepa Y do <i>T. cruzi</i>	90

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

α -Gal - Epítipo Gal α 1-3Gal β 1-4GlcNAc-R

α 1,3GT- Enzima α -1,3-galactosiltransferase

α 1,3GT-KO - Camundongo α 1,3GT *knockout*

ANOVA - Análise de Variância

ASP-1 - *Amastigote Surface Protein-1*

ASP-2 - *Amastigote Surface Protein-2*

BSA - *Bovine Serum Albumin* (Albumina Sérica Bovina)

CEUA - Comitê de Ética no Uso de Animais

DC - Doença de Chagas

DNA - Ácido Desoxirribonucléico

DPI - Dias Pós-Infecção

DTU - *Discrete Typing Units*

E. coli - *Escherichia coli*

ELISA - *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (Ensaio Imunoenzimático)

EUA - Estados Unidos da America

GPI – Glicofosfatidilinositol

HAI - Reação de Hemaglutinação Indireta

IFN- γ - Interferon-Gamma

IgG - Imunoglobulina da classe G

kDNA-RFLP - *Restriction Fragment Length Polymorphism of Kinetoplast DNA*

Kg - Quilograma

LSSP-PCR - *Low Stringency Single Specific Primer*

MASPs - Família de Proteínas de Superfície Associadas à Mucina

mg – Miligrama

MHC - Complexo Principal de Histocompatibilidade (*Major Histocompatibility Complex*)

MHC-I - Complexo Principal de Histocompatibilidade de Classe I

MHC-II - Complexo Principal de Histocompatibilidade de Classe II

ml- Mililitro

mM - Milimolar

MS - Ministério da Saúde

nm - Nanômetros

OMS - Organização Mundial da Saúde

OPD - o-Fenilenodiamina

PBS1X - Solução Salina Tamponada com Fosfatos

PBS1X – BSA 1% - PBS1X contendo 1% de BSA

PBS1X–T 0,05% - PBS1X contendo Tween-20 a 0,05%

PCR - Reação da Polimerase em Cadeia

pH - Potencial Hidrogeniônico

Q β - Bacteriófago Q β

qPCR - Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativo

Q β -VLP - Bacteriófago Modificado Q β (*virus like particle*)

RAPD - *Random Amplification of Polymorphic DNA*

RIFI - Imunofluorescência Indireta

SEM - Erro Padrão da Média

T. cruzi - *Trypanosoma cruzi*

TcS - Família Trans-sialidases/Trans-sialidases *Like*

TESA - *Trypomastigote Excreted-Secreted Antigen* (Antígeno Secretado e Excretado de Tripomastigotas)

tGPI-mucinas - Mucinas de tripomastigotas ancoradas a GPI

TS - trans-sialidase com atividade enzimática

TS-epi - trans-sialidase com atividade enzimática expressa na forma epimastigota

UFMG - Universidade Federal de Minas Gerais

VLPs - *Virus Like Particle*

μl – Microlitro

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	31
1.1. Aspectos epidemiológicos da doença de Chagas e o ciclo biológico de <i>Trypanosoma cruzi</i>.....	31
1.2. Manifestações clínicas na doença de Chagas.....	34
1.3. Resposta imune na doença de Chagas.....	36
1.4. Diagnóstico na doença de Chagas.....	37
1.5. <i>Trypanosoma cruzi</i>: variabilidade intra-específica, proteínas de superfície da membrana e o epítipo α-galactosil (α-Gal)	39
1.5.1. Variabilidade intra-específica.....	39
1.5.2. Proteínas de superfície da membrana.....	41
i) Família de proteínas trans-sialidasas.....	41
ii) Família de proteínas de superfície associadas à mucina (MASP).....	43
1.5.3. Epítipo α-galactosil (α-Gal).....	44
1.6. Tratamento e vacinas na doença de Chagas.....	45
1.7. A utilidade do Bacteriófago modificado Qβ (Qβ-VLP) e do modelo experimental C57BL/6, depletados para os genes da enzima α1,3galactosiltransferase (α1,3GT-KO) para o desenvolvimento de vacinas contra o <i>T. cruzi</i>.....	49
1.7.1. Bacteriófago modificado Qβ (Qβ-VLP).....	49
1.7.2. Modelo experimental C57BL/6, depletados para os genes da enzima α1,3galactosiltransferase (α1,3GT-KO).....	50
2. JUSTIFICATIVA.....	52

3. OBJETIVOS.....	54
3.1. Objetivo Geral.....	54
3.2. Objetivos Específicos	54
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	56
4.1. Parasito.....	56
4.2. Modelo experimental.....	56
4.3. Preparo do bacteriófago modificado Qβ (Qβ-VLP) e sua ligação aos peptídeos selecionados a partir das proteínas: TS e MASP, ao epítopo α-Gal e a glucose.....	57
4.4. Fluxograma metodológico.....	57
4.5. Vacinação e infecção com <i>T. cruzi</i>.....	62
4.6. Dosagem dos níveis de anticorpos IgG total reativos aos peptídeos selecionados a partir das proteínas: TS, MASP e ao epítopo α-Gal por ELISA.....	63
4.7. Avaliação da parasitemia.....	64
4.8. Avaliação das variações na massa corporal.....	65
4.9. Avaliação do percentual de sobrevivência.....	65
4.10. Eutanásia.....	65
4.11. Análise histopatológica semi-quantitativa do infiltrado celular, das alterações degenerativas e hipertrofia, para avaliação das lesões no tecido muscular cardíaco e contagem dos ninhos de amastigotas por microscopia de campo claro.....	66
4.12. Quantificação dos níveis de citocinas teciduais pró-inflamatórias e anti-inflamatórias/moduladoras por ELISA.....	67
4.12.1. Extração de citocinas.....	67
4.12.2. Ensaio de imun absorção enzimática (ELISA).....	68

4.13.	Análise estatística dos dados.....	69
5.	RESULTADOS.....	71
5.1.	TÓPICO I: Eficácia dos peptídeos selecionados a partir das proteínas: TS e MASP, do epítoto α -Gal e das associações: TS/MASP, TS/ α -Gal, MASP/ α -Gal e TS/MASP/ α -Gal, acoplados ao Q β -VLP como antígenos vacinais contra a infecção pela cepa Y do <i>T. cruzi</i> , em camundongos C57BL/6 α 1,3GT-KO α -Gal.....	71
5.1.1.	Cinética da resposta imune humoral em camundongos vacinados e infectados.....	71
5.1.2.	Eficácia das vacinações no controle da infecção.....	78
5.1.2.1.	Níveis de parasitemia.....	78
5.1.2.2.	Parasitismo nos tecidos cardíacos.....	82
5.1.3.	Alterações na massa corporal e taxa de sobrevivência em camundongos vacinados durante a infecção experimental.....	84
5.1.4.	Eficácia das vacinações na prevenção do dano aos tecidos cardíacos associado à infecção pelo <i>T. cruzi</i>	91
5.1.5.	Perfil de citocinas teciduais em camundongos vacinados durante a infecção experimental.....	99
5.2.	TÓPICO II: Eficácia dos peptídeos selecionados a partir das proteínas: TS e MASP, do epítoto α -Gal e das associações: TS/MASP, TS/ α -Gal, MASP/ α -Gal e TS/MASP/ α -Gal, acoplados ao Q β -VLP como antígenos vacinais contra a infecção pela cepa Colombiana do <i>T. cruzi</i> , em camundongos C57BL/6 α 1,3GT-KO.....	103
5.2.1.	Cinética da resposta imune humoral em camundongos vacinados e infectados.....	103

5.2.2.	Eficácia das vacinações no controle da infecção.....	109
5.2.2.1.	Níveis de parasitemia.....	109
5.2.2.2.	Parasitismo nos tecidos cardíacos.....	115
5.2.3.	Alterações da massa corporal e taxa de sobrevivência em camundongos vacinados durante a infecção experimental.....	117
5.2.4.	Eficácia das vacinações na prevenção do dano aos tecidos cardíacos associado à infecção pelo <i>T. cruzi</i>	122
5.2.5.	Perfil de citocinas teciduais em camundongos vacinados durante a infecção experimental.....	131
6.	DISCUSSÃO.....	136
7.	CONCLUSÃO.....	151
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	152

1. INTRODUÇÃO

1.1. Aspectos epidemiológicos da doença de Chagas e o ciclo biológico de *Trypanosoma cruzi*

A doença de Chagas também conhecida como Tripanossomíase Americana é uma antroponose causada pelo parasito intracelular obrigatório flagelado *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), classificado dentro da ordem Kinetoplastida e da família Trypanosomatidae (Hoare, 1964). Este protozoário hemoflagelado é um organismo digenético, que se desenvolve em insetos hematófagos da família Reduviidae, em pequenos mamíferos de vida silvestre e em humanos (Chagas, 1909).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde, no ano de 2010, aproximadamente 6 a 7 milhões de indivíduos estavam infectados pelo *T. cruzi* em todo o mundo, ocorrendo cerca de 12.000 mortes a cada ano por complicações decorrentes da doença. Apesar da maioria desses casos se encontrarem em áreas endêmicas de 21 países da América Latina, nas últimas décadas tem-se observado um número crescente de casos fora destes locais, principalmente devido ao fluxo migratório de pessoas infectadas (**Fig.1**) (Organização Mundial de Saúde, 2010). Estima-se que aproximadamente 1 milhão de imigrantes nos Estados Unidos e na Europa têm a doença (Rassi et al., 2010).

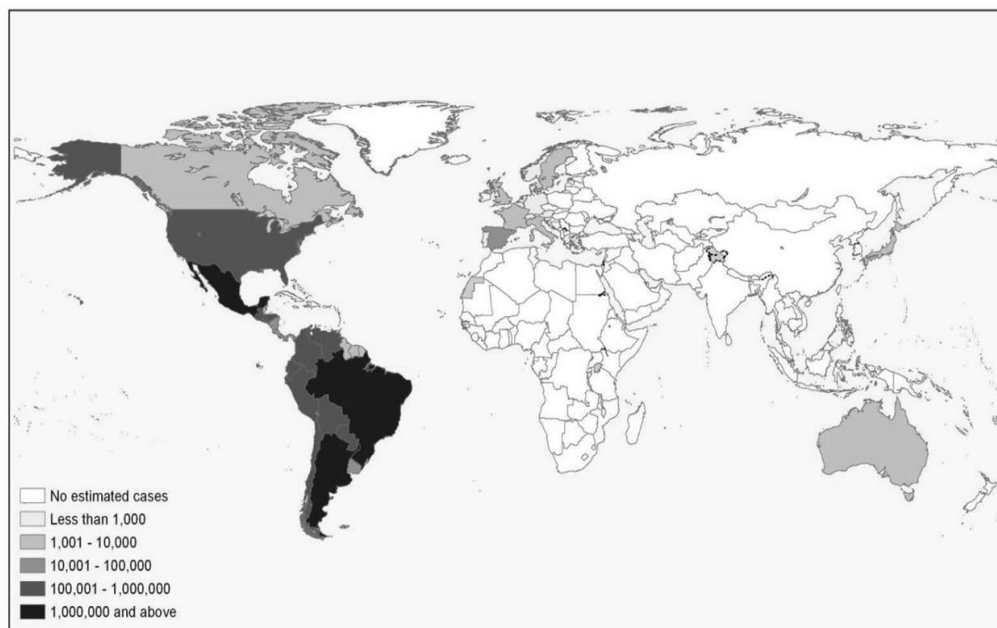


Figura 1. Distribuição dos casos de doença de Chagas em 2009. Fonte: Organização Mundial de Saúde, 2010.

A transmissão se dá pelo contato do protozoário presente nas excretas do vetor (triatomíneos hematófagos) com a pele lesionada ou mucosas do indivíduo, durante ou logo após o repasto sanguíneo (Chagas, 1909). Outras formas de contágio incluem: ingestão de alimentos contaminados, transfusão de sangue, transplante de órgãos ou tecidos, contato de material contaminado com a pele lesionada ou com mucosas e durante a gestação ou o parto. (Brener, 1984 e 1987; Nobrega et al., 2009).

A infecção humana inicia quando formas tripomastigotas metacíclicas de *T. cruzi* atingem a circulação sanguínea e posteriormente invadem qualquer célula nucleada. No citoplasma da célula parasitada, transforma-se em formas amastigotas, onde o parasito inicia uma série de divisões binárias (Andrews, 1990; Dvorak & Hyde, 1973). Quando a célula infectada está repleta de amastigotas, estas diferenciam em tripomastigotas, com crescimento de flagelos, lisam a célula hospedeira e são liberadas no meio extracelular (Low et al., 1992; De Souza, 2002). Estas formas podem atingir a corrente sanguínea e espalhar-se pelo organismo ou infectar células vizinhas (Storino & Milei, 1994).

O ciclo prossegue com as formas tripomastigotas sendo ingeridas por triatomíneos durante o repasto sanguíneo (Ley et al., 1988). No intestino médio do hospedeiro invertebrado, transformam-se em epimastigotas e sofrem divisão binária longitudinal (Billingsley & Downe, 1986). A partir do momento em que as epimastigotas atingem a extremidade posterior do intestino e o reto, convertem-se em tripomastigotas metacíclicas infectantes e não replicativas (Minning et al., 2009). Então se misturam com a urina e as fezes e são liberadas durante repasto sanguíneo (**Fig.2**) (Jimenez, 2014).

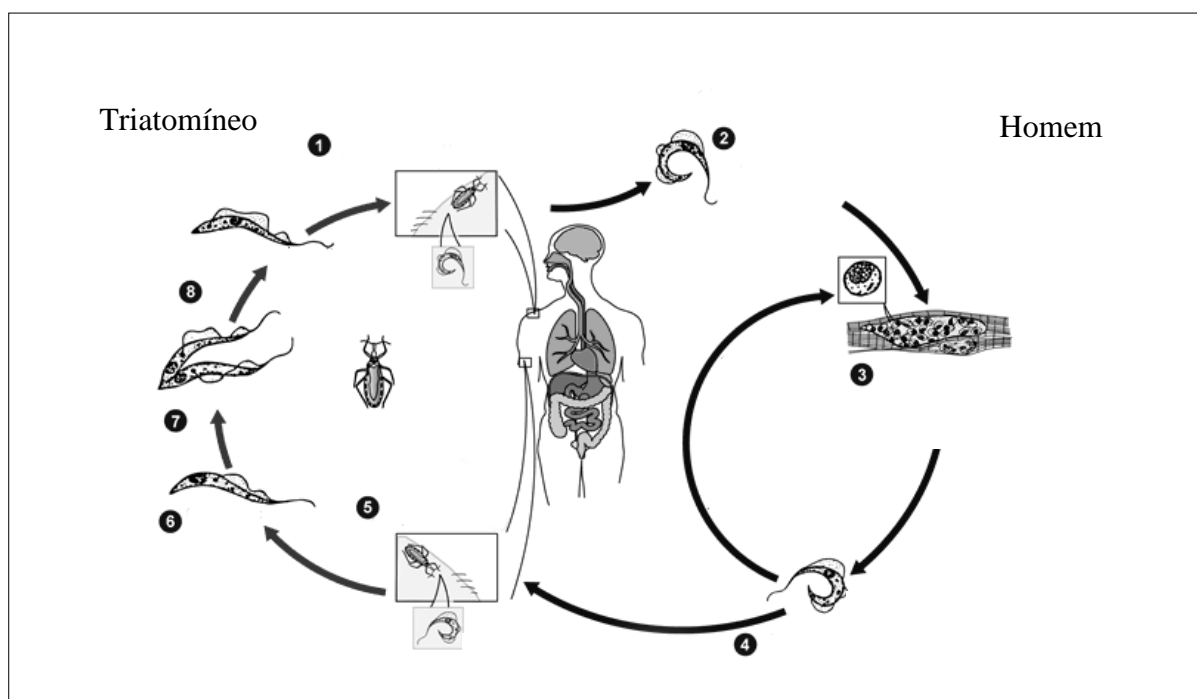


Figura 2. Ciclo biológico de *T. cruzi*: **1** O inseto vetor triatomíneo infectado, durante o repasto sanguíneo elimina nas fezes formas tripomastigotas metacíclicas de *T. cruzi*, que penetram no hospedeiro humano através do ferimento provocado pela picada ou pelas mucosas intactas. **2** As formas tripomastigotas metacíclicas invadem as células nucleadas, diferenciam-se nas formas intracelulares amastigotas. **3 e 4** As formas amastigotas multiplicam-se, diferenciam-se em tripomastigotas, são liberadas na circulação sanguínea e vão infectar novas células. **5** O triatomíneo infecta-se ao ingerir sangue de um hospedeiro contendo os parasitos circulantes. **6 e 7** As formas tripomastigotas ingeridas transformam-se em epimastigotas no intestino médio do inseto vetor, que se multiplicam. **8** No intestino posterior e no reto o parasito se diferencia na forma infectante, tripomastigota metacíclica que se mistura com a urina e as fezes. Fonte: modificado de <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx>, 2019.

1.2. Manifestações clínicas na doença de Chagas

De modo geral, reconhecem-se três fases clínicas distintas na doença de Chagas que são: aguda, crônica indeterminada e crônica determinada (Rocha et al., 2009). A fase aguda inicia-se após cerca de sete a dez dias de incubação do parasito (Bahia- Oliveira et al., 1988). Esta fase apresenta curso clínico de curta duração, presença de níveis geralmente elevados da parasitemia sanguínea, reações inflamatórias nos tecidos parasitados, sinais e sintomas quase sempre inespecíficos e é reconhecida somente em 1 a 2% dos casos (Bahia- Oliveira et al., 1988; Coura & Dias, 2009). As manifestações clínicas mais comuns são: febre, cefaléia, mal-estar, mialgia, astenia, calafrios, apatia, edema nos membros inferiores ou na face, taquicardia, hepatoesplenomegalia, ascite e enfartamento ganglionar, o que dificulta o diagnóstico precoce da infecção (Andrade, 1958). Náusea, vômitos, diarreia e epigastralgia intensa são comuns em casos em que ocorreu a transmissão oral (Ministério da Saúde, 2009). Em casos de transmissão vetorial, podem ocorrer sinais de porta de entrada: sinal de Roman (edema bpalpebral unilateral) ou chagoma de inoculação (Laranja et al., 1948; Andrade, 1958).

Entre quatro e dez semanas, as manifestações clínicas agudas regridem e inicia-se a fase crônica assintomática, que pode persistir por dez a vinte anos ou por toda a vida do paciente (Lopes et al., 1982). Nesta fase se torna difícil a demonstração do parasito no sangue circulante, mas é possível sua detecção nos tecidos (Lopes et al., 1982). Esta fase é caracterizada pela ausência de sintomas e/ou sinais da doença, eletrocardiograma convencional normal, coração, esôfago e cólon radiologicamente normais e exame sorológico e/ou parasitológico positivo para doença de Chagas (Lopes et al., 1982). Cerca de 20% a 30% dos pacientes infectados podem evoluir para uma das formas crônicas sintomáticas da doença de Chagas (Lopes et al., 1982).

O paciente que desenvolve a forma cardíaca pode apresentar manifestações clínicas variáveis, que podem incluir desde arritmias a sintomas e sinais de insuficiência cardíaca compensada ou descompensada, o que pode provocar sua morte súbita. Essa forma é considerada responsável pela maior causa de morbidade e óbitos na doença de Chagas crônica (Coura et al., 1983; Dias, 1992). Aqueles pacientes que desenvolvem a

forma digestiva, apresentam evidências de acometimento do aparelho digestivo, como dilatações e alterações funcionais principalmente no esôfago e no cólon, provocadas pela destruição das células nervosas do sistema entérico e da instalação de fibrose (Tafari, 1970; Tafari, 1987; Dias, 1992). Já a forma nervosa ocorre somente em pacientes imunocomprometidos, comprometendo tanto o sistema nervoso central (SNC) como o periférico. O paciente pode vir a desenvolver distúrbios motores e/ou sensoriais, déficit cognitivo e apresentar alterações eletroencefalográficas (Mangone et al., 1994; Prost et al., 2000). A forma mista é caracterizada pela ocorrência concomitante de lesões compatíveis com as manifestações provocadas pelas formas clínicas anteriormente mencionadas. (Prata, 2001).

Os mecanismos imunopatogênicos responsáveis pela formação das lesões durante a fase crônica da doença de Chagas ainda não são totalmente compreendidos. (Dias, 2000). No entanto, duas hipóteses que se complementam têm sido mais aceitas entre os pesquisadores para explicar a patologia nesta fase da doença (Cunha-Neto et al., 1995; Kalil e Cunha-Neto, 1996; Tarleton e Zhang, 1999; Tarleton, 2001; Tarleton, 2003).

Uma hipótese que a resposta inflamatória patogênica é dirigida aos antígenos de *T. cruzi* em locais de persistência do parasito (Tarleton 2001). E é apoiada por estudos que demonstraram a associação da presença de *T. cruzi* com o desenvolvimento das lesões cardíacas e digestivas, através de utilização de técnicas mais sensíveis para detecção de parasitos como a imuno-histoquímica e a reação em cadeia da polimerase (PCR) (Vago et al., 2000; Schijman et al., 2004; Benvenuti et al., 2008). A outra hipótese alega que a doença de Chagas crônica é autoimune, estando o processo de formação das lesões severas em grande parte dos pacientes chagásicos durante esta fase, associado a presença de anticorpos ou linfócitos T autorreativos derivados do mimetismo molecular entre epítomos antigênicos do parasito e do hospedeiro (Anselmi *et al.*, 1966; Cossio *et al.*, 1974; Teixeira *et al.*, 1978; Kalil & Cunha-Neto 1995, Kierszenbaum, 1999; Leon *et al.*, 2001).

1.3. Resposta imune na doença de Chagas

O desenvolvimento de uma resposta imunológica capaz de controlar a replicação do parasito, especialmente na fase aguda da doença de Chagas, está associada com as citocinas pró-inflamatórias: Interleucina-12 (IL-12), Interferon-gama (IFN- γ) e Fator de necrose tumoral-alpha (TNF- α). As citocinas IL-12 e TNF- α produzidas principalmente por macrófagos e células dendríticas em resposta a infecção pelo *T. cruzi*, induz a produção de IFN- γ por linfócitos T ativados e células *Natural Killer* (NK) (Gutierrez et al., 2009; Paiva et al., 2009; Talvani & Teixeira, 2011). O IFN- γ exerce uma ação sinérgica com TNF- α induzindo a expressão da enzima iNOS (óxido nítrico sintase induzível), catalizadora da síntese de óxido nítrico pelos macrófagos infectados, promovendo a eliminação do parasito. Além de ativar células do sistema mononuclear fagocitário, o IFN- γ também estimula a liberação de quimiocinas para o recrutamento de novas células para o sítio da infecção (Gutierrez et al., 2009; Paiva et al., 2009; Talvani & Teixeira, 2011).

Entre as subpopulações de linfócitos T ativados CD4+, os linfócitos do tipo T *helper* 1 (Th1) é que atuam na destruição intracelular de parasitos, através da síntese de IFN- γ . Enquanto os linfócitos do tipo T *helper* 2 (Th2) induzem a produção de anticorpos líticos protetores por linfócitos B (Brenner, 1986; Mosmann et al., 1986). A subpopulação de linfócitos do tipo T *helper* 17 (Th17) também está relacionada com os mecanismos de defesa, por sintetizarem citocinas como Interleucina-17 (IL-17) e Interleucina-22 (IL-22) (Aggarwal et al., 2003, Murphy et al., 2003). Já linfócitos do tipo T reguladores (Treg), desempenham um papel fundamental na manutenção e controle de uma resposta imune exacerbada ao sintetizarem principalmente as citocinas Interleucina-10 (IL-10) e Fator de transformação do crescimento beta (TGF- β) (Chen et al., 2003; Sakaguchi et al., 2006). Os linfócitos T CD4+ também auxiliam na ativação de linfócitos T CD8+, que além de produzirem IFN- γ e outras citocinas que estimulam células do sistema imunológico, limita a infecção por reconhecer e matar células infectadas, através de mecanismos citotóxicos (de Alencar et al., 2009; Junqueira et al., 2010).

Assim, durante a fase aguda da doença de Chagas células da resposta imune inata e adaptativa trabalham em conjunto para impedir a replicação do parasito, controlando a parasitemia patente. No entanto, a falta de modulação dessa resposta contínua, com alta expressão de citocinas pró-inflamatórias, posteriormente acaba sendo patogênica provocando as lesões das formas crônicas sintomáticas (Dutra et al., 2009). Estudos demonstraram que pacientes com a forma crônica indeterminada apresentam esta capacidade de modulação da resposta inflamatória, mecanismo essencial para que a resposta imune não se torne exacerbada e provoque danos teciduais severos, causando alterações anatomoclínicas. Estes indivíduos produzem tanto citocinas pró-inflamatórias como TNF- α e IFN- γ , quanto elevados níveis de citocinas anti-inflamatórias como a IL-10, desenvolvendo uma resposta imune eficaz e controlada (Souza et al., 2004; Araujo et al., 2007; Araujo et al., 2012; Dutra et al., 2014). O contrário é observado em pacientes com a forma cardíaca da doença. Estudos demonstraram que estes indivíduos apresentam uma predominância de citocinas pró-inflamatórias em relação a IL-10, e relataram que o infiltrado inflamatório presente no miocárdio destes pacientes é composto por linfócitos T CD8+, citocinas como TNF- α e IFN- γ e moléculas citotóxicas, como perforina e granzima A (Higuchi, 1999, Dutra et al., 2009). Em pacientes que desenvolveram a forma crônica digestiva da doença, também foi observado uma exacerbção da resposta inflamatória, com a presença de níveis elevados de citocinas como TNF- α , Interleucina - 1 beta (IL-1 β), Interleucina - 6 (IL-6) e alta frequência de linfócitos T CD4+, células NK, mastócitos, macrófagos e eosinófilos. (D'Avila Reis et al., 2001; Da Silveira et al., 2007, Dutra et al., 2009).

1.4. Diagnóstico na doença de Chagas

Durante a fase aguda da doença de Chagas há um elevado número de formas tripomastigotas na circulação periférica do indivíduo, permitindo a identificação direta do parasito no sangue. Desta forma, o diagnóstico da infecção durante essa fase é dado por meio dos métodos parasitológicos como: o exame direto do sangue ou liquor, lâmina

corada de gota espessa, esfregaço, métodos de concentração (*Strout*, microhematócrito ou creme leucocitário) e hemocultura (Ministério da Saúde, 2013).

Na doença de Chagas crônica métodos de diagnóstico parasitológicos são insatisfatórios pois, esta fase é caracterizada pela baixa parasitemia. No entanto, apresenta uma elevada produção de anticorpos imunoglobulina G (IgG) anti-*T. cruzi*, por isso o indicado é que o diagnóstico seja realizado pela detecção de anticorpos específicos contra o parasito (Organização Mundial da Saúde, 2002; Dias et al., 2016). Por tanto, as técnicas mais comumente utilizadas para a realização do diagnóstico nesta fase são: a reação de imunofluorescência indireta (RIFI), o ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) e o teste de hemaglutinação indireta (HAI) (Rrassi et al., 2012; Bern, 2015; Balouz, et al., 2017; Santos et al., 2017). O resultado só é considerado positivo, quando no mínimo dois métodos de análise distintos ou de diferentes preparações de antígenos são reativos (Organização Mundial de Saúde, 2002; Dias et al., 2016).

No entanto, os testes sorológicos disponíveis atualmente muitas vezes quando realizados apresentam resultados discordantes, com o soro do paciente sendo considerado reativo apenas por um dos métodos utilizados. O problema da sorodiscordância ocorre principalmente entre indivíduos com baixas concentrações de anticorpos anti-*T. cruzi* e torna o diagnóstico da doença de Chagas crônica inconclusivo (Otani et al., 2009). Estes testes também têm a sua especificidade limitada, podendo haver reação cruzada com outros tripanosomatídeos, como a *Leishmania* sp. e *Trypanosoma rangeli* (Araújo, 1986; Silveira et al., 2001; Caballero et al., 2007). Além disso, não são bons métodos para avaliar a eficácia do tratamento aplicado, pois menos de 10% dos pacientes chagásicos crônicos apresentam reversão da sorologia positiva após o tratamento anti-*T. cruzi* (Gomes et al., 2009).

O diagnóstico molecular por amplificação de genes específicos através da PCR (polymerase chain reaction) ou PCR em tempo real tem sido utilizado de maneira complementar aos diagnósticos parasitológico e sorológico. Este método é considerado um teste promissor, por ser altamente sensível e fornecer resultados em um curto espaço de tempo (Luquetti & Rassi, 2000).

1.5. *Trypanosoma cruzi*: variabilidade intra-específica, proteínas de superfície da membrana e o epítipo α -galactosil (α -Gal)

1.5.1. Variabilidade intra-específica

O *T. cruzi* é um parasito muito complexo que apresenta uma alta variabilidade genética, exibindo assim um amplo grupo de cepas com grande variação intraespecífica (Murta & Romanha, 1999; Macedo et al., 2004; Machado et al., 2006), que estão distribuídas entre diferentes espécies de insetos vetores e hospedeiros mamíferos domésticos e silvestres (Zingales et al., 1998). Esta elevada diversidade genética apresentada pelo *T. cruzi* foi comprovada por diferentes estudos que empregaram: técnicas de análises de isoenzimas (Miles et al., 1977; 1978; 1980), kDNA-RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism of Kinetoplast DNA*) (Morel et al., 1980), LSSP-PCR (*Low Stringency Single Specific Primer- Polymerase Chain Reaction*) (Vago et al., 1996), RAPD (*Random Amplification of Polymorphic DNA*) (Steindel et al., 1993), amplificação do gene do mini-éxon (região do espaçador não transcrito) e do gene 24S α rDNA (*Ribosomal DNA*) (região divergente na porção terminal 3') (Souto et al., 1996).

Perante a grande variedade de trabalhos desenvolvidos abordando a caracterização de subpopulações de *T. cruzi* com o objetivo de definir subgrupos deste parasito, surgiu a necessidade de padronizar uma classificação genética que seria utilizada por todos os pesquisadores. Por tanto foi adotada a divisão de *T. cruzi* em sete unidades de tipagem discretas (DTUs), denominadas TcI a TcVI e TcBat (Zingales et al., 2009; 2012). A infecção humana provocada por parasitos classificados dentro da DTU-TcI se concentra na América Central e no norte da América do Sul e está associado a casos agudos (Miles et al., 1981; Añez et al., 2004; Coura, 2007; Marcili et al., 2009 a, b; Valente et al., 2009; Llewellyn et al., 2009b ; Alarcón de Noya et al., 2010; Cura et al., 2010; Zingales et al., 2012), a cardiomiopatia chagásica (Bosseno et al., 2002; Montilla et al., 2002; Añez et al., 2004; Higo et al., 2004; Sánchez-Guillén et al., 2006; Coura, 2007; Zingales et al., 2012) e a complicações no sistema nervoso central e meningoencefalite em indivíduos imunocomprometidos (Zingales et al., 2012). No entanto existem isolados selvagens no Alabama nos Estados Unidos (Roellig et al., 2008)

e em Limarí no Chile (Apt et al., 1987). Membros desta divisão podem estar relacionados tanto ao ciclo silvestre quanto ao doméstico e são os mais amplamente dispersos e abundantes nas Américas. Podem ser encontrados em todos os principais gêneros de insetos triatomíneos e em 52 gêneros de mamíferos, sendo vistos com mais frequência nas ordens: Marsupialia, Rodentia, Primata, Chiroptera, Xenartha, Carnivora e Artiodactyla (Zingales et al., 2012).

A DTU-TcII é encontrada predominantemente nas regiões sul e central da América do Sul, onde está associada com a ocorrência concomitante de lesões compatíveis com as formas cardíaca e digestiva da doença de Chagas crônica. E tem sido isolada principalmente de ciclos de transmissão doméstica (Luquetti et al., 1986; Freitas et al., 2005; Lages-Silva et al., 2006; Zingales et al., 2012).

A DTU-TcIII está associada principalmente ao ciclo silvestre no Brasil e países vizinhos. As infecções humanas documentadas por parasitos membros desta divisão são raras (Llewellyn et al., 2009a; Marcili et al., 2009a; Zingales et al., 2012). No entanto, a DTU-TcIV embora mostre um padrão de distribuição semelhante na América do Sul estando ausente na região do Chaco, ocorre com frequência em humanos sendo a segunda divisão mais descrita na Venezuela (Miles et al., 1981; Zingales et al., 2012).

Estudos comparativos que utilizaram técnicas de biologia molecular, comprovaram que as DTUs: TcV e TcVI são similares e híbridas das DTUs: TcII e TcIII (Sturm et al., 2003; Sturm & Campbell, 2010). Membros destas duas divisões, também foram associadas com a ocorrência concomitante de lesões compatíveis com as formas cardíaca e digestiva da doença de Chagas crônica, na região sul e central da América do Sul e nunca foram isolados no meio silvestre (Luquetti et al., 1986; Freitas et al., 2005; Lages-Silva et al., 2006; Zingales et al., 2012).

A DTU-Tcbat foi identificada previamente em morcegos e está associada principalmente ao ciclo silvestre (Zingales et al., 2012; Brenière et al., 2016). Não se sabe ainda em qual inseto vetor os parasitos classificados dentro desta divisão se desenvolvem, no entanto suspeita-se que seja em espécies de triatomíneos encontradas em refúgios de morcegos, ou cimicídeos, vetores de *Trypanosoma dionisii* na Europa, ou ectoparasitos

de morcegos (Cavazzana et al., 2010). Somente recentemente foi relatada em seres humanos (Marcili et al., 2009; Cavazzana et al., 2010; Ramirez et al., 2014).

1.5.2. Proteínas de superfície da membrana

O tripanossomatídeo *T. cruzi* expressa na superfície de sua membrana uma grande variedade de proteínas. A expressão destas moléculas de superfície é modificada de acordo com o ambiente que o parasito é exposto, durante o seu ciclo de vida (Pech-Canul, et al., 2017). Diferentes estudos realizados para elucidar as funções que estas proteínas exercem, concluíram que muitas destas moléculas são cruciais para o processo de interação com o hospedeiro, desempenhando um papel fundamental durante a adesão e invasão de células, na adaptação, diferenciação e evasão do parasito no decorrer do seu ciclo de vida. O que indica que a capacidade de sobrevivência de *T. cruzi* no hospedeiro em parte está relacionada a composição diversificada da sua superfície (Schenkman et al., 1994; Di Noia et al., 1995; Santos et al., 1997; Acosta-Serrano et al., 2001; Kawashita et al., 2009; Bartholomeu et al., 2009).

Estas proteínas foram classificadas de acordo com suas características dentro de famílias nas quais as: mucinas, trans-sialidases, TcGP63 (*T. cruzi* GP63), amastinas, TcTASV (proteínas ricas em alanina, serina e valina em tripomastigota), MASPs (proteínas de superfície associadas à mucina) e cruzipains, atualmente são conhecidas como as mais abundantes e/ou relevantes durante o ciclo de vida do parasito (Pech-Canul, et al., 2017). Muitos membros destas famílias são expressos em formas tripomastigotas infectantes (Atwood et al., 2005) e podem induzir a ativação da resposta imune inata e/ou adaptativa no hospedeiro humano, o que as torna alvos em potencial para tratar ou mesmo impedir o processo de infecção (Ropert et al., 2002, Santos et al., 1997; Wizek et al., 1997; Martin et al., 2006).

i) Família de proteínas trans-sialidases

A família de proteínas trans-sialidases é altamente polimórfica, embora todos os seus integrantes compartilhem o motivo VTVxNVxLYNR (Schenkman et al., 1994).

Estudos sugerem que além de grande parte de seus membros desenvolverem um papel crucial durante o processo de infecção celular, a alta variação e a co-expressão destas proteínas exibidas durante o ciclo de vida do parasito, poderiam distribuir a resposta imune do hospedeiro. E assim, evitariam o desenvolvimento de uma resposta adquirida eficiente, contribuindo para o processo de evasão do sistema imune (Reina-San-Martin et al., 2000).

As proteínas que fazem parte desta família foram divididas em grupos de I a IV, estando envolvidos na sua expressão 1.430 genes incluindo 693 pseudogenes (Moraes Barros et al., 2012). A similaridade de sequências apresentadas entre estas moléculas e suas propriedades funcionais foram empregados como parâmetros para estabelecer esta classificação (Pech-Canul, et al., 2017).

O grupo I é composto pelas proteínas: *T. cruzi* neuraminidase (TCNA), antígeno disperso de fase aguda (SAPA), expressas na forma tripomastigota e trans-sialidase-epimastigota (TS-epi), expressa na forma epimastigota (Affranchino et al., 1989; Pitcovsky et al., 2001). Estas proteínas realizam a transferência do ácido siálico presente nas células do hospedeiro, para mucinas presentes na membrana plasmática das formas tripomastigotas (Pereira, et al., 1980; Zingales, et al., 1987) ou para a água (Schenkman, et al., 1991; Prioli, et al., 1990). O processo de sialilação confere ao *T. cruzi* uma superfície carregada negativamente que protege as formas tripomastigotas extracelulares de serem eliminadas por anticorpos anti- α -galactosil (anti- α -Gal) (Previato et al., 1985; Frasc, 2000; Vercelli et al., 2005; Mucci et al., 2006). E também está envolvido no escape do vacúolo parasitóforo para o citoplasma da célula parasitada pelas formas tripomastigotas metacíclicas, sendo importante para a internalização do parasito (Rubin-de-Celis, et al., 2006).

O grupo II é formado pelas proteínas: ASP-1 (proteína de superfície amastigota 1), ASP-2 (proteína de superfície amastigota 2), TSA-1 (antígeno de superfície tripomastigota 1), Tc85 (glicoproteína 85 kDa), SA85 (Sialidase 85 kDa), GP82 (glicoproteína 82 kDa) e GP90 (glicoproteína 90 kDa), expressas nas formas tripomastigota e amastigota. As proteínas deste grupo apresentam diversas funções na interação parasito-hospedeiro, especificamente na adesão e invasão da célula hospedeira

(Ouaisi, et al., 1988; Colli, 1993; Colli & Alves, 1999).

O grupo III é constituído pelas proteínas: CRP (proteína regulatória do complemento), FL-160 (proteína associado ao flagelo 160), CEA (exoantígeno da face crônica) e TESA (antígeno secretado e excretado de tripomastigota), presentes na superfície de formas tripomastigotas sanguíneas (Correa, et al., 2013). A TESA é distribuída na membrana da superfície celular de *T. cruzi* (Berrizbeitia, et al., 2006; Matsumoto, et al., 2002) enquanto CRP, FL-160 e CEA são proteínas de membrana associadas aos flagelos (Norris, et al., 1997; Cetron, et al., 1992). Essas proteínas inibem as vias clássica e alternativa de ativação do complemento, protegendo as formas tripomastigotas contra a lise (Correa, et al., 2013; Matsumoto, et al., 2002; Colli, 1993; Campetella, et al., 1992; Kipniset, et al., 1981).

O grupo IV é composto por proteínas de superfície de formas tripomastigotas cuja função biológica ainda é desconhecida (Pech-Canul, et al., 2017).

ii) Família de proteínas de superfície associadas à mucina (MASP)

A família de proteínas MASPs é composta por glicoproteínas ancoradas por glicosilfosfatidilinositol (GPI) expressas na superfície de *T. cruzi*, que podem ser secretadas para o meio extracelular (Atwood et al., 2005; Bartholomeu et al., 2009; Bayer-Santos et al., 2013; Serna et al., 2014). Seus membros contêm domínios conservados nos terminais N e C que codificam um peptídeo sinal e um sítio de adição de âncora de GPI, respectivamente. No entanto apresentam uma região central altamente variável e repetitiva (El-Sayed, et al., 2005). Estudos sobre o genoma de *T. cruzi* demonstraram que 1.377 genes e 433 pseudogenes estão envolvidos na sua expressão, correspondendo aproximadamente 6% do genoma diplóide do parasito (Arner E, et al., 2007).

As proteínas que fazem parte desta família são os antígenos mais abundantes encontrados na superfície de formas tripomastigotas de *T. cruzi* (Bartholomeu et al., 2009; Serna et al., 2014), podendo ser expressas também em formas amastigotas e epimastigotas (Atwood et al., 2005; Bayer-Santos et al., 2013). Esta excessiva expressão

na superfície destas formas evolutivas sugere que algumas destas proteínas desempenham um papel biológico importante na sobrevivência e multiplicação do parasito.

Diferentes estudos propuseram que a enorme variabilidade de sequências, expressas na superfície das formas tripomastigotas de proteínas que pertencem a família MASP, podem estar ajudando a formar um grande repertório de peptídeos. Que podem interagir com diferentes receptores celulares, estando assim associadas com processos que envolvem adesão e infecção (Chuenkova & Pereira Perrin 2004; Bartholomeu et al., 2009).

Além disso, estudos também têm sugerido que a alta variação e a co-expressão de membros desta família, podem mediar tanto respostas imunológicas independentes de células T específicas, como não específicas e estar relacionadas com a promoção da ativação de linfócitos B policlonais. O que pode difundir a resposta imune, impedindo o desenvolvimento de uma resposta específica e neutralizante contra o parasito e sua completa eliminação. Podendo estes fenômenos estarem fazendo parte dos mecanismos de evasão do sistema imune do hospedeiro, utilizado pelo *T. cruzi*. (Reina-San-Martin et al., 2000 ; Minoprio, 2001 ; Gao et al., 2002 ; dos Santos et al., 2012).

1.5.3. Epítipo α -galactosil (α -Gal)

A superfície de formas tripomastigotas, amastigotas e epimastigotas de *T. cruzi* também é revestida por glicoproteínas tais como mucinas ancoradas a GPI, que exibem o resíduo terminal não redutor α -galactosil, altamente imunogênico (Souto-Padron et al., 1994). Este carboidrato denominado epítipo α -Gal apresenta a estrutura química: Gal α 1-3Gal β 1-4GlcNAc-R (Schocker et al., 2016), e é sintetizado pela enzima α 1,3-galactosiltransferase (α 1,3GT) dentro do complexo de Golgi (Blanken & Van den Eijnden, 1985).

Protozoários como *Leishmania spp.* (Avila, Rojas & Galili, 1989), *Plasmodium falciparum* (Ramasamy & Rajakaruna, 1997), *Trypanosoma brucei* (Pingel et al., 1999), assim como células de mamíferos não primatas e de macacos da América do Norte, Central e Sul, também o expressam na superfície de sua membrana. No entanto, está

ausente em macacos da Europa, Ásia e África, símios e humanos (Galili et al., 1987; Galili et al., 1988).

O epítopo α -Gal, estimula uma elevada produção de anticorpos anti- α -Gal em humanos infectados pelo *T. cruzi*, tanto na fase aguda, quanto crônica da doença (Travassos & Almeida, 1993; Almeida et al., 1994; Soares et al., 2012; Izquierdo et al., 2013). Estes anticorpos anti- α -Gal ligam-se aos epítomos α -Gal na superfície de *T. cruzi* e induzem a lise do parasito mediada pelo complemento, contribuindo para o combate a infecção (Towbin et al., 1987; Travassos & Almeida, 1993).

Recentemente, um estudo realizado por Portillo et al. (2019) apontou este carboidrato como um alvo para o desenvolvimento de uma vacina contra o *T. cruzi*. Outros estudos também demonstraram que a vacinação com este antígeno induz proteção considerável contra diferentes espécies de *Plasmodium* (Yilmaz et al., 2014) e *Leishmania* (Iniguez et al., 2017; Moura et al., 2017).

1.6. Tratamento e vacinas na doença de Chagas

Atualmente o Nifurtimox e o Benznidazol são os únicos medicamentos que obtiveram sucesso no tratamento humano da doença de Chagas (Dias, 2006). No entanto, diferentes estudos demonstraram variações na eficácia terapêutica destes fármacos de acordo com a fase da doença. Ensaio clínicos demonstraram que ambas as drogas têm atividade significativa durante a fase aguda, causando cura parasitológica em até 80% dos pacientes que foram tratados precocemente (Guedes et al., 2006). Enquanto o tratamento apresenta pequena ou nenhuma atividade quando realizado na fase crônica tardia da doença, com índices de cura variando entre 0% e 19,1% (Lana et al., 2009; Fernades et al., 2009; Ferreira et al., 2002; Braga et al., 2000; Lauria-Pires et al., 2000; Fabbro et al., 2000; Viotti et al., 1994; Ferreira, 1990). Além disso, a capacidade que o tratamento realizado com estes medicamentos durante a fase aguda tem de prevenir o desenvolvimento das formas crônicas da doença, é ainda uma questão que precisa ser elucidada (Silveira et al., 2000).

Estes fármacos também possuem eficácia terapêutica variável de acordo com a metodologia utilizada para verificação da cura, a dose, o tempo do tratamento, a idade e origem geográfica do paciente (Guedes et al., 2006). As diferenças genéticas entre as populações de parasitos e de hospedeiros vertebrados e invertebrados, presentes nas distintas regiões geográficas também influenciam na resposta ao tratamento (Andrade et al., 1992). Temos que considerar ainda que, os medicamentos são altamente tóxicos e provocam uma serie de reações adversas, tem pouca atividade em pacientes imunossuprimidos, requerem posologia por períodos muito longos e um alto custo (Boscardin et al., 2010). Por tanto, os baixos índices de cura detectados na fase crônica associados a gravidade dos efeitos colaterais provocados pelo tratamento, fazem com que muitos médicos optem por não tratar os indivíduos chagásicos crônicos (Urbina & Docampo, 2003).

Assim, diante deste cenário é necessário o desenvolvimento de novos fármacos e de estratégias terapêuticas alternativas para o tratamento da doença de Chagas (Urbina, 2009). Desta forma, a utilização terapêutica de vacinas pode ser uma alternativa para melhorar a eficácia do tratamento atual e assim, proporcionar um melhor prognóstico para o paciente (Rodríguez-Morales et al., 2015).

Além da quimioterapia, uma vacina pode fornecer uma medida preventiva adequada para controlar a disseminação da doença (Arce-fonseca et al., 2015; Rodríguez-morales et al., 2015). Uma vez que, a presença de espécies de insetos vetores difíceis de serem controladas por inseticidas ou resistentes ao tratamento dificultam a realização do controle vetorial, que é a principal forma de combate à infecção pelo *T. cruzi* em áreas endêmicas (Schofield et al., 2006). E ainda devemos considerar que as rotas de transmissão secundárias: como as transfusões, transplantes, o contágio por via congênita e oral, que consistem nas principais formas de infecção em locais fora das áreas endêmicas ou onde a presença do inseto vetor foi controlada, são difíceis de serem contidas. Além de exigirem altos investimentos para a realização de triagem laboratorial dos doadores de sangue e órgãos (Coura & Viñas, 2010).

Uma vacina profilática ideal no caso da doença de Chagas, provavelmente seria aquela capaz de ser reconhecida simultaneamente por linfócitos T (CD4+, CD8+) e B de

memória, provocando assim durante a infecção a ativação sistemática tanto da resposta imune celular, quanto da imunidade humoral. Uma vez que estudos realizados demonstraram que a resistência a infecção pelo *T. cruzi* está associada a ativação simultânea de ambos os tipos de respostas (Krautz et al., 2000; Bhatia et al., 2004; Tarleton et al., 2005; Rodrigues et al., 2009).

O papel desempenhado pelas células T CD4⁺ na defesa, pode estar relacionada com a ativação imunológica de macrófagos infectados e com a destruição intracelular de parasitos por células do tipo Th1, produtoras de IFN- γ . E no caso de células Th2, com a indução da produção de anticorpos líticos protetores por células B (Brenner, 1986). Enquanto, os linfócitos T CD8⁺ específicos além de também produzirem IFN- γ e outras citocinas que estimulam células do sistema imunológico (Travassos & Almeida, 1993), promovem resistência à infecção pelo *T. cruzi* através de sua atividade citotóxica direta mediada por perforina, que limita a infecção por reconhecer e matar células infectadas (de Alencar et al., 2009; Junqueira et al., 2010).

Porém, para uma vacina ser realmente eficiente contra a doença de Chagas tem que possuir epítomos capazes de serem reconhecidos por toda a população humana, que apresenta um alto grau de polimorfismo do MHC (complexo principal de histocompatibilidade) e esta resposta precisa ser eficaz contra as diferentes cepas de *T. cruzi* existentes. Por tanto este alto grau de variação e a escassez de informações sobre as proteínas expressas na superfície celular do parasito em diferentes estágios, cepas e linhagens filogenéticas, dificulta o desenvolvimento de uma vacina contra a doença de Chagas (Rodrigues et al., 2009).

Ao longo dos anos, diferentes antígenos como: proteínas recombinantes, purificadas e DNA, lisados, extratos, formas atenuadas ou mortas, de *T. cruzi* ou de micro-organismo, já foram testados quanto à sua eficácia no controle da infecção. No entanto, a maioria destes forneceram parcial ou nenhuma proteção (Rodríguez-Morales et al., 2015). Porém, recentemente carboidratos (Portillo et al., 2019) e proteínas (Pech-Canul et al., 2017) expressos na superfície da membrana de *T. cruzi* têm sido apontados como potenciais candidatos para tratar, ou mesmo prevenir, o processo de infecção.

Estudos demonstraram que a proteína trans-sialidase (TS), poderia ser um importante alvo vacinal, uma vez que seus epítomos são reconhecidos por linfócitos T CD8⁺ de memória, células envolvidas no desenvolvimento de formas severas da doença em mecanismos modulados por IFN- γ (Araújo et al., 2007; Fiúza et al., 2009). Recentemente uma vacina quimérica denominada Traspain, contendo domínios desta proteína e da ASP2, mostrou ter a capacidade de ativar células T CD4⁺ e CD8⁺, controlar a disseminação do parasito e de prevenir o dano tecidual durante a fase crônica em diferentes modelos experimentais murino de infecção pelo *T. cruzi* (Sanchez Alberti. et al., 2017). As proteínas Tc24 (proteína flagelar ligada ao cálcio) e TSA-1, quando testadas também como antígenos vacinais, ambas como proteínas recombinantes, apresentaram um desempenho semelhante no controle da infecção e na capacidade de ativação da resposta adaptativa celular (Villanueva-Lizama et al., 2018).

Membros da família MASP também vêm sendo considerados valiosos alvos para o desenvolvimento de vacinas, para tratar ou mesmo prevenir o processo de infecção, pois possuem vários epítomos que apresentam afinidade por moléculas do *Major Histocompatibility Complex* (MHC) de classe I e II (Nakayasu et al., 2012). Um peptídeo com sobreposição de epítomos capazes de ativar células T e B, selecionado a partir de um membro desta família, já foi testado como antígeno vacinal em um modelo experimental murino de infecção pelo *T. cruzi*. Os resultados apresentados pelo estudo foram promissores, as vacinações reduziram a mortalidade, a carga parasitária e induziram o desenvolvimento de uma resposta imune mediada por células T CD4⁺ e CD8⁺ (Serna et al., 2014).

Outro candidato vacinal que foi apontado por um estudo realizado recentemente é o epítomo α -Gal, como mencionado anteriormente. A vacinação com este antígeno induziu uma forte resposta humoral mediada por anticorpos anti- α -Gal específicos e também provocou redução na carga parasitária e mortalidade em um modelo experimental murino durante a infecção pelo parasito (Portillo et al., 2019).

1.7. A utilidade do Bacteriófago modificado Q β (Q β -VLP) e do modelo experimental C57BL/6, depletados para os genes da enzima α 1,3galactosiltransferase (α 1,3GT-KO) para o desenvolvimento de vacinas contra o *T. cruzi*

1.7.1. Bacteriófago modificado Q β (Q β -VLP)

Um grande desafio enfrentado por pesquisadores no desenvolvimento de vacinas que utilizam moléculas antigênicas muito pequenas como os peptídeos, é que embora consigam se ligar aos receptores dos linfócitos T e B, estas moléculas não apresentam a capacidade de ativá-los. Assim, existe a necessidade de inseri-las a estruturas carreadoras antes das vacinações para melhorar a sua exposição ao sistema imune. Por tanto, a utilização de plataformas estáveis, de fácil obtenção, que apresentam um número elevado de locais de conjugação, como as partículas virais (*virus like particle* - VLPs), é uma alternativa promissora para o desenvolvimento de vacinas terapêuticas ou profiláticas (Schwarz & Douglas, 2015; Hovlid et al., 2014; Fiedler et al., 2012; Patel & Swartz, 2011; Keller et al., 2010; Johnson et al., 2007; Ashcroft et al., 2005; Kozlovská et al., 1993).

Dentre as partículas virais (*virus like particle* - VLPs) mais comumente utilizadas destacam-se as proteínas de revestimento do bacteriófago Q β . Um membro da família Leviviridae, constituído por um capsídeo icosaédrico de 180 subunidades de proteínas que formam um dímero interdigitado com domínios α -hélice sobre regiões adjacentes de folha β (Brown, et al., 2009; Fiedler et al., 2012; Schwarz & Douglas, 2015). Suas proteínas de revestimento podem ser consideradas excelentes estruturas carreadoras, pois podem receber em sua superfície diferentes moléculas antigênicas, tornando possível a exposição de mais de um tipo de antígeno ao sistema imune ao mesmo tempo (Kozlovská et al., 1993, Patel & Swartz, 2011; Hovlid et al., 2014).

Essas partículas também são eficazes em induzir uma potente resposta imune mediada por células T e B, devido à grande quantidade de moléculas antigênicas que podem receber em sua superfície e serem apresentadas ao sistema imunológico (Keller et al., 2010). Além disso, não transportam material genético perdendo a sua capacidade replicativa, não sendo assim infecciosas (Schwarz & Douglas, 2015). Podem ser

produzidas de forma recombinante, em grande escala, mantendo suas características moleculares frente a: variações de temperatura, potencial hidrogeniônico (pH), composição do solvente (Ashcroft et al., 2005; Johnson et al., 2007) e durante os processos de modificações químicas (Fiedler et al., 2012), o que torna sua aplicação muito viável.

O bacteriófago modificado Q β (Q β -VLP), já foi utilizado em ensaios clínicos em humanos, sendo empregado como plataforma para uma vacina contra o vírus H1N1 (Low et al., 2014), a dependência de nicotina (Maurer et al., 2005) e para reduzir a pressão arterial sanguínea, através da vacinação com um peptídeo derivado da angiotensina II (Ambühl et al., 2007). Em estudos realizados com modelos experimentais murinos, foi utilizado para construir vacinas para prevenção de doenças inflamatórias (Spohn et al., 2007), para tratamento da obesidade (Fulurija et al., 2008) e da aterosclerose (Tissot et al., 2013). Também já foi relatado, o uso do bacteriófago modificado Q β (Q β -VLP), como plataforma para a apresentação de antígenos associados a tumores (Yin et al., 2013). Além disso, foi utilizado em estudos que procuravam avaliar a eficácia de antígenos vacinais contra a infecção por *Plasmodium vivax* (Alves et al., 2017) e que buscavam investigar a imunogenicidade da proteína circunsporozoíta (CSP) de *Plasmodium falciparum* (Khan et al., 2015).

1.7.2. Modelo experimental C57BL/6, depletados para os genes da enzima α 1,3galactosiltransferase (α 1,3GT-KO)

A resposta imune desencadeada após a infecção pelo *T. cruzi* em mamíferos não primatas e macacos do novo mundo não se assemelha à gerada por humanos. Estes animais expressam na superfície de suas células o epítipo α -Gal, não sendo capazes de desenvolver uma resposta humoral que produz em abundância anticorpos anti- α -Gal. Assim, estudos que utilizam estes animais como modelos experimentais de infecção pelo *T. cruzi*, podem não esclarecer a participação dos mecanismos protetores desencadeados por estes anticorpos contra o parasito (Almeida et al., 1991; Gazzinelli et al., 1991; González et al., 1995; LaTemple & Galili, 1998; Chiang et al., 2000).

Os camundongos da linhagem C57BL/6, depletados para os genes da enzima

α 1,3galactosiltransferase (α 1,3GT-KO), são incapazes de sintetizar o epítipo α -Gal (Galili, 1991). Recentemente, diferentes trabalhos demonstraram que estes animais representam um modelo experimental útil para o desenvolvimento de estudos que buscam testar a eficácia de antígenos vacinais contra doença de Chagas. Uma vez que mimetizam a resposta imune humoral humana, na produção de altos títulos de anticorpos anti- α -Gal, quando infectados pelo *T. cruzi* (Portillo et al., 2019; Ayala et al., 2020).

