

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PARASITOLOGIA

**Aspectos parasitológicos, imunológicos e
moleculares da resposta dependente do
receptor do tipo Toll 9 na infecção
experimental por cepas de diferentes
linhagens de *Trypanosoma cruzi***

Rodrigo de Almeida e Lourdes

Belo Horizonte
2013

Rodrigo de Almeida e Lourdes

Aspectos parasitológicos, imunológicos e moleculares da resposta dependente do receptor do tipo Toll 9 na infecção experimental por cepas de diferentes linhagens de *Trypanosoma cruzi*

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

Área de concentração: Protozoologia

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Daniella Castanheira Bartholomeu

Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Parasitologia

Belo Horizonte – MG
Outubro de 2013

AGRADECIMENTOS

- *Agradeço a Deus por ter me dado força e perseverança, e por estar sempre presente em minha vida!*
- *À Prof.^a Daniella Castanheira Bartholomeu, pelo exemplo de profissionalismo, pela dedicação e paciência como orientadora, pela oportunidade de aprendizado e ensinamentos.*
- *À Dr.^a Catherine Ropert, meu obrigado.*
- *Ao professor Dr. Ricardo Gazzinelli, colaborador deste projeto, pela ajuda.*
- *Ao professor Dr. Egler Chiari por gentilmente ter cedido as cepas utilizadas neste trabalho.*
- *Ao professor Dr. Marcelo Caliari e ao Doutorando Fabrício Marcus, pela ajuda nas análises histopatológicas.*
- *À professora Cidinha pela oportunidade e pelo aprendizado.*
- *À Denise Lemos e Lívia Passos, pela amizade e auxílio nos experimentos de citometria de fluxo.*
- *Ao Tiago Mendes, pelo companheirismo e imensa ajuda com as análises de bioinformática.*
- *Aos membros da banca pela disponibilidade em avaliarem este trabalho de tese .*
- *À Pós-graduação em Parasitologia, incluindo seus professores, alunos e funcionários.*
- *À minha família por ter sempre acreditado em mim e estado sempre comigo.*
- *À minha namorada, pelo carinho e apoio.*
- *Aos meus amigos de sempre e os novos que fiz aqui em Belo Horizonte.*
- *Aos amigos da minha turma de mestrado, pela amizade. Que me desculpem as outras turmas, mas essa é a melhor de todos os tempos!*
- *Aos amigos e colegas do LIGP, vocês são um grupo fantástico, muito obrigado por tudo!*
- *Enfim, obrigado a todos que me ajudaram de uma forma ou de outra durante, não só nesse trabalho, mas em toda minha vida!*

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	v
LISTA DE TABELAS	vii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	viii
RESUMO.....	x
ABSTRACT.....	xii
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 <i>Trypanosoma cruzi</i> e aspectos históricos da doença de Chagas	1
1.2 Ciclo de vida e transmissão do parasito <i>Trypanosoma cruzi</i>	2
1.3 Variabilidade genética do <i>T. cruzi</i>	7
1.4 Aspectos gerais da resposta imune na doença de Chagas	8
1.5 Imunidade inata mediada por receptores do tipo Toll e sua importância contra os patógenos.....	11
1.6 Ativação de TLRs por PAMPs de protozoários.....	13
1.6.1 Ativação de TLR9 na infecção pelo <i>T. cruzi</i>	15
2 JUSTIFICATIVA.....	19
3 OBJETIVOS	20
3.1 Geral	20
3.2 Específicos	20
4. MATERIAL E MÉTODOS	22
4.1 Animais.....	22
4.2 Parasitos.....	22
4.2.1 Monitoramento da contaminação das culturas celulares por <i>Mycoplasma spp.</i>	23
4.3 Extração do DNA genômico de <i>T. cruzi</i>	24
4.3.1 Digestão do DNA genômico com enzimas de restrição	25
4.4 Obtenção de populações celulares derivadas de camundongos	25
4.4.1 Macrófagos peritoneais.....	25

4.4.2 Células dendríticas (DC) derivadas de medula óssea.....	26
4.4.3 Ensaio de ativação de macrófagos e células dendríticas.....	27
4.5 Infecção experimental com <i>T. cruzi</i> e curva de parasitemia.....	29
4.6 Infecção experimental com <i>T. cruzi</i> e coleta de sangue para obtenção do soro ...	30
4.6.1 Determinação dos níveis de citocinas por “Cytometric Bead Array” (CBA)	31
4.7 Infecção experimental com <i>T. cruzi</i> e análises histopatológicas	32
4.8 Quantificação dos motivos CpG no genoma das cepas de <i>T. cruzi</i>	33
4.8.1 Hibridação dos DNAs genômicos de cada uma das cepas de <i>T. cruzi</i> com sequências gênicas localizadas em regiões enriquecidas com motivos CpG	33
4.8.2 Perfil de motivos CpG em diferentes cepas de <i>T. cruzi</i>	34
4.9 Análises estatísticas.....	35
4.10 Comitê de Ética em Experimentação Animal	36
5 RESULTADOS.....	37
5.1 TLR9 desempenha papel mais importante na resistência à infecção pelas cepas Y e CL Brener de <i>T. cruzi</i> quando comparado com a infecção causada pela cepa Colombiana.....	37
5.2 Ativação de células da imunidade inata pelo DNA genômico das diferentes cepas de <i>T. cruzi</i>	42
5.3 Tripomastigotas vivas das cepas Y e CL Brener apresentam uma maior ativação TLR9-dependente de DC com quando comparado com a cepa Colombiana.....	51
5.4 O perfil de citocinas no soro de camundongos infectados com as cepas Y e CL Brener difere daquele obtido com a cepa Colombiana	53
5.5 Camundongos TLR9 ^{-/-} infectados com as cepas CL Brener e Y apresentam menor inflamação atrial do que camundongos WT.	56
5.6 Sequências gênicas que se colocizam com motivos CpG imunoestimulatórios são menos abundantes no genoma da cepa Colombiana comparado com as cepas Y e CL Brener.	61
5.7 Motivos CpG de <i>T. cruzi</i> com alta capacidade imunoestimulatória são mais abundantes nos genomas das cepas CL Brener e Y comparado com Colombiana.....	64

6 DISCUSSÃO	67
7 CONCLUSÃO	81
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	82
ANEXO I - Aprovação do projeto pelo CETEA	99
ANEXO II – Carta de aceite e cópia do artigo aceito para publicação na revista PLoS Neglected Tropical Diseases	100

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Ciclo de vida do <i>Trypanosoma cruzi</i>	3
Figura 2 -	Fases clínicas da doença de Chagas	6
Figura 3 -	Imunidade inata e adquirida durante a infecção pelo <i>T. cruzi</i>	10
Figura 4 -	Representação das regiões genômicas de <i>T. cruzi</i> que contêm os motivos CpG	17
Figura 5 -	Polimorfismo das regiões <i>T. cruzi</i> específicas codificadoras de proteínas de superfície nos dois haplótipos de CL Brener	18
Figura 6 -	Curva de parasitemia e sobrevivência de camundongos infectados com a cepa Y	39
Figura 7 -	Curva de parasitemia e sobrevivência de camundongos infectados com a cepa CL Brener.....	40
Figura 8 -	Curva de parasitemia e sobrevivência de camundongos infectados com a cepa Colombiana	41
Figura 9 -	Análise de PCR negativa para <i>Mycoplasma spp.</i>	43
Figura 10 -	Eletroforese em gel de agarose 0,8% para quantificação do DNA das cepas de <i>T. cruzi</i>	43
Figura 11 -	Avaliação da produção de NO por macrófagos estimulados com DNA genômico das cepas de <i>T. cruzi</i>	45
Figura 12 -	Avaliação da produção de IL-12p40 por macrófagos estimulados com DNA genômico das cepas de <i>T. cruzi</i>	46
Figura 13 -	Avaliação da produção de IL-12p40 por células dendríticas estimulados com DNA genômico das cepas de <i>T. cruzi</i>	47
Figura 14 -	Eletroforese em gel de agarose 1,2% para verificação da digestão dos DNAs genômicos das cepas de <i>T. cruzi</i> , utilizando a enzima Bsp1286I.....	49
Figura 15 -	Avaliação da produção de NO e IL-12p40 por macrófagos estimulados com DNA genômico de cada uma das cepas, após digestão. <i>cruzi</i>	50

Figura 16 - Avaliação da produção de TNF- α e IL-12p40 por células dendríticas após estímulo com tripomastigotas vivas de cada uma das cepas de <i>T. cruzi</i>	52
Figura 17 - Perfil de citocinas no soro de camundongos infectados com as diferentes cepas de <i>T. cruzi</i>	53
Figura 18 - Avaliação da produção de IL-12p40 no soro de camundongos infectados com diferentes cepas de <i>T. cruzi</i>	54
Figura 19 - Representação do miocárdio atrial de camundongos infectados com a cepa CL Brener	57
Figura 20 - Representação do miocárdio atrial de camundongos infectados com a cepa Y.....	58
Figura 21 - Representação do miocárdio atrial de camundongos infectados com a cepa Colombiana	59
Figura 22 - Quantificação do infiltrado inflamatório no miocárdio atrial de camundongos infectados com as diferentes cepas de <i>T. cruzi</i>	60
Figura 23 - Abundância relativa de sequências localizadas em regiões enriquecidas com motivos CpG no genomas das diferentes cepas de <i>T. cruzi</i>	62
Figura 24 - Análise de densitometria das hibridizações do DNA genômico das diferentes cepas de <i>T. cruzi</i> , com a região MASP 3`UTR e do gene DGF-1	63
Figura 25 - Abundância dos motivos CpG de classe B imunoestimulatórios agonistas de TLR9 murino nos genomas de diferentes cepas de <i>T. cruzi</i>	66
Figura 26 - Teste da reatividade dos peptídeos com soro de camundongos infectados com diferentes cepas de <i>T. cruzi</i>	80

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Padrões de moléculas associadas a patógenos (PAMPs) identificados em protozoários	14
Tabela 2 -	Estimativa do número de motivos CpG de classe B agonistas de TLR9 murino no genoma das diferentes cepas de <i>T. cruzi</i>	65

LISTA DE ABREVIATURAS

BLAST -	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BMDCs -	Células Dendríticas da Medula Óssea (Bone Marrow Dendritic Cells)
CBA -	Cytometric Bead Arrays
CEBIO -	Centro de Bioterismo
CLB -	cepa CL Brener
COL -	cepa Colombiana
CPqRR -	Centro de Pesquisa René Rachou
Y -	Cepa Y
DC -	Célula dentrítica (Dendritic Cell)
DNA -	Ácido Desoxiribonucleico
dNTP -	Desoxinucleotídeos Trifosfato
DOTAP -	1,2- dioleoyloxy-3-(trimethylammonium)propane
DTU -	Subdivisões Genéticas Discretas (<i>Discrete Typing Units</i>)
GIPL -	Glicoinositolfosfolípedes
GPI -	Glicosilfosfatidilinositol
IL -	Interleucina
IFN-	Interferon
LPS -	Lipopolissacarídeo
LIT -	<i>Liver Infusion Tryptose medium</i>
NO -	Óxido Nítrico
ODN -	Oligodeoxinucleotídeo
PBS -	Tampão fosfato-salino (<i>Phosphate Buffered Saline</i>)
PCR -	Reação em Cadeia da Polimerase (<i>Polymerase chain reaction</i>)

RNA -	Ácido Ribonucleico
rpm -	Rotações por minuto
rRNA -	RNA ribossomal
RNI -	Reativos intermediários de nitrogênio
SFB -	Soro Fetal Bovino
TA -	Temperatura ambiente
TLR -	Receptor(es) do Tipo Toll (<i>Toll-like receptor</i>)
TNF -	Fator de necrose tumoral (<i>Tumor Necrosis Factor</i>)
WT-	Camundongos selvagens (<i>Wild Type</i>)

RESUMO

Receptores do tipo Toll (TLR) são importantes componentes do sistema imune inato, responsáveis pelo reconhecimento de Padrões Moleculares Associados a Patógenos (PAMPs). TLR9 foi inicialmente identificado como responsável pelo reconhecimento de motivos CpG não metilados derivados do DNA genômico de bactéria e vírus. Mais recentemente, também foi demonstrado que o DNA genômico de alguns tripanosomatídeos, como *Trypanosoma cruzi*, apresenta atividade imunoestimulatória TLR9 dependente, e que este receptor é essencial no reconhecimento dos parasitos e na resistência do hospedeiro em infecções experimentais. Estudos prévios realizados pelo nosso grupo permitiram a identificação de sequências imunoestimulatórias contendo motivos CpG no genoma da cepa CL Brener de *T. cruzi*. Estas sequências não estão distribuídas aleatoriamente no genoma, mas enriquecidas em regiões contendo clusters gênicos codificadores de proteínas de superfície e outras sequências *T. cruzi* específicas. Estas regiões são altamente polimórficas nos dois haplótipos da cepa híbrida CL Brener, o que nos levou a especular que a abundância destes motivos CpG poderia variar no genoma das diferentes cepas de *T. cruzi*, podendo assim contribuir para uma ativação diferencial de TLR9 e, por consequência, um padrão diferencial de resposta imune, importantes no controle de parasitemia. A fim de testar esta hipótese, no presente trabalho, estudamos a importância de TLR9 na infecção causada por cepas de *T. cruzi* pertencentes a diferentes linhagens evolutivas: Colombiana (TcI), Y (TcII) e CL Brener (TcVI). Estas cepas foram selecionadas para este estudo por apresentarem padrão de parasitemia e virulência bastante distintos na infecção experimental. Nossos resultados indicam uma menor importância de TLR9 no controle da infecção com a cepa Colombiana, quando comparado com as infecções com CL Brener e Y, visto que camundongos TLR9^{-/-} infectados com as duas últimas, apresentaram aumento da parasitemia e maior mortalidade quando comparados aos animais selvagens, o que não foi visto nas infecções com a cepa Colombiana. Ensaios imunoestimulatórios usando macrófagos e células dendríticas de camundongos C57BL/6 e TLR9^{-/-} com quantidades iguais de DNA genômico das diferentes cepas não revelaram

diferenças na produção de óxido nítrico e IL-12 entre as cepas. Entretanto, ensaios de estimulação com células dendríticas incubadas com o mesmo número de formas tripomastigotas vivas das três cepas de *T. cruzi* mostraram que a diferença da produção de TNF- α e IL-12 entre células provenientes de camundongos selvagens e células de TLR9^{-/-} foi menor para a cepa Colombiana do que para outras cepas. Estes resultados corroboram a hipótese de que a cepa Colombiana possui menores quantidades de motivos CpG imunoestimulatórios em seu genoma, quando comparadas as cepas CL Brener e Y e sugerem possíveis diferenças no tamanho dos genomas das três cepas. Esta hipótese foi confirmada através do sequenciamento do genoma das cepas Y e Colombiana e análises comparativas com o genoma da cepa CL Brener. As cepas CL Brener e Y apresentam uma maior abundância de motivos CpG que apresentam alta capacidade imunoestimulatória, enquanto que o genoma de Colombiana é enriquecido com motivos CpG com menor capacidade imunoestimulatória. Análises comparativas incluindo os genomas das cepas Sylvio (Tcl), Arequipa (Tcl), Esmeraldo (Tcll) e Tulahuén (TcVI) revelam que o padrão de abundância deste motivos CpG imunoestimulatórios é conservado dentro das diferentes linhagens evolutivas do parasito. Em conjunto estes resultados revelam que a infecção causada por diferentes cepas de *T. cruzi* promove uma ativação diferencial do receptor TLR9, gerando uma produção variável de citocinas pró-inflamatórias que são necessárias para a diminuição de parasitemia. O conteúdo de motivos CpG imunoestimulatórios nos genomas das diferentes cepas de *T. cruzi* é, portanto, um importante fator que afeta a virulência, patogênese, e adaptação do parasito ao hospedeiro vertebrado.

ABSTRACT

Toll-like receptors (TLR) are important components of the innate immune system, responsible for the recognition of Pathogen Associated Molecular Patterns (PAMPs). TLR9 was initially identified as responsible for the recognition of unmethylated CpG motifs derived from genomic DNA of bacteria and viruses. More recently, it was demonstrated that the genomic DNA of trypanosomatids, such as *Trypanosoma cruzi*, exhibits a TLR9-dependent immunostimulatory activity and that this receptor is essential in the recognition of the parasite and host resistance in experimental infections. Previous studies by our group have identified immunostimulatory CpG motifs in the genome of *T. cruzi* CL Brener strain. These sequences are not randomly distributed in the genome, but instead are enriched in regions containing gene clusters encoding surface proteins and other *T. cruzi* specific sequences. These regions are highly polymorphic in the two haplotypes of the hybrid CL Brener strain, which led us to speculate that the abundance of these CpG motifs could vary in the genome of different *T. cruzi* lineages, and if so, contribute to a differential activation of TLR9. To test this hypothesis, in this work, we studied the role of TLR9 in infections caused by *T. cruzi* strains that belong to different evolutionary lineages: Colombiana (TcI), Y (TcII) and CL Brener (TcVI). These strains were selected for this study because they display a distinct pattern of parasitaemia and virulence in experimental infections. Experimental infections of wild type and TLR9^{-/-} mice with Colombiana, Y and CL Brener strains revealed a lower importance of TLR9 in controlling parasitemia and mortality in infections with Colombiana, when compared with infections with CL Brener and Y strains. Immunostimulatory assays using dendritic cells and macrophages from C57BL/6 and TLR9^{-/-} incubated with equal amounts of genomic DNA of different strains revealed no difference in the production of nitric oxide and IL-12 among the strains. However, assays using dendritic cells incubated with the same number of live trypomastigotes of the three strains of *T. cruzi* revealed a lower ratio of the TNF- α and IL-12 production by dendritic cells from C57BL/6 and TLR9^{-/-} mice for Colombiana compared with those values for the other strains. These results support the hypothesis that Colombiana strain has lower

abundance of CpG motifs in its genome compared with CL Brener and Y strains, and suggest possible differences in the size of the genomes of these strains. This hypothesis was confirmed by sequencing the genomes of Y and Colombiana strains and by performing comparative analysis with the genome of CL Brener. CL Brener and Y strains have a higher abundance of CpG motifs that have high immunostimulatory activity, whereas the genome of Colombiana is enriched with CpG motifs with lower immunostimulatory properties. Comparative analyzes including the genomes of Sylvio (TcI), Arequipa (TcI), Esmeraldo (TcII) and Tulahuén (TcVI) revealed that this profile is conserved within *T. cruzi* phylogenetic lineages. Our results reveal that infection caused by distinct *T. cruzi* strains promotes a differential activation of the TLR9 receptor, leading to variable production of proinflammatory cytokines that are necessary for parasite clearance. The content of CpG motifs in the genome of different *T. cruzi* strains is therefore an important factor affecting virulence, pathogenesis and parasite adaptation to the vertebrate host.

1 INTRODUÇÃO

1.1 *Trypanosoma cruzi* e aspectos históricos da doença de Chagas

A doença de Chagas, também chamada de Tripanossomíase Americana, foi descoberta por um brasileiro chamado Dr. Carlos Ribeiro Justiniano das Chagas (1879-1934) no Brasil em 1909 (CHAGAS, 1909). Carlos Chagas identificou o agente transmissor da doença, o *Trypanosoma cruzi*, o ciclo de vida do parasito, mamíferos reservatórios da doença, além de descrever vários aspectos da doença humana, com detalhes da forma aguda, assim como a morfologia e o desenvolvimento do parasito em seus hospedeiros, e o curso da infecção em animais de laboratório (CHAGAS, 1909; revisado por LEWINSOHN, 1981). Na época esse pesquisador investigava casos de malária que ocorriam no estado de Minas Gerais, onde estava sendo construída uma importante ferrovia. Chagas notou alta ocorrência de triatomíneos nesta área. Estes insetos eram conhecidos como *barbeiros*, pelo hábito de picarem faces humanas (CHAGAS, 1909). Sabendo do papel de insetos vetores na transmissão de doenças parasitárias, Chagas examinou o intestino desses insetos e encontrou formas flageladas de um parasito ainda não identificado (revisado por PERLETH, 1997). Semanas depois desta descoberta, ele examinou uma menina, a qual apresentava um inchaço na pálpebra, febre e mal-estar. Um exame de uma amostra do sangue desta menina revelou o mesmo parasito encontrado nos insetos (revisado por PUNUKOLLU *et al.*, 2004).

Em 1911, Chagas publicou a descrição de vários aspectos clínicos, etiológicos, patológicos e epidemiológicos da doença (CHAGAS, 1911; revisado por LEWINSOHN, 1981). Com todas estas descobertas, Chagas foi duas vezes indicado para o Prêmio Nobel em 1913 e 1921.

1.2 Ciclo de vida e transmissão do parasito *Trypanosoma cruzi*

O parasito *T. cruzi* alterna o seu ciclo de vida entre um hospedeiro invertebrado (membros da família Reduviidae, subfamília Triatominae) e um hospedeiro vertebrado, que incluem diversos mamíferos, dentre eles o homem (revisado por ZELEDÓN e RABINOVICH, 1981). Durante o ciclo biológico, o *T. cruzi* passa por diferentes estágios de desenvolvimento em cada um dos hospedeiros. Esta grande gama de hospedeiros permite ao parasito se desenvolver em ambientes silvestre, peridoméstico e doméstico, sendo o último possível pela instalação de triatomíneos hematófagos em moradias humanas simples, como casas de pau a pique (COURA *et al.*, 2007).

A transmissão se inicia quando o triatomíneo infectado, após o repasto sanguíneo, defeca ou urina, liberando nestas excreções formas tripomastigotas metacíclicas infectantes do parasito sob a pele ou pelo do homem ou animal. Este, geralmente por ação mecânica, ao coçar, causa uma ferida ou carreiam o parasito para regiões de mucosa por onde as formas tripomastigotas penetram (DIAS e SCHOFIELD, 1999). As formas tripomastigotas não possuem capacidade de divisão celular, mas são altamente infectantes, podendo invadir aparentemente qualquer célula nucleada. O mecanismo de invasão celular pelo *T. cruzi* em células não fagocíticas profissionais envolve o recrutamento de lisossomos para a região da membrana plasmática da célula hospedeira onde o parasito está aderido e posterior formação de um vacúolo parasitóforo contendo constituintes lisossomais (ANDRADE e ANDREWS, 2004). Acredita-se que o pH ácido do vacúolo parasitóforo induza a expressão de uma proteína formadora de poro, a TcTOX, que ao se inserir na membrana do vacúolo termina por destruí-lo e assim o parasito escapa para o citoplasma da célula hospedeira. No citoplasma, as formas tripomastigotas diferenciam-se em formas replicativas com o flagelo interiorizado, denominadas amastigotas (ANDREWS *et al.*, 1990; revisado por COURA *et al.*, 2007). As amastigotas se dividem por vários ciclos de divisão binária no citoplasma da célula hospedeira, e posteriormente se diferenciam novamente nas formas tripomastigotas. Após ruptura da célula parasitada, as formas tripomastigotas sanguíneas e, eventualmente, as formas

amastigotas são liberadas no interstício, podendo invadir novas células e tecidos (APT *et al.*, 2008; TEIXEIRA *et al.*, 2006). Ao picar o hospedeiro infectado, o inseto vetor ingere o sangue contaminado com as formas tripomastigotas, as quais se diferenciam nas formas epimastigotas no trato digestivo do triatomíneo. Essas formas, não infectantes, são capazes de multiplicar rapidamente e, uma vez que atingem as porções terminais do intestino do vetor, se diferenciam novamente nas formas tripomastigotas metacíclicas, fechando o ciclo (FIG. 1) (revisado por MACEDO *et al.*, 2002).

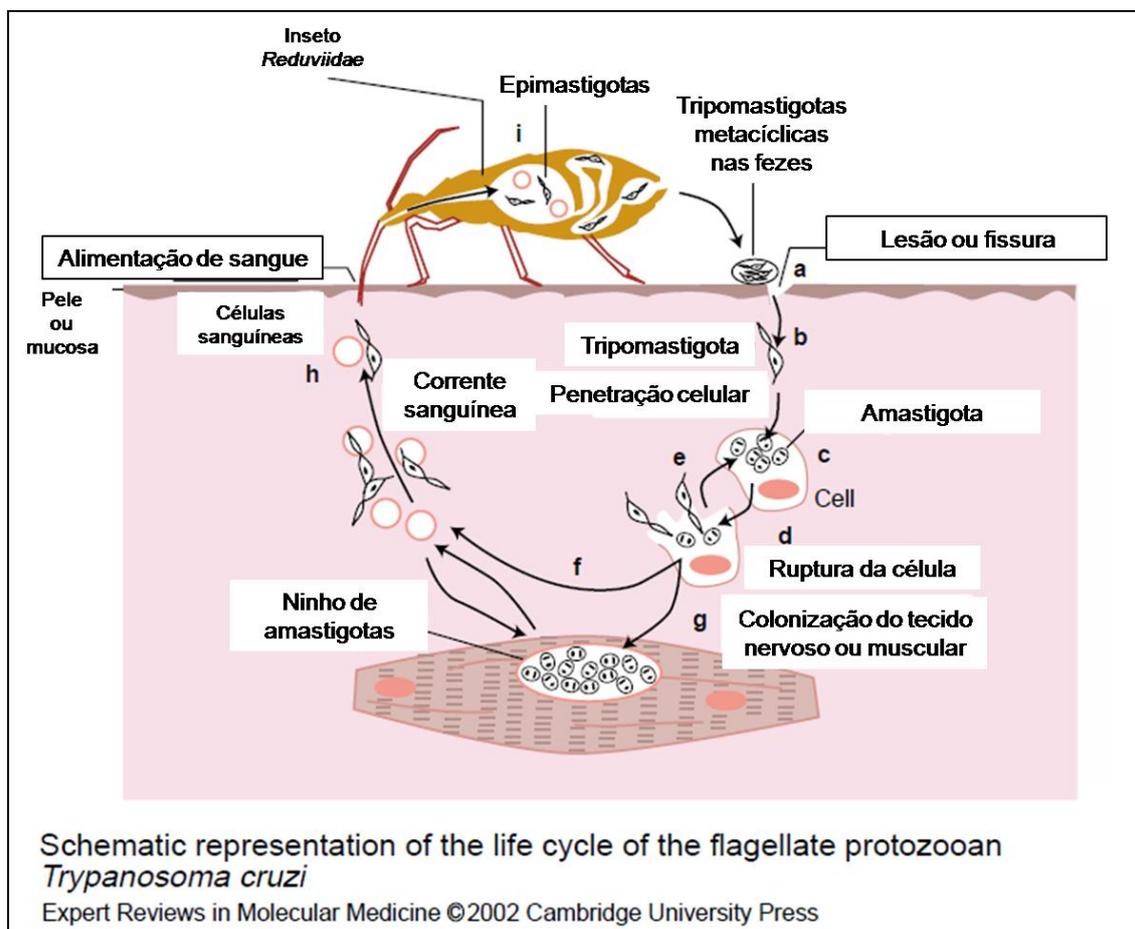


FIGURA 1 - Ciclo de vida do *T. cruzi* (descrição no texto).

Fonte: MACEDO *et al.*, 2002.

Os principais mecanismos de transmissão da doença de Chagas são: vetorial (triatomíneos); transfusão sanguínea; oral (alimentos contaminados); transmissão congênita. Existem outros mecanismos de menor importância epidemiológica, como: acidentes em laboratórios; transplante de órgãos; sexualmente (feridas, esperma e fluídos menstruais).

Surtos de transmissão oral do parasito pela ingestão de alimentos contaminados com triatomíneos infectados ou seus dejetos, foram já notificados no Brasil, México, Bolívia e Colômbia (COURA *et al.*, 2002; COURA *et al.*, 2007; SHIKANAI-YASUDA *et al.*, 1991; DA SILVA *et al.*, 1968). Com a erradicação da transmissão vetorial pelo *Triatoma infestans* no Brasil, o modo transfusional tornou-se uma das mais importantes formas de transmissão da doença de Chagas até a implantação de triagem em bancos de sangue (DIAS *et al.*, 2002), sendo ainda a principal forma de transmissão em países não endêmicos como Canadá e Estados Unidos, pelo fato da constante imigração de pessoas infectadas provenientes de regiões endêmicas e da ausência até pouco tempo atrás da triagem nos bancos de sangue desses países (CHENG *et al.*, 2007; YOUNG *et al.*, 2007).