2. JUSTIFICATIVA

Até o presente momento, não existem vacinas disponíveis para a prevenção ou que contribuam com tratamento da doença de Chagas em seres humanos. Levando em consideração este cenário, buscamos avaliar a eficácia como antígenos vacinais de peptídeos sintéticos, selecionados a partir de proteínas expressas na superfície de *T. cruzi* e suas associações com o epítopo α -Gal, acoplados ao bacteriófago modificado Q β (Q β -VLP).

Estes peptídeos foram selecionados através de ferramentas de imunoinformática, pelo Instituto Nacional de Matemática e Síntese Biológica (NIMBioS, Universidade do Tennessee, Knoxville, EUA), por um estudo prévio realizado pelo Dr. Alexandre Ferreira Marques em colaboração com o Dr. Clemente Aguilar. Porém, as eficácias como antígenos vacinais em um modelo experimental murino de infecção pelo *T. cruzi*, até então não foram testadas por nenhum outro estudo.

O peptídeo selecionado a partir da proteína TS e o outro obtido a partir de um membro da família MASP, avaliados neste estudo, são considerados potenciais candidatos a uma vacina contra a infecção pelo *T. cruzi*, por apresentarem epítopos que são reconhecidos por linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ de memória. Por tanto, provavelmente podem induzir a ativação de uma resposta imune adaptativa mediada por linfócitos T durante a infecção, que forneça resistência ao hospedeiro.

Além disso, buscamos avaliar a eficácia dos peptídeos selecionados a partir da proteína TS e MASP, associados ao epítopo α -Gal. Visto que, imunizações com antígenos capazes de induzir a ativação da resposta imune adaptativa, mediada tanto por linfócitos T (como estes peptídeos), quanto por linfócitos B (como o epítopo α -Gal), provavelmente podem ser mais eficazes em fornecer resistência a infecção pelo *T. cruzi*. Uma vez que, estudos já demonstraram que o controle da disseminação do parasito, está associada a ativação simultânea de ambos os tipos de respostas imunes.

Estes antígenos foram sintetizados e acoplados ao bacteriófago modificado Q β (Q β -VLP) pelo Dr. Finn, M. G. do Instituto de Tecnologia da Georgia (Atlanta, Georgia, EUA). Esta partícula viral foi escolhida como estrutura carreadora por ser eficaz em

induzir uma potente resposta imune mediada por células T e B, devido à grande quantidade de moléculas antigênicas que podem receber em sua superfície, que leva ao aumento do número de epítopos que são apresentados ao sistema imunológico. Além disso, é segura por não ser infecciosa, é altamente estável, mantendo suas características moleculares frente a alterações físicas e químicas e pode ser produzida de forma recombinante, em grande escala, o que torna sua aplicação muito viável. Outro aspecto importante que foi levado em consideração na escolha desta partícula viral como estrutura carreadora, é que esta plataforma vem sendo utilizada em vacinas construídas para uso em humanos.

Camundongos da linhagem C57BL/6 depletados para os genes da enzima α 1,3galactosiltransferase (α 1,3GT-KO) foram utilizados como modelo experimental, por mimetizarem a resposta imune humoral humana na produção de altos títulos de anticorpos anti- α -Gal, quando previamente infectados pelo *T. cruzi*. Portanto, são excelentes modelos experimentais para estudos que buscam testar a eficácia de antígenos vacinais contra a doença de Chagas.

Deste modo, este estudo que utiliza camundongos que simulam a resposta imune humana na produção de anticorpos anti- α -Gal como modelo experimental, e antígenos capazes de ativar simultaneamente a resposta adaptativa celular e humoral destes, pode ser um importante passo para o desenvolvimento de uma vacina profilática eficaz contra infecção pelo *T. cruzi*.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Avaliar a eficácia de antígenos vacinais, acoplados ao bacteriófago modificado Q β (Q β -VLP), contra a infecção pelas cepas Y e Colombiana do *Trypanosoma cruzi*, em camundongos C57BL/6 α 1,3galactosiltransferase knockout (α 1,3GT-KO).

3.2. Objetivos Específicos

- Avaliar a resposta imune humoral, através da dosagem dos níveis de anticorpos IgG total no soro, antes e após a infecção experimental pelo *T. cruzi*, reativos aos peptídeos sintéticos selecionados a partir das proteínas: TS, MASP e ao epítipo α -Gal usados nas vacinações dos camundongos.
- Analisar o efeito da vacinação com os peptídeos sintéticos selecionados a partir das proteínas: TS e MASP, com o epítipo α -Gal e as associações TS/MASP, TS/ α -Gal, MASP/ α -Gal e TS/MASP/ α -Gal sobre a evolução da infecção experimental pelo *T. cruzi*, através da avaliação da carga parasitária no sangue e nos tecidos cardíacos.
- Avaliar as alterações na massa corporal e a capacidade de sobrevivência, em camundongos vacinados com os peptídeos sintéticos selecionados a partir das proteínas: TS e MASP, com o epítipo α -Gal e as associações TS/MASP, TS/ α -Gal, MASP/ α -Gal e TS/MASP/ α -Gal, durante a infecção experimental pelo *T. cruzi*.
- Analisar o efeito da vacinação com os peptídeos sintéticos selecionados a partir das proteínas: TS e MASP, com o epítipo α -Gal e as associações TS/MASP,

TS/ α -Gal, MASP/ α -Gal e TS/MASP/ α -Gal sobre a evolução das lesões cardíacas, após a infecção experimental pelo *T. cruzi*, através da quantificação do infiltrado inflamatório, das alterações degenerativas e hipertrofia.

- Determinar o perfil de citocinas teciduais pró-inflamatórias e anti-inflamatórias/moduladoras, em camundongos vacinados com os peptídeos sintéticos selecionados a partir das proteínas: TS e MASP, com o epítipo α -Gal e as associações TS/MASP, TS/ α -Gal, MASP/ α -Gal e TS/MASP/ α -Gal, durante a infecção experimental pelo *T. cruzi*.
- Verificar a ocorrência do efeito sinérgico da vacinação entre as diferentes associações entre os peptídeos sintéticos selecionados a partir das proteínas: TS, MASP e o epítipo α -Gal.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Parasito

As formas tripomastigotas da cepa Y ou Colombiana de *T. cruzi* utilizadas nos procedimentos, foram cedidas pelos colaboradores Dr. Egler Chiari e Dra. Lucia Galvão. A cepa Y de *T. cruzi* – DTU II (Zingales et al., 2009) foi isolada de um paciente na fase aguda da doença de Chagas por Pereira de Freitas, em 1950, em Marília, São Paulo e posteriormente estudada e descrita por Silva e Nussenzweig (1953). A cepa Colombiana de *T. cruzi* - DTU I (Zingales et al., 2009) foi isolada de um paciente na Colômbia e posteriormente estudada e descrita por Federici et al. (1964).

4.2. Modelo experimental

Foram utilizados camundongos (*Mus musculus*) da linhagem C57BL/6, depletados para o gene da enzima α 1,3-galactosiltransferase (α 1,3GT-KO), fêmeas com idade entre 6 a 8 semanas. Os camundongos foram doados pelo Diretor Peter Cowan, Hospital São Vicente, Austrália e Dr. Janda, Scripps, Estados Unidos e são criados e mantidos no biotério da Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Parasitologia. Em condições apropriadas de temperatura e umidade, os camundongos foram alojados em caixas de polipropileno de 30,3 x 19,3 x 12,6 cm com 3-5 camundongos cada, com ciclos controlados de 12 horas de presença e ausência de luz, recebendo ração comercial específica para a espécie (Presense/Archer Daniels Midland Company) e água *ad libitum*.

Todos os experimentos foram aprovados e conduzidos de acordo com as diretrizes do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Minas Gerais (protocolo nº 255/2013).

4.3. Preparo do bacteriófago modificado Q β (Q β -VLP) e sua ligação aos peptídeos selecionados a partir das proteínas: TS e MASP, ao epítipo α -Gal e a glucose

A produção do bacteriófago modificado Q β (Q β -VLP) preparado para ser utilizado como estrutura carreadora, a síntese e a ligação dos peptídeos selecionados a partir das proteínas: TS e MASP, do epítipo α -Gal e da glucose a estas estruturas foi realizada em colaboração com o Dr. M. G. Finn, do Departamento de Química e Bioquímica, do Instituto de Tecnologia da Geórgia, Atlanta, Geórgia, EUA. Após os bacteriófagos Q β serem isolados de culturas a partir do sistema de expressão em *Escherichia coli*, estas partículas foram preparadas conforme o método descrito por Fiedler et al. (2010), envolvendo a instalação de um ligante curto terminado em azida na superfície do capsídeo. Os peptídeos selecionados a partir das proteínas: TS e MASP, o epítipo α -Gal e a glucose sintetizados foram então ligados covalentemente ao bacteriófago modificado Q β (Q β -VLP) por ligação azida/alcino (Hong et al., 2009). Uma média de 28 e 34 unidades dos peptídeos selecionados a partir das proteínas: TS e MASP e 180 unidades do epítipo α -Gal e da glucose, foram ligadas por partícula, respectivamente. De acordo com a análise por espectrometria de massa, a estrutura do capsídeo permaneceu intacta e altamente estável para armazenamento em longo prazo.

4.4. Fluxograma metodológico

Camundongos C57BL/6 α 1,3GT-KO fêmeas foram divididos em 9 grupos experimentais. Os camundongos foram vacinados com três doses, em intervalos de sete dias, que continham os peptídeos selecionados a partir das proteínas: TS e MASP, o epítipo α -Gal e as associações TS/MASP, TS/ α -Gal, MASP/ α -Gal, TS/MASP/ α -Gal, acoplados ao Q β -VLP. Como grupo controle infectado não vacinado, foram utilizados camundongos que receberam doses do carboidrato glucose também acoplado Q β -VLP (Q β -controle). Uma semana após receberem a última dose de vacinação, os camundongos foram infectados pela cepa Y ou Colombiana do *T. cruzi* (**Fig. 3**).

A avaliação da resposta humoral desenvolvida pelos camundongos após serem

submetidos a vacinação e durante a infecção, foi realizada através da dosagem dos níveis de anticorpos IgG total reativos aos peptídeos selecionados a partir das proteínas: TS, MASP e ao epítipo α -Gal por ELISA. Para isso, amostras de sangue foram coletadas a partir da mandíbula dos camundongos, na veia facial, antes da inoculação da primeira dose da vacina ou do Q β -controle, cinco dias após os camundongos receberem a terceira dose e por punção cardíaca, após a infecção, quando foram eutanasiados (**Figs. 3, 4 e 5**).

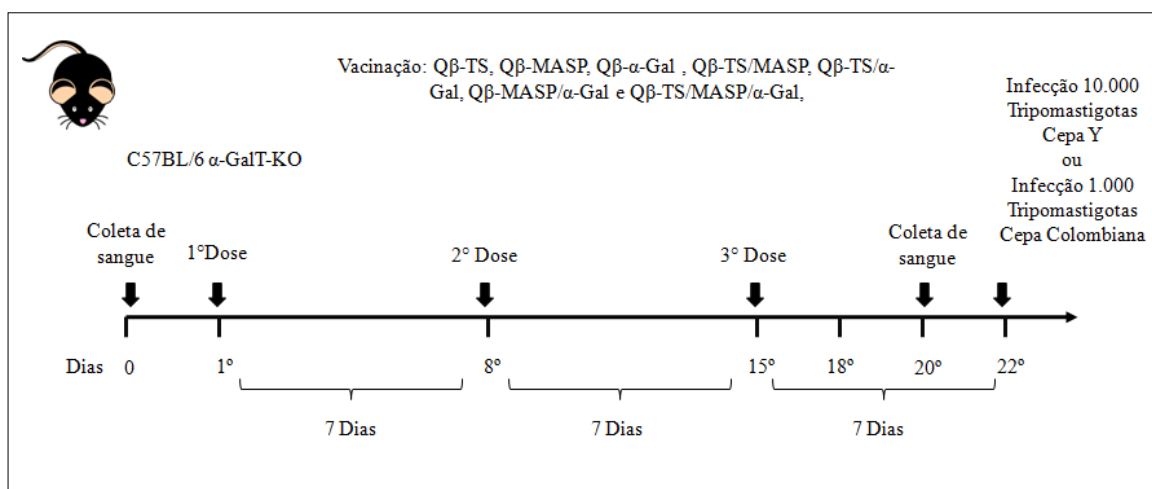


Figura 3. Protocolo de vacinação, infecção pela cepa You Colombiana do *T. cruzi* e coleta de sangue.

A parasitemia dos grupos experimentais, infectados pela cepa Y, foi avaliada diariamente, a partir do 5º até 15º dia após a infecção, exceto nos experimentos em que os camundongos foram eutanasiados no 8º dia de infecção, durante a fase aguda da doença (**Fig. 4**). Enquanto os níveis de parasito por ml de sangue periférico, dos grupos experimentais, infectados pela cepa Colombiana, foram avaliados em intervalos de 1 dia, a partir do 6º até 46º dia após a infecção, exceto nos experimentos em que os camundongos foram eutanasiados no 22º dia de infecção, durante a fase aguda da doença (**Fig. 5**).

A massa corporal e a capacidade de sobrevivência dos camundongos infectados foram acompanhadas, até o momento da eutanásia. Camundongos vacinados com os peptídeos selecionados a partir das proteínas: TS, MASP, com o epítipo α -Gal e com as associações TS/MASP, TS/ α -Gal, MASP/ α -Gal, TS/MASP/ α -Gal, acoplados ao Q β -

VLP, infectados pela cepa Y foram eutanasiados em intervalos de tempo: 8 e 36 dias após a infecção, durante a fase aguda e crônica da doença, respectivamente (**Fig. 4**). Enquanto camundongos infectados com a cepa Colombiana foram eutanasiados em intervalos de tempo: 22 e 190 dias após a infecção, também durante a fase aguda e crônica da doença, respectivamente (**Fig. 5**).

As amostras de sangue coletadas durante a eutanásia dos camundongos sobreviventes foram destinadas para a avaliação da concentração de anticorpos específicos, como já mencionado anteriormente. Enquanto os corações foram divididos e cada fragmento foi armazenado para realização das análises histopatológicas e dosagem de citocinas cardíacas por ensaio de ELISA.

Análises histopatológicas semi-quantitativas da inflamação, alterações degenerativas e hipertrofia foram realizadas para avaliação das lesões no tecido cardíaco, após a infecção experimental pelo *T. cruzi*. Enquanto a contagem dos ninhos de amastigotas, presentes nos cortes histológicos foi feita para quantificar a carga parasitaria.

Os níveis das citocinas teciduais pró-inflamatórias: IL-12p40, IFN- γ , e anti-inflamatórias/moduladoras: IL-4 (Interleucina 4), IL-10 foram dosados através do ensaio de ELISA de captura, utilizando-se os Kits comerciais BD OptEIA™ Set Mouse (BD Biosciences), para avaliar o perfil da resposta imunológica desenvolvida pelos camundongos, durante a infecção experimental pelo *T. cruzi*.

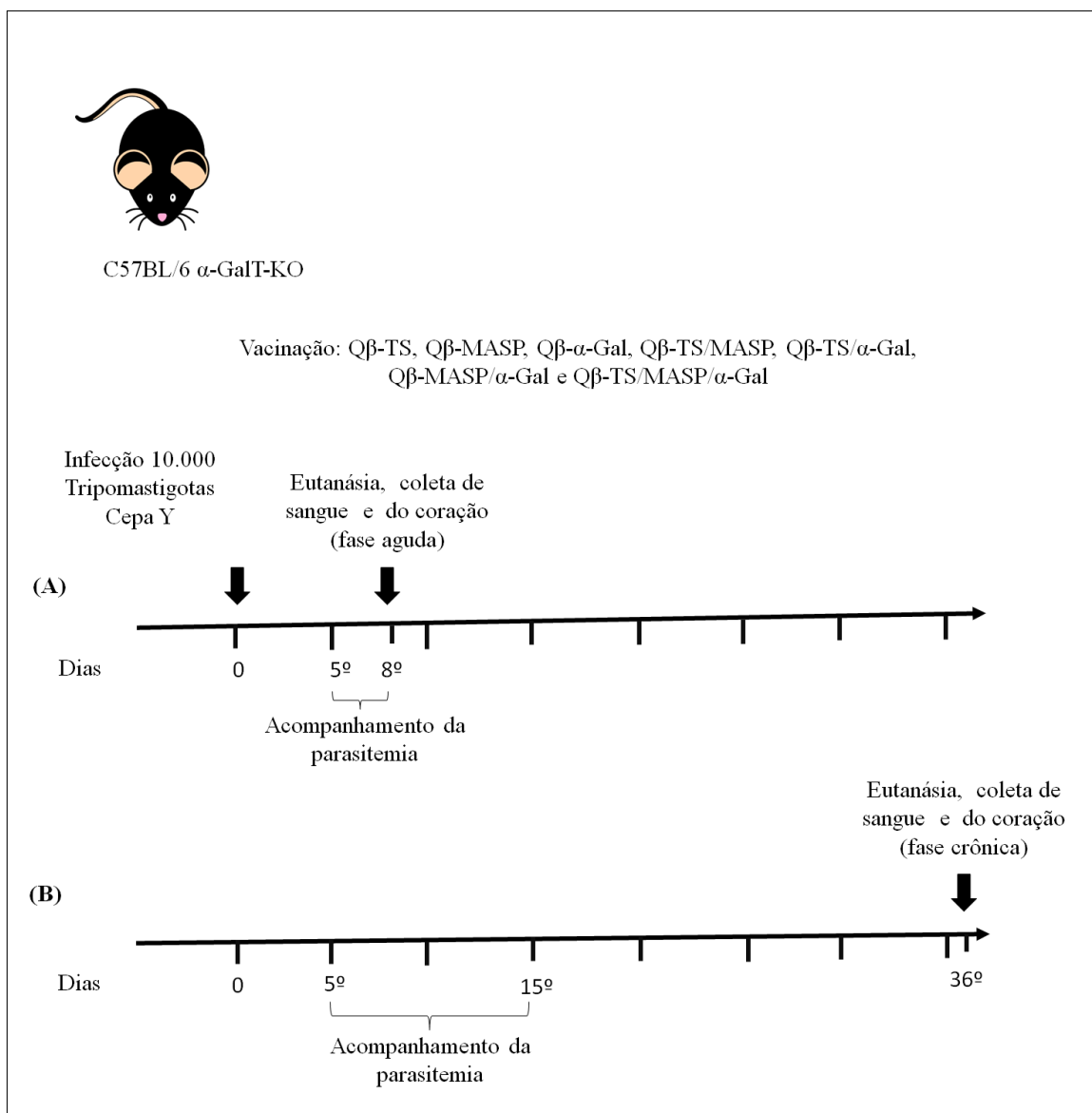


Figura 4. Intervalo de tempo em que a parasitemia foi acompanhada e os grupos avaliados foram eutanasiados após a infecção pela cepa Y. (A) Camundongos que tiveram os níveis de parasitos no sangue quantificados diariamente, a partir do 5^o dia após a infecção e foram eutanasiados no 8^o dia, durante a fase aguda. (B) Camundongos que tiveram os níveis de parasitos no sangue quantificados diariamente, a partir do 5^o até 15^o dia após a infecção e foram eutanasiados 36^o dia, durante a fase crônica da doença.

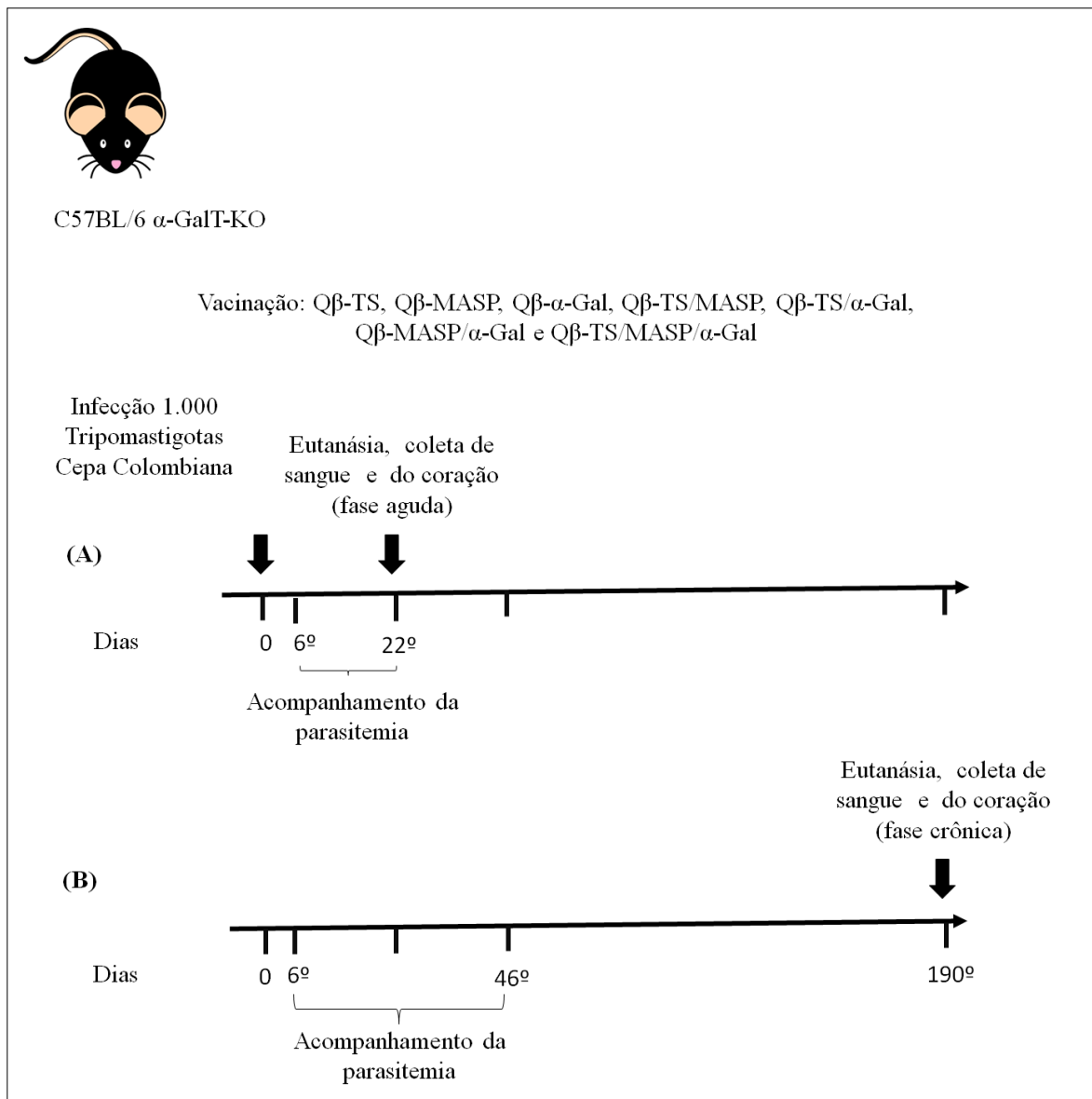


Figura 5. Intervalo de tempo em que a parasitemia foi acompanhada e os grupos avaliados foram eutanasiados após a infecção pela cepa Colombiana. (A) Camundongos que tiveram os níveis de parasitos no sangue quantificados em intervalos de 1 dia, a partir do 6^o dia após a infecção e foram eutanasiados no 22^o dia, durante a fase aguda. (B) Camundongos que tiveram os níveis de parasitos no sangue quantificados em intervalos de 1 dia, a partir do 6^o até 46^o dia após a infecção e foram eutanasiados 190^o dia, durante a fase crônica da doença.

4.5. Vacinação e infecção com *T. cruzi*

Camundongos foram divididos em grupos de 5-10 camundongos e inoculados com doses que continham 10 µg dos peptídeos selecionados a partir das proteínas: TS, MASP, do epítipo α -Gal e das associações: TS/MASP, TS/ α -Gal, MASP/ α -Gal, TS/MASP/ α -Gal, acoplados ao Q β -VLP. Como grupo controle infectado não vacinado, foram utilizados camundongos que receberam doses que continham 10 µg do Q β -controle (**Tab. 1**).

Os camundongos, receberam três doses, que foram diluídas em 200 µl de solução salina tamponada com fosfatos (PBS1X), em intervalos de 7 dias, aplicadas por via intraperitoneal. Uma semana após a última dose de vacinação os camundongos foram infectados com 10.000 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Y ou com 1.000 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Colombiana de *T. cruzi* também por via intraperitoneal.

Foram utilizadas para as infecções dos grupos experimentais, formas tripomastigotas de *T. cruzi*, derivadas do sangue de camundongos albinos Swiss, após serem mantidas através de sucessivas passagens por via intraperitoneal.

Tabela 1. Descrição esquemática dos protocolos de vacinação dos camundongos.

Antígenos utilizados nas vacinações por grupo experimental	Concentração por dose aplicada
Grupo 1 - Q β -TS	
Grupo 2 - Q β -MASP	10 µg/200 µl PBS1X
Grupo 3 - Q β - α -Gal	
Grupo 4 - Q β -controle	
Grupo 5 - Q β -TS/Q β -MASP	
Grupo 6 - Q β -TS/Q β - α -Gal	10 µg de cada antígeno/200 µl PBS1X
Grupo 7 - Q β -MASP/Q β - α -Gal	
Grupo 8 - Q β -TS/Q β -MASP/Q β - α -Gal	

4.6. Dosagem dos níveis de anticorpos IgG total reativos aos peptídeos selecionados a partir das proteínas: TS, MASP e ao epítopo α -Gal por ELISA

Amostras de sangue foram coletadas a partir da mandíbula dos camundongos, na veia facial, antes da inoculação da primeira dose da vacina ou do Q β -controle e cinco dias após os camundongos receberem a terceira dose. Como descrito no item 4.10, amostras de sangue também foram coletadas dos camundongos após a infecção, por punção cardíaca, quando foram eutanasiados.

Todas as amostras foram armazenadas em tubos sem anticoagulante. As alíquotas de soro foram obtidas pela centrifugação a 3000 χ g durante 15 minutos a 25°C, e armazenadas a -20° C até o momento do uso.

Para realização do ensaio imunoenzimático, microplacas de poliestireno com 96 poços (NUNC® MaxiSorp /Thermo Fisher Scientific) foram sensibilizadas durante 18 horas a uma temperatura de 2-8°C. Para isso, foi adicionado em cada orifício 50 μ l de um dos peptídeos selecionados a partir das proteínas: TS e MASP ou do epítopo α -Gal, acoplados ao Q β -VLP, diluídos a uma concentração de 0,4 μ g/ml em 100 mM de tampão carbonato/bicarbonato de sódio, pH 9,6.

Em seguida, após desprezar todo conteúdo, 200 μ l de solução de PBS1X contendo 1% de albumina sérica bovina (PBS1X – BSA 1%) foram acrescentados em todos os orifícios das microplacas, que foram novamente incubadas por cinquenta minutos a 37°C. Depois do bloqueio, foram depositados, em duplicata, 50 μ l de soro diluído 1:100, em solução PBS1X – BSA 1% e as microplacas foram incubadas por uma hora e trinta minutos a 37°C. Então foram lavadas três vezes com 200 μ l de PBS1X contendo Tween-20 a 0,05% (PBS1X–T 0,05%) por orifício.

Posteriormente, foram adicionados 50 μ l de anticorpo anti- IgG de camundongo conjugados com biotina (GE Healthcare) diluído a 1:5.000 em solução de PBS1X – BSA 1% e as microplacas foram incubadas por cinquenta minutos a 37° C. Em seguida, após uma nova série de lavagens, foram adicionados 50 μ l de estreptavidina conjugada com *horseradish peroxidase* (HRP) (GE Healthcare) diluído a 1:3.000 em solução de PBS1X – BSA 1%. Logo depois da incubação por cinquenta minutos a 37° C, as microplacas

foram lavadas novamente, agora por quatro vezes e foram adicionados 100 µl da solução de substrato. A solução foi preparada adicionando 2mg de OPD (dicloridrato de o-fenilenodiamina) e 4µl de peróxido de hidrogênio 30-32%, em 10 ml da solução contendo: 30mM ácido cítrico, 50mM fosfato dissódico; pH 5, diluídos em um litro de água destilada. Em seguida as microplacas foram incubadas por trinta minutos ao abrigo da luz e foram aplicados 50 µl de solução de ácido sulfúrico 4 N em cada poço. As leituras de absorvância foram realizadas no leitor de microplaca utilizando o comprimento de onda de 492 nm.

4.7. Avaliação da parasitemia

A parasitemia dos grupos experimentais, infectados pela cepa Y, foi avaliada diariamente, a partir do 5° até 15° dia após infecção, exceto nos experimentos em que os camundongos foram eutanasiados no 8° dia de infecção, durante a fase aguda da doença. Enquanto os níveis de parasito por ml de sangue periférico, dos grupos experimentais, infectados com a cepa Colombiana, foram avaliados em intervalos de 1 dia, a partir do 6° até 46° dia após-infecção, exceto nos experimentos em que os camundongos foram eutanasiados no 22° dia de infecção, durante a fase aguda da doença.

A carga parasitária foi estimada a partir da contagem dos parasitos, em amostras de sangue, coletado a partir da veia caudal, do camundongo, ao microscópio de campo claro, usando o método de Brener (Brener, 1962). Uma caixa de retenção que expõem a cauda do camundongo foi utilizada para contenção. Cinco microlitros de sangue periférico foram obtidos da veia caudal, através de um corte transversal desferido na ponta da cauda, utilizando tesoura para procedimento cirúrgico. O fator de correção foi calculado para cada microscópio de campo claro utilizado (Brener, 1962). As amostras foram examinadas entre lâmina e lamínula na objetiva de 40X (Brener, 1962). O número de tripomastigotas sanguíneas móveis foi contado em 50 campos aleatoriamente, de forma que se distribuíssem por toda a área da lamínula (Brener, 1962). Os dados foram demonstrados como quantidade de tripomastigotas por ml de sangue (Brener, 1962).

4.8. Avaliação das variações na massa corporal

Camundongos C57BL/6 α 1,3GT-KO pertencentes aos grupos experimentais, foram pesados individualmente antes da infecção pela cepa Y ou Colombiana de *T. Cruzi* e após, em intervalos de três dias, até o momento em que foram eutanasiados. As alterações na massa corporal foram determinadas como um índice, calculado como percentual de variação, a partir da fórmula: % mudança da massa corporal = [(massa corporal atual/massa corporal antes da infecção) x 100] – 100. Deste modo as variações da massa corporal apresentadas pelos camundongos após a infecção puderam ser comparadas.

4.9. Avaliação do percentual de sobrevivência

A mortalidade dos grupos experimentais de camundongos C57BL/6 α 1,3GT-KO infectados com as cepas Y ou Colombiana de *T. Cruzi* foi monitorada diariamente, até o momento em que os camundongos foram eutanasiados. A taxa de sobrevivência foi calculada contando-se todos os camundongos que sobreviveram durante todo intervalo de tempo em que foram acompanhados e os resultados foram expressos em porcentagens.

4.10. Eutanásia

Camundongos vacinados com os peptídeos selecionados a partir das proteínas: TS, MASP, com o epítipo α -Gal e com as associações TS/MASP, TS/ α -Gal, MASP/ α -Gal, TS/MASP/ α -Gal, acoplados ao Q β -VLP, infectados pela cepa Y foram eutanasiados em intervalos de tempo: 8 e 36 dias após a infecção, durante a fase aguda e crônica da doença, respectivamente. Enquanto camundongos infectados pela cepa Colombiana foram eutanasiados em intervalos de tempo: 22 e 190 dias após a infecção, durante a fase aguda e crônica da doença, respectivamente. Foram avaliados 5-10 camundongos por grupo, em cada intervalo de tempo determinado.

A eutanásia dos camundongos sobreviventes foi realizada por exsanguinação após anestesia por via intraperitoneal, utilizando como anestésico 100 mg/kg de quetamina e

16 mg/kg de xilazina. Posteriormente, as amostras de sangue coletadas foram processadas para obtenção do soro e foi realizada uma incisão ventral, para a retirada do coração. Os corações coletados foram divididos, através de cortes desferidos na vertical e destinados para análise histopatológica e dosagem de citocinas teciduais por ELISA.

4.11. Análise histopatológica semi-quantitativa do infiltrado celular, das alterações degenerativas e hipertrofia, para avaliação das lesões no tecido muscular cardíaco e contagem dos ninhos de amastigotas por microscopia de campo claro

Posteriormente a eutanásia dos camundongos, um fragmento de cada coração removido foi fixado em formol tamponado 10% por um período de 7 dias, posteriormente foi desidratado em diluições alcoólicas crescentes, diafanizado em xilol, infiltrado e incluído em parafina para a confecções de blocos e posterior microtomia, colaração e montagem das lâminas. Os blocos foram cortados em secções de 4 µm de diâmetro para coloração com hematoxilina e eosina (H & E). Após a confecção das lâminas as análises histopatológicas quantitativas e semi-quantitativas foram realizadas por microscopia de campo claro. As lesões exibidas no miocárdio foram caracterizadas em relação ao infiltrado inflamatório, alterações degenerativas e hipertrofia. O parasitismo nos tecidos cardíacos foi quantificado pela presença de ninhos de amastigotas.

Para análises semi-quantitativas as lâminas foram examinadas em microscópio óptico de campo claro acoplado a um sistema de captura digital de Imagem (Motic 2.0). Para o *score* da inflamação do miocárdio foram capturadas 10 imagens aleatórios por fragmento com aumento de 20X. O *score* foi baseado em 4 graus para inflamação do miocardio sendo: grau 0 ausência de células inflamatórias em torno dos cardiomiócitos (ausente); grau 1 alguns cardiomiócitos possuíam um pequeno número de células inflamatórias (discreto); grau 2 alguns cardiomiócitos possuíam em torno inflamação significativa (moderado); grau 3 alguns cardiomiócitos possuíam intenso infiltrado inflamatório (acentuado).

O *score* baseado em 4 graus de intensidade também foi adotado para alterações degenerativas representadas por necrose tecidual, autólise ou degeneração dos

cardiomiócitos. Sendo o grau 0 ausência de alterações histopatológicas (ausente); grau 1 alguns cardiomiócitos apresentavam degeneração (discreto); grau 2 alguns cardiomiócitos apresentavam aspecto degenerativo e outros encontravam-se em autólise (moderado); grau 3 numerosos cardiomiócitos apresentavam aspecto degenerativo, autólise (acentuado).

Do mesmo modo, para a análise semi-quantitativa da hipertrofia dos cardiomiócitos o *score* baseado em 4 graus de intensidade foi adotado, onde grau 0 significava ausência de hipertrofia dos cardiomiócitos (ausente); grau 1 escassos cardiomiócitos encontravam-se hipertrofiados (discreto); grau 2 números significativo de cardiomiócitos apresentavam hipertrofia (moderado); grau 3 grande número cardiomiócitos encontravam-se hipertrofiados (acentuado).

Para a contagem dos ninhos amastigotas presentes nos cortes histológicos no tecido muscular cardíaco, foi realizado varredura completa das secções do coração dos camundongos com aumento de 20X.

4.12. Quantificação dos níveis de citocinas teciduais pró-inflamatórias e anti-inflamatórias/moduladoras por ELISA

4.12.1. Extração de citocinas

Logo após a eutanásia dos camundongos e a remoção do coração, fragmentos de 10 mg do tecido cardíaco foram submetidos a maceração em 1 ml de solução de extração utilizando um pistilo de polipropileno com ponta cônica e tubos de microcentrífuga de 1,5 ml. A solução de extração foi preparada a partir de 400 mM cloreto de sódio, 0,05% tween 20, 0,5% BSA, 0,1 mM cloreto de benzetônio, 1 mM ácido etilenodiamina tetraacético (EDTA), 20 UI de aprotinina, diluídos em PBS1X. Em seguida foi acrescentado a solução 0,1 mM fluoreto de fenilmetilsulfonila (PMSF) diluído em 0,1% de dimetilsulfóxido (DMSO).

O homogeneizado resultante foi centrifugado por 10 minutos a 10.000 rpm a 4° C e o sobrenadante foi recolhido e armazenado a -80° C para a dosagem de citocinas por ELISA.

4.12.2 Ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA)

Os níveis de IL-12p40, IFN- γ , IL-4 e IL-10 foram quantificados através do ensaio de ELISA de captura, utilizando-se os Kits comerciais BD OptEIA™ Set Mouse (BD Biosciences). Os limites de detecção dos ensaios são: 15,6 pg/ml para IL-12p40; 3,1 pg/ml para IFN- γ ; 7,8 pg/ml para IL-4; 31,3 pg/ml para IL-10. As instruções do fabricante para a realização dos ensaios foram seguidas e estão resumidamente descritas abaixo.

Inicialmente todas as amostras após serem descongeladas, foram centrifugadas a 10.000 rpm por 15 minutos a 4°C e diluídas na proporção de 1:2 em solução de PBS1X – BSA 1%. Uma curva padrão foi gerada, em cada experimento, construída com 7 diluições seriadas também em PBS1X – BSA 1% (1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128), proveniente de citocinas recombinantes de camundongo. Fornecidas liofilizadas, pelo kit, as citocinas recombinantes foram preparadas a uma concentração inicial de 1.000 pg/ml para IL-12 p40, 200 pg/ml para IFN- γ , 500 pg/ml para IL-4, 2.000 pg/ml para IL-10. Os ensaios imunoenzimáticos foram realizados utilizando-se microplacas de poliestireno com 96 poços de meia área (Costar/Corning Incorporated). Foram adicionados 25 μ L de anticorpos de camundongos anti-IL-12p40, anti-IFN- γ , anti-IL-4 e anti-IL-10 diluídos numa concentração de 1:250 em PBS1X. As microplacas foram sensibilizadas por 18 horas a uma temperatura de 2-8°C. Em seguida, foram lavadas cinco vezes com 200 μ l de PBS1X–T 0,05%.

O bloqueio foi realizado com a incubação por 1 hora a temperatura ambiente de 200 μ L de PBS1X – BSA 1% por orifício. Logo após, foram depositados em duplicata alíquotas de 25 μ l das amostras, da curva padrão e do diluente PBS1X – BSA 1% e as microplacas foram incubadas por duas horas a temperatura ambiente. Então, após cinco lavagens foram adicionados 25 μ l da solução preparada com anticorpos de camundongos anti-IL-4, anti-IL-10, anti-IL-12p40 e anti-IFN- γ conjugados com biotina na concentração de 1:250 ou 1:500 (dependendo das especificações do Kit) e estreptavidina conjugada com HRP na concentração de 1:125 ou 1:250 (dependendo das especificações do Kit), diluídos em PBS1X – BSA 1%. As microplacas foram incubadas por uma hora a temperatura ambiente. Em seguida foram lavadas cinco vezes e foram adicionados 25 μ l

da solução de substrato. A solução foi preparada adicionando 4 mg de OPD e 2 µl de peróxido de hidrogênio 30-32% em 10 ml da solução contendo: 30 mM ácido cítrico, 50 mM fosfato dissódico; pH 5, diluídos em 1 l de água destilada. As microplacas foram incubadas por trinta minutos ao abrigo da luz e foram aplicados 25 µl de solução de ácido sulfúrico 4 N em cada poço. As leituras de absorvância foram realizadas no leitor de microplaca utilizando o comprimento de onda de 492 nm.

A concentração das citocinas nas amostras foi determinada automaticamente, por análise do software fornecido pelo leitor de microplaca, a partir dos valores obtidos com a curva padrão. A curva padrão foi traçada em um gráfico log-log, para análise dos resultados, como determinado pelo fabricante do Kit. Para validação dos ensaios o coeficiente de determinação (R^2), obtido através de análises da curva padrão, calculado automaticamente pelo software do leitor de microplaca, foi avaliado. Foram validados somente aqueles ensaios com valores de $R^2 > 0,99$, por oferecerem uma boa confiança, indicando haver uma relação direta entre os valores do eixo x e y que constituem a curva padrão.

4.13. Análise estatística dos dados

Para a análise estatística dos dados foi utilizado o software GraphPad Prism (San Diego, E.UA., versão 7.0) para comparação entre os grupos. Para verificar se os dados apresentavam distribuição gaussiana, foi utilizado o teste de normalidade de *D'Agostino & Pearson*. O teste de análise de ANOVA *two way*, seguido pelo pós-teste de *Bonferroni* foi empregado para comparação dos valores apresentados pela curva de parasitemia e de variação da massa corporal. O teste de *Log Rank* foi empregado para comparar a taxa de sobrevivência dos camundongos após a infecção com o *T. cruzi*. O Teste de *Fisher* foi usado para comparar as diferentes proporções de camundongos que sobreviverem à infecção.

Testes estatísticos também foram empregados para comparação das dosagens de anticorpos IgG total no soro, dos níveis máximos de parasitos detectado no sangue periférico, do número de ninhos de amastigotas, da intensidade do infiltrado celular, alterações degenerativas, hipertrofia e dos níveis de citocinas nos tecidos cardíacos. Para

isto, foi empregado o teste T de *student* para dados paramétricos e o teste de *Mann Whitney* para dados não paramétricos, em análises comparativas entre dois grupos. Para a análise comparativa entre três ou mais grupos foi empregado o teste de ANOVA *one way*, seguido pelo pós-teste de *Tukey*, para dados paramétricos e o teste de *Kruskal-Wallis*, seguido pelo pós-teste de *Dunns* para dados não paramétricos. O teste de *Grubb's* foi utilizado para detectar os “*outliers*”. As diferenças entre grupos foram consideradas significativas quando o valor de $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1. TÓPICO I: Eficácia dos peptídeos selecionados a partir das proteínas: TS e MASP, do epítipo α -Gal e das associações: TS/MASP, TS/ α -Gal, MASP/ α -Gal e TS/MASP/ α -Gal, acoplados ao Q β -VLP como antígenos vacinais contra a infecção pela cepa Y do *T. cruzi*, em camundongos C57BL/6 α 1,3GT-KO α -Gal

5.1.1. Cinética da resposta imune humoral em camundongos vacinados e infectados

Os níveis de anticorpos IgG total reativos aos peptídeos selecionados a partir das proteínas: TS, MASP e ao epítipo α -Gal, foram avaliados antes das vacinações (pré-vacinação), 5 dias após a 3ª dose (pré-infecção), 8 e 36 dias após a infecção pela cepa Y de *T. cruzi*, no soro dos camundongos C57BL/6 α 1,3GT-KO (n=5-10 por grupo). A concentração de anticorpos foi quantificada através do ensaio de ELISA.

Anticorpos IgG total anti-TS foram dosados em amostras de camundongos que receberam doses de: Q β -TS, Q β -TS/MASP, Q β -TS/ α -Gal e Q β -TS/MASP/ α -Gal. Enquanto anticorpos IgG total anti-MASP foram dosados em amostras de camundongos que receberam doses de: Q β -MASP, Q β -TS/MASP, Q β -MASP/ α -Gal e Q β -TS/MASP α -Gal. Já anticorpos IgG total anti- α -Gal foram dosados em amostras de camundongos que receberam doses de: Q β - α -Gal, Q β -TS/ α -Gal, Q β -MASP/ α -Gal e Q β -TS/MASP α -Gal.

As análises estatísticas dos dados, mostraram diferenças estatísticas significativas entre os níveis de anticorpos IgG total anti-TS, anti-MASP e anti- α -Gal apresentados pelas amostras de soro coletadas antes e após as vacinações (5 dias após a 3ª dose, 8 e 36 dias após a infecção). Os resultados demonstraram que as vacinações provocaram uma elevada produção de anticorpos, que se mantém ao longo da infecção, por pelo menos 36 dias após, quando os camundongos foram eutanasiados (**Fig. 6, 7 e 8**).

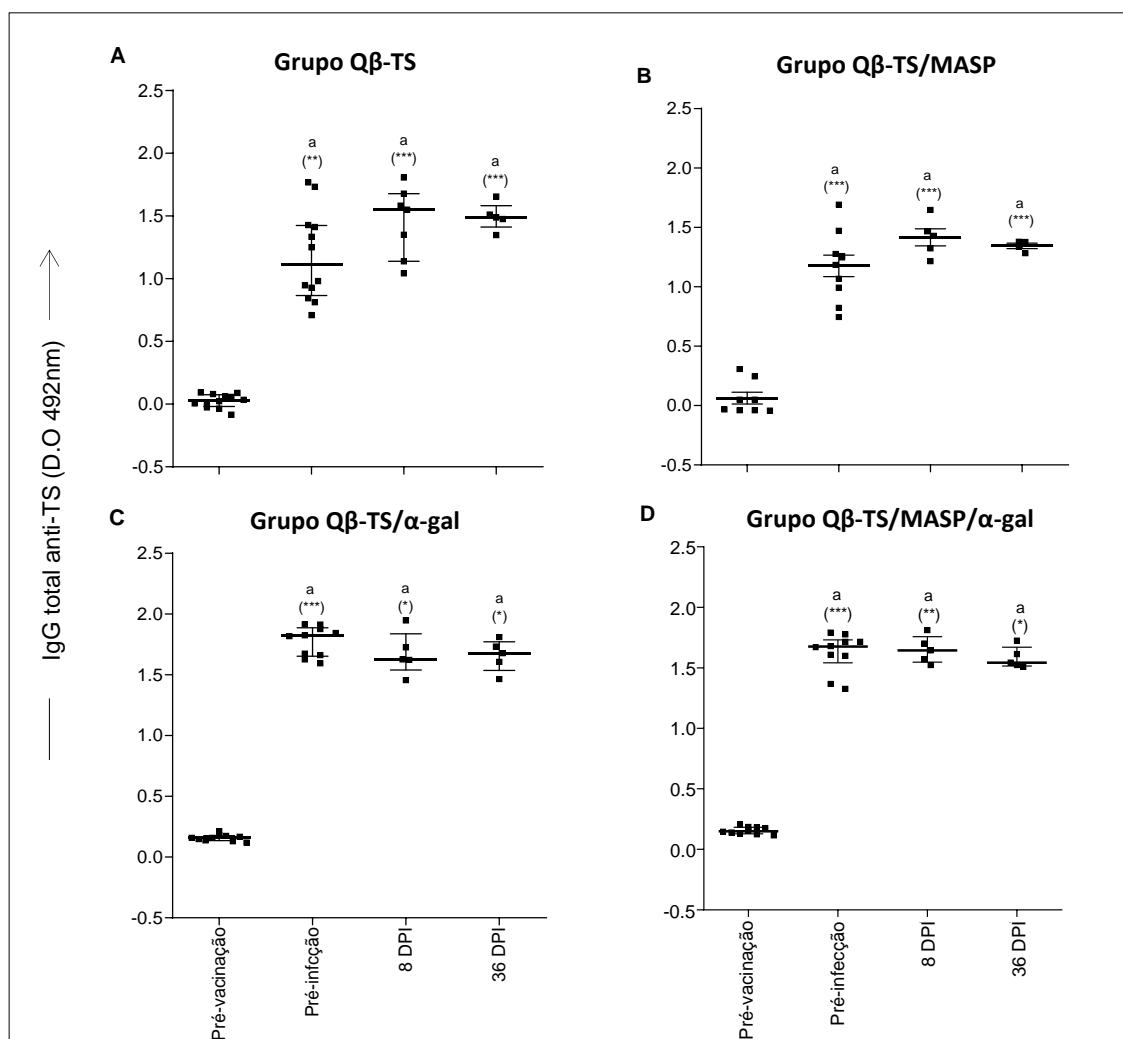


Figura 6. Concentração de anticorpos IgG total reativos ao peptídeo selecionado a partir da proteína TS avaliados antes das vacinações (pré-vacinação), 5 dias após a 3ª dose (pré-infecção), 8 e 36 dias após a infecção (DPI) pela cepa Y de *T. cruzi*, no soro de camundongos C57BL/6 $\alpha 1,3GT$ -KO fêmeas (n=5-10). (A) Camundongos vacinados com Q β -TS. (B) Camundongos vacinados com Q β -TS/MASP. (C) Camundongos vacinados com Q β -TS/ α -Gal. (D) Camundongos vacinados com Q β -TS/MASP/ α -Gal. Os resultados estão representados nos gráficos de dispersão A, C e D, destacando a mediana e o intervalo interquartil das absorbâncias. O teste de *Kruskal-Wallis*, seguido pelo pós-teste de *Dunns*, foi aplicado para realização das análises estatísticas dos resultados. No gráfico de dispersão B, estão representados destacando a média e SEM das absorbâncias. O teste de ANOVA *one way*, seguido pelo pós-teste de *Tukey*, foi aplicado para realização das análises estatísticas dos resultados. a: representa diferença significativa em relação as amostras de soro coletadas antes das vacinações (pré-vacinação). Os símbolos indicam: *($p < 0,05$), **($p < 0,01$) e ***($p < 0,001$).

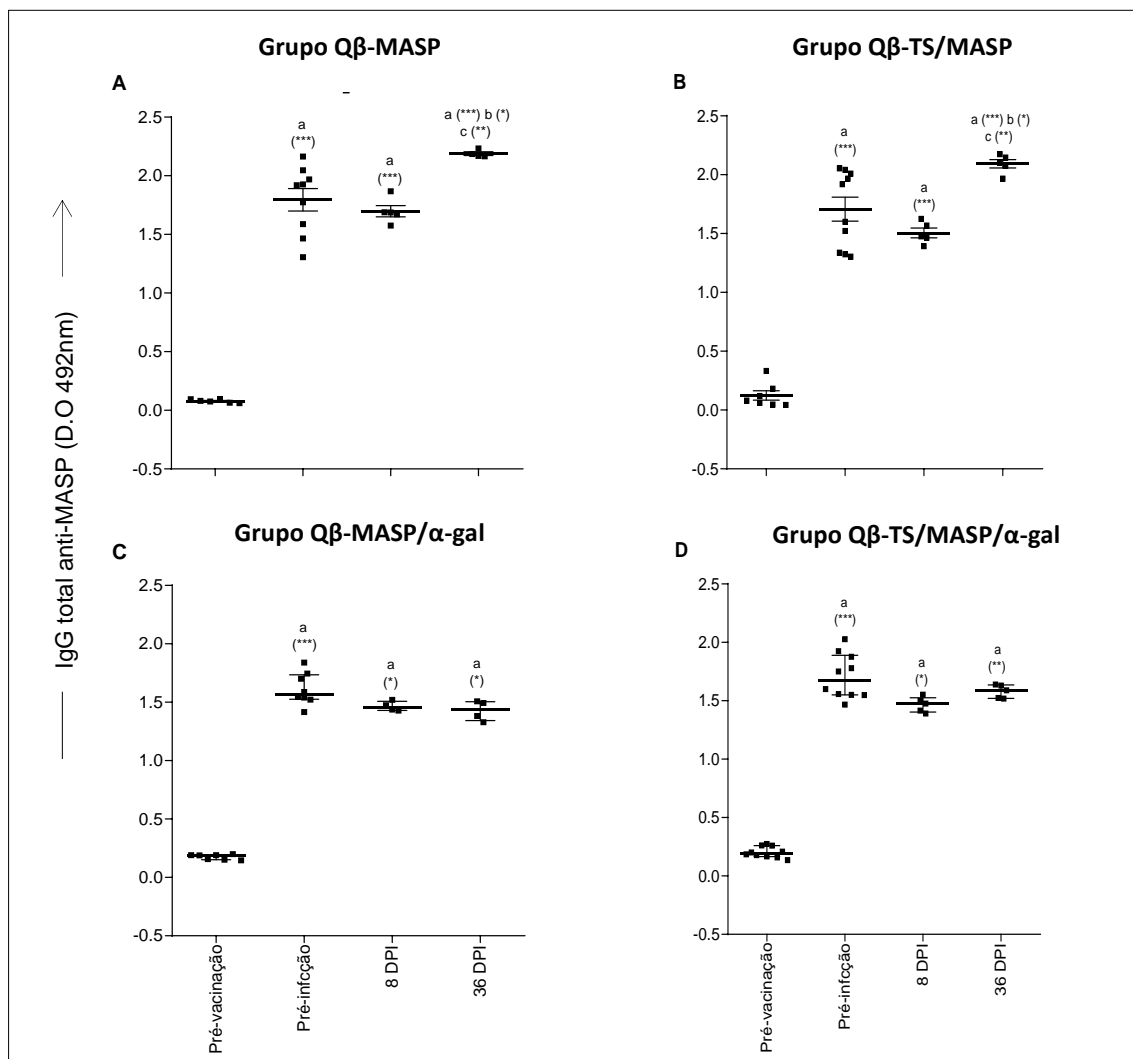


Figura 7. Concentração de anticorpos IgG total reativos ao peptídeo selecionado a partir da proteína MASP avaliados antes das vacinações (pré-vacinação), 5 dias após a 3ª dose (pré-infecção), 8 e 36 dias após a infecção (DPI) pela cepa Y de *T. cruzi*, no soro de camundongos C57BL/6 $\alpha 1,3GT-KO$ fêmeas (n=5-10). (A) Camundongos vacinados com Q β -MASP. (B) Camundongos vacinados com Q β -TS/MASP. (C) Camundongos vacinados com Q β -MASP/ α -Gal. (D) Camundongos vacinados com Q β -TS/MASP/ α -Gal. Os resultados estão representados nos gráficos de dispersão A e B, destacando a média e SEM (erro padrão da média) das absorbâncias. O teste de ANOVA *one way*, seguido pelo pós-teste de *Tukey*, foi aplicado para realização das análises estatísticas dos resultados. Nos gráficos de dispersão C e D, estão representados destacando a mediana e o intervalo interquartil das absorbâncias. O teste de *Kruskal-Wallis*, seguido pelo pós-teste de *Dunns*, foi aplicado para realização das análises estatísticas dos resultados. a: representa diferença significativa em relação as amostras de soro coletadas antes das vacinações (pré-vacinação). b: representa diferença significativa em relação as amostras de soro coletadas 5 dias após a 3ª dose (pré-infecção). c: representa diferença significativa em relação as amostras de soro coletadas 8 dias após a infecção (DPI). Os símbolos indicam: *($p < 0,05$), **($p < 0,01$) e ***($p < 0,001$).

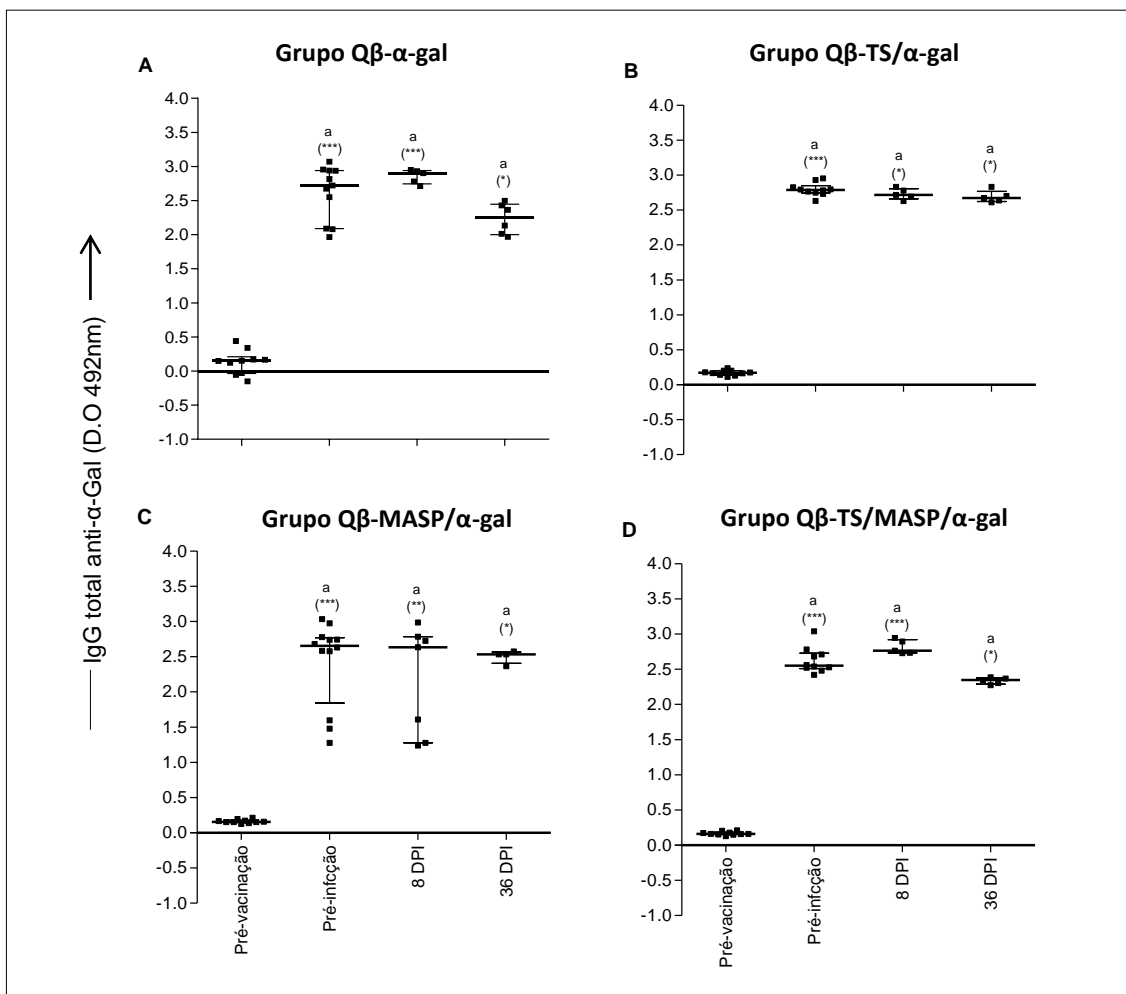


Figura 8. Concentração de anticorpos IgG total relativos ao epítipo α -Gal avaliados antes das vacinações (pré-vacinação), 5 dias após a 3^odose (pré-infecção), 8 e 36 dias após a infecção (DPI) pela cepa Y de *T. cruzi*, no soro de camundongos C57BL/6 α 1,3GT-KO fêmeas (n=5-10). (A) Camundongos vacinados com Q β - α -Gal. (B) Camundongos vacinados com Q β -TS/ α -Gal. (C) Camundongos vacinados com Q β -MASP/ α -Gal. (D) Camundongos vacinados com Q β -TS/MASP/ α -Gal. Os resultados estão representados nos gráficos de dispersão A, B, C e D destacando a mediana e o intervalo interquartil das absorbâncias. O teste de *Kruskal-Wallis*, seguido pelo pós-teste de *Dunns*, foi aplicado para realização das análises estatísticas dos resultados. a: representa diferença significativa em relação as amostras de soro coletadas antes das vacinações (pré-vacinação). Os símbolos indicam: *($p < 0,05$), **($p < 0,01$) e ***($p < 0,001$).

As análises comparativas das absorvâncias, também mostraram que camundongos que receberam doses de Q β -TS/ α -Gal (5 dias após a 3^odose (pré-infecção) - mediana=1,821; intervalo interquartil=1,653-1,887 e 36 dias após a infecção - $1,7 \pm 0,06$), apresentaram concentrações de anticorpos IgG total anti-TS significativamente maiores, em relação aos que receberam doses de Q β -TS 5 dias após a 3^odose (pré-infecção - mediana=1,116; intervalo interquartil=0,8654-1,425, $p < 0,001$) e de Q β -TS/MASP, 5 dias após a 3^odose (pré-infecção - mediana=1,216; intervalo interquartil=0,9514-1,327, $p < 0,001$) e 36 dias após a infecção ($1,3 \pm 0,02$, $p < 0,01$) (**Fig. 9 A e C**). Já camundongos que receberam doses de Q β -TS/MASP/ α -Gal ($1,6 \pm 0,04$), apresentaram níveis significativamente maiores, em relação aos que receberam doses de Q β -TS/MASP, 36 dias após a infecção ($1,3 \pm 0,02$, $p < 0,05$) (**Fig. 9 C**).

Além disso, camundongos que receberam doses de Q β -MASP (8 dias após a infecção - mediana=1,687; intervalo interquartil=1,623-1,779 e 36 dias após a infecção - $2,2 \pm 0,15$), apresentaram concentrações de anticorpos IgG total anti-MASP significativamente maiores, em relação aos que receberam doses de: Q β -TS/MASP (mediana=1,476; intervalo interquartil=1,429-1,597, $p < 0,01$) e Q β -TS/MASP/ α -Gal (mediana=1,477; intervalo interquartil=1,403-1,525, $p < 0,01$), 8 dias após a infecção e de Q β -MASP/ α -Gal, 8 (mediana=1,456; intervalo interquartil=1,439-1,508, $p < 0,01$) e 36 ($1,4 \pm 0,04$, $p < 0,01$), dias após a infecção. Enquanto camundongos que receberam doses de Q β -TS/MASP ($2,1 \pm 0,03$), apresentaram níveis significativamente maiores, em relação aos que receberam doses de Q β -MASP/ α -Gal, 36 dias após a infecção ($1,4 \pm 0,04$, $p < 0,05$) (**Fig. 9 E e F**).

Ainda, os resultados mostraram que camundongos que receberam doses de Q β -TS/ α -Gal (mediana=2,671; intervalo interquartil=2,622-2,767), também apresentaram concentrações de anticorpos IgG total anti- α -Gal significativamente maiores, em relação aos que receberam doses de: Q β - α -Gal (mediana=2,248; intervalo interquartil=2,001-2,447, $p < 0,001$) e Q β -TS/MASP/ α -Gal (mediana=2,348; intervalo interquartil=2,287-2,377, $p < 0,01$), 36 dias após a infecção. Enquanto camundongos que receberam doses de Q β -MASP/ α -Gal (mediana=2,532; intervalo interquartil=2,406-2,565) apresentaram concentrações significativamente maiores, em relação aos que receberam doses de Q β - α -

Gal, 36 dias após a infecção (mediana=2,248; intervalo interquartil=2,001-2,447, $p<0,05$) (Fig. 9 I). Os valores descritos anteriormente entre os parênteses mostram a média e o erro padrão da média (SEM) ou a mediana e o intervalo interquartil das absorbâncias das amostras de soro dos grupos experimentais.

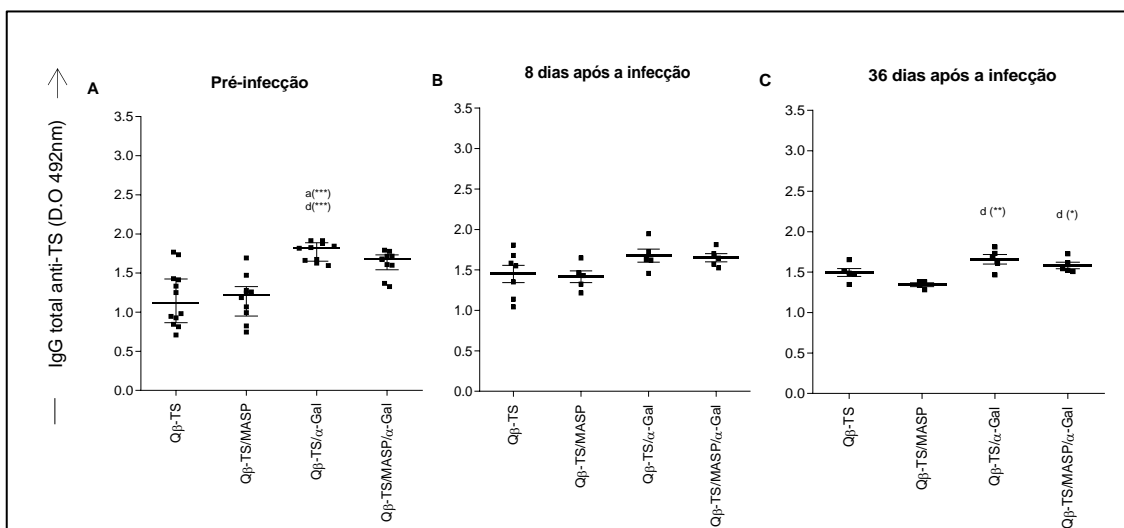


Figura 9 A, B e C. Concentração de anticorpos IgG total reativos ao peptídeo selecionado a partir da proteína TS em amostras de soro de camundongos que receberam doses de: Qβ-TS, Qβ-TS/MASP, Qβ-TS/α-Gal e Qβ-TS/MASP/α-Gal. (A) 5 dias após a 3ª dose (pré-infecção). (B) 8 dias após a infecção (DPI). (C) 36 dias após a infecção (DPI). Os resultados estão representados nos gráficos de dispersão B e C destacando a média e SEM das absorbâncias. O teste de ANOVA *one way*, seguido pelo pós-teste de *Tukey*, foi aplicado para realização das análises estatísticas dos resultados. No gráfico de dispersão A estão representados destacando a mediana e o intervalo interquartil das absorbâncias. O teste de *Kruskal-Wallis*, seguido pelo pós-teste de *Dunn's*, foi aplicado para realização das análises estatísticas dos resultados. a: representa diferença significativa em relação ao grupo Qβ-TS, b: representa diferença significativa em relação ao grupo Qβ-MASP, c: representa diferença significativa em relação ao grupo Qβ-α-Gal, d: representa diferença significativa em relação ao grupo Qβ-TS/MASP, e: representa diferença significativa em relação ao grupo Qβ-TS/α-Gal, f: representa diferença significativa em relação ao grupo Qβ-MASP/α-Gal e g: representa diferença significativa em relação ao grupo Qβ-TS/MASP/α-Gal. Os símbolos indicam: * ($p<0,05$), ** ($p<0,01$) e *** ($p<0,001$).

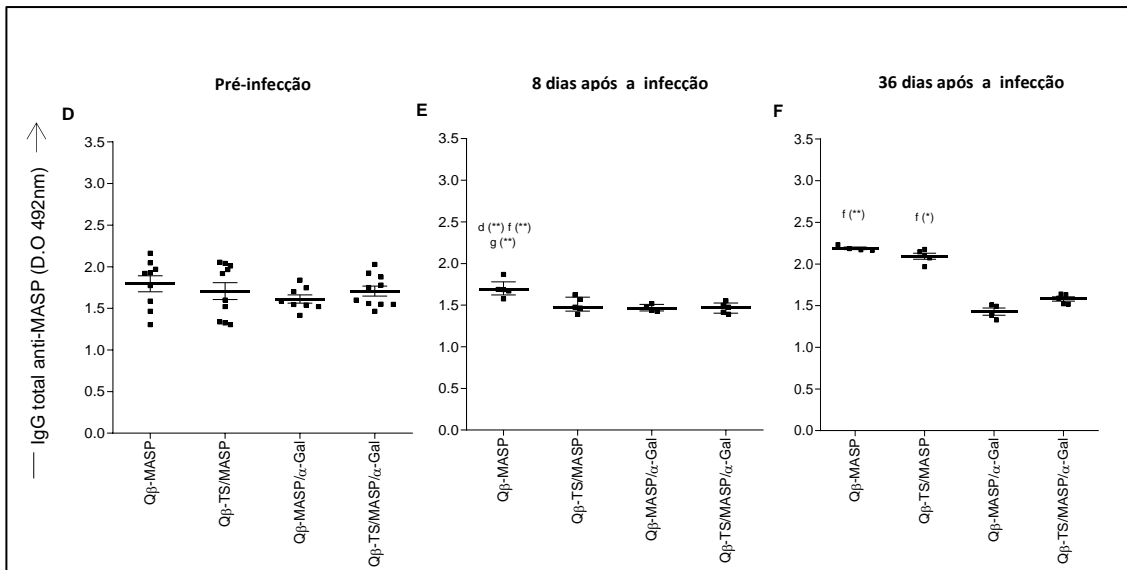


Figura 9 D, E e F. Concentração de anticorpos IgG total reativos ao peptídeo selecionado a partir da proteína MASP em amostras de soro de camundongos que receberam doses de: Q β -MASP, Q β -TS/MASP, Q β -MASP/ α -Gal e Q β -TS/MASP/ α -Gal. (D) 5 dias após a 3^o dose (pré-infecção), (E) 8 dias após a infecção (DPI) e (F) 36 dias após a infecção (DPI). Os resultados estão representados nos gráficos de dispersão D e F destacando a média e SEM das absorbâncias. O teste de ANOVA *one way*, seguido pelo pós-teste de *Tukey*, foi aplicado para realização das análises estatísticas dos resultados. No gráfico de dispersão E estão representados destacando a mediana e o intervalo interquartil das absorbâncias. O teste de *Kruskal-Wallis*, seguido pelo pós-teste de *Dunns*, foi aplicado para realização das análises estatísticas dos resultados. a: representa diferença significativa em relação ao grupo Q β -TS, b: representa diferença significativa em relação ao grupo Q β -MASP, c: representa diferença significativa em relação ao grupo Q β - α -Gal, d: representa diferença significativa em relação ao grupo Q β -TS/MASP, e: representa diferença significativa em relação ao grupo Q β -TS/ α -Gal, f: representa diferença significativa em relação ao grupo Q β -MASP/ α -Gal e g: representa diferença significativa em relação ao grupo Q β -TS/MASP/ α -Gal. Os símbolos indicam: *($p < 0,05$), **($p < 0,01$) e ***($p < 0,001$).

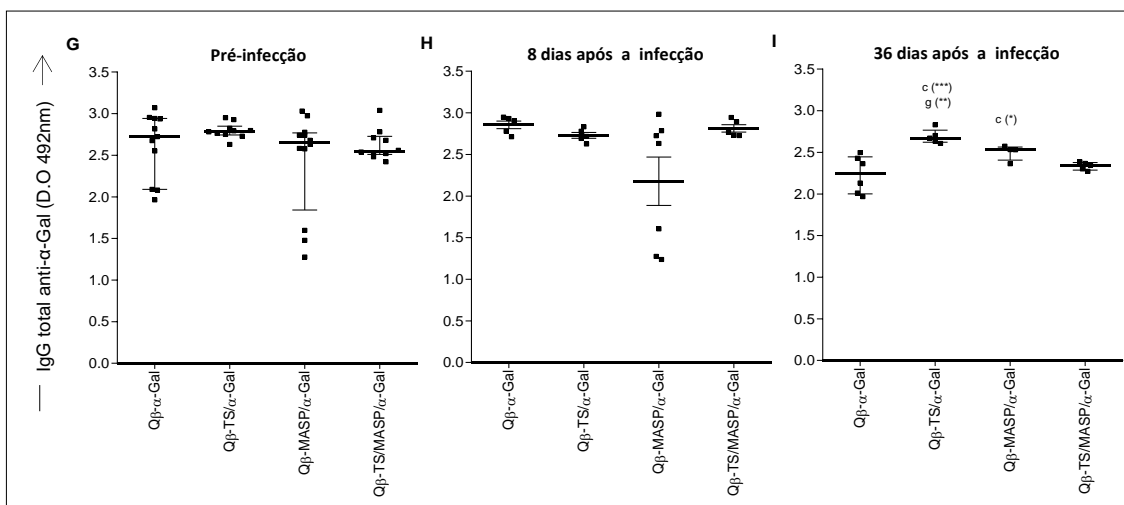


Figura 9 G, H e I. Concentração de anticorpos IgG total reativos ao epítipo α -Gal em amostras de soro de camundongos que receberam doses de: Q β - α -Gal, Q β -TS/ α -Gal, Q β -MASP/ α -Gal e Q β -TS/MASP/ α -Gal. (G) 5 dias após a 3ª dose (pré-infecção). (H) 8 dias após a infecção (DPI). (I) 36 dias após a infecção (DPI). Os resultados estão representados no gráfico de dispersão H destacando a média e SEM das absorbâncias. O teste de ANOVA *one way*, seguido pelo pós-teste de *Tukey*, foi aplicado para realização das análises estatísticas dos resultados. Nos gráficos de dispersão G e I estão representados destacando a mediana e o intervalo interquartil das absorbâncias. O teste de *Kruskal-Wallis*, seguido pelo pós-teste de *Dunns*, foi aplicado para realização das análises estatísticas dos resultados. a: representa diferença significativa em relação ao grupo Q β -TS, b: representa diferença significativa em relação ao grupo Q β -MASP, c: representa diferença significativa em relação ao grupo Q β - α -Gal, d: representa diferença significativa em relação ao grupo Q β -TS/MASP, e: representa diferença significativa em relação ao grupo Q β -TS/ α -Gal, f: representa diferença significativa em relação ao grupo Q β -MASP/ α -Gal e g: representa diferença significativa em relação ao grupo Q β -TS/MASP/ α -Gal. Os símbolos indicam: *($p < 0,05$), **($p < 0,01$) e ***($p < 0,001$).

5.1.2. Eficácia das vacinações no controle da infecção

5.1.2.1. Níveis de parasitemia

A parasitemia dos grupos experimentais de camundongos C57BL/6 α 1,3GT-KO vacinados e que receberam doses de Q β -controle (n=5-10 por grupo), foi avaliada diariamente, do 5º até 15º dia após a infecção pela cepa Y. Exceto nos experimentos em que os camundongos foram eutanasiados no 8º dia após a infecção. Os grupos avaliados receberam doses dos peptídeos selecionados a partir das proteínas: TS e MASP, do

epítopo α -Gal e das associações: TS/MASP, TS/ α -Gal, MASP/ α -Gal e TS/MASP/ α -Gal, acoplados ao Q β -VLP. Camundongos que receberam doses do Q β -controle, foram incluídos como grupo controle infectado não vacinado.

Os dados obtidos mostraram que 85% (84) dos camundongos apresentaram níveis de parasitos detectáveis no sangue no 5º dia de infecção. O pico de parasitemia variou do 7º ao 8º dia após a infecção, em 72% (39) dos camundongos que foram avaliados até o 15º dia. A análise da curva de parasitemia mostrou que no 7º dia após a infecção os grupos vacinados com: Q β - α -Gal ($6,545 \times 10^4 \pm 1,258$) e Q β -TS/MASP ($9,390 \times 10^4 \pm 3,902$), apresentaram níveis de parasitemia significativamente menores ($p < 0,01$; $p < 0,05$, respectivamente), quando comparado com o grupo controle ($22,700 \times 10^4 \pm 5,470$). No 8º dia após a infecção apenas o grupo vacinado com Q β -TS ($3,291 \times 10^4 \pm 0,509$), apresentou níveis significativamente menores ($p < 0,05$), em relação ao grupo controle ($15,550 \times 10^4 \pm 4,484$). No entanto, no 9º dia após a infecção os grupos vacinados com: Q β -TS ($3,020 \times 10^4 \pm 0,503$; $p < 0,01$), Q β - α -Gal ($4,233 \times 10^4 \pm 1,678$; $p < 0,01$), Q β -TS/MASP ($4,380 \times 10^4 \pm 1,379$; $p < 0,01$), Q β -TS/ α -Gal ($3,880 \times 10^4 \pm 1,093$; $p < 0,01$), Q β -MASP/ α -Gal ($5,080 \times 10^4 \pm 2,444$; $p < 0,05$) e Q β -TS/MASP/ α -Gal ($5,080 \times 10^4 \pm 1,539$; $p < 0,05$), apresentaram níveis de parasitemia significativamente menores, quando comparado com o grupo controle ($13,780 \times 10^4 \pm 7,458$). Os valores anteriormente descritos entre os parênteses mostram a média e o SEM do nível de parasitos por ml de sangue periférico dos grupos experimentais (**Fig. 10 A e B**). Nos outros dias avaliados, nenhuma diferença estatística significativa foi observada, entre os níveis de parasitemia dos grupos experimentais que receberam doses de: Q β -controle, Q β -TS, Q β -MASP, Q β - α -Gal, Q β -TS/MASP, Q β -TS/ α -Gal, Q β -MASP/ α -Gal e Q β -TS/MASP/ α -Gal.

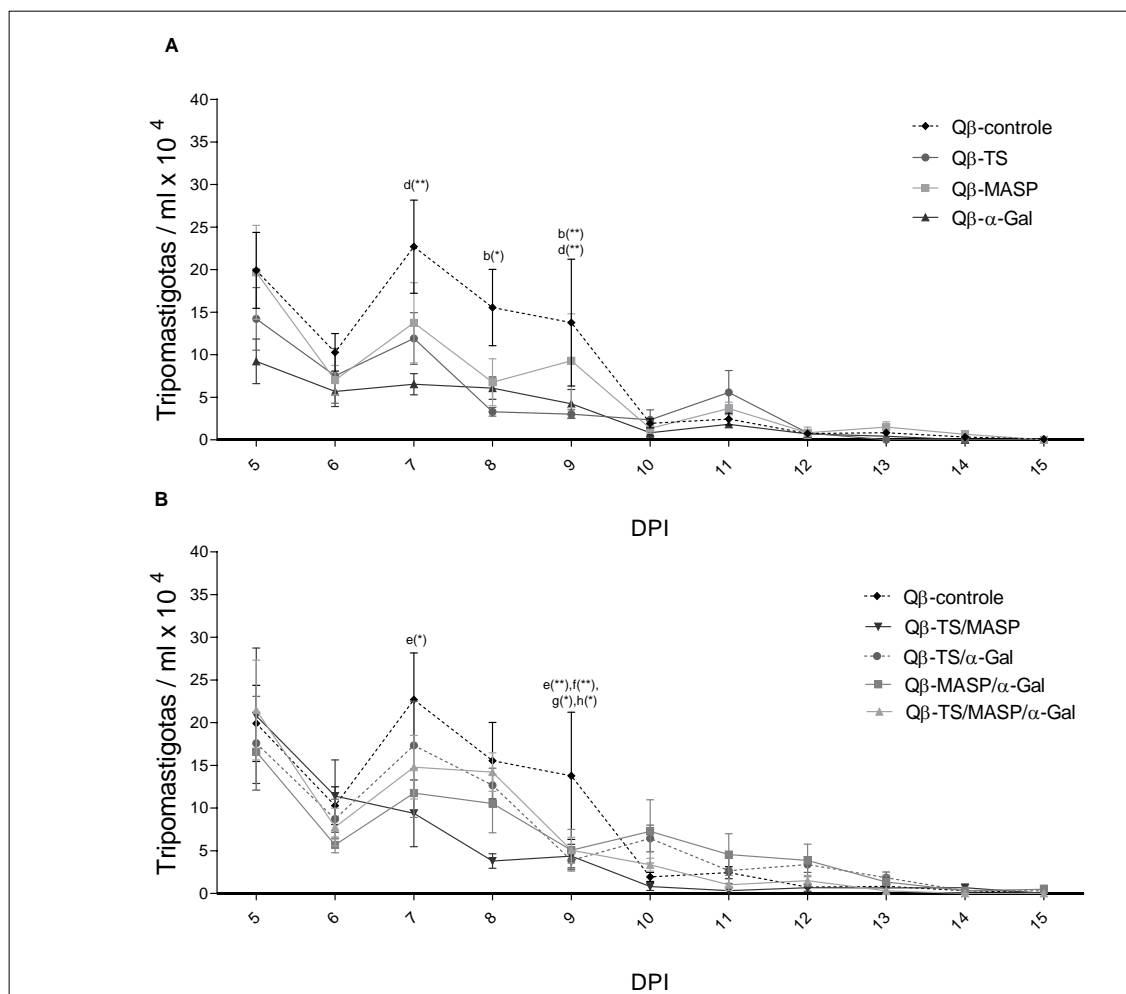


Figura 10. Análise da curva de parasitemia, avaliada diariamente, do 5° até 8° ou 15° dia após a infecção pela cepa Y do *T. cruzi*, em camundongos C57BL/6 $\alpha 1,3GT$ -KO fêmeas que receberam doses de Q β -controle e vacinados (n=5-10). (A) Camundongos que receberam doses de Q β -controle e vacinados com: Q β -TS, Q β -MASP e Q β - α -Gal. (B) Camundongos que receberam doses de Q β -controle e vacinados com as associações: Q β -TS/MASP, Q β -TS/ α -Gal, Q β -MASP/ α -Gal e Q β -TS/MASP/ α -Gal. Os valores descritos nos gráficos A e B mostram a média e o SEM de tripomastigotas por ml de sangue periférico apresentados pelos grupos experimentais em cada dia avaliado. O teste de análise de ANOVA *two way*, seguido pelo pós-teste de *Bonferroni*, foi aplicado para realização das análises estatísticas dos resultados. a: representa diferença significativa em relação ao grupo Q β -controle. b: representa diferença significativa em relação ao grupo Q β -TS. c: representa diferença significativa em relação ao grupo Q β -MASP. d: representa diferença significativa em relação ao grupo Q β - α -Gal. e: representa diferença significativa em relação ao grupo Q β -TS/MASP. f: representa diferença significativa em relação ao grupo Q β -TS/ α -Gal. g: representa diferença significativa em relação ao grupo Q β -MASP/ α -Gal. h: representa diferença significativa em relação ao grupo Q β -TS/MASP/ α -Gal. Os símbolos indicam: *($p < 0,05$) e **($p < 0,01$). DPI indica: dias após infecção.

Além disso, a avaliação do nível máximo de parasitos detectados por ml de sangue periférico, durante 15 dias após a infecção pela cepa Y do *T. cruzi*, apresentado pelos grupos vacinados e o grupo controle, também foi realizada. Os grupos vacinados com: Q β -TS ($p < 0,01$), Q β -TS/MASP ($p < 0,01$), Q β -MASP ($p < 0,05$), Q β -TS/ α -Gal ($p < 0,05$), Q β -MASP/ α -Gal ($p < 0,05$) e Q β -TS/MASP/ α -Gal ($p < 0,05$), apresentaram níveis de parasitemia durante o pico significativamente menores, em relação aos encontrados nos camundongos que pertencem ao grupo controle. Enquanto o grupo vacinado com Q β - α -Gal, apresentou níveis significativamente menores, quando comparados aos encontrados em camundongos que pertencem ao grupo controle ($p < 0,001$) e que receberam doses de: Q β -MASP/ α -Gal ($p < 0,001$), Q β -TS ($p < 0,01$), Q β -TS/MASP/ α -Gal ($p < 0,01$), Q β -MASP ($p < 0,05$) e Q β -TS/ α -Gal ($p < 0,05$) (**Fig. 11**).

As análises comparativas entre os valores da média (descritos entre parênteses, juntamente com SEM) dos níveis de parasitemia durante o pico apresentados pelos grupos vacinadas e controle ($54,03 \times 10^4 \pm 6,476$) revelaram que as vacinações com: Q β - α -Gal ($10,17 \times 10^4 \pm 2,263$), Q β -TS/MASP ($17,42 \times 10^4 \pm 6,094$), Q β -TS ($22,66 \times 10^4 \pm 2,617$), Q β -MASP ($26,90 \times 10^4 \pm 5,829$), Q β -MASP/ α -Gal ($27,42 \times 10^4 \pm 2,379$), Q β -TS/ α -Gal ($28,15 \times 10^4 \pm 8,298$) e Q β -TS/MASP/ α -Gal ($31,46 \times 10^4 \pm 4,790$) reduziram a carga parasitária, durante o pico em: 81%, 68%, 58%, 50%, 49%, 48% e 42%, respectivamente.

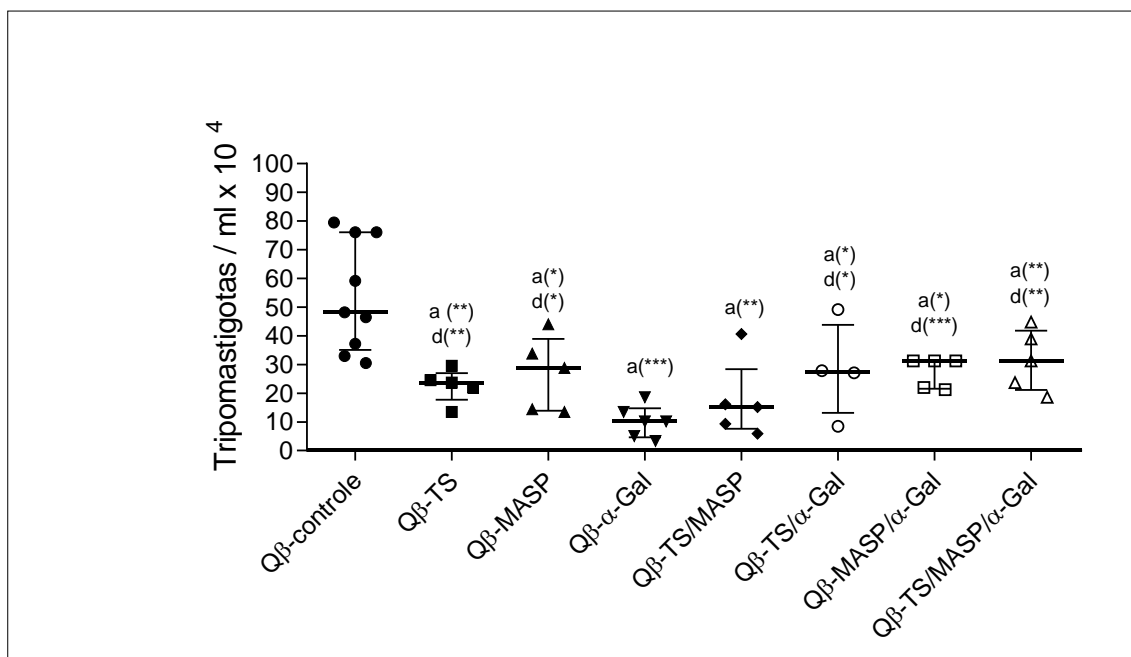


Figura 11. Análise do nível máximo de parasitos detectado por ml de sangue periférico, durante 15 dias após a infecção pela cepa Y do *T. cruzi*, em camundongos C57BL/6 $\alpha 1,3GT-KO$ fêmeas que receberam doses de Q β -controle e vacinados com: Q β -TS, Q β -MASP, Q β - α -Gal, Q β -TS/MASP, Q β -TS/ α -Gal, Q β -MASP/ α -Gal e Q β -TS/MASP/ α -Gal (n=5-10). Os resultados estão representados no gráfico de dispersão como valores da mediana e intervalo interquartil de tripomastigotas por ml de sangue periférico. O teste de *Kruskal-Wallis*, seguido pelo pós-teste de *Dunns*, foi aplicado para realização das análises estatísticas dos resultados. a: representa diferença significativa em relação ao grupo Q β -controle. d: representa diferença significativa em relação ao grupo Q β - α -Gal. Os símbolos indicam: *($p < 0,05$), **($p < 0,01$) e ***($p < 0,001$). DPI indica: dias após infecção.

5.1.2.2. Parasitismo nos tecidos cardíacos

A quantificação da carga parasitaria nos tecidos cardíacos de camundongos, C57BL/6 $\alpha 1,3GT-KO$ vacinados e que receberam doses de Q β -controle (n=5-10 por grupo) infectados pela cepa Y de *T. cruzi*, foi realizada através da contagem dos ninhos de amastigotas, presentes nos cortes histológicos por microscopia óptica. Os grupos experimentais avaliados que receberam doses dos peptídeos selecionados a partir das proteínas: TS e MASP, do epítipo α -Gal e das associações: TS/MASP, TS/ α -Gal, MASP/ α -Gal e TS/MASP/ α -Gal, acoplados ao Q β -VLP, foram eutanasiados 8 e 36 dias após a infecção, durante a fase aguda e crônica, respectivamente. Camundongos que

receberam doses do Q β -controle, foram incluídos como grupo controle infectado não vacinado.

Durante 8^o dia após a infecção, não foram encontrados ninhos de amastigota nos tecidos cardíacos de camundongos vacinados com Q β -TS/ α -Gal. Além disso, as análises revelaram ausência de ninhos de amastigota nas secções dos corações de 33% (n=2/6) dos camundongos avaliados que receberam doses de: Q β -controle, Q β -TS e Q β -MASP/ α -Gal. Enquanto que esta porcentagem foi de 40% (n=2/5) e 50% (n=2/4) entre os camundongos vacinados com: Q β -TS/MASP/ α -Gal e Q β -TS/MASP, respectivamente. Entre os camundongos vacinados com: Q β -MASP e Q β - α -Gal foram observados ninhos de amastigotas em todas as secções avaliadas. Nenhuma diferença estatisticamente significativa foi encontrada entre os grupos avaliados. Os camundongos que receberam doses de: Q β - α -Gal, Q β -TS, Q β -controle, Q β -MASP, Q β -MASP/ α -Gal, Q β -TS/MASP/ α -Gal e Q β -TS/MASP, apresentaram mediana e intervalo interquartil de ninhos de amastigota nas secções dos corações de: mediana=2, intervalo interquartil=1-2; mediana=1,5, intervalo interquartil=0-4; mediana=1, intervalo interquartil=0-3,5; mediana=1, intervalo interquartil=0-2; mediana=1, intervalo interquartil=0-2,25; mediana=1, intervalo interquartil=0-2; mediana=0,5, intervalo interquartil=0-1,750, respectivamente (**Fig. 12**).

Durante 36^o dia após a infecção, não foram encontrados ninhos de amastigota em secções dos corações de camundongos que receberam doses de: Q β -controle, Q β -TS, Q β -MASP, Q β - α -Gal, Q β -TS/MASP, Q β -TS/ α -Gal Q β -MASP/ α -Gal e Q β -TS/MASP/ α -Gal.

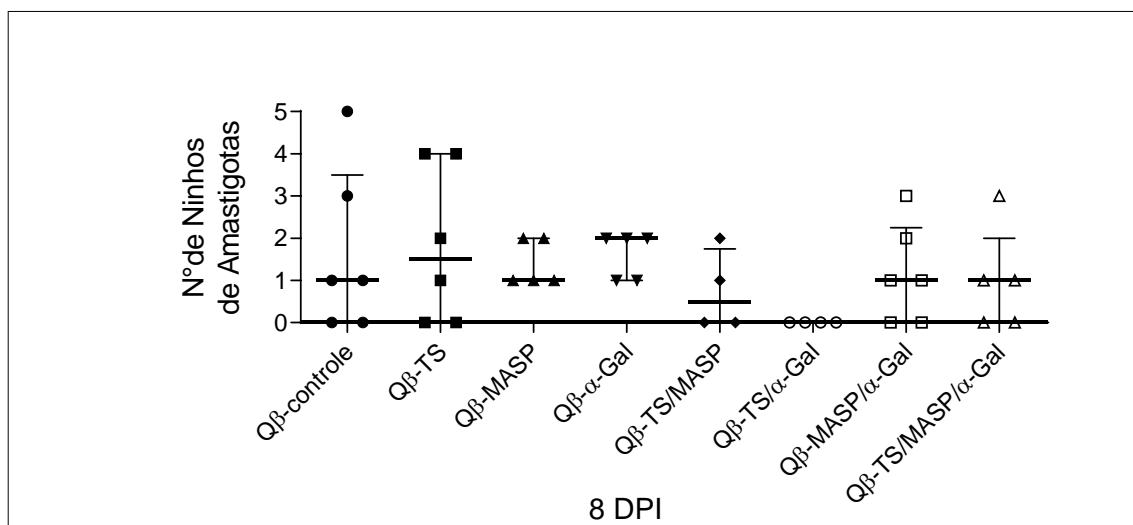


Figura 12. Análise quantitativa dos ninhos de amastigotas em seções dos corações de camundongos C57BL/6 α 1,3GT-KO fêmeas que receberam doses de Q β -controle e vacinados com: Q β -TS, Q β -MASP, Q β - α -Gal, Q β -TS/MASP, Q β -TS/ α -Gal, Q β -MASP/ α -Gal e Q β -TS/MASP/ α -Gal (n=5-10), infectados pela cepa Y de *T. cruzi*. Os resultados estão representados no gráfico de dispersão destacando a mediana e o intervalo interquartil do número dos ninhos de amastigotas. O teste de *Kruskal-Wallis*, seguido pelo pós-teste de *Dunns*, foi aplicado para realização das análises estatísticas dos resultados. DPI indica: dias após infecção.

5.1.3. Alterações na massa corporal e taxa de sobrevivência em camundongos vacinados durante a infecção experimental

Camundongos C57BL/6 α 1,3GT-KO vacinados e que receberam doses de Q β -controle (n=5-10 por grupo) foram pesados individualmente, antes e durante a infecção pela cepa Y de *T. cruzi*, em intervalos de três dias. Em seguida, uma curva de variação da massa corporal inicial de cada grupo experimental avaliado foi construída a partir destes dados coletados. Enquanto a mortalidade foi monitorada diariamente, até o momento em que os camundongos foram eutanasiados.

Os grupos experimentais avaliados que receberam doses dos peptídeos selecionados a partir das proteínas: TS e MASP, do epítipo α -Gal e das associações: TS/MASP, TS/ α -Gal, MASP/ α -Gal, TS/MASP/ α -Gal, acoplados ao Q β -VLP, foram eutanasiados 8 e 36 dias após a infecção, durante a fase aguda e crônica, respectivamente.

Camundongos que receberam doses do Q β -controle, foram incluídos como grupo controle infectado não vacinado.

Os dados apresentados pela curva de variação da massa corporal inicial mostram que os camundongos que receberam doses de: Q β -TS/MASP, Q β -TS e Q β -MASP aumentaram sua massa corporal em: 4,340%, 3,709% e 3,510% respectivamente até 9° dia após a infecção, enquanto que, os camundongos que receberam doses de: Q β -TS/MASP/ α -Gal, Q β -TS/ α -Gal, Q β -MASP/ α -Gal, Q β -controle e Q β - α -Gal aumentaram sua massa corporal em 18,020%, 13,100%, 12,440%, 8,878% e 7,933%, respectivamente até 13° dia após a infecção. Nos dias seguintes os camundongos passaram a apresentar perda da massa corporal, que se torna mais acentuada, no 21° dia após a infecção. Neste momento os grupos que receberam doses de: Q β -MASP/ α -Gal, Q β -TS/MASP/ α -Gal, Q β -TS, Q β -TS/ α -Gal, Q β -controle, Q β -TS/MASP, Q β -MASP e Q β - α -Gal tiveram uma perda de 19,44%, 18,98%, 18,169%, 14,2%, 14,116%, 13,64%, 12,935% e 11,8% de sua maior massa corporal apresentada até então, respectivamente. A partir deste ponto, os camundongos passaram a ganhar massa corporal, mas não conseguiram recuperá-lo até 36 dias após a infecção, momento em que foram eutanasiados (**Fig. 13 A e B**).

As análises estatísticas da curva de variação da massa corporal inicial mostraram que durante o 9° dia após a infecção o grupo vacinado com Q β -TS/MASP/ α -Gal (7,290%), apresentou ganho de massa corporal significativamente maior, quando comparado aos grupos vacinados com: Q β -MASP (3,510%, $p < 0,05$) e Q β -TS (3,7%, $p < 0,05$). Durante o 13° dia após a infecção o grupo vacinado com Q β -TS/MASP/ α -Gal (18,020%), apresentou ganho de massa corporal, enquanto os grupos vacinados com: Q β -MASP (-1,960%, $p < 0,001$), Q β -TS (0,9%, $p < 0,01$) e Q β -TS/MASP (1,080%, $p < 0,01$), apresentaram perda da massa corporal adquirida, demonstrando porcentagens de variação da massa corporal inicial significativamente menores. Os grupos vacinados com: Q β -TS/ α -Gal (13,100, $p < 0,01$) e Q β -MASP/ α -Gal (12,440%, $p < 0,05$), também apresentaram ganho de massa corporal durante o 13° dia após a infecção, demonstrando porcentagens de variação de massa corporal inicial significativamente maiores, quando comparadas com a do grupo vacinado com Q β -MASP (-1,960%), que apresentou perda da massa corporal adquirida durante este dia, (**Fig. 13 A e B**).

No 17° dia após a infecção os grupos vacinados com: Q β -TS/ α -Gal (8,060%, $p < 0,001$; $p < 0,01$; $p < 0,01$), Q β -TS/MASP/ α -Gal (7,100%, $p < 0,01$; $p < 0,01$; $p < 0,05$) e Q β -MASP/ α -Gal (5,900%, $p < 0,01$; $p < 0,05$; $p < 0,05$) apresentaram perda de massa corporal significativamente menor, quando comparado aos grupos vacinados com: Q β -TS (-10%), Q β -MASP (-8,520%) e Q β -TS/MASP (-7,420). Enquanto, o grupo vacinado com Q β - α -Gal (3,3%, $p < 0,05$; $p < 0,05$), apresentou perda de massa corporal significativamente menor, apenas quando comparado aos grupos vacinados com: Q β -TS (-10%) e Q β -MASP (-8,520%). No 21° dia após a infecção os grupos vacinados com: Q β -TS/ α -Gal (-1,100%) e Q β -TS/MASP/ α -Gal (-0,960%), apresentaram uma perda de massa corporal significativamente menor ($p < 0,01$), quando comparado com o grupo vacinado com Q β -TS (-14,460%) (**Fig. 13 B**).

Durante o 25° dia após a infecção, o grupo vacinado com Q β -TS/MASP/ α -Gal (4,060%) apresentou ganho de massa corporal significativamente maior ($p < 0,05$), em relação ao grupo Q β -TS/MASP (-9,100%). Enquanto no 25° e 29° dia após a infecção os grupos que receberam doses de: Q β -TS/MASP/ α -Gal (4,060%, $p < 0,01$; 4,060%, $p < 0,001$), Q β -TS/ α -Gal (1,940%, $p < 0,05$; 4,060%, $p < 0,001$), Q β -controle (-2,250%, $p < 0,05$; 0,200%, $p < 0,01$) e Q β - α -Gal (0,97%, $p < 0,05$; -0,617%, $p < 0,05$), apresentaram ganho de massa corporal significativamente maior, em relação ao grupo vacinado com Q β -TS (-12,640%/-13,580%). Já, o grupo vacinado com Q β -MASP/ α -Gal (2,500%), apresentou ganho de massa corporal significativamente maior ($p < 0,01$), em relação ao grupo vacinado com Q β -TS (-13,580%), somente durante o 29° dia após a infecção (**Fig. 13B**).

No 33° dia após a infecção, o grupo vacinado com Q β -TS/MASP/ α -Gal (5,060%) também apresentou ganho de massa corporal significativamente maior ($p < 0,05$), em relação aos grupos vacinados com: Q β -TS (-7,980%) e Q β -TS/MASP (-8,820%). Enquanto, o grupo vacinado com Q β - α -Gal (3,250%, $p < 0,05$), apresentou ganho de massa corporal significativamente maior, apenas quando comparado ao grupo vacinado com Q β -TS/MASP (-8,820%). Nenhuma outra diferença estatística significativa foi encontrada entre as porcentagens de variação da massa corporal inicial, durante todo o

período avaliado (**Fig. 13B**). Os valores descritos entre os parênteses mostram a média da porcentagem de variação da massa corporal inicial avaliada em cada momento.

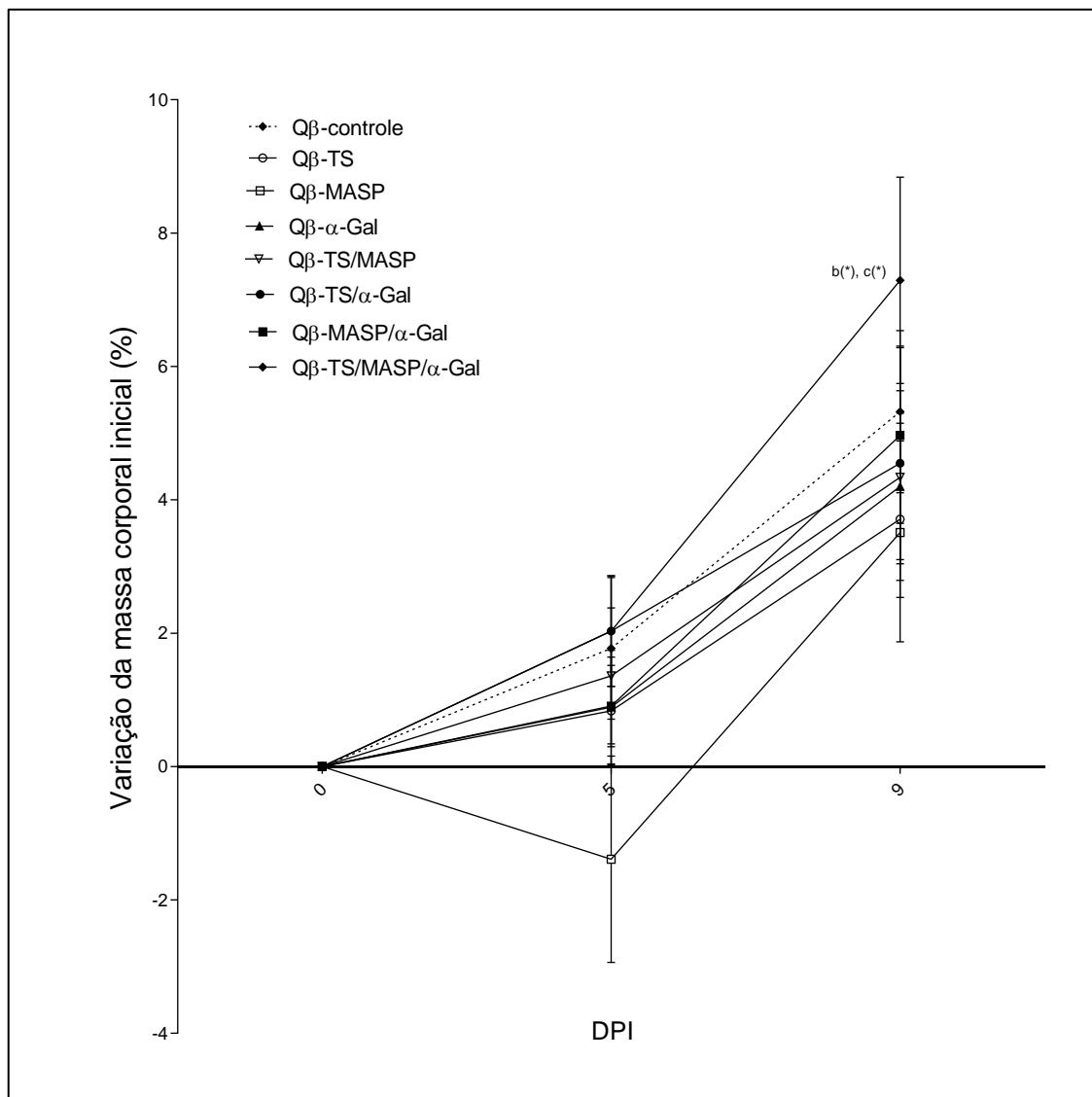


Figura 13 A. Análise da curva de variação da massa corporal inicial, avaliada antes da infecção pela cepa Y do *T. cruzi* e após, em intervalos de três dias, do 5º até 8º ou 36º dia, em camundongos C57BL/6 α 1,3GT-KO fêmeas que receberam doses de Q β -controle e vacinados com: Q β -TS, Q β -MASP, Q β - α -Gal, Q β -TS/MASP, Q β -TS/ α -Gal, Q β -MASP/ α -Gal e Q β -TS/MASP/ α -Gal (n=5-10). Os valores descritos mostram a média e o SEM da variação da massa corporal inicial (%) apresentados pelos grupos experimentais em cada ponto examinado. O teste de análise de ANOVA *two way*, seguido pelo pós-teste de *Bonferroni*, foi aplicado para realização das análises estatísticas dos resultados. b: representa diferença significativa em relação ao grupo Q β -TS. c: representa diferença significativa em relação ao grupo Q β -MASP. Os símbolos indicam: *($p < 0,05$), **($p < 0,01$) e *** ($p < 0,001$). DPI indica: dias após infecção.

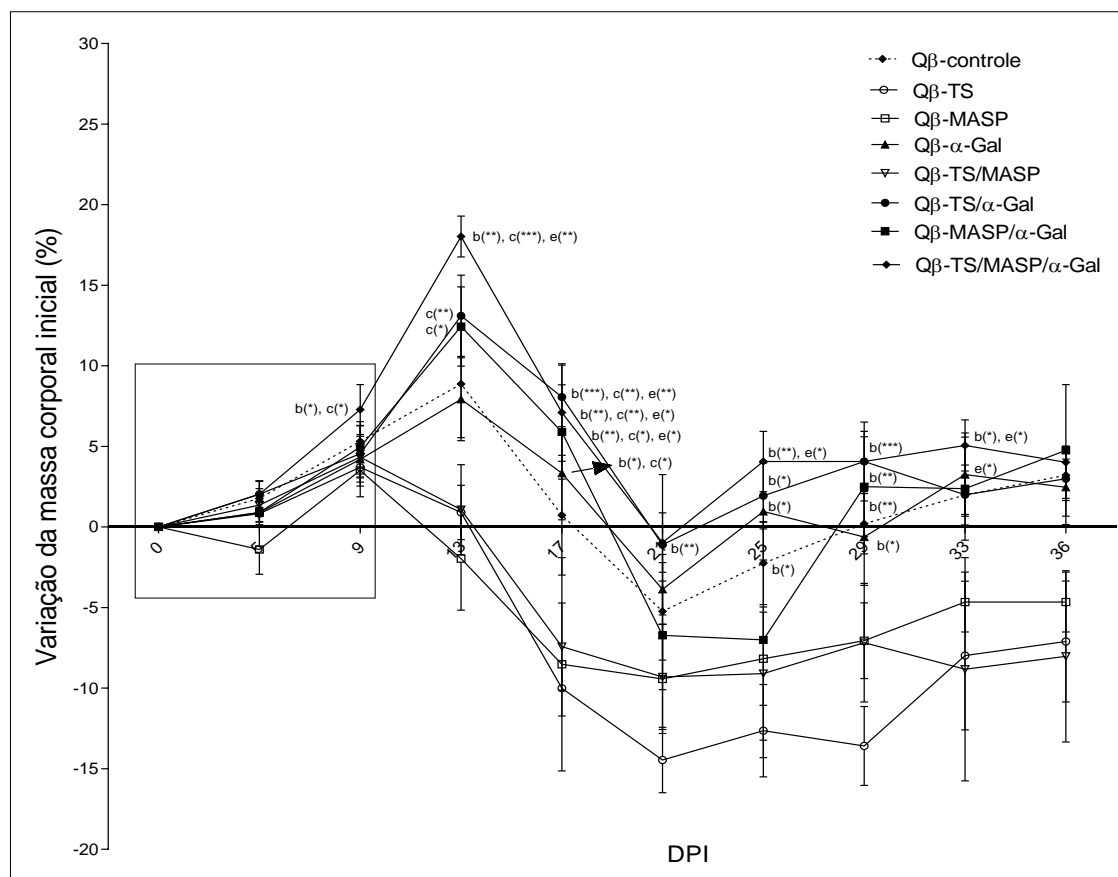


Figura 13 B. Análise da curva de variação da massa corporal inicial, avaliada antes da infecção pela cepa Y do *T. cruzi* e após, em intervalos de três dias, do 5° até 8° ou 36° dia, em camundongos C57BL/6 $\alpha 1,3GT-KO$ fêmeas que receberam doses de Q β -controle e vacinados com: Q β -TS, Q β -MASP, Q β - α -Gal, Q β -TS/MASP, Q β -TS/ α -Gal, Q β -MASP/ α -Gal e Q β -TS/MASP/ α -Gal (n=5-10). Os valores descritos mostram a média e o SEM da variação da massa corporal inicial (%) apresentados pelos grupos experimentais em cada ponto examinado. O teste de análise de ANOVA *two way*, seguido pelo pós-teste de *Bonferroni*, foi aplicado para realização das análises estatísticas dos resultados. b: representa diferença significativa em relação ao grupo Q β -TS. c: representa diferença significativa em relação ao grupo Q β -MASP. e: representa diferença significativa em relação ao grupo Q β -TS/MASP. Os símbolos indicam: *($p < 0,05$), **($p < 0,01$) e ***($p < 0,001$). DPI indica: dias após infecção.

A avaliação do percentual de sobrevivência demonstrou que 100% dos camundongos vacinados com: Q β -TS, Q β - α -Gal, Q β -TS/MASP, Q β -TS/ α -Gal e Q β -TS/MASP/ α -Gal, avaliados 8 e 36 dias após a infecção sobreviveram. Entretanto, foi identificado 20% de mortalidade, entre os camundongos vacinados com: Q β -MASP (1/5), Q β -MASP/ α -Gal (1/5) e que receberam doses de Q β -controle (2/10), acompanhados diariamente durante o

período de 36 dias após a infecção. Apresentando assim, estes grupos uma taxa de sobrevivência, de 80%. Os camundongos que pertencem ao grupo que recebeu doses de Q β -controle, vieram a óbito no 14° e 22° dia após a infecção. Enquanto os camundongos vacinados com: Q β -MASP e Q β -MASP/ α -Gal, faleceram no 22° e 30° dia após a infecção, respectivamente (**Tab. 2**).

Tabela 2. Eficácia da vacinação com: Q β -TS, Q β -MASP, Q β - α -Gal, Q β -TS/MASP, Q β -TS/ α -Gal, Q β -MASP/ α -Gal e Q β -TS/MASP/ α -Gal, na supressão ou redução da mortalidade de camundongos C57BL/6 α 1,3GT-KO fêmeas, infectados pela cepa Y do *T. cruzi*.

Antígeno vacinal (n=5-6)	Mortalidade (avaliada até 8 e 36 dias após infecção)		
	8	36	Total
Q β -TS	0/6	0/5	0/11
Q β -MASP	0/5	1/5 (20%)	1/10 (10%)
Q β - α -Gal	0/5	0/6	0/11
Q β -TS/MASP	0/5	0/5	0/10
Q β -TS/ α -Gal	0/5	0/5	0/10
Q β -MASP/ α -Gal	0/6	1/5 (20%)	1/11 (9%)
Q β -TS/MASP/ α -Gal	0/5	0/5	0/10
Grupo Não Vacinado (n=8-10)			
Q β -controle	0/8	2/10 (20%)	2/18 (11%)

5.1.4. Eficácia das vacinações na prevenção do dano aos tecidos cardíacos associado à infecção pelo *T. cruzi*

Análises histopatológicas semi-quantitativas por microscopia óptica do infiltrado celular, alterações degenerativas e hipertrofia das fibras musculares em secções de coração corados com H&E, de camundongos C57BL/6 $\alpha 1,3GT$ -KO vacinados e que receberam doses de Q β -controle (n=5-10 por grupo), eutanasiados 8 e 36 dias após a infecção pela cepa Y de *T. cruzi*, foram realizadas para determinar a intensidade das lesões. Os grupos experimentais avaliados receberam doses dos peptídeos selecionados a partir das proteínas: TS e MASP, do epítipo α -Gal e das associações: TS/MASP, TS/ α -Gal, MASP/ α -Gal e TS/MASP/ α -Gal, acoplados ao Q β -VLP. Camundongos que receberam doses do Q β -controle, foram incluídos como grupo controle infectado não vacinado.

Os dados demonstraram que nenhuma diferença estatística significativa foi observada, entre os níveis do infiltrado celular quantificado ao longo das fibras musculares cardíacas de camundongos que receberam doses de: Q β -controle, Q β -TS, Q β - α -Gal, Q β -TS/MASP e Q β -MASP/ α -Gal, 8 dias após a infecção, durante a fase aguda. No entanto, camundongos vacinados com: Q β -MASP e Q β -TS/MASP/ α -Gal apresentaram níveis significativamente maiores, que os observados em camundongos que receberam doses de: Q β -TS/ α -Gal ($p < 0,0001$), Q β - α -Gal ($p < 0,001$), Q β -MASP/ α -Gal ($p < 0,05$) e Q β -controle ($p < 0,05$). Além disso, camundongos vacinados com Q β -TS/ α -Gal, também apresentaram níveis significativamente menores ($p < 0,05$), em relação aos quantificados em cortes histológicos de camundongos que receberam doses de: Q β - α -Gal, Q β -TS/MASP, Q β -MASP/ α -Gal e Q β -controle. Diferenças estatísticas significativas também foram encontradas entre o grupo não infectado, que não apresentou inflamação e os grupos que receberam doses de: Q β -MASP ($p < 0,0001$), Q β -TS/MASP/ α -Gal ($p < 0,0001$), Q β -controle ($p < 0,001$), Q β -MASP/ α -Gal ($p < 0,001$), Q β -TS ($p < 0,01$), Q β - α -Gal ($p < 0,01$), Q β -TS/MASP ($p < 0,01$) e Q β -TS/ α -Gal ($p < 0,05$) (**Fig. 14 A**).