A distribuição geográfica da doença de Chagas coincide com a ocorrência de insetos vetores e reservatórios, que vai do sul do Chile e Argentina, até o sul dos Estados Unidos. Acredita-se que aproximadamente 90 milhões de pessoas estão expostas ao parasito, uma vez que vivem nessas áreas de risco (PORTELA-LINDOSO *et al.*, 2003), com cerca de 9 milhões de pessoas infectadas, na América Latina, com casos esporádicos relatados nos Estados Unidos (COURA e DIAS, 2009; DIAS *et al.*, 1999; ROGGERO, 2002).

A evolução da doença de Chagas depende de uma série de determinantes, tais como: o número de formas infectantes tripomastigotas no inóculo inicial; a linhagem de *T. cruzi* inoculado; e resposta imune inicial e tardia do paciente (ANDRADE *et al.* 2006; COURA, 1988; MACEDO e PENA, 1998; TEIXEIRA *et al.* 2006).

As fases clínicas da doença de Chagas podem ser resumidas de acordo com COURA (2007), e estão representadas na Figura 2. A fase aguda pode ser assintomática, moderada ou severa; enquanto que a fase crônica pode ser classificada como forma indeterminada, cardíaca, digestiva ou mista (cardíaca e digestiva), e nervosa.

A doença de Chagas humana é uma moléstia que se caracteriza por uma fase aguda que geralmente é assintomática, porém também pode haver sintomatologia e nesses casos existem sinais ou sintomas característicos e/ou sugestivos como: chagoma de inoculação ou sinal de Romana, febre, adenopatia generalizada, edema, hepatoesplenomegalia, miocardite e

meningoencefalite nos casos severos (COURA, 2007; JUNQUEIRA *et al.*, 2010; TEIXEIRA *et al.*, 2006). Este período se estende por 6 a 8 semanas (MONCAYO, 2003). Esta fase também representa um período de parasitemia patente, onde o parasito pode ser encontrado com facilidade no sangue periférico e nos tecidos. Na grande maioria dos casos, a sintomatologia desaparece espontaneamente, ocorrendo total melhora dos sinais (APT *et al.*, 2008; MONCAYO, 2003).

A maioria dos indivíduos em fase aguda sobrevive e evolui para uma fase crônica e permanecerão infectados durante o transcorrer de suas vidas. Nesta fase, o indivíduo pode se apresentar assintomático ou apresentar distúrbios e manifestações cardíacas, digestivas ou neurológicas. Essa variedade de formas se deve, entre outros fatores, ao local onde o parasito se encontra e à intensidade do processo inflamatório por ele causado (COURA *et al.*, 1983; CUNHA-NETO *et al.*, 1995).

A forma crônica indeterminada é a forma mais frequente encontrada nos pacientes chagásicos e caracteriza-se por ausência de sintomas cardíacos, digestivos e cardiodigestivos (COURA, 2007). Caracteriza-se pela baixa parasitemia e sorologia positiva, mas outros exames laboratoriais estão dentro da normalidade, tais como: eletrocardiograma e radiografias. O xenodiagnóstico e a Reação em Cadeia da Polimerase (*Polymerase chain reaction* - PCR) podem permanecer positivos por vários anos (COURA *et al.*, 1999). A forma indeterminada representa 60-70% dos casos de pacientes chagásicos, com os mesmos permanecendo assintomáticos durante toda a vida (APT *et al.*, 2008; MONCAYO, 2003).

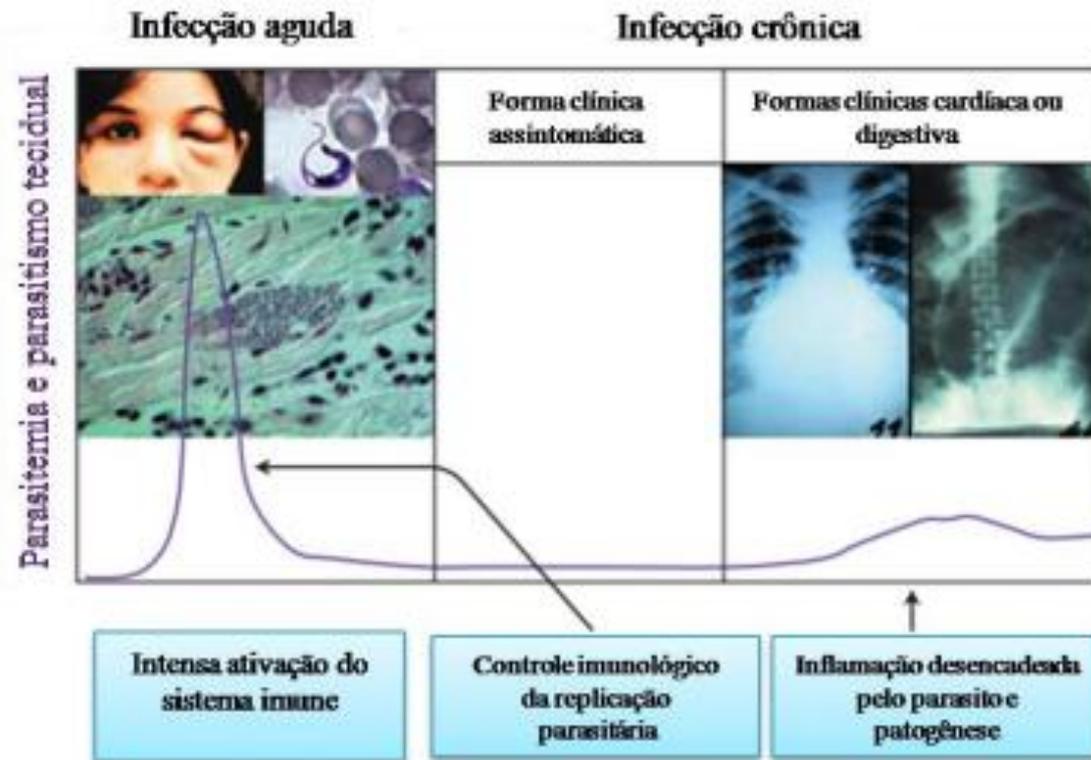


FIGURA 2: Curso da infecção pelo *T. cruzi* e o desenvolvimento da doença de chagas em humanos. A fase aguda é normalmente sintomática e associada a uma alta parasitemia, parasitismo tecidual e grande ativação do sistema imune. As imagens mostram uma criança com sinal de Romaña, uma forma tripomastigota no sangue circulante e um ninho de amastigota no tecido cardíaco. Durante a fase crônica, a parasitemia e o parasitismo tecidual são baixos, com muitos pacientes assintomáticos. No entanto, 20-30% dos pacientes chagásicos crônicos podem apresentar sintomatologia, que são associadas com intensa inflamação local e escasso parasitismo nos tecidos afetados. As imagens mostram uma cardiomegalia e um megacólon em pacientes cardíacos crônicos. A linha roxa indica a mudança na parasitemia e parasitismo tecidual durante a infecção pelo *T. cruzi*.

Fonte: JUNQUEIRA *et al.*, 2010.

1.3 Variabilidade genética do *T. cruzi*

Um grande número de estudos biológicos, bioquímicos e moleculares tem demonstrado que o táxon *T. cruzi* é extremamente heterogêneo. Estas diferenças se manifestam de diversas maneiras, tais como: morfologia das formas sanguíneas, curvas de parasitemia, patogenicidade, sensibilidade a drogas, taxa de crescimento, metaciclogênese, tropismo tecidual, variabilidade antigênica (revisado por DI NOIA *et al.* 2002; MACEDO *et al.*, 2004). É bem estabelecido que a evolução predominantemente clonal e raros eventos de troca genética têm definido a estrutura populacional do parasito, levando a individualização de várias subdivisões genéticas discretas ou DTUs (do inglês, *discrete typing units*) (BRISSE *et al.*, 2000; TIBAYRENC, 1998; TIBAYRENC, 2003). Atualmente, o táxon de *T. cruzi* é classificado em seis subgrupos denominados *T. cruzi* I-VI (Tc I-VI) (ZINGALES *et al.*, 2009, ZINGALES *et al.*, 2012). Esta classificação foi proposta com a finalidade de uniformização das diferentes classificações anteriores propostas e é necessária pela grande variabilidade genética do *T. cruzi*, o que lhe confere um fenótipo particular em cada grupo (ANDRADE *et al.*, 2010; STURM *et al.*, 2003; ZINGALES *et al.*, 2012).

As cepas híbridas de *T. cruzi* estão agrupadas nos grupos TcV e TcVI. O clone CL Brener, cujo genoma foi recentemente sequenciado (EL-SAYED *et al.*, 2005), pertence ao grupo TcVI, sendo, portanto, um híbrido.

O subgrupo *T. cruzi* I (TcI) é altamente predominante entre os pacientes chagásicos na região da bacia Amazônica, sendo a principal causa da doença em áreas endêmicas da Venezuela, Colômbia e Peru (MILES *et al.*, 1981; ANEZ *et al.*, 2004; MILES *et al.*, 2009). No Brasil, TcI relaciona-se com o ciclo silvestre, enquanto nos outros países, os ciclos silvestres e domésticos tendem a se sobrepôr (MILES *et al.*, 2003; MILES *et al.*, 2009; ZINGALES *et al.*, 2012). Já parasitos pertencentes ao grupo *T. cruzi* II (TcII) são mais predominantes entre pacientes do cone sul da América do Sul, onde a doença de Chagas é considerada mais grave (MILES *et al.*, 1981; AÑEZ *et al.*, 2004; MILES *et al.*, 2009).

Patologias digestivas associadas à infecção pelo parasito são mais frequentes no centro do Brasil e sul da América do Sul, sendo raras no norte da América do Sul e América Central (revisado por BUSCAGLIA e DI NOIA *et al.*, 2003). As bases moleculares das diferentes manifestações clínicas da doença de Chagas não são bem compreendidas. De qualquer forma, tropismo tecidual diferencial tem sido demonstrado para as linhagens *T. cruzi* I e II. Além disso, padrões diferenciais de parasitemia têm sido reportados. Por exemplo, a cepa CL (*T. cruzi* II) isolado no sul do Brasil é altamente infectante em camundongo, enquanto que a cepa G, isolada da Amazônia (*T. cruzi* I), não produz parasitemia (YOSHIDA, 1983). Diferentes cepas de *T. cruzi* também podem apresentar capacidades de infecção e de proliferação celular distintas, exemplo a cepa Colombiana (Tcl) apresenta uma maior capacidade de infectar cardiomiócitos do que parasitos da cepa JG (ANDRADE *et al.*, 2010).

1.4 Aspectos gerais da resposta imune na doença de Chagas

Protozoários intracelulares, como o *T. cruzi*, ao infectar hospedeiros vertebrados, geralmente levam ao estabelecimento de uma infecção crônica. A cura espontânea nunca foi reportada, sugerindo que potentes mecanismos de evasão do sistema imune foram desenvolvidos pelo parasito (LEIRIÃO *et al.* 2004; DENKERS E BUTCHER, 2005). O hospedeiro vertebrado, por sua vez, desenvolve uma resposta imune bastante robusta no transcorrer da fase aguda da doença de Chagas o que leva a diminuição de parasitemia e parasitismo tecidual, os quais se mantêm baixos durante a fase crônica da infecção. Esse controle da infecção pelo *T. cruzi* requer a ativação adequada de diversos mecanismos imunes efetores tanto da resposta imune inata, quanto adaptativa. A imunidade adquirida na infecção contra o *T. cruzi* tem sido mais amplamente estudada, enquanto que apenas recentemente aspectos relacionados à ativação da imunidade inata têm sido mais bem compreendidos. Sabe-se, entretanto, que antes do estabelecimento da imunidade adquirida, o sistema imune inato parece ter um papel fundamental em pelo menos dois aspectos importantes da doença de Chagas aguda: o controle da replicação do parasito

e propagação da infecção para tecidos do hospedeiro; e processo inflamatório nos locais de infecção, que é a principal causa de dano nos tecidos e perda de funcional de órgãos (BRENER e GAZZINELLI, 1997; GOLGHER e GAZZINELLI, 2004, JUNQUEIRA *et al.*, 2010). Em relação à resposta imune adaptativa, a ativação de células B levando a produção de níveis substanciais de anticorpos e ativação adequada de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ são essenciais para a diminuição de parasitemia na fase aguda e controle da infecção da fase crônica (ROTTENBERG *et al.*, 1993, GAZZINELLI e DENKERS, 2006).

Após intensa replicação nos tecidos do hospedeiro vertebrado na fase aguda, diversas moléculas expressas pelas formas tripomastigotas e amastigotas induzem a produção de citocinas pró-inflamatórias como interferon- γ (IFN- γ), Interleucina 12 (IL-12) e o fator de necrose tumoral- α (TNF- α) que, quando produzidas em níveis adequados, estão associadas a um fenótipo de resistência. A participação de IL-12 é extremamente importante, principalmente no controle inicial da infecção, levando à proteção (ANTUNES e CARDONI, 2000). Esta citocina produzida pelas células dendríticas induz a síntese de IFN- γ por diversas populações celulares, tais como células *Natural Killer* (NK), linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺. IFN- γ é uma das citocinas mais importantes na indução desse fenótipo resistente. Esta citocina ativa células fagocitárias que destroem os parasitos internalizados pelo aumento da produção de reativos de nitrogênio e oxigênio (NOGUEIRA *et al.*, 1981; GAZZINELLI *et al.*, 1992). O óxido nítrico (NO) pode, diretamente ou indiretamente, modular a efeito da maquinaria leucocitária através de diversos mecanismos. Esse processo envolve efeitos microbicidas, pela produção de radicais livres tóxicos, gerados pela produção de NO, assim como regulação e aumento da resposta inflamatória durante este tipo de infecção. NO mata diretamente os parasitos *in vitro* (VESPA *et al.* 1994, JUNQUEIRA *et al.*, 2010). O IFN- γ também induz a atividade citotóxica de linfócitos T CD8⁺ que termina por destruir células infectadas (SILVA *et al.*, 1995).

Por outro lado, a citocina IL-10 e o fator de transformação do crescimento (TGF- β), possuem papel modulador da ativação da resposta imune (GAZZINELLI *et al.*, 1992) e são necessárias para prevenir o aumento do processo inflamatório e dano tecidual, associados a uma produção exacerbada de IFN- γ e IL-12 (HUNTER *et al.*, 1997).

Tanto linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ estão envolvidos na proteção do hospedeiro à infecção pelo *T. cruzi* (ROTTENBERG *et al.*, 1993). As células Natural killer (NK), células dendríticas (DC) e macrófagos também desempenham um papel crucial na resistência na fase aguda da infecção (FIGURA 3) (ROTTENBERG *et al.*, 1988; TAKEUCHI e AKIRA, 2010), principalmente devido à produção de IFN- γ (CARDILLO *et al.*, 1996).

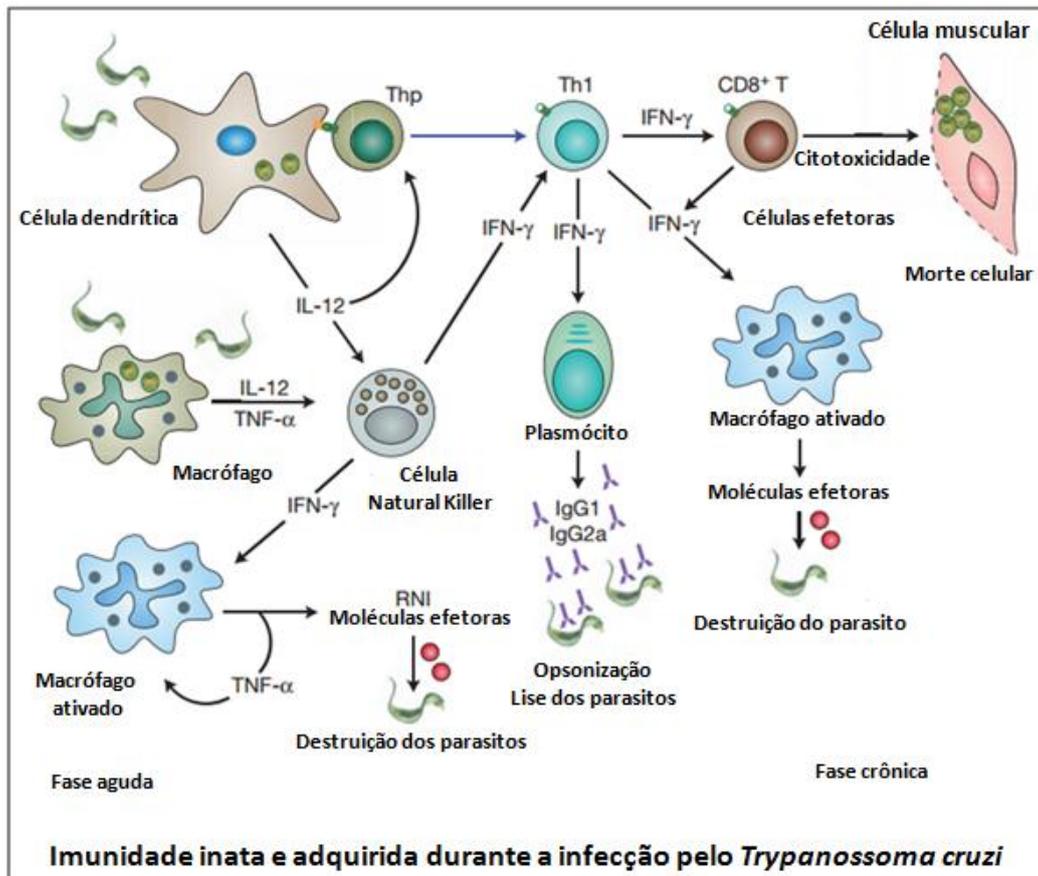


FIGURA 3. Imunidade inata e adquirida durante a infecção pelo *T. cruzi*. Em um primeiro momento da invasão do *T. cruzi*, imunidade inata desempenha um papel crucial na resistência do hospedeiro à infecção: atuando como primeira barreira, as células do sistema imune inato (macrófagos, células NK e DC) produzem citocinas (IL-12, TNF- α e IFN- γ) e moléculas efetoras (reativos intermediários de nitrogênio e oxigênio), que controlam a replicação parasitária. Ao mesmo tempo, células do sistema imune inato, particularmente, DCs, fazem uma ponte entre a imunidade inata e adquirida, produzindo citocinas (IL-12) necessárias para a diferenciação e expansão clonal de células T auxiliar 1 (T helper 1 – Th1) CD4⁺, assim como células T CD8⁺ e B. IFN- γ produzido por células Th1 CD4⁺ ou células T CD8⁺, ativam mecanismos efetores em macrófagos, que destroem formas amastigotas e tripomastigotas fagocitadas, enquanto a atividade citotóxica realizada pelas células T CD8⁺ destroem células com amastigotas internalizadas.

Fonte: JUNQUEIRA *et al.*, 2010.

1.5 Imunidade inata mediada por receptores do tipo Toll e sua importância contra os patógenos

Uma proteína Toll foi inicialmente identificada em *Drosophila melanogaster* como tendo funções na embriogênese e estabelecimento do eixo dorso-ventral (TANJI e IP, 2005). Posteriormente, foi demonstrado que moscas mutantes para o gene Toll eram altamente susceptíveis a infecções fúngicas e bacterianas (LEMAITRE *et al.*, 1996; WILLIAMS *et al.*, 1997; POLTORAK *et al.*, 1998; TANJI e IP, 2005). Vale destacar aqui, o Prêmio Nobel de Medicina do ano de 2011 recebido por Bruce A. Beutler e Jules A. Hoffmann pelas suas descobertas sobre a ativação da imunidade inata, onde evidenciaram que Toll estava envolvido na detecção de microorganismos patogênicos em *Drosophila* e que a ativação de Toll era necessária para a resistência. Os achados desses pesquisadores indicaram também que os mamíferos e as moscas de fruta utilizam moléculas similares para ativar a imunidade inata contra microorganismos patogênicos. Enfim, finalmente os sensores da imunidade inata haviam sido descobertos, abrindo assim novos caminhos para o desenvolvimento da prevenção e terapia contra infecções, câncer e doenças inflamatórias (NOBEL PRIZE, 2011).

Os mamíferos expressam uma variedade de receptores estruturalmente semelhantes à Toll. O primeiro destes a ser reconhecido foi o receptor de IL-1 (GAY e KEITH, 1991; HEGUY *et al.*, 1992). Posteriormente, foram identificados receptores do tipo Toll nos mamíferos (Toll Like Receptors – TLR) (MEDZHITOV *et al.*, 1997; ROCK *et al.*, 1998; TAKEUCHI *et al.*, 1999). MEDZHITOV e JANEWAY (1997) descreveram uma proteína homóloga ao Toll de *Drosophila*, posteriormente designada de Toll Like Receptor 4 (TLR4). Este trabalho demonstrou que a alta expressão da proteína TLR4 resultava na ativação do fator de transcrição nuclear kappa B (NF- κ B) e produção de citocinas (IL-1, IL-6, e IL-8) em monócitos (MEDZHITOV *et al.*, 1997).

Das várias famílias de receptores da imunidade inata, os quais estão incluídos helicases, inflamassomas e receptores do tipo Nod (Nod like receptor – NLR), os TLRs têm sido o foco de vários estudos de infecção de *T. cruzi*. Durante as fases iniciais da infecção por diversos patógenos, as vias de

sinalização dos TLR, bem como outros sensores celulares integrantes do sistema imune inato do hospedeiro, são responsáveis pelo reconhecimento e resposta rápida a microorganismos (MEDZHITOV e JANEWAY, 1998; IWASAKI e MEDZHITOV, 2004; GAZZINELLI e DENKERS, 2006). TLRs são cruciais para diversos aspectos da eliminação microbiana, incluindo recrutamento de fagócitos para os tecidos infectados e subsequente morte microbiana. TLRs expressos por macrófagos e DCs também são importantes para orquestrar a resposta imune adaptativa. No entanto, quando ativados em excesso, TLRs podem gerar patologias, como no caso do choque séptico induzido pela infecção com bactérias Gram-negativas e LPS (DOBROVOLSKAIA e VOGEL, 2002; LIEN e INGALLS, 2002).

Os TLRs são glicoproteínas transmembrana com um domínio extracelular com numerosas repetições ricas em leucina e uma região intracelular que contém um domínio denominado receptor Toll IL-1 (TIR). O domínio extracelular apresenta uma plasticidade notável em termos de reconhecimento de ligantes, pois os TLRs podem reconhecer estruturalmente diferentes ligantes de diferentes organismos (DUNNE *et al.*, 2003).

A família dos TLRs é composta de 10 e 13 membros em humanos e em camundongos, respectivamente (MEDZHITOV *et al.*, 1997; ROCK *et al.*, 1998; DU *et al.*, 2000; TAKEUCHI e AKIRA, 2010; GRAVINA *et al.*, 2013). TLR10 é um membro órfão entre o TLRs humanos, e um dos grandes obstáculos para o seu estudo é a ausência de homólogo em camundongo (CHUANG e ULEVITCH, 2001; HASAN *et al.*, 2005). Por outro lado, camundongos expressam TLR11, TLR12 e TLR13, que não são encontrados em humanos (JANSSENS e BEYAERT, 2003; JUNQUEIRA *et al.*, 2010; TAKEUCHI e AKIRA, 2010; JUNQUEIRA *et al.*, 2010).

TLRs estão localizados na membrana plasmática ou membranas internas de células do sistema imune tais como macrófagos, DCs e células B. TLR3, TLR7, TLR8 e TLR9 localizam-se em membranas internas (CHUANG e ULEVITCH, 2000; MATSUMOTO *et al.*, 2003), enquanto que TLR1, TLR2, TLR4, TLR5 e TLR6 estão localizados na membrana plasmática (OKUSAWA *et al.*, 2004). Trabalhos recentes têm mostrado que os TLRs podem cooperar entre si, para o desempenho de suas funções (TAKEUCHI *et al.*, 1999;

OZINSKY *et al.*, 2000; THEINER *et al.*, 2008; BAFICA *et al.*, 2006; GRAVINA *et al.*, 2013).

1.6 Ativação de TLRs por PAMPs de protozoários

O termo padrão de molécula associado a patógeno (PAMP, do inglês *Pathogen Associated Molecular Pattern*) é utilizado para designar um alvo não próprio ao sistema imune inato. Os PAMPs possuem três características principais: são geralmente expressos pelos microorganismos, mas ausentes no hospedeiro, são conservados entre os microorganismos de uma determinada classe e sua expressão é essencial para a sobrevivência microbiana (JANEWAY, 2001). Os TLRs reconhecem PAMPs presentes em bactérias, vírus e fungos (HOSHINO *et al.*, 1999, BEUTLER, 2004) e muitos agonistas de TLR derivados de protozoários foram identificados recentemente (GAZZINELLI *et al.*, 2004) (TABELA 1).

Dentre os PAMPs identificados em protozoários estão as moléculas de glicosilfosfatidilinositol (GPI) lípidos altamente abundantes em protozoários usadas para ancorar proteínas na superfície dos parasitos que são agonistas de TLR2 (CAMPOS *et al.*, 2001, DE VEER *et al.* 2003; DEBIERRE-GROCKIEGO *et al.* 2003; KRISHNEGOWDA *et al.* 2005). Além disto, glicoinositolfosfolípedes (GIPL), um subtipo de GPI livres de *T. cruzi*, *P. falciparum* e *T. gondii* induzem a produção de citocinas pró-inflamatórias mediadas por TLR4 (DEBIERRE-GROCKIEGO *et al.* 2003; OLIVEIRA *et al.*, 2004; KRISHNEGOWDA *et al.* 2005). Mais recentemente, demonstrou-se que o DNA genômico de *T. cruzi* e *P. falciparum* contêm motivos CpG não metilados que são ativadores de TLR9 (BAFICA *et al.*, 2006; PARROCHE *et al.*, 2007; BARTHOLOMEU *et al.*, 2008). CAETANO e colaboradores (2011) também já demonstraram a importância de TLR7 na infecção pelo *T. cruzi*, principalmente com a produção de IL-12p40 em DCs e IFN- γ em linfócitos T em resposta ao reconhecimento do RNA do parasito. O genoma de *P. falciparum* possui alto conteúdo AT, sendo que um grande número de motivos AT que possuem capacidade de ativar o sistema imune inato, de uma maneira

independente de TLR9, foram identificados neste parasito (SHARMA *et al.*, 2011).

Uma vez ativado por PAMPs, os TLRs interagem com moléculas adaptadoras. A molécula adaptadora mais bem estudada é o MyD88, que é responsável pela transdução do sinal de todos os TLRs, exceto TLR3, assim como o sinal dos receptores de IL-1 e IL-18 (ADACHI *et al.*, 1998; TAKEUCHI e AKIRA, 2002; O'NEILL *et al.*, 2003). Alguns trabalhos recentes já demonstraram a importância dessa via de sinalização por moléculas adaptadoras na resistência do hospedeiro e patogênese durante as infecções por parasitos, utilizando camundongos deficientes de MyD88 infectados com protozoários. Os animais deficientes de MyD88 são altamente susceptíveis à infecção por *T. cruzi*, *Toxoplasma gondii*, *Trypanosoma brucei* e *Leishmania major* (CAMPOS *et al.*, 2004; MURAILLE *et al.*, 2003; DRENNAN *et al.*, 2005).

TABELA 1 | Padrões de moléculas associadas a protozoários (PAMPs)

PAMPs	Parasitos	Estágio que expressa	Estrutura	TLR
GPI	<i>L. major</i>	Promastigotas	LPG	TLR2
	<i>L. donovani</i>			
	<i>T. cruzi</i>	Tripomastigotas	Alquilacilglicerol não saturado	TLR2
		Epimastigotas	GIPLs contendo ceramida	TLR4
	<i>T. brucei</i>	Tripomastigotas	GPI em VSGs	ND
	<i>P. falciparum</i>	Merozoítos	GIPLs e GPI de MSP	TLR2
	<i>T. gondii</i>	Taquizoítos	GIPL e GPI	TLR4
DNA genômico	<i>T. brucei</i>	Todos os estágios	CpG não metilado	TLR9
	<i>T. cruzi</i>	Todoso os estágios	CpG não metilado	TLR9
Hemozoína	<i>P. falciparum</i>	Merozoítos	Cristal β -Hematina de hemina	TLR9
PFTG	<i>T. gondii</i>	Taquizoítos	Profilina	TLR11

TABELA 1: Padrões de moléculas associadas a patógenos (PAMPs) identificados em protozoários parasitos.

Fonte: GAZZINELLI e DENKERS, 2006.

Referências: MAGEZ *et al.* 1998; McCONVILLE *et al.*, 1995; CAMPOS *et al.*, 2001; SHODA *et al.*, 2001; DEBIERRE-GROCKIEGO *et al.*, 2003; DE VEER *et al.*, 2003; OLIVEIRA *et al.*, 2004; COBAN *et al.*, 2005; KRISHNEGOWDA *et al.*, 2005; YAROVINSKY *et al.*, 2005.

Essa ativação de TLRs por moléculas de *T. cruzi* ativa NF- κ B e quinases ativadas por mitógenos (MAPK – mitogen-activated protein kinase), que induzem a expressão de genes de citocinas pró-inflamatórias, ao mesmo tempo em que citocinas anti-inflamatórias são também induzidas (GAZZINELLI e DENKERS, 2006). Ocorre a produção principalmente de IL-12 e TNF- α . Estas citocinas induzirão a síntese de IFN- γ e consequente produção de intermediários reativos de oxigênio e nitrogênio (RNI) que apresentam propriedades microbicidas. A indução da produção de IL-12 por DCs também levará ao desenvolvimento de uma resposta de perfil Th1 e produção de IFN- γ , propiciando o estabelecimento da imunidade mediada por células, bem como a produção de anticorpos, eventos geralmente necessários para o estabelecimento de uma imunidade protetora de grande porte e durável contra protozoários (revisado por JUNQUEIRA *et al.*, 2010).

1.6.1 Ativação de TLR9 na infecção pelo *T. cruzi*

O DNA de bactéria tem um grande efeito imunoestimulatório em células imunes de mamíferos, o que depende da presença do dinucleotídeo CpG não metilado, no DNA bacteriano (KRIEG, 1996; YAMAMOTO *et al.*, 2000). Em contraste a isso, o DNA genômico de mamíferos tem um baixa frequência de dinucleotídeos CpG, e este é muito metilado, e por isso, não apresenta atividade imunoestimulatória.

HEMMI e colaboradores (2000) mostraram que o camundongo deficiente de TLR9 (TLR9^{-/-}) não apresentava nenhuma resposta contra o CpG DNA, incluindo proliferação de esplenócitos, produção de citocinas inflamatórias de macrófagos e maturação de DCs.

Como já dito, o DNA genômico de parasitos também desempenha um importante papel na resposta inflamatória durante as infecções com protozoários. Similar aos motivos do DNA bacteriano, o DNA de *T. cruzi*, *T. brucei*, *L. major* e *Babesia bovis* podem estimular macrófagos e DC e o tratamento com DNase ou metilase aboli a atividade pró-inflamatória do DNA

em macrófagos e DCs (AHMAD-NEJAD *et al.*, 2002; SHODA *et al.*, 2001; BROWN *et al.*, 2002; HARRIS *et al.*, 2006; BARTHOLOMEU *et al.*, 2008).

Vários trabalhos já demonstraram a importância de TLR9 no reconhecimento do parasito e na resistência do hospedeiro em infecções experimentais com *T. cruzi* (AHMAD-NEJAD *et al.*, 2002; BAFICA *et al.*, 2006; BARTHOLOMEU *et al.*, 2008). Esses trabalhos principalmente utilizam animais deficientes em alguns dos componentes da via dos TLRs. Os camundongos TLR9^{-/-} apresentam diminuição da produção de IL-12 e IFN- γ , aumento da parasitemia e aceleração da mortalidade (BAFICA *et al.*, 2006; BARTHOLOMEU *et al.*, 2008), porém é mais resistente quando comparado com o camundongo Myd88^{-/-} que apresenta produção de citocinas pró-inflamatórias mais comprometida e um grande aumento da susceptibilidade à infecção pelo *T. cruzi* (CAMPOS *et al.*, 2004). Outros trabalhos demonstraram também que camundongos TLR2^{-/-} infectados com *T. cruzi*, apresentaram maior produção de IL-12 e IFN- γ em comparação aos animais WT, mostrando um importante papel imunoregulatório desse TLR, prevenindo uma ativação excessiva e produção descontrolada de citocinas pró-inflamatórias (ROPERT e GAZZINELLI, 2004). Camundongos TLR6^{-/-} e TLR4^{-/-} apresentam produção normal de citocinas, parasitemia e sobrevivência (CAMPOS *et al.*, 2004; GAZZINELLI e DENKERS, 2006; BAFICA *et al.*, 2006). CAETANO e colaboradores (2011) revelaram que TLR7 é também importante na imunidade inata, envolvido no reconhecimento do RNA do parasito, induzindo a produção de IL-12p40 em DCs e conseqüentemente, IFN- γ em linfócitos. Neste trabalho também foi mostrado que o animal 3d (triplo deficiente para TLR3, TLR7 e TLR9) infectado com *T. cruzi* apresenta alta susceptibilidade comparado ao animal WT (CAETANO, *et al.*, 2011).

O TLR9 está localizado no endossomo e no retículo endoplasmático (HEMMI *et al.*, 2000; AHMAD-NEJAD *et al.*, 2002; BARTHOLOMEU *et al.*, 2008), portanto, não está presente na superfície das células. BARTHOLOMEU e colaboradores (2008) demonstraram que a infecção pelo *T. cruzi* promove a translocação de TLR9 do retículo endoplasmático para o compartimento lisossomal, onde provavelmente reconhece o DNA do parasito destruído neste compartimento. Neste trabalho foi mostrado também que a atividade imunoestimulatória aumenta quando o DNA do *T. cruzi* é entregue no

compartimento endolisossomal da célula hospedeira que expressa TLR9 usando o reagente DOTAP. A internalização e maturação endossomal são condições para CpG DNA possa ativar TLR9 (AHMAD-NEJAD *et al.*, 2002).

Análises *in silico* do genoma da cepa CL Brener de *T. cruzi* (EL-SAYED *et al.*, 2005) mostraram um alto número de motivos CpG (FIGURA 4) que são similares, mas não idênticos ao CpG DNA bacteriano (KRIEG *et al.*, 2002). Estes motivos não estão distribuídos ao longo de todo o genoma de *T. cruzi*, mas preferencialmente associados com regiões do genoma que contêm genes específicos do parasito, incluindo genes que codificam proteínas de superfície, tais como mucinas glicoproteínas (TcMUC) e o retroelemento VIPER (BARTHOLOMEU *et al.*, 2008).

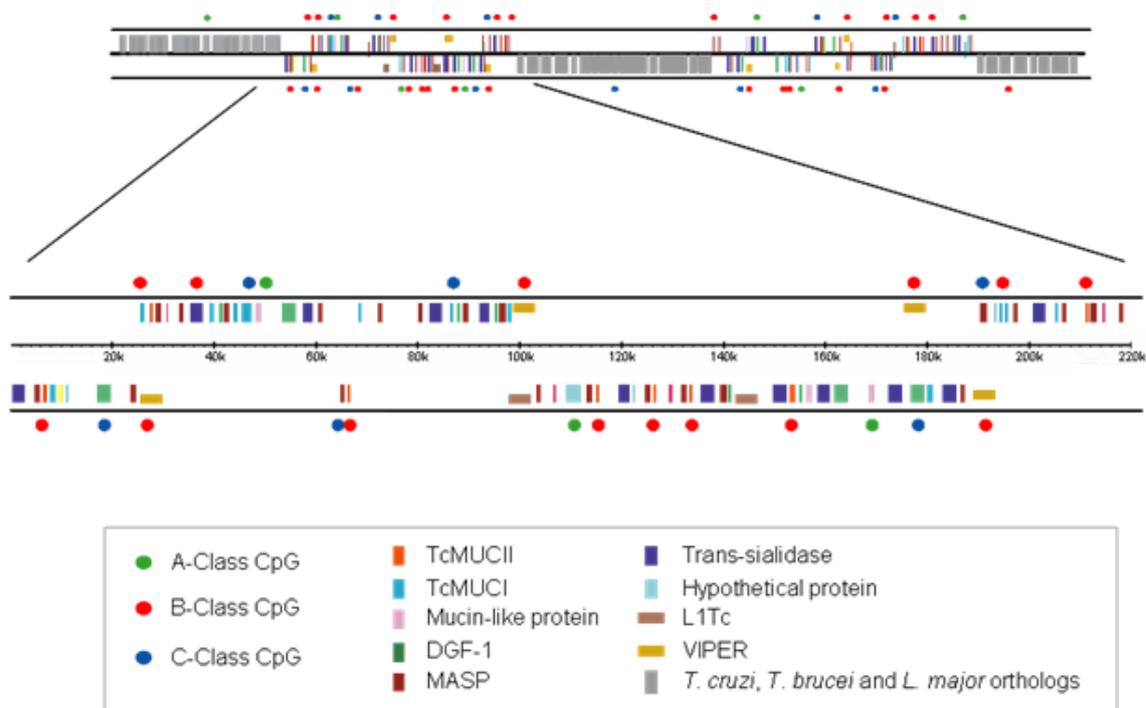


FIGURA 4 - Representação das regiões genômicas de *T. cruzi* que contêm os motivos CpG. Esta figura esquemática mostra a concentração das classes A, B e C de motivos CpG nas regiões específicas de *T. cruzi*, que contém o retrotransposon VIPER e genes codificadores de proteínas de superfície (retângulos coloridos); estes motivos são menos frequentes nas áreas conservadas dos genomas de *T. cruzi*, *T. brucei*, e *L. major* (retângulos cinzas).

Fonte: BARTHOLOMEU *et al.*, 2008.

Estas regiões, que contêm os motivos CpG, são altamente polimórficas nos dois haplótipos da cepa CL Brener, um híbrido recente na história evolutiva do parasito (FIGURA 5). Este último fato nos levou a especular que a abundância destas sequências imunoestimulatórias poderiam variar no genoma das diferentes linhagens evolutivas de *T. cruzi*, podendo assim contribuir para uma ativação diferencial do TLR9 e por consequência produção diferencial de citocinas do tipo Th1, sabidamente envolvidas no controle da parasitemia na infecção por *T. cruzi*.

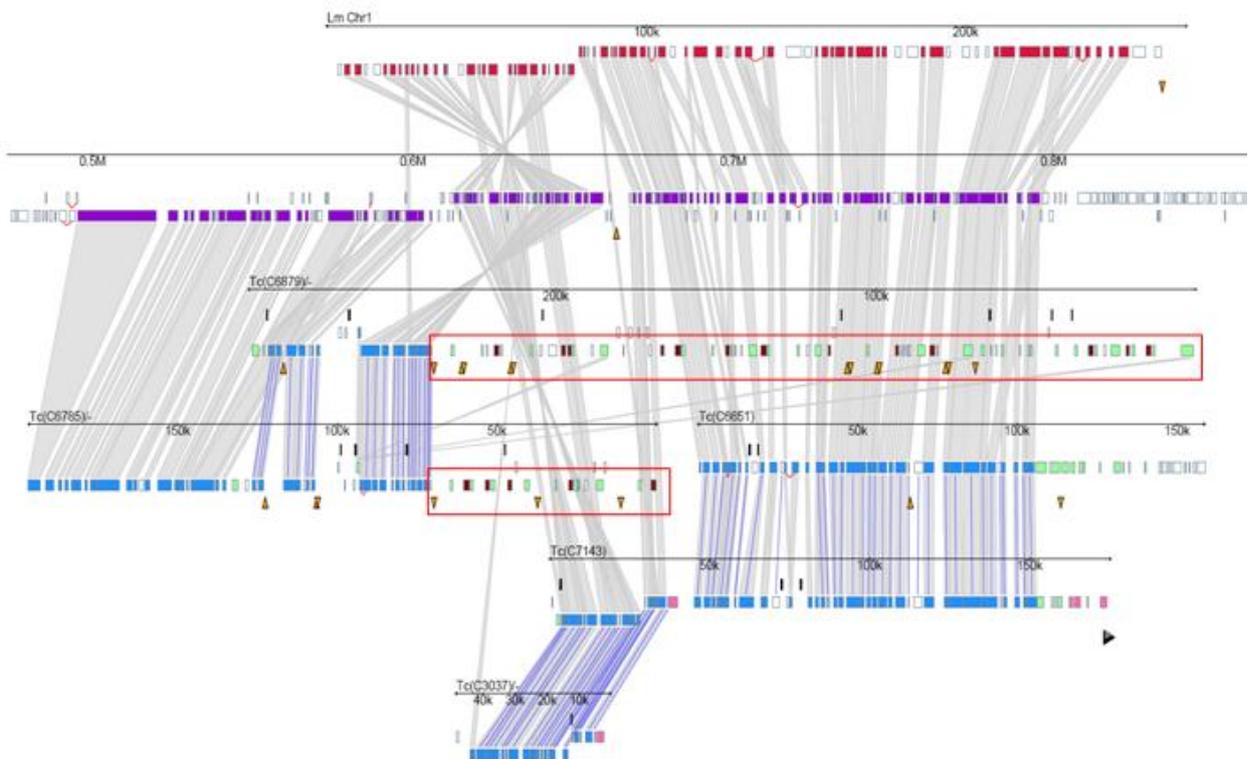


FIGURA 5: Polimorfismo das regiões *T. cruzi* específicas codificadoras de proteínas de superfície nos dois haplótipos da cepa CL Brener. Retângulos vermelhos, roxos de azuis representam genes de *L. major*, *T. brucei* e *T. cruzi*, respectivamente; linhas cinza conectam genes ortólogos; linhas azuis conectam pares de alelos nos dois haplótipos de CL Brener; triângulos laranja representam retroelementos; triângulo preto representa uma região telomérica; caixas vermelhas destacam clusters gênicos codificadores de proteínas de superfície em *T. cruzi*.

2 JUSTIFICATIVA

Doenças causadas por alguns protozoários foram classificadas pela Organização Mundial da Saúde como negligenciadas, visto que as indústrias farmacêuticas não têm voltado os seus esforços para um investimento adequado no desenvolvimento de novas drogas e vacinas contra estas doenças, por não ser economicamente atrativo. Não existem vacinas contra estes parasitos no mercado e as drogas disponíveis apresentam eficácia limitada, fortes efeitos colaterais, problemas com resistência e alto custo. Assim, novos tratamentos quimioterapêuticos e profiláticos devem ser desenvolvidos, para um combate efetivo a estas doenças. O entendimento dos aspectos imunológicos envolvidos na resistência à infecção por protozoários é vital para o desenvolvimento de alternativas terapêuticas mais eficientes (GAZZINELLI e DENKERS, 2006).

Um dos importantes componentes do sistema imune envolvido na resistência dos hospedeiros a esses protozoários nos primeiros estágios da infecção são os TLRs (ROPERT *et al.* 2002). A ativação destes receptores leva à produção de citocinas pró-inflamatórias, importantes no controle da infecção, porém essa resposta não pode ser excessiva e descontrolada, o que poderia levar a um quadro inflamatório danoso ao hospedeiro. Dentre os diferentes TLRs, TLR9, que é responsável pelo reconhecimento de motivos CpG não metilados, tem apresentado papel primordial no desenvolvimento de um fenótipo mais resistente por parte dos hospedeiros em infecções por *T. cruzi*. Apesar de grandes avanços recentes, várias questões importantes ainda precisam ser respondidas a respeito de componentes da resposta inata envolvendo a resistência do hospedeiro e patogênese da doença de Chagas. Em especial, as implicações da grande variabilidade genética de cepas de *T. cruzi* no reconhecimento do parasito pelo sistema imune inato e estabelecimento da imunidade adquirida tem sido pouco estudadas. O melhor entendimento dos padrões imunológicos de resposta à infecção causada por diferentes isolados do parasito poderá proporcionar novas perspectivas de intervenções imunológicas para prevenção e tratamento da doença de Chagas.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Neste trabalho, temos por objetivo, avaliar a importância de TLR9 na infecção causada por diferentes cepas do *T. cruzi*. Mais especificamente, nosso objetivo é buscar correlacionar o perfil de parasitemia e mortalidade de camundongos selvagens (WT) e TLR9^{-/-} infectados com as diferentes cepas do parasito com a abundância de motivos CpG nestes genomas e os padrões de resposta imune TLR9 dependente gerados por cada uma dessas cepas de *T. cruzi* *in vivo* e *in vitro*.

3.2 Específicos

- Obtenção da curva de parasitemia em camundongos WT e TLR9^{-/-} infectados com as cepas CL Brener, Y e Colombiana.
- Realizar ensaios imunoestimulatórios de macrófagos DC com preparações de DNA genômico das diferentes cepas de *T. cruzi*.
- Avaliação da produção de citocinas por DC derivadas de camundongos WT e TLR9^{-/-} expostas a tripomastigotas vivas de cada uma das cepas estudadas.
- Avaliação da produção de citocinas no soro, dos camundongos WT e TLR9^{-/-} infectados com as diferentes cepas de *T. cruzi*.

- Avaliação do processo inflamatório no miocárdio atrial de camundongos WT e TLR9^{-/-} infectados com as três cepas.
- Quantificação dos motivos imunoestimulatórios no genoma das cepas de *T. cruzi* pertencentes a diferentes linhagens evolutivas do parasito.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais

Para os experimentos foram utilizados camundongos entre 6 a 10 semanas de idade, da linhagem C57BL/6. Os animais foram produzidos no Centro de Pesquisa René Rachou (CPqRR) e mantidos no biotério do próprio CPqRR (Biotex). Os animais deficientes dos TLR9^{-/-} e TLR4^{-/-} foram também obtidos do CPqRR, através da colaboração estabelecida com o Prof. Dr. Ricardo Gazzinelli, CPqRR, Fiocruz. Os animais foram sempre acondicionados em salas próprias para acondicionamento de animais *knockout*, com água e ração *ad libitum*.

4.2 Parasitos

As cepas de *Trypanosoma cruzi* utilizadas neste trabalho foram: Y (*T. cruzi* II), Colombiana (*T. cruzi* I) e o clone CL Brener (*T. cruzi* VI). As formas epimastigotas das cepas mencionadas foram gentilmente cedidas pelo Prof. Égler Chiari.

Os métodos de cultivo de formas epimastigotas e tripomastigotas das diferentes cepas de *T. cruzi* foram empregados de acordo com protocolos previamente descritos (TEIXEIRA *et al.*, 1994). As formas epimastigotas em fase exponencial de crescimento foram cultivadas em garrafas próprias para cultivo, sendo mantidas a 28°C em incubadora (Eletrolab[®] EL 101/2), em meio *Liver Infusion Tryptose medium* (LIT) – completo (10g/L de infuso de fígado; 4 g/L NaCl; 0,4 g/L KCl; 8 g/L Na₂HPO₄; 1 g/L glicose; 5 g/L triptose; 10 mL de hemina 2% em NaOH (p/v)) acrescido de 10% de soro fetal bovino (SFB), estreptomicina (100 µg/ml) e penicilina (100 U/ml).

As formas tripomastigotas derivadas de cultura foram obtidas através de infecção de monocamadas de células L6 (mioblasto de camundongo) com formas tripomastigotas de cada uma das cepas de *T. cruzi*.

Essas células foram cultivadas em meio RPMI (SIGMA) acrescido de 5% de SFB e 1% dos antibióticos penicilina (100 U/mL, GIBCO) e estreptomicina (1 µg/mL, GIBCO) a 37°C, com 5% de CO₂ em estufa (SANYO CO₂ INCUBATOR). Para obtenção de tripomastigotas, as células L6 infectadas foram cultivadas em meio RPMI acrescido de 1% de SFB a 37°C e 1% dos antibióticos penicilina (100 U/mL, GIBCO) e estreptomicina (1 µg/mL, GIBCO) com 5% de CO₂ em incubadora. Cerca de 5 dias após a infecção, as formas tripomastigotas foram recolhidas do sobrenadante.

Cada uma das cepas utilizadas nos experimentos foram devidamente genotipados por PCR utilizando três marcadores moleculares, de acordo com MACEDO e SEGATTO (2011).

4.2.1 Monitoramento da contaminação das culturas celulares por *Mycoplasma spp.*

O monitoramento da contaminação de *Mycoplasma spp.* nas culturas de epimastigotas e tripomastigotas de *T. cruzi* foi realizado por PCR. Foram utilizados os iniciadores específicos descritos por TIMENETSKY e colaboradores (2006), para amplificar parte do gene da subunidade 16s do rRNA de qualquer espécie do gênero *Mycoplasma*. Para a reação de PCR foi utilizado 100-300 ng da preparação de DNA das amostras, 200 µM de cada dNTP (dTTP, dATP, dCTP e dGTP), 10 pmol dos iniciadores MGSO 5'TGCACCATCTGTCACTCTGTTAACCTC3' e GPO3 5'GGGAGCAAACAGGATAGATACCCT3' em solução contendo Tris-HCl 10mM pH 8,0, KCl 50mM e MgCl₂ 1,5mM para um volume final de 10 µL. As condições de reação foram: desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, 35 ciclos de 94°C por 1 minuto, anelamento dos iniciadores a 55°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 minuto, e o último passo a 72°C por 2 minutos para extensão final. O produto da reação foi fracionado por eletroforese em gel de agarose 1%, corado por brometo de etídeo e visualizado em transiluminador. Como controle positivo, utilizamos amostras de célula Vero (célula epitelial de

rim) já sabidamente infectadas com *Mycoplasma spp.* Como controle negativo, foi incluído um sistema de PCR sem a presença de DNA.

Em caso de contaminação da cultura, a mesma foi submetida ao tratamento com ciprofloxacina (cloridrato de ciprofloxacino; Ciprobiot; Hexal) na concentração de 10 µg/mL adicionada ao meio LIT ou RPMI. A descontaminação foi feita por no mínimo de 10 dias (UPHOFF *et al.*, 2002).

4.3 Extração do DNA genômico de *T. cruzi*

A extração do DNA de cada uma das cepas de *T. cruzi* foi realizada a partir das formas epimastigotas, devido a sua facilidade de cultivo. O DNA foi extraído usando a coluna Illustra™ (GE Healthcare), seguindo-se as instruções do fabricante. As formas epimastigotas (aproximadamente 1×10^8 formas em cada extração), ao atingirem a fase exponencial no cultivo, foram submetidas à centrifugação a 3.000 rpm (Sorvall® 6000) por 15 minutos, à temperatura ambiente (TA). Após essa centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o sedimento lavado com 10 mL de tampão fosfato-salino (Phosphate Buffered Saline - PBS) com centrifugação a 3.000 rpm, por 15 minutos, à TA. Novamente o sobrenadante foi descartado, sendo nova lavagem com PBS realizada, como descrito acima. O DNA extraído de cada cepa foi ressuspendido em água MilliQ autoclavada e quantificado no espectrofotômetro NanoDrop® Spectrophotometer ND-1000 e armazenado a -20°C até o momento do seu uso.

4.3.1 Digestão do DNA genômico com enzimas de restrição

Com a finalidade de aumentar a capacidade de ativação das células da imunidade inata pelo DNA das diferentes cepas de *T. cruzi*, realizamos uma busca no genoma do parasito por sequências reconhecidas por enzimas de restrição de corte frequente, mas que mantivesse os motivos CpG intactos. O objetivo seria fragmentar o DNA em sequências muito pequenas e assim facilitar o acesso dos mesmos até o TLR9 intracelular. Assim, selecionamos a enzima de restrição *Bsp1286I* (Fermentas – Life Sciences). Para digestão, de um total de 30 µg de DNA genômico das cepas de *T. cruzi*, foram utilizadas 40 unidades de enzima de restrição, por cerca de 12 horas de incubação, a 37°C e posterior inativação da enzima a 65°C por 20 min.

4.4 Obtenção de populações celulares derivadas de camundongos

4.4.1 Macrófagos peritoneais

Para a obtenção de macrófagos peritoneais de camundongos WT, TLR9^{-/-} e TLR4^{-/-}, inoculamos, por via intraperitoneal, 2 mL de tioglicolato 3% (ROPERT *et al.*, 2001) nos camundongos. Os animais foram mantidos por 72 horas em suas gaiolas com água e alimento *ad libitum*, sendo posteriormente sacrificados por deslocamento cervical. Cada animal foi sacrificado separadamente, no momento da retirada das macrófagos peritoneais. Para a retirada das células, procedeu-se com grande assepsia, limpando-se a região abdominal do animal com álcool 70%. Retirou-se toda a pele do animal e injetou-se 5 mL de meio de cultura RPMI (SIGMA) gelado na cavidade peritoneal, massageando-se o local. O meio de cultura que fora injetado foi recolhido logo em seguida. Foi feito um *pool* com células de todos os camundongos de cada linhagem e o mesmo foi centrifugado a 1.200 rpm por 10 minutos, a 4°C (Eppendorf 5804 R). O sedimento foi ressuspenso em 5 mL RPMI suplementado com 10% SBF e 1% dos antibióticos penicilina (100

U/mL, GIBCO) e estreptomicina (1 µg/mL, GIBCO). As células foram quantificadas em câmara hemocitométrica de Neubauer, sendo o total 2×10^5 células adicionadas nos poços em placas de 96 poços de poliestireno (NUNCLON™ Surface). As células foram incubadas a 37°C em incubadora (SANYO Incubator CO₂), com atmosfera de 5% CO₂ por 3 horas para adesão celular à placa. Após essa incubação, as placas foram lavadas com meio de cultura e neste momento se encontravam prontas para utilização nos ensaios de imunoestimulatórios.

4.4.2 Células dendríticas (DC) derivadas de medula óssea

Para obtenção e diferenciação de DC derivadas de medula óssea de camundongos, utilizados protocolos previamente já descritos (MACEDO *et al.*, 2008). A medula óssea foi extraída de fêmures e tíbias de animais WT, TLR9^{-/-} e TLR4^{-/-}. Cada animal foi sacrificado separadamente, no momento em que ia ser feita a retirada dos ossos. Procedeu-se em todo este experimento com grande higienização e assepsia. Os ossos extraídos foram colocados em meio de cultura DMEM (SIGMA), e a extremidade de cada osso foi cortada com auxílio de uma tesoura, sendo as células do interior retirada, por passagem de meio de cultura, com auxílio de uma seringa. As células foram colocadas em placas de Petri na concentração de 1×10^7 células/placa e mantidas em 7 mL de DMEM suplementado com 10% de SFB (GIBCO), 1% dos antibióticos penicilina (100 U/mL, GIBCO) e estreptomicina (1 µg/mL, GIBCO) e 30% de GM-CSF (linhagem celular - J558 GM-CSF) (fator estimulante de macrófagos e granulócitos). As placas então foram incubadas a 37 °C, sob atmosfera de 5% de CO₂ em incubadora (SANYO Incubator CO₂). No terceiro dia após o início da cultura, foram adicionados 5 mL/placa de DMEM suplementado, como descrito acima. Para renovação do meio de cultura, nos dias 5 e 7, foram retirados 4 mL do meio e adicionados 5 mL/placa de DMEM suplementado. No décimo dia de cultura as células não aderentes foram coletadas, centrifugadas a 1200 g por 10 minutos, a 4°C (Eppendorf 5804 R), e ressuspensas em 1 mL de DMEM suplementado. Em seguida, as células foram contadas em uma

câmara de Neubauer. As BMDCs (células dendríticas derivadas de medula óssea) foram plaqueadas em placas de 96 poços de fundo em U (NUNC) na concentração de 3×10^5 células/poço.

4.4.3 Ensaio de ativação de macrófagos e células dendríticas

Macrófagos primados com IFN- γ (120 U/mL) ou DC derivados de camundongos WT e TLR9-/- foram incubados com o DNA genômico extraído das diferentes cepas de *T. cruzi*, em diferentes concentrações em presença do reagente DOTAP 1,2-dioleoyloxy-3-(trimethylammonium)propane (Roche Diagnostics), um reagente de transfecção lipossomal. Nesses ensaios foram utilizados 5 μ L de DOTAP para cada 1 μ g de DNA. Essas duas populações celulares também foram incubadas com os seguintes sistemas: DNA em maiores concentrações (100 μ g/mL, 50 μ g/mL, 25 μ g/mL e 12,5 μ g/mL) sem a presença de DOTAP; com DNAs digeridos com enzima de restrição *Bsp1286I* (descrito no item 4.4.1); tripomastigotas vivas de cada uma das cepas de *T. cruzi* (relação de 10 e 20 tripomastigotas para cada célula).

Foram utilizados como controle positivo, LPS ultra puro na concentração de 10 ng/mL (*Escherichia coli* 0111:B4 - Sigma-Aldrich) e um oligonucleotídeo (ODN) CpG 1826 (Alpha DNA) (BARTHOLOMEU *et al.*, 2008). Como controle negativo, os macrófagos ou DC foram cultivados em meio de cultura na ausência de estímulo, com IFN- γ (macrófagos), DOTAP e também GpC 1826 ODN (com a inversão do dinucleotídeo CpG). Após 48 horas de incubação com os estímulos, para macrófagos, e 24 horas para DC, o sobrenadante foi coletado para a dosagem das citocinas e dosagem de óxido nítrico (ROPERT *et al.*, 2001).