Durante este período após a infecção, altos níveis de infiltrado celular predominaram ao longo das fibras musculares cardíacas de camundongos vacinados com

Q β -MASP e Q β -TS/MASP/ α -Gal. Em camundongos vacinados com: Q β -TS/MASP e Q β - α -Gal a intensidade da inflamação variou de alta a moderada em 60% (3/5) dos cortes histológicos avaliados. Entre os camundongos vacinados com: Q β -TS e Q β -MASP/ α -Gal está porcentagem foi de 50% (3/6) e em camundongos que receberam doses de Q β -controle foi de 43% (3/7). Em secções de camundongos vacinados com Q β -TS/ α -Gal a inflamação era ausente ou apresentava baixos níveis (**Fig. 14 A**). Os camundongos que receberam doses de: Q β -MASP, Q β -TS/MASP/ α -Gal, Q β -TS/MASP, Q β -controle, Q β -TS, Q β -MASP/ α -Gal, Q β - α -Gal e Q β -TS/ α -Gal apresentaram uma média e SEM de intensidade da inflamação de: 3 ± 0 ; 3 ± 0 ; $2,2 \pm 0,49$; $1,857 \pm 0,404$; $1,833 \pm 0,543$; $1,833 \pm 0,402$; $1,6 \pm 0,245$ e $0,6 \pm 0,245$, respectivamente.

Por outro lado, aos 36 dias após a infecção, durante a fase crônica camundongos vacinados com: Q β -TS ($p < 0,0001$), Q β - α -Gal ($p < 0,0001$), Q β -TS/MASP ($p < 0,0001$) e Q β -MASP ($p < 0,01$), apresentaram níveis de infiltrado celular significativamente menores ao longo das fibras musculares cardíacas, que os observados em camundongos que pertencem ao grupo que recebeu doses de Q β -controle. Além disso, o grupo que recebeu doses de Q β - α -Gal, apresentou níveis significativamente menores em relação aos grupos que receberam doses de: Q β -MASP ($p < 0,001$), Q β -TS ($p < 0,01$) e Q β -TS/MASP ($p < 0,01$). Diferenças estatísticas significativas também foram encontradas entre os grupos não infectados, vacinados com: Q β -TS/ α -Gal, Q β -MASP/ α -Gal e Q β -TS/MASP/ α -Gal, que não apresentaram inflamação e os grupos que receberam doses de: Q β -controle ($p < 0,0001$), Q β -TS ($p < 0,001$), Q β -MASP ($p < 0,001$) e Q β -TS/MASP ($p < 0,001$) (**Fig. 14 B**).

Durante este período após a infecção, altos níveis de infiltrado celular prevaleceram ao longo das fibras musculares cardíacas de camundongos que receberam doses de Q β -controle. Níveis moderados predominaram em camundongos imunizados com Q β -MASP. A intensidade da inflamação variou de moderada a baixa em camundongos vacinados com: Q β -TS e Q β -TS/MASP. Em secções de camundongos vacinados com Q β - α -Gal a inflamação era ausente ou apresentava baixos níveis. Enquanto não foi encontrado processo inflamatório em cortes histológicos de camundongos vacinados com: Q β -TS/ α -Gal, Q β -MASP/ α -Gal e Q β -TS/MASP/ α -Gal

(Fig. 14 B). Os camundongos que receberam doses de: Q β -controle, Q β -MASP, Q β -TS, Q β -TS/MASP e Q β - α -Gal apresentaram uma média e SEM de intensidade da inflamação de: $3 \pm 0, 2 \pm 0, 1,6 \pm 0,245, 1,6 \pm 0,245$ e $0,4 \pm 0,245$, respectivamente.

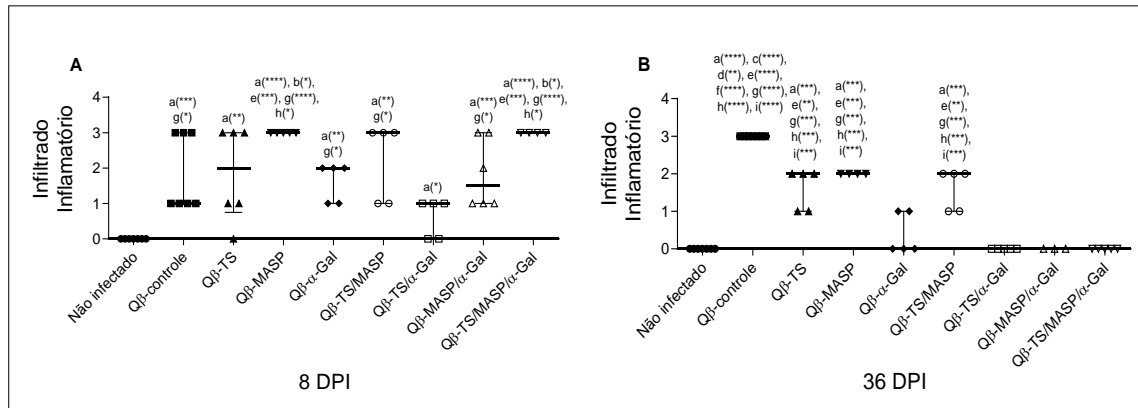


Figura 14. Análise semi-quantitativa do infiltrado inflamatório, em secções dos corações de camundongos C57BL/6 α 1,3GT-KO fêmeas que receberam doses de Q β -controle e foram vacinados com: Q β -TS, Q β -MASP, Q β - α -Gal, Q β -TS/MASP, Q β -TS/ α -Gal, Q β -MASP/ α -Gal e Q β -TS/MASP/ α -Gal (n=5-10), infectados pela cepa Y de *T. cruzi* e não infectados. (A) Camundongos eutanasiados 8 dias após a infecção. (B) Camundongos eutanasiados 36 dias após a infecção. Os resultados estão apresentados em gráficos de dispersão como mediana e intervalo interquartil da intensidade do infiltrado inflamatório. O teste de *Kruskal-Wallis*, seguido pelo pós-teste de *Dunns*, foi aplicado para realização das análises estatísticas. a: representa diferença significativa em relação ao grupo não infectado. b: representa diferença significativa em relação ao grupo Q β -controle. c: representa diferença significativa em relação ao grupo Q β -TS. d: representa diferença significativa em relação ao grupo Q β -MASP. e: representa diferença significativa em relação ao grupo Q β - α -Gal. f: representa diferença significativa em relação ao grupo Q β -TS/MASP. g: representa diferença significativa em relação ao grupo Q β -TS/ α -Gal. h: representa diferença significativa em relação ao grupo Q β -MASP/ α -Gal. i: representa diferença significativa em relação ao grupo Q β -TS/MASP/ α -Gal. Os símbolos indicam: *($p < 0,05$), **($p < 0,01$), *** ($p < 0,001$) e **** ($p < 0,0001$). DPI indica: dias após infecção.

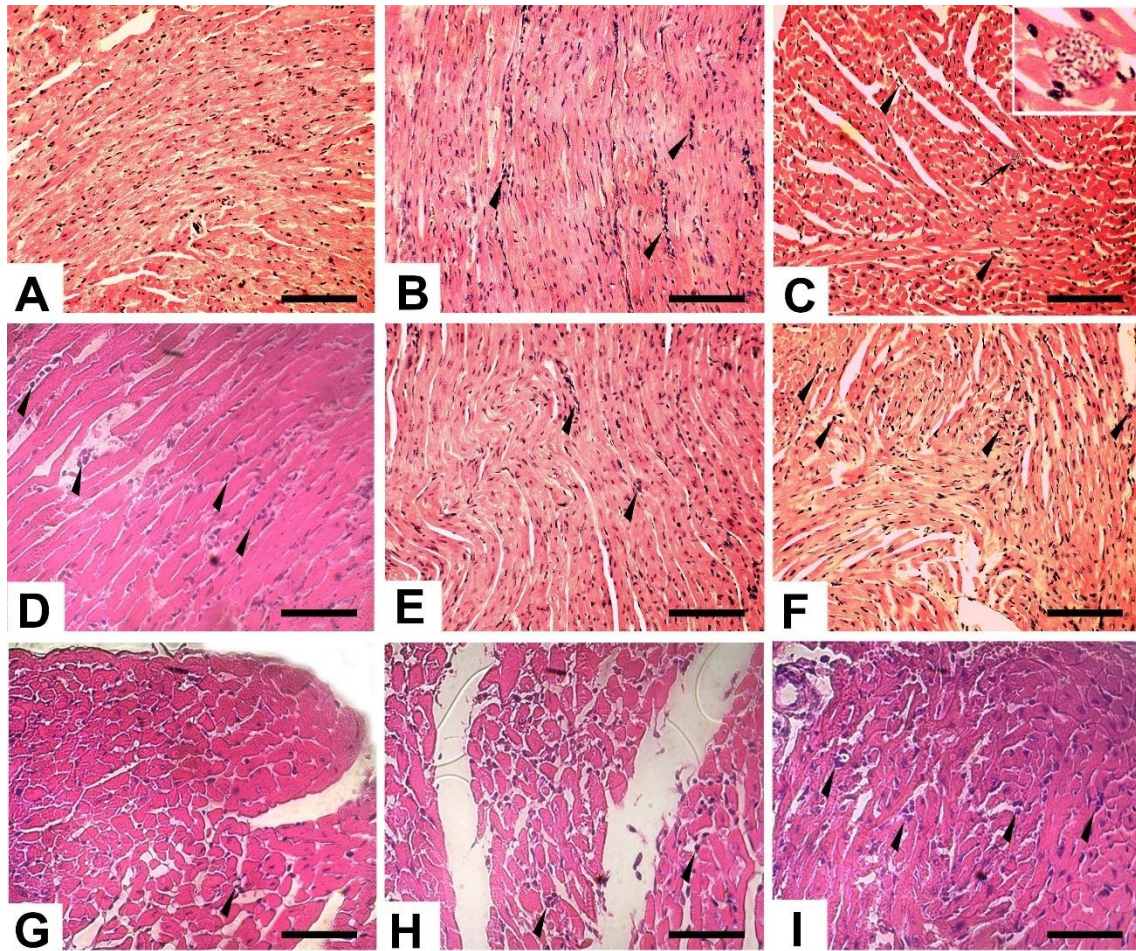


Figura 15. Fotomicrografia de corte histológico do coração de camundongos C57BL/6 $\alpha 1,3GT-KO$, fêmeas que receberam doses de $Q\beta$ -controle e foram vacinados, eutanasiados após 8 dias de infecção pela cepa Y de *T. cruzi*. (A) Grupo Controle não infectado e não vacinado: corte histológico do coração apresentando aspecto habitual. (B) Grupo Controle infectado não vacinado ($Q\beta$ -controle): infiltrado inflamatório moderado no miocárdio (cabeças de setas). (C) $Q\beta$ -TS: presença de infiltrado inflamatório moderado no miocárdio (cabeças de setas); presença de ninho de amastigotas (setas); detalhes do ninho de amastigotas (*insert*). (D) $Q\beta$ -MASP: presença de infiltrado inflamatório intenso no miocárdio (cabeças de setas). (E) $Q\beta$ - α -Gal: infiltrado inflamatório moderado no miocárdio (cabeças de setas). (F) $Q\beta$ -TS/MASP: presença de infiltrado inflamatório moderado no miocárdio (cabeças de setas). (G) $Q\beta$ -TS/ α -Gal: infiltrado inflamatório discreto no miocárdio (cabeças de setas). (H) $Q\beta$ -MASP/ α -Gal: infiltrado inflamatório discreto no miocárdio (cabeças de setas). (I) $Q\beta$ -TS/MASP/ α -Gal: presença de infiltrado inflamatório intenso no miocárdio (cabeças de setas). Coloração Hematoxilina e eosina, barra = 50 μm .

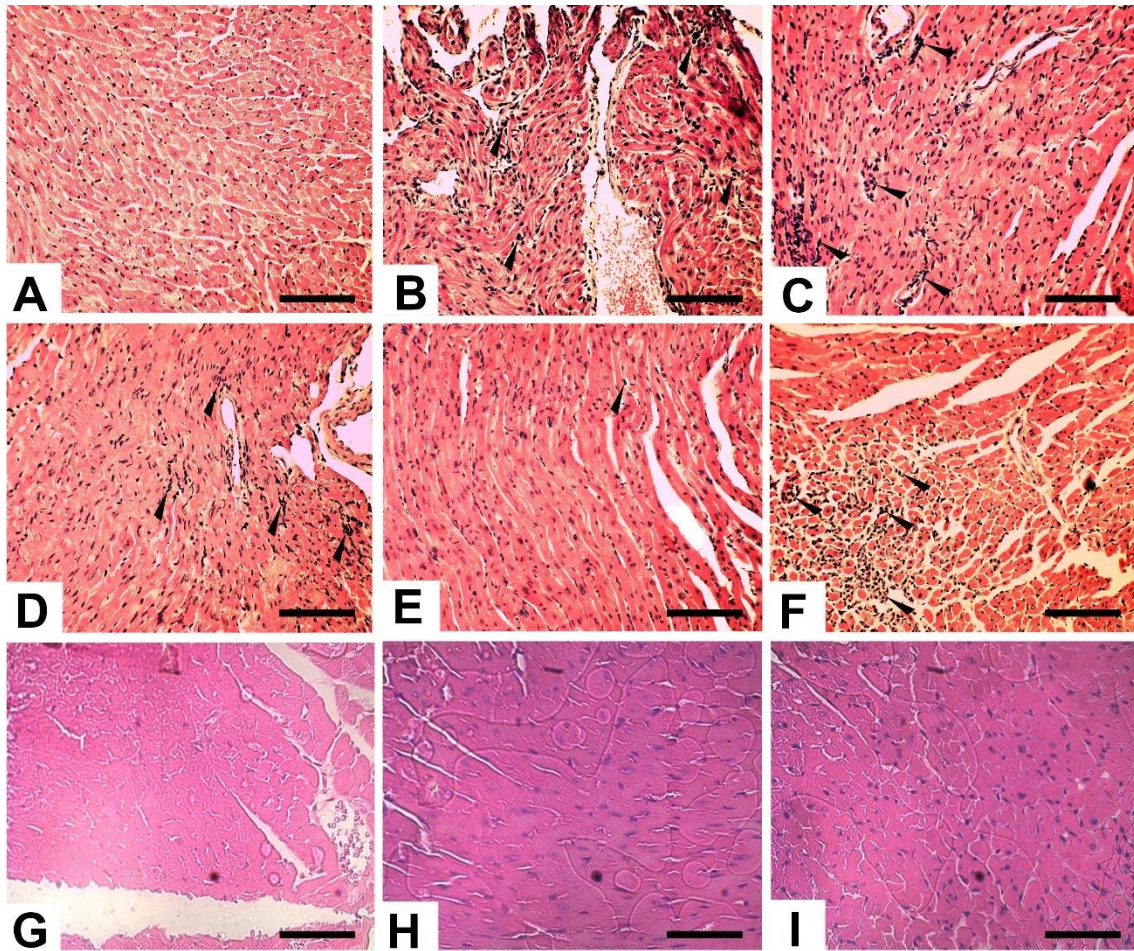


Figura 16. Fotomicrografia de corte histológico do coração de camundongos C57BL/6 $\alpha 1,3GT$ -KO, fêmeas que receberam doses de Q β -controle e foram vacinados, eutanasiados após 36 dias de infecção pela cepa Y de *T. cruzi*. (A) Grupo Controle não infectado e não vacinado: corte histológico do coração apresentado aspecto habitual. (B) Grupo Controle infectado não vacinado (Q β -controle): presença de infiltrado inflamatório intenso no miocárdio (cabeças de setas). (C) Q β -TS: presença de infiltrado inflamatório moderado no miocárdio (cabeças de setas). (D) Q β -MASP: presença de infiltrado inflamatório moderado no miocárdio (cabeças de setas). (E) Q β - α -Gal: infiltrado inflamatório discreto no miocárdio (cabeças de setas). (F) Q β -TS/MASP: presença de infiltrado inflamatório moderado no miocárdio (cabeças de setas). (G) Q β -TS/ α -Gal: corte histológico do coração apresentado aspecto habitual, ausência de infiltrado inflamatório. (H) Q β -MASP/ α -Gal: corte histológico do coração apresentado aspecto habitual, ausência de infiltrado inflamatório. (I) Q β -TS/MASP/ α -Gal: corte histológico do coração apresentado aspecto habitual, ausência de infiltrado inflamatório. Coloração Hematoxilina e eosina, barra = 50 μ m.

Nenhuma diferença estatística significativa foi observada, entre os níveis de alterações degenerativas quantificados nas secções dos corações de camundongos vacinados com: Q β -TS, Q β -MASP, Q β - α -Gal, Q β -TS/MASP e Q β -TS/ α -Gal, quando comparados com os de camundongos que receberam doses de Q β -controle, 8 dias após a infecção, durante a fase aguda. No entanto, camundongos vacinados com: Q β -MASP/ α -Gal e Q β -TS/MASP/ α -Gal, apresentaram níveis de alterações degenerativas significativamente menores ($p < 0,05$), que os observados em camundongos que receberam doses de Q β -controle. Enquanto camundongos que receberam doses de Q β -TS apresentaram níveis significativamente maiores, em relação aos de camundongos que receberam doses de: Q β -MASP/ α -Gal ($p < 0,01$), Q β -TS/MASP/ α -Gal ($p < 0,01$), Q β -MASP ($p < 0,05$), Q β - α -Gal ($p < 0,05$), Q β -TS/MASP ($p < 0,05$) e Q β -TS/ α -Gal ($p < 0,05$). Diferenças estatísticas significativas também foram encontradas entre os grupos não infectados, que não apresentaram alterações degenerativas e os grupos que receberam doses de: Q β -controle ($p < 0,001$), Q β -TS ($p < 0,001$), Q β -MASP ($p < 0,01$), Q β -MASP/ α -Gal ($p < 0,01$), Q β -TS/MASP/ α -Gal ($p < 0,01$), Q β - α -Gal ($p < 0,05$), Q β -TS/MASP ($p < 0,05$), Q β -TS/ α -Gal ($p < 0,05$), (**Fig. 17A**).

Durante este período, níveis moderados de alterações degenerativas prevaleceram nos tecidos cardíacos de camundongos vacinados com Q β -TS. A intensidade variou de moderada a baixa entre os cortes histológicos de camundongos que receberam doses de: Q β -controle e Q β -MASP. Em camundongos vacinados com: Q β - α -Gal, Q β -TS/MASP e Q β -TS/ α -Gal, alterações degenerativas eram ausentes ou apresentava baixos níveis, em 80% (4/5) das secções avaliadas. Enquanto baixos níveis prevaleceram em camundongos vacinados com: Q β -MASP/ α -Gal e Q β -TS/MASP/ α -Gal. Os camundongos que receberam doses de: Q β -TS, Q β -controle, Q β -MASP, Q β -TS/MASP, Q β - α -Gal, Q β -MASP/ α -Gal, Q β -TS/MASP/ α -Gal e Q β -TS/ α -Gal, apresentaram uma média e SEM de intensidade das alterações degenerativas de: 2 ± 0 ; $1,571 \pm 0,202$; $1,4 \pm 0,245$; $1 \pm 0,316$; $1 \pm 0,316$; 1 ± 0 ; 1 ± 0 ; $0,8 \pm 0,374$, respectivamente (**Fig. 17A**).

Aos 36 dias após a infecção, os tecidos cardíacos dos camundongos que receberam doses de: Q β -controle, Q β -MASP, Q β - α -Gal, Q β -TS/MASP, Q β -TS/ α -Gal, Q β -MASP/ α -Gal e TS/MASP/ α -Gal não apresentaram alterações degenerativas. Enquanto

foram observadas em 40% (2/5) dos camundongos vacinados com Q β -TS, que apresentaram uma média e SEM de intensidade das alterações degenerativas de: $0,8 \pm 0,583$. Nenhuma diferença estatística significativa entre os níveis de alterações degenerativas dos diferentes grupos experimentais foi encontrada (**Fig. 17B**).

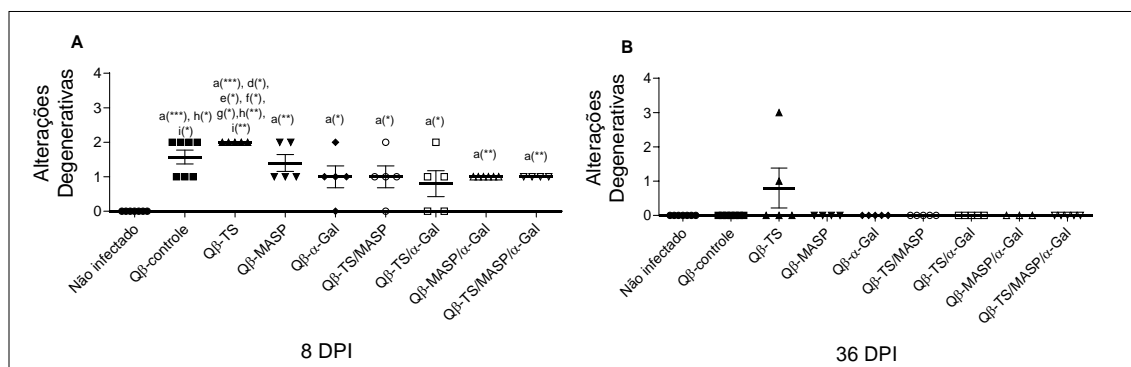


Figura 17. Análise semi-quantitativa das alterações degenerativas, em secções dos corações de camundongos C57BL/6 α 1,3GT-KO fêmeas que receberam doses de Q β -controle e foram vacinados com: Q β -TS, Q β -MASP, Q β - α -Gal, Q β -TS/MASP, Q β -TS/ α -Gal, Q β -MASP/ α -Gal e Q β -TS/MASP/ α -Gal (n=5-10), infectados pela cepa Y de *T. cruzi*. (A) Camundongos eutanasiados 8 dias após a infecção. (B) Camundongos eutanasiados 36 dias após a infecção. Os resultados estão apresentados em gráficos de dispersão como média e SEM da intensidade das alterações degenerativas. O teste de ANOVA *one way*, seguido pelo pós-teste de *Tukey*, foi aplicado para realização das análises estatísticas. a: representa diferença significativa em relação ao grupo não infectado. d: representa diferença significativa em relação ao grupo Q β -MASP. e: representa diferença significativa em relação ao grupo Q β - α -Gal. f: representa diferença significativa em relação ao grupo Q β -TS/MASP. g: representa diferença significativa em relação ao grupo Q β -TS/ α -Gal. h: representa diferença significativa em relação ao grupo Q β -MASP/ α -Gal. i: representa diferença significativa em relação ao grupo Q β -TS/MASP/ α -Gal. Os símbolos indicam: *($p < 0,05$), **($p < 0,01$) e *** ($p < 0,001$). DPI indica: dias após infecção.

Além disso, diferenças estatísticas significativas foram encontradas 8 dias após a infecção, durante a fase aguda, entre os grupos não infectados, que não apresentaram hipertrofia das fibras musculares do coração e os grupos infectados que receberam doses de: Q β -controle ($p < 0,01$), Q β -TS ($p < 0,01$), Q β -MASP ($p < 0,01$), Q β - α -Gal ($p < 0,05$), Q β -TS/MASP ($p < 0,05$), Q β -MASP/ α -Gal ($p < 0,01$), Q β -TS/MASP/ α -Gal ($p < 0,01$) e Q β -TS/ α -Gal ($p < 0,05$). Nenhuma outra diferença estatística significativa foi observada, entre os grupos experimentais avaliados. Durante este período, baixos níveis de hipertrofia

prevaleceram entre os camundongos vacinados e que receberam doses de Q β -controle (**Fig. 18A**).

Por outro lado, aos 36 dias após a infecção, camundongos vacinados com Q β -TS, ($p < 0,05$) apresentaram níveis de hipertrofia das fibras musculares no coração significativamente menores, que os observados em camundongos que pertencem ao grupo que receberam doses de Q β -controle. Diferenças estatísticas significativas também foram encontradas entre camundongos não infectados, infectados e vacinados com: Q β - α -Gal, Q β -TS/ α -Gal, Q β -MASP/ α -Gal e Q β -TS/MASP/ α -Gal, que não apresentaram hipertrofia e os grupos que receberam doses de: Q β -controle ($p < 0,0001$) e Q β -TS ($p < 0,05$). Nenhuma outra diferença estatística significativa foi observada, entre os níveis de hipertrofia das fibras musculares no coração dos diferentes grupos experimentais (**Fig. 18B**).

Durante este período, níveis de hipertrofia que variaram de alto a moderado prevaleceram em camundongos que receberam doses de Q β -controle. Em camundongos vacinados com Q β -TS e Q β -TS/MASP a hipertrofia era ausente ou apresentava baixos níveis em 60% (3/5) das secções do coração avaliadas. Entre os camundongos vacinados com: Q β -MASP esta percentagem foi de 75% (3/4). Enquanto não foi encontrada em cortes histológicos de camundongos vacinados com: Q β - α -Gal, Q β -TS/ α -Gal, Q β -MASP/ α -Gal e Q β -TS/MASP/ α -Gal (**Fig. 18B**). Os camundongos que receberam doses de: Q β -controle, Q β -TS, Q β -MASP e Q β -TS/MASP apresentaram uma média e SEM de intensidade de hipertrofia das fibras musculares de: $2,667 \pm 0,333$; $1,2 \pm 0,374$; $1 \pm 0,707$ e $1 \pm 0,632$, respectivamente.

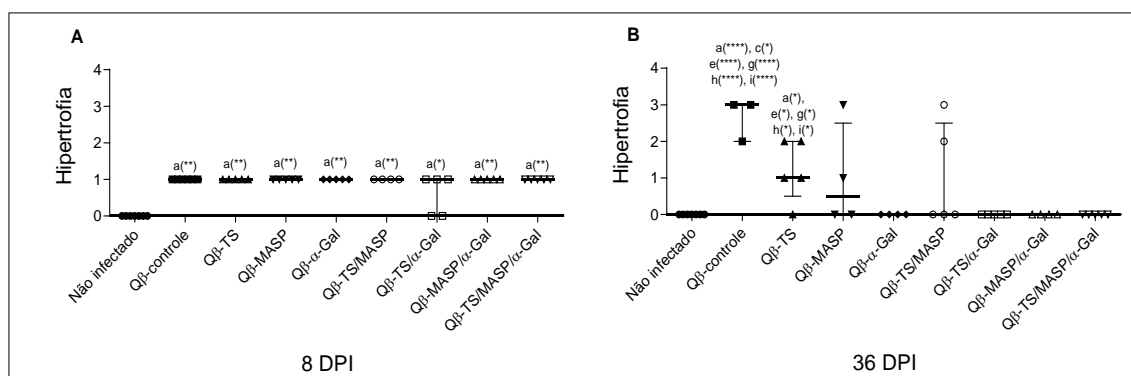


Figura 18. Análise semi-quantitativa da hipertrofia das fibras musculares em secções dos corações de camundongos C57BL/6 α 1,3GT-KO fêmeas que receberam doses de Q β -controle e foram vacinados com: Q β -TS, Q β -MASP, Q β - α -Gal, Q β -TS/MASP, Q β -TS/ α -Gal, Q β -MASP/ α -Gal e Q β -TS/MASP/ α -Gal (n=5-10), infectados pela cepa Y de *T. cruzi*. (A) Camundongos eutanasiados 8 dias após a infecção. (B) Camundongos eutanasiados 36 dias após a infecção. Os resultados estão apresentados em gráficos de dispersão como mediana e intervalo interquartil da intensidade da hipertrofia das fibras musculares. O teste de *Kruskal-Wallis*, seguido pelo pós-teste de *Dunns*, foi aplicado para realização das análises estatísticas. a: representa diferença significativa em relação ao grupo não infectado. c: representa diferença significativa em relação ao grupo Q β -TS. e: representa diferença significativa em relação ao grupo Q β - α -Gal. g: representa diferença significativa em relação ao grupo Q β -TS/ α -Gal. h: representa diferença significativa em relação ao grupo Q β -MASP/ α -Gal. i: representa diferença significativa em relação ao grupo Q β -TS/MASP/ α -Gal. Os símbolos indicam: *($p < 0,05$), **($p < 0,01$) e ****($p < 0,0001$). DPI indica: dias após infecção.

5.1.5. Perfil de citocinas teciduais em camundongos vacinados durante a infecção experimental

Os níveis das citocinas teciduais pró-inflamatórias: IL-12p40, IFN- γ e anti-inflamatória/moduladora: IL-4, IL-10, apresentados por camundongos C57BL/6 α 1,3GT-KO vacinados, que receberam doses do Q β -controle, infectados pela cepa Y de *T. cruzi* e que não sofreram nenhum tipo de intervenção (n=5-10 por grupo), foram quantificados através do ensaio de ELISA de captura. Os grupos experimentais vacinados que receberam doses dos peptídeos selecionados a partir das proteínas: TS, MASP, do epítipo α -Gal e das associações TS/MASP, TS/ α -Gal, MASP/ α -Gal, TS/MASP/ α -Gal, acoplados ao Q β -VLP foram eutanasiados 8 e 36 dias após a infecção, durante a fase aguda e crônica, respectivamente. Camundongos que receberam doses do Q β -controle, foram incluídos como grupo controle infectado não vacinado e camundongos que não sofreram

nenhum tipo de intervenção, foram incluídos como grupo controle não infectado.

Os dados demonstraram maior nível de citocinas pró-inflamatórias: IL-12p40 e IFN- γ , nos tecidos cardíacos dos grupos experimentais que receberam doses de: Q β -TS ($p < 0,05$, $p < 0,01$), Q β -MASP/ α -Gal ($p < 0,05$, $p < 0,01$), Q β -controle ($p < 0,01$), Q β -TS/MASP ($p < 0,01$), Q β -MASP ($p < 0,01$, $p < 0,001$), Q β - α -Gal ($p < 0,001$) e Q β -TS/MASP/ α -Gal ($p < 0,001$), quando comparados com o do grupo experimental não infectado, 8 dias após a infecção, durante a fase aguda. O valor médio e o SEM descrito entre os parênteses da concentração da citocina IFN- γ apresentado pelo grupo vacinado com Q β -TS/ α -Gal ($819,7 \pm 305,3$) é de aproximadamente 6 vezes maior, quando comparada com o exibido pelo grupo não infectado ($133,0 \pm 39,60$), respectivamente. No entanto, nenhuma diferença estatisticamente significativa foi observada para os níveis desta citocina entre estes grupos (**Fig. 19 A e C**).

Neste mesmo período após a infecção, camundongos que receberam doses de Q β -MASP/ α -Gal apresentaram níveis de IFN- γ , nos tecidos cardíacos significativamente mais baixos ($p < 0,05$), que os encontrados em camundongos que receberam doses de Q β -TS/MASP/ α -Gal. Enquanto que nenhuma outra diferença estatística significativa foi observada para os níveis das citocinas IL-12p40 e IFN- γ , entre os grupos que receberam doses de: Q β -controle, Q β -TS, Q β -MASP, Q β - α -Gal, Q β -TS/MASP, Q β -TS/ α -Gal, Q β -MASP/ α -Gal, Q β -TS/MASP/ α -Gal (**Fig. 19 A e C**). Aos 36 dias após a infecção nenhuma diferença estatística significativa foi observada para os níveis das citocinas IL-12p40 e IFN- γ , entre os grupos: não infectados, que receberam doses de: Q β -controle, Q β -TS, Q β -MASP, Q β - α -Gal, Q β -TS/MASP, Q β -TS/ α -Gal, Q β -MASP/ α -Gal e Q β -TS/MASP/ α -Gal (**Fig. 19 B e D**).

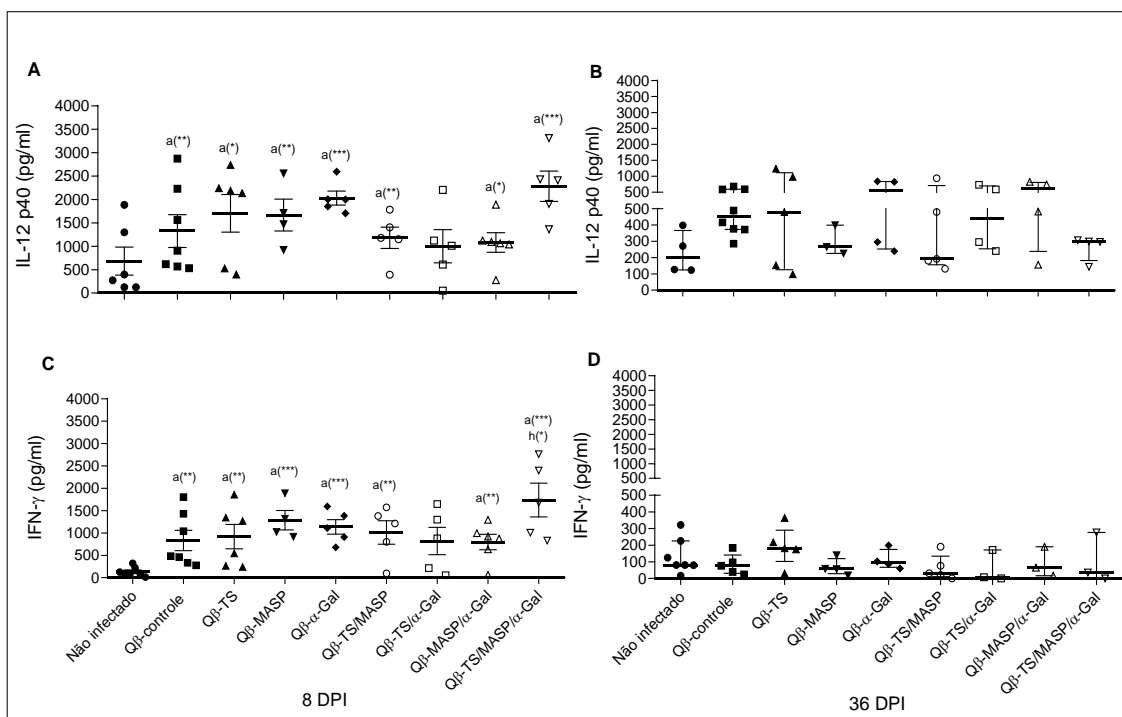


Figura 19. Avaliação do perfil de citocinas teciduais pró-inflamatórias IL-12p40 e IFN- γ em camundongos C57BL/6 α 1,3GT-KO fêmeas que receberam doses de Q β -controle e vacinados com: Q β -TS, Q β -MASP, Q β - α -Gal, Q β -TS/MASP, Q β -TS/ α -Gal, Q β -MASP/ α -Gal e Q β -TS/MASP/ α -Gal, infectados pela cepa Y de *T. cruzi* e não infectados (n=5-6 por grupo). (A) Níveis de IL-12p40 em pg/ml em camundongos eutanasiados 8 dias após a infecção. (B) Níveis de IL-12p40 em pg/ml camundongos eutanasiados 36 dias após a infecção. (C) Níveis de IFN- γ em pg/ml em camundongos eutanasiados 8 dias após a infecção. (D) Níveis de IFN- γ em pg/ml camundongos eutanasiados 36 dias após a infecção. Nos gráficos A e C estão representados os valores da média e SEM. O teste de ANOVA *one way*, seguido pelo pós-teste de *Tukey*, foi aplicado para realização das análises estatísticas. Nos gráficos B e D estão representados os valores da mediana e o intervalo interquartil. O teste de *Kruskal-Wallis*, seguido pelo pós-teste de *Dunns*, foi aplicado para realização das análises estatísticas. a: representa diferença significativa em relação ao grupo não infectado. h: representa diferença significativa em relação ao grupo Q β -MASP/ α -Gal. Os símbolos indicam: *($p < 0,05$), **($p < 0,01$) e *** ($p < 0,001$). DPI indica: dias após infecção.

Além disso, os resultados mostraram que durante 8^o e 36^o dia após a infecção, nenhuma diferença estatística significativa foi observada para os níveis das citocinas IL-4 e IL-10, entre os grupos: não infectados, que receberam doses de: Q β -controle, Q β -TS, Q β -MASP, Q β - α -Gal, Q β -TS/MASP, Q β -TS/ α -Gal, Q β -MASP/ α -Gal e Q β -TS/MASP/ α -Gal (**Fig. 20 A, B, C e D**).

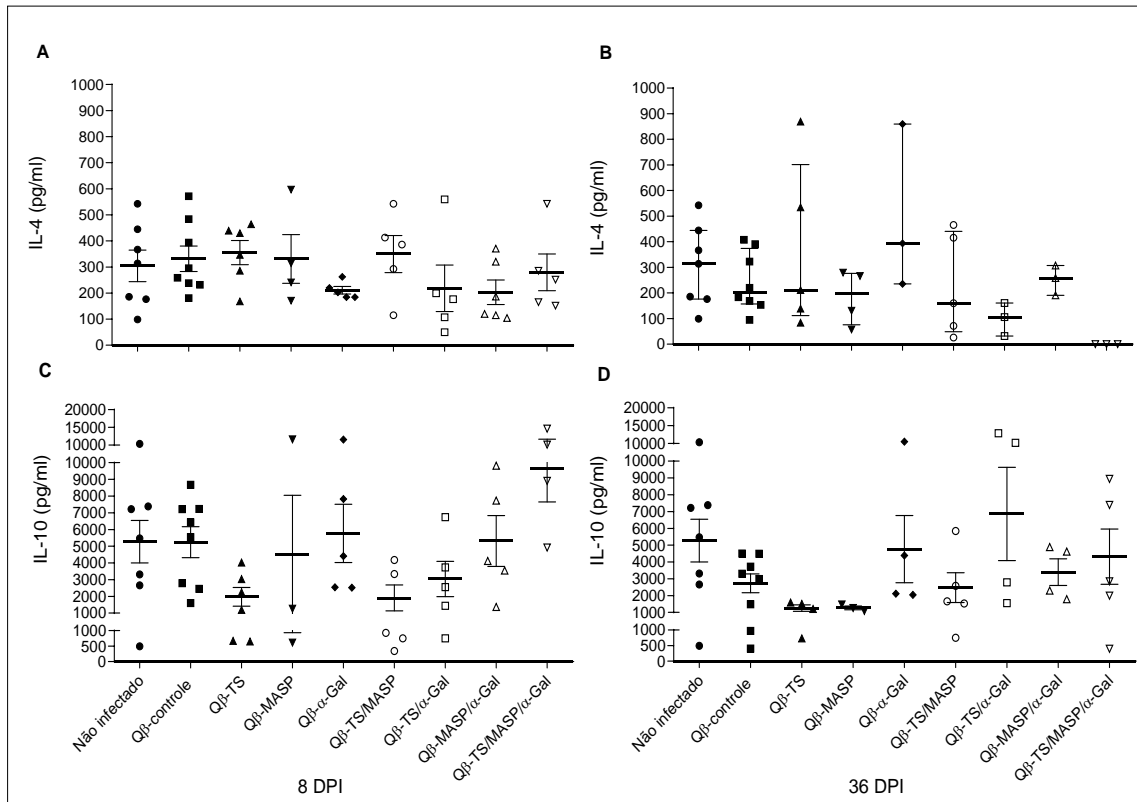


Figura 20. Avaliação do perfil de citocinas teciduais anti-inflamatórias/moduladoras IL-4 e IL-10 em camundongos C57BL/6 $\alpha 1,3GT$ -KO fêmeas que receberam doses de Q β -controle e vacinados com: Q β -TS, Q β -MASP, Q β - α -Gal, Q β -TS/MASP, Q β -TS/ α -Gal, Q β -MASP/ α -Gal e Q β -TS/MASP/ α -Gal, infectados pela cepa Y de *T. cruzi* e não infectados (n=5-6 por grupo). (A) Níveis de IL-4 em pg/ml em camundongos eutanasiados 8 dias após a infecção. (B) Níveis de IL-4 em pg/ml camundongos eutanasiados 36 dias após a infecção. (C) Níveis de IL-10 em pg/ml em camundongos eutanasiados 8 dias após a infecção. (D) Níveis de IL-10 em pg/ml camundongos eutanasiados 36 dias após a infecção. Nos gráficos A, C e D estão representados os valores da média e SEM. O teste de ANOVA *one way*, seguido pelo pós-teste de Tukey, foi aplicado para realização das análises estatísticas. No gráfico B está representado os valores da mediana e o intervalo interquartil. O teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo pós-teste de Dunns, foi aplicado para realização das análises estatísticas. DPI indica: dias após infecção.

5.2. TÓPICO II: Eficácia dos peptídeos selecionados a partir das proteínas: TS e MASP, do epítipo α -Gal e das associações: TS/MASP, TS/ α -Gal, MASP/ α -Gal e TS/MASP/ α -Gal, acoplados ao Q β -VLP como antígenos vacinais contra a infecção pela cepa Colombiana do *T. cruzi*, em camundongos C57BL/6 α 1,3GT-KO

5.2.1. Cinética da resposta imune humoral em camundongos vacinados e infectados

Os níveis de anticorpos IgG total reativos aos peptídeos selecionados a partir das proteínas: TS, MASP e ao epítipo α -Gal foram avaliados antes das vacinações (pré-vacinação), 5 dias após a 3ª dose (pré-infecção), 22 e 190 dias após a infecção pela cepa Colombiana de *T. cruzi*, no soro dos camundongos C57BL/6 α 1,3GT-KO (n=5-6 por grupo). A concentração dos anticorpos foi quantificada através do ensaio de ELISA.

Anticorpos IgG total anti-TS foram dosados em amostras de camundongos que receberam doses de: Q β -TS, Q β -TS/MASP, Q β -TS/ α -Gal e Q β -TS/MASP/ α -Gal. Enquanto anticorpos IgG total anti-MASP foram dosados em amostras de camundongos que receberam doses de: Q β -MASP, Q β -TS/MASP, Q β -MASP/ α -Gal e Q β -TS/MASP/ α -Gal. Já anticorpos IgG total anti- α -Gal foram dosados em amostras de camundongos que receberam doses de: Q β - α -Gal, Q β -TS/ α -Gal, Q β -MASP/ α -Gal e Q β -TS/MASP/ α -Gal.

As análises estatísticas dos dados, mostraram diferenças estatísticas significativas entre os níveis de anticorpos IgG total anti-TS, anti-MASP e anti- α -Gal apresentados pelas amostras de soro coletadas antes e após as vacinações (5 dias após a 3ª dose, 22 e 190 dias após a infecção). Os resultados demonstraram que as vacinações provocaram uma elevada produção de anticorpos, que se mantém ao longo da infecção, por pelo menos 190 dias após, quando os camundongos foram eutanasiados (**Fig. 21, 22 e 23**).

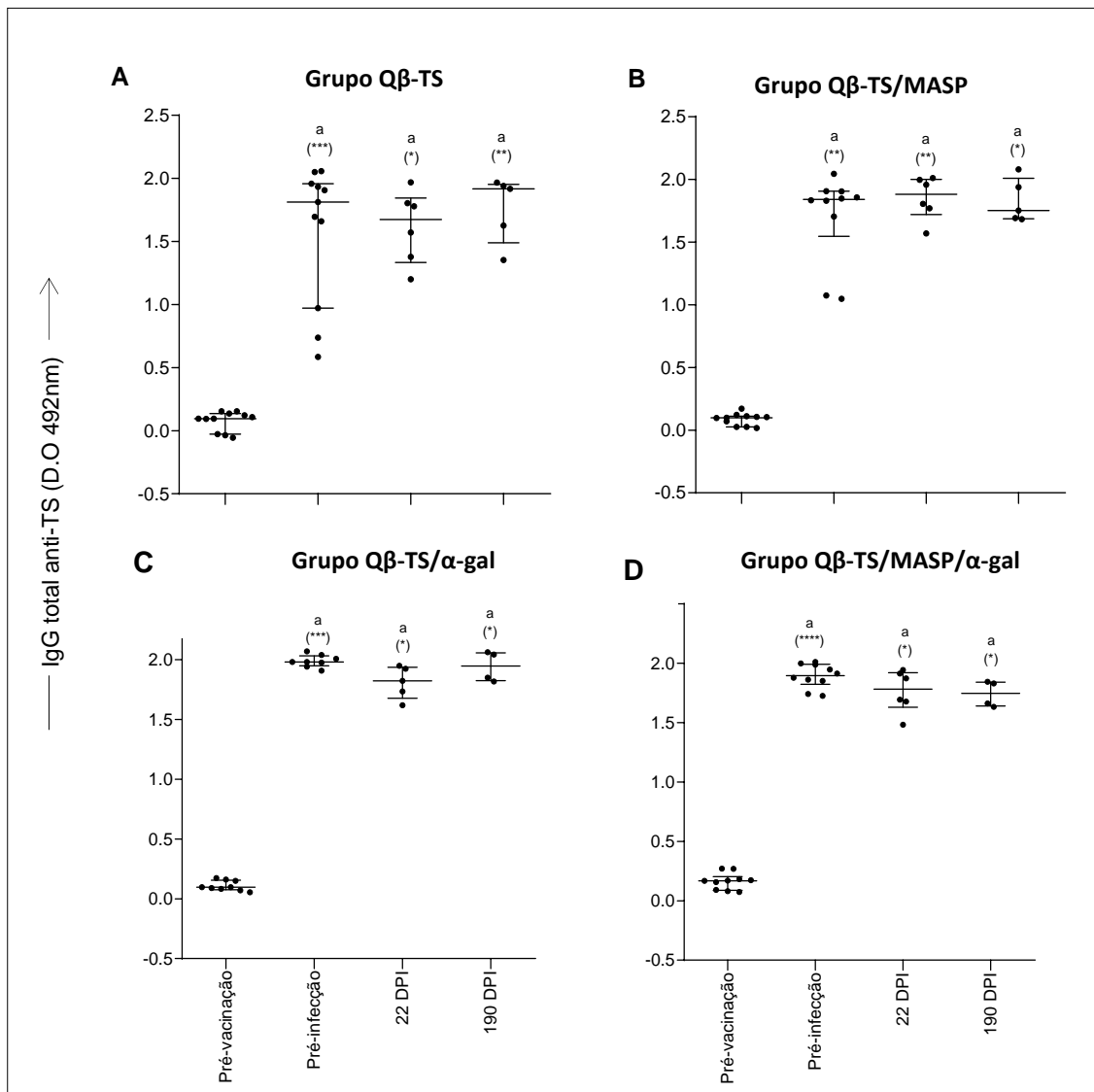


Figura 21. Concentração de anticorpos IgG total reativos ao peptídeo selecionado a partir da proteína TS avaliados antes das vacinações (pré-vacinação), 5 dias após a 3^o dose (pré-infecção), 22 e 190 dias após a infecção (DPI) pela cepa Colombiana de *T. cruzi*, no soro de camundongos C57BL/6 α 1,3GT-KO fêmeas (n=5-6). (A) Camundongos vacinados com Q β -TS. (B) Camundongos vacinados com Q β -TS/MASP. (C) Camundongos vacinados com Q β -TS/ α -Gal. (D) Camundongos vacinados com Q β -TS/MASP/ α -Gal. Os resultados estão representados nos gráficos de dispersão destacando a mediana e o intervalo interquartil das absorbâncias. O teste de *Kruskal-Wallis*, seguido pelo pós-teste de *Dunns*, foi aplicado para realização das análises estatísticas dos dados. a: representa diferença significativa em relação as amostras de soro coletadas antes das vacinações (pré-vacinação). Os símbolos indicam: *($p < 0,05$), **($p < 0,01$), ***($p < 0,001$) e ****($p < 0,0001$).

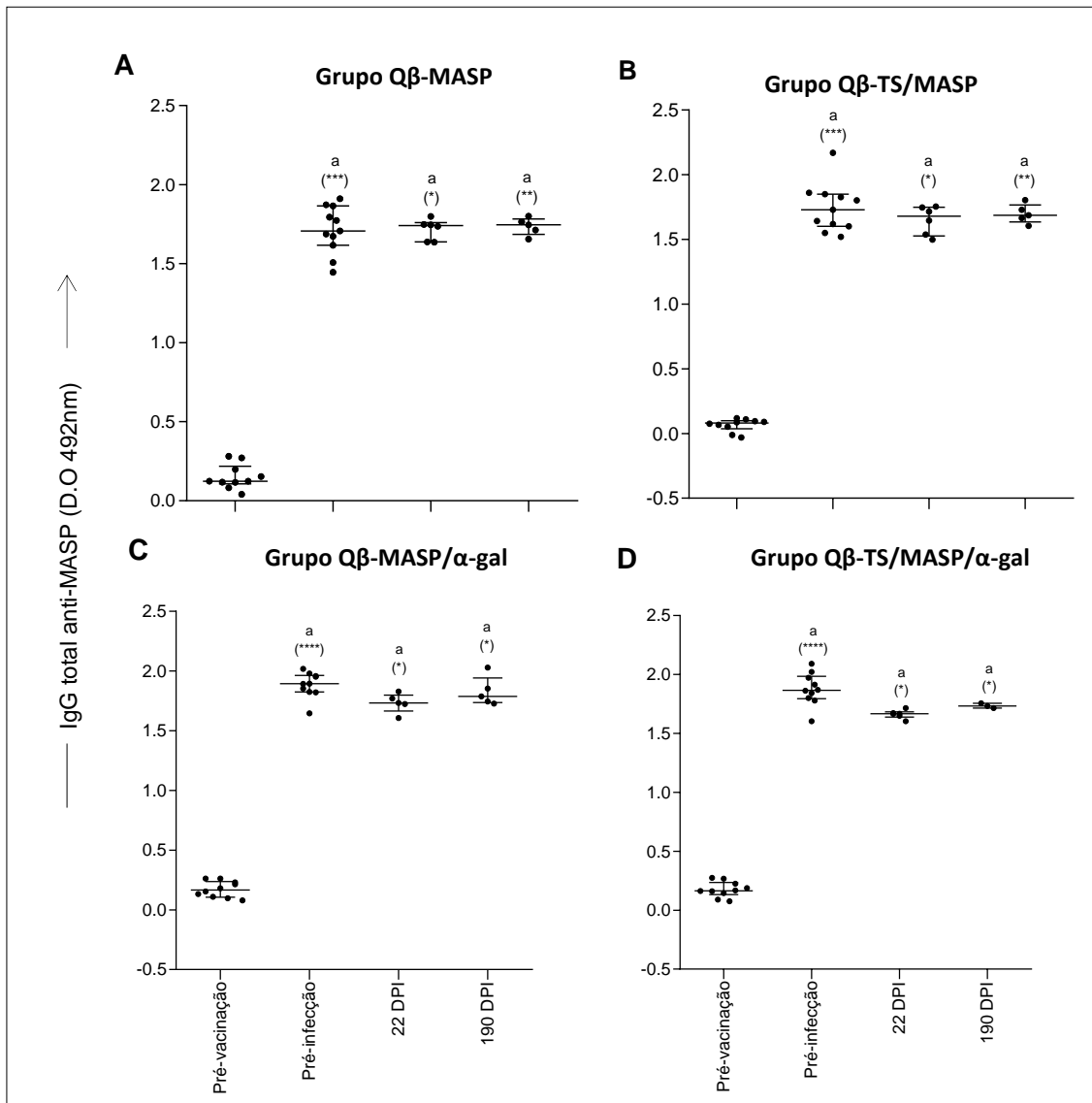


Figura 22. Concentração de anticorpos IgG total relativos ao peptídeo selecionado a partir da proteína MASP avaliados antes das vacinações (pré-vacinação), 5 dias após a 3ª dose (pré-infecção), 22 e 190 dias após a infecção (DPI) pela cepa Colombiana de *T. cruzi*, no soro de camundongos C57BL/6 $\alpha 1,3GT$ -KO fêmeas (n=5-6). (A) Camundongos vacinados com Q β -MASP. (B) Camundongos vacinados com Q β -TS/MASP. (C) Camundongos vacinados com Q β -MASP/ α -Gal. (D) Camundongos vacinados com Q β -TS/MASP/ α -Gal. Os resultados estão representados nos gráficos de dispersão destacando a mediana e o intervalo interquartil das absorbâncias. O teste de *Kruskal-Wallis*, seguido pelo pós-teste de *Dunns*, foi aplicado para realização das análises estatísticas dos dados. a: representa diferença significativa em relação as amostras de soro coletadas antes das vacinações (pré-vacinação). Os símbolos indicam: *($p < 0,05$), **($p < 0,01$), ***($p < 0,001$) e ****($p < 0,0001$).

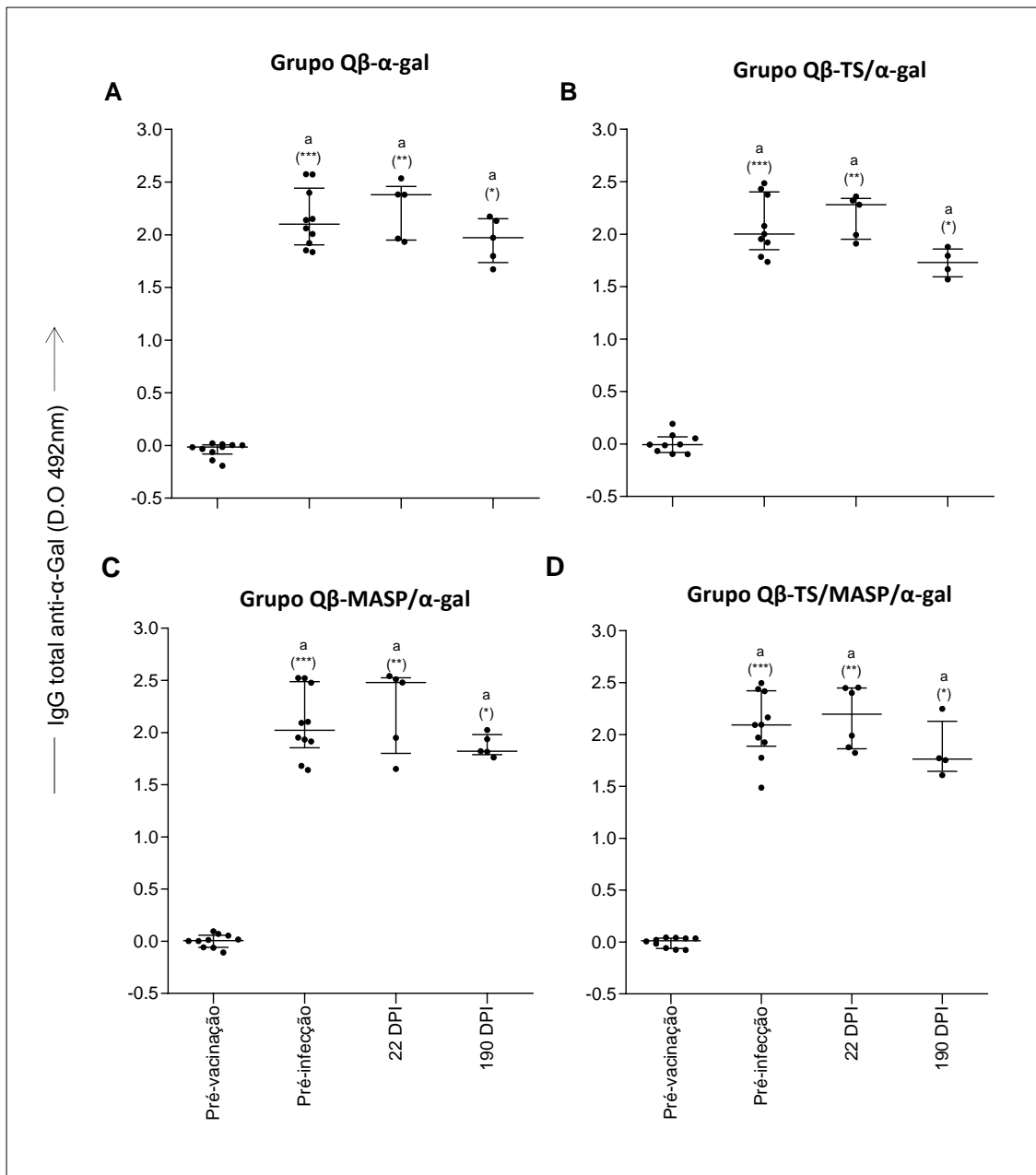


Figura 23. Concentração de anticorpos IgG total reativos ao epítipo α -Gal avaliados antes das vacinações (pré-vacinação), 5 dias após a 3ª dose (pré-infecção), 22 e 190 dias após a infecção (DPI) pela cepa Colombiana de *T. cruzi*, no soro de camundongos C57BL/6 α 1,3GT-KO fêmeas (n=5-6). (A) Camundongos vacinados com Q β - α -Gal. (B) Camundongos vacinados com Q β -TS/ α -Gal. (C) Camundongos vacinados com Q β -MASP/ α -Gal. (D) Camundongos vacinados com Q β -TS/MASP/ α -Gal. Os resultados estão representados nos gráficos de dispersão destacando a mediana e o intervalo interquartil das absorbâncias. O teste de *Kruskal-Wallis*, seguido pelo pós-teste de *Dunns*, foi aplicado para realização das análises estatísticas dos dados. a: representa diferença significativa em relação as amostras de soro coletadas antes das vacinações (pré-vacinação). Os símbolos indicam: *($p < 0,05$), **($p < 0,01$) e ***($p < 0,001$).