4.4.3.1 Dosagem de óxido nítrico

A dosagem de óxido nítrico, no sobrenadante das culturas de células dos experimentos de macrófagos, foi realizada pela Reação de Griess, onde é feita a dosagem de nitrito (NO_2^-) (HIBBS *et al.*, 1988; ROPERT *et al.*, 2001). Após incubação dos macrófagos com os estímulos especificados no item 4.4.3., foram retirados 50 μL do sobrenadante e transferidos para outra placa de 96 poços, onde foi acrescentado 50 μL do reagente de Griess. Após 10 minutos de reação, à TA, a leitura foi realizada em espectrofotômetro (leitor de ELISA) com comprimento de onda de 540 nm.

O Reagente de Griess foi preparado no momento da adição aos poços das seguintes soluções: solução 1: 1% de sulfanilamida em 2,5% H_3PO_4 ; solução 2: 0,1% Nedd (Dihidrocloreto de N-(1-naftil)-etilenodiamina) em 2,5% de H_3PO_4 . Essas soluções foram preparadas previamente e mantidas a 4° C em frascos protegidos da luz. A concentração de nitrito foi calculada utilizando-se uma curva padrão com uma concentração conhecida de nitrito de sódio (NaNO_2) em diferentes concentrações.

4.4.3.2 Dosagem de citocinas por ELISA

A dosagem de citocinas no sobrenadante de cultura de macrófagos e DC foi realizado por ELISA. Foram realizadas dosagens de IL-12p40 e TNF- α utilizando-se kit comercial, conforme instruções do fabricante (R&D Systems). O anticorpo de captura proveniente do kit, foi diluído para a concentração de trabalho de 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ em PBS e 50 μL do mesmo foi distribuído nos poços de uma placa de 96 poços (FALCON), para que o anticorpo se fixasse. A placa contendo o anticorpo de captura foi incubada à TA, por cerca de 16 horas. Após essa incubação, a placa foi lavada 6 vezes com 0,05% Tween[®] 20 em PBS em lavadora de placas (Aquamax 2000 – Molecular Devices) e procedeu-se ao bloqueio com 300 μL de PBS 1% BSA, com incubação por 2 horas, à TA. Após bloqueio, as placas foram lavadas mais uma vez como descrito

anteriormente. Pipetou-se nos poços, 50 µL do sobrenadante das culturas, do padrão e do branco, e as placas foram incubadas por 1 hora à TA. As placas foram lavadas novamente e adicionou-se 100 µL do anticorpo de detecção, na concentração de 400 ng/mL, incubando-as por 2 horas. Após este período, as placas foram lavadas novamente, e colocou-se 100 µL de streptavidina (diluição 1:200), com incubação à TA, por 30 minutos, com proteção da luz. Após, os poços foram lavados e adicionou-se 100 µL da solução do substrato (10 mL de tampão citrato fosfato + 15 mg de OPD + 4 µl de peróxido de hidrogênio (H₂O₂)). Incubou-se por 20 minutos, ao abrigo da luz e adicionou-se 30µL da solução de parada (ácido sulfúrico 4N). Foi feita a leitura das absorbâncias imediatamente em espectrofotômetro, a um comprimento de onda de 495nm.

4.5 Infecção experimental com *T. cruzi* e curva de parasitemia

Foram utilizados camundongos WT e TLR9^{-/-}, com cada grupo contendo de 8 a 10 indivíduos, com 6 a 10 semanas de vida, os quais foram infectados com formas tripomastigotas sanguíneas das diferentes cepas de *T. cruzi* por via intraperitoneal. Foram infectados grupos de animais com a cepa CL Brener (500 formas tripomastigotas), Y (100 formas tripomastigotas) e Colombiana (50 formas tripomastigotas) (TALVANI *et al.*, 2000; BARTHOLOMEU *et al.*, 2008). Após essa infecção, os animais ficaram em suas gaiolas recebendo água e alimentos *ad libitum*.

A curva de parasitemia teve início antes da patência da infecção. Os animais foram acompanhados durante toda essa fase parasitêmica, com contagem do número de parasitos no sangue e avaliação da mortalidade diariamente. Cada animal foi marcado com um tipo de sinal, de modo a diferenciá-los entre si, para identificação da variação da parasitemia individual.

Para realização da parasitemia, os animais foram retirados de suas gaiolas e colocados em um suporte próprio, para que ficassem presos, de modo que somente a cauda ficasse exposta. Com extremo cuidado, auxiliado por uma tesoura, cortou-se a ponta da cauda de cada um dos camundongos.

Pipetamos 5 μ L de sangue diretamente da cauda e o colocamos em lâmina sob lamínula. A cauda dos camundongos foi cauterizada, a fim de evitar que o mesmo sujasse a gaiola com sangue e assim evitar a possibilidade de contaminação para o manuseador. Levou-se a lâmina ao microscópio óptico e os parasitos foram contados em 50 campos, no aumento de 40 vezes. A mortalidade dos animais foi avaliada diariamente.

4.6 Infecção experimental com *T. cruzi* e coleta de sangue para obtenção do soro

Camundongos WT e TLR9^{-/-}, machos, com 6 a 8 semanas de vida, foram separados em 8 a 10 animais em cada grupo, os quais foram infectados com formas tripomastigotas sanguíneas da mesma forma e com as mesmas cargas parasitárias do item **anterior 4.5**, para cada uma das cepas de *T. cruzi*. Esses animais foram acompanhados quanto à parasitemia, sendo realizadas várias coletas de sangue ao longo do tempo, em dias antes, durante e depois do pico de parasitemia (de acordo com as curvas obtidas). Após 30 minutos à TA, o sangue foi centrifugado a 5.000 rpm por 15 minutos e o soro obtido foi mantido a -80° C.

As citocinas séricas no soro foram detectadas utilizando-se o kit CBA (Inflammation kit Cytometric Bead Array – CBA, BD), seguindo-se protocolo do fabricante. A escolha do CBA para a quantificação de citocinas séricas nesse experimento foi feita, porque permite uma quantificação de 6 citocinas em um pequeno volume de amostra (25 μ L de soro).

4.6.1 Determinação dos níveis de citocinas por “Cytometric Bead Array” (CBA)

Após a coleta de sangue dos animais infectados com *T. cruzi*, foi feita a quantificação de citocinas no soro. Os soros foram coletados para determinação da produção das seguintes citocinas, por CBA: IL-6, MCP-1, IFN- γ e TNF- α , (Inflammation kit Cytometric Bead Array – CBA, BD), de acordo com o protocolo sugerido pelo fabricante. O princípio da técnica de CBA baseia-se no uso de seis populações de microesferas com diferentes intensidades de fluorescência; cada população de microesferas foi sensibilizada com anticorpos de captura específicos para IL-6, MCP-1, IFN- γ , TNF- α , IL-10 e IL-12.

Essas microesferas específicas para cada uma das citocinas foram detectadas em citômetro de fluxo e a quantidade de citocinas presentes nos soros dos camundongos determinadas pela intensidade de fluorescência. Resumidamente, uma alíquota (25 μ L) de soro foi incubada com 15 μ L da mistura de microesferas específicas anticitocinas por 3 horas à TA, ao abrigo da luz, seguida por uma lavagem com tampão contendo 1% BSA em PBS e centrifugação a 600 g por 7 minutos a 18°C. Após o descarte dos sobrenadantes, as microesferas foram incubadas com 18 μ L da mistura de anticorpos anticitocinas conjugados com PE (ficoeritrina), por 30 minutos à TA, protegidas da luz. Finalmente, as microesferas foram lavadas novamente e ressuspendidas em 100 μ L do tampão de lavagem, e então analisadas no citômetro de fluxo (FACScan®, BD Biosciences, EUA). Para quantificação da citocinas, padrões contendo concentrações conhecidas foram processados em paralelo.

A análise dos dados foi realizada utilizando-se o software FCAP array (BD Biosciences). Resultados foram obtidos em pg/mL, e os limites de detecção foram de 20 pg/mL a 5.000 pg/mL.

4.7 Infecção experimental com *T. cruzi* e análises histopatológicas

Para realizamos análises histopatológicas, os camundongos WT e TLR9-/- foram infectados com 5000 formas tripomastigotas sanguíneas das cepas CL Brener, Y e Colombiana. Após as infecções, os animais foram sacrificados e os corações coletados 15 após a infecção. Cada órgão foi submetido a dois cortes, de modo que fosse separada, a parte atrial da parte ventricular. Os fragmentos teciduais foram fixados em solução de formol tamponado 10% e processados de acordo com trabalhos prévios da literatura (MALTOS *et al.*, 2004; GUEDES *et al.*, 2009).

Todos os cortes histológicos foram visualizados pela objetiva de 40X para digitalização de imagens através da microcâmera JVC TK-1270/RGB (Tokyo, Japan), perfazendo uma área total de 4×10^5 mm² de miocárdio atrial analisado em cada animal. Uma sequência de algoritmos do programa KS300 software foi elaborada para o processamento das imagens, segmentação, definição das condições de morfometria e contagem dos núcleos (CALIARI, 1997). As técnicas de processamento de imagens foram aplicadas para evidenciar os núcleos das células. Através da segmentação, foram selecionados os pixels dos núcleos de todos os tipos celulares presentes no miocárdio atrial e excluídos aqueles do citoplasma celular e de outras estruturas do corte histológico. Mediante este processo, foi criada uma imagem binária e contados os núcleos de todos os tipos celulares presentes no miocárdio atrial. A contagem obtida nos animais controles foi considerada como o padrão normal de celularidade do miocárdio atrial, sem infiltrado inflamatório. Já nos animais infectados, foram contados os núcleos dos tipos celulares normalmente presentes no miocárdio atrial e os núcleos dos leucócitos recrutados no processo inflamatório, permitindo a avaliação quantitativa da inflamação como previamente descrito (MALTOS *et al.*, 2004; PACHECO *et al.*, 2008; GUEDES *et al.*, 2009; BORGES *et al.*, 2009; MENDES *et al.*, 2010).

4.8 Quantificação dos motivos CpG no genoma das cepas de *T. cruzi*

4.8.1 Hibridação dos DNAs genômicos de cada uma das cepas de *T. cruzi* com sequências gênicas localizadas em regiões enriquecidas com motivos CpG

Foi feita a quantificação relativa de genes que se co-localizam com sequências imunoestimulatórias no genoma das cepas CL Brener, Y e Colombiana, por dot blot. Diferentes quantidades de DNA genômico de cada cepa foram aplicadas em membrana Hybond-N+ (GE Healthcare) usando um aparato do tipo slot-plot (Híbrido-dot Manifold - LifeTechnologies, Inc., USA). O DNA foi desnaturado em solução 1,5 M NaCl/0,5M NaOH por 10 minutos e procedeu-se a neutralização em solução 1 M NaCl/0,5 M TrisCl, pH 7.0 por 5 minutos. O DNA foi então fixado à membrana irradiando-a com luz ultravioleta no aparelho UV STRATALINKER[®] (STRATAGENE) de acordo com as instruções do fabricante e a membrana foi estocada a -20°C até o momento do uso. Procedeu-se à marcação radioativa das sequências usadas como sonda (região codificadora do gene DGF-1 (dispersed gene Family -1) e região 3'UTR da família multigênica MASP) conforme se segue. Os fragmentos foram radioativamente marcados com [α -³²P]dCTP (3.000 Ci/mmol, da Amersham/Pharmacia) pela técnica de *random priming* utilizando-se os kits de marcação *Megaprime DNA labelling system* (GE Healthcare), conforme recomendado pelos fornecedores. Após a marcação, as reações foram bloqueadas com 2 μ l de EDTA 0,2 mol/l pH 8,0 e o DNA foi separado dos nucleotídeos não incorporados por fracionamento em coluna Sephadex G-50, previamente empacotada em seringa de 1 ml e equilibrada com 2 vezes o volume com tampão TE ou em colunas Sephadex G-50 pré-empacotadas (*Nick Columns* -Pharmacia/Amersham). As membranas foram então pré-hibridizadas, por 2 h a 42°C sob agitação moderada, em solução contendo formamida a 50% (v/v); SSC 6X; Denhardt's 10X; SDS a 0,2% e DNA de esperma de salmão a 100 μ g/ml. O volume da solução de pré-hibridização foi de 0,2 ml de solução por cm² de membrana. Após a pré-hibridização, a sonda purificada, previamente desnaturada a 100°C durante 5 minutos, foi adicionada à solução

de hibridização (mesma composição da solução de pré-hibridização). As membranas foram incubadas a 42°C por 12 a 14 h e lavadas rapidamente em solução de SSC 2X e SDS 0,2% à TA e duas vezes durante 30 minutos a 60°C. Procedeu-se então, à exposição da membrana no aparelho Typhoon 9.400 (GE Healthcare).

4.8.2 Perfil de motivos CpG em diferentes cepas de *T. cruzi*

4.8.2.1 Sequenciamento dos genomas das cepas Y e Colombiana

O sequenciamento das cepas Y e Colombiana foram realizados no LNCC (Laboratório Nacional de Ciência da Computação) em colaboração com o grupo da Dra. Ana Tereza Vasconcelos. O genoma de outras duas cepas (Arequipa e CL-14) também foram sequenciados. Bibliotecas “shotgun” foram construídas a partir do DNA genômico conforme descrito no protocolo da 454 ROCHE. Resumidamente o material foi fragmentado e ligado a adaptadores específicos, os quais foram utilizados nas etapas posteriores. Em seguida, foram feitas as reações de amplificação das bibliotecas em microesferas (emPCR), com subsequente preparação das microesferas contendo o material amplificado para o sequenciamento na plataforma 454. Os genomas das demais cepas (CL Brener, Tulahuén, Esmeraldo e Sylvio) foram obtidos no banco de dados *Read Achieve* do NCBI (National Center for Biotechnology Information).

4.8.2.2 Quantificação dos motivos CpG DNA no genoma de cada uma das cepas.

Motivos CpG classe B de camundongo previamente identificados na cepa CL Brener como imunoestimulatórios (BARTHOLOMEU *et al.*, 2008) foram pesquisados em ambas as fitas das *reads* não montadas de cada genoma usando o algoritmo fuzznuc (Emboss package). Para estimar o

número de cada motivo por genoma haplóide, o número total dos motivos foram normalizados pela cobertura de cada genoma. Para estimar a cobertura de cada genoma, calculou-se a cobertura média de cada nucleotídeo derivados de genes cópias simples de CL Brener identificados usando o programa OrthoMCL (LI *et al.*, 2003).

4.8.2.3 Agrupamento das cepas de *T. cruzi* com padrão similar de motivos CpG

Para identificar grupos de cepas com padrão similar de motivos CpG foi utilizado o método de agrupamento hierárquico utilizando a biblioteca Pvcust (SUZUKI e SHIMODAIRA, 2006) implementada na plataforma R (R Development Core Team, 2011). Inicialmente foi gerada uma matriz de distância estimada pela distância euclidiana entre cada par de cepas de *T. cruzi* baseada na quantidade de diferentes motivos CpG. O dendograma foi gerado utilizando o método de “complete linkage”. A contagem de diferentes motivos CpGs também foi comparada entre os DTUs de *T. cruzi* utilizando o teste one-way implementados no software GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Inc.).

4.9 Análises estatísticas

O teste t Student e o ANOVA foram utilizados para analisar a significância das diferenças das médias entre os grupos experimentais. As curvas de sobrevivência foram geradas utilizando o método de KaplanMeier e a significância das diferenças foi calculada pelo teste log-rank. Significância estatística foi definida pelo $p < 0,05$. Os outliers foram detectados utilizando-se o Teste de Grubbs.

4.10 Comitê de Ética em Experimentação Animal

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA). Todos os procedimentos com animais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da Universidade Federal de Minas Gerais (Protocolo # 92/2009), conforme certificado apresentado no ANEXO 1, e foram realizados seguindo as normas do Colégio Brasileiro em Experimentação animal (COBEA), de acordo com a lei 11.794/2008 que estabelece procedimentos para o uso científico de animais.

5 RESULTADOS

5.1 TLR9 desempenha papel mais importante na resistência à infecção pelas cepas Y e CL Brener de *T. cruzi* quando comparado com a infecção causada pela cepa Colombiana.

Para determinar a possibilidade de haver diferenças na importância e influência de TLR9 no controle de parasitemia em cepas de *T. cruzi* pertencentes a diferentes linhagens evolutivas, nós infectamos camundongos selvagens (WT) e TLR9^{-/-}, com formas tripomastigotas sanguíneas das cepas Colombiana (*T. cruzi* I), Y (*T. cruzi* II) e CL Brener (cepa híbrida, *T. cruzi* VI). Vale ressaltar que estas cepas apresentam padrões de parasitemia bastante distintos em animais experimentalmente infectados, mas não se sabe se são capazes de ativar diferencialmente o sistema imune inato do hospedeiro via TLR9. Uma vez que estas cepas apresentam em camundongos níveis de parasitemia e virulência distintos e o objetivo era avaliar a diferença de susceptibilidade dos animais WT e TLR9 para cada cepa, os animais foram infectados com diferentes inóculos: 50, 100 e 500 formas tripomastigotas sanguíneas, para Colombiana, Y e CL Brener, respectivamente. Os animais foram em seguida monitorados quanto à parasitemia e sobrevivência. Como mostrado na FIGURA 6, o padrão de parasitemia apresentado por animais infectados com essa a cepa Y é rápido e curto, com o pico ocorrendo no 10° dia após a infecção, onde foram verificadas diferenças estatisticamente significativas entre as parasitemias dos animais WT e TLR9^{-/-}. Encontramos também diferenças na taxa de sobrevivência, sendo que todos os camundongos TLR9^{-/-} morreram até o 20° dia após infecção, enquanto que 70% dos animais WT infectados sobreviveram até o final do experimento (40 dias após a infecção). Diferenças mais pronunciadas em relação à parasitemia foram verificadas nos camundongos infectados com a cepa CL Brener (FIGURA 7), tendo sido encontradas diferenças estatisticamente significativas ao longo da curva de parasitemia, enquanto que a taxa de sobrevivência dos camundongos WT e TLR9^{-/-} apresentou um perfil muito parecido daquele obtido na infecção com a cepa Y. Em contrapartida, o mesmo padrão não foi

observado para os camundongos infectados com a cepa Colombiana. O pico no número de parasitos no sangue dos animais infectados com essa cepa ocorreu no 43° dia após a infecção, onde não verificamos diferenças estatisticamente significativas. As curvas de parasitemia nos animais WT e TLR9 $-/-$ foram muito parecidas tendo sido observadas diferenças estatisticamente significativas apenas no 51° dia após infecção. Além disso, não houve diferença estatisticamente significativa entre as curvas de sobrevivência entre os dois grupos de animais infectados com esta cepa (FIGURA 8).

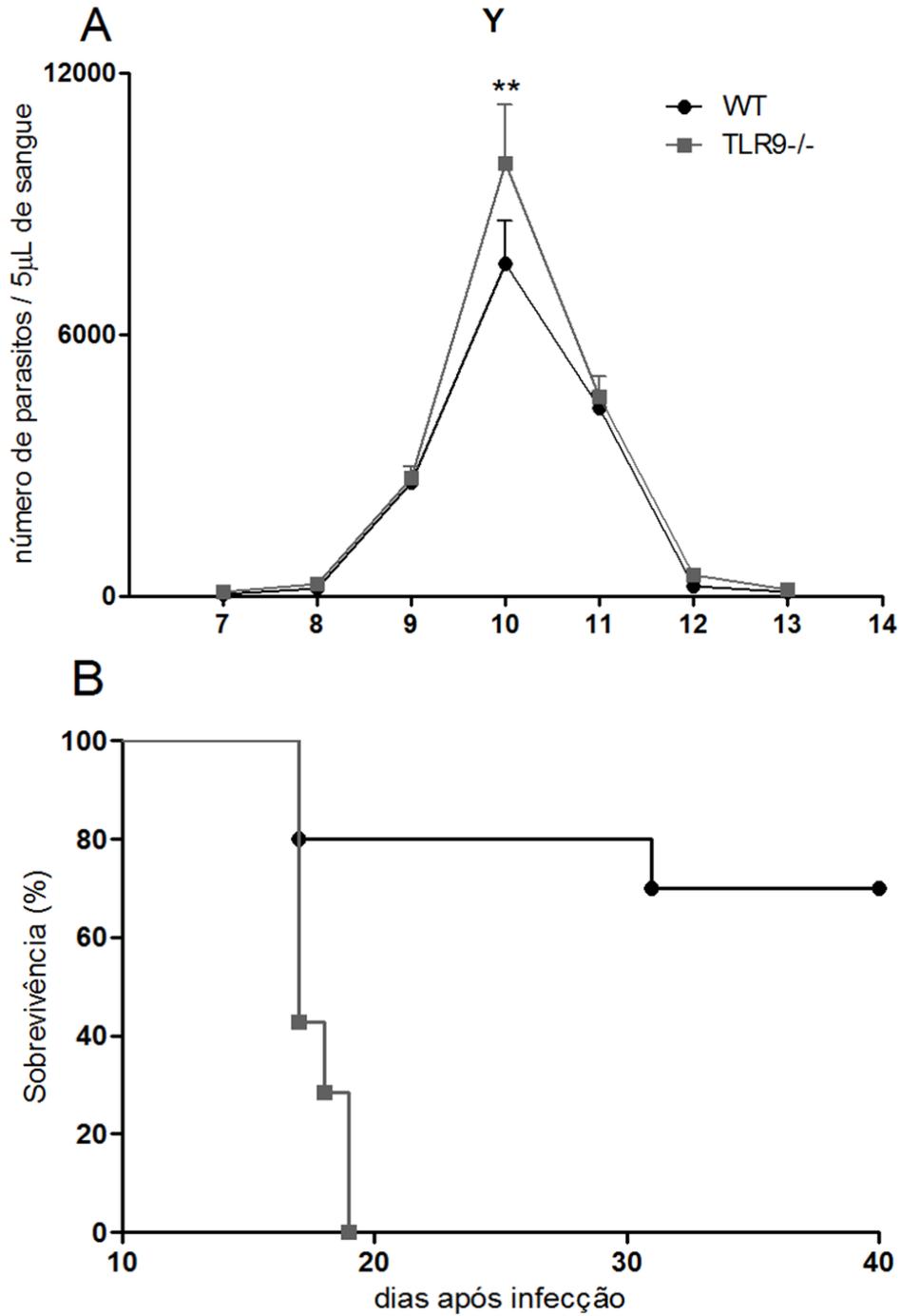


FIGURA 6 - Curva de parasitemia e sobrevivência de camundongos WT e TLR9-/- infectados com 100 formas tripomastigotas da cepa Y de *T. cruzi*. A, mostra a curva de parasitemia. Análises estatísticas mostraram diferenças significativas no 10º dia pós-infecção (**, $p < 0,01$), entre os camundongos WT e TLR9-/- . B, curva de sobrevivência, mostrando claramente a influência de TLR9 para a sobrevivência dos animais ($p = 0,0015$).

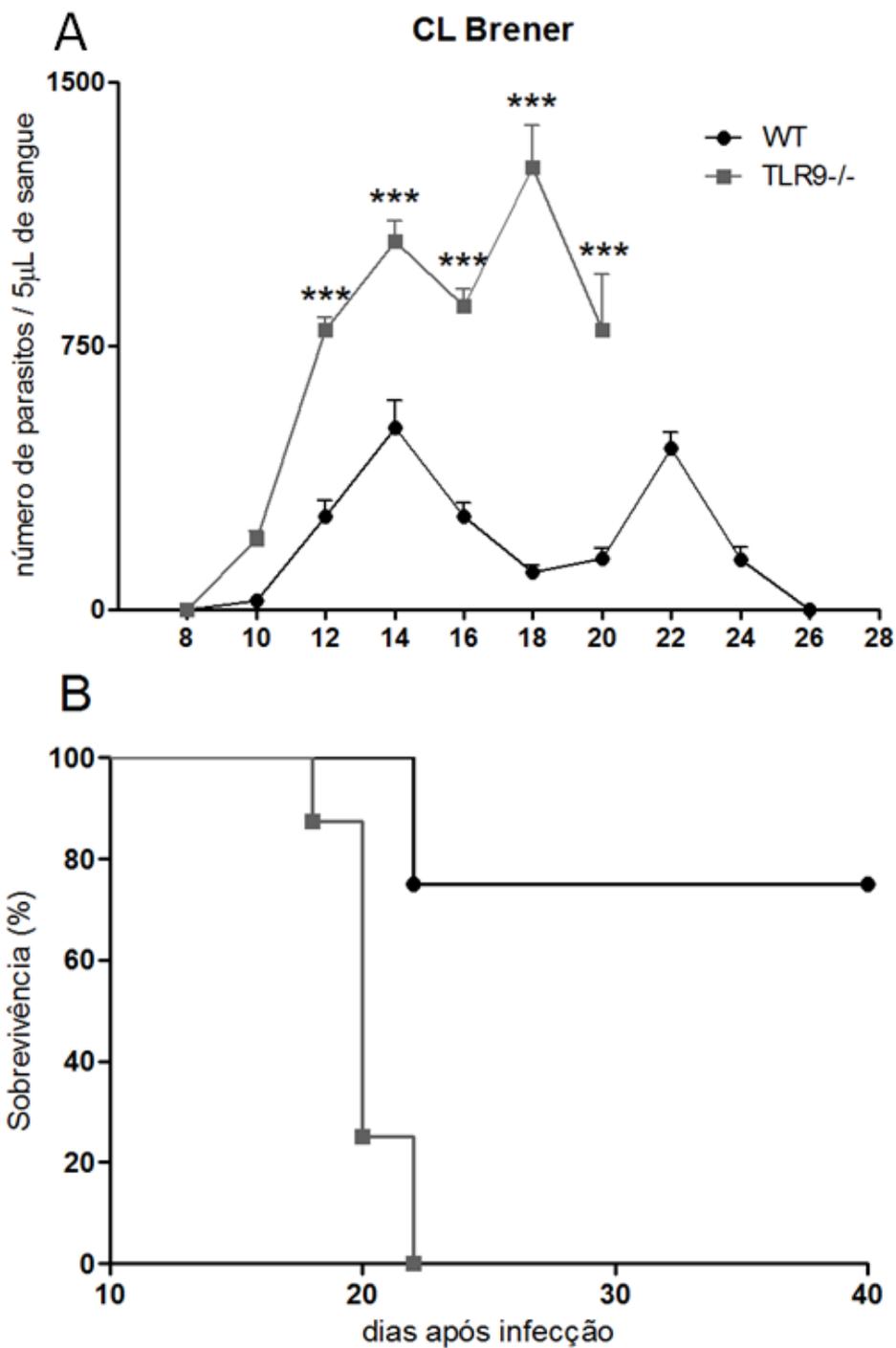


FIGURA 7 - Curva de parasitemia e sobrevivência de camundongos WT e TLR9-/- infectados com 500 formas tripomastigotas da cepa CL Brener de *T. cruzi*. A, mostra a curva de parasitemia avaliada em intervalos de 2 em 2 dias. Análises estatísticas mostraram diferenças estatísticas significativas nos dias 12, 14, 16, 18 e 20, na parasitemia entre os grupos (***, $p < 0,01$). B, mostra curva de sobrevivência, onde análises estatísticas mostraram que os camundongos TLR9-/- apresentam maior susceptibilidade quando comparados aos camundongos WT, mostrando aceleração da mortalidade ($p = 0,0005$).

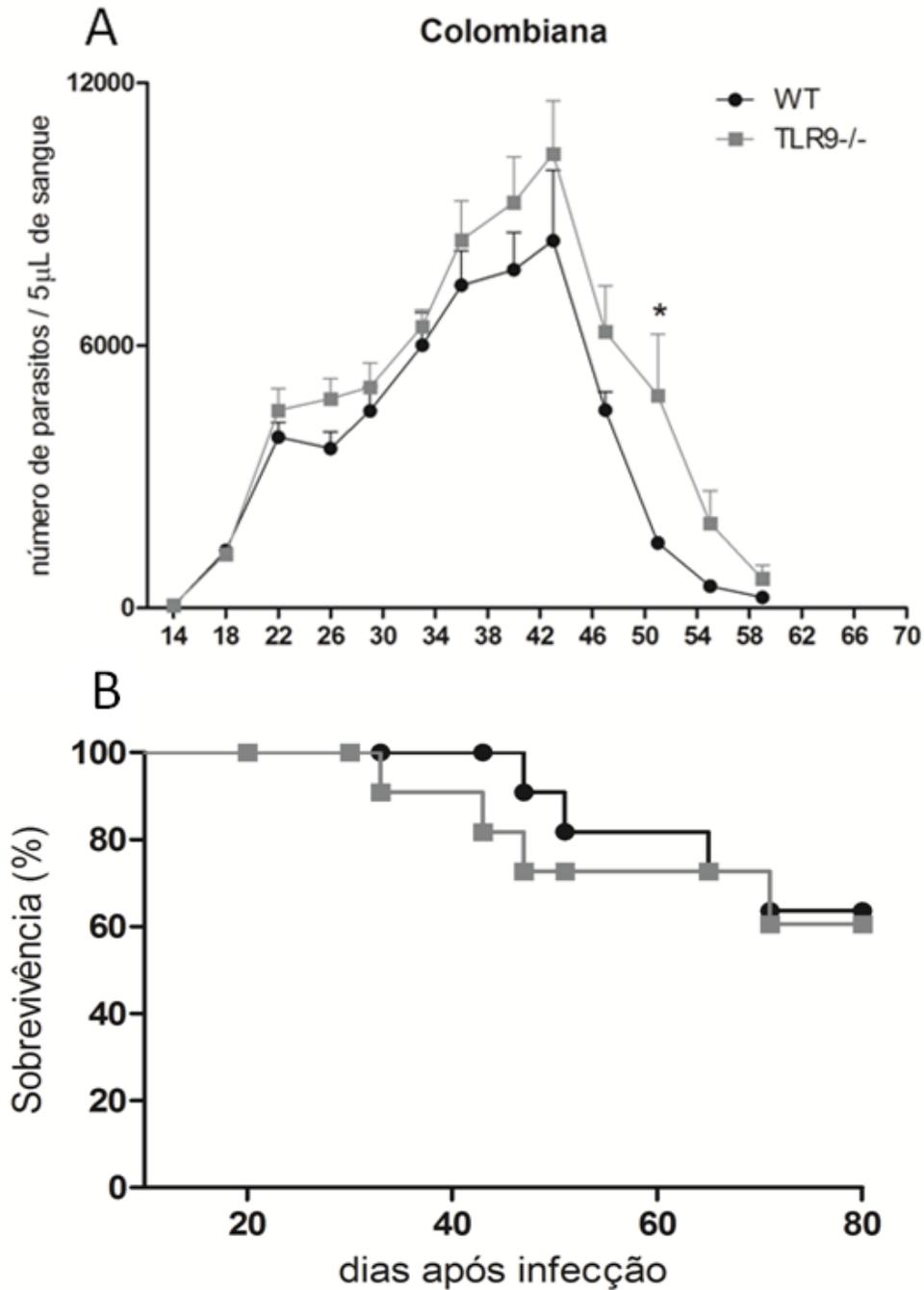


FIGURA 8 - Curva de parasitemia e sobrevivência de camundongos WT e TLR^{-/-} infectados com 50 formas tripomastigotas da cepa Colombiana de *T. cruzi*. A, mostra a curva de parasitemia avaliada em intervalos de 4 e 4 dias. Foram observadas diferenças estatisticamente significativas apenas no 51° dia após infecção (*, $p < 0.05$) entre os camundongos WT e TLR^{-/-} na infecção por essa cepa. B, representa a curva de sobrevivência, onde os animais foram acompanhados a cada dois dias. Não foi observada diferença estatística entre as curvas de mortalidade dos camundongos WT e TLR^{-/-} infectados com esta cepa.

5.2 Ativação de células da imunidade inata pelo DNA genômico das diferentes cepas de *T. cruzi*

Uma vez que observamos diferenças marcantes na parasitemia e mortalidade em animais WT e TLR9 ^{-/-} infectados com as diferentes cepas, avaliamos então a capacidade imunoestimulatória do DNA genômico destas cepas. Formas epimastigotas mantidas em cultura foram utilizadas para extrair o DNA genômico de cada uma das cepas de *T. cruzi*. Estas culturas foram monitoradas quanto a contaminação por *Mycoplasma spp.*, (TIMENETSKY *et al.*, 2006) por PCR, sendo verificadas sempre antes da extração de DNA ser feita, a fim de detectar qualquer possibilidade de contaminação, evitando assim utilizar amostras de DNA contendo sequências de bactéria que são sabidamente imunoestimulatórias. Após a realização da PCR com iniciadores específicos do gênero *Mycoplasma*, o produto foi fracionado em gel de agarose, por eletroforese e um gel representativo está exemplificado na FIGURA 9.

O DNA extraído de cada uma das cepas foi quantificado em espectrofotômetro como descrito anteriormente, sendo essas quantidades certificadas também por eletroforese em gel de agarose (FIGURA 10) para maior confiabilidade nas quantidades de DNAs a serem utilizadas nos ensaios imunoestimulatórios. Esse foi considerado um ponto crítico, pois, a utilização das mesmas quantidades de cada uma das preparações de DNA nos ensaios imunoestimulatórios, nesse ponto do trabalho, era totalmente necessária.

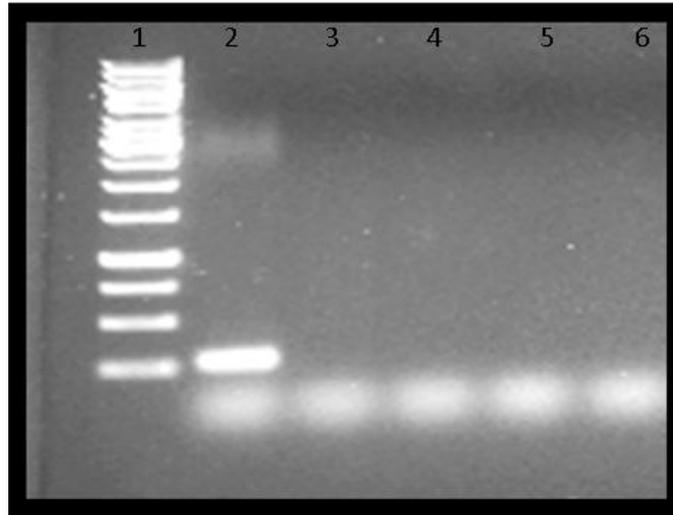


FIGURA 9 - Análise de PCR negativa para *Mycoplasma spp.*. Eletroforese em gel de agarose 1%, de produto de PCR utilizando iniciadores que amplificam uma região da subunidade 16S do rRNA de *Mycoplasma spp.*. Coluna 1, marcador de peso molecular 1 kb (Fermentas); coluna 2, controle positivo (células Vero, sabidamente infectadas com *Mycoplasma spp.*); coluna 3, controle negativo (sem dna); colunas 4, 5 e 6, PCR das culturas de epimastigotas das cepas Y, Colombiana e CL Brener de *T. cruzi*, respectivamente, usadas na extração de DNA genômico.

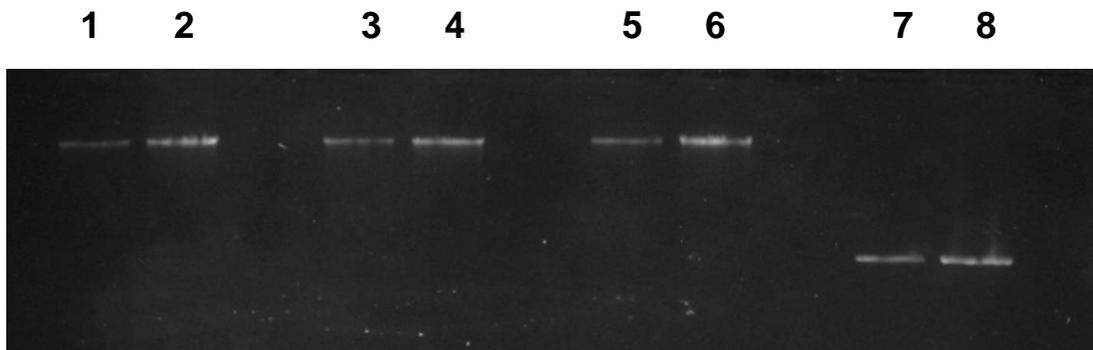


FIGURA 10 - Eletroforese em gel de agarose 0,8% para quantificação do DNA das diferentes cepas. Canaletas 1, 3 e 5 representam 50 ng de DNA genômico das cepas Y, Colombiana e CL Brener, respectivamente. Canaletas 2, 4 e 6 representam 100 ng de DNA genômico das cepas Y, Colombiana e CL Brener, respectivamente. Como controle das quantidades foram utilizados 50 ng e 100 ng do vetor pUC linearizado com a enzima *EcoRI* (canaletas 7 e 8, respectivamente).

Após a obtenção de preparações de DNA genômico de cada uma das cepas, os mesmos foram utilizados em ensaios de ativação com macrófagos e DC provenientes de camundongos WT e TLR9^{-/-}. Essas células da imunidade inata foram incubadas com diferentes quantidades de DNA genômico intacto, sonificado e digerido com a enzima de restrição *Bsp1286I*,

que apresenta sítios de restrição frequentes no genoma de *T. cruzi*, mas não corta em sequências CpG. Nesses ensaios foram utilizados como controles positivos LPS (10 ng/mL) e ODN CpG 1826 de bactéria (10 e 5 µg/mL) e, como controles negativos, somente células com meio de cultura, células primadas com IFN-γ (100 U/mL - macrófagos), DOTAP (25 µL/mL), ODN GpC, cuja sequência é idêntica ao oligonucleotídeo CpG 1826, mas com o dinucleotídeo CG invertido.

Primeiramente foram realizados ensaios utilizando preparações de DNA genômico nas concentrações de 10 µg/mL e 5 µg/mL na presença do reagente lipossomal DOTAP, com macrófagos e DC provenientes de camundongos WT, TLR9^{-/-} e TLR4^{-/-}. Utilizou-se o reagente DOTAP para otimizar a internalização e disponibilização do DNA genômico ao TLR9 (BARTHOLOMEU *et al.*, 2008). As FIGURAS 11, 12 e 13 mostram os resultados da dosagem de nitrito e IL-12p40 nos sobrenadantes das culturas, onde é mostrado a capacidade imunoestimulatória do DNA de cada uma das três cepas, CL Brener, Colombiana e Y. Porém, não encontramos diferenças estatisticamente significativas na capacidade de ativação das células usando DNA genômico das diferentes cepas. Como já esperado, os efeitos imunoestimulatórios foram totalmente abolidos nas células provenientes de camundongos TLR9^{-/-}, mostrando que o reconhecimento do DNA de *T. cruzi* é TLR9 dependente. Nesses ensaios também foram incluídas células provenientes de camundongos TLR4^{-/-} e neste caso, a ativação das células pelo DNA das cepas de *T. cruzi*, apresentou um padrão semelhante ao encontrado nas células derivadas de camundongos WT, mostrando que essas preparações dos DNAs não apresentavam contaminações com LPS.

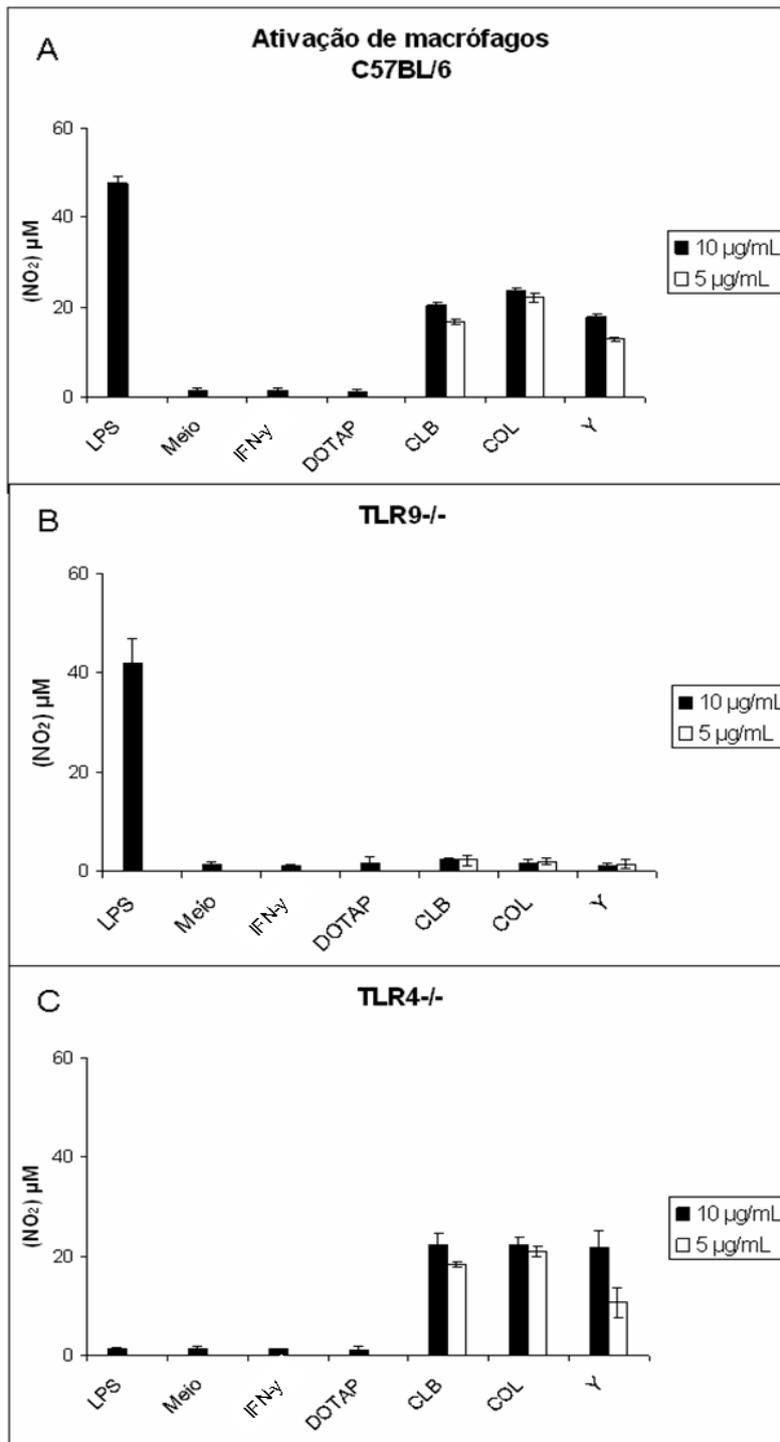


FIGURA 11 - Avaliação da produção de óxido nítrico por macrófagos estimulados com DNA genômico das diferentes cepas de *T. cruzi* (CLB, CL Brener; Col, Colombiana; e γ). DNA extraído de cada uma das cepas foi incubado com macrófagos provenientes de camundongos WT (A), TLR9^{-/-} (B) e TLR4^{-/-} (C). Os DNAs foram testados em duas concentrações (10 e 5 µg/mL) em conjunto com o reagente DOTAP (5 µL / 1 µg de DNA). LPS e CpG 1826 ODN foram utilizados como controle positivo para ativação de TLR4 e TLR9, respectivamente, e GpC ODN como controle negativo de TLR9. Nitrito foi medido no sobrenadante após 48 horas de estimulação.

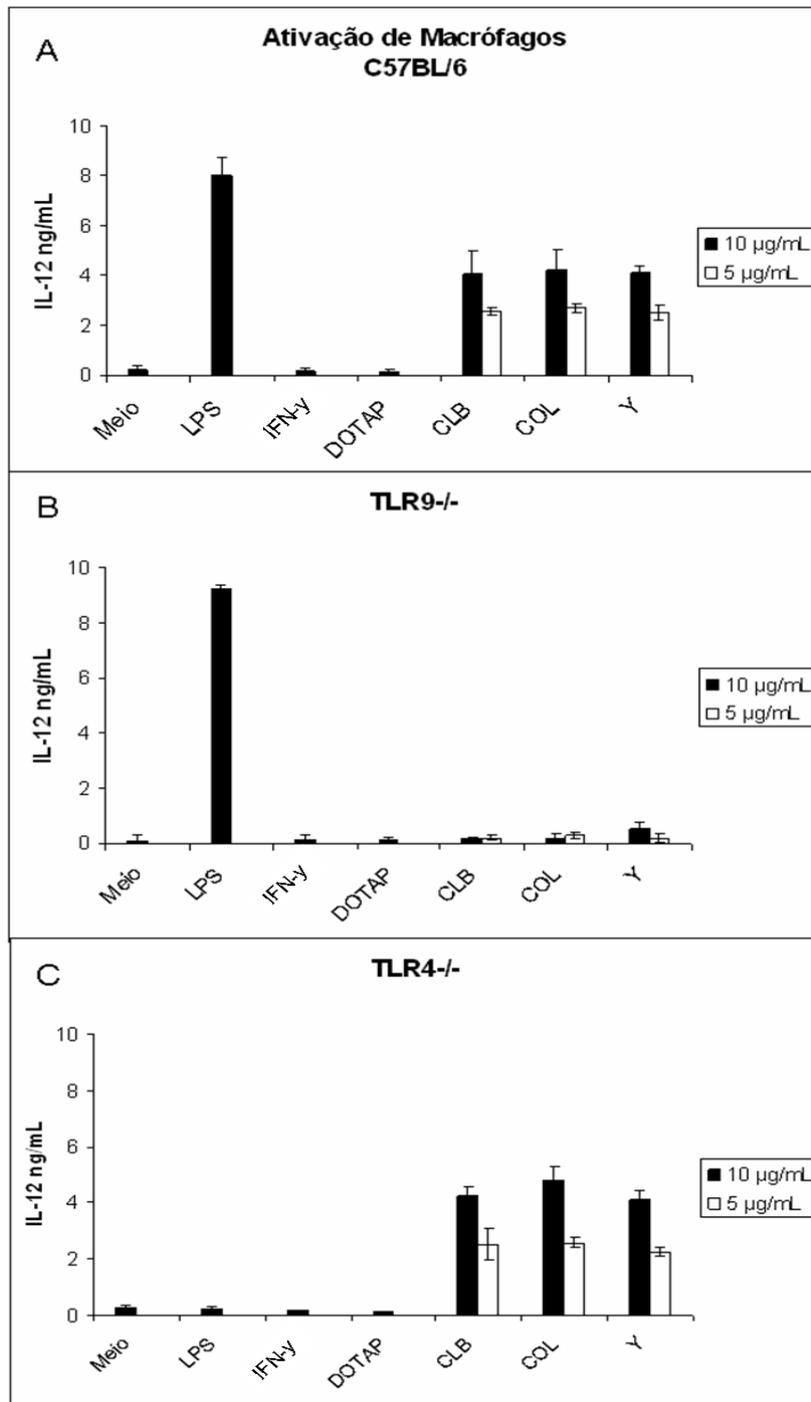


FIGURA 12 - Avaliação da produção de IL-12p40 por macrófagos estimulados com DNA genômico das diferentes cepas de *T. cruzi* (CLB, CL Brener; Col, Colombiana; e Y). DNA extraído de cada uma das cepas foi incubado com macrófagos provenientes de WT (A), TLR9^{-/-} (B) e TLR4^{-/-} (C). Os DNAs foram testados em duas concentrações (10 e 5 µg/mL) em conjunto com o reagente DOTAP (5 µL / 1 µg de DNA). LPS e CpG 1826 ODN foram utilizados como controle positivo para ativação de TLR4 e TLR9, respectivamente, e GpC ODN como controle negativo de TLR9. IL-12p40 foi medido no sobrenadante após 48 horas de estimulação.

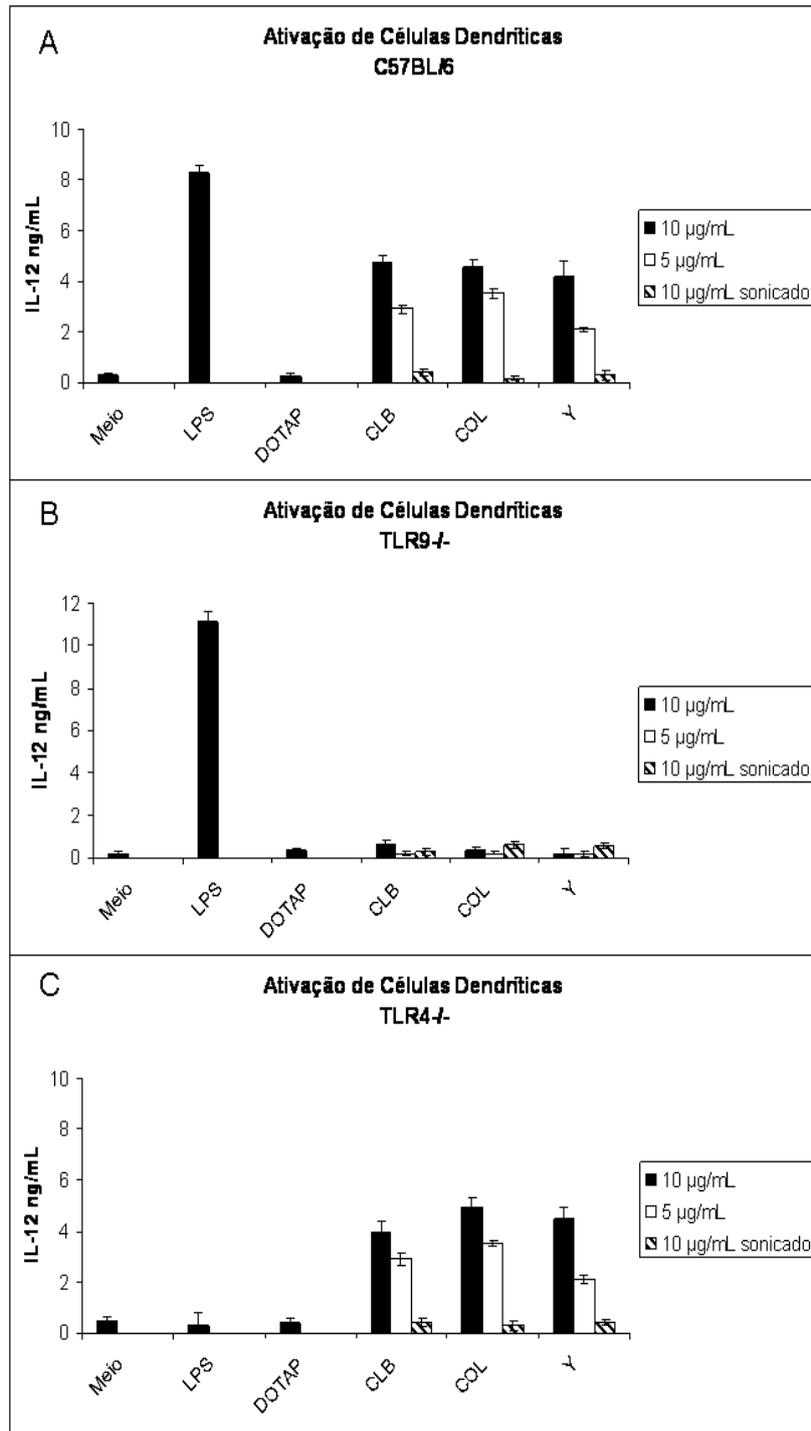


FIGURA 13 - Ativação de células dendríticas com DNA genômico (10 e 5 µg/mL) das três cepas de *T. cruzi*. DNA extraído de cada uma das cepas foi incubado com DC provenientes de camundongos WT (A), TLR9^{-/-} (B) e TLR4^{-/-} (C). Os DNAs foram testados em duas concentrações (10 e 5 µg/mL) em conjunto com DOTAP (5 µL / 1 µg de DNA). Foi utilizado também DNA sonicado (10 µg/mL). LPS e CpG 1826 ODN foram utilizados como controle positivo para ativação de TLR4 e TLR9, respectivamente, e GpC ODN como controle negativo de TLR9. IL-12p40 foi medido no sobrenadante após 48 horas de estimulação.

Realizamos também ensaios de macrófagos e DCs incubados com DNA genômico digerido por enzima de restrição. Recentemente, YASUDA e colaboradores (2009) demonstraram que DNA livre de CpG pode ativar TLR9 se os fragmentos de DNA forem internalizados por transfecção de lipossomas com DOTAP. Isso possivelmente ocorre devido à alta concentração de fragmentos de DNA que são entregues ao TLR9 intracelular, numa internalização mediada por DOTAP. Como este reagente foi utilizado nos nossos experimentos, levantou-se a hipótese de que talvez por isso não tenhamos detectado diferenças na ativação das células do sistema imune inato, com preparações de DNA genômico das diferentes cepas. Como alternativa ao uso do DOTAP, optou-se por fragmentar enzimaticamente as amostras de DNA genômico a fim de obtermos moléculas de pequenos tamanhos para favorecer a internalização por macrófagos e células dendríticas. Em uma pesquisa *in silico*, rastreou-se todo o genoma montado da cepa CL Brener à procura de uma enzima que tivesse uma maior frequência de corte no genoma, mas que não fizesse cortes dentro dos motivos CpG DNA imunoestimulatórios. Selecionou-se a enzima de restrição *Bsp1286I* purificada de *Bacillus spaericus* que reconhece a sequência G(AGT)GC(ACT)↓C, estando entre parênteses os nucleotídeos alternativos para a posição. Esta enzima apresentou maior número de sítios de restrição (~150 mil) no genoma, gerando sequências de tamanho médio de 450 pb. Essa fragmentação do DNA facilita a entrada do DNA dentro da célula e conseqüentemente a oferta de agonistas de TLR9.

Após a digestão (FIGURA 14), incubamos os DNAs digeridos, em três concentrações (10, 20 e 30µg/mL), em ensaios imunoestimulatórios com macrófagos. Os resultados das dosagens de nitrito e IL-12p40 estão representados na FIGURA 15. Novamente, mesmo com a digestão, não encontramos diferenças estatisticamente significativas na capacidade imunoestimulatória entre as preparações de DNA das cepas de *T. cruzi*.

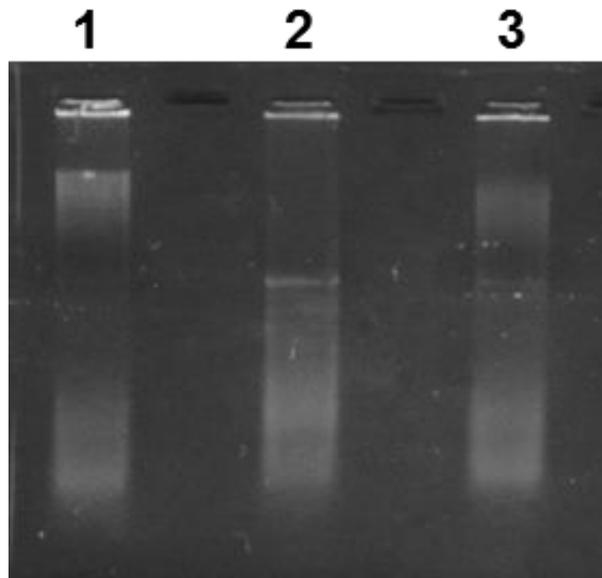


FIGURA 14 - Eletroforese em gel de agarose 1,2% para verificação da digestão dos DNAs genômicos das cepas de *T. cruzi*, utilizando a enzima *Bsp1286I*. Coluna 1, 2 e 3 representam DNAs digeridos das cepas CL Brener, Colombiana e Y, respectivamente.