As análises comparativas das absorbâncias mostraram que camundongos vacinados com Q β -TS/ α -Gal ($1,99 \pm 0,018$) apresentaram concentrações de anticorpos IgG total anti-TS significativamente maiores, em relação aos grupos que receberam doses de: Q β -TS/MASP ($1,71 \pm 0,11$, $p < 0,05$), Q β -TS ($1,58 \pm 0,16$, $p < 0,05$), 5 dias após a 3^o dose (pré-infecção) (**Fig. 24 A**).

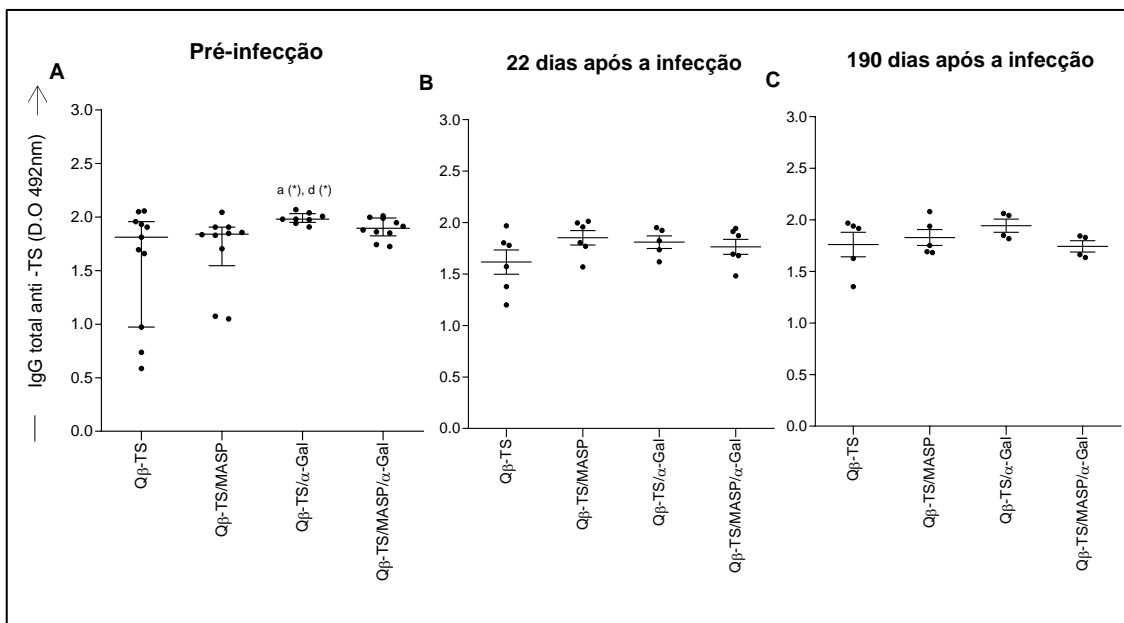


Figura 24 A, B e C. Concentração de anticorpos IgG total reativos ao peptídeo selecionado a partir da proteína TS em amostras de soro de camundongos que receberam doses de: Q β -TS, Q β -TS/MASP, Q β -TS/ α -Gal e Q β -TS/MASP/ α -Gal. (A) 5 dias após a 3^o dose (pré-infecção). (B) 22 dias após a infecção (DPI). (C) 190 dias após a infecção (DPI). Os resultados estão representados nos gráficos de dispersão B e C destacando a média e SEM das absorbâncias. O teste de ANOVA *one way*, seguido pelo pós-teste de *Tukey*, foi aplicado para realização das análises estatísticas dos resultados. No gráfico de dispersão A estão representados destacando a mediana e o intervalo interquartil das absorbâncias. O teste de *Kruskal-Wallis*, seguido pelo pós-teste de *Dunns*, foi aplicado para realização das análises estatísticas dos resultados. a: representa diferença significativa em relação ao grupo Q β -TS, b: representa diferença significativa em relação ao grupo Q β -MASP, c: representa diferença significativa em relação ao grupo Q β - α -Gal, d: representa diferença significativa em relação ao grupo Q β -TS/MASP, e: representa diferença significativa em relação ao grupo Q β -TS/ α -Gal, f: representa diferença significativa em relação ao grupo Q β -MASP/ α -Gal e g: representa diferença significativa em relação ao grupo Q β -TS/MASP/ α -Gal. Os símbolos indicam: * ($p < 0,05$).

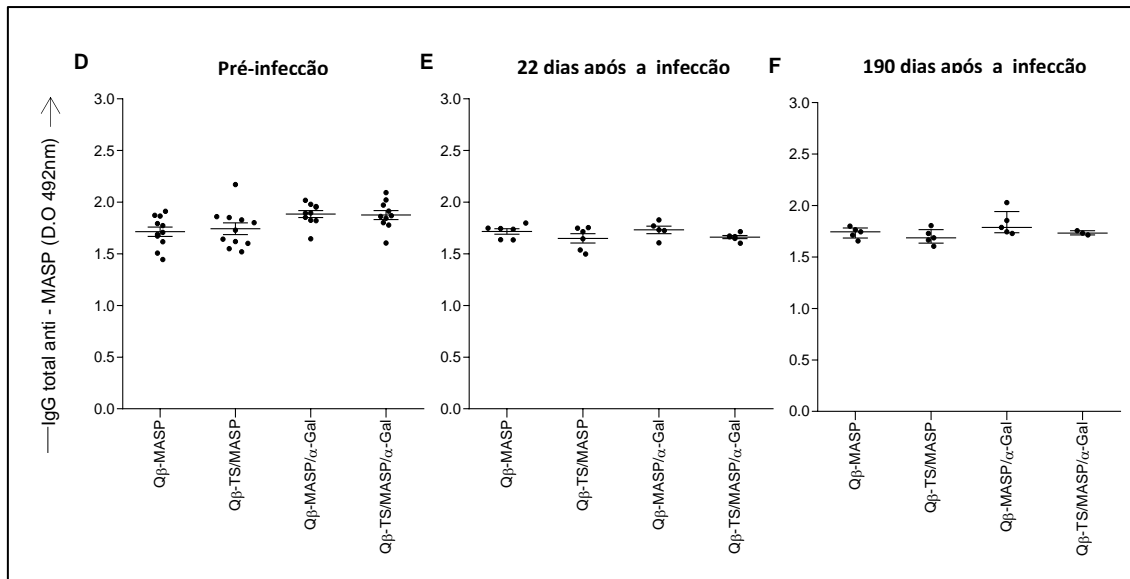


Figura 24 D, E e F. Concentração de anticorpos IgG total reativos ao peptídeo selecionado a partir da proteína MASP em amostras de soro de camundongos que receberam doses de: Q β -MASP, Q β -TS/MASP, Q β -MASP/ α -Gal e Q β -TS/MASP/ α -Gal. (D) 5 dias após a 3^o dose (pré-infecção), (E) 22 dias após a infecção (DPI) e (F) 190 dias após a infecção (DPI). Os resultados estão representados nos gráficos de dispersão D e E destacando a média e SEM das absorbâncias. O teste de ANOVA *one way*, seguido pelo pós-teste de *Tukey*, foi aplicado para realização das análises estatísticas dos resultados. No gráfico de dispersão F estão representados destacando a mediana e o intervalo interquartil das absorbâncias. O teste de *Kruskal-Wallis*, seguido pelo pós-teste de *Dunns*, foi aplicado para realização das análises estatísticas dos resultados.

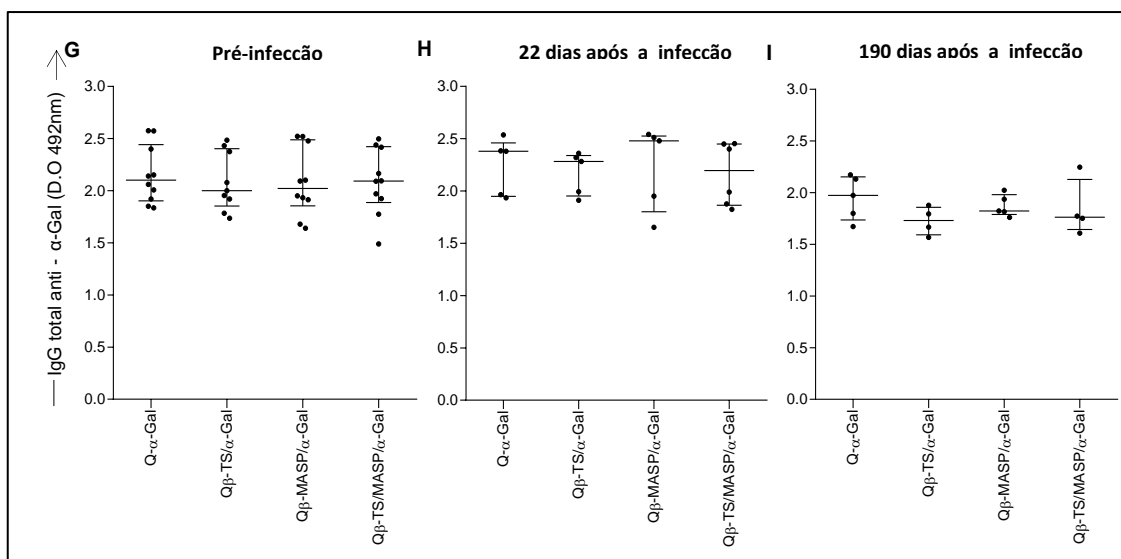


Figura 24 G, H e I. Concentração de anticorpos IgG total reativos ao epítipo α -Gal em amostras de soro de camundongos que receberam doses de: Q β - α -Gal, Q β -TS/ α -Gal, Q β -MASP/ α -Gal e Q β -TS/MASP/ α -Gal. (G) 5 dias após a 3ª dose (pré-infecção). (H) 22 dias após a infecção (DPI). (I) 190 dias após a infecção (DPI). Os resultados estão representados nos gráficos de dispersão nos gráficos de dispersão G, H e I estão representados destacando a mediana e o intervalo interquartil das absorbâncias. O teste de *Kruskal-Wallis*, seguido pelo pós-teste de *Dunns*, foi aplicado para realização das análises estatísticas dos resultados.

5.2.2. Eficácia das vacinações no controle da infecção

5.2.2.1. Níveis de parasitemia

A parasitemia dos grupos experimentais de camundongos C57BL/6 α 1,3GT-KO que receberam doses de Q β -controle e vacinados (n=5-6 por grupo), foi avaliada em intervalos de 1 dia a partir do 6º até 46º dia após a infecção pela cepa Colombiana. Exceto nos experimentos em que os camundongos foram eutanasiados no 22º dia após a infecção. Os grupos avaliados receberam doses dos peptídeos selecionados a partir das proteínas: TS e MASP, do epítipo α -Gal e das associações: TS/MASP, TS/ α -Gal, MASP/ α -Gal e TS/MASP/ α -Gal, acoplados ao Q β -VLP. Camundongos que receberam doses do Q β -controle, foram incluídos como grupo controle infectado não vacinado.

Os dados obtidos mostraram que 94,4% (85) dos camundongos apresentaram níveis de parasitos detectáveis no sangue entre o 6º e 14º dia de infecção. O pico de

parasitemia variou do 26° ao 34° dia após a infecção, em 69% (31) dos camundongos que foram avaliados até o 46° dia.

As análises da curva de parasitemia mostraram que no 14° dia após a infecção os grupos vacinados com: Q β -MASP/ α -Gal ($1,340 \times 10^4 \pm 0,228$, $p < 0,01$), Q β -TS/MASP/ α -Gal ($1,340 \times 10^4 \pm 0,459$, $p < 0,01$), Q β -MASP ($2,064 \times 10^4 \pm 0,348$, $p < 0,05$) e Q β -TS/MASP ($2,055 \times 10^4 \pm 0,569$, $p < 0,05$), apresentaram níveis de parasitos por ml de sangue significativamente menores, em relação ao grupo controle ($4,150 \times 10^4 \pm 0,957$). Enquanto no 16° dia após a infecção apenas o grupo vacinado com Q β -TS/MASP/ α -Gal ($0,740 \times 10^4 \pm 0,197$), apresentou uma redução significativa da parasitemia ($p < 0,01$), quando comparado com o grupo vacinado com Q β - α -Gal ($3,278 \times 10^4 \pm 0,9181$) e controle ($3,380 \times 10^4 \pm 0,501$) (**Fig. 25 A e B**).

No entanto, no 18° e 20° dia após a infecção os grupos vacinados com: Q β -MASP/ α -Gal ($0,910 \times 10^4 \pm 0,323$ / $0,580 \times 10^4 \pm 0,219$, $p < 0,001$), Q β -TS/MASP/ α -Gal ($1,690 \times 10^4 \pm 0,704$, $p < 0,001$ / $1,100 \times 10^4 \pm 0,508$, $p < 0,01$), Q β -MASP ($1,209 \times 10^4 \pm 0,383$, $p < 0,001$ / $1,755 \times 10^4 \pm 0,612$, $p < 0,05$), Q β -TS/MASP ($1,991 \times 10^4 \pm 0,503$ / $1,455 \times 10^4 \pm 0,500$, $p < 0,01$), Q β -TS ($1,909 \times 10^4 \pm 0,399$ $p < 0,01$ / $1,527 \times 10^4 \pm 0,360$, $p < 0,05$) e Q β - α -Gal ($1,778 \times 10^4 \pm 0,476$, $p < 0,01$ / $1,400 \times 10^4 \pm 0,470$, $p < 0,05$), apresentaram níveis significativamente menores, em relação ao grupo controle ($4,630 \times 10^4 \pm 1,226$ / $3,870 \times 10^4 \pm 1,319$). Enquanto o grupo vacinado com Q β -TS/ α -Gal ($1,867 \times 10^4 \pm 0,692$), apresentou uma redução significativa ($p < 0,01$) em relação ao grupo controle, somente quando comparados no 18° dia após a infecção (**Fig. 25 A e B**). No 22° dia após a infecção o grupo vacinado com Q β - α -Gal ($0,833 \times 10^4 \pm 0,375$), apresentou níveis significativamente menores ($p < 0,05$), quando comparado com o grupo controle ($2,690 \times 10^4 \pm 0,647$). No 26° dia após a infecção os grupos vacinados com: Q β - α -Gal ($1,475 \times 10^4 \pm 0,871$) e Q β -MASP/ α -Gal ($1,340 \times 10^4 \pm 0,581$), apresentaram uma redução significativa ($p < 0,05$), quando comparado com o grupo vacinado com Q β -TS/MASP ($7,620 \times 10^4 \pm 1,488$) e controle ($8,250 \times 10^4 \pm 5,4310$) (**Fig. 25 A e B**).

Entre 28° e 34° dia após a infecção, houve uma redução significativa ($p < 0,001$) nos níveis da parasitemia em camundongos vacinados com: Q β -TS ($4,060 \times 10^4 \pm 0,911$ / $3,540 \times 10^4 \pm 0,724$ / $3,540 \times 10^4 \pm 0,724$ / $3,880 \times 10^4 \pm 0,877$), Q β -MASP ($1,860 \times 10^4 \pm$

0,860 / 2,880x10⁴ ± 0,921 / 2,880x10⁴ ± 0,921 / 2,700x10⁴ ± 0,738), Qβ-α-Gal (2,325 x10⁴ ± 0,949 / 1,450x10⁴ ± 0,936 / 1,450 x10⁴ ± 0,936 / 1,475x10⁴ ± 0,527), Qβ-TS/MASP (4,060x10⁴ ± 1,187 / 3,840x10⁴ ± 0,765 / 3,840x10⁴ ± 0,765 / 3,560x10⁴ ± 0,561), Qβ-TS/α-Gal (4,025x10⁴ ± 1,061 / 1,250x10⁴ ± 0,542 / 1,250x10⁴ ± 0,542 / 2,100x10⁴ ± 1,008), Qβ-MASP/α-Gal (3,200x10⁴ ± 1,405 / 3,200x10⁴ ± 0,738 / 3,200x10⁴ ± 0,738 / 3,380x10⁴ ± 0,601) e Qβ-TS/MASP/α-Gal (1,875x10⁴ ± 0,803 / 2,750x10⁴ ± 1,533 / 2,750x10⁴ ± 1,533 / 2,525x10⁴ ± 1,251), quando comparados com o grupo controle (14,175x10⁴ ± 6,103 / 13,500x10⁴ ± 5,186 / 13,500x10⁴ ± 5,186 / 12,725x10⁴ ± 4,470). No 36° e 38° dia após a infecção, houve uma redução significativa (*p*<0,05) nos níveis da parasitemia de camundongos vacinados com: Qβ-α-Gal (0,625x10⁴ ± 0,405 / 0,625x10⁴ ± 0,405), Qβ-TS/MASP (1,680x10⁴ ± 0,705 / 1,680x10⁴ ± 0,705), Qβ-MASP/α-Gal (1,680x10⁴ ± 0,717 / 1,680x10⁴ ± 0,717) e TS/MASP/α-Gal (1,050 x10⁴ ± 1,050 / 1,050 x10⁴ ± 1,050), quando comparados com o grupo controle (8,025x10⁴ ± 2,892 / 8,025x10⁴ ± 2,892) (**Fig. 25 A e B**).

Enquanto que durante o 40° e 42° dia após a infecção, houve uma redução significativa (*p*<0,01) nos níveis de parasitos por ml de sangue, em camundongos vacinados com: Qβ-TS (2,700x10⁴ ± 0,321 / 2,700x10⁴ ± 0,321), Qβ-MASP (2,540 x10⁴ ± 0,850 / 2,540 x10⁴ ± 0,850), Qβ-α-Gal (0,625x10⁴ ± 0,625 / 0,625x10⁴ ± 0,625), Qβ-TS/MASP (5,760x10⁴ ± 0,974 / 5,760x10⁴ ± 0,974), Qβ-TS/α-Gal (1,475x10⁴ ± 0,225 / 1,475x10⁴ ± 0,225), Qβ-MASP/α-Gal (2,020x10⁴ ± 0,572 / 2,020x10⁴ ± 0,572) e Qβ-TS/MASP/α-Gal (1,875 x10⁴ ± 0,405 / 1,875x10⁴ ± 0,405), quando comparados com o grupo controle (9,950x10⁴ ± 2,495 / 9,950x10⁴ ± 2,495) (**Fig. 25 A e B**).

Os valores descritos anteriormente entre os parênteses mostram a média e o SEM dos níveis de parasitos por ml de sangue periférico quantificados em cada período avaliado. Nenhuma outra diferença estatisticamente significativa foi observada, entre os níveis de parasitemia dos grupos que receberam dose de: Qβ-controle, Qβ-TS, Qβ-MASP, Qβ-α-Gal, Qβ-TS/MASP, Qβ-TS/α-Gal, Qβ-MASP/α-Gal e TS/MASP/α-Gal (**Fig. 25 A e B**).

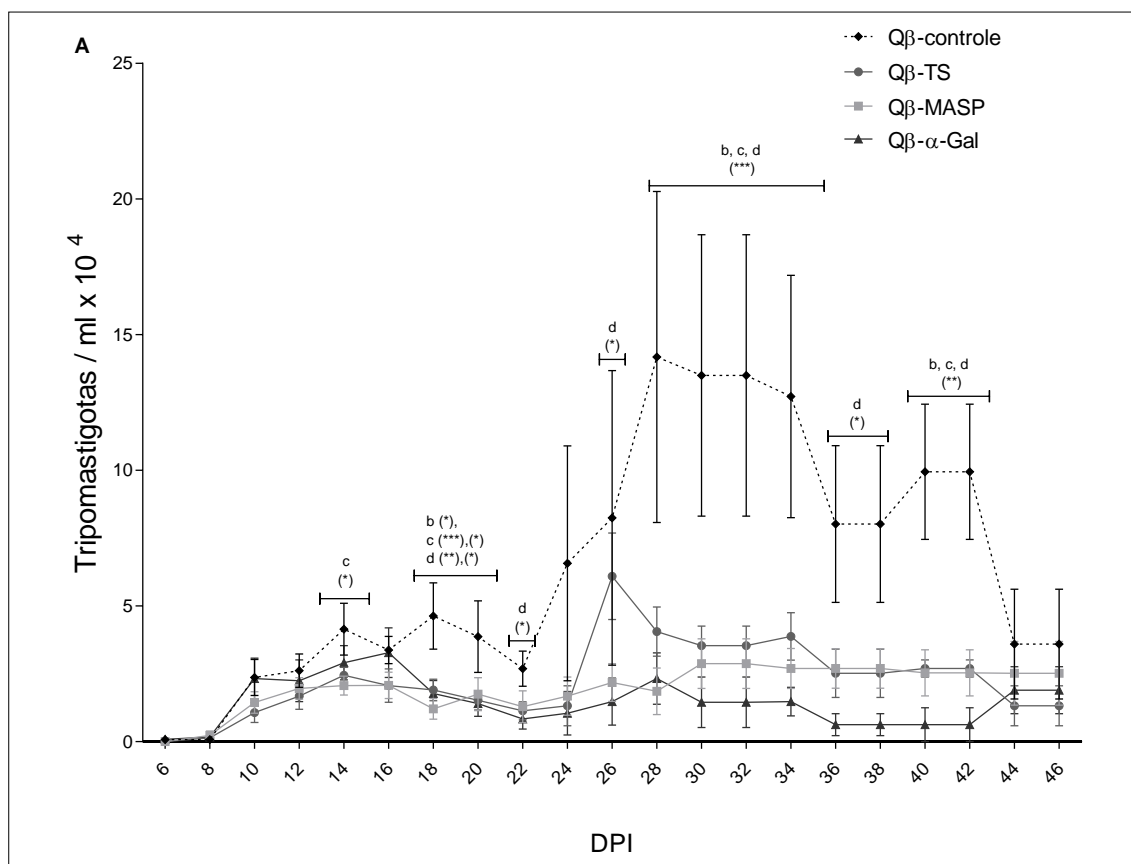


Figura 25 A. Análise da curva de parasitemia, avaliada diariamente, do 6° até 22° ou 46° dia após a infecção pela cepa Colombiana do *T. cruzi*, em camundongos C57BL/6 $\alpha 1,3GT-KO$ fêmeas que receberam doses de Q β -controle e vacinados com: Q β -TS, Q β -MASP e Q β - α -Gal (n=5-6). Os valores descritos no gráfico mostram a média e o SEM de tripomastigotas por ml de sangue periférico apresentados pelos grupos experimentais em cada dia avaliado. O teste de análise de ANOVA *two way*, seguido pelo pós-teste de *Bonferroni*, foi aplicado para realização das análises estatísticas dos resultados apresentados. a: representa diferença significativa em relação ao grupo Q β -controle, b: representa diferença significativa em relação ao grupo Q β -TS, c: representa diferença significativa em relação ao grupo Q β -MASP, d: representa diferença significativa em relação ao grupo Q β - α -Gal, e: representa diferença significativa em relação ao grupo Q β -TS/MASP, f: representa diferença significativa em relação ao grupo Q β -TS/ α -Gal, g: representa diferença significativa em relação ao grupo Q β -MASP/ α -Gal e h: representa diferença significativa em relação ao grupo Q β -TS/MASP/ α -Gal. Os símbolos indicam: *($p < 0,05$), **($p < 0,01$) e ***($p < 0,001$). DPI indica: dias após infecção.

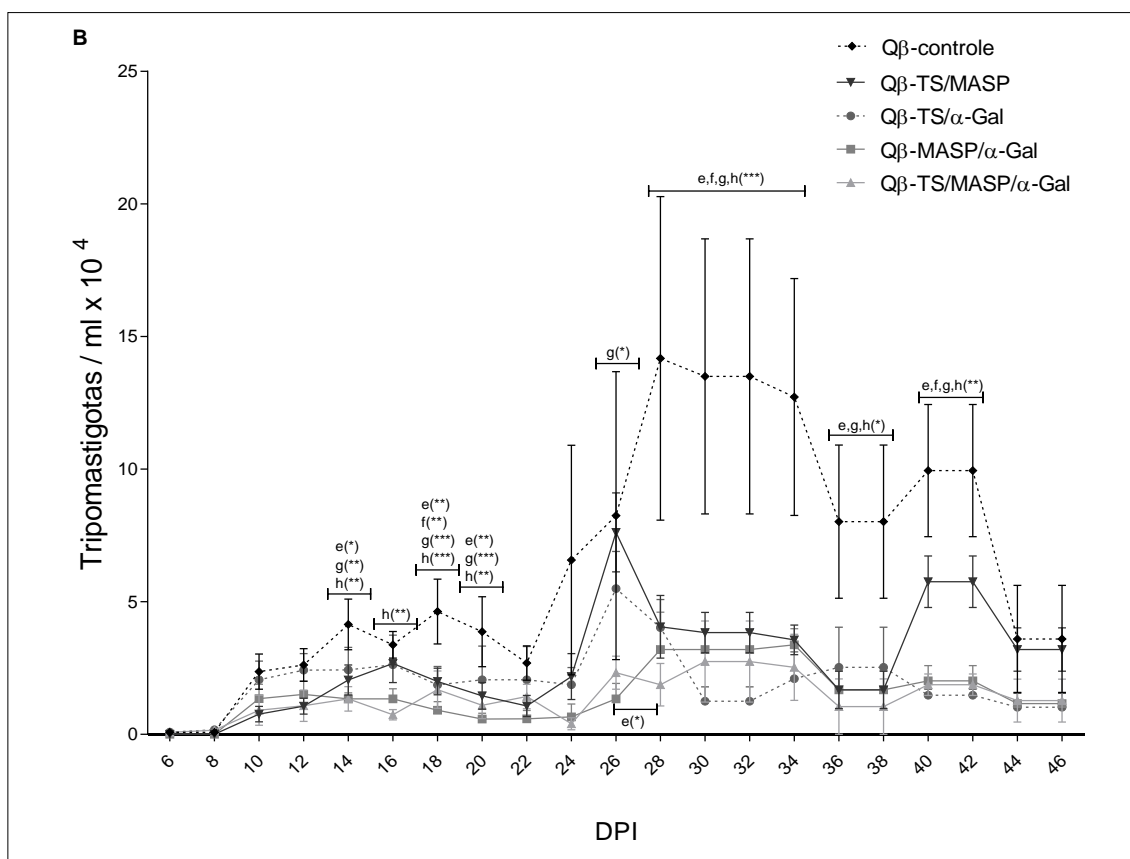


Figura 25 B. Análise da curva de parasitemia, avaliada diariamente, do 6^o até 22^o ou 46^o dia após a infecção pela cepa Colombiana do *T. cruzi*, em camundongos C57BL/6 $\alpha 1,3GT$ -KO fêmeas que receberam doses de Q β -controle e vacinados com as associações: Q β -TS/MASP, Q β -TS/ α -Gal, Q β -MASP/ α -Gal e Q β -TS/MASP/ α -Gal (n=5-6). Os valores descritos no gráfico mostram a média e o SEM de tripomastigotas por ml de sangue periférico apresentados pelos grupos experimentais em cada dia avaliado. O teste de análise de ANOVA *two way*, seguido pelo pós-teste de *Bonferroni*, foi aplicado para realização das análises estatísticas dos resultados apresentados. a: representa diferença significativa em relação ao grupo Q β -controle, b: representa diferença significativa em relação ao grupo Q β -TS, c: representa diferença significativa em relação ao grupo Q β -MASP, d: representa diferença significativa em relação ao grupo Q β - α -Gal, e: representa diferença significativa em relação ao grupo Q β -TS/MASP, f: representa diferença significativa em relação ao grupo Q β -TS/ α -Gal, g: representa diferença significativa em relação ao grupo Q β -MASP/ α -Gal e h: representa diferença significativa em relação ao grupo Q β -TS/MASP/ α -Gal. Os símbolos indicam: *($p < 0,05$), **($p < 0,01$) e ***($p < 0,01$). DPI indica: dias após infecção.

A avaliação do nível máximo de parasitos detectados por ml de sangue periférico, durante 46 dias após a infecção pela cepa Colombiana do *T. cruzi*, apresentado pelos grupos experimentais vacinados e o grupo controle, também foi realizada. As análises estatísticas dos dados mostraram que os grupos vacinados com: Q β -MASP

(mediana= $5,100 \times 10^4$; intervalo interquartil= $4,650-5,950$), Q β - α -Gal (mediana= $4,20 \times 10^4$; intervalo interquartil= $3,600-4,875$), Q β -MASP/ α -Gal (mediana= $5,100 \times 10^4$; intervalo interquartil= $3,800/6,350$) e Q β -TS/MASP/ α -Gal (mediana= $3,800 \times 10^4$; intervalo interquartil= $1,900/6,375$), apresentaram níveis de parasitemia durante o pico significativamente ($p < 0,05$) menores, em relação aos detectados nos camundongos que pertencem ao grupo controle (mediana= $16,50 \times 10^4$; intervalo interquartil= $8,650/26,90$). Nenhuma outra diferença estatística significativa foi encontrada, entre os grupos: Q β -controle, Q β -TS, Q β -MASP, Q β - α -Gal, Q β -TS/MASP, Q β -TS/ α -Gal, Q β -MASP/ α -Gal e TS/MASP/ α -Gal (**Fig. 26**).

A análise comparativa entre os valores da média (descritos entre parênteses, juntamente com SEM) dos níveis de parasitemia durante o pico apresentados pelos grupos vacinados e controle ($17,35 \times 10^4 \pm 4,759$) revelaram que as vacinações com: Q β -TS/MASP ($8,640 \times 10^4 \pm 1,290$), Q β -TS ($7,280 \times 10^4 \pm 1,093$), Q β -TS/ α -Gal ($5,500 \times 10^4 \pm 1,397$), Q β -MASP ($5,260 \times 10^4 \pm 0,423$), Q β -MASP/ α -Gal ($5,080 \times 10^4 \pm 0,705$), Q β - α -Gal ($4,225 \times 10^4 \pm 0,347$) e TS/MASP/ α -Gal ($4,025 \times 10^4 \pm 1,176$) reduziram a carga parasitária em: 50%, 58%, 68%, 70% 71%, 76% e 77%, respectivamente.

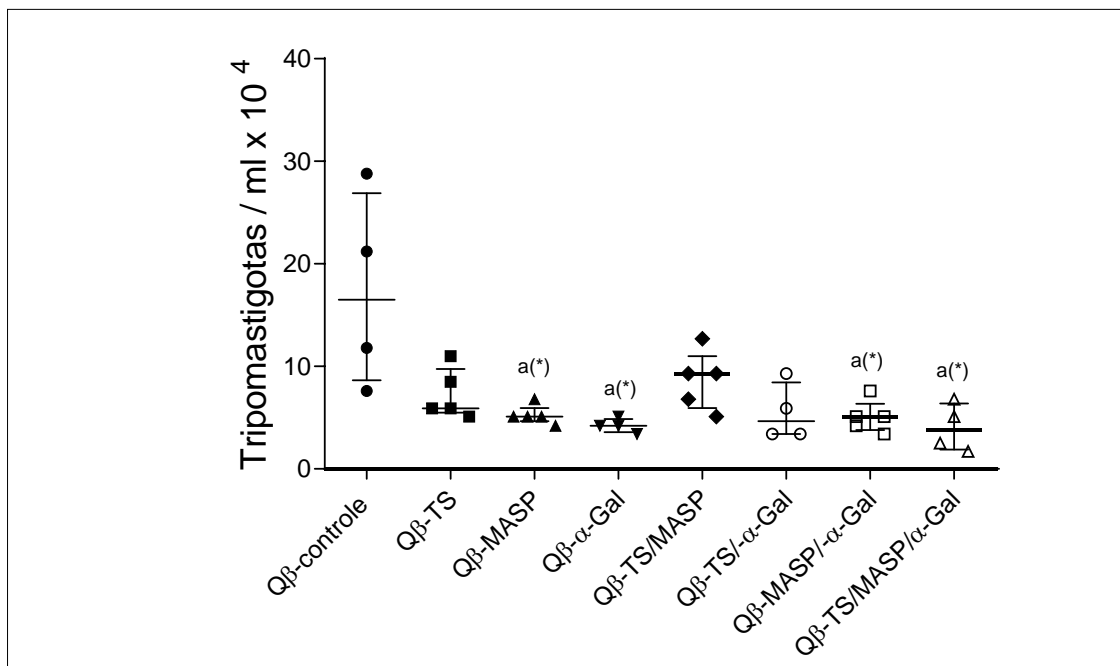


Figura 26. Análise do nível máximo de parasitos detectado por ml de sangue periférico, durante 46 dias após a infecção pela cepa Colombiana do *T. cruzi*, em camundongos C57BL/6 α 1,3GT-KO fêmeas que receberam doses de Q β -controle e vacinados com: Q β -TS, Q β -MASP, Q β - α -Gal, Q β -TS/MASP, Q β -TS/ α -Gal, Q β -MASP/ α -Gal e Q β -TS/MASP/ α -Gal (n=5-6). Os resultados estão representados no gráfico de dispersão destacando a mediana e intervalo interquartil de tripomastigotas por ml de sangue periférico. O teste de *Kruskal-Wallis*, seguido pelo pós-teste de *Dunns*, foi aplicado para realização das análises estatísticas dos dados. a: representa diferença significativa em relação ao grupo Q β -controle. Os símbolos indicam: *($p < 0,05$). DPI indica: dias após infecção.

5.2.2.2. Parasitismo nos tecidos cardíacos

A quantificação da carga parasitaria nos tecidos cardíacos de camundongos C57BL/6 α 1,3GT-KO que receberam doses de Q β -controle e vacinados (n=5-6 por grupo), eutanasiados 22 e 190 dias após a infecção pela cepa Colombiana de *T. cruzi*, foi realizada através da contagem dos ninhos de amastigotas presentes nos cortes histológicos por microscopia óptica. Os grupos experimentais avaliados receberam doses dos peptídeos selecionados a partir das proteínas: TS e MASP, do epítipo α -Gal e das associações: TS/MASP, TS/ α -Gal, MASP/ α -Gal e TS/MASP/ α -Gal, acoplados ao Q β -VLP. Camundongos que receberam doses do Q β -controle, foram incluídos como grupo

controle infectado não vacinado.

Durante 22º dia após a infecção, não foram encontrados ninhos de amastigotas nos tecidos cardíacos dos camundongos vacinados com: Q β - α -Gal, Q β -MASP/ α -Gal e Q β -TS/MASP/ α -Gal. Os resultados também revelaram ausência de ninhos de amastigotas em secções do coração de 80% (n=4/5) dos camundongos vacinados com Q β -TS/MASP, 60% (n=3/5) dos camundongos vacinados com: Q β -TS, Q β -MASP e 40% (n=2/5) dos camundongos vacinados com Q β -TS/ α -Gal. Enquanto apenas 17% (n=1/6) dos camundongos pertencentes ao grupo controle, não apresentaram ninhos de amastigotas. Diferenças estatísticas significativas ($p < 0,05$) foram observadas somente entre os grupos vacinados com: Q β - α -Gal, Q β -MASP/ α -Gal e Q β -TS/MASP/ α -Gal, que não apresentaram ninhos de amastigotas em seus tecidos e o grupo controle (mediana=1, intervalo interquartil=0,75-3,25)(**Fig. 27**).

Os camundongos que receberam doses de: Q β -controle, Q β -TS/ α -Gal, Q β -TS, Q β -MASP, Q β - α -Gal, Q β -TS/MASP, , Q β -MASP/ α -Gal e Q β -TS/MASP/ α -Gal, apresentaram mediana e intervalo interquartil de ninhos de amastigota nas secções dos corações de: mediana=1, intervalo interquartil=0,75-3,25; mediana=1, intervalo interquartil=0-3; mediana=0, intervalo interquartil=0-1,5; mediana=0, intervalo interquartil=0-3; mediana=0, intervalo interquartil=0; mediana=0, intervalo interquartil=0-0,5; mediana=0, intervalo interquartil=0-0 e mediana=0, intervalo interquartil=0-0, respectivamente (**Fig. 27**).

No período de 190 dias após a infecção, durante a fase crônica, ninhos de amastigotas não foram encontrados nos tecidos cardíacos dos camundongos que receberam doses de: Q β -glucose, Q β -TS, Q β -MASP, Q β - α -Gal, Q β -TS/MASP, Q β -TS/ α -Gal, Q β -MASP/ α -Gal e Q β -TS/MASP/ α -Gal.

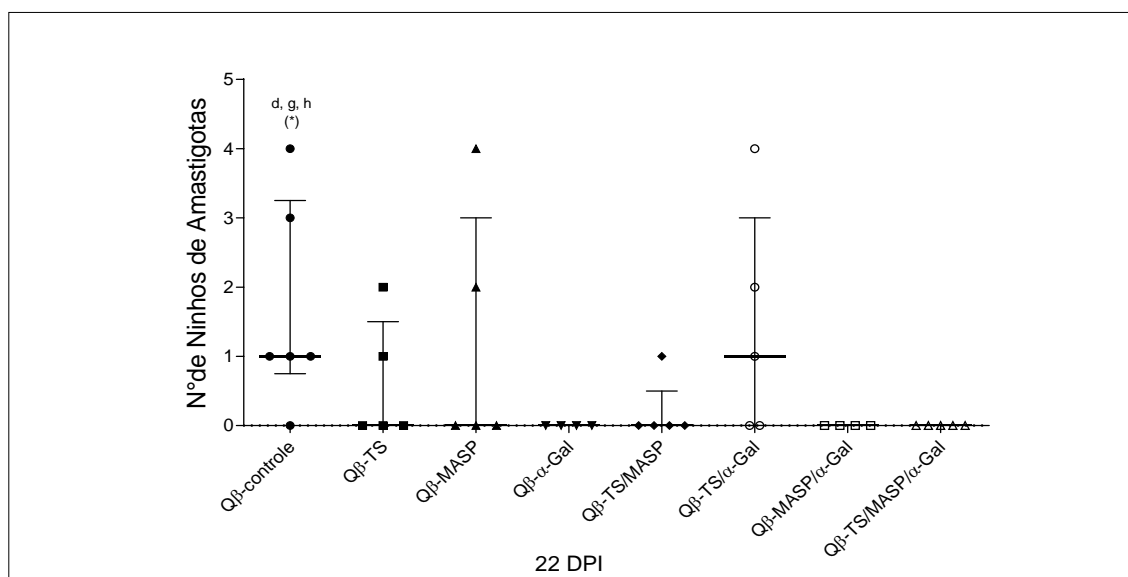


Figura 27. Análise quantitativa dos ninhos de amastigotas em seções dos corações de camundongos C57BL/6 α 1,3GT-KO fêmeas que receberam doses de Q β -controle, Q β -TS, Q β -MASP, Q β - α -Gal, Q β -TS/MASP, Q β -TS/ α -Gal, Q β -MASP/ α -Gal e Q β -TS/MASP/ α -Gal (n=5-6), 22 dias após a infecção pela cepa Colombiana de *T. cruzi*. Os resultados estão representados no gráfico de dispersão como valores da mediana e intervalo interquartil do número dos ninhos de amastigotas. O teste de *Kruskal-Wallis*, seguido pelo pós-teste de *Dunns*, foi aplicado para realização das análises estatísticas dos dados. d: representa diferença significativa em relação ao grupo Q β - α -Gal. g: representa diferença significativa em relação ao grupo Q β -MASP/ α -Gal. h: representa diferença significativa em relação ao grupo Q β -TS/MASP/ α -Gal. Os símbolos indicam: *($p < 0,05$). DPI indica: dias após infecção.

5.2.3. Alterações na massa corporal e taxa de sobrevivência em camundongos vacinados durante a infecção experimental

Camundongos C57BL/6 α 1,3GT-KO que receberam doses de Q β -controle e vacinados (n=5-6 por grupo) foram pesados individualmente, antes e durante a infecção pela cepa Colombiana de *T. cruzi*, em intervalos de três dias. Em seguida, uma curva de variação na massa corporal de cada grupo experimental avaliado foi construída a partir destes dados coletados. Enquanto a mortalidade foi monitorada diariamente, até o momento em que os camundongos foram eutanasiados, 22 e 190 dias após a infecção. Os grupos experimentais avaliados receberam doses dos peptídeos selecionados a partir das proteínas: TS e MASP, do epítipo α -Gal e das associações: TS/MASP, TS/ α -Gal,

MASP/ α -Gal e TS/MASP/ α -Gal, acoplados ao Q β -VLP. Camundongos que receberam doses do Q β -controle, foram incluídos como grupo controle infectado não vacinado.

As análises da curva de variação na massa corporal inicial demonstraram que o grupo vacinado com Q β -TS/MASP/ α -Gal, apresentou porcentagens significativamente maiores em relação ao grupo controle, entre 13° e 190° dia após a infecção. Enquanto, em relação aos grupos vacinados com: Q β -TS, Q β -TS/MASP, Q β -TS/ α -Gal e Q β -MASP/ α -Gal, foram observadas diferenças significativamente maiores entre 25° e 190° dia após a infecção. Em relação ao grupo vacinado com Q β -MASP foram encontradas diferenças significativamente maiores do 25° ao 37° e do 61° ao 190° dia após a infecção. Já em relação ao grupo vacinado com Q β - α -Gal foram encontradas diferenças significativamente maiores do 21° ao 57°, no 70°, 114°, 118°, 142° e 190° dia após a infecção. As diferenças estatísticas variaram de: $p < 0,05$; $p < 0,01$ e $p < 0,001$.

Além disso, os dados demonstraram que o grupo vacinado com Q β - α -Gal, apresentou porcentagens de variação na massa corporal inicial significativamente maiores, em relação ao grupo controle, do 122° ao 146° e do 162° ao 186° dia após a infecção. Enquanto, em relação aos grupos vacinados com: Q β -TS e Q β -TS/ α -Gal, foram observadas diferenças significativamente maiores no 162° e 166° dia após a infecção. Em relação ao grupo vacinado com Q β -TS/MASP e Q β -MASP/ α -Gal, foram encontradas diferenças significativamente maiores no 146° dia após a infecção. As diferenças estatísticas variaram de: $p < 0,05$; $p < 0,01$ e $p < 0,001$. (**Fig. 28 A e B**).

Nenhuma outra diferença estatisticamente significativa foi observada, entre as porcentagens de variação na massa corporal inicial dos grupos que receberam dose de: Q β -controle, Q β -TS, Q β -MASP, Q β - α -Gal, Q β -TS/MASP, Q β -TS/ α -Gal, Q β -MASP/ α -Gal e TS/MASP/ α -Gal (**Fig. 28 A e B**).

Os camundongos que receberam doses de Q β -controle e vacinados com Q β -TS aumentaram sua massa corporal em 12,44% e 15,69%, respectivamente até 21° dia após a infecção. Enquanto os camundongos vacinados com: Q β - α -Gal, Q β -MASP, Q β -TS/ α -Gal, Q β -MASP/ α -Gal, Q β -TS/MASP e Q β -TS/MASP/ α -Gal aumentaram sua massa corporal em 14%, 16%, 16,62%, 16,8%, 19,3% e 33,37%, respectivamente até 25° dia após a infecção (**Fig. 28 A e B**).

Nos dias seguintes os camundongos que pertencem aos grupos experimentais passaram a apresentar perda da massa corporal, que se tornou mais acentuada após o pico de parasitemia. Os camundongos que receberam doses de: Q β -MASP, Q β -TS/MASP, Q β -TS/ α -Gal, Q β -MASP/ α -Gal e Q β -controle, apresentaram maior perda no 37° dia após a infecção. Enquanto os camundongos que receberam doses de: Q β -TS, Q β - α -Gal e Q β -TS/MASP/ α -Gal, apresentaram maior perda entre 41° e 45° dia após a infecção (**Fig. 28 A e B**). Neste momento os grupos que receberam doses de: Q β - α -Gal, Q β -MASP, Q β -TS/MASP/ α -Gal, Q β -MASP/ α -Gal, Q β -TS, Q β -TS/ α -Gal, Q β -TS/MASP e Q β -controle tiveram uma perda de 2,2%, 4,56%, 5,2%, 6,18%, 6,33%, 7,15%, 8,7% e 9,8% da sua maior massa corporal apresentada até então, respectivamente (**Fig. 28 A e B**).

A partir deste ponto, os camundongos que pertencem aos grupos experimentais passaram a ganhar massa corporal. Aqueles vacinados com: Q β -MASP, Q β - α -Gal, Q β -TS/ α -Gal, Q β -MASP/ α -Gal e Q β -TS/MASP/ α -Gal, conseguiram recuperá-lo entre 61° e 74° dia após a infecção respectivamente. Enquanto camundongos vacinados com: Q β -TS, Q β -TS/MASP e que receberam doses de Q β -controle, recuperam a massa corporal perdida entre 114° e 154° dia após a infecção. Os camundongos que receberam doses de Q β -controle, vacinados com: Q β -TS, Q β -TS/ α -Gal, Q β -MASP, Q β -TS/MASP, Q β -MASP/ α -Gal, Q β - α -Gal e Q β -TS/MAS/ α -Gal, chegaram a aumentar a sua massa corporal em 16,75%, 19,76%, 22,9%, 23,46%, 23,56%, 24,76%, 32,17% e 45,45% respectivamente, durante a infecção (**Fig. 28 A e B**).

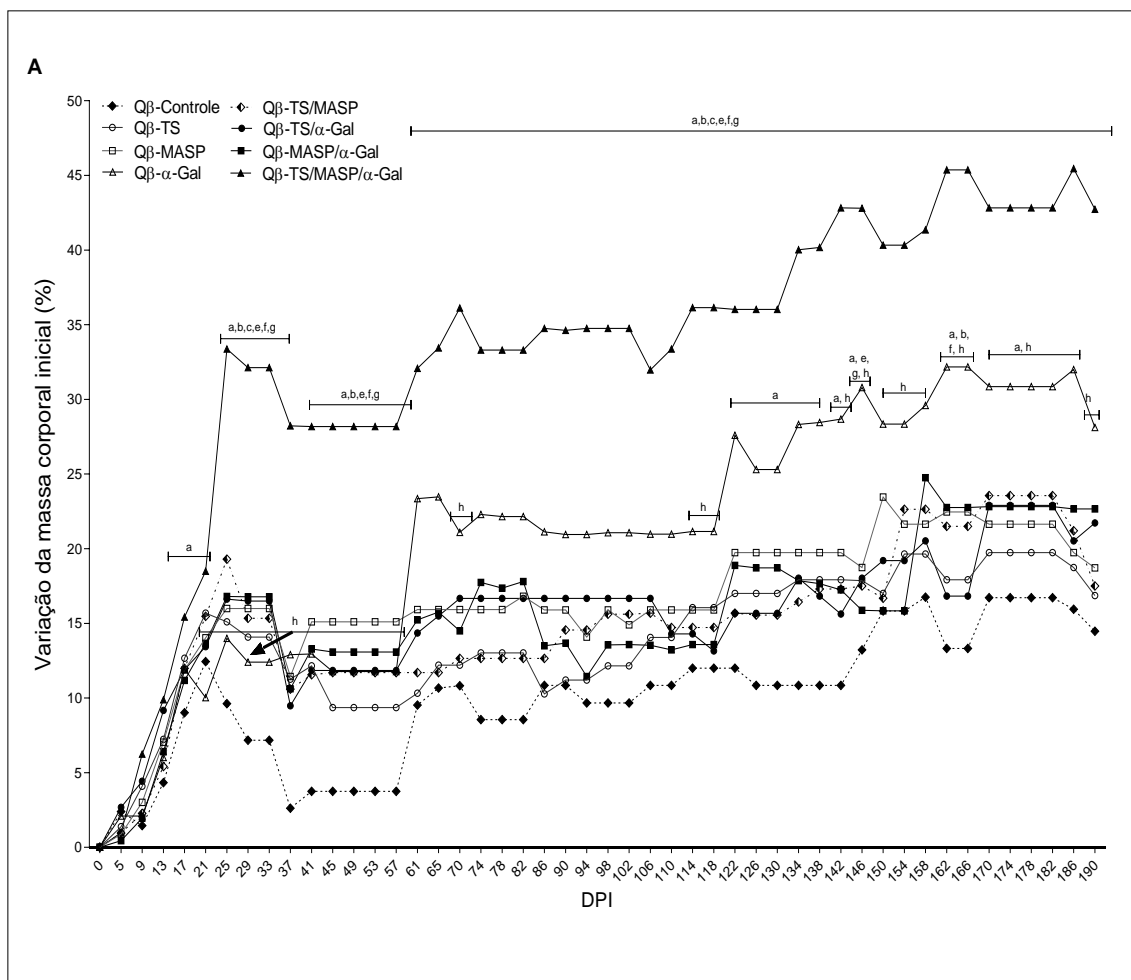


Figura 28 A. Análise da curva de variação da massa corporal inicial, avaliada antes da infecção e após pela cepa Colombiana do *T. cruzi*, em intervalos de três dias, do 5º até 22º ou 190º dia, em camundongos C57BL/6 α 1,3GT-KO fêmeas que receberam doses de Q β -controle e vacinados com: Q β -TS, Q β -MASP, Q β - α -Gal, Q β -TS/MASP, Q β -TS/ α -Gal, Q β -MASP/ α -Gal e Q β -TS/MASP/ α -Gal. Os valores descritos no gráfico mostram a média da variação da massa corporal inicial (%) apresentados pelos grupos experimentais em cada ponto examinado. O teste de análise de ANOVA *two way*, seguido pelo pós-teste de *Bonferroni*, foi aplicado para realização das análises estatísticas dos resultados apresentados no gráfico. a: representa diferença significativa em relação ao grupo Q β -Controle. b: representa diferença significativa em relação ao grupo Q β -TS. c: representa diferença significativa em relação ao grupo Q β -MASP. d: representa diferença significativa em relação ao grupo Q β - α -Gal. e: representa diferença significativa em relação ao grupo Q β -TS/MASP. f: representa diferença significativa em relação ao grupo Q β -TS/ α -Gal. g: representa diferença significativa em relação ao grupo Q β -MASP/ α -Gal. h: representa diferença significativa em relação ao grupo Q β -TS/MASP/ α -Gal. DPI indica: dias após infecção.

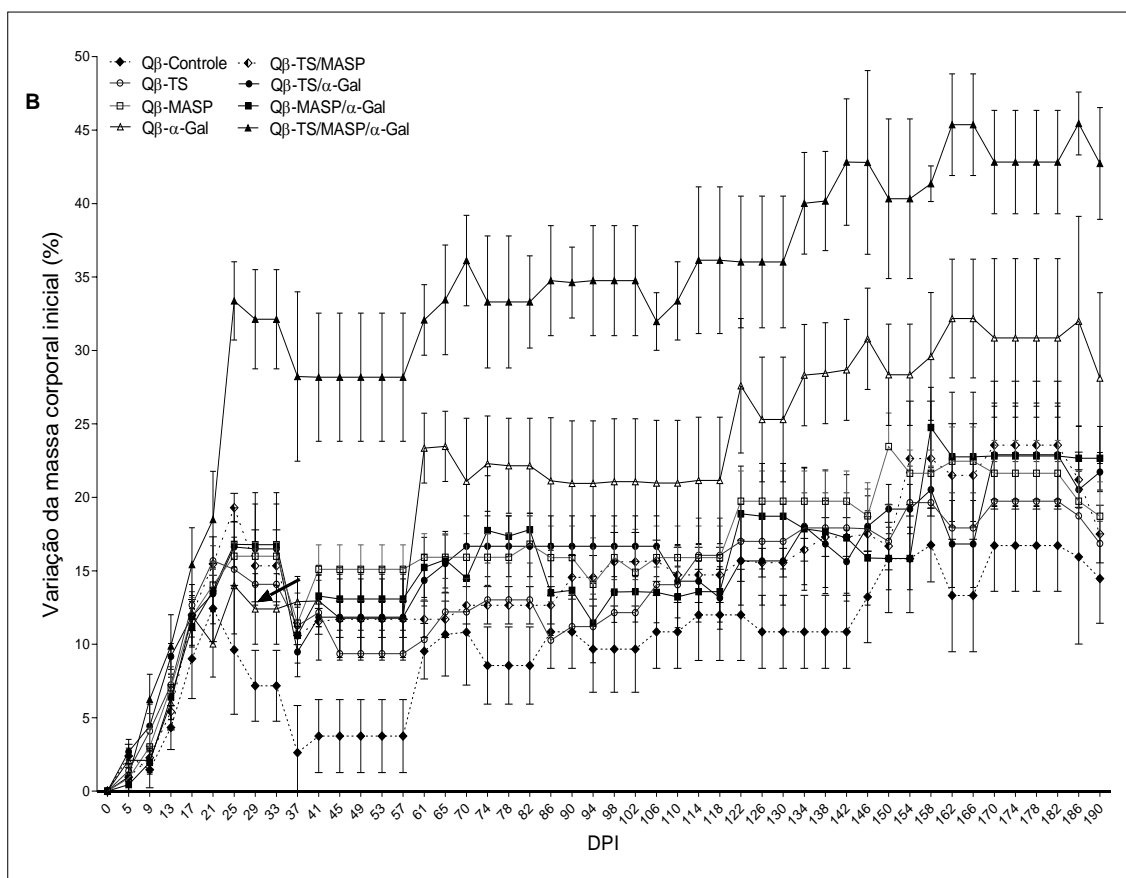


Figura 28 B. Análise da curva de variação da massa corporal inicial, avaliada antes da infecção e após pela cepa Colombiana do *T. cruzi*, em intervalos de três dias, do 5º até 22º ou 190º dia, em camundongos C57BL/6 α 1,3GT-KO fêmeas que receberam doses de Q β -controle e vacinados com: Q β -TS, Q β -MASP, Q β - α -Gal, Q β -TS/MASP, Q β -TS/ α -Gal, Q β -MASP/ α -Gal e Q β -TS/MASP/ α -Gal. Os valores descritos no gráfico mostram a média e o SEM da variação da massa corporal inicial (%) apresentados pelos grupos experimentais em cada ponto examinado. DPI indica: dias após infecção.

A avaliação do percentual de sobrevivência demonstrou que 100% dos camundongos que receberam doses de Q β -controle e vacinados com: Q β -TS, Q β -MASP, Q β - α -Gal, Q β -TS/MASP, Q β -TS/ α -Gal, Q β -MASP/ α -Gal e Q β -TS/MASP/ α -Gal, avaliados 22 e 190 dias após a infecção sobreviveram.

5.2.4. Eficácia das vacinações na prevenção do dano aos tecidos cardíacos associado à infecção pelo *T. cruzi*

Análises histopatológicas semi-quantitativas por microscopia óptica do infiltrado celular, alterações degenerativas e hipertrofia das fibras musculares em secções de corações corados com H&E, de camundongos C57BL/6 $\alpha 1,3GT$ -KO que receberam doses de Q β -controle e vacinados (n=5-6 por grupo), eutanasiados 22 e 190 dias após a infecção pela cepa Colombiana de *T. cruzi*, foram realizadas para determinar a intensidade das lesões. Os grupos experimentais avaliados receberam doses dos peptídeos selecionados a partir das proteínas: TS e MASP, do epítipo α -Gal e das associações: TS/MASP, TS/ α -Gal, MASP/ α -Gal e TS/MASP/ α -Gal, acoplados ao Q β -VLP. Camundongos que receberam doses do Q β -controle, foram incluídos como grupo controle infectado não vacinado.

Os dados demonstraram que nenhuma diferença estatística significativa foi observada, entre os níveis do infiltrado celular quantificado ao longo das fibras musculares cardíacas de camundongos que receberam dose de: Q β -controle, Q β -TS, Q β -MASP, Q β - α -Gal, Q β -TS/MASP, Q β -TS/ α -Gal, Q β -MASP/ α -Gal e TS/MASP/ α -Gal, 22 dias após a infecção, durante a fase aguda (**Fig. 29 A**).

Durante este período, a intensidade da inflamação variou de moderada a alta em 50% (n=3/6), nos corações de camundongos que foram vacinados com: Q β -TS, Q β -TS/MASP/ α -Gal e que receberam doses de Q β -controle. Em camundongos vacinados com: Q β -MASP, Q β -TS/ α -Gal e Q β -MASP/ α -Gal a porcentagem foi de 60% (n=3/5), enquanto em camundongos vacinados com Q β -TS/MASP foi de 67% (n=4/6). No entanto, em camundongos vacinados com Q β - α -Gal a intensidade da inflamação era ausente ou apresentava baixos níveis em 80% (n=4/5) das secções dos corações avaliadas. Os camundongos que receberam doses de: Q β -MASP/ α -Gal, Q β -TS/MASP, Q β -controle, Q β -TS/ α -Gal, Q β -MASP, Q β -TS, Q β -TS/MASP/ α -Gal e Q β - α -Gal apresentaram uma média e SEM de intensidade da inflamação de: $2,2 \pm 0,5$; $2,167 \pm 0,401$; $2 \pm 0,447$; $2 \pm 0,447$; $1,8 \pm 0,374$; $1,667 \pm 0,615$; $1,667 \pm 0,333$ e $0,8 \pm 0,374$, respectivamente.

Por outro lado, aos 190 dias após a infecção, durante a fase crônica, camundongos vacinados com: Q β -TS/MASP ($p < 0,01$), Q β -TS ($p < 0,05$), Q β -MASP ($p < 0,05$), Q β -MASP/ α -Gal ($p < 0,05$) e TS/MASP/ α -Gal ($p < 0,05$) apresentaram níveis de infiltrado celular significativamente menores ao longo das fibras cardíacas, que os observados em camundongos que pertencem ao grupo controle. Nenhuma outra diferença estatística significativa foi encontrada entre os níveis de infiltrado celular, nos corações dos camundongos que receberam doses de: Q β -controle, Q β -TS, Q β -MASP, Q β - α -Gal, Q β -TS/MASP, Q β -TS/ α -Gal, Q β -MASP/ α -Gal, Q β -TS/MASP/ α -Gal (**Fig. 29 B**).

Durante este período, observou-se ausência de inflamação em 60% ($n=3/5$) das secções dos corações de camundongos vacinados com TS/MASP e prevalência de baixa intensidade entre os corações de camundongos vacinados com: Q β -TS, Q β -MASP, Q β -MASP/ α -Gal e TS/MASP/ α -Gal. Enquanto os níveis do infiltrado inflamatório variaram de leve a moderada em 60% ($n=2/4$) e 75% ($n=3/4$) dos tecidos cardíacos de camundongos vacinados com Q β -TS/ α -Gal e Q β - α -Gal, respectivamente. No entanto, em camundongos que receberam doses de Q β -controle, a intensidade variou de moderada a alta em 75% ($n=3/4$) dos corações, respectivamente. Os camundongos que receberam doses de: Q β -controle, Q β -TS, Q β -MASP, Q β - α -Gal, Q β -MASP/ α -Gal, Q β -TS/MASP/ α -Gal, Q β -TS/ α -Gal e Q β -TS/MASP, apresentaram uma média e SEM de intensidade da inflamação de: $2,2 \pm 0,479$; 1 ± 0 ; 1 ± 0 ; $1 \pm 0,408$; 1 ± 0 ; 1 ± 0 ; $0,750 \pm 0,479$; $0,4 \pm 0,245$, respectivamente (**Fig. 29 B**).

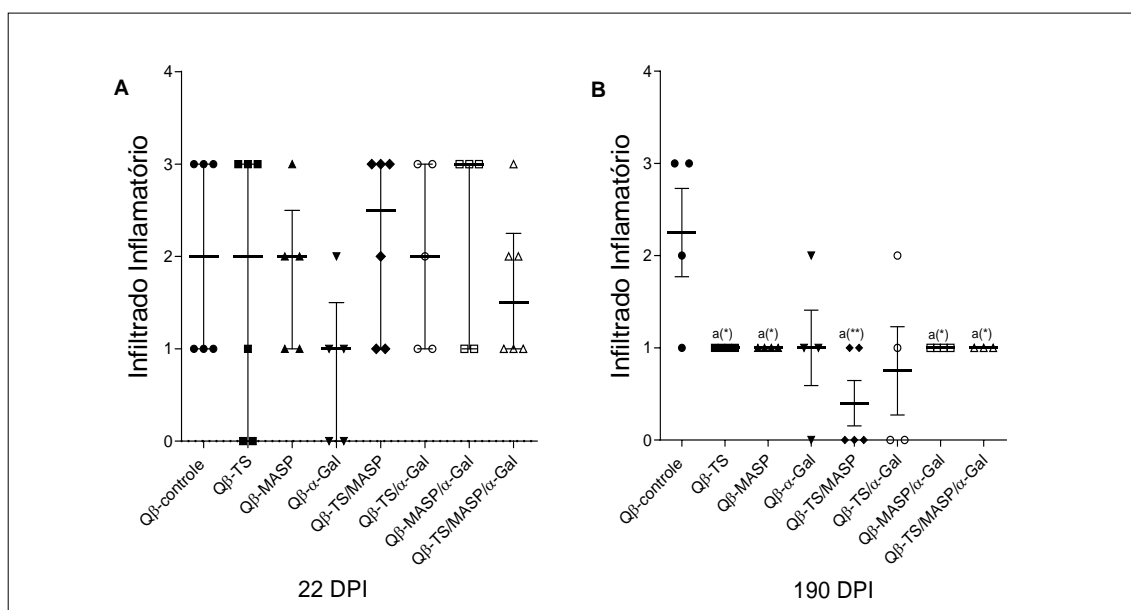


Figura 29. Análise semi-quantitativa do infiltrado inflamatório, em secções dos corações de camundongos C57BL/6 $\alpha 1,3GT$ -KO fêmeas que receberam doses de Q β -controle e que foram vacinados com: Q β -TS, Q β -MASP, Q β - α -Gal, Q β -TS/MASP, Q β -TS/ α -Gal, Q β -MASP/ α -Gal e Q β -TS/MASP/ α -Gal (n=5-6), infectados pela cepa Colombiana de *T. cruzi*. (A) Camundongos eutanasiados 22 dias após a infecção. (B) Camundongos eutanasiados 190 dias após a infecção. No gráfico de dispersão A os resultados estão apresentados como mediana e intervalo interquartil da intensidade do infiltrado inflamatório. O teste de *Kruskal-Wallis*, seguido pelo pós-teste de *Dunn's*, foi aplicado para realização das análises estatísticas dos dados. No gráfico de dispersão B os resultados estão apresentados como média e SEM da intensidade do infiltrado inflamatório. O teste de ANOVA *one way*, seguido pelo pós-teste de *Tukey*, foi aplicado para realização das análises estatísticas dos dados. a: representa diferença significativa em relação ao grupo Q β -Controle. As diferenças estatisticamente significativas estão representadas pelos símbolos * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$). DPI indica: dias após infecção.

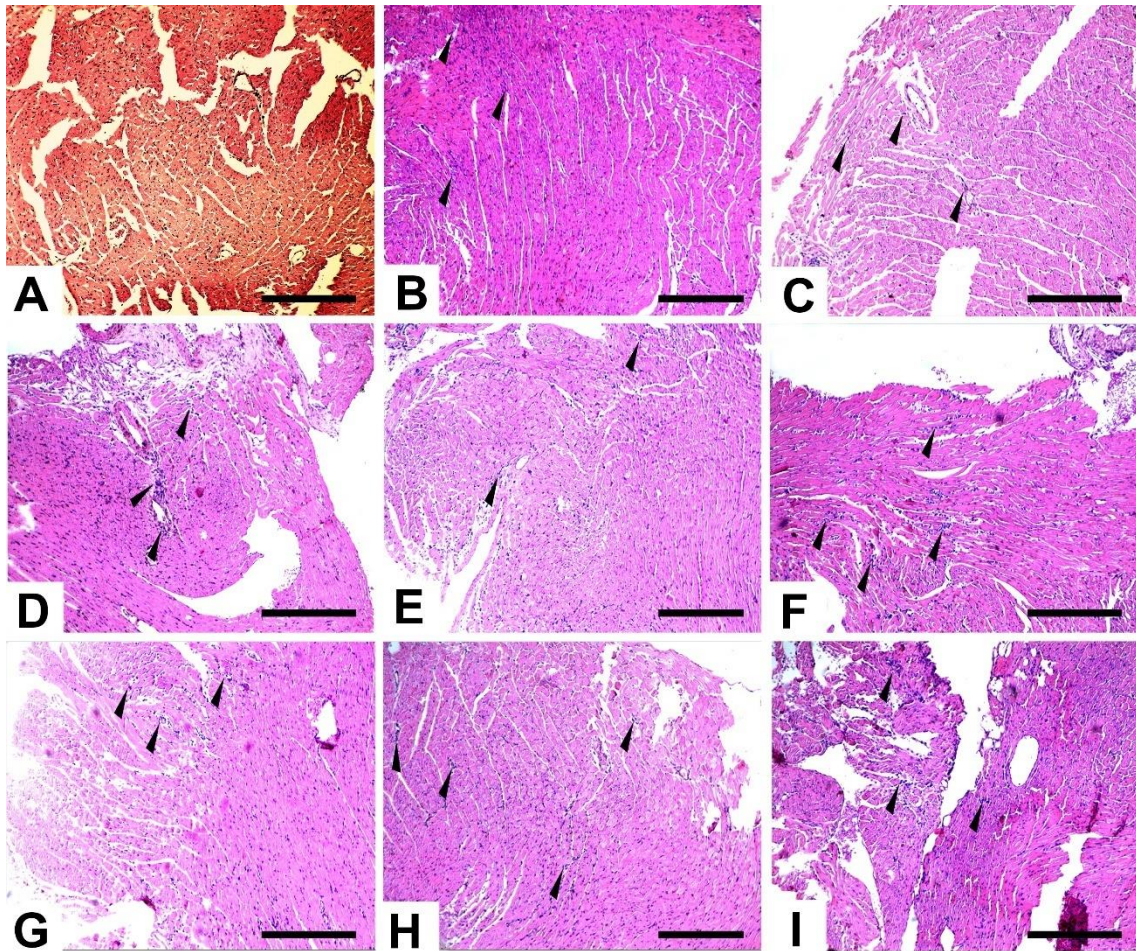


Figura 30. Fotomicrografia de corte histológico do coração de camundongos C57BL/6 $\alpha 1,3GT-KO$, fêmeas que receberam doses de $Q\beta$ -controle e foram vacinados, eutanasiados após 22 dias de infecção pela cepa Colombiana de *T. cruzi*. (A) Grupo Controle não infectado: coração apresentando aspecto habitual. (B) Grupo $Q\beta$ -controle (infectado): infiltrado inflamatório moderado no miocárdio (cabeças de setas). (C) $Q\beta$ -TS: presença infiltrado inflamatório moderado no miocárdio (cabeças de setas). (D) $Q\beta$ -MASP: presença de infiltrado inflamatório moderado no miocárdio (cabeças de setas). (E) $Q\beta$ - α -Gal: presença de infiltrado inflamatório discreto no miocárdio (cabeças de setas). (F) $Q\beta$ -TS/MASP: presença de infiltrado inflamatório moderado no miocárdio (cabeças de setas). (G) $Q\beta$ -TS/ α -Gal: infiltrado inflamatório moderado no miocárdio (cabeças de setas). (H) $Q\beta$ -MASP/ α -Gal: infiltrado inflamatório moderado no miocárdio (cabeças de setas). (I) $Q\beta$ -TS/MASP/ α -Gal: presença de infiltrado inflamatório moderada no miocárdio (cabeças de setas). Coloração Hematoxilina e eosina, barra = 100 μm .

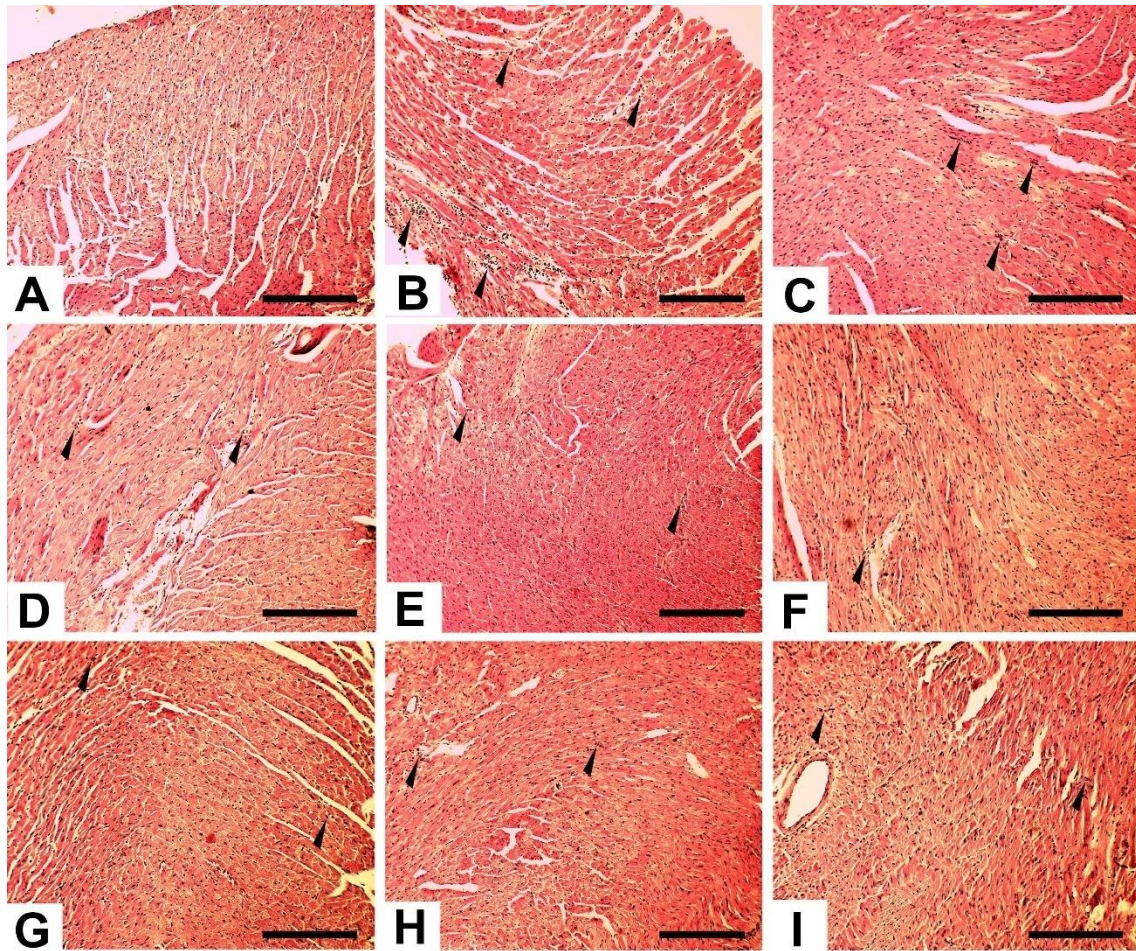


Figura 31. Fotomicrografia de corte histológico do coração de camundongos infectados com a cepa Colombiana de *T. cruzi* e eutanasiados após 190 dias de infecção. (A) Grupo Controle não infectado: coração apresentando aspecto habitual. (B) Grupo Q β -controle (infectado): infiltrado inflamatório moderado no miocárdio (cabeças de setas). (C) Q β -TS: presença de infiltrado inflamatório discreto no miocárdio (cabeças de setas). (D) Q β -MASP: presença de infiltrado inflamatório discreto no miocárdio (cabeças de setas). (E) Q β - α -Gal: presença de infiltrado inflamatório discreto no miocárdio (cabeças de setas). (F) Q β -TS/MASP: presença de infiltrado inflamatório discreto no miocárdio (cabeças de setas). (G) Q β -TS/ α -Gal: infiltrado inflamatório discreto no miocárdio (cabeças de setas). (H) Q β -MASP/ α -Gal: infiltrado inflamatório discreto no miocárdio (cabeças de setas). (I) Q β -TS/MASP/ α -Gal: presença de infiltrado inflamatório discreto no miocárdio (cabeças de setas). Coloração Hematoxilina e eosina, barra = 100 μ m.

Os resultados também revelaram que camundongos que receberam doses de Q β - α -Gal, apresentaram níveis de alterações degenerativas significativamente menores nos tecidos cardíacos, em relação aos grupos que receberam doses de: Q β - controle ($p < 0,01$), Q β -MASP ($p < 0,05$), Q β -TS/MASP ($p < 0,05$), Q β -TS/ α -Gal ($p < 0,05$), Q β -MASP/ α -Gal ($p < 0,05$), aos 22 dias após a infecção, durante a fase aguda. Enquanto camundongos que receberam doses de Q β -TS/MASP/ α -Gal apresentaram níveis significativamente menores, em relação aos grupos que receberam doses de: Q β -controle ($p < 0,01$) e Q β -TS/MASP ($p < 0,05$). Já camundongos que receberam doses de Q β -TS apresentaram níveis significativamente menores ($p < 0,05$), que os observados em camundongos que receberam doses de Q β -controle. Nenhuma outra diferença estatística significativa foi encontrada entre os níveis de alterações degenerativas dos camundongos que receberam doses de: Q β -controle, Q β -TS, Q β -MASP, Q β - α -Gal, Q β -TS/MASP, Q β -TS/ α -Gal, Q β -MASP/ α -Gal, Q β -TS/MASP/ α -Gal no tecido cardíaco (**Fig. 32**).

Durante este período, alterações degenerativas não foram encontradas ou apresentaram baixa intensidade em 100% dos cortes histológicos de camundongos vacinados com: Q β - α -Gal e Q β -TS/MASP/ α -Gal. Em camundongos vacinados com: Q β -TS a percentagem foi de 83% ($n=5/6$). Enquanto baixos níveis prevaleceram nas secções de coração dos camundongos vacinados com: Q β -MASP, TS/ α -Gal e MASP/ α -Gal. No entanto, a intensidade das alterações degenerativas variou de moderada a alta em 50% ($n=3/6$) e 67% ($n=4/6$) das secções de camundongos vacinados com Q β -TS/MASP e pertencentes ao grupo controle. Os camundongos que receberam doses de: Q β -controle, Q β -TS/MASP, Q β -MASP, Q β -TS/ α -Gal, Q β -MASP/ α -Gal, Q β -TS, Q β -TS/MASP/ α -Gal e Q β - α -Gal apresentaram uma média e SEM de intensidade das alterações degenerativas de: $1,7 \pm 0,2$; $1,7 \pm 0,3$; 1 ± 0 ; 1 ± 0 ; 1 ± 0 ; $0,83 \pm 0,3$; $0,7 \pm 0,2$; $0,4 \pm 0,245$, respectivamente (**Fig. 32**).

Aos 190 dias após a infecção, durante a fase crônica, os tecidos cardíacos dos camundongos que receberam doses de: Q β -controle, Q β -TS, Q β -MASP, Q β - α -Gal, Q β -TS/MASP, Q β -TS/ α -Gal, Q β -MASP/ α -Gal e TS/MASP/ α -Gal, não apresentaram alterações degenerativas.

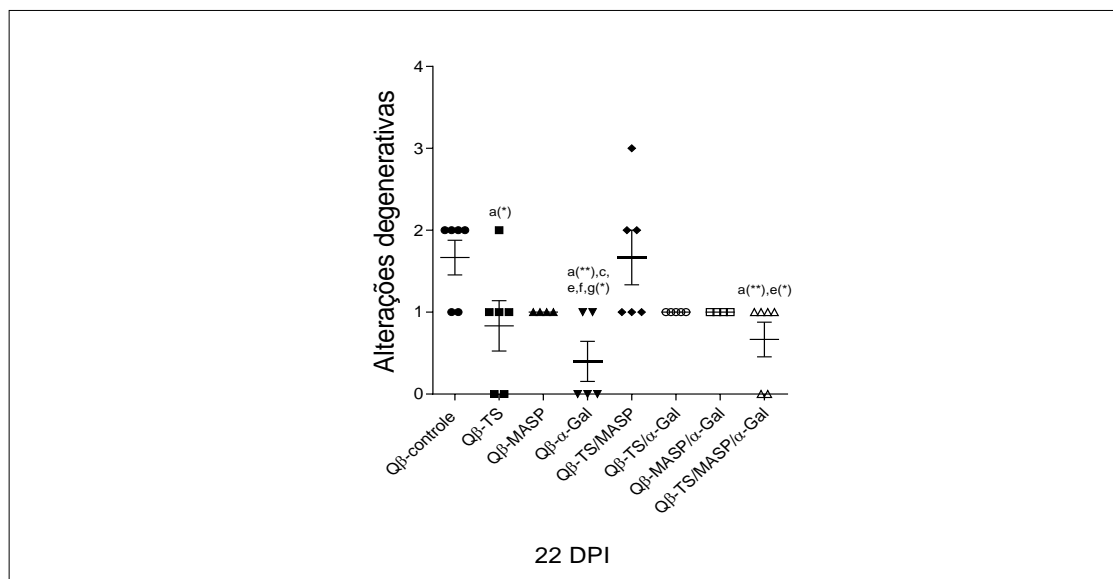


Figura 32. Análise semi-quantitativa das alterações degenerativas, em secções dos corações de camundongos C57BL/6 α 1,3GT-KO fêmeas que receberam doses de Q β -controle e que foram vacinados com: Q β -TS, Q β -MASP, Q β - α -Gal, Q β -TS/MASP, Q β -TS/ α -Gal, Q β -MASP/ α -Gal e Q β -TS/MASP/ α -Gal (n=5-6), infectados pela cepa Colombiana de *T. cruzi* e eutanasiados 22 dias após. Os resultados estão apresentados como média e SEM da intensidade das alterações degenerativas. O teste de ANOVA *one way*, seguido pelo pós-teste de *Tukey*, foi aplicado para realização das análises estatísticas dos dados. a: representa diferença significativa em relação ao grupo Q β -Controle. c: representa diferença significativa em relação ao grupo Q β -MASP. e: representa diferença significativa em relação ao grupo Q β -TS/MASP. f: representa diferença significativa em relação ao grupo Q β -TS/ α -Gal. g: representa diferença significativa em relação ao grupo Q β -TS/MASP/ α -Gal. As diferenças estaticamente significativas estão representadas pelos símbolos * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$). DPI indica: dias após infecção.

Além disso, os dados mostraram que diferenças estatísticas significativas ($p < 0,05$), foram encontradas entre os grupos que receberam doses de: Q β -TS, Q β - α -Gal, Q β -MASP/ α -Gal, que não apresentaram hipertrofia das fibras musculares cardíacas e o grupo que recebeu doses de Q β -TS/ α -Gal, aos 22 dias após a infecção, durante a fase aguda. Nenhuma outra diferença estatística significativa foi encontrada entre os níveis de hipertrofia identificados em secções do coração de camundongos que receberam doses de: Q β -controle, Q β -TS, Q β -MASP, Q β - α -Gal, Q β -TS/MASP, Q β -TS/ α -Gal, Q β -MASP/ α -Gal e TS/MASP/ α -Gal (**Fig. 33 A**).

Durante este período, camundongos vacinados com: Q β -TS, Q β - α -Gal, Q β -MASP/ α -Gal não apresentaram hipertrofia das fibras musculares cardíacas. Enquanto observou-se leve intensidade em 67% (n=4/6), 50% (n=3/6), 40% (n=2/5) e 33% (n=2/6) dos cortes histológicos de camundongos que receberam doses de: Q β -TS/MASP, Q β -TS/MASP/ α -Gal, Q β -MASP e Q β -controle, respectivamente, sendo ausente no restante das secções. No entanto, camundongos vacinados com Q β -TS/ α -Gal apresentaram níveis, que variaram de baixo a moderado em 80% (n=4/5) dos tecidos cardíacos.

Os camundongos que receberam doses de: Q β -controle, Q β -MASP, Q β -TS/MASP/ α -Gal, Q β -TS/MASP e Q β -TS/ α -Gal e apresentaram uma média e SEM de intensidade de hipertrofia das fibras musculares de: $0,33 \pm 0,21$; $0,4 \pm 0,24$; $0,5 \pm 0,22$; $0,67 \pm 0,21$; $1 \pm 0,31$ respectivamente (**Fig. 33 A**).

Por outro lado, aos 190 dias após a infecção, durante a fase crônica, fibras musculares cardíacas de camundongos vacinados com: Q β -MASP e Q β -TS/MASP/ α -Gal apresentaram níveis de hipertrofia significativamente menores que os observados em camundongos que receberam doses de: Q β -controle ($p < 0,05$), Q β - α -Gal ($p < 0,01$) e Q β -TS/ α -Gal ($p < 0,05$). Enquanto que camundongos vacinados com Q β -MASP/ α -Gal apresentaram níveis de hipertrofia significativamente menores ($p < 0,05$), que os observados em camundongos que receberam doses de Q β - α -Gal. Diferenças estatísticas significativas também foram encontradas entre o grupo vacinado com Q β -TS/MASP, que não apresentou hipertrofia e os grupos que receberam doses de: Q β - α -Gal ($p < 0,001$), Q β -MASP/ α -Gal ($p < 0,01$), Q β -controle ($p < 0,05$), Q β -TS ($p < 0,05$), Q β -MASP ($p < 0,05$), Q β -TS/ α -Gal ($p < 0,05$) e Q β -TS/MASP/ α -Gal ($p < 0,05$). Nenhuma outra diferença estatística significativa foi identificada entre os níveis presentes em cortes histológicos de camundongos que receberam doses de: Q β -controle, Q β -TS, Q β -MASP, Q β - α -Gal, Q β -TS/MASP, Q β -TS/ α -Gal, Q β -MASP/ α -Gal e Q β -TSMASP/ α -Gal (**Fig. 33 B**).

Durante este período, grupos vacinados com: Q β -TS e Q β - α -Gal apresentaram níveis de hipertrofia que variaram de moderados a altos em 60% (n=3/5) e 100% dos tecidos cardíacos, respectivamente. Enquanto níveis moderados de hipertrofia prevaleceram entre os camundongos que receberam doses de: Q β -controle e Q β -TS/ α -Gal. No entanto, baixos níveis de hipertrofia foram identificados em 60% (n=3/5) dos

cortes histológicos de camundongos vacinados com Q β -MASP/ α -Gal e prevaleceram entre os camundongos vacinados com: Q β -MASP e Q β -TS/MASP/ α -Gal. Já camundongos vacinados com Q β -TS/MASP não apresentaram hipertrofia das fibras musculares cardíacas. Os camundongos que receberam doses de: Q β - α -Gal, Q β -controle, Q β -TS/ α -Gal, Q β -TS, Q β -MASP/ α -Gal, Q β -MASP e Q β -TS/MASP/ α -Gal apresentaram uma média e SEM de intensidade de hipertrofia das fibras musculares de: $2,25 \pm 0,25$; 2 ± 0 ; 2 ± 0 ; $1,6 \pm 0,5$; $1,4 \pm 0,24$; 1 ± 0 ; 1 ± 0 , respectivamente (**Fig. 33 B**).

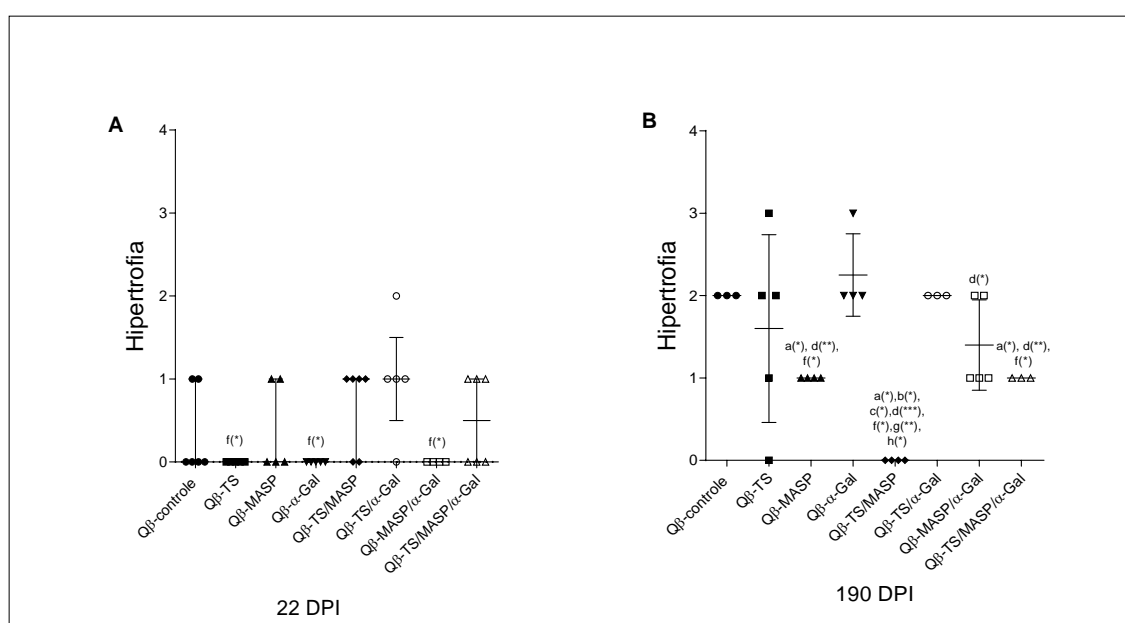


Figura 33. Análise semi-quantitativa da hipertrofia das fibras musculares, em secções dos corações de camundongos C57BL/6 α 1,3GT-KO fêmeas que receberam doses de Q β -controle e que foram vacinados com: Q β -TS, Q β -MASP, Q β - α -Gal, Q β -TS/MASP, Q β -TS/ α -Gal, Q β -MASP/ α -Gal e Q β -TS/MASP/ α -Gal (n=5-6), infectados pela cepa Colombiana de *T. cruzi*. (A) Camundongos eutanasiados 22 dias após a infecção. (B) Camundongos eutanasiados 190 dias após a infecção. No gráfico A os resultados estão apresentados como mediana e intervalo interquartil de intensidade da hipertrofia das fibras musculares. O teste de *Kruskal-Wallis*, seguido pelo pós-teste de *Dunns*, foi aplicado para realização das análises estatísticas dos dados. No gráfico B os resultados estão apresentados como média e SEM de intensidade da hipertrofia das fibras musculares. O teste de ANOVA *one way*, seguido pelo pós-teste de *Tukey*, foi aplicado para realização das análises estatísticas dos dados. a: representa diferença significativa em relação ao grupo Q β -Controle. b: representa diferença significativa em relação ao grupo Q β -TS. c: representa diferença significativa em relação ao grupo Q β -MASP. d: representa diferença significativa em relação ao grupo Q β - α -Gal. e: representa diferença significativa em relação ao grupo Q β -TS/MASP. f: representa diferença significativa em relação ao grupo Q β -TS/ α -Gal. g: representa diferença significativa em relação ao grupo Q β -MASP/ α -Gal. h: representa diferença significativa em relação ao grupo Q β -TS/MASP/ α -Gal. As diferenças estaticamente significativas estão representadas pelos * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$), *** ($p < 0,001$). DPI indica: dias após infecção.

5.2.5. Perfil de citocinas teciduais em camundongos vacinados durante a infecção experimental

Os níveis das citocinas teciduais pró-inflamatórias: IL-12p40, IFN- γ e anti-inflamatória/moduladora: IL-4, IL-10, apresentados por camundongos C57BL/6 α 1,3GT-KO vacinados, que receberam doses do Q β -controle, infectados pela cepa Colombiana de *T. cruzi* e que não sofreram nenhum tipo de intervenção (n=5-6 por grupo), foram quantificados através do ensaio de ELISA de captura. Os grupos experimentais vacinados que receberam doses dos peptídeos selecionados a partir das proteínas: TS, MASP, do epítipo α -Gal e das associações TS/MASP, TS/ α -Gal, MASP/ α -Gal, TS/MASP/ α -Gal acoplados ao Q β -VLP foram eutanasiados 22 e 190 dias após a infecção, durante a fase aguda e crônica, respectivamente. Camundongos que receberam doses do Q β -controle, foram incluídos como grupo controle infectado não vacinado e camundongos que não sofreram nenhum tipo de intervenção, foram incluídos como grupo controle não infectado.

Os dados demonstraram maiores níveis das citocinas pró-inflamatórias: IL-12p40 e IFN- γ nos tecidos cardíacos dos grupos experimentais que receberam doses de: Q β -controle ($p < 0,01/p < 0,001$), Q β -MASP ($p < 0,05/p < 0,001$), Q β - α -Gal ($p < 0,05/p < 0,01$), Q β -TS/MASP ($p < 0,05/p < 0,01$), Q β - TS/ α -Gal ($p < 0,05/p < 0,01$) e Q β - TS/MASP/ α -Gal ($p < 0,05/ p < 0,01$), quando comparados com o do grupo experimental não infectado, 22 dias após a infecção, durante a fase aguda. O valor médio e SEM descrito entre os parênteses da concentração da citocina IL-12p40 apresentado pelos grupos vacinados com: Q β -TS ($2.498 \pm 829,6$) e Q β -MASP/ α -Gal ($2.354 \pm 820,5$) é aproximadamente 3 vezes maior, quando comparado com o exibido pelo grupo não infectado ($704,3 \pm 292,9$). No entanto, nenhuma diferença estatisticamente significativa foi observada para os níveis desta citocina entre estes grupos. Porém, os níveis de IFN- γ são significativamente maiores ($p < 0,01$) nestes dois grupos vacinados em relação ao grupo não infectado (**Fig. 34 A e C**).

Aos 190 dias após a infecção, durante a fase crônica, os grupos que receberam doses de: Q β -controle ($p < 0,001/p < 0,01$; $p < 0,001/p < 0,05$; $p < 0,001/p < 0,05$;

$p < 0,001/p < 0,05$; $p < 0,001/p < 0,05$; $p < 0,001/ p < 0,05$, respectivamente) e Q β - α -Gal ($p < 0,001/p < 0,001$; $p < 0,001/p < 0,001$; $p < 0,01/p < 0,01$; $p < 0,01/p < 0,001$; $p < 0,01/p < 0,01$; $p < 0,001/p < 0,001$, respectivamente), apresentaram maiores nívéis das citocinas pró-inflamatória IL-12p40 e IFN- γ nos tecidos cardíacos, quando comparados com o dos grupos experimentais: não infectado, que receberam doses de: Q β -TS, Q β -MASP, Q β -TS/MASP, Q β -TS/ α -Gal e Q β -MASP/ α -Gal. No entanto, somente para a citocina a IFN- γ , os grupos que receberam doses de: Q β -controle ($p < 0,05$) e Q β - α -Gal ($p < 0,01$), apresentaram nívéis mais altos, quando comparado com os do grupo vacinado com Q β -TS/MASP/ α -Gal, neste mesmo período. Enquanto apenas para a citocina IL-12p40, o grupo que recebeu doses de Q β -TS/ α -Gal, apresentou nívéis maiores ($p < 0,05$), quando comparado com o do grupo experimental não infectado (**Fig. 34 B e D**). Nenhuma outra diferença estatística significativa foi observada para os nívéis destas citocinas entre os grupos: não infectado, que receberam doses de: Q β -controle, Q β -TS, Q β -MASP, Q β - α -Gal, Q β -TS/MASP, Q β -TS/ α -Gal, Q β -MASP/ α -Gal e Q β -TS/MASP/ α -Gal, nos diferentes períodos avaliados (**Fig. 34 A, B, C e D**).

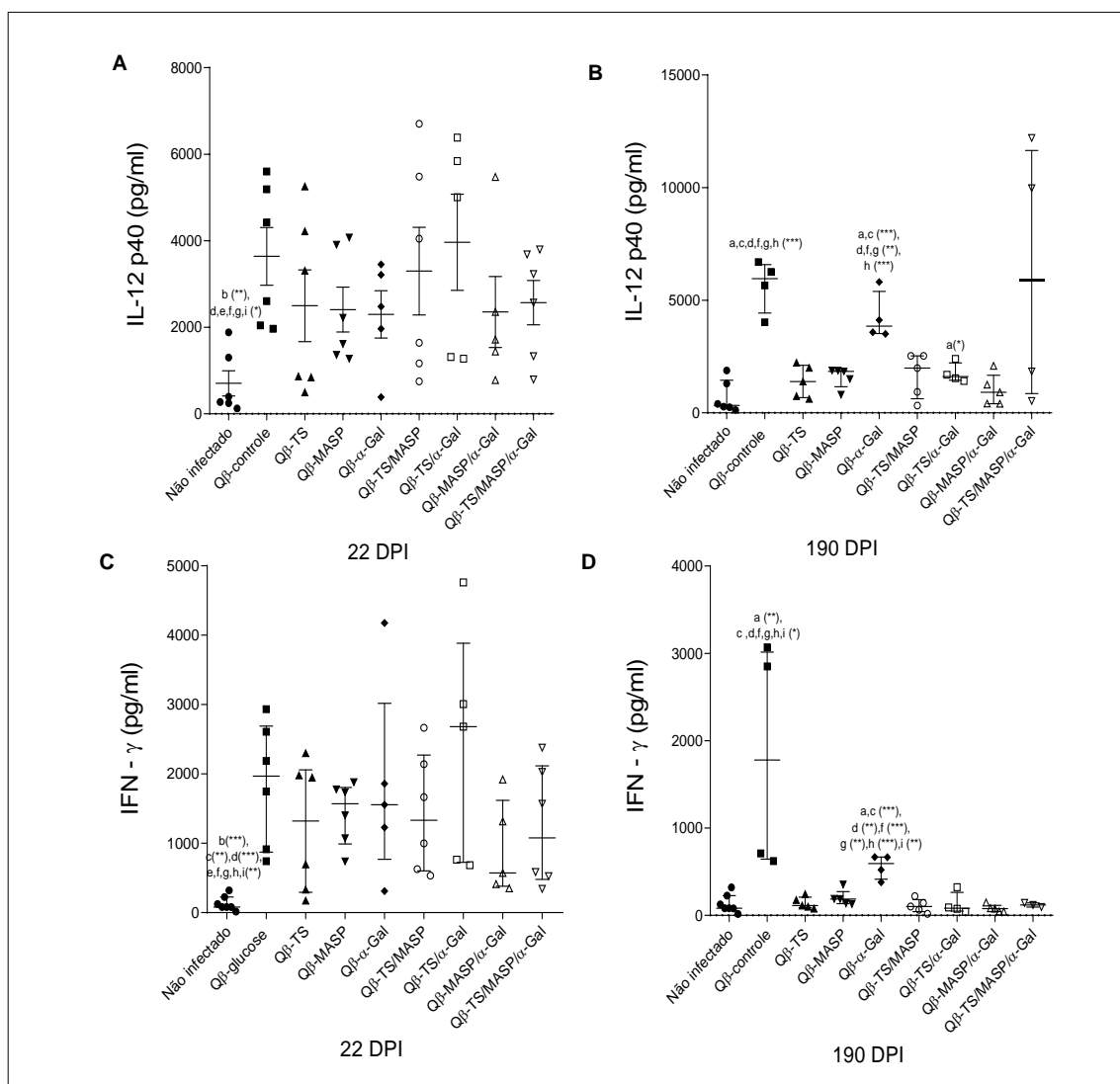


Figura 34. Avaliação do perfil de citocinas pró-inflamatórias IL-12p40 e IFN- γ no tecido cardíaco de camundongos C57BL/6 α 1,3GT-KO fêmeas que receberam doses de Q β -controle e vacinados com: Q β -TS, Q β -MASP, Q β - α -Gal, Q β -TS/MASP, Q β -TS/ α -Gal, Q β -MASP/ α -Gal e Q β -TS/MASP/ α -Gal, infectados pela cepa Colombiana de *T. cruzi* e não infectados (n=5-6 por grupo). (A) Níveis de IL-12p40 em pg/ml em camundongos eutanasiados 22 dias após a infecção. (B) Níveis de IL-12p40 em pg/ml camundongos eutanasiados 190 dias após a infecção. (C) Níveis de IFN- γ em pg/ml em camundongos eutanasiados 22 dias após a infecção. (D) Níveis de IFN- γ em pg/ml camundongos eutanasiados 190 dias após a infecção. No gráfico A estão representados os valores da média e SEM. O teste de ANOVA *one way*, seguido pelo pós-teste de *Tukey*, foi aplicado para realização das análises estatísticas destes dados. Nos gráficos B, C e D estão representadas os valores da mediana e o intervalo interquartil. O teste de *Kruskal-Wallis*, seguido pelo pós-teste de *Dunns*, foi aplicado para realização das análises estatísticas destes dados. a: representa diferença significativa em relação ao grupo não infectado. b: representa diferença significativa em relação ao grupo Q β -Controle. c: representa diferença significativa em relação ao grupo Q β -TS. d: representa diferença significativa em relação ao grupo Q β -MASP. e: representa diferença significativa em relação ao grupo Q β - α -Gal. f: representa diferença significativa em relação ao grupo Q β -TS/MASP. g: representa diferença significativa em relação ao grupo Q β -TS/ α -Gal. h: representa diferença significativa em relação ao grupo Q β -MASP/ α -Gal. i: representa diferença significativa em relação ao grupo Q β -TS/MASP/ α -Gal. As diferenças estatisticamente significativas estão representadas pelo símbolo * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$), *** ($p < 0,001$). DPI indica: dias após infecção.

Além disso, os resultados mostraram que durante 22º dia após a infecção, nenhuma diferença estatística significativa foi observada entre os níveis das citocinas anti-inflamatória/moduladora: IL-4 e IL-10 nos tecidos cardíacos dos grupos: não infectado, que receberam doses de Q β -controle e vacinados. Não foi possível realizar as dosagens dos níveis da citocina IL-4 nos tecidos cardíacos dos grupos: Q β -MASP, Q β - α -Gal, Q β -TS/MASP, Q β -TS/ α -Gal (**Fig. 35 A e C**).

As análises comparativas também demonstraram que 190 dias após a infecção, os grupos que receberam doses de: Q β - α -Gal e Q β -controle, apresentaram níveis mais elevados de IL-4 e IL-10, quando comparados com os de grupos experimentais: não infectados (IL-4 - $p < 0,001/p < 0,01$; IL-10 - $p < 0,01/p < 0,05$, respectivamente), que receberam doses de: Q β -TS ($p < 0,05$), Q β -MASP ($p < 0,05$), Q β -TS/MASP ($p < 0,05$), Q β -TS/ α -Gal ($p < 0,05$) e Q β -MASP/ α -Gal ($p < 0,05$). Nenhuma outra diferença estatística significativa foi observada para os níveis destas citocinas entre os grupos: não infectado, que receberam doses de: Q β -controle, Q β -TS, Q β -MASP, Q β - α -Gal, Q β -TS/MASP, Q β -TS/ α -Gal, Q β -MASP/ α -Gal e Q β -TS/MASP/ α -Gal (**Fig. 35 B e D**).

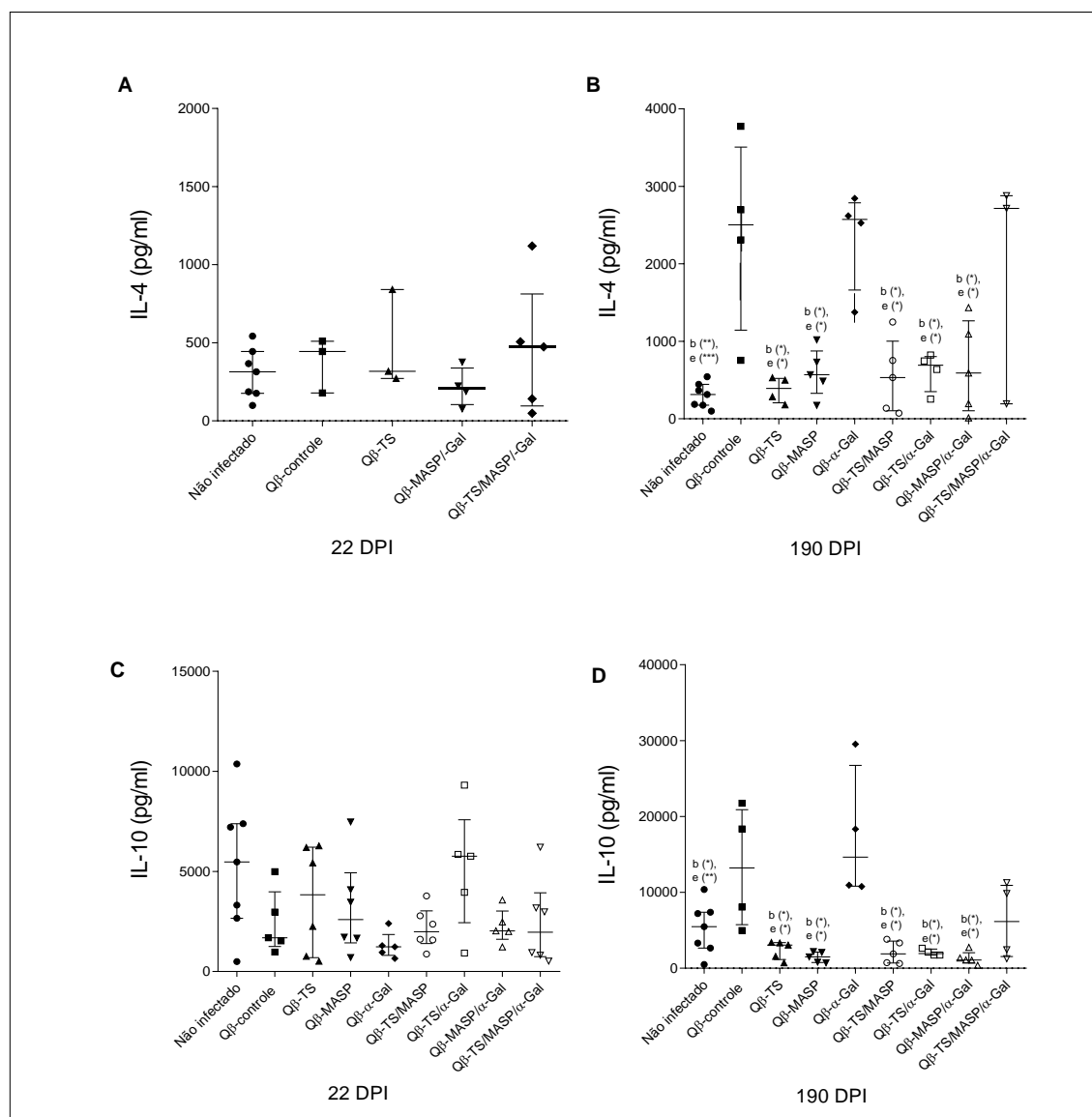


Figura 35. Avaliação do perfil de citocinas anti-inflamatórias/moduladoras IL-4 e IL-10 no tecido cardíaco de camundongos C57BL/6 $\alpha 1,3GT-KO$ fêmeas que receberam doses de Q β -controle e vacinados com: Q β -TS, Q β -MASP, Q β - α -Gal, Q β -TS/MASP, Q β -TS/ α -Gal, Q β -MASP/ α -Gal e Q β -TS/MASP/ α -Gal, infectados pela cepa Colombiana de *T. cruzi* e não infectados (n=5-6 por grupo). (A) Níveis de IL-4 em pg/ml em camundongos eutanasiados 22 dias após a infecção. (B) Níveis de IL-4 em pg/ml camundongos eutanasiados 190 dias após a infecção. (C) Níveis de IL-10 em pg/ml em camundongos eutanasiados 22 dias após a infecção. (D) Níveis de IL-10 em pg/ml camundongos eutanasiados 190 dias após a infecção. Nos gráficos A, B, C e D estão representadas os valores da mediana e o intervalo interquartil. O teste de *Kruskal-Wallis*, seguido pelo pós-teste de *Dunns*, foi aplicado para realização das análises estatísticas destes dados. b: representa diferença significativa em relação ao grupo Q β -Controle. e: representa diferença significativa em relação ao grupo Q β - α -Gal. As diferenças estatisticamente significativas estão representadas pelo símbolo * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$), *** ($p < 0,001$). DPI indica: dias após infecção.

6. DISCUSSÃO

A doença de Chagas é potencialmente fatal, apresentando alta taxa de mortalidade nos países da América Latina, com aproximadamente 12.000 mortes a cada ano por complicações decorrentes da infecção. E tem causado um alto impacto econômico, social e cultural, por ser uma doença de caráter crônico, incapacitante e debilitante, provocando deficiência prematura dos indivíduos afetados nas áreas endêmicas (Organização Mundial de Saúde, 2010).

Até o presente momento, não existem vacinas disponíveis para a prevenção ou que contribuam com tratamento da doença de Chagas em seres humanos, apesar de numerosos estudos usando parasitos atenuados, lisados, proteínas recombinantes, purificadas e DNA (Rodríguez-Morales et al., 2015). Os fármacos disponíveis para o tratamento, apresentam baixa ou nenhuma eficácia quando administrados durante a fase crônica tardia da doença (Lana et al., 2009; Fernades et al., 2009; Ferreira et al., 2002; Braga et al., 2000; Lauria-Pires et al., 2000; Fabbro et al., 2000; Viotti et al., 1994; Ferreira, 1990). A presença de espécies de insetos vetores difíceis de serem controladas por inseticidas ou resistentes ao tratamento, prejudica a realização do controle vetorial (Schofield et al., 2006). As rotas de transmissão secundárias: como as transfusões, transplantes, o contágio por via congênita e oral, dificultam e torna oneroso o combate à infecção pelo *T. cruzi* onde a presença do inseto vetor foi controlada (Coura & Viñas, 2010). Além disso, contribui para dispersão da doença fora das áreas endêmicas (Organização Mundial de Saúde, 2010).

Assim, o alto número de pessoas afetadas, o impacto econômico causado pela doença nas áreas endêmicas, a recente dispersão de pessoas infectadas, a ineficiência e alto custo do tratamento, a falta de métodos eficazes de controle de transmissão, tem incentivado o desenvolvimento de pesquisas que buscam produzir vacinas capazes de proteger os humanos da infecção pelo *T. cruzi* (Arce-Fonseca et al. 2015; Rodríguez-Morales et al. 2015). Levando em consideração este cenário, neste estudo buscamos avaliar a eficácia de antígenos vacinais contra a infecção pela cepa Y e Colombiana do *T. cruzi*, em camundongos da linhagem isogênica C57BL/6 depletados para os genes da

enzima α 1,3galactosiltransferase (α 1,3GT-KO).

Estes camundongos foram utilizados como modelo experimental, por mimetizarem a resposta imune humoral humana quanto a produção de altos títulos de anticorpos anti- α -Gal, quando previamente infectados pelo *T. cruzi* (Portillo et al., 2019; Ayala et al., 2020). Além disso, o modelo experimental camundongo é amplamente utilizado em pesquisas sobre a doença de Chagas, pois reproduzem aspectos da infecção pelo *T. cruzi* humana relacionados ao dano tecidual e a resposta imunológica envolvida no controle do parasito (Andrade et al., 1999; Diaz et al., 2004; Ayala et al., 2020). Estes animais também são descritos como sendo um dos camundongos mais resistentes à infecção por diferentes cepas de *T. cruzi*, permitindo a avaliação com certa facilidade da fase crônica da doença (Pizzi et al., 1948; Postan et al., 1984; Portillo et al., 2019).

A cepa Y foi escolhida para os estudos de infecção experimental, por apresentar alta virulência, induzir alta parasitemia e provocar alta mortalidade na infecção murina, facilitando, neste caso, a avaliação da eficácia dos candidatos a antígenos vacinais no controle da infecção e em induzir a supressão ou reduzir a mortalidade dos camundongos (Andrade, 1976; Filardi & Brener, 1987). Enquanto a cepa Colombiana de *T. cruzi*, foi escolhida, por apresentar algumas particularidades como a indução de baixa mortalidade, tropismo por tecidos musculares durante toda a infecção e por provocar uma intensa cardiomiopatia (Federici et al., 1964; Andrade, 1976; Talvani et al., 2000). Estas características facilitam a avaliação da eficácia dos candidatos a antígenos vacinais na prevenção do dano aos tecidos cardíacos tanto na fase aguda, quanto na fase crônica. Assim a intensa cardiomiopatia provocada pela cepa Colombiana associada à alta taxa de sobrevivência animal, possibilita o estudo da patologia cardíaca na doença de Chagas e seus aspectos imunológicos durante as distintas fases da infecção experimental (Talvani et al., 2000).

Optamos por eutanasiar os camundongos 8 dias após a infecção pela cepa Y e 22 dias após a infecção pela cepa Colombiana, pois durante este período a infecção provocada por estas cepas se encontra na fase aguda, onde os níveis de parasitemia no sangue são elevados (Andrade, 1976). Além disso, optamos também em eutanasiar os camundongos 36 dias após a infecção pela cepa Y, pois de acordo com estudos prévios

realizados pelo nosso grupo de pesquisa, camundongos fêmeas C57BL/6 $\alpha 1,3GT-KO$ que foram inoculados com PBS1X e infectados com esta cepa tiveram uma grande perda de massa corporal e uma porcentagem vieram a óbito entre 14° e 36° dia após a infecção, final da fase aguda e início da fase crônica indeterminada. A partir desse período os camundongos sobreviventes começaram a recuperar a massa corporal perdida e não foram observadas mais mortalidades (dados não publicados). Assim decidimos analisar as condições histopatológicas dos tecidos cardíacos dos camundongos sobreviventes vacinados e não vacinados, neste momento tão crítico da infecção.

Escolhemos infectar os camundongos com a cepa Colombiana, caracterizada por provocar intensa cardiomiopatia e eutanasiar 190 dias após a infecção, porque o modelo experimental camundongo leva cerca de seis a doze meses para desenvolver as formas determinadas crônicas cardíaca e/ou digestiva da doença de Chagas. Assim, podemos avaliar adequadamente as alterações histopatológicas desencadeadas durante a fase crônica no coração (Federici et al., 1964; Andrade., 1990).

Inicialmente, foi avaliada a eficácia das vacinações em induzir o controle da infecção, através da análise da carga parasitária no sangue periférico e nos tecidos cardíacos. Os dados obtidos mostraram que durante a infecção pela cepa Y (**Fig.10**) ou colombiana (**Fig.25**) camundongos C57BL/6 $\alpha 1,3GT-KO$ vacinados e não vacinados apresentaram um padrão de alterações da parasitemia ao longo do tempo semelhante ao que já foi demonstrado vastamente na literatura (Federici et al., 1964; Andrade, 1976; Filardi & Brener, 1987; Reis Machado, et al; 2014; Portillo et al., 2019). Através da análise da cinética de parasitemia podemos observar que durante a infecção pela cepa Y a parasitemia apresentou níveis detectáveis em 85% (84) dos animais 5 dias após. O pico máximo foi atingindo aproximadamente entre o 7° e 8° dia em 72% (39) e o nível de parasitos foi diminuindo a partir deste ponto abruptamente até o 15° dia, passando a permanecer extremamente baixo ou não sendo mais detectado (**Fig.10**). Observamos que durante a infecção pela cepa Colombiana a parasitemia apresenta-se baixa nos primeiros dias, com um aumento substancial dos níveis a partir do 22° dia, atingindo o pico máximo aproximadamente entre o 26° e 34° dia, em 69% (31) dos animais e diminuindo a partir deste ponto (**Fig.25**). Os dados deste parâmetro parasitológico apresentado pelos grupos

experimentais são concordantes com aqueles da literatura, que demonstraram que durante a fase aguda após o desenvolvimento da imunidade, no hospedeiro mamífero a replicação do parasito é controlada (Tarleton., 1995).

No entanto, através da avaliação destes dados também podemos observar que durante a infecção pela cepa Y (**Fig.10**) ou colombiana (**Fig.25**), camundongos C57BL/6 α 1,3GT-KO infectados vacinados com: Q β -TS, Q β -MASP, Q β - α -Gal, Q β -TS/MASP, Q β -TS/ α -Gal, Q β -MASP/ α -Gal e Q β -TS/MASP/ α -Gal apresentaram baixos níveis de parasitos no sangue periférico, quando comparados com o grupo controle infectado não vacinado. Estes resultados nos levam a sugerir que estes candidatos a antígenos vacinais são capazes de induzir um controle do parasitismo sanguíneo durante a infecção por ambas as cepas. A eficácia apresentada por estes candidatos a antígenos vacinais em induzir um controle mais efetivo da replicação do parasito é relevante. Visto que a capacidade do hospedeiro em montar uma resposta capaz de manter baixos níveis de parasitemia no início da infecção provavelmente pode vir a ter um papel decisivo no desenvolvimento da patologia na doença de Chagas. Uma vez que, estudos de acompanhamento em pacientes chagásicos sugerem que a intensidade dos sintomas clínicos e das alterações fisiopatológicas que ocorrem durante a fase aguda da doença se correlacionam positivamente com os níveis de parasitemia e com a gravidade da doença cardíaca observada durante a fase crônica da doença de Chagas (Teixeira et al., 1978; Dias., 1989).