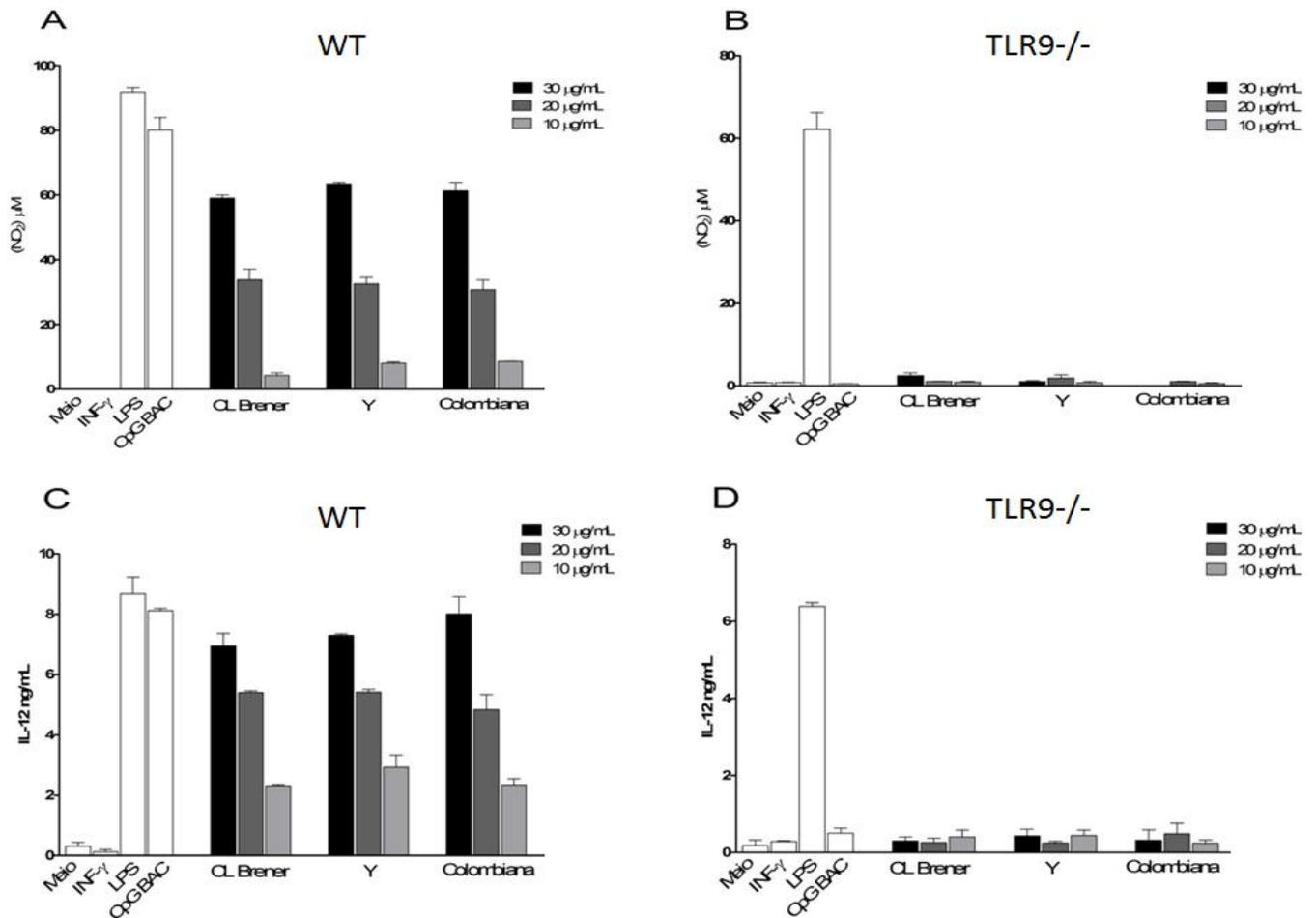


FIGURA 15 - Avaliação da produção de NO e IL-12p40 por macrófagos estimulados com DNA genômico das diferentes cepas de *T. cruzi* (CLB, CL Brener; Col, Colombiana e Y). DNA genômico de cada uma das cepas digerido com a enzima de restrição *Bsp1286I* foi incubado com macrófagos provenientes de camundongos WT (A, C) e TLR9^{-/-} (B, D). Os DNAs foram testados nas concentrações de 30, 20 e 10 µg/mL, e LPS e CpG 1826 ODN foram utilizados como controle positivo para ativação de TLR4 e TLR9, respectivamente, e GpC ODN como controle negativo de TLR9. Nitrito e IL-12p40 foram medidos no sobrenadante após 48 horas de estimulação.

5.3 Tripomastigotas vivas das cepas Y e CL Brener apresentam uma maior ativação TLR9-dependente de DC com quando comparado com a cepa Colombiana.

Uma vez que, usando as mesmas quantidades de DNA, não foi possível detectar diferenças na capacidade estimulatória do DNA genômico das diferentes cepas do *T. cruzi*, nós realizamos ensaios de ativação de macrófagos e DC provenientes de camundongos WT e TLR9^{-/-} incubados com o mesmo número de formas tripomastigotas vivas das diferentes cepas de *T. cruzi*. Foram utilizadas nesses experimentos formas tripomastigotas vivas mantidas em cultura. As quantidades de tripomastigotas utilizadas foram de 20 e 10 formas do parasito para cada célula hospedeira (DC). Após ativação por 24 horas, o sobrenadante foi coletado e foram feitas as dosagens de IL-12p40 e TNF- α . Os resultados dessas dosagens mostram que as tripomastigotas induziram a produção de ambas citocinas pro-inflamatórias (FIGURA 16, A e C). Mais importante, a razão entre a produção das citocinas nas DCs provenientes dos dois grupos de camundongos foi sempre menor para as tripomastigotas de Colombiana do que os parasitos das outras cepas (Figura 16, B e D). Como já mencionado, é sabido que as formas tripomastigotas de *T. cruzi* possuem vários PAMPs capazes de ativar diferentes TLRs em DCs murinas, por esse motivo, para estimarmos a ativação somente do TLR9, nós analisamos a razão da ativação de DC provenientes de camundongos WT e TLR9^{-/-}. Estes resultados corroboram a hipótese de que a cepa Colombiana possui menores quantidades de motivos CpG em seu genoma, quando comparadas as cepas CL Brener e Y e sugerem possíveis diferenças no tamanho dos genomas das três cepas.

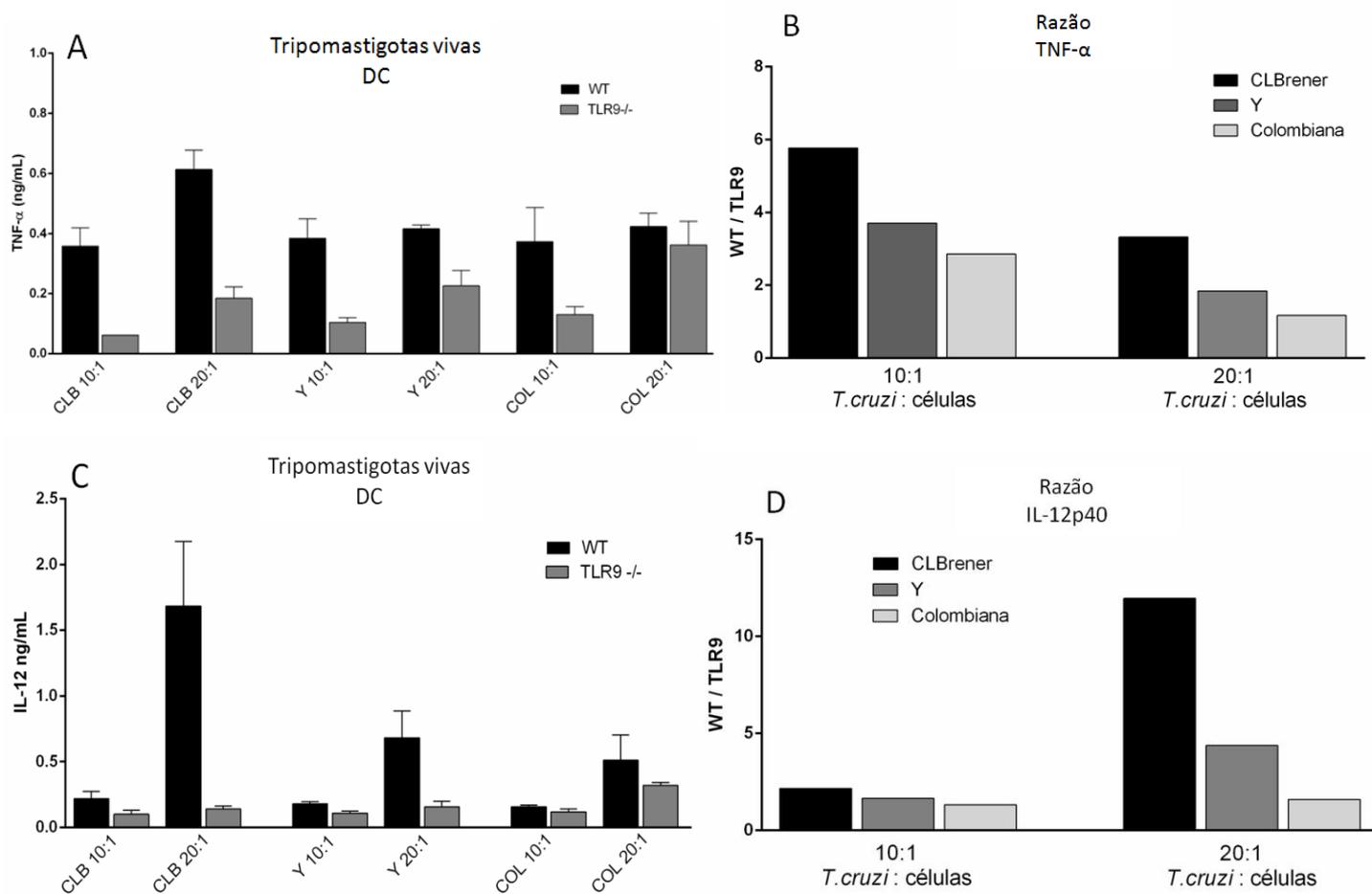


FIGURA 16. Avaliação da produção de TNF- α e IL-12p40 por DC estimuladas com tripomastigotas vivas de cada uma das cepas de *T. cruzi*. As formas tripomastigotas foram incubadas com DC provenientes de camundongos WT e TLR9^{-/-}. As tripomastigotas foram utilizadas em duas quantidades (relação célula:tripomastigota, 10:1 e 20:1). LPS e CpG 1826 ODN foram utilizados como controle positivo, e GpC ODN como controle negativo de TLR9 (dados não mostrados). TNF- α (A) e IL-12p40 (C) foram medidos no sobrenadante após 24 horas de estimulação. Em B e D, estão representadas a razão entre a produção das citocinas de células provenientes de camundongos WT e TLR9^{-/-}.

5.4 O perfil de citocinas no soro de camundongos infectados com as cepas Y e CL Brener difere daquele obtido com a cepa Colombiana

A etapa seguinte deste trabalho foi avaliar se a infecção de camundongos WT e TLR9 $-/-$ com as diferentes cepas de *T. cruzi* induzem níveis variáveis de citocinas plasmáticas. Para tanto camundongos TLR9 $-/-$ (n=10) e WT (n=10) foram infectados com as diferentes cepas do parasito e parasitemia desses animais foi monitorada. As coletas de sangue para dosagem das citocinas foram realizadas em pontos específicos para cada uma das cepas, de acordo com o padrão de parasitemia apresentado por cada uma delas (FIGURAS 6, 7 e 8). As citocinas IL-6, MCP-1, IFN- γ e TNF foram dosadas por CBA (FIGURA 17), e a citocina IL-12p70 foi quantificada por ELISA (FIGURA 18).

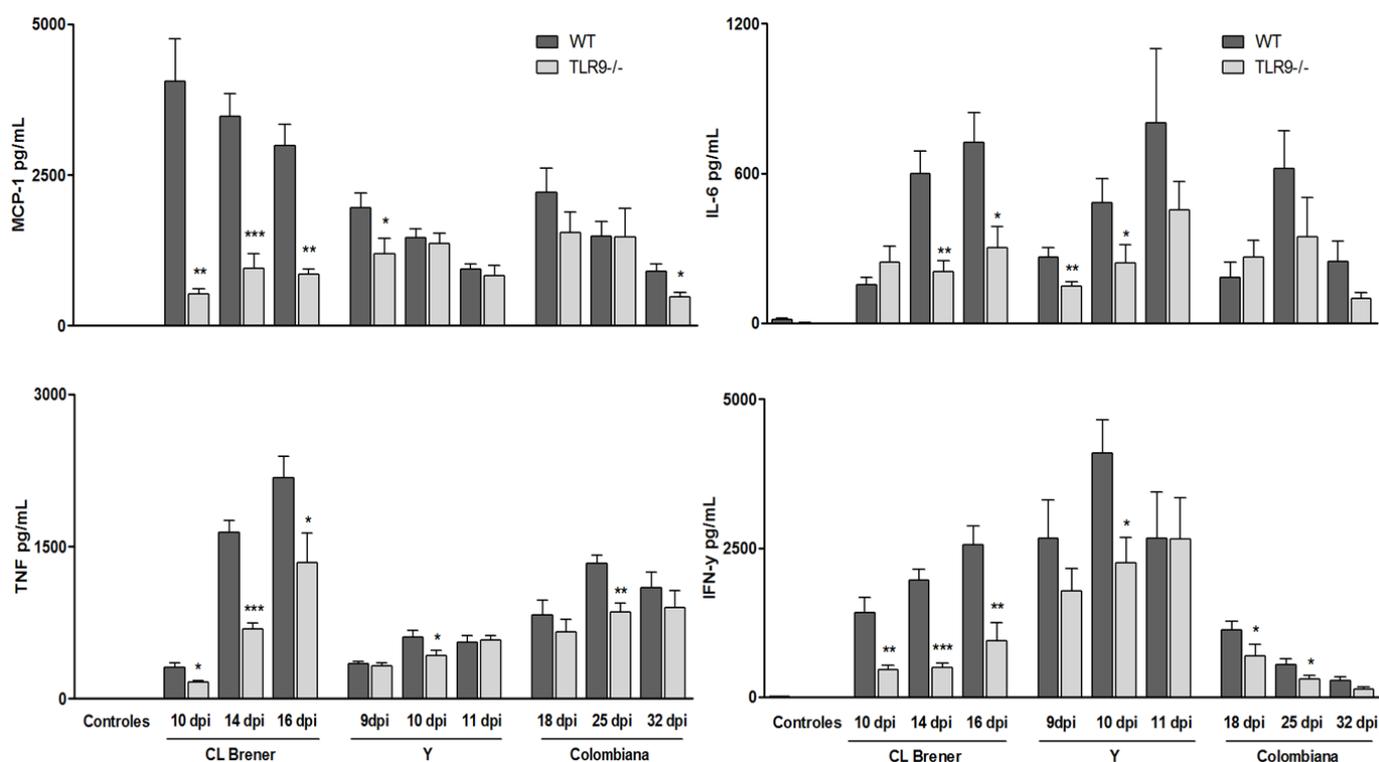


FIGURA 17. Perfil de citocinas no soro de camundongos infectados com as diferentes cepas de *T. cruzi*. Camundongos WT e TLR9 $-/-$ foram infectados com as cepas CL Brener, Y e Colombiana com o inóculo de 500, 100 e 50 formas tripomastigotas, respectivamente. As citocinas foram dosadas no soro dos camundongos infectados nos dias 10, 14 e 16 após a infecção com a cepa CL Brener, 9, 10 e 11 para a cepa Y, e nos dias 18, 25 e 32 após a infecção com a cepa Colombiana. As citocinas dosadas foram IL-6, IFN- γ , TNF e MCP-1 pelo método de CBA, sendo as barras cinza escuras representando a produção em animais WT e mais claras no soro de animais TLR9 $-/-$. As diferenças estatísticas entre os animais WT e TLR9 $-/-$ infectados com as mesmas cepas nas determinadas datas, estão representadas através de * (*, p<0,05; **, p<0,01; ***, p<0,001).

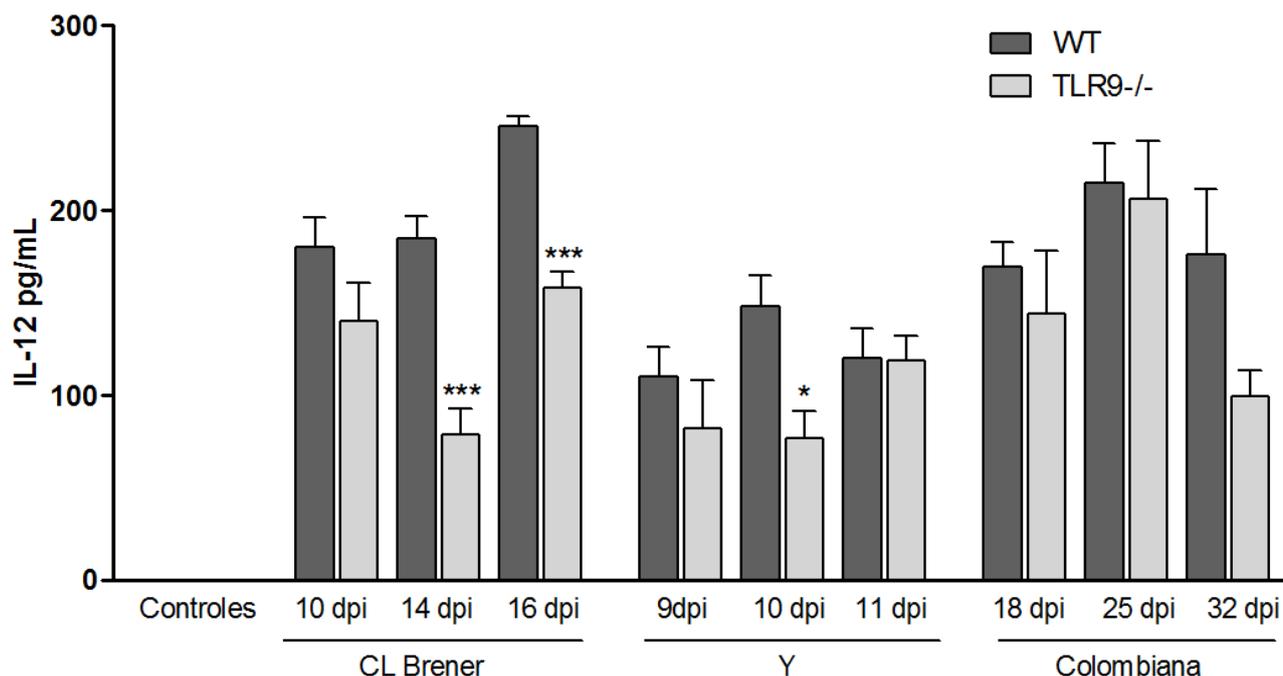


FIGURA 18. Produção da citocina IL-12p40 no soro de camundongos infectados com as diferentes cepas de *T. cruzi*. Camundongos WT e TLR9^{-/-} foram infectados com as cepas CL Brener, Y e Colombiana com o inóculo de 500, 100 e 50 formas tripomastigotas, respectivamente. As citocinas foram dosadas no soro dos camundongos infectados nos dias 10, 14 e 16 após a infecção com a cepa CL Brener, 9, 10 e 11 para a cepa Y, e nos dias 18, 25 e 32 após a infecção com a cepa Colombiana. A citocina IL-12p40 foi dosada pelo método de ELISA, sendo as barras cinza escuras representando a produção em animais WT e mais claras no soro de animais TLR9^{-/-}. As diferenças estatísticas entre os animais WT e TLR9^{-/-} infectados com as mesmas cepas nas determinadas datas, estão representadas através de * (*, p<0,05; ***, p<0,001).

Nos animais infectados com a cepa CL Brener, as dosagens das citocinas foram realizadas nos dias 10, 14 e 16 após a infecção, que correspondem aos pontos antes, durante e após o primeiro pico de parasitemia desta cepa. Além disso, nestes pontos vimos diferenças entre os níveis de parasitemia entre os animais WT e TLR9^{-/-}, sendo que a mortalidade dos animais *knockout* começou a ocorrer apenas após esta data. Na infecção com esta cepa, nas quantificações das citocinas IL-12, TNF- α , IFN- γ , e IL-6, notamos que ocorreu um aumento da produção em animais WT, com o decorrer da infecção, sendo que a quantidade de citocinas TNF- α e IFN- γ presentes no soro dos animais WT infectados foi significativamente maior do que nos camundongos TLR9^{-/-}, mostrando um decréscimo na produção de citocinas por parte desses animais. Na avaliação da produção de IL-6 e IL-12 no soro, vimos diferenças estatisticamente significativas somente nos dias 14 e 16 após a infecção, novamente com animais TLR9^{-/-} apresentando uma menor produção. A quimiocina MCP-1 foi encontrada em grande quantidade no soro,

porém a sua maior produção ocorreu no dia 10 após a infecção com CL Brener, havendo uma queda da produção com o decorrer da infecção. Na dosagem desta quimiocina também encontramos diferenças entre a produção de camundongos WT e TLR9^{-/-}, com os animais deficientes apresentando menores níveis.

Os animais infectados com a cepa Y foram avaliados quanto à produção de citocinas no soro nos dias 9, 10 e 11 após a infecção. Assim como para a cepa CL Brener, selecionou-se pontos antes, durante e após o pico de parasitemia com esta cepa. No 10° dia após a infecção, ou seja, no pico de parasitemia, foram verificadas diferenças entre animais WT e TLR9^{-/-} com relação à produção de IL-6, TNF- α , IFN- γ e IL-12. A produção de TNF- α , IFN- γ e IL-12 aumentou do 9° para o 10° dia, e diminuiu em sequência na dosagem no 11° dia após a infecção nos animais WT infectados com a cepa Y, padrão este que coincide com os níveis de parasitos no sangue. O mesmo não ocorreu na dosagem no soro dos animais TLR9^{-/-}, que mostrou um aumento da produção na decorrência da infecção. Com relação à produção de MCP-1, as dosagens revelaram novamente que com o decorrer da infecção existe uma queda na produção dessa quimiocina, tanto em animais WT e TLR9^{-/-}, sendo encontradas diferenças estatisticamente significativas entre estes animais no 9° dia após a infecção.

Por fim, foram realizadas dosagens de citocinas no soro dos camundongos WT e TLR9^{-/-} infectados com a cepa Colombiana. As coletas de soro ocorreram em intervalos maiores do que para as cepas anteriores, pelo fato dos animais infectados com a cepa Colombiana apresentarem um padrão de parasitemia mais tardio e prolongado, demorando cerca de 2 meses para completo declínio do número de parasitos circulantes. As dosagens ocorreram no 18°, 25° e 32° após a infecção. As dosagens no soro das citocinas IL-6, TNF- α e IL-12 mostraram um aumento da produção do 18° para o 25° dia e uma posterior queda no 32° dia. Na dosagem de TNF- α , encontrou-se diferenças entre os grupos WT e TLR9^{-/-} somente no 25° dia após a infecção. A produção de MCP-1, como ocorreu na infecção das outras infecções com as outras duas cepas, apresentou queda dos níveis com o passar da infecção, sendo encontrada diferença estatística entre os animais WT e TLR9^{-/-} somente no 32° dia após a infecção. Entretanto, os níveis de IFN- γ no soro, dos animais

WT e TLR9^{-/-} infectados com Colombiana, foram baixos quando comparados com as outras citocinas dosadas. Interessantemente, essa citocina apresentou redução dos seus níveis séricos com o decorrer da infecção, o que não foi visto para as infecções com as cepas CL Brener e Y. Foram encontradas diferenças estatisticamente significativas no 18° e 25° dia após a infecção na dosagem de IFN- γ .

5.5 Camundongos TLR9^{-/-} infectados com as cepas CL Brener e Y apresentam menor inflamação atrial do que camundongos WT.

Para verificarmos se as cepas de *T. cruzi* usadas neste estudo promovem diferentes padrões no desenvolvimento de alterações cardíacas no início da infecção aguda, análises quantitativas da inflamação foram realizadas na região atrial de camundongos WT e TLR9^{-/-}, infectados com 5000 tripomastigotas de cada uma das cepas CL Brener, Y e Colombiana, 15 dias após a infecção. Os camundongos WT apresentaram padrões diferentes de inflamação cardíaca para cada uma das cepas (FIGURAS 19, 20, 21, 22). Podemos observar que os animais TLR9^{-/-} infectados com as cepas Y e CL Brener, apresentaram menor processo inflamatório quando comparados com os animais WT infectados com essas mesmas cepas. Os animais WT infectados com a cepa CL Brener apresentaram um processo inflamatório mais extenso dentre todos os grupos de camundongos infectados. No tempo avaliado, 15 dias após a infecção, os camundongos WT e TLR9^{-/-} infectados com a cepa Colombiana, apresentaram um processo inflamatório semelhante entre si, e menor comparando-se com os animais infectados com as outras cepas de *T. cruzi*.

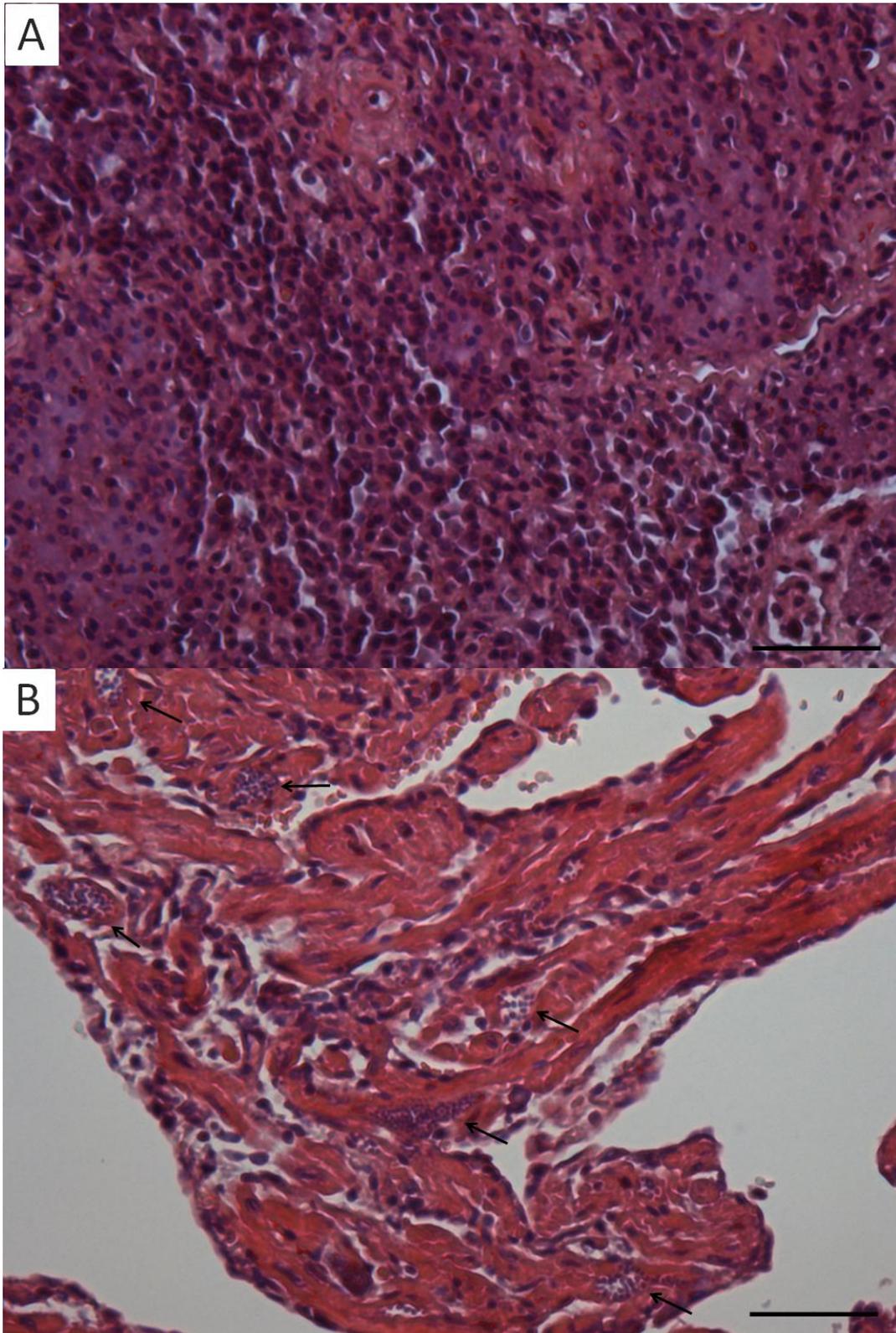


FIGURA 19. Imagens representativas do miocárdio atrial de camundongos WT (A) e TLR9^{-/-} (B) infectados com 5×10^3 tripomastigotas sanguíneas da cepa CL Brener. Os corações foram coletados 15 dias após a infecção e os cortes embebidos em parafina foram corados com H&E. As setas indicam os ninhos de amastigotas. Aumento de 200x.

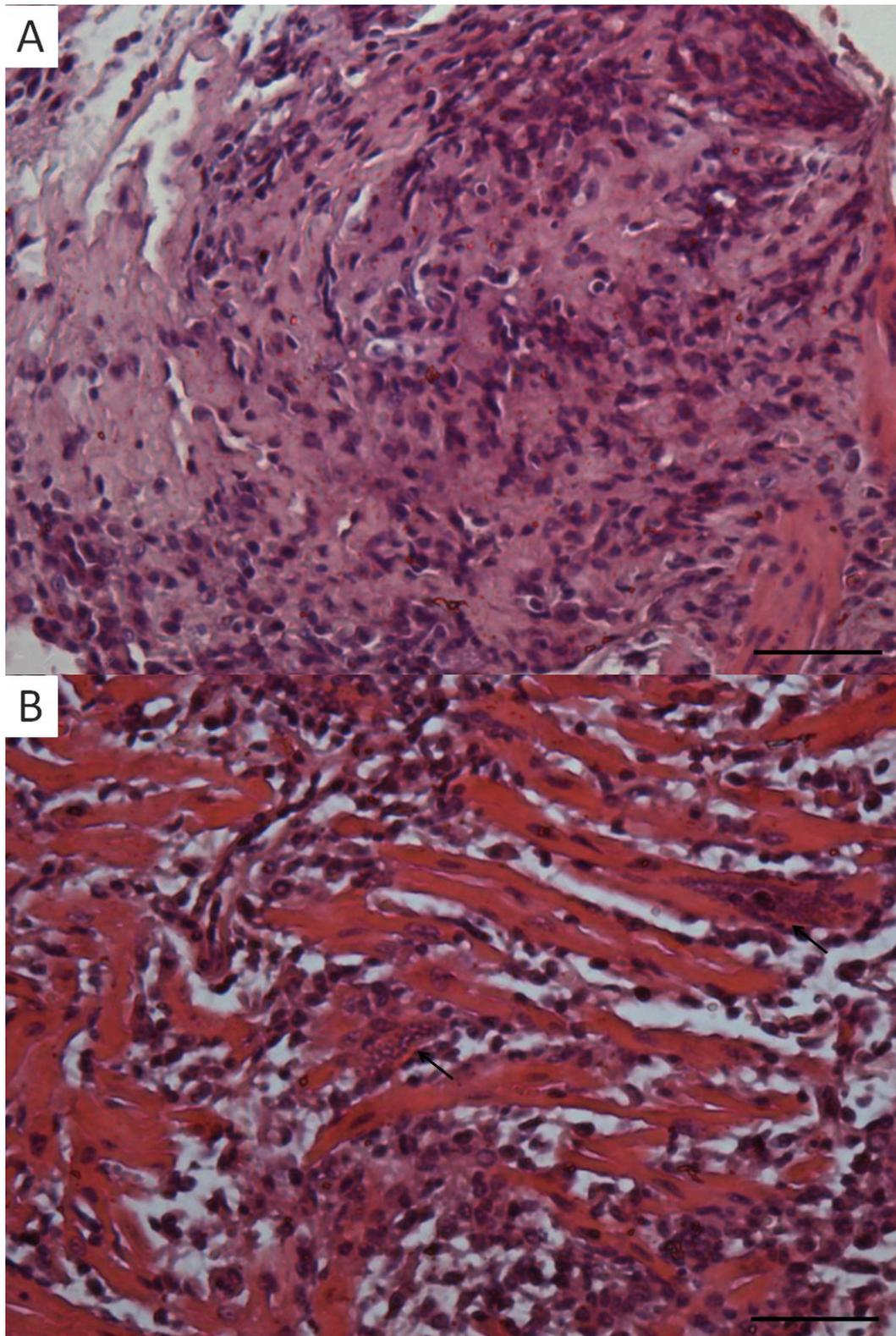


FIGURA 20. Imagens representativas do miocárdio atrial de camundongos WT (A) e TLR9^{-/-} (B) infectados com 5×10^3 tripomastigotas sanguíneas da cepa Y. Os corações foram coletados 15 dias após a infecção e os cortes embebidos em parafina foram corados com H&E. As setas indicam os ninhos de amastigotas. Aumento de 200x.

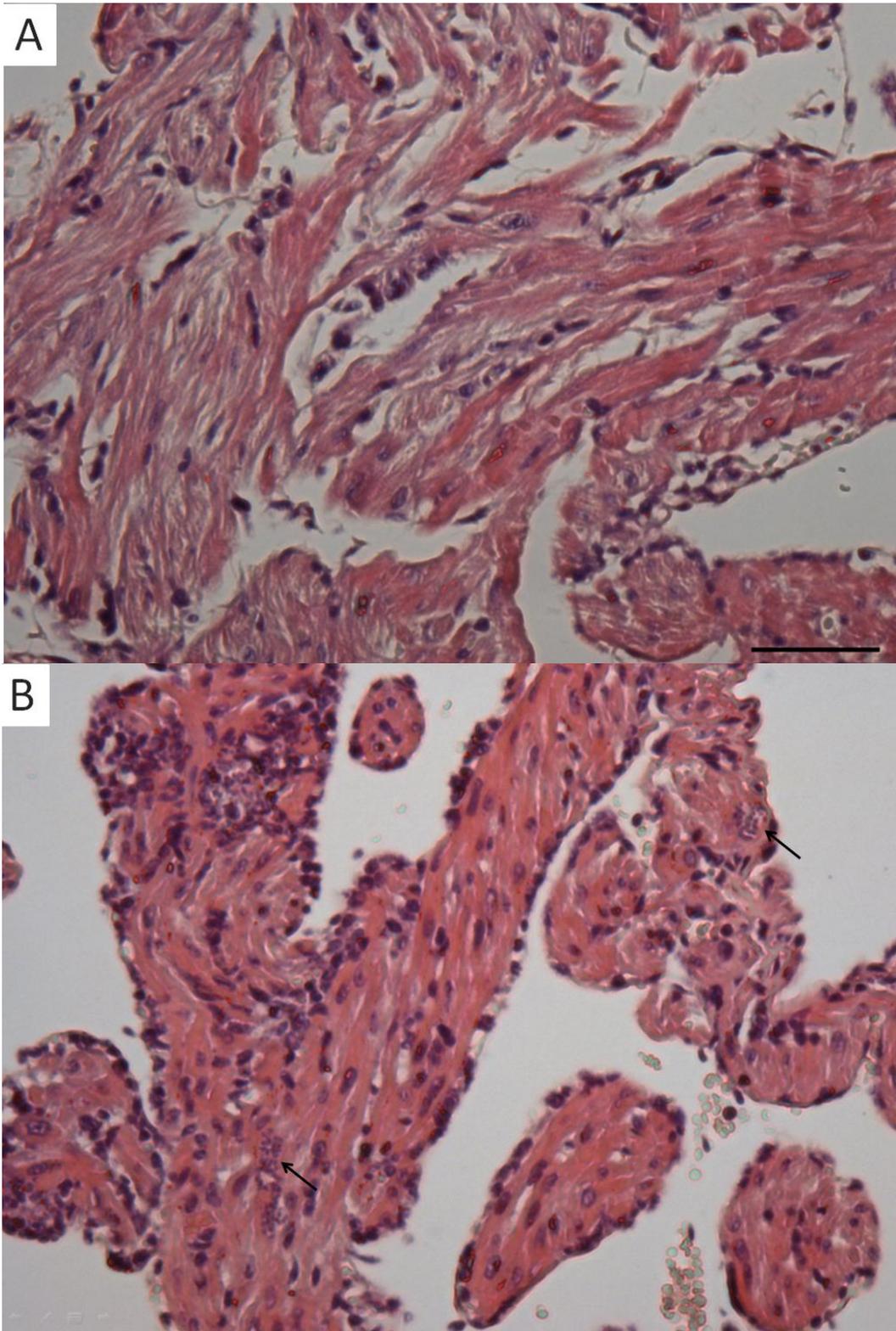


FIGURA 21. Imagens representativas do miocárdio atrial de camundongos WT (A) e TLR9^{-/-} (B) infectados com 5×10^3 tripomastigotas sanguíneas da cepa Colombiana. Os corações foram coletados 15 dias após a infecção e os cortes embebidos em parafina foram corados com H&E. As setas indicam os ninhos de amastigotas. Aumento de 200x.

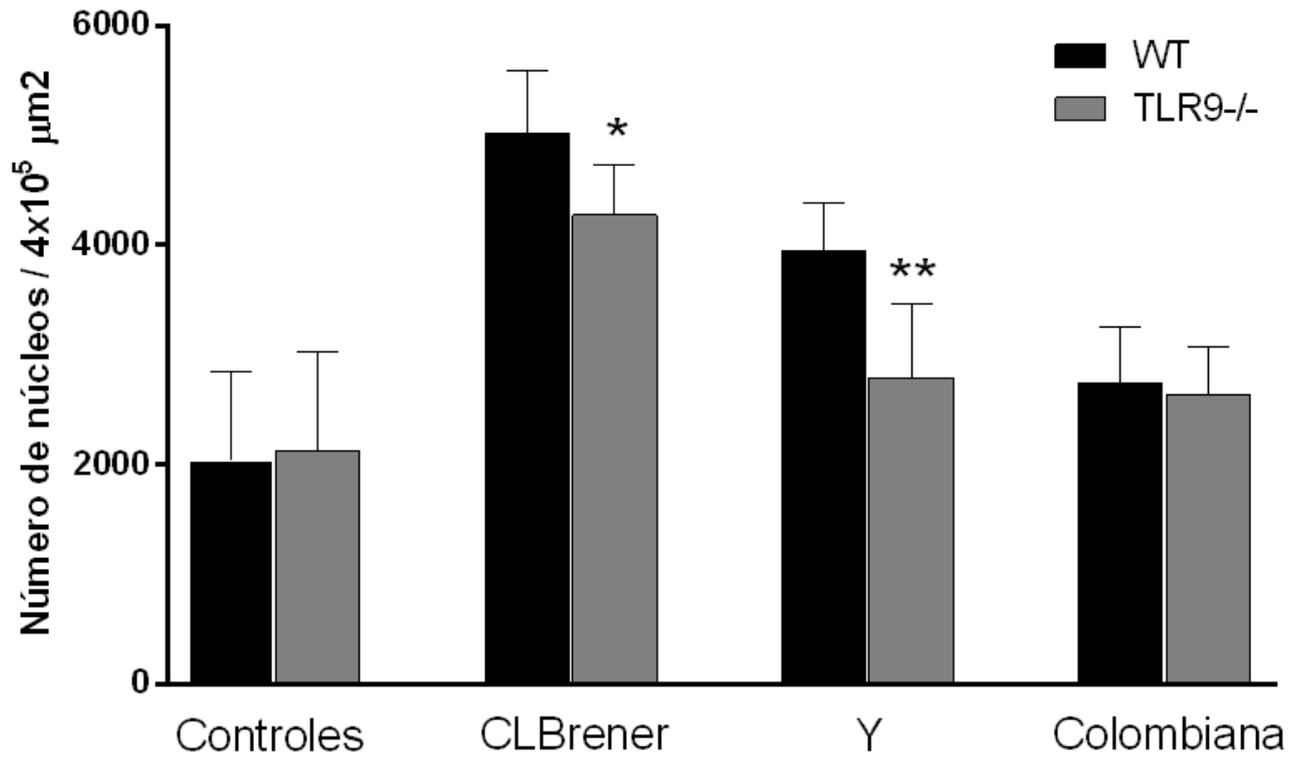


FIGURA 22. Quantificação do infiltrado inflamatório no miocárdio atrial de animais TLR9^{-/-} e WT infectados com 5×10^3 formas tripomastigotas das três cepas de *T. cruzi*. Foi analisada uma área total de $4 \times 10^5 \mu\text{m}^2$ de miocárdio atrial, com contagem dos núcleos presentes. Foram encontradas diferenças estatísticas entre os grupos TLR9^{-/-} e WT nas infecções com as cepas CL Brener (* $p = 0,0159$) e Y (** $p = 0,0066$). As análises realizadas nas amostras de WT e TLR9^{-/-} infectados com Colombiana não apresentaram diferenças estatísticas.

5.6 Sequências gênicas que se colocam com motivos CpG imunoestimulatórios são menos abundantes no genoma da cepa Colombiana comparado com as cepas Y e CL Brener.

Como forma de reunirmos evidências sobre se há diferenças em relação à abundância de motivos CpG imunoestimulatórios nos genomas das diferentes cepas de *T. cruzi*, nós realizamos experimentos de hibridação, usando como sondas sequências gênicas que localizam-se em regiões genômicas enriquecidas para os motivos CpG. Foram utilizadas como sondas parte da região codificadora do gene DGF-1 (*dispersed gene family-1*) e a região 3'UTR dos genes de MASP. Além do critério de localização genômica, os outros critérios usados na seleção das sondas foram a abundância e o grau de conservação das sequências. Os genes de MASP e DGF-1 apresentam ~1300 e ~600 cópias, respectivamente, no genoma de CL Brener e as sequências usadas como sonda são as mais conservadas dentro destas famílias (FREITAS *et al.*, 2011; BARTHOLOMEU *et al.*, 2009). Amostras de DNA (25, 50 e 100 ng) foram imobilizadas nas membranas de nylon (Hybond-N+ - GE Healthcare) e hibridados com as sondas marcadas radioativamente, com $^{32}\text{P}\alpha\text{dATP}$. A FIGURA 23, mostra a abundância relativa das sequências de MASP 3'UTR (A) e DGF-1 (B) no genoma de CL Brener, Colombiana, Y. Também estão representados os resultados da hibridação com o DNA do clone CL 14 e cepa CL (pertencentes ao grupo TcVI).

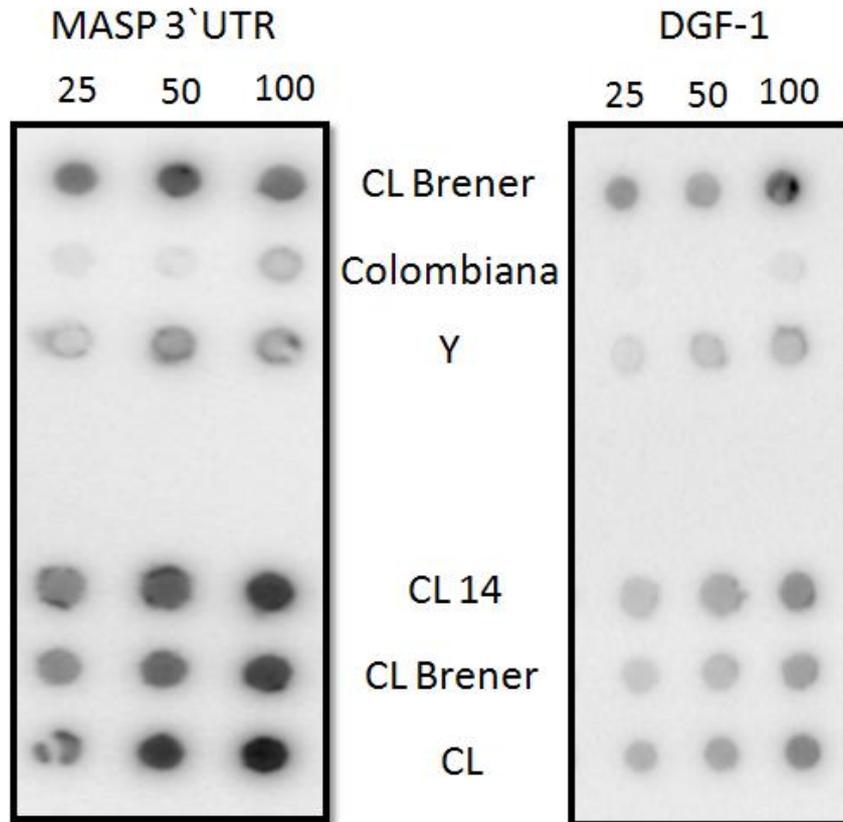


FIGURA 23 - Abundância relativa de sequências localizadas em regiões enriquecidas com motivos CpG imunoestimulatórios no genoma das cepas Colombiana, Y, CL Brener, CL14 e CL. Amostras de DNA genômico com 25, 50 e 100 ng, de cada uma das cepas de *T. cruzi* foram imobilizadas em membranas de nylon (Hybond-N+ - GE Healthcare) e hibridadas com as sequências MASP 3'UTR (painel da esquerda) e a região codificadora do gene DGF-1 (painel da direita) marcadas com ^{32}P dATP.

Realizamos a análise de densitometria em cada um dos spots (FIGURA 24), que mostrou que a cepa Colombiana possui menores quantidades dessas regiões em seu genoma do que as cepas CL Brener e Y, para ambas as sequências, MASP e DGF-1. Com relação às cepas do grupo Tc VI, a análise não mostrou diferenças nas quantidades destas regiões nos genomas da cepa CL e dos clones CL Brener e CL 14.

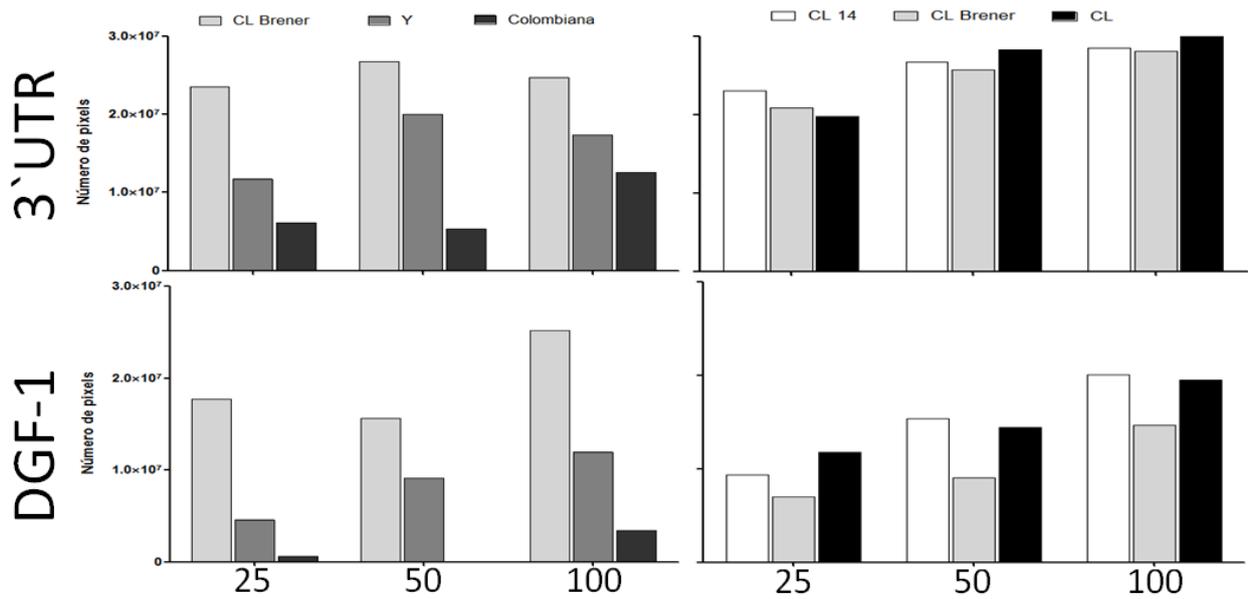


FIGURA 24. Análise de densitometria das hibridizações do DNA genômico das cepas CL Brener (TcVI), Y (TcII), Colombiana (TcI), e outros isolados do grupo TcVI, CL e CL14, com sequências gênicas localizadas em regiões enriquecidas pelos motivos CpG. Foram utilizadas as quantidades de 25, 50 e 100 ng de DNA que foram hibridadas com a região MASP 3'UTR e do gene DGF-1. As análises de densitometria foram realizadas usando o programa Image Quant TL no equipamento Image Quant LAS 4000-GE. Os valores de números de pixels foram obtidos subtraindo os valores de pixel de cada spot pelo valor correspondente ao background da imagem.

5.7 Motivos CpG de *T. cruzi* com alta capacidade imunoestimulatória são mais abundantes nos genomas das cepas CL Brener e Y comparado com Colombiana

Como mencionado anteriormente, estudos prévios realizados pelo nosso grupo, permitiram a identificação de motivos CpG DNA imunoestimulatórios derivados do genoma de *T. cruzi* (BARTHOLOMEU *et al.*, 2008). Neste trabalho anterior, o genoma inteiro da cepa CL Brener, que já havia sido sequenciado (EL-SAYED *et al.*, 2005), foi rastreado usando ferramentas de bioinformática para a busca de motivos CpG semelhantes aos previamente identificados em bactéria e os motivos candidatos tiveram sua capacidade imunoestimulatória TLR-9 dependente testada experimentalmente. A fim de realizarmos análises semelhantes às aquelas realizadas com CL Brener e mais assertivas que aquelas inferidas com base nos experimentos de hibridação, nós realizamos o sequenciamento dos genomas das cepas Y e Colombiana usando a plataforma 454. Cerca de 577 e 533 milhões de nucleotídeos foram gerados para Y e Colombiana, respectivamente. O rastreamento dos motivos CpG foram realizados nas sequências não montadas dos genomas (reads individuais). Optou-se por esta estratégia uma vez que, por ser um genoma muito repetitivo, a montagem é muito difícil, gerando sequências parciais. A primeira etapa da análise foi inferir os valores de cobertura dos genomas para que se pudesse estimar o número de motivos CpG por genoma haplóide. Esta etapa é essencial para evitar superestimar o número dos motivos CpG naqueles genomas para os quais se gerou um número maior de nucleotídeos. Os valores de cobertura obtidos em projetos genomas pode ser calculado computando-se a cobertura de cada nucleotídeo derivado de genes cópia simples, uma vez que os mesmos ocorrem uma única vez no genoma haplóide. A cobertura dos genes cópia simples de CL Brener previamente identificados pelo nosso grupo (MENDES *et al.*, 2013) foi estimada usando scripts em PERL desenvolvidos pelo nosso grupo (SILVA *et al.*, não publicado). Usando-se esta abordagem, a cobertura do genoma da cepa Y e Colombiana foi estimada em 13.8 e 13.9 vezes. Incluímos nesta mesma análise, genomas de outras cepas de *T. cruzi* que estamos sequenciando em

outros projetos ou disponíveis no banco de dados Sequence Read Archive (SRA) do National Center for Biotechnology Information (NCBI). Um total de 8 genomas foram rastreados e os valores de cobertura variaram de 6.8 vezes (cepa Arequipa) a 177 vezes (cepa Tulahuén). Posteriormente, buscamos nas reads individuais de cada genoma disponível os cinco motivos CpG de *T. cruzi* agonistas de TLR-9 murino previamente validados como sendo imunoestimulatórios (BARTHOLOMEU *et al.*, 2008). A TABELA 2, mostra a estimativa do número de cópias de cada um destes motivos nos 8 genomas.

CpG Motif	Mouse TLR9 SI	TcVI			TcII		TcI		
		CL Brener	Tulahuen	CL-14	Y	Esmeraldo	Colombiana	Arequipa	Sylvio
616	146	44	35	40	40	30	12	10	4
297	133	21	14	17	18	26	2	2	7
344	125	25	19	20	20	22	3	2	1
772	76	55	39	54	41	48	69	63	80
597	75	43	28	29	13	7	32	33	41

Tabela 2: Estimativa do número de motivos CpG de classe B agonista de TLR-9 murino nos genomas das diferentes cepas de *T. cruzi*. CpG motif = nome do motivo CpG previamente identificado em CL Brener e SI TLR9 corresponde ao índice estimulatório obtido para cada oligonucleotídeo CpG (BARTHOLOMEU *et al.*, 2008). Cada um dos motivos CpG foram rastreados nas reads individuais de cada genoma usando o programa fuzznuc (pacote EMBOSS) e o número de motivos identificados foi normalizado pela cobertura do genoma.

Após a quantificação dos motivos CpG em cada uma das cepas de *T. cruzi*, nós realizamos o agrupamento hierárquico fim de verificar se a distribuição de motivos CpGs segue o padrão de classificação de DTU de *T. cruzi*. Como mostra a FIGURA 25 (A), cepas de um mesmo DTU apresentam maior similaridade no conteúdo destes motivos do que cepas de outras linhagens. Além disso, o dendograma também mostra que cepas representantes das DTU II e VI apresentam maior similaridade de conteúdo de CpG do que o DTU I.

Como o dendograma mostrou que o agrupamento das cepas segue a classificação de DTUs, foi avaliado quais tipos de motivos seriam mais frequentes em cada DTU e quais as diferenças entre eles (FIGURA 25, B). Os DTU TcII e TcVI apresentam maior conteúdo de motivos com maior índice de estimulação do que o TcI, que é enriquecido com motivos com baixo índice de estimulação. O motivo com menor índice de estimulação é o único que

conseguiu discriminar TcII de TcVI. Por fim, TcVI é o DTU com maior quantidade de motivos CpGs.

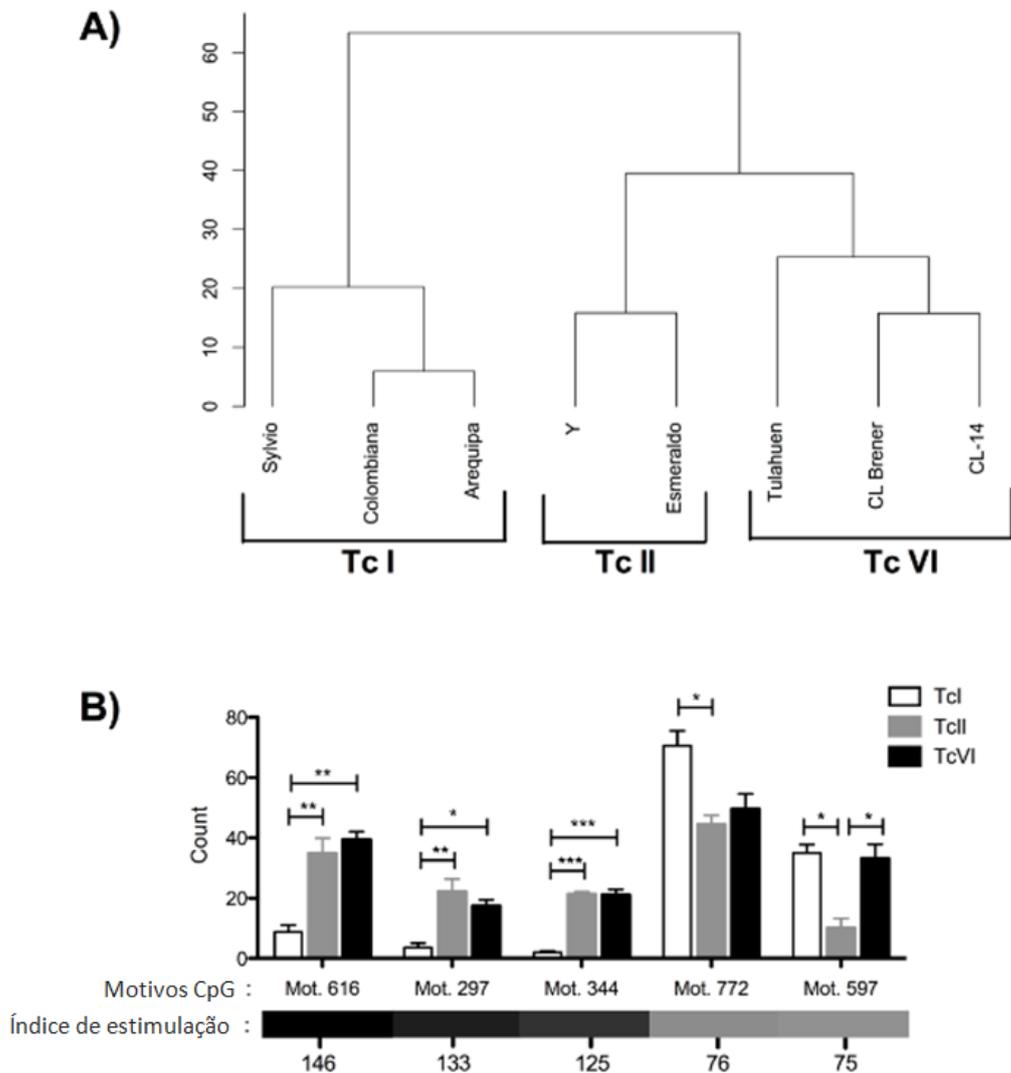


FIGURA 25. Abundância dos motivos CpG de classe B imunoestimulatórios agonistas de TLR-9 murino nos genomas de diferentes cepas de *T. cruzi*. Os genomas das cepas Colombiana, Y, Arequipa e CL-14 foram gerados na plataforma 454 Roche. Os genomas das outras cepas do parasito que foram analisados foram obtidos do banco de dados *Sequence Reads Archive* do NCBI. *A*, dendograma do agrupamento hierárquico do numero de motivos CpG identificados em cada genoma usando o programa Pvcust. *B*, Comparação da média do número de cópias dos motivos CpGs entre as linhagens filogenéticas de *T. cruzi* usando o teste one-way.