Análises comparativas entre os níveis máximos de parasitos atingidos durante o acompanhamento da parasitemia também foram realizadas. Os resultados demonstraram que a vacinação com a partícula Q β - α -Gal provocou a redução da parasitemia, durante o pico em aproximadamente 80% na infecção por ambas as cepas. Observamos também que a vacinação com a partícula Q β -TS/MASP/ α -Gal reduziu a parasitemia, durante o pico em aproximadamente 40% e 80% na infecção pela cepa Y e Colombiana, respectivamente. Já a vacinação com as partículas, Q β -MASP, Q β -MASP/ α -Gal e Q β -TS/ α -Gal reduziram a carga parasitária no sangue periférico, durante o pico em aproximadamente 50% e 70% na infecção pela cepa Y e Colombiana, respectivamente. A vacinação com a partícula Q β -TS, provocou a redução da parasitemia, durante o pico

em aproximadamente 60% na infecção por ambas as cepas. E a vacinação com a partícula Q β -TS/MASP, reduziu a carga parasitária no sangue periférico, durante o pico em aproximadamente 70% e 50% na infecção pela cepa Y e Colombiana, respectivamente (**Fig.11 e Fig.26**).

Quando avaliamos o parasitismo tecidual, não encontramos ninhos de amastigotas nos tecidos cardíacos dos camundongos vacinados com Q β -TS/ α -Gal, 8 dias após a infecção pela cepa Y (**Fig.12**). Isso foi observado também em camundongos vacinados com: Q β - α -Gal, Q β -MASP/ α -Gal e Q β -TS/MASP/ α -Gal, 22 dias após a infecção pela cepa Colombiana (**Fig.27**). Enquanto, não foi encontrado diferença estatística entre o número de ninhos de amastigotas presentes nas secções dos corações, dos camundongos infectados com a cepa Y (**Fig. 12**) ou colombiana (**Fig. 27**) e vacinados com: Q β -TS, Q β -MASP e Q β -TS/MASP em relação ao grupo controle infectado não vacinado.

Nossos resultados sugerem que as vacinações com Q β -TS/ α -Gal, durante a infecção pela cepa Y (**Fig.10, Fig.11 e Fig.12**) e as vacinações com: Q β - α -Gal, Q β -MASP/ α -Gal e Q β -TS/MASP/ α -Gal, durante a infecção pela cepa Colombiana (**Fig.25, Fig.26 e Fig.27**), apresentaram uma melhor eficácia em controlar a disseminação do parasito. Uma vez que os camundongos que receberam as doses destas partículas contribuíram na manutenção da baixa parasitemia, reduzindo significativamente a carga parasitária durante o pico e controlaram o parasitismo tecidual durante o período da fase aguda avaliado.

Aos 36 dias após a infecção pela cepa Y (**Fig. 12**) e 190 dias após a infecção pela cepa Colombiana (**Fig. 27**), durante a fase crônica, não encontramos ninhos de amastigotas nos tecidos cardíacos dos grupos experimentais.

Os dados deste parâmetro parasitológico apresentado pelo grupo controle infectado não vacinado são concordantes com aqueles da literatura. No qual, demonstram que em camundongos da linhagem C57BL/6 selvagens na infecção pela cepa Colombiana o parasitismo tecidual inicia-se 15 dias após, havendo um aumento substancial dos níveis até 30° dia, diminuindo a partir deste ponto, não sendo mais encontrados 120 dias após a infecção (Talvani et al., 2000). Outros estudos também relataram que na infecção por diferentes cepas de *T. cruzi*, inclusive pela cepa Y no modelo experimental murino, o

parasitismo tecidual é mais intenso durante a fase aguda, quando os níveis de parasitemia também são altos. Na fase crônica da infecção, quando a parasitemia é inexistente ou os níveis são extremamente baixos, ninhos de amastigotas são raramente encontrados no coração (Fragata Filho et al., 1995; Rassi Jr et al., 2010).

Para avaliar a capacidade de sobrevivência dos camundongos vacinados e não vacinados durante a infecção pelo *T. cruzi*, a mortalidade foi monitorada diariamente, até o momento em que foram eutanasiados, 8 e 36 dias após a infecção pela cepa Y, 22 e 190 dias após a infecção pela cepa Colombiana. Na infecção pela cepa Y do *T. cruzi*, caracterizada por apresentar alta virulência no modelo murino, os resultados demonstraram que as vacinações com: Q β -TS, Q β - α -Gal, Q β -TS/MASP, Q β -TS/ α -Gal e Q β -TS/MASP/ α -Gal foram capazes de garantir a sobrevivência dos camundongos. Camundongos infectados vacinados com: Q β -MASP (1/5), Q β -MASP/ α -Gal (1/5) e que pertencem ao grupo controle infectado não vacinado (2/10), acompanhados diariamente durante o período de 36 dias após a infecção, apresentaram taxa de sobrevivência, de 80% (**Tab.2**).

Além disso, nossos dados também mostraram que 100% dos camundongos que pertencem aos grupos experimentais monitorados durante 22 e 190 dias após a infecção pela cepa Colombiana, durante a fase aguda e crônica da doença, respectivamente, sobreviveram. Estes resultados são esperados, uma vez que o modelo experimental camundongo C57BL/6 α 1,3GT-KO são descritos como mais resistentes à infecção por diferentes cepas de *T. cruzi* (Pizzi et al., 1948; Postan et al., 1984; Portillo et al., 2019) e a cepa Colombiana é caracterizada por induzir baixa mortalidade (Andrade, 1976). A vantagem em utilizar este modelo experimental de infecção está relacionada a intensa cardiomiopatia provocada pela cepa Colombiana associada à alta taxa de sobrevivência animal. Estas condições tornam este modelo adequado para avaliar as alterações histopatológicas desencadeadas durante a fase crônica no coração. E desta forma possibilita o estudo da patologia cardíaca na doença de Chagas e a avaliação da eficácia de candidatos vacinais em prevenir os danos teciduais provocados pela infecção (Talvani et al., 2000).

Ainda, podemos sugerir a partir dos resultados apresentados, que durante a infecção pela cepa Y, os camundongos vacinados não apresentaram diferença significativa na mudança da massa corporal, quando comparados com o grupo infectado não vacinado (**Fig.13 A e B**).

Durante a infecção pela cepa Colombiana, a análise da curva de variação da massa corporal revelou que a vacinação com a associação Q β -TS/MASP/ α -Gal, garantiu que os camundongos infectados ganhassem mais massa corporal no início da infecção, do que os outros grupos infectados: vacinados e não vacinados. Camundongos vacinados com: Q β -TS, Q β -TS/ α -Gal, Q β -MASP, Q β -TS/MASP, Q β -MASP/ α -Gal, Q β - α -Gal e Q β -TS/MASP/ α -Gal chegaram a aumentar a sua massa corporal em 19,76%, 22,9%, 23,46%, 23,56%, 24,76%, 32,17% e 45,45% respectivamente, durante a infecção, enquanto o grupo controle infectado não vacinado obteve um ganho de 16,75% (Fig.28).

Os dados também demonstraram que camundongos infectados e vacinados com: Q β - α -Gal, Q β -MASP, Q β -TS/MASP/ α -Gal, Q β -MASP/ α -Gal, Q β -TS, Q β -TS/ α -Gal, Q β -TS/MASP chegaram a apresentar uma perda máxima de: 2,2%, 4,56%, 5,2%, 6,18%, 6,33%, 7,15% e 8,7%, respectivamente da massa corporal adquirida, durante a fase aguda da infecção, logo após o pico de parasitemia. O grupo controle infectado não vacinado apresentou uma perda de massa corporal maior de: 9,8%. Além disso, através da análise da curva de variação da massa corporal inicial podemos concluir que camundongos infectados e vacinados com: Q β -MASP, Q β - α -Gal, Q β -TS/ α -Gal, Q β -MASP/ α -Gal e Q β -TS/MASP/ α -Gal, conseguiram recuperar a massa corporal perdida mais rapidamente (entre 61° e 74° dia após a infecção), quando comparados com camundongos infectados e vacinados com: Q β -TS, Q β -TS/MASP e que pertencem ao grupo controle infectado não vacinado (entre 114° e 154° dia após a infecção) (**Fig.28**).

Neste trabalho, também, foi avaliada a resposta imune humoral induzida pelos antígenos vacinais, através da quantificação dos níveis de anticorpos IgG total. O papel que os anticorpos exercem no controle da parasitemia e na resistência à infecção pelo *T. cruzi* foi bem estudado no modelo camundongo (Kagan & Norman, 1961; Kierszenbaum & Howard, 1976; Krettli e Brener, 1976; Kipnis et al., 1981; Umekita et al., 1988). A infecção provoca a ativação policlonal de células B, o que leva a hipergamaglobulinemia

observada (Minoprio et al., 1986). A produção de anticorpos da classe IgG é desencadeada logo no início da fase aguda da doença. Estes anticorpos reagem principalmente com as moléculas de superfície das formas tripomastigotas, participando da eliminação dos parasitos (Cançado, 1963, 1997).

Nossos resultados demonstraram que as vacinações com as partículas: Q β -TS, Q β -MASP, Q β - α -Gal, Q β -TS/MASP, Q β -TS/ α -Gal, Q β -MASP/ α -Gal e Q β -TS/MASP/ α -Gal provocaram uma elevada produção de anticorpos IgG total, que se mantém ao longo da infecção, por pelo menos 36 dias após a infecção pela cepa Y (**Fig. 6, Fig.7 e Fig.8**) e 190 dias após a infecção pela cepa Colombiana (**Fig. 21, Fig.22 e Fig.23**), momento em que foi realizada a última avaliação. Assim, a presença de altos níveis de anticorpos IgG total no soro dos camundongos reativos aos antígenos vacinais, 8 dias após a infecção pela cepa Y (**Fig. 6, Fig.7 e Fig.8**) e 22 dias após a infecção pela cepa Colombiana (**Fig. 21, Fig.22 e Fig.23**), durante a fase aguda associada à baixos níveis de parasitemia, nos leva a concluir que a vacinação com estas partículas, provavelmente induziram o desenvolvimento de uma resposta imune adaptativa, mediada por linfócitos B protetora.

As análises histopatológicas dos tecidos cardíacos demonstraram que durante a fase aguda da infecção pela cepa Y (**Fig. 14 e Fig.15**), ou colombiana (**Fig. 29 e Fig.30**), os camundongos que pertencem aos grupos controles infectados não vacinados apresentaram níveis moderados de infiltrado inflamatório ao longo das fibras cardíacas. Ao avaliarmos o perfil de citocinas nos tecidos cardíacos, estes mesmos grupos apresentaram produção de elevados níveis das citocinas pró-inflamatórias IL-12p40, IFN- γ e níveis basais das citocinas anti-inflamatórias/moduladoras IL-4 e IL-10. Resultados semelhantes foram apresentados pelos grupos infectados e vacinados com: Q β -TS, Q β -MASP, Q β - α -Gal, Q β -TS/MASP, Q β -MASP/ α -Gal e Q β -TS/MASP/ α -Gal (**Fig. 19, Fig.20, Fig.34 e Fig. 35**). Apenas os camundongos infectados pela cepa Y e vacinados com Q β -TS/ α -Gal apresentaram baixos níveis de infiltrado inflamatório estatisticamente diferentes do grupo controle infectado não vacinado. Além de níveis basais das citocinas pró-inflamatórias IL-12p40 e IFN- γ (**Fig. 14, Fig.15, Fig. 19 e Fig.20**).

Quando analisamos a intensidade das alterações degenerativas representadas por necrose tecidual e autólise ou degeneração dos cardiomiócitos, provocada pela replicação do parasito e pelo processo inflamatório, camundongos que pertencem aos grupos controles infectados não vacinados apresentaram também níveis moderados, durante a fase aguda da infecção pela cepa Y (**Fig. 17**) ou colombiana (**Fig. 32**). Apenas a vacinação com a associação Q β -TS/MASP/ α -Gal apresentou a capacidade de reduzir as alterações degenerativas durante a fase aguda da infecção pela cepa Y (**Fig. 17**) ou colombiana (**Fig. 32**). A vacinação com a associação Q β -MASP/ α -Gal reduziu apenas durante a infecção pela cepa Y (**Fig. 17**). Enquanto, as vacinações com: Q β -TS e Q β - α -Gal reduziram apenas durante a infecção pela cepa Colombiana (**Fig. 32**).

Juntos, estes dados apresentados são concordantes com aqueles da literatura que demonstram que durante a fase aguda da doença de Chagas no hospedeiro mamífero as formas amastigotas e tripomastigotas expressam moléculas que provocam a estimulação excessiva do sistema imune, promovendo uma forte ativação de linfócitos, o que desencadeia um intenso processo inflamatório em muitos tecidos, incluindo os do coração (Higuchi et al., 2003). A resposta inflamatória deflagrada pela infecção pelo *T. cruzi* é essencial no processo de controle do parasitismo tecidual, mas também pode ser responsável pela patologia na doença de Chagas caso não seja modulada. Dessa forma, a ativação de uma resposta imune exacerbada e contínua, com alta expressão de citocinas pró-inflamatórias, posteriormente acaba sendo patogênica provocando danos nos tecidos e consequente morte do hospedeiro. No entanto, a ausência ou redução desta resposta inflamatória também pode ser prejudicial conduzindo a uma replicação excessiva do parasito (Teixeira et al., 2002; Talvani & Teixeira, 2011).

Esses resultados também reforçam a ideia de que durante os estágios iniciais da infecção experimental o hospedeiro mamífero, apresenta um padrão de expressão de citocinas teciduais predominantemente do tipo 1, demonstrado pelo aumento da expressão de IL-12p40 e IFN- γ , associado a diminuição de expressão das citocinas IL-4 e IL-10 (Zhang & Tarleton, 1996). Diferentes ensaios realizados tanto in vitro, quando in vivo, demonstraram que durante a fase aguda da doença de Chagas, células da resposta imune inata produzem citocinas pró-inflamatórias, como IL-12 e TNF- α . A IL-12 induz

a síntese de IFN- γ , por linfócitos T ativados e células *Natural Killer* (NK). O IFN- γ exerce uma ação sinérgica com TNF- α , ativando macrófagos infectados levando-os a produzir altos níveis de óxido nítrico, o que promove o controle da replicação do parasito, desempenhando assim um papel importante na resistência a infecção. Assim, durante esta fase da infecção células da resposta imune inata e adaptativa trabalham em conjunto para impedir a replicação do parasito, controlando a parasitemia e o parasitismo tecidual (Torrice et al., 1991; Gazzinelli et al., 1992; Silva et al., 1992; Vespa et al., 1994; Abrahamsohn et al., 1995; Silva et al., 1995; Aliberti et al., 1996; Hunter et al., 1996; Camargo et al., 1997a; Camargo et al., 1997b; Holscher et al., 1998).

Os resultados encontrados pela análise histopatológica dos tecidos cardíacos também sugerem que as vacinações com: Q β -TS/ α -Gal, Q β -MASP/ α -Gal e Q β -TS/MASP/ α -Gal, foram capazes de impedir o surgimento do processo inflamatório durante a fase crônica da infecção pela cepa Y. Enquanto, as vacinações com: Q β -TS, Q β -MASP, Q β - α -Gal e Q β -TS/MASP, foram capazes de reduzi-lo (**Fig.14 e Fig.16**). Além disso, foi possível observar que a vacinação com: Q β -TS, foi capaz de reduzir a hipertrofia das fibras musculares, enquanto as vacinações com: Q β - α -Gal, Q β -TS/ α -Gal, Q β -MASP/ α -Gal e Q β -TS/MASP/ α -Gal, foram capazes de impedir (**Fig.18**).

Camundongos vacinados com Q β -TS, Q β -MASP, Q β -TS/MASP, Q β -TS/ α -Gal, Q β -MASP/ α -Gal e Q β -TS/MASP/ α -Gal, durante a fase crônica da infecção pela cepa Colombiana também controlaram de maneira efetiva a infecção, mantendo a homeostasia do sistema imune. Uma vez que apresentaram baixos níveis de infiltrado inflamatório ao longo das fibras cardíacas, estatisticamente menores que de camundongos infectados não vacinados (**Fig.29 e Fig.31**) e um perfil basal de citocinas teciduais semelhante aos de camundongos não infectados e não vacinados (**Fig.34 e Fig.35**). O que irá provavelmente contribuir para prevenir as lesões cardíacas provocadas pela doença. Através dos resultados encontrados também podemos sugerir que a vacinação com Q β -MASP e Q β -TS/MASP/ α -Gal, foi capaz de reduzir a hipertrofia das fibras musculares na infecção pela cepa Colombiana, durante a fase crônica, enquanto as vacinações com Q β -TS/MASP foram capazes de impedir (**Fig.33**).

Juntos, os dados apresentados aqui nos levam a sugerir que camundongos vacinados com Q β -TS, Q β -TS/MASP, Q β -TS/ α -Gal, e Q β -TS/MASP/ α -Gal, desenvolveram uma resposta imune eficaz e controlada. Estes camundongos foram capazes de conter de maneira efetiva a replicação do parasito (**Fig.10 e Fig.25**), mantendo a homeostasia do sistema imune, o que explica a presença de um perfil de citocinas semelhante aos camundongos não infectados, durante a fase crônica da doença (**Fig.19, 20, Fig.34 e Fig.35**). Assim, conseqüentemente, o processo inflamatório que leva a maiores danos teciduais durante a fase crônica se apresentou reduzido ou ausente na infecção pela cepa Y ou Colombiana (**Fig.14, Fig.16, Fig.29 e Fig.31**). Apesar das vacinações com Q β -MASP e Q β -MASP/ α -Gal não induzirem a supressão da mortalidade durante a infecção pela cepa Y, condições semelhantes foram observadas em camundongos sobreviventes e infectados pela cepa Colombiana (**Tab.2, Fig.25, Fig.29, Fig.31, Fig.34 e Fig.35**). Camundongos infectados pela cepa Colombiana não vacinados desenvolveram uma resposta inflamatória exarcebada, contínua e desequilibrada com produção elevada de citocinas tanto do tipo 1, quanto do tipo 2, que apesar de ter controlado a replicação do parasito durante a fase aguda, não é modulada e conseqüentemente irá gerar danos teciduais severos durante a fase crônica da infecção (**Fig.25, Fig. 29, Fig. 31, Fig.34 e Fig.35**). Condições semelhantes também foram observadas na infecção pela cepa Y, o processo inflamatório intenso observado nos tecidos cardíacos durante a fase aguda, permaneceu durante a fase crônica em camundongos que sobreviveram a infecção, o que provavelmente foi responsável pela geração de danos teciduais severos que levou a morte do restante dos camundongos que pertenciam a este grupo (**Fig.10, Fig.14, Fig.16, Fig.19, Fig.20**). Entre os camundongos vacinados com Q β - α -Gal, apesar de terem baixos níveis de parasitemia durante a fase aguda da infecção por ambas as cepas, na infecção pela cepa Colombiana durante a fase crônica desenvolveram uma resposta inflamatória exarcebada e desequilibrada. Uma elevada produção de citocinas tanto do tipo 1, quanto do tipo 2, semelhante ao grupo controle não vacinado, foi identificada (**Fig.10, Fig.25, Fig. 29, Fig. 31, Fig.34 e Fig.35**). Os resultados, no entanto, mostraram que aos 8 dias após a infecção pela cepa Y, o processo inflamatório apresentou uma intensidade média baixa ao longo das fibras

cardíacas, apesar de não haver diferença estatística quando comparados com os níveis de camundongos infectados não vacinados (**Fig.14 e Fig.15**). Já aos 36 dias após a infecção o infiltrado celular nos tecidos cardíacos destes camundongos apresentou níveis significativamente baixos em relação ao grupo controle infectado não vacinado, ocorrendo uma regressão do processo inflamatório observado durante a fase aguda (**Fig.14 e Fig.16**)

Durante a fase crônica da infecção pelo *T. cruzi*, o processo inflamatório provoca a degeneração dos tecidos, o que desencadeia a formação de fibrose. Provavelmente o que determina um desfecho favorável ou desfavorável para o hospedeiro é o equilíbrio entre a resposta imune mediada pelo parasito e a inflamação prejudicial aos tecidos. Uma resposta imune ineficiente, leva a danos teciduais e estarão aumentadas a carga parasitária e a inflamação mediada pelo sistema imune. Em contrapartida, uma resposta imune efetiva provoca a redução da carga parasitária e da inflamação, o que conseqüentemente resultará em menores danos teciduais (Rassi et al., 2010).

A partir da avaliação da eficácia de antígenos vacinais em um modelo experimental murino de infecção pelo *T. cruzi*, realizada por este trabalho, podemos sugerir que os peptídeos selecionados a partir das proteínas TS e MASP, o epítipo α -Gal e as associações avaliadas (Q β -TS/MASP, Q β -TS/ α -Gal, Q β -MASP/ α -Gal e Q β -TS/MASP/ α -Gal) podem ser consideradas potenciais candidatas a uma vacina contra a infecção pela cepa Y e Colombiana. Provavelmente estes antígenos e suas associações são capazes de induzirem o desenvolvimento de uma resposta imune efetiva que provocou a redução da carga parasitária no sangue e da inflamação nos tecidos cardíacos durante a fase crônica, o que conseqüentemente resultará em menores danos ao coração, fornecendo resistência ao hospedeiro. No entanto estes alvos vacinais apresentaram diferentes graus de proteção.

Durante a infecção com a cepa Y, as vacinações com os peptídeos selecionados a partir das proteínas: TS, MASP, com o epítipo α -Gal e as associações: TS/MASP, TS/ α -Gal, MASP/ α -Gal e TS/MASP/ α -Gal foram eficientes na manutenção da baixa parasitemia, reduzindo significativamente a carga parasitária durante o pico em relação ao grupo controle infectado não vacinado (**Fig.10 e Fig.11**). As vacinações com o

peptídeo selecionado a partir da proteína TS, com epítipo α -Gal e as associações: TS/MASP, TS/ α -Gal e TS/MASP/ α -Gal foram capazes de induzir a supressão da mortalidade dos camundongos na infecção pela cepa Y (**Tab.2**). O processo inflamatório apresentado nos tecidos cardíacos durante a fase aguda, regrediu entre os camundongos vacinados com as associações: TS/ α -Gal, MASP/ α -Gal e TS/MASP/ α -Gal, não sendo mais encontrado, durante a fase crônica, o que irá provavelmente contribuir para prevenir os danos ao coração. Enquanto, a vacinação com os peptídeos selecionados a partir das proteínas: TS, MASP, com o epítipo α -Gal e a associação: TS/MASP, foram capazes de reduzi-lo (**Fig.14, Fig.15 e Fig.16**). A vacinação com as associações: Q β -MASP/ α -Gal e Q β -TS/MASP/ α -Gal, foram capazes de reduzir a intensidade das alterações degenerativas representadas por necrose tecidual, autólise ou degeneração dos cardiomiócitos durante a fase aguda da infecção (**Fig.17**). A vacinação com o peptídeo selecionado a partir da proteína TS, foi capaz de reduzir a hipertrofia das fibras musculares, durante a fase crônica, enquanto as vacinações com o epítipo α -Gal e as associações: Q β -TS/ α -Gal, Q β -MASP/ α -Gal e Q β -TS/MASP/ α -Gal, foram capazes de impedir (**Fig.18**).

Também durante a infecção com a cepa Y, provavelmente a vacinação com os peptídeos selecionados a partir das proteínas: TS, MASP, com o epítipo α -Gal e as associações: TS/MASP, MASP/ α -Gal e TS/MASP/ α -Gal, induziram o desenvolvimento de uma resposta imune adaptativa, mediada por linfócitos T e B equilibrada e protetora. Uma vez que os camundongos vacinados apresentaram uma elevada produção de citocinas pró-inflamatórias nos tecidos cardíacos e de anticorpos IgG total no soro reativos aos antígenos vacinais durante a fase aguda, associados à baixos níveis de parasitemia e a redução do processo inflamatório ao longo das fibras cardíacas na fase crônica. Camundongos vacinados com a associação Q β -TS/ α -Gal controlaram de maneira efetiva a infecção, mantendo a homeostasia do sistema imune. O que explica, a presença de baixa intensidade de inflamação ao longo das fibras cardíacas, com níveis de infiltrado celular estatisticamente menores que de camundongos infectados não vacinados e um perfil basal de citocinas teciduais semelhante aos de camundongos não infectados e não vacinados, durante a fase aguda da infecção (**Fig.6, Fig.7, Fig.8, Fig.10, Fig.11, Fig.14, Fig.15, Fig.16, Fig.19, Fig.26**).

Durante a infecção com a cepa Colombiana: os peptídeos selecionados a partir do epítopo α -Gal e as associações: MASP/ α -Gal e TS/MASP/ α -Gal, entre os antígenos testados, foram mais eficientes em controlar a disseminação do parasito durante a infecção pela cepa Colombiana. Uma vez que contribuíram na manutenção da baixa parasitemia, reduzindo significativamente a carga parasitária durante o pico e controlaram o parasitismo tecidual durante o período da fase aguda avaliado (**Fig.25, Fig.26, Fig.27**). A vacinação com: TS/MASP/ α -Gal, garantiu que os camundongos ganhassem mais massa corporal que aqueles que pertencem ao grupo controle infectado não vacinado e aos outros grupos vacinados. Além disso, as vacinações com: MASP, α -Gal, TS/ α -Gal, MASP/ α -Gal e TS/MASP/ α -Gal, contribuíram para que os camundongos conseguissem recuperar a massa corporal perdida mais rapidamente (**Fig.28**). Camundongos vacinados com TS, MASP, as associações: TS/MASP, TS/ α -Gal, MASP/ α -Gal e TS/MASP/ α -Gal, controlaram de maneira efetiva a infecção, mantendo a homeostasia do sistema imune. O que explica, a presença de baixa intensidade de inflamação ao longo das fibras cardíacas, com níveis de infiltrado celular estatisticamente menores que de camundongos infectados não vacinados e um perfil basal de citocinas teciduais semelhante aos de camundongos não infectados e não vacinados, durante a fase crônica da infecção. O que irá provavelmente contribuir para prevenir as lesões cardíacas provocadas pela doença (**Fig.29, Fig.30, Fig.31, Fig.34, Fig.35**).

Também durante a infecção com a cepa Colombiana, as vacinações com: TS, α -Gal e a associação TS/MASP/ α -Gal, foram capazes de reduzir a intensidade das alterações degenerativas representadas por necrose tecidual, autólise ou degeneração dos cardiomiócitos durante a fase aguda da infecção (**Fig.32**). As vacinações com MASP e a associação Q β -TS/MASP/ α -Gal, foram capazes de reduzir a hipertrofia das fibras musculares, durante a fase crônica, enquanto a vacinação com TS/MASP, foi capaz de impedir (**Fig.33**). Provavelmente a vacinação com os peptídeos selecionados a partir das proteínas: TS, MASP, as associações: TS/MASP, TS/ α -Gal, MASP/ α -Gal e TS/MASP/ α -Gal, induziram o desenvolvimento de uma resposta imune adaptativa, mediada por linfócitos T e B equilibrada e protetora. Uma vez que os camundongos vacinados apresentaram uma elevada produção de citocinas pró-inflamatórias nos tecidos cardíacos

e de anticorpos IgG total no soro reativos aos antígenos vacinais durante a fase aguda, associada à baixos níveis de parasitemia e a redução do processo inflamatório ao longo das fibras cardíacas na fase crônica (**Fig.21, Fig.22, Fig.23, Fig.25, Fig.26, Fig.29, Fig.30, Fig.31, Fig.34, Fig.35**).

Ao avaliarmos estes resultados, podemos observar que os diferentes candidatos vacinais testados apresentaram diferentes graus de proteção contra infecção pelo *T. cruzi*, onde a associação TS/MASP/ α -Gal demonstrou um desempenho igual aos outros candidatos avaliados ou melhor em todos os parâmetros avaliados. Estes resultados reforçam a idéia de que a associação de antígenos capazes de induzir a ativação da resposta imune adaptativa, mediada tanto por linfócitos T (como os peptídeos TS e MASP), quanto por linfócitos B (como o epítipo α -Gal), provavelmente podem ser mais eficazes em fornecer resistência a infecção pelo *T. cruzi*. Uma vez que, estudos já demonstraram que o controle da disseminação do parasito, está associada a ativação simultânea de ambos os tipos de respostas imunes (Krautz et al., 2000; Bhatia et al., 2004; Tarleton et al., 2005; Rodrigues et al., 2009). Deste modo, este estudo que utiliza camundongos que simulam a resposta imune humana na produção de anticorpos anti- α -Gal como modelo experimental, e antígenos capazes de ativar simultaneamente a resposta adaptativa celular e humoral destes, pode ser um importante passo para o desenvolvimento de uma vacina profilática eficaz contra infecção pelo *T. cruzi*.

7. CONCLUSÃO

Os diferentes candidatos vacinais testados apresentaram diferentes graus de proteção contra infecção pelo *T. cruzi*, onde a associação TS/MASP/ α -Gal demonstrou um melhor desempenho. Este resultado reforça a idéia de que a associação de antígenos capazes de induzir a ativação da resposta imune adaptativa, mediada tanto por linfócitos T (como os peptídeos TS e MASP), quanto por linfócitos B (como o epítipo α -Gal), provavelmente podem ser mais eficazes em fornecer resistência a infecção pelo *T. cruzi*.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHAMSOHN, I. A., COFFMAN, R. L. Cytokine, and nitric oxide regulation of immunosuppression in *Trypanosoma cruzi* infection. *Journal of Immunology*, v. 155, p. 3955–3963, 1995.

ACOSTA-SERRANO, A., ALMEIDA, I. C., FREITAS-JUNIOR, L. H., YOSHIDA, N., SCHENKMAN, S. The mucin-like glycoprotein super-family of *Trypanosoma cruzi*: structure and biological roles. *Molecular and Biochemical Parasitology*, v. 114, n. 2, p. 143-50, 2001.

AFFRANCHINO, J. L., IBANEZ, C. F., LUQUETTI, A. O., RASSI, A., REYES, M. B., MACINA, R. A., ASLUND, L., PETTERSSON, U., FRASCH, A. C. Identification of a *Trypanosoma cruzi* antigen that is shed during the acute phase of Chagas disease. *Molecular and Biochemical Parasitology*, v. 34, n. 3, p. 221-228, 1989.

AGGARWAL, S., GHILARDI, N., XIE, M. H., DE SAUVAGE, F. J., GURNEY, A. L. Interleukin-23 promotes a distinct CD4 Tcell activation state characterized by the production of interleukin-17. *Journal of Biological Chemistry*, v. 278, n. 3, p. 1910-1914, 2003.

ALARCÓN DE NOYA, B., DÍAZ-BELLO, Z., COLMENARES, C., RUIZ-GUEVARA, R., MAURIELLO, L., ZAVALA-JASPE, R., SUAREZ, J. A., ABATE, T., NARANJO, L., PAIVA, M., RIVAS, L., CASTRO, J., MÁRQUES, J., MENDOZA, I., ACQUATELLA, H., TORRES, J., NOYA, O. Large urban outbreak of orally acquired acute Chagas disease at a school in Caracas, Venezuela. *The Journal of Infectious Diseases*, v. 201, n. 9, p. 1308-1315, 2010.

ALIBERTI, J. C. S., CARDOSO, M. A. G., MARTINS, G. A., GAZZINELLI, R. T., VIEIRA, L. Q., SILVA, J. S. IL-12 mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* in mice and is produced by murine macrophages in response to live trypomastigotes. *Infection and Immunity*, v. 64, p. 1961–1967, 1996.

ALMEIDA, I. C., FERGUSON, M.A., SCHENKMAN, S., TRAVASSOS, L. R. Lytic anti-alpha-galactosyl antibodies from patients with chronic Chagas' disease recognize novel O-linked oligosaccharides on mucin-like glycosylphosphatidylinositol- anchored glycoproteins of *Trypanosoma cruzi*. *The Biochemical Journal*, v. 304, n. 3, p. 793-802, 1994.

ALMEIDA, I. C., MILANI, S. R., GORIN, P. A., TRAVASSOS, L. R.. Complement-mediated lysis of *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes by human anti-alpha-galactosyl antibodies. *Journal of Immunology*, v. 146, n. 7, p. 2394-2400, 1991.

ALVES, E., SALMAN, A. M., LEORATTI, F., LOPEZ-CAMACHO, C., VIVEROS-SANDOVAL, M. E., LALL, A., EL-TURABI, A., BACHMANN, M. F., HILL, A. V., JANSE, C.J., KHAN, S. M., REYES-SANDOVAL, A. Evaluation of *Plasmodium vivax* cell-traversal protein for ookinetes and sporozoites as a preerythrocytic *P. vivax* vaccine. *Clinical and Vaccine Immunology*, v. 24, n. 4, p. 1-14, 2017.

AMBÜHL, P. M., TISSOT, A. C., FULURIJA, A., MAURER, P., NUSSBERGER, J., SABAT, R., NIEF, V., SCHELLEKENS, C., SLADKO, K., ROUBICEK, K., PFISTER, T., RETTENBACHER, M., VOLK, H. D., WAGNER, F., MÜLLER, P., JENNINGS, G. T., BACHMANN, M. F. A vaccine for hypertension based on virus-like particles: preclinical efficacy and phase I safety and immunogenicity. *Journal of Hypertension*, v. 25, n. 1, p. 63-72, 2007.

ANDRADE L. O., MACHADO C. R., CHIARI E., PENA S. D., MACEDO, A. M. Differential tissue distribution of diverse clones of *Trypanosoma cruzi* in infected mice. *Molecular and biochemical parasitology*, v. 100, n. 2, p.163-172, 1999.

ANDRADE S. G. Tentative for grouping different *Trypanosoma cruzi* strains in some types. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 18, n. 2, p. 140-1, 1976

ANDRADE S. G., Influence of *Trypanosoma cruzi* strain on the pathogenesis of chronic myocardopathy in mice. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 85, n. 1, p. 17-27, 1990.

ANDRADE, S. G., RASSI, A., MAGALHAES, J. B., FERRIOLLI, F. F., LUQUETTI, A. O. Specific chemotherapy of Chagas disease: a comparison between the response in patients and experimental animals inoculated with the same strains. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 86, n. 6, p. 624-626, 1992.

ANDRADE, S. G.; MAGALHÃES, J. B.; PONTES, A. L. Terapêutica da fase crônica da infecção experimental pelo *Trypanosoma cruzi* com o benzonidazole o nifurtimox. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 22, n. 3, p. 113-118, 1989.

ANDRADE, Z. A. Anatomia patológica da doença de Chagas. *Revista Goiana de Medicina*, v. 4, p. 103-119, 1958.

ANDREWS, N. W. The acid-active hemolysin of *Trypanosoma cruzi*. *Experimental Parasitology*, v. 71, n. 2, p. 241-244, 1990.

AÑEZ, N., CRISANTE, G., DA SILVA, F.M., ROJAS, A., CARRASCO, H., UMEZAWA, E.S., STOLF, A. M, RAMÍREZ, J. L., TEIXEIRA, M. M. Predominance of lineage I among *Trypanosoma cruzi* isolates from Venezuelan patients with different clinical profiles of acute Chagas' disease. *Tropical Medicine & International Health*, v. 9, n. 12, p. 1319-1326, 2004.

ANONYMOUS. Recommendations from a satellite meeting. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 94, n. 1, p. 429-432, 1999.

ANSELMINI, A., PIFANO, F., SUAREZ, J. A., GURDIEL, O. Myocardopathy in Chagas' disease. I. Comparative study of pathologic findings in chronic human and experimental Chagas' myocarditis. *American Heart Journal*, v. 72, p. 469-481, 1966.

APT, W., AGUILERA, X., ARRIBADA, A., GOMEZ, L., MILES, M. A., WIDMER, G. Epidemiology of Chagas disease in Northern Chile – isozyme profiles of *Trypanosoma cruzi* from domestic and sylvatic transmission cycles and their association with cardiopathy. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v.37, n. 2, p. 302-307, 1987.

ARAUJO, F. F., GOMES, J. A., ROCHA, M. O., WILLIAMS-BLANGERO, S., PINHEIRO, V. M., MORATO, M. J., CORREA-OLIVEIRA, R. Potential role of CD4⁺CD25^{HIGH} regulatory T cells in morbidity in Chagas disease. *Frontiers in Bioscience*, v. 12, p. 2797–2806, 2007.

ARCE-FONSECA, M., RIOS-CASTRO, M., CARRILLO-SÁNCHEZ SDEL, C., MARTÍNEZ-CRUZ, M., RODRÍGUEZ-MORALES, O. Prophylactic and therapeutic DNA vaccines against Chagas disease. *Parasit Vectors*, v. 8, p. 121, 2015.

ARNER, E., KINDLUND, E., NILSSON, D., FARZANA, F., FERELLA, M., TAMMI, M. T., ANDERSSON, B. Database of *Trypanosoma cruzi* repeated genes: 20,000 additional gene variants. *BMC Genomics*, v. 8, p. 391, 2007.

ASHCROFT, A. E., LAGO, H., MACEDO, J. M., HORN, W. T., STONEHOUSE, N. J., STOCKLEY, P. G. Engineering thermal stability in RNA phage capsids via disulphide bonds. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, v. 5, n. 12, p. 2034- 2041, 2005.

ATWOOD, J. A III., WEATHERLY, D. B., MINNING, T. A., BUNDY, B., CAVOLA, C., OPPERDOES, F. R., ORLANDO, R., TARLETON, R. L. The *Trypanosoma cruzi* proteome. *Science*, v. 309, n. 5733, p. 473-6, 2005.

AVILA, J. L. a-Galactosyl-bearing epitopes as potent immunogens in Chagas disease and leishmaniasis. *Subcellular Biochemistry*, v. 32, p. 173–213, 1999.

AVILA, J. L., ROJAS, M., GALILI, U. Immunogenic Gal alpha 1-3Gal carbohydrate epitopes are present on pathogenic American *Trypanosoma* and *Leishmania*. *Journal of Immunology*, v. 142, n. 8, p. 2828-2834, 1989.

AYALA, E. V., RODRIGUES DA CUNHA, G. M., AZEVEDO, M. A., CALDERON, M., JIMENEZ, J., VENUTO, A. P., GAZZINELLI, R. T., LAVALLE, R., RIVA, A., HINCAPIE, R., FINN, M. G., MARQUES, A. F. C57BL/6 α 1,3-galactosyltransferase Knockout Mouse (α -GalT-KO) as an Animal Model for Experimental Chagas Disease. *ACS Infectious Diseases*, v. xx, p. acsinfecdis.0c00061-x, 2020.

BAHIA-OLIVEIRA, L. M. G., GOMES, J. A. S., ROCHA, M. O. C., MOREIRA, M. C. V., LEMOS, E. M., LUZ, Z. M. P., PEREIRA, M. E. S., COFFMAN, R. L., DIAS, J. C. P., CANÇADO, J. R., GAZZINELLI, G., CORRÊA-OLIVEIRA, R. IFN-gamma in human Chagas disease: protection or pathology? *Brazilian Journal of Medical and Biological*, v. 31, p. 127-131, 1988.

BALOUZ, V., AGÜERO, F., BUSCAGLIA, C. A. Chagas disease diagnostic applications: present knowledge and future steps. *Advances in Parasitology*, v. 97, p. 1- 45, 2017.

BARTHOLOMEU, D. C., CERQUEIRA, G. C., LEÃO, A. C., da ROCHA, W. D., PAIS, F. S., MACEDO, C., DJIKENG, A., TEIXEIRA, S. M., EL-SAYED, N. M. Genomic organization and expression profile of the mucin-associated surface protein (masp) family of the human pathogen *Trypanosoma cruzi*. *Nucleic Acids Research*, v. 37, n. 10, p. 3407-17, 2009.

BAYER-SANTOS, E., AGUILAR-BONAVIDES, C., RODRIGUES, S. P., CORDERO, E. M., MARQUES, A. F., VARELA-RAMIREZ, A., CHOI, H., YOSHIDA, N., DA SILVEIRA, J. F., ALMEIDA, I. C. Proteomic analysis of trypanosoma cruzi secretome: characterization of two populations of extracellular vesicles and soluble proteins. *Journal of Proteome Research*, v. 12, n. 2, p. 883–897, 2013.

BENVENUTI, L. A., ROGGERIO, A., FREITAS, H. F., MANSUR A. J., FIORELLI, A., HIGUCHI, M. L. Chronic American trypanosomiasis: parasite persistence in endomyocardial biopsies is associated with high-grade myocarditis. *Annals of tropical medicine and parasitology*, v. 102, p. 481-487, 2008.

BERN, C. Chagas' Disease. *The New England Journal of Medicine*, v. 373, n. 5, p. 456- 466, 2015.

BERRIZBEITIA, M., NDAO, M., BUBIS, J., GOTTSCHALK, M., ACHÉ A., LACOUTURE, S., MEDINA, M., WARD, B. J. Purified excreted/secreted antigens from *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes as tools for diagnosis of Chagas disease. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 44, n. 2, p. 291–296, 2006.

BHATIA, V., SINHA, M., LUXON, B., GARG, N. Utility of the *Trypanosoma cruzi* sequence database for identification of potential vaccine candidates by in silico and in vitro screening. *Infection and Immunity*, v. 72, p. 6245-6254, 2004.

BILLINGSLEY, P. F., DOWNE, A. E. R. The surface morphology of the midgut cells of *Rhodnius prolixus* Sta^o1 (Hemiptera: Reduviidae) during blood digestion. *Acta Tropica*, v. 43, p. 355–366, 1986.

BLANKEN, W. M., VAN den EIJDEN, D. H. Biosynthesis of terminal Gal alpha 1- 3Gal beta 1-4GlcNAc-R oligosaccharide sequences on glycoconjugates. Purification and acceptor specificity of a UDP-Gal:N-acetyllactosaminide alpha 1-3- galactosyltransferase from calf thymus. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 260, n. 24, p. 12927-12934, 1985.

BOSCARDIN, S. B., TORRECILHAS, A. C., MANARIN, R., REVELLI, S., REY, E. G., TONELLI, R. R., SILBER, A. M. Chagas disease: an update on immune mechanisms and therapeutic strategies. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, v. 14, p.1373-84, 2010.

BOSSENO, M. F., BARNABÉ, C., MAGALLON, G. E., LOZANO, K. F., RAMSEY, J., ESPINOZA, B., BRENIÈRE, S. F. Predominance of *Trypanosoma cruzi* lineage I in Mexico. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 40, n. 2, p. 627-632, 2002.

BRAGA, M. S., LAURIA-PIRES, L., ARGANARAZ, E. R., NASCIMENTO, R. J., TEIXEIRA, A. R. Persistent infections in chronic Chagas disease patients treated with anti-*Trypanosoma cruzi* nitroderivatives. *Revista do Instituto de Medicina Tropical*, v. 42, p. 157-161, 2000.

BRENER, Z. Why vaccines do not work in Chagas' disease. *Parasitology Today*, v. 2, p. 196-199, 1986.

BRENER, Z. Recent advances in the chemotherapy of Chagas' disease. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 79, p. 149-155, 1984.

BRENER, Z. Therapeutic activity and criterion of cure in mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. *Revista do Instituto de Medicina Tropical*, v. 4, p. 389-96, 1962.

BRENIÈRE, S. F., WALECKX, E., BARNABÉ, C. Over six thousand *trypanosoma cruzi* strains classified into discrete typing units (DTUs): Attempt at an Inventory. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, v. 10, n. 8, p. e0004792, 2016.

BRISSE, S., BARNABÉ, C., TIBAYRENC, M. Identification of six *Trypanosoma cruzi* phylogenetic lineages by random amplified polymorphic DNA and multilocus enzyme electrophoresis. *International Journal for Parasitology*, v. 30, n.1, p. 35-44, 2000 a.

BRISSE, S.; DUJARDIN, J. C.; TIBAYRENC, M. Identification of six *Trypanosoma cruzi* lineages by sequence-characterised amplified region markers. *Molecular and Biochemical Parasitology*, v. 111, p. 95-105, 2000 b.

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. *International Journal for Parasitology*, v. 31, p. 1218-1226, 2001.

BROWN, S. D., FIEDLER, J. D. & FINN, M. G. Assembly of hybrid bacteriophage Q β virus-like particles. *Biochemistry*, v. 48, n. 47, p. 11155-11157, 2009.

CABALLERO, Z. C., SOUSA, O. E., MARQUES, W. P., SAEZ-ALQUEZAR, A., UMEZAWA, E. S. Evaluation of serological tests to identify *Trypanosoma cruzi* infection in humans and determine cross-reactivity with *Trypanosoma rangeli* and *Leishmania* spp. *Clinical and Vaccine Immunology*, v. 14, n. 8, p. 1045-1049, 2007.

CANÇADO, J.R. Aspectos clínicos na padronização dos métodos de avaliação terapêutica na doença de Chagas. *Revista Goiana de Medicina*, v.9, p.212-232, 1963.

CANÇADO, J.R. Terapêutica específica. Em Dias, J.C.P. e Coura, J.R. *Clínica e Terapêutica da Doença de Chagas. Uma Abordagem Prática para o Clínico Geral*, 1997.

CAMARGO, M. M., ALMEIDA, I. C., PEREIRA, M. E. S., FERGUSON, M. A. J., TRAVASSOS, L. R., GAZZINELLI, R. T. Glycosylphosphatidylinositol anchored mucin-like glycoproteins isolated from *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes initiate the synthesis of pro-inflammatory cytokines by macrophages. *Journal of Immunology*, v. 158, p. 5890–5901, 1997.

CAMARGO, M. M., ANDRADE, A. C., ALMEIDA, I. C., TRAVASSOS, L. R., GAZZINELLI, R. T. Glycoconjugates isolated from *Trypanosoma cruzi* but not from *Leishmania sp.* parasite membranes trigger nitric oxide synthesis as well as microbicidal activity by IFN- γ -primed macrophages. *Journal of Immunology*, v. 159, p. 6131–6139, 1997.

CAMPETELLA, O., S'ANCHEZ, D., CAZZULO, J. J., FRASCH, A. C. C. A superfamily of trypanosoma cruzi surface antigens. *Parasitology Today*, v. 8, n. 11, p. 378–381, 1992.

CAVAZZANA, M. JR., MARCILI, A., LIMA, L., DA SILVA, F. M., JUNQUEIRA, A. C., VELUDO, H. H., VIOLA, L. B., CAMPANER, M., NUNES, V. L., PAIVA, F., COURA, J. R., CAMARGO, E. P., TEIXEIRA, M. M. Phylogeographical, ecological and biological patterns shown by nuclear (ssrRNA and gGAPDH) and mitochondrial (Cyt b) genes of trypanosomes of the subgenus *Schizotrypanum* parasitic in Brazilian bats. *International Journal for Parasitology*, v. 40, n. 3, p. 345–55, 2010.

CETRON, M. S., HOFF, R., KAHN, S., EISEN, H., VAN VOORHIS, W. C., Evaluation of recombinant trypomastigote surface antigens of *Trypanosoma cruzi* in screening sera from a population in rural Northeastern Brazil endemic for chagas disease. *Acta Tropica*, v. 50, n. 3, p. 259–266, 1992.

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

CHAPADEIRO, E. Hipertrofia do miocárdio na cardiopatia chagásica crônica. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v.7, p. 27-30, 1965.

CHEN, W., JIN, W., HARDEGEN, N., LEI, K. J., LI, L., MARINOS, N., MCGRADY, G., WAHL, S. M. Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF- β induction of transcription factor Foxp3.

CHIANG, T. R., FANGET, L., GREGORY, R., TANG, Y., ARDIET, D. L., GAO, L., MESCHTER, C., KOZIKOWSKI, A. P., BUELOW, R., VUIST, W. M. Anti-Gal antibodies in humans and 1, 3 α -galactosyltransferase knock out mice. *Transplantation*, v. 69, n. 12, p. 2593-2600, 2000.

CHUENKOVA, M. V., PEREIRAPERRIN, M. Chagas disease parasite promotes neuron survival and differentiation through TrkA nerve growth factor receptor. *Journal of Neurochemistry*, v. 91, n. 2, p. 385–394, 2004.

COLLI, W & ALVES, M. J. M. Relevant glycoconjugates on the surface of *Trypanosoma cruzi*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 94, n. 1, p. 37–49, 1999.

COLLI, W. Trans-sialidase: a unique enzyme activity discovered in the protozoan *Trypanosoma cruzi*. *FASEB Journal*, v. 7, n. 13, p. 1257–1264, 1993.

CORREA, P.R., CORDERO, E. M., GENTIL, L. G., BAYER-SANTOS, E., DA SILVEIRA, J. F. Genetic structure and expression of the surface glycoprotein GP82, the main adhesin of *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigotes. *Scientific World Journal*, v. 2013, p. 156734, 2013.

COSSIO, P. M., DIEZ, C., SZARFMAN, A., KREUTZER, E., CANDIOLO, B., ARANA, R.M. Chagasic cardiopathy. Demonstration of a serum gamma globulin factor which reacts with endocardium and vascular structures. *Circulation*, v. 49, p.13-21, 1974.

COURA, J. R. Chagas disease: what is known and what is needed--a background article. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 102, n. 1, p. 113-122, 2007.

COURA, J. R., ANUNZIATO, N., WILLCOX, H. P. Chagas' disease morbidity. I - Study of cases originating in various states of Brazil, observed in Rio de Janeiro. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 78, p. 363-372, 1983.

COURA, J. R., DIAS, J. C. Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease: 100 years after its discovery. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.1, p. 31-40, 2009.

COURA, J. R., VIÑAS, P. A. Chagas disease: a new worldwide challenge. *Nature*, v. 465, n. 7301, p. S6-7, 2010.

CUNHA-NETO, E., DURANTI, M., GRUBER, A., ZINGALES, B., DE, M. I, STOLF, N., BELLOTTI, G., PATARROYO, M. E., PILLEGGI, F., KALIL, J. Autoimmunity in Chagas disease cardiopathy: biological relevance of a cardiac myosin-specific epitope crossreactive to an immunodominant *Trypanosoma cruzi* antigen. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 92, p. 3541-3545, 1995.

CURA, C. I., MEJÍA-JARAMILLO, A. M., DUFFY, T., BURGOS, J. M., RODRIGUERO, M., CARDINAL, M. V., KJOS, S., GURGEL-GONÇALVES, R., BLANCHET, D., DE PABLOS, L. M., TOMASINI, N., DA SILVA, A., RUSSOMANDO, G., CUBA, C. A., AZNAR, C., ABATE, T., LEVIN, M.J., OSUNA, A., GÜRTLER, R. E., DIOSQUE, P., SOLARI, A., TRIANA-CHÁVEZ, O., SCHIJMAN, A. G. *Trypanosoma cruzi* I genotype in different geographical regions and transmission cycles based on a microsatellite motif of the intergenic spacer of spliced-leader genes. *International Journal for Parasitology*. v. 40, n. 14, p. 1599–1607, 2010.

DA SILVEIRA, A. B.; LEMOS, E. M.; ADAD, S. J.; CORREA-OLIVEIRA, R.; FURNESS, J. B.; D'AVILA REIS, D. Megacolon in Chagas disease: a study of inflammatory cells, enteric nerves, and glial cells. *Human Pathology*, v. 38, p. 1256-64, 2007.

D'AVILA REIS, D.; LEMOS, E. M.; SILVA, G. C.; ADAD, S. J.; MCCURLEY, T.; CORREAOLIVEIRA, R.; MACHADO, C. R. Phenotypic characterization of the inflammatory cells in chagasic megaesophagus. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 95, p. 177-8, 2001.

DE ALENCAR, B. C., PERSECHINI, P. M., HAOLLA, F. A., DE OLIVEIRA, G., SILVERIO, J. C., LANNES-VIEIRA, J., MACHADO, A. V., GAZZINELLI, R. T., BRUNAROMERO, O., RODRIGUES, M. M. Perforin and gamma interferon expression are required for CD4+ and CD8+ T-cell-dependent protective immunity against a human parasite, *Trypanosoma cruzi*, elicited by heterologous plasmid DNA prime-recombinant adenovirus 5 boost vaccination. *Infection and Immunity*, v. 77, p. 4383-95, 2009.

DE ARAÚJO, F. F., CORRÊA-OLIVEIRA, R., ROCHA, M. O., CHAVES, A. T., FIUZA, J. A., FARES, R. C., FERREIRA, K. S., NUNES, M. C., KEESEN, T. S., DAMASIO, M. P., TEIXEIRA-CARVALHO, A., GOMES, J. A. Foxp3+CD25 (high) CD4+ regulatory T cells from indeterminate patients with Chagas disease can suppress the effector cells and cytokines and reveal altered correlations with disease severity. *Immunobiology*, v. 217, n. 8, p. 768-777, 2012.

DE SOUZA, W. Basic cell biology of *Trypanosoma cruzi*. *Current Pharmaceutical Design*, v.8, p. 269-285, 2002.

DIAS, J. C. Epidemiology of Chagas disease. Em: Wendel, S.; Brener, Z.; Camargo, M.S., Rassi, A. Chagas disease (American Trypanosomiasis): its impact on transfusion and clinical medicine. Editora ISBT Brasil. Sociedade Brasileira de Hematologia e Hemoterapia, cap. 5, p. 49-80, São Paulo, 1992.

DIAS J. C. Epidemiological surveillance of Chagas disease. *Cadernos de Saúde Pública*, v. 16 Suppl 2, p. 43-59, 2000.

DIAS J. C. P. The indeterminate form of human chronic Chagas'disease a clinical epidemiological review. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 22, p. 147–156, 1989.

DIAS, J. C. P. Editorial - The Treatment of Chagas Disease (South American Trypanosomiasis). *Annals of Internal Medicine*, v.144, p. 772-774, 2006.

DIAS, J. C., RAMOS, A. N. JR., GONTIJO, E. D., LUQUETTI, A., SHIKANAI-YASUDA, M. A., COURA, J.R., TORRES, R. M., MELO, J. R., ALMEIDA, E. A., OLIVEIRA, W. J. R., SILVEIRA, A. C., REZENDE, J. M., PINTO, F. S., FERREIRA, A. W., RASSI, A., FRAGATA, A. A. FILHO., SOUSA, A. S., CORREIA, D., JANSEN, A. M., ANDRADE, G. M., BRITTO, C. F., PINTO, A. Y., RASSI, A. JR., CAMPOS, DE., ABAD-FRANCH, F., SANTOS, S. E., CHIARI, E., HASSLOCHER-MORENO, A. M., MOREIRA, E. F., MARQUES, D. S., SILVA, E. L., MARIN-NETO, J. A., GALVÃO, L. M., XAVIER, S. S., VALENTE, S. A., CARVALHO, N. B., CARDOSO, A. V., SILVA, R. A., COSTA, V. M., VIVALDINI, S. M., OLIVEIRA, S. M., VALENTE, V. D., LIMA, M. M., ALVES, R. V. 2nd Brazilian Consensus on Chagas Disease 2015. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 49, suppl. 1, p. 3-60, 2016.

DÍAZ-LIMAY E, ESCALANTE H, JARA C. Niveles de parasitemia y alteraciones histopatológicas en *Mus musculus* Balb/c infectado con *Trypanosoma cruzi* obtenido de *Panstrongylus chinai* del valle Chaman, La Libertad – Perú. *Parasitologia Latinoamericana*, v. 59, n. 2, p. 153-58, 2004.

DI NOIA, J. M., SÁNCHEZ, D. O., FRASCH, A. C. The protozoan *Trypanosoma cruzi* has a family of genes resembling the mucin genes of mammalian cells. *Journal of Biological Chemistry*, v. 270, n. 41, p. 24146-9, 1995.

DOS SANTOS, S. L., FREITAS, L. M., LOBO, F. P., RODRIGUES-LUIZ, G. F., MENDES, T. A., OLIVEIRA, A. C., ANDRADE, L. O., CHIARI, E., GAZZINELLI, R. T., TEIXEIRA, S. M., FUJIWARA, R. T., BARTHOLOMEU, D. C. The MASP family of *Trypanosoma cruzi*: changes in gene expression and antigenic profile during the acute phase of experimental infection. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, v. 6, n. 8, p. e1779, 2012.

DUTRA, W. O.; MENEZES, C. S. A.; MAGALHÃES, L. M. D.; GOLLOB, K. J. Immunoregulatory networks in human Chagas disease. *Parasite Immunology*, v. 36, n. 8, p. 377- 387, 2014.

DUTRA, W. O.; MENEZES, C. A.; VILLANI, F. N.; DA COSTA, G. C.; DA SILVEIRA, A. B.; REIS, D.; GOLLOB, K. J. Cellular and genetic mechanisms involved in the generation of protective and pathogenic immune responses in human Chagas disease. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 104 n.1, p. 208-18, 2009.

DVORAK, J. A. & HYDE, T. P. *Trypanosoma cruzi*: interaction with vertebrate cells *in vitro*. I. Individual interactions and the cellular and subcellular levels. *Experimental Parasitology*, v. 34, p. 268-283, 1973.

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

EL-SAYED, N. M., MYLER, P. J., BLANDIN, G., BERRIMAN, M., CRABTREE, J., AGGARWAL, G., CALER, E., RENAULD, H., WORTHEY, E. A., HERTZ-FOWLER, C., GHEDIN, E., PEACOCK, C., BARTHOLOMEU, D. C., HAAS, B. J., TRAN, A. N., WORTMAN, J. R., ALSMARK, U. C., ANGIUOLI, S., ANUPAMA, A., BADGER, J., BRINGAUD, F., CADAG, E., CARLTON, J. M., CERQUEIRA, G. C., CREASY, T., DELCHER, A. L., DJIKENG, A., EMBLEY, T. M., HAUSER, C., IVENS, A. C., KUMMERFELD, S. K., PEREIRA-LEAL, J. B., NILSSON, D., PETERSON, J., SALZBERG, S. L., SHALLOM, J., SILVA, J. C., SUNDARAM, J., WESTENBERGER, S., WHITE, O., MELVILLE, S. E., DONELSON, J. E., ANDERSSON, B., STUART, K. D., HALL, N. Comparative genomics of trypanosomatid parasitic protozoa. *Science*, v. 309, n. 5733, p. 404–409, 2005.

FABBRO DE SUASNÁBAR, D., ARIAS, E., STREIGER, M., PIACENZA, M., INGARAMO, M., DEL BARCO, M., AMICONE, N. Evolutive behavior towards cardiomyopathy of treated (nifurtimox or benznidazole) and untreated chronic chagasic patients. *Revista do Instituto de Medicina Tropical*, v. 42, n. 2, p. 99–109, 2000.

FRAGATA FILHO, A. A., DA SILVA, M. A., BOAINAIN, E. Etiologic treatment of acute and chronic Chagas' Disease [corrected]. *São Paulo Medical Journal*, v. 113, n. 2, p. 867–872, 1995.

FEDERICI, E. E., ABELMANN, W. B., NEVA, F. A. Chronic and progressive myocarditis in C3H mice infected with *Trypanosoma cruzi*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v.13, p. 272-280, 1964.

FERNANDES, C. D., TIECHER, F. M., BALBINOT, M. M., LIARTE, D. B., SCHOLL D., STEINDEL, M., ROMANHA, A. Efficacy of benznidazol treatment for asymptomatic chagasic patients from state of Rio Grande do Sul evaluated during a three-year follow-up. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 104, p. 27-32, 2009.

FERREIRA, H. De. O. Treatment of the undetermined form of Chagas disease with nifurtimox and benzonidazole. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 23, n. 4, p. 209–211, 1990.

FERREIRA, L. R., ABRANTES, E. F., RODRIGUES, C. V., CAETANO, B., CERQUEIRA, G. C., SALIM, A. C., REIS, L. F., GAZZINELLI, R. T. Identification and characterization of a novel mouse gene encoding a Ras-associated guanine nucleotide exchange factor: expression in macrophages and myocarditis elicited by *Trypanosoma cruzi* parasites. *Journal of Leukocyte Biology*, v. 72, p. 1215-1227, 2002.

FIEDLER, J. D., BROWN, S. D., LAU, J. L., FINN, M. G. RNA-directed packaging of enzymes within virus-like particles. *Angewandte Chemie*, v. 49, n. 50, p. 9648-9651, 2010.

FIEDLER, J. D., HIGGINSON, C., HOVLID, M. L., KISLUKHIN, A. A., CASTILLEJOS, A., MANZENRIEDER, F., CAMPBELL, M. G., VOSS, N. R., POTTER, C. S., CARRAGHER, B., FINN, M. G. Engineered mutations change the structure and stability of a virus-like particle. *Biomacromolecules*, v. 13, n. 8, p. 2339-2348, 2012.

FILARDI L.S. & BRENER Z. Susceptibility and natural resistance of *Trypanosoma cruzi* strains to drugs used clinically in Chagas disease. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 81, p. 755-759, 1987.

FIUZA, J. A., FUJIWARA, R.T., GOMES, J. A., ROCHA, M. O., CHAVES, A. T., DE ARAÚJO, F. F., FARES, R. C., TEIXEIRA-CARVALHO, A., MARTINS-FILHO, O. A., CANÇADO, G. G., CORREA-OLIVEIRA, R. Profile of Central and Effector Memory T Cells in the Progression of Chronic Human Chagas Disease. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, v. 3, n. 9, p. e512, 2009.

FRASCH, A. C. Functional diversity in the trans-sialidase and mucin families in *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology Today*, v. 16, p. 282-6, 2000.

FREITAS, J. M., LAGES-SILVA, E., CREMA, E., PENA, S. D. J., MACEDO, A. M. Real time PCR strategy for the identification of major lineages of *Trypanosoma cruzi* directly in chronically infected human tissues. *International Journal for Parasitology*, v. 35, p. 411–417, 2005.

FULURIJA, A., LUTZ, T. A., SLADKO, K., OSTO, M., WIELINGA, P. Y., BACHMANN, M. F., SAUDAN, P. Vaccination against GIP for the treatment of obesity. *PLoS One*, v.3, n. 9, p. 1-11, 2008.

GARCIA, M. N., BURROUGHS, H., GORCHAKOV, R., GUNTER, S. M., DUMONTEIL, E., MURRAY, K. O., HERRERA, C. P. Molecular identification and genotyping of *Trypanosoma cruzi* DNA in autochthonous Chagas disease patients from Texas, USA. *Infection, Genetics and Evolution*, v. 49, p. 151-6, 2017.

GALILI, U. The natural anti-Gal antibody: evolution and autoimmunity in man. *Immunology Series*, v. 55, p. 355-373, 1991.

GALILI, U., CLARK, M. R., SHOHET, S. B., BUEHLER, J., MACHER, B. A. Evolutionary relationship between the natural anti-Gal antibody and the Gal α 1-3Gal epitope in primates. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 84, n. 5, p. 1369-1373, 1987.

GALILI, U., SHOHET, S. B., KOBRIN, E., STULTS, C. L., MACHER, B. A. Man, apes, and Old-World monkeys differ from other mammals in the expression of alpha-galactosyl epitopes on nucleated cells. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 263, n. 33, p. 17755-17762, 1988.

GAO, W., WORTIS, H. H., PEREIRA, M. A. The *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase is a T cell-independent B cell mitogen and an inducer of non-specific Ig secretion. *International Immunology*, v. 14, n. 3, p. 299-308, 2002.

GAZZINELLI, R. T., PEREIRA, M. E., ROMANHA, A., GAZZINELLI, G., BRENER, Z. Direct lysis of *Trypanosoma cruzi*: a novel effector mechanism of protection mediated by human anti-gal antibodies. *Parasite Immunology*, v. 13, n. 4, p. 345-356, 1991.

GAZZINELLI, R. T., OSWALD, I. P., HIENY, S., JAMES, S., SHER, A. The microbicidal activity of interferon- γ -treated macrophages against *Trypanosoma cruzi* involves an L-arginine-dependent, nitrogen oxide-mediated mechanism inhibitable by interleukin-10 and transforming growth factor-beta. *European Journal of Immunology*, v. 22, p. 2501-2506, 1992.

GOMES, Y. M.; LORENA, V. M. B.; LUQUETTI, A.O. Diagnosis of Chagas disease: what has been achieved? What remains to be done with regard to diagnosis and follow up studies? *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.104, s. 1, p. 115-121, 2009.

GONZÁLEZ, J., RAMÍREZ, C., SEGUEL, X., GUTIÉRREZ, B., MANQUE, P., PORCILE, P., NEIRA, I., SAGUA, H. Levels of anti-Gal antibodies in persons infected and non-infected with *Trypanosoma cruzi*. Probably induced by bacteria and by the parasite. *Boletín chileno de parasitología*, v. 50, n. 1-2, p. 3-9, 1995.

GUEDES, P. M. M., FIETTO, J. L. R., LANA, M., BAHIA, M. T. Advances in Chagas Disease Chemotherapy. *Anti-Infective Agents in Medicinal Chemistry*, v. 5, p. 175-186, 2006.

GUTIERREZ, F. R. S.; GUEDES, P. M. M.; GAZZINELLI, R. T.; SILVA, J. S. The role of parasite persistence in pathogenesis of Chagas heart disease. *Parasite Immunology*, v. 31, p. 673-685, 2009.

HAN W., CAI L., WU B., LI L., XIAO Z., CHENG J., WANG P. G. The wciN gene encodes an α -1,3-galactosyltransferase involved in the biosynthesis of the capsule repeating unit of *Streptococcus pneumoniae* serotype 6B. *Biochemistry*, v. 51, p. 5804-10, 2012.

HIGO, H., MIURA, S., HORIO, M., MIMORI, T., HAMANO, S., AGATSUMA, T., YANAGI, T., CRUZ-REYES, A., UYEMA, N., ROJAS DE ARIAS, A., MATTA, V., AKAHANE, H., HIRAYAMA, K., TAKEUCHI, T., TADA, I., HIMENO, K. Genotypic variation among lineages of *Trypanosoma cruzi* and its geographic aspects. *Parasitology International*, v. 53, p. 337-344, 2004.

HIGUCHI, M. D. L. Human chronic chagasic cardiopathy: participation of parasite antigens, subsets of lymphocytes, cytokines and microvascular abnormalities. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 94 Suppl 1, p. 263-7, 1999.

HIGUCHI M. L., BENVENUTI L. A., MARTINS R. M., METZGER M. Pathophysiology of the heart in Chagas' disease: status and new developments. *Cardiovascular Research*, v. 60, p. 96-107, 2003.

HOARE, C. A. Morphological and Taxonomic Studies on Mammalian Trypanosomes. X. Revision of the Systematics. *J. Protozool*, v. 11, p. 200-207, 1964.

HOLSCHER, C., KOHLER, G., MULLER, U., MOSSMANN, H., SCHAUB, G. A., BROMBACHER, F. Defective nitric oxide effector functions lead to extreme susceptibility of *Trypanosoma cruzi*-infected mice deficient in gamma interferon receptor or inducible nitric oxide synthase. *Infection and Immunity*, v. 66, p. 1208–1215, 1998.

HONG, V., PRESOLSKI, S. I., MA, C., FINN, M. G. Analysis and optimization of copper-catalyzed azide-alkyne cycloaddition for bioconjugation. *Angewandte Chemie*, v. 48, n. 52, p. 9879-9883, 2009.

HOVLID, M. L., LAU, J. L., BREITENKAMP, K., HIGGINSON, C. J., LAUFER B., MANCHESTER, M., FINN, M. G. Encapsidated atom-transfer radical polymerization in Q β virus like nanoparticles. *ACS Nano*, v. 8, n. 8, p. 8003-8014, 2014.

HUNTER, C. A., SLIFER, T., ARAUJO, F. G., Interleukin-12- mediated resistance to *Trypanosoma cruzi* is dependent on tumor necrosis factor alpha and gamma interferon. *Infection and immunity*, v. 64, p. 2381–2386, 1996.

INIGUEZ, E., SCHOCKER, N. S., SUBRAMANIAM, K., PORTILLO, S., MONTOYA, A. L., AL-SALEM, W. S., TORRES, C. L., RODRIGUEZ, F., MOREIRA, O. C., ACOSTA-SERRANO, A., MICHAEL, K., ALMEIDA, I. C., MALDONADO, R. A. An alpha-Gal-containing neoglycoprotein-based vaccine partially protects against murine cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania major*. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, v. 11, p. e0006039, 2017.

IZQUIERDO, L., MARQUES, A. F., GÁLLEGO, M., SANZ, S., TEBAR, S., RIERA, C., QUINTÓ, L., ALDASORO, E., ALMEIDA, I. C., GASCON, J. Evaluation of a chemiluminescent enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of *Trypanosoma cruzi* infection in a nonendemic setting. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 108, n. 7, p. 928-931, 2013.

JIMENEZ, V. Dealing with environmental challenges: mechanisms of adaptation in *Trypanosoma cruzi*. *Research in Microbiology*, v. 165, n. 3, p. 155-165, 2014.

JOHNSON, H. R., HOOKER, J. M., FRANCIS, M. B., CLARK, D. S. Solubilization and stabilization of bacteriophage MS2 in organic solvents. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 97, n. 2, p.224-234, 2007.

JUNQUEIRA, C., CAETANO, B., BARTHOLOMEU, D. C., MELO, M. B., ROPERT, C., RODRIGUES, M. M., GAZZINELLI, R. T. The endless race between *Trypanosoma cruzi* and host immunity: lessons for and beyond Chagas disease. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, v. 12, p. e29, 2010.

KAGAN, I. G., NORMAN, L. Immunologic studies on *Trypanosoma cruzi*. III. Duration of acquired immunity in mice initially infected with a North American strain of *T. cruzi*. *The Journal of Infectious Diseases*, v.108, p. 213-7, 1961.

KALIL J. & CUNHA-NETO E. Autoimmunity in chagas disease cardiomyopathy: Fulfilling the criteria at last? *Parasitology Today*, v. 12, p. 396-399, 1996.

KAWASHITA, S. Y., DA SILVA, C. V., MORTARA, R. A., BURLEIGH, B. A, BRIONES, MR. Homology, paralogy and function of DGF-1, a highly dispersed *Trypanosoma cruzi* specific gene family and its implications for information entropy of its encoded proteins. *Molecular and Biochemical Parasitology*, v. 165, n. 1, p. 19-31, 2009.

KELLER, S. A., BAUER, M., MANOLOVA, V., MUNTWILER, S., SAUDAN, P., BACHMANN, M. F. Cutting edge: limited specialization of dendritic cell subsets for MHC class II-associated presentation of viral particles. *Journal of Immunology*, v. 184, n. 1, p. 26-29, 2010.

KIPNIS, T. L., JAMES, S. L., SHER, A., DAVID, J. R. Cell mediated cytotoxicity to *Trypanosoma cruzi*. II. Antibody dependent killing of bloodstream forms by mouse eosinophils and neutrophils. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v.30, n.1, p. 47-53, 1981

KHAN, F., PORTER, M., SCHWENK, R., DEBOT, M., SAUDAN, P., DUTTA, S. Head-to-head comparison of soluble vs. Q β VLP circumsporozoite protein vaccines reveals selective enhancement of NANP repeat responses. *PLoS One*, v. 10, n. 11, p. 1-18, 2015.

KIERSZENBAUM F. Chagas' disease and the autoimmunity hypothesis. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 12, p. 210-223, 1999.

KIPNIS, T. L., DAVID, J. R., ALPER, C. A., SHER, A., da SILVA, W. D. Enzymatic treatment transforms trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi* into activators of alternative complement pathway and potentiates their uptake by macrophages. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 78, n. 1, p. 602–605, 1981.

KOZLOVSKA, T. M., CIELENS, I., DREILINŅA, D., DISLERS, A., BAUMANIS, V., OSE, V., PUMPENS, P. Recombinant RNA phage Q beta capsid particles synthesized and self-assembled in *Escherichia coli*. *Gene*, v. 137, n. 1, p. 133-137, 1993.

KRAUTZ, G. M., KISSINGER, J. C., KRETTLI, A. U. The targets of the lytic antibody response against *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology Today*, v. 16, p. 31-34, 2000.

KRETTLI A.U. & BRENER Z. Protective effects of specific antibodies in *Trypanosoma cruzi* infections. *Journal of Immunology*. v.116, p.755-760, 1976.

LAGES-SILVA, E., RAMÍREZ, L. E., PEDROSA, A. L., CREMA, E., DA CUNHA GALVÃO, L. M., PENA, S. D., MACEDO, A. M., CHIARI, E. Variability of kinetoplast DNA gene signatures of *Trypanosoma cruzi* II strains from patients with different clinical forms of Chagas' disease in Brazil. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 44, p. 2167–2171, 2006.

LANA, M., LOPES, L. A., MARTINS, H. R., BAHIA, M. T., HADO-DE-ASSIS, G. F., WENDLING, A. P., MARTINS-FILHO, O. A., MONTROYA, R. A., DIAS, J. C., BAJARVINAS P., COURA J. R. Clinical and laboratory status of patients with chronic Chagas disease living in a vector-controlled area in Minas Gerais, Brazil, before and nine years after aetiological treatment. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 104, p. 1139-1147, 2009.

LARANJA, F. S., DIAS, E., NOBREGA, G. Clínica e terapêutica da doença de Chagas. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 46, p. 473-529, 1948.

LaTEMPLE D. C. & GALILI, U. Adult and neonatal anti-Gal response in knock-out mice for alpha1,3galactosyltransferase. *Xenotransplantation*, v. 5, n. 3, p. 191-196, 1998.

LAURIA-PIRES, L., BRAGA, M. S., VEXENAT, A. C., NITZ N., SIMOES-BARBOSA, A., TINOCO, D. L. & TEIXEIRA, A. R. Progressive chronic Chagas heart disease ten years after treatment with anti-*Trypanosoma cruzi* nitroderivatives. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 63, p. 111-118, 2000.

LEON, J. S., GODSEL, L. M., WANG, K., ENGMAN, D. M. Cardiac myosin autoimmunity in acute Chagas' heart disease. *Infection and Immunity*, v. 69, p.5643-5649, 2001.

LEY, V., ANDREWS, N. W., ROBBINS, E. S., NUSSENZWEIG, V. Amastigotes of *Trypanosoma cruzi* sustain an infective cycle in mammalian cells. *Journal of Experimental Medicine*, v. 168, p. 649-659, 1988.

LLEWELLYN, M. S., LEWIS, M. D., ACOSTA, N., YEO, M., CARRASCO, H. J., SEGOVIA, M., VARGAS, J., TORRICO, F., MILES, M. A., GAUNT, M. W. *Trypanosoma cruzi* IIc: phylogenetic and phylogeographic insights from sequence and microsatellite analysis and potential impact on emergent Chagas disease. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, v. 3, p. e510, 2009 a.

LLEWELLYN, M. S., MILES, M. A., CARRASCO, H. J., LEWIS, M. D., YEO, M., VARGAS, J., TORRICO, F., DIOSQUE, P., VALENTE, V., VALENTE, S. A., GAUNT, M.W. Genome-scale multilocus microsatellite typing of *Trypanosoma cruzi* Discrete Typing Unit I reveals phylogeographic structure and specific genotypes linked to human infection. *PLOS Pathogens*, v. 5, p. e1000410, 2009 b.

LOPES, E. R., CHAPADEIRO, E., BORGES, M. C., CANÇADO, M. A., ROCHA, A. Sudden death and Chagas disease – analysis of predisposing factors of sudden death in chronic Chagas patients. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 77, p. 255-262, 1982.

LOW, J. G., LEE, L. S., OOI, E. E., ETHIRAJULU, K., YEO, P., MATTER, A., CONNOLLY, J. E., SKIBINSKI, D. A., SAUDAN, P., BACHMANN, M., HANSON, B. J., LU, Q., MAURER-STROH, S., LIM, S., NOVOTNY-DIERMAYR, V. Safety and immunogenicity of a virus-like particle pandemic influenza A (H1N1) 2009 vaccine: results from a double-blinded, randomized Phase I clinical trial in healthy Asian volunteers. *Vaccine*, v. 32, n. 39, p. 5041-5048, 2014.

LOW, H. P., PAULIN, J. J., KEITH, C. H. *Trypanosoma cruzi* infection of BSC-1 fibroblast cells cause cytoskeletal disruption and changes in intracellular calcium levels. *Journal of Protozoology*, v. 39, p. 463-470, 1992.

LUQUETTI, A. O., MILES, M. A., RASSI, A., DE REZENDE, J. M., DE SOUZA, A. A., POVOA, M. M., RODRIGUES, I. *Trypanosoma cruzi*: zymodemes associated with acute and chronic Chagas' disease in central Brazil. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 80, p. 462-470, 1986.

LUQUETTI, A. O., RASSI, A. Diagnóstico laboratorial da infecção pelo *Trypanosoma cruzi*. In BRENER, Z.; ANDRADE, Z.; BARRAL-NETTO, M (org.), *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas, Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, p. 344-348, 2000.

MACEDO, A. M., MACHADO, C. R., OLIVEIRA, R. P., PENA, S. D. *Trypanosoma cruzi*: genetic structure of populations and relevance of genetic variability to the pathogenesis of chagas disease. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 99, p. 1-12, 2004.

MACHADO, C. R., AUGUSTO-PINTO, L., MCCULLOCH, R., TEIXEIRA, S. M. DNA metabolism and genetic diversity in Trypanosomes. *Mutation Research*, v. 612, p. 40-57, 2006.

MANGONE, C. A., SICA, R. E. R., PEREYRA, S., GENOVESE, O., SANZ, O.P., SEGURA, M. Cognitive impairment in human chronic Chagas' disease. *Arquivos de Neuro-Psiquiatria*, v. 52, n. 2, p. 200-203, 1994.

MARCILI, A., LIMA, L., CAVAZZANA, M., JUNQUEIRA, A. C., VELUDO, H. H., MAIA, DA SILVA, F., CAMPANER, M., PAIVA, F., NUNES, V. L., TEIXEIRA, M. M. A new genotype of *Trypanosoma cruzi* associated with bats evidenced by phylogenetic analyses using SSU rDNA, cytochrome b and Histone H2B genes and genotyping based on ITS1 rDNA. *Parasitology*, v. 136, p. 641–655, 2009 a.

MARCILI, A., LIMA, L., VALENTE, V. C., VALENTE, S. A., BATISTA, J. S., JUNQUEIRA, A. C., SOUZA, A. I., DA ROSA, J. A., CAMPANER, M., LEWIS, M. D., LLEWELLYN, M. S., MILES, M. A., TEIXEIRA, M. M. Comparative phylogeography of *Trypanosoma cruzi* TCIc: new hosts, association with terrestrial ecotopes, and spatial clustering. *Infection, Genetics and Evolution*, v. 9, p. 1265–1274, 2009 b.

MARTIN, D. L., WEATHERLY, D. B., LAUCELLA, S. A., CABINIAN, M. A., CRIM, M. T., SULLIVAN, S., HEIGES, M., CRAVEN, S. H., ROSENBERG, C. S., COLLINS, M. H., SETTE, A., POSTAN, M., TARLETON, R. L. CD8+T-cell responses to *Trypanosoma cruzi* are highly focused on strain variant transsialidase epitopes. *PLoS Pathogens*, v. 2, n. 8, p. e77, 2006.

MATSUMOTO, T. K., COTRIM, P. C., DA SILVEIRA, J. F., STOLF, A. M. S., UMEZAWA, E. S. *Trypanosoma cruzi*: Isolation of a immunodominant peptide of TESA (trypomastigote excreted/secreted antigens) by gene cloning. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, v. 42, n. 3, p. 187–192, 2002.

MAURER, P., JENNINGS, G. T., WILLERS, J., ROHNER, F., LINDMAN, Y., ROUBICEK, K., RENNER, W. A., MÜLLER, P., BACHMANN, M. F. A therapeutic vaccine for nicotine dependence: preclinical efficacy, and Phase I safety and immunogenicity. *European Journal of Immunology*, v. 35, n. 7, p. 2031-2040, 2005.

MILES, M. A., CEDILLOS, R. A., POVOA, M. M., DE SOUZA, A. A., PRATA, A., MACEDO, V. Do radically dissimilar *Trypanosoma cruzi* strains (zymodemes) cause Venezuelan and Brazilian forms of Chagas' disease? *Lancet*, v. 1, p. 1338–1340, 1981.

MILE, M. A.; LANHAM, S. M.; DE SOUZA, A. A.; POVOA, M. Further enzymic characters of *Trypanosoma cruzi* and their evaluation for strain identification. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 74, p. 221-37, 1980.

MILES, M. A.; SOUZA, A.; POVOA, M.; SHAW, J. J.; LAINSON, R.; TOYE, P. J. Isozymic heterogeneity of *Trypanosoma cruzi* in the first autochthonous patients with Chagas' disease in Amazonian Brazil. *Nature*, v. 272, p. 819-21, 1978.

MILES, M. A.; TOYE, P. J.; OSWALD, S. C.; GODFREY, D. G. The identification by isoenzyme patterns of two distinct strain-groups of *Trypanosoma cruzi*, circulating independently in a rural area of Brazil. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 71, p. 217-25, 1977.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Guia de Vigilância Epidemiológica. 7ª edição. Brasília – DF, 2009.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Recomendações sobre o diagnóstico parasitológico, sorológico e molecular para confirmação da doença de Chagas aguda e crônica. *Revista de Patologia Tropical*, v. 42, n. 4, p. 475-478, 2013.

MINNING, T. A., WEATHERLY, D. B., ATWOOD, J. 3RD., ORLANDO, R., TARLETON, R. L. The steady-state transcriptome of the four major life-cycle stages of *Trypanosoma cruzi*. *BMC Genomics*, v. 10, n. 370, p. 1-15, 2009.

MINOPRIO, P. Parasite polyclonal activators: new targets for vaccination approaches? *International Journal for Parasitology*. v.31, p. 588-91, 2001.

MINOPRIO, P. M., EISEN, H., FORNI, L., IMPERIO LIMA, M. R., JOSKOWICZ, M., COUTINHO, A. Polyclonal lymphocyte responses to murine *Trypanosoma cruzi* infection. I. Quantitation of both T- and B-cell responses. *Scandinavian Journal of Immunology*, v. 24, p. 661-668, 1986.

MONTILLA, M., GUHL, F., JARAMILLO, C., NICHOLLS, S., BARNABÉ, C., BOSSENO, M. F., BRENIÈRE, S. F. Isoenzyme clustering of Trypanosomatidae Colombian populations. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 66, p. 394–400, 2002.

MOSMANN T. R., CHERWINSKI H., BOND M. W., GIEDLIN M. A., COFFMAN R. L. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *Journal of Immunology*, v. 136, p. 2348-2357, 1986.

MORAES BARROS, R. R., MARINI, M. M., ANTÔNIO, C. R., CORTEZ, D. R., MIYAKE, A. M., LIMA, F. M., RUIZ, J. C., BARTHOLOMEU, D. C., CHIURILLO, M. A., RAMIREZ, J. L., DA SILVEIRA, J. F. Anatomy and evolution of telomeric and subtelomeric regions in the human protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*. *BMC Genomics*, v. 8, n. 13, p. 229, 2012.

MOREL, C.; CHIARI, E.; CAMARGO, E. P.; MATTEI, D. M.; ROMANHA, A. J.; SIMPSON, L. Strains and clones of *Trypanosoma cruzi* can be characterized by pattern of restriction endonuclease products of kinetoplast DNA minicircles. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 77, n.11, p. 6810-4, 1980.

MOURA, A. P. V., SANTOS, L. C. B., BRITO, C. R. N., VALENCIA, E., JUNQUEIRA, C., FILHO, A. A. P., SANT'ANNA, M. R. V., GONTIJO, N. F., BARTHOLOMEU, D. C., FUJIWARA, R. T., GAZZINELLI, R. T., MCKAY, C. S., SANHUEZA, C. A., FINN, M. G., MARQUES, A. F. Virus-like particle display of the alpha-Gal carbohydrate for vaccination against *Leishmania* infection. *ACS Central Science*, v. 3, p. 1026–1031, 2017.

MUCCI, J., RISSO, M. G., LEGUIZAMÓN, M. S., FRASCH, A. C., CAMPETELLA, O. The trans-sialidase from *Trypanosoma cruzi* triggers apoptosis by target cell sialylation. *Cellular Microbiology*, v. 8, n. 7, p. 1086-95, 2006.

MURPHY C. A., LANGRISH C. L., CHEN Y., BLUMENSCHNEIN W., MCCLANAHAN T., KASTELEIN R. A., SEDGWICK J. D., CUA D. J. Divergent pro- and antiinflammatory roles for IL-23 and IL-12 in joint autoimmune inflammation.

MURTA, S. M. F., ROMANHA, A. J. Characterization of *Trypanosoma cruzi*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 94, p. 177-180, 1999.

NAKAYASU, E. S., SOBREIRA, T. J., TORRES, R. JR., GANIKO, L., OLIVEIRA, P. S., MARQUES, A. F., ALMEIDA, I. C. Improved proteomic approach for the discovery of potential vaccine targets in *Trypanosoma cruzi*. *Journal of proteome research*, v. 11, p. 237–46, 2012.

NOBREGA, A. A., GARCIA, M. H., TATTO, E., OBARA, M. T., COSTA, E., SOBEL, J., ARAUJO, W. N. Oral transmission of Chagas disease by consumption of açai palm fruit, Brazil. *Emerging Infectious Diseases*, v. 15, p. 653-655, 2009.

NORRIS, K. A., SCHRIMPF, J. E., SZABO AND, M. J. Identification of the gene family encoding the 160-kilodalton *Trypanosoma cruzi* complement regulatory protein. *Infection and Immunity*, v. 65, n. 2, p. 349–357, 1997.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Control of Chagas disease. *World Health Organization Technical Report Series*, v. 905, p. 1-109, 2002.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Média centre. Chagas disease (American trypanosomiasis). *Fact sheet*, v. 340, 2010.

OTANI, M. M., VINELLI, E., KIRCHHOFF, L. V., DEL POZO, A., SANDS, A., VERCAUTEREN, G., SABINO, E. C. WHO comparative evaluation of serologic assays for Chagas disease. *Transfusion*, v. 49, n. 6, p. 1076-1082, 2009.

PAIVA, C. N.; FIGUEIREDO, R. T.; KROLL-PALHARES, K.; SILVA, A. A.; SILVERIO, J. C.; GIBALDI, D.; PYRRHO, A. S.; BENJAMIM, C. F.; LANNESVIEIRA, J.; BOZZA, M. T. CCL2/MCP-1 controls parasite burden, cell infiltration, and mononuclear activation during acute *Trypanosoma cruzi* infection. *Journal of Leukocyte Biology*, v. 86, p. 1239-1246, 2009.

PATEL, K. G. & SWARTZ, J. R. Surface functionalization of virus-like particles by direct conjugation using azide-alkyne click chemistry. *Bioconjugate Chemistry*, v. 22, n. 3, p. 376-387, 2011.

PECH-CANUL, Á. C., MONTEÓN, V., SOLÍS-OVIEDO, R. L. A Brief View of the Surface Membrane Proteins from *Trypanosoma cruzi*. *Journal of Parasitology Research*, v. 2017, p. 2017:3751403, 2017.

PEREIRA, M. E. A., LOURES, M. A., VILLALTA, F., ANDRADE, A. F. B. Lectin receptors as markers for *Trypanosoma cruzi*. Developmental stages and a study of the interaction of wheat germ agglutinin with sialic acid residues on epimastigote cells. *Journal of Experimental Medicine*, v. 152, n. 5, p. 1375–1392, 1980.

PINGEL, S., RHEINWEILER, U., KOLB, V., DUSZENKO, M. Purification and characterization of an alpha-galactosyltransferase from *Trypanosoma brucei*. *The Biochemical Journal*, v. 338, n. pt2, p. 545-551, 1999.

PITCOVSKY, T. A., MUCCI, J., ALVAREZ, P., LEGUIZAMON, M. S., BURRONE, O., ALZARI, P. M., CAMPETELLA, O. Epitope mapping of transsialidase from *Trypanosoma cruzi* reveals the presence of several crossreactive determinants. *Infection and Immunity*, v.69, p. 1869-75, 2001.

PIZZI T., AGOSÍN M., CHRISTEN R., HOECKER G., NEGhme A. Influencia de la constitucion genetica en la resistencia de la laucha a la infeccion experimental por *Trypanosoma cruzi*. *Biologica*, v. 11, p. 43-53, 1948.

PORTILLO, S., ZEPEDA, B. G., INIGUEZ, E., OLIVAS, J. J., KARIMI, N. H., MOREIRA, O. C., MARQUES, A. F., MICHAEL, K., MALDONADO, R. A., ALMEIDA, I. C. A prophylactic α -Gal based glycovaccine effectively protects against murine acute Chagas disease. *NPJ Vaccines*, v.22, n. 4, p. 33, 2019.

POSEKANY, K. J., PITTMAN, H. K., BRADFIELD, J. F., HAISCH, C. E., VERBANAC, K. M. Induction of cytolytic anti-Gal antibodies in α -1,3-galactosyltransferase gene knockout mice by oral inoculation with *Escherichia coli* O86:B7 bacteria. *Infection and Immunity*, v. 7, p. 6215–22, 2002.

POSTAN M., MCDANIEL J. P. AND DVORAK J. A.. Studies of *Trypanosoma cruzi* clones in inbred mice. II. Course of infection of C57BL/6 mice with single-cell-isolated stocks. *American Journal of Tropical Medicine & Hygiene*, v. 33, p. 236-238, 1984

PRATA A. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. *Lancet Infectious Diseases*, v. 1, p. 92-100, 2001.

PREVIATO, J. O., ANDRADE, A. F., PESSOLANI, M. C., MENDONÇA-PREVIATO L. Incorporation of sialic acid into *Trypanosoma cruzi* macromolecules. A proposal for a new metabolic route. *Molecular and Biochemical Parasitology*, v. 16, n. 1, p. 85-96, 1985.

PRIOLI, R. P., ROSENBERG, I., PEREIRA AND M. E. A. High- and lowdensity lipoproteins enhance infection of *Trypanosoma cruzi* in vitro. *Molecular and Biochemical Parasitology*, v. 38, n. 2, p. 191–198, 1990.

PROST, J. O., ROMERO VILLANUEVA, H., MORIKONE, A. M., POLO, G., BOSCH, A. M. Evidence of cerebral involvement in the chronic stage of Chagas disease obtained using the P300 potential and quantified electroencephalography. *Arquivos de Neuro-Psiquiatria*, v. 58, n. 2A, p. 262-271, 2000.

QUAISSI, M. A., KUSNIERZ, J. P., GRAS-MASSE, H., DROBECQ, H., VELGE, P., CORNETTE, J., CAPRON, A., TARTAR, A. Fluorescence-activated cell-sorting analysis of fibronectin peptides binding to *trypanosoma cruzi* trypomastigotes. *The Journal of Protozoology*, v. 35, n. 1, p. 111–114, 1988.

RAMASAMY, R & RAJAKARUNA, R. Association of malaria with inactivation of alpha1,3-galactosyl transferase in catarrhines. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1360, n. 3, p. 241-246, 1997.

RAMÍREZ, J. D., HERNÁNDEZ, C., MONTILLA, M., ZAMBRANO, P., FLÓREZ, A. C., PARRA, E., CUCUNUBÁ, Z. M. First report of human infection attributed to TcBat genotype. *Zoonoses Public Health*, v. 61, n. 7, p. 477-9, 2014

RASSI, A. J. R., RASSI, A., MARIN-NETO, J. A. Chagas disease. *Lancet*, v. 375, p. 1388-1402, 2010.

RASSI, J. R. A., RASSI, A. & REZENDE, J. M. American trypanosomiasis (Chagas disease). *Infectious Disease Clinics of North America*, v. 26, n. 2, p. 275-291, 2012.

REINA-SAN-MARTIN, B., COSSON, A., MINOPRIO, P. Lymphocyte polyclonal activation: a pitfall for vaccine design against infectious agents. *Parasitology Today*, v. 16, n. 2, p. 62-7, 2000.

REIS MACHADO J., SILVA M. V., BORGES D. C., DA SILVA C. A., RAMIREZ L. E., DOS REIS M. A., RODRIGUES D. B. R. Immunopathological aspects of experimental *Trypanosoma cruzi* reinfections. *BioMed Research International*. v. 2014, p. 648715, 2014.

ROELLIG, D. M., BROWN, E. L., BARNABÉ, C., TIBAYRENC, M., STEURER, F. J., YABSLEY, M. J. Molecular typing of *Trypanosoma cruzi* isolates, United States. *Emerging Infectious Diseases*, v. 14, p. 1123-1125, 2008.

ROCHA, M. O. C., NUNES, M. C. P., RIBEIRO, A. L. Morbidity and prognostic factors in chronic chagasic cardiopathy. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 104, p: 159-166, 2009.

RODRIGUES, M. M., ALENCAR, B. C., CLASER, C., TZELEPIS, F. Immunodominance: a new hypothesis to explain parasite escape and host/parasite equilibrium leading to the chronic phase of Chagas' disease? *Brazilian Journal of Medical and Biological*, v. 42, p. 220-3, 2009.

RODRÍGUEZ-MORALES, O., MONTEÓN-PADILLA, V., CARRILLO-SÁNCHEZ, S. C., RIOS-CASTRO, M., MARTÍNEZ-CRUZ, M., CARABARIN-LIMA, A., ARCE-FONSECA, M. Experimental Vaccines against Chagas Disease: A Journey through History. *Journal of Immunology Research*, v. 2015, p. 2015- 489758, 2015.

ROPERT, C., FERREIRA, L. R., CAMPOS, M. A., PROCÓPIO, D. O., TRAVASSOS, L. R., FERGUSON, M. A., REIS, L. F., TEIXEIRA, M. M., ALMEIDA, I. C., GAZZINELLI, R. T. Macrophage signaling by glycosylphosphatidylinositolanchored mucin-like glycoproteins derived from *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes. *Microbes and Infection*, v. 4, n. 9, p. 1015-25, 2002.

ROTTENBERG, M. E., BAKHIET, M., OLSSON, T., KRISTENSSON, K., MAK, T., WIGZELL, H., ORN, A. Differential susceptibilities of mice genomically deleted of CD4 and CD8 to infections with *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma brucei*. *Infection & Immunity*, v. 61, p. 5129-5133, 1993.

RUBIN-DE-CELIS, S. S., UEMURA, H., YOSHIDA, N., SCHENKMAN, S. Expression of trypomastigote transsialidase in metacyclic forms of *Trypanosoma cruzi* increases parasite escape from its parasitophorous vacuole. *Cellular Microbiology*, v. 8, n. 12, p. 1888-98, 2006.

SAKAGUCHI S., ONO M., SETOGUCHI R., YAGI H., HORI S., FEHERVARI Z., SHIMIZU J., TAKAHASHI K., NOMBRA T. Foxp3+ CD25+ CD4+ natural regulatory T cells in dominant self-tolerance and autoimmune disease *Immunol. Revs*, v. 212, p. 8-27, 2006.

SANCHEZ ALBERTI, A., BIVONA, A. E., CERNY, N., SCHULZE, K., WEIßMANN, S., EBENSEN, T., MORALES, C., PADILLA, A. M., CAZORLA, S. I., TARLETON, R. L., GUZMÁN, C. A., MALCHIODI, E. L. Engineered trivalent immunogen adjuvanted with a STING agonist confers protection against *Trypanosoma cruzi* infection. *NPJ Vaccines*, v. 2, p. 9, 2017.

SÁNCHEZ-GUILLÉN MDEL, C., BERNABÉ, C., TIBAYRENC, M., ZAVALA-CASTRO, J., TOTOLHUA, J. L., MÉNDEZ-LÓPEZ, J., GONZÁLEZ-MEJÍA, M. E., TORRES-RASGADO, E., LÓPEZ-COLOMBO, A., PÉREZ-FUENTES, R. *Trypanosoma cruzi* strains isolated from human, vector, and animal reservoir in the same endemic region in Mexico and typed as *T. cruzi* I, discrete typing unit 1 exhibit considerable biological diversity. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 101, p. 585–590, 2006.

SANTOS, F. L., CELEDON, P. A., ZANCHIN, N. I., DE SOUZA, W. V., DA SILVA, E. D., FOTI, L., KRIEGER, M. A., GOMES, Y. M. Accuracy of chimeric proteins in the serological diagnosis of chronic chagas disease - a Phase II study. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 11, n. 3, p. 1-20, 2017.

SANTOS, M. A., GARG, N., TARLETON, R. L. The identification and molecular characterization of *Trypanosoma cruzi* amastigote surface protein 1, a member of the trans-sialidase gene super-family. *Molecular and Biochemical Parasitology*, v. 86, n. 1, p.1-11, 1997.

SCHAUB G. A., BROMBACHER F. Defective nitric oxide effector functions lead to extreme susceptibility of *Trypanosoma cruzi*-infected mice deficient in gamma interferon receptor or inducible nitric oxide synthase. *Infection and immunity*, v. 66, p. 1208–1215, 1998.

SCHENKMAN S, EICHINGER D, PEREIRA ME, NUSSENZWEIG V. Structural and functional properties of *Trypanosoma* trans-sialidase. *Annual Review of Microbiology*, v. 48, p. 499-523, 1994.

SCHENKMAN, S., JIANG, M. S., HART, G. W., NUSSENZWEIG, V. A novel cell surface trans-sialidase of *Trypanosoma cruzi* generates a stage-specific epitope required for invasion of mammalian cells. *Cell*, v. 65, n. 7, p. 1117–1125, 1991.

SCHIJMAN, A. G., VIGLIANO, C. A., VIOTTI, R. J., BURGOS, J. M., BRANDARIZ, S., LOCOCO, B. E., LEZE, M. I., ARMENTI, H. A., LEVIN, M. J. *Trypanosoma cruzi* DNA in cardiac lesions of Argentinean patients with end-stage chronic chagas heart disease. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 70, p. 210-220, 2004.

SCHOCKER, N. S., PORTILLO, S., BRITO, C. R., MARQUES, A. F., ALMEIDA, I. C., MICHAEL, K. Synthesis of Gal α (1,3)Gal β (1,4)GlcNAc α -, Gal β (1,4)GlcNAc α - and GlcNAc-containing neoglycoproteins and their immunological evaluation in the context of Chagas disease. *Glycobiology*, v. 26, n. 1, p. 39-50, 2016.

SCHOFIELD, C. J., JANNIN, J., SALVATELLA, R. The future of Chagas disease control. *Trends Parasitology*, v. 22, n. 12, p. 583-8, 2006.

SCHWARZ, B. & DOUGLAS, T. Development of virus-like particles for diagnostic and prophylactic biomedical applications. *Wiley Interdisciplinary Reviews. Nanomedicine and Nanobiotechnology*, v. 7, n. 5, p. 722-735, 2015.

SERNA, C., LARA, J. A., RODRIGUES, S. P., MARQUES, A. F., ALMEIDA, I. C., MALDONADO, R. A. A synthetic peptide from *Trypanosoma cruzi* mucin-like associated surface protein as candidate for a vaccine against Chagas disease. *Vaccine*, v. 32, n. 28, p. 3525–3532, 2014.

SILVA, J. S., MORRISSEY, P. J., GRAVSTEIN, K. H., MOHLER, K. M., ANDERSON, D., REED, S.G. Interleukin-10 and interferon- γ (regulation of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *Journal of Experimental Medicine*, v.175, p. 169–174, 1992.

SILVA J. S., VESPA G. N. R., CARDOSO M. A. G., ALIBERTI J. C., CUNHA F. Q. Tumor necrosis factor alpha mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* in mice by inducing nitric oxide production in infected IFN- γ -activated macrophages. *Infection and immunity*, v. 63 p. 4862–4867, 1995.

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

SILVEIRA, C.A., CASTILLO, E. & CASTRO, C. Evaluation of an specific treatment for *Trypanosoma cruzi* in children, in the evolution of the indeterminate phase. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 33, p. 191-196, 2000.

SILVEIRA, J.F., UMEZAWA E. S. & LUQUETTI, A. O. Chagas disease: recombinant *Trypanosoma cruzi* antigens for serological diagnosis. *Trends in Parasitology*, v. 17, n. 6, p. 286-291, 2001.

SOARES, R. P., TORRECILHAS, A. C., ASSIS, R. R., ROCHA, M. N., MOURA, E., CASTRO, F. A., FREITAS, G. F., MURTA, S. M., SANTOS, S. L., MARQUES, A. F., ALMEIDA, I. C., ROMANHA, A. J. Intraspecies variation in *Trypanosoma cruzi* GPI-mucins: biological activities and differential expression of α -galactosyl residues. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 87, n. 1, p. 87-96, 2012.

SOUZA, P. E., ROCHA, M. O., ROCHA-VIEIRA, E., MENEZES, C. A., CHAVES, A. C., GOLLOB, K. J., DUTRA, W. O. Monocytes from patients with indeterminate and cardiac forms of Chagas disease display distinct phenotypic and, functional characteristics associated with morbidity. *Infection and Immunity*, v.72, p. 5283-5291, 2004.

SOUTO-PADRON, T., ALMEIDA, I.C., DE SOUZA, W., TRAVASSOS L. R. Distribution of alpha-galactosyl-containing epitopes on *Trypanosoma cruzi* trypomastigote and amastigote forms from infected Vero cells detected by Chagasic antibodies. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, v. 41, n. 1, p. 47-54, 1994.

SOUTO, R. P.; FERNANDES, O.; MACEDO, A. M.; CAMPBELL, D. A.; ZINGALES, B. DNA markers define two major phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, v. 83, p. 141-52, 1996.

SPOHN, G., GULER, R., JOHANSEN, P., KELLER, I., JACOBS, M., BECK, M., ROHNER, F., BAUER, M., DIETMEIER, K., KÜNDIG, T. M., JENNINGS, G. T., BROMBACHER, F., BACHMANN, M. F. A virus-like particle-based vaccine selectively targeting soluble TNFalpha protects from arthritis without inducing reactivation of latent tuberculosis. *Journal of Immunology*, v. 178, n. 11, p. 7450-7457, 2007.

STEINDEL, M.; DIAS NETO, E.; DE MENEZES, C. L.; ROMANHA, A. J.; SIMPSON, A. J. Random amplified polymorphic DNA analysis of *Trypanosoma cruzi* strains. *Molecular and Biochemical Parasitology*, v. 60, p. 71-9, 1993.

STORINO, R. & MILEI, J. Introducción. Enfermedad de Chagas, Storino R, Milei J. Ed. Mosby-Doyma Argentina, Buenos Aires. Cap. 1: 1-7, 1994.

STURM, N. R., CAMPBELL, D. A. Alternative lifestyles: the population structure of *Trypanosoma cruzi*. *Acta Tropica*, v. 115, p. 35-43, 2010.

STURM, N. R., VARGAS, N. S., WESTENBERGER, S. J., ZINGALES, B., CAMPBELL, D. A. Evidence for multiple hybrid groups in *Trypanosoma cruzi*. *International Journal for Parasitology*, v. 33, p. 269-279, 2003.

TAFURI W.L. Pathogenesis of lesions of the autonomic nervous system of the mouse in experimental acute Chagas' disease. Light and electron microscope studies. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 19, p. 405-417, 1970.

TAFURI, W.L. Patogenia da doença de Chagas. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v.29, p.194-199, 1987.

TALVANI, A.; TEIXEIRA, M. M. Inflammation and Chagas disease: some mechanisms and relevance. *Advances in Parasitology*, v. 76, p. 171-194. 2011.

TALVANI A., RIBEIRO C.S., ALIBERTI J. S. C. Kinetics of cytokine gene expression in experimental chagasic cardiomyopathy: tissue parasitism and endogenous INF-gama as important determinants of chemokine mRNA expression during infection with *Trypanosoma cruzi*. *Microbes and Infection*, v. 2, p. 851-866, 2000.

TALVANI, A.; TEIXEIRA, M. M. Inflammation and Chagas disease: some mechanisms and relevance. *Advances in Parasitology*, v. 76, p. 171-194, 2011.

TARLETON, R. L. The role of T cells in *Trypanosoma cruzi* infections. *Parasitology Today*, v.11, n.1, p.7-9, 1995.

TARLETON R. L. Parasite persistence in the aetiology of Chagas disease. *International Journal for Parasitology*, v. 31, p. 550-554, 2001.

TARLETON R. L. Chagas disease: a role for autoimmunity? *Trends Parasitology*, v. 19, p. 447-451, 2003.

TARLETON, R. L. New approaches in vaccine development for parasitic infections. *Cellular Microbiology*, v. 7, p. 1379-1386, 2005.

TARLETON, R. L., KOHLER, B. H., LATOUR, A., POSTAN, M. Susceptibility of β_2 - microglobulin-deficient mice to *Trypanosoma cruzi* infection. *Nature*, v. 356, p. 338-340, 1992.

TARLETON R.L. & ZHANG L. Chagas disease etiology: autoimmunity or parasite persistence? *Parasitology Today*, v. 15, p. 94-99, 1999.

TEIXEIRA, A. R. L., TEIXEIRA, G., MAC DO, V., PRATA, A. Acquired cell-mediated immunodepression in acute Chagas' disease. *Journal of Clinical Investigation*, v. 62, p. 1132–1141, 1978 a.

TEIXEIRA, A. R., TEIXEIRA, G., MACEDO, V., PRATA, A. *Trypanosoma cruzi*-sensitized T-lymphocyte mediated 51CR release from human heart cells in Chagas' disease. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 27, p. 1097-1107, 1978 b.

TEIXEIRA, M. M.; GAZZINELLI, R. T.; SILVA, J. S. Chemokines, inflammation and *Trypanosoma cruzi* infection. *Trends Parasitology*, v.18, p. 262-265, 2002.

TISSOT, A. C., SPOHN, G., JENNINGS, G. T., SHAMSHIEV, A., KURRER, M. O., WINDAK, R., MEIER, M., VIESTI, M., HERSBERGER, M., KÜNDIG, T. M., RICCI, R., BACHMANN, M. F. A VLP-based vaccine against interleukin-1 α protects mice from atherosclerosis. *European Journal of Immunology*, v. 43, n. 3, p. 716-722, 2013.

TORRICO F., HEREMANS H., RIVERA M. T., VAN M. E., BILLIAU A., CARLIER Y. Endogenous IFN-gamma is required for resistance to acute *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *Journal of Immunology*, v. 146, p. 3626–3632, 1991.

TOWBIN, H., ROSENFELDER, G., WIESLANDER, J., *et al.* Circulating antibodies to mouse laminin in Chagas disease, American cutaneous leishmaniasis, and normal individuals recognize terminal galactosyl(α 1-3)-galactose epitopes. *Journal of Experimental Medicine*, v. 66, p. 419–32, 1987.

TRAVASSOS, L. R & ALMEIDA, I. C. Carbohydrate immunity in American trypanosomiasis. *Springer Semin Immunopathol*, v. 15, p. 183-204, 1993.

URBINA, J. A. Ergosterol biosynthesis and drug development for Chagas disease. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 104, p. 311-318, 2009.

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

UMEKITA, L. F., TAKEHARA, H. A., MOTA, I. Role of the antibody Fc in the immune clearance of *Trypanosoma cruzi*. *Immunology Letters*, v. 17, n. 1, p. 85-9, 1988.

VALENTE, S. A., DA COSTA VALENTE, V., DAS NEVES PINTO, A. Y., DE JESUS BARBOSA CÉSAR, M., DOS SANTOS, M. P., MIRANDA, C. O., CUERVO, P., FERNANDES, O. Analysis of an acute Chagas disease outbreak in the Brazilian Amazon: human cases, triatomines, reservoir mammals and parasites. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 103, p. 291–297, 2009.

VAGO, A. R., ANDRADE, L. O., LEITE, A. A., D'AVILA, R. D., MACEDO, A. M., ADAD, S. J., TOSTES, S. JR., MOREIRA, M. C., FILHO, G. B., PENA, S. D. Genetic characterization of *Trypanosoma cruzi* directly from tissues of patients with chronic Chagas disease: differential distribution of genetic types into diverse organs. *American Journal of Pathology*, v. 156, p. 1805-1809, 2000.

VAGO, A. R.; MACEDO, A. M.; ADAD, S. J.; REIS, D. D.; CORREA-OLIVEIRA, R. PCR detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in oesophageal tissues of patients with chronic digestive Chagas disease. *Lancet*, v. 348, p. 891-2, 1996 a.

VAGO, A. R.; MACEDO, A. M.; OLIVEIRA, R. P.; ANDRADE, L. O.; CHIARI, E.; GALVAO, L. M.; REIS, D.; PEREIRA, M. E.; SIMPSON, A. J.; TOSTES, S.; PENA, S. D. Kinetoplast DNA signatures of *Trypanosoma cruzi* strains obtained directly from infected tissues. *American Journal of Pathology*, v. 149, p. 2153-9, 1996 b.

VERCELLI, C. A., HIDALGO, A. M., HYON, S. H., ARGIBAY, P. F. *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase inhibits human lymphocyte proliferation by nonapoptotic mechanisms: implications in pathogenesis and transplant immunology. *Transplantation Proceedings*, v. 37, n. 10, p. 4594-7, 2005.

VESPA, G. N. R., CUNHA, F. Q., SILVA, J. S. Nitric oxide is involved in the control of *Trypanosoma cruzi* induced parasitemia and directly kills parasite *in vitro*. *Infection and Immunity*, v. 62, p. 5177–5182, 1994.

VILLANUEVA-LIZAMA, L. E., CRUZ-CHAN, J. V., AGUILAR-CETINA, A. D. C., HERRERA-SANCHEZ, L. F., RODRIGUEZ-PEREZ, J. M., ROSADO-VALLADO, M.

E., RAMIREZ-SIERRA, M. J., ORTEGA-LOPEZ, J., JONES, K., HOTEZ, P., BOTTAZZI, M. E., DUMONTEIL, E. *Trypanosoma cruzi* vaccine candidate antigens Tc24 and TSA-1 recall memory immune response associated with HLA -A and -B supertypes in Chagasic chronic patients from Mexico. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, v. 12, n. 1, p. e006240, 2018.

VIOTTI, R., VIGLIANO, C., LOCOCO, B., BERTOCCHI, G., PETTI, M., ALVAREZ, M.G., POSTAN, M. & ARMENTI A. Long-term cardiac outcomes of treating chronic Chagas disease with benznidazole versus no treatment: a nonrandomized trial. *Annals of Internal Medicine*, v. 144, p. 724-734, 2006.

ZINGALES, B., ANDRADE, S. G., BRIONES, M. R. S., CAMPBELL, D. A., CHIARI, E., FERNANDES, O., GUHL, F., LAGES-SILVA, E., MACEDO, A. M., MACHADO, C. R., MILES, M. A., ROMANHA, A. J., STURM, N. R., TIBAYRENC, M., SCHIJMAN, G. A. New consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 104, n. 7, p. 1051-1054, 2009.

ZINGALES, B., CARNIOL, C., DE LEDERKREMER, R. M., COLLI, W. Direct sialic acid transfer from a protein donor to glycolipids of trypomastigote forms of *Trypanosoma cruzi*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, v. 26, n. 1-2, p. 135-144, 1987.

ZINGALES, B., MILES, M. A., CAMPBELL, D. A., TIBAYRENC, M., MACEDO, A. M., TEIXEIRA, M. M., SCHIJMAN, A. G., LLEWELLYN, M. S., LAGES-SILVA, E., MACHADO, C. R., ANDRADE, S. G., STURM, N. R. The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: rationale, epidemiological relevance and research applications. *Infection, Genetics and Evolution*, v. 12, n. 2, p. 240-53, 2012.

ZINGALES, B., SOUTO, R. P., MANGIA, R. H., LISBOA, C. V., CAMPBELL, D. A., COURA, J. R., JANSEN, A., FERNANDES, O. Molecular epidemiology of American trypanosomiasis in Brazil based dimorphisms of rRNA and miniexon gene sequences. *International Journal for Parasitology*, v.28, n.1, p. 105-112, 1998.

ZHANG, L., TARLETON, R. L. Characterization of cytokine production in murine *Trypanosoma cruzi* infection by in situ immunocytochemistry: lack of association between susceptibility and type 2 cytokine production. *European Journal of Immunology*, v.26, n.1, p.102-9, 1996.

WIZEL, B., NUNES, M., TARLETON, R. L. Identification of *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase family members as targets of protective CD8⁺ TC1 responses. *Journal of Immunology*, v.159, n. 12, p. 6120-30, 1997.

YILMAZ, B., PORTUGAL, S., TRAN, T. M., GOZZELINO, R., RAMOS, S., GOMES, J., REGALADO, A., COWAN, P. J., D'APICE, A. J., CHONG, A. S., DOUMBO, O. K., TRAORE, B., CROMPTON, P. D., SILVEIRA, H., SOARES, M. P. Gut microbiota elicits a protective immune response against malaria transmission. *Cell*, v. 159, p. 1277–1289, 2014.

YIN, Z., COMELLAS-ARAGONES, M., CHOWDHURY, S., BENTLEY, P., KACZANOWSKA, K., BENMOHAMED, L., GILDERSLEEVE, J. C., FINN, M. G., HUANG, X. Boosting immunity to small tumor-associated carbohydrates with bacteriophage $\phi\beta$ capsids. *ACS Chemical Biology*, v. 8, n. 6, p. 1253-1262, 2013.