6 DISCUSSÃO

Estudos parasitológicos, bioquímicos e moleculares têm demonstrado que *T. cruzi* é um táxon extremamente polimórfico (SOUTO *et al.*, 1996; BRISSE *et al.*, 2001; DE FREITAS *et al.*, 2006; ACKERMANN *et al.*, 2012) e atualmente seis linhagens filogenéticas do parasito, denominadas TcI a TcVI, são reconhecidas (ZINGALES *et al.*, 2012). A grande variabilidade genética das diferentes linhagens do parasito confere-lhe características fenotípicas e de virulência bastante distintas, tais como morfologia das formas sanguíneas, curvas de parasitemia, patogenicidade, sensibilidade a drogas, taxa de crescimento, metaciclogênese, tropismo tecidual e variabilidade antigênica (revisado por DI NOIA *et al.* 2002; MACEDO *et al.*, 2004).

Muito tem se especulado sobre se esta variabilidade genética do parasito poderia estar associada a diferentes formas clínicas da doença de Chagas. Em modelo experimental de infecção, tem sido demonstrado que diferentes isolados do parasito apresentam tropismo tecidual diferencial. Por exemplo, foi demonstrado que na infecção de camundongos BALB/c, a cepa JG (TcII) apresenta um tropismo para o tecido cardíaco, enquanto que a cepa Colombiana (TcI) se aloja majoritariamente no trato digestivo (ANDRADE *et al.*, 1999). Em pacientes chagásicos, por outro lado, nenhum estudo conseguiu estabelecer claramente uma associação entre a cepa infectante e a manifestação clínica da doença de Chagas. Apesar disso, esta hipótese não foi descartada uma vez que correlações entre padrões de distribuição geográfica associadas as diferentes linhagens de *T. cruzi* e manifestações clínicas da doença de Chagas têm sido reportados. Em países do cone sul da América do Sul (Argentina, Bolívia, Brasil, Chile, Paraguai, Uruguai) onde a doença de Chagas é considerada mais severa, TcI está associado com o ciclo silvestre de transmissão infectando principalmente mamíferos arbóreos, enquanto que as cepas TcII, TcV e TcVI predominam no ciclo doméstico infectando homens e outros mamíferos terrestres (FREITAS *et al.*, 2005; YEO *et al.*, 2005). Por outro lado, TcI predomina na bacia Amazônica e em áreas endêmicas para doença de Chagas na Venezuela. Manifestações patológicas digestivas associadas à infecção pelo *T. cruzi* são mais comuns nas regiões do Brasil Central e sul da

América do Sul, mas raras ou ausentes no norte da América do Sul e América Central (revisado por BUSCAGLIA *et al.*, 2003). Apesar destas incertezas, é bem estabelecido que a patogênese da doença de Chagas é extremamente complexa e tem natureza multifatorial influenciada tanto pela variabilidade genética do parasito quanto do hospedeiro (COURA e BORGES-PEREIRA, 2010).

Poucos são os estudos que investigaram as implicações da variabilidade genética do parasito na resposta imune do hospedeiro. CAETANO e colaboradores (2010) mostraram que a cepa MORC-1 gerava em camundongos Swiss um padrão de resposta do tipo Th2, com grande produção de IL-4, enquanto a cepa MORC-2 desencadeava uma resposta do tipo Th1 com altos níveis de IFN- γ e TNF- α , o que caracterizou a maior resistência dos camundongos infectados com MORC-2.

O trabalho de RODRIGUES e colaboradores (2010) investigou fatores do parasito e do hospedeiro na infecção de camundongos BALB/c com as cepas JG e/ou CL Brener. Esses pesquisadores mostraram que camundongos infectados com a cepa JG apresentaram reduzida parasitemia e parasitismo no coração, não sucumbiram à infecção, produziram níveis basais de citocinas pró-inflamatórias e nenhuma manifestação clínica da doença. Em contraste, os mesmos animais infectados com a cepa CL Brener apresentaram alta parasitemia e parasitismo no coração, assim como grande produção de citocinas pró-inflamatórias e alta mortalidade. Interessantemente, a coinfeção com JG e CL Brener resultou em níveis intermediários de parasitemia, parasitismo cardíaco e mortalidade, mostrando que a coinfeção foi capaz de desencadear tanto uma imunidade inflamatória protetora, como mecanismos imunes regulatórios capazes de atenuar os danos causados pela inflamação e a gravidade da doença em camundongos.

A despeito destes estudos, não há relatos na literatura investigando as implicações da variabilidade genética do parasito no reconhecimento e ativação de receptores da resposta imune inata.

Dentre os receptores da imune inata, o TLR9 tem um papel muito importante na geração de um fenótipo resistente na infecção aguda pelo *T. cruzi* e também em orquestrar uma resposta imune adaptativa (GAZZINELLI e DENKERS *et al.*, 2006). Camundongos deficientes de MyD88, uma molécula

adaptadora necessária para eventos de sinalização para a maioria dos TLRs, exceto TLR3, apresenta grande susceptibilidade à infecção pelo *T. cruzi*, indicando que a ativação de TLRs é crucial para a resistência do hospedeiro (BAFICA et al., 2006; CAETANO et al., 2011). O camundongo MyD88^{-/-} é apenas um pouco mais susceptível à infecção pelo *T. cruzi* do que animais 3d (triplo deficiente para TLR3, TLR7 e TLR9). Foi demonstrado que os animais TLR3^{-/-} não apresentam maior susceptibilidade que os animais WT, o que sugere então que TLR7 e TLR9 são os principais TLRs associados à resistência ao parasito (CAETANO et al., 2011).

Como já mostrado, os motivos CpG DNA agonistas de TLR9 não se encontram distribuídos aleatoriamente no genoma de *T. cruzi*, mas concentram-se em famílias multigênicas que codificam proteínas de superfície específicas do parasito (BARTHOLOMEU et al., 2008). O mesmo padrão de distribuição dos motivos CpG foi observado no genoma de *P. falciparum*, onde essas sequências são mais frequentes em regiões subteloméricas associadas a família multigênica var que codifica a proteína da membrana do eritrócito 1 (PfEMP1), específica do parasito (PARROCHE et al., 2007). Em *Leishmania major*, por outro lado, os motivos CpG estão distribuídos ao longo de todo o genoma (LOURDES et al., dados não publicados). Vale ressaltar que o genoma de *L. major* apresenta um reduzido número de genes espécie-específicos quando comparado com *T. cruzi* e *T. brucei* (EL-SAYED et al., 2005). É possível, portanto, que a expansão de famílias multigênicas em *T. cruzi* e *P. falciparum* que possuem motivos CpG seja modulada tanto pelas propriedades e funções das proteínas que estes genes codificam, quanto pela capacidade imunoestimulatória de suas sequências nucleotídicas. As regiões de *T. cruzi* que contêm os motivos CpG enriquecidos são muito polimórficas nos dois haplótipos da cepa híbrida CL Brener (EL-SAYED et al., 2005), tanto em relação ao tamanho, quanto em relação ao conteúdo gênico. Este fato, nos levou a especular se esses motivos CpG poderiam variar nas diferentes cepas de *T. cruzi*, pertencentes a diferentes linhagens do parasito.

Levando em conta a quantidade escassa de estudos investigando a variabilidade de resposta imune inata gerada por diferentes isolados do parasito, nós elegemos para este estudo três cepas pertencentes a diferentes linhagens filogenéticas: CL Brener (Tc VI), Y (Tc II) e Colombiana (Tc I). Sabe-

se que estas cepas apresentam diferenças no tropismo tecidual, capacidade infectante e curvas de parasitemia (YOSHIDA, 1983; TALVANI *et al.*, 2000; BAFICA *et al.*, 2006; BARTHOLOMEU *et al.*, 2008; ANDRADE *et al.*, 2010), mas não se sabe se a diferenças genéticas destas cepas resultam em um reconhecimento diferencial pelo TLR9. Foram avaliados neste trabalho aspectos parasitológicos, imunológicos e moleculares nas infecções de camundongos WT e TLR9 *-/-* com as três cepas selecionadas.

Inicialmente foram avaliados o padrão de parasitemia e mortalidade dos animais infectados. Os dados destes parâmetros parasitológicos são concordantes com aqueles da literatura que demonstram que Y atinge o seu pico de parasitemia mais rapidamente do que a cepa CL Brener, sendo que a cepa Colombiana atinge o seu pico de parasitos no sangue bem mais tardiamente (TALVANI *et al.*, 2000; BAFICA *et al.*, 2006; BARTHOLOMEU *et al.*, 2008). No presente trabalho demonstramos que TLR9 tem uma grande importância na geração de um fenótipo resistente em camundongos infectados com as cepas CL Brener e Y, diferentemente do que foi visto na infecção com a cepa Colombiana, onde camundongos TLR9 *-/-* apresentaram um padrão semelhante aos camundongos WT, não mostrando acelerada mortalidade e tampouco maiores níveis de parasitemia. A susceptibilidade demonstrada pelos camundongos TLR9 *-/-* infectados com a cepa Y e CL Brener corrobora trabalhos da literatura que demonstram que camundongos deficientes em TLR9 *-/-* apresentam maior susceptibilidade à infecção pela cepa Y comparados aos animais WT (BAFICA *et al.*, 2006; BARTHOLOMEU *et al.*, 2008). A maior resistência apresentada pelos camundongos TLR9 *-/-* infectados com Colombiana em relação à infecção pelas outras duas cepas, demonstra claramente que o TLR9 pode responder diferencialmente a determinadas cepas de *T. cruzi*, e por consequência apresentar uma importância diferencial no estabelecimento da resposta imune.

Como já demonstrado vastamente na literatura, uma resposta imune do tipo Th1 está relacionada com um fenótipo resistente à infecção pelo *T. cruzi*, sendo parcialmente dependente das funções de MyD88 (BIRON e GAZZINELLI, 1995; TAKEUCHI e AKIRA, 2010), principalmente com a participação de IL-12 e IFN- γ (CARDILLO *et al.*, 1996; ALIBERTI *et al.*, 1986) e certamente envolvendo o TLR9 (BARTHOLOMEU *et al.*, 2008) e o TLR7

(CAETANO *et al.*, 2011). Com a realização da dosagem de citocinas que apresentam um perfil pró-inflamatório no soro dos camundongos infectados, pudemos verificar a cinética de produção nos animais em determinados pontos de acordo com o padrão de parasitemia apresentado por cada uma das cepas. Com o perfil de produção das citocinas IL-6, TNF, IFN- γ , IL-12, e a quimiocina MCP-1, em animais WT e TLR9^{-/-} infectados pelas três cepas de *T. cruzi*, nos permitiu relacioná-lo com o padrão de parasitemia apresentado por cada uma delas. A produção das citocinas em animais WT infectados com CL Brener apresentou grande diferença do perfil apresentado pelos animais TLR9^{-/-}. Os animais WT infectados por essa cepa apresentaram alta produção dessas citocinas que se caracterizam por gerar um fenótipo resistente, ao contrário dos animais TLR9^{-/-} que produziram menores níveis dessas citocinas o que poderia gerar a susceptibilidade apresentada por esses animais nas curvas de parasitemia e mortalidade.

A infecção pela cepa Y mostra novamente uma inabilidade dos animais TLR9^{-/-} em produzir citocinas pró-inflamatórias comparados aos camundongos WT. Importante notar que a queda da resistência apresentada em animais TLR9^{-/-} infectados por essa cepa pode estar relacionada à produção comprometida de citocinas IL-6 e TNF, e principalmente IFN- γ e IL-12, que são importantes na geração da resposta Th1 (CAMPO *et al.*, 2004; BAFICA *et al.*, 2006). Os camundongos TLR9^{-/-} apresentaram um atraso na produção de citocinas importantes para o controle de parasitemia e indução de um fenótipo resistente, no pico de parasitemia, onde esses animais também foram menos eficientes em controlar o número de parasitos do sangue comparados aos camundongos WT. Com a passagem do pico de parasitemia, ocorre uma equalização dos níveis de parasitemia e também da produção dessas citocinas pró-inflamatórias. Contudo, apesar de os animais TLR9^{-/-} apresentarem deficiência no controle dos níveis de parasitemia e na produção de citocinas apenas no pico de parasitemia, quando comparados aos animais WT, verificamos que uma resposta mais eficiente nesse momento é totalmente necessário já que ocorre a diminuição da mortalidade em animais WT infectados por essa cepa. Vários estudos já mostraram que a deficiência na produção de IFN- γ e IL-12, é geradora de aumento de parasitemia e

aceleração de mortalidade (CAMPO *et al.*, 2004; BAFICA *et al.*, 2006; GAZZINELLI e DENKERS, 2006).

A produção de citocinas pelos camundongos infectados com a cepa Colombiana mostrou um perfil bem diferente do encontrado nas infecções com as outras cepas. Verificamos que camundongos TLR9^{-/-} infectados com essa cepa apresentaram uma resposta muito semelhante à encontrada em camundongos WT, sendo que os grupos de animais mostraram de maneira geral uma diminuição da produção das citocinas do 25^o para o 32^o dias após a infecção.

A citocina IL-6 é importante na defesa do hospedeiro contra o *T. cruzi*. A infecção pelo parasito em animais e humanos resulta em elevada expressão de IL-6 em tecidos parasitados e na circulação (TRUYENS *et al.*, 1994; CHANDRASEKAR *et al.*, 1996). GAO e PEREIRA (2002) mostraram que camundongos IL-6^{-/-} apresentam maior susceptibilidade à infecção pelo *T. cruzi*, apresentando maiores níveis de parasitemia e morte acelerada, comparados aos animais WT. Nesse trabalho, foi mostrado que os animais IL-6^{-/-} infectados por *T. cruzi* não apresentaram diminuição, no pico de parasitemia, da secreção de IFN- γ , que é uma citocina crucial para controlar o parasito. Nos nossos experimentos, mostramos que os animais WT infectados com CL Brener e Y apresentam aumento da produção de IL-6 com o passar da infecção, diferentemente dos animais WT infectados com a cepa Colombiana, que apresentaram diminuição da produção de IL-6 do 25^o para o 32^o dias após a infecção.

Nossos experimentos mostraram nas infecções com as três cepas que a quimiocina MCP-1 apresenta queda de sua produção com o passar da infecção. MCP-1 (CCL2) é uma quimiocina secretada por uma variedade de células em resposta à inflamação e representa um fator importante do recrutamento de monócitos para os tecidos (SERBINA *et al.*, 2008; KUZIEL *et al.*, 1997). MCP-1 participa da captação e destruição do parasito por macrófagos, e também reduz o crescimento de *T. cruzi* em culturas de macrófagos peritoneais (TALVANI *et al.*, 2003; ALIBERTI *et al.*, 1999).

A produção das citocinas IL-12 e IFN- γ , que são incriminadas como as mais importantes para o controle de parasitemia e mortalidade de animais infectados com *T. cruzi* (BARTHOLOMEU *et al.*, 2008; GRAVINA *et al.*, 2013),

apresentaram diminuição dos seus níveis séricos com o decorrer da infecção em animais infectados com Colombiana. Interessantemente, os níveis de IFN- γ , diferentemente do que ocorreu nas infecções com as outras cepas, decresceram com o passar da infecção. TALVANI e colaboradores (2000) mostraram que a citocina IL-12 aumenta a sua expressão no 15º dia após a infecção e diminui para níveis basais no 30º dia após a infecção, no tecido cardíaco. Houve também alta produção de IFN- γ com 15 dias pós-infecção e baixos níveis após esse período. Essa diminuição das citocinas séricas, com o passar dos dias pós-infecção, poderia favorecer o prolongamento dos níveis de parasitemia, dificultando assim o seu controle mais rapidamente como ocorre nas infecções com CL Brener e Y. Assim, uma resposta adaptativa poderia ser montada mais tardiamente e explicaria o recuo dos níveis de parasitemia na infecção pela cepa Colombiana.

Os achados de MICHAILOWSKY e colaboradores (1998) mostram um padrão bem semelhante ao que encontramos com relação à indução das citocinas IL-12 e IFN- γ nas infecções com as cepas CL, Y e Colombiana. Neste estudo, foi mostrado diferenças na indução da produção de IL-12 em macrófagos pelas cepas CL, Y e Colombiana, sendo que a última cepa induziu baixa síntese de IL-12 em macrófagos, comparado com CL e Y. Também foi mostrado que animais infectados com as cepas CL e Y que receberam tratamento com anticorpos neutralizantes contra IL-12 e IFN- γ , sofreram grande alteração no curso natural da infecção, mostrando alta parasitemia e acelerada taxa de mortalidade. Em contraste, não foram observadas diferenças nos animais infectados com a cepa Colombiana que receberam o mesmo tratamento com anti-IL-12 e anti-IFN- γ . Isso mostra que a cepa Colombiana é péssima indutora da síntese de IL-12 *in vivo* e também de IFN- γ . Esses resultados evidenciam a grande diferença na resposta imune desencadeada por essas três cepas, corroborando os nossos achados, mostrando que a cepa Colombiana é capaz de estimular *in vivo* menores níveis de IL-12 e IFN- γ quando comparada com as outras cepas CL Brener e Y.

Nas nossas condições experimentais, as infecções com as cepas CL Brener e Y apresentaram um grande processo inflamatório no miocárdio atrial em camundongos WT e uma significativa diminuição da inflamação no tecido de animais TLR9^{-/-}. Como o animal TLR9^{-/-} apresenta comprometimento da

produção de citocinas pró-inflamatórias, a inflamação no miocárdio atrial poderia refletir essa produção deficiente. Em contraste, os animais WT e TLR9^{-/-} infectados com a cepa Colombiana apresentaram processo inflamatório moderado na região atrial. Um padrão semelhante foi observado no trabalho de ROFFÊ e colaboradores (2012), onde animais C57BL/6 infectados com Colombiana, apresentaram uma miocardite leve, sendo que camundongos C3H/HeSnJ (modelo susceptível) infectados desenvolveram uma grave miocardite. O trabalho de TALVANI e colaboradores (2000) mostrou que o controle do parasitismo no coração de animais infectados com a cepa Colombiana era acompanhado pela diminuição da inflamação e expressão de diferentes quimiocinas e IFN- γ no tecido cardíaco. No entanto nesse estudo os autores mostraram que ocorre uma inflamação difusa com 30 dias após a infecção, com o pico da inflamação ocorrendo com 60 dias, diminuindo após esse período.

Essa indicação de uma importância diferencial de TLR9 na infecção de animais com diferentes cepas de *T. cruzi*, nos direcionou para realização de testes imunoestimulatórios *in vitro*. Uma das hipóteses iniciais por nós testadas, era a tentativa de demonstrarmos que o DNA das diferentes cepas de *T. cruzi* é capaz de ativar células da imunidade inata (BARTHOLOMEU *et al.*, 2008) de uma forma diferencial, TLR9 dependente, incriminando a diferença de motivos CpG no genoma de cada uma das cepas como responsável por essa possível diferença na capacidade imunoestimulatória. Utilizamos então, DNA extraído de formas epimastigotas das três cepas em ensaios imunoestimulatórios. As preparações dos DNAs das cepas CL Brener, Y e Colombiana utilizadas nos experimentos de ativação de macrófagos e DCs, foram capazes de ativá-las, porém, nas nossas condições experimentais, não conseguimos visualizar diferenças nessa capacidade imunoestimulatória. Nesses experimentos inicialmente utilizamos um reagente de transfecção DOTAP, utilizado para facilitar a internalização do DNA pelas células e assim aumentar a capacidade estimulatória. Recentemente, YASUDA e colaboradores (2009) demonstraram que DNA livre de CpG pode ativar TLR9 se os fragmentos de DNA forem internalizados com DOTAP. Isso possivelmente ocorre devido à alta concentração de fragmentos de DNA que são entregues ao TLR9 intracelular, numa internalização mediada por esse reagente de transfecção. Como

alternativa ao uso do DOTAP, a fim de obtermos moléculas de DNA de pequenos tamanhos para favorecer a internalização por macrófagos e células dendríticas, realizamos a fragmentação enzimática do DNA. Essa fragmentação facilitaria a entrada do DNA dentro da célula, o que poderia aumentar a capacidade de ativação do DNA, pois sabemos que a expressão de TLR9 aumenta quando o DNA é entregue diretamente no compartimento endolisossomal das células e também é sabido que a capacidade imunoestimulatória de um ODN é maior que o DNA genômico (AHMAD-NEJAD *et al.*, 2002; BARTHOLOMEU *et al.*, 2008). A enzima de restrição *Bsp1286I* apresentou maior número de sítios de restrição no genoma e era capaz de manter as sequências CpG DNA intactas. Como esperado, houve um aumento da capacidade imunoestimulatória nos DNAs que sofreram digestão, porém, novamente não encontramos diferenças na capacidade imunoestimulatória do DNA genômico digerido das diferentes cepas de *T. cruzi*, usando as mesmas quantidades de DNA.

Uma questão que poderia explicar tal fato seria que o tamanho dos genomas das diferentes cepas de *T. cruzi*. Estudos recentes já demonstraram que existe uma grande variação no tamanho do genoma das diferentes cepas de *T. cruzi* pertencentes às diferentes linhagens. O genoma das cepas do grupo TcI são, de maneira geral, menores do que cepas pertencentes a outros grupos, variando principalmente no tamanho de diversas famílias multigênicas que codificam proteínas de superfície e que se co-localizam com os motivos CpG (FRANZÉN *et al.*, 2011; SOUZA *et al.*, 2011). No trabalho de SOUZA e colaboradores (2011), o tamanho dos genomas de nove cepas de *T. cruzi* de 4 linhagens diferentes (Tc I, Tc II, Tc V e Tc VI) foi determinado, demonstrando que o genoma das cepas do grupo Tc I são menores do que as outras linhagens. Nas nossas condições experimentais, utilizamos a mesma quantidade de DNA genômico para cada uma das cepas, então poderíamos ter para a cepa Colombiana (Tc I), maior número de cópias do seu genoma, em comparação com CL Brener (Tc VI) e Y (Tc II), que possuem o genoma maior, o que poderia não mostrar a real diferença da capacidade imunoestimulatória dos genomas analisados.

A fim de normalizar a quantidade de DNA genômico nos experimentos de ativação de células da imunidade inata, nós utilizamos as

mesmas quantidades de formas tripomastigotas de cultura vivas, de cada uma das cepas de *T. cruzi*, nos experimentos de ativação de DC. Nesse tipo de experimento, utilizando formas tripomastigotas vivas incubadas diretamente em contato com as células, vários tipos de respostas são desencadeados, sendo ativados também outros TLRs, como por exemplo, TLR2, TLR4 e TLR7, que são sabidamente estimulados mediante a infecção pelo *T. cruzi* (CAMPO *et al.*, 2001; OLIVEIRA *et al.*, 2004; BAFICA *et al.*, 2006; CAETANO *et al.*, 2011). Sendo assim, para avaliarmos a importância e ativação somente do TLR9, nós analisamos a razão dos níveis de citocinas produzidos na ativação de DC provenientes de camundongos WT e TLR9^{-/-}. Assim, verificamos que as formas tripomastigotas foram capazes de estimular DCs provenientes de camundongos WT e TLR9^{-/-} e que a razão entre os níveis de citocinas, foi sempre menor para a cepa Colombiana quando comparados com as cepas CL Brener e Y. Esses resultados revelam que, na infecção por Colombiana, DCs derivadas de camundongos TLR9^{-/-} respondem de forma semelhante a DCs derivadas de camundongos WT. Estes resultados corroboram a hipótese de que a cepa Colombiana possui menores quantidades de motivos CpG em seu genoma, quando comparadas às cepas CL Brener e Y, e sugerem possíveis diferenças no tamanho dos genomas das três cepas.

Como o sequenciamento de genomas de diversas espécies de protozoários tem ocorrido nos últimos anos, uma gama de dados potencialmente informativos é assim disponibilizada, o que propicia a possibilidade de diversos novos estudos. Com relação ao *T. cruzi*, a disponibilidade do genoma da cepa CL Brener (EL-SAYED *et al.*, 2005) e o estudo de BARTHOLOMEU e colaboradores (2008) nos permitiu traçar estratégias para avaliar se há diferenças na abundância dos motivos CpG DNA do genoma de cepas dos diferentes grupos filogenéticos do parasito.

Um dos primeiros indícios de que isso poderia ocorrer foram os achados nos experimentos de hibridização dos DNAs das diferentes cepas com sequências que se co-localizam nas regiões enriquecidas pelos motivos CpG DNA (BARTHOLOMEU *et al.*, 2008). Os dados obtidos sugerem que a cepa Colombiana teria um menor número de cópias dos genes MASP e DGF-1 do que as cepas CL Brener e Y, e conseqüentemente poderia apresentar também menores quantidades dos motivos CpG DNA imunoestimulatórios. Porém,

esses achados foram considerados preliminares, pois as sondas disponíveis para hibridização provinham da cepa CL Brener, sendo que não tínhamos o conhecimento na época do experimento sobre o grau de conservação dessas sequências nos genomas de Y e Colombiana.

Nosso grupo participa de um consórcio envolvido no sequenciamento dos genomas das cepas Y, Colombiana incluídas no presente estudo, além de CL 14 e Arequipa, que são objeto de outros estudos pelo nosso grupo. A partir da disponibilidade desses dados, nós realizamos a quantificação precisa dos motivos CpG sabidamente imunoestimulatórios (BARTHOLOMEU *et al.*, 2008) nos genomas dessas cepas. Também realizamos a quantificação desses motivos, em todas as cepas de *T. cruzi* que tinham dados de genoma disponíveis em bancos de dados, que são: CL Brener, Tulahuén, Esmeraldo e Sylvio (EL-SAYED *et al.*, 2005; FRANZÉN *et al.*, 2011). Assim sendo, cepas de três diferentes grupos de *T. cruzi* foram analisadas quanto à quantidade de motivos CpG nos seus genomas, Tc VI (CL Brener, Tulahuén e CL 14), Tc II (Y e Esmeraldo) e Tc I (Colombiana, Arequipa e Sylvio) (ZINGALES *et al.*, 2012).

Verificamos que os motivos que apresentam alta capacidade imunoestimulatória são muito mais abundantes nos genomas das cepas CL Brener (Tc VI) e Y (Tc II), enquanto que o genoma de Colombiana é enriquecido apenas com motivos CpG que possuem menor capacidade imunoestimulatória. Assim, o genoma de Colombiana deve também ser reconhecido por TLR9, mas apresentar uma capacidade de ativação pequena. Além disso, o genoma de CL Brener também apresenta motivos CpG de menores índices imunoestimulatórios em quantidades estatisticamente similares àsquelas encontradas em Colombiana. Estes dados estão concordantes com os achados *in vivo* e *in vitro* que sugerem uma maior importância de TLR9 na resistência à infecção por CL Brener, sendo de importância intermediária na infecção por Y, e possuindo papel minoritário no controle da infecção por Colombiana.

Análises comparativas incluindo os genomas das cepas Sylvio (TcI), Arequipa (TcI), Esmeraldo (TcII), Tulahuén (TcVI) e CL 14 revelam que o padrão de abundância deste motivos CpG imunoestimulatórios é mantido nas diferentes linhagens evolutivas do parasito. É importante ressaltar, entretanto,

que a abundância dos motivos CpG presentes no genoma de *T. cruzi* é apenas um dos diversos fatores de virulência do parasito, visto que a cepa CL-14 possui quantidades de motivos CpG em seu genoma semelhantes à CL Brener, porém apresenta-se não infectante e não patogênica em camundongos.

O estudo de ANDRADE e colaboradores 2010 mostra que cepas pertencentes a diferentes grupos de *T. cruzi* apresentam padrões distintos de virulência e infecção de células. Foi mostrado neste trabalho que a cepa Colombiana apresentou maior poder de invasão em cardiomiócitos de cultura do que a cepa JG (Tc II), no entanto a replicação intracelular dos parasitos de JG foi mais eficiente do que a cepa Colombiana. Apesar da invasão influenciar na seleção tecidual, esses dados sugerem que o desenvolvimento intracelular é muito importante para determinar o tropismo tecidual do parasito. Um aspecto que seria interessante investigar seria o tempo de associação de cada uma destas cepas no vacúolo parasitóforo, local onde o DNA do parasito é reconhecido pelo TLR9.

Como existem poucos estudos na literatura em que se mostra a variabilidade da resposta imunológica comparativa entre cepas de diferentes grupos de *T. cruzi*, várias perguntas ainda precisam de resposta. No estudo de MENDES e colaboradores (2013), foi feita uma busca no proteoma da cepa CL Brener à procura de epítomos de célula B que poderiam ser utilizados na sorotipagem da doença de Chagas. Neste trabalho a predição de epítomos foi restrita a proteínas codificadas por pares de alelos identificados no genoma de CL Brener. Foram selecionados 150 peptídeos conservados e não conservados derivados do proteoma de CL Brener, que tiveram suas reatividades testadas com o soro de camundongos C57BL/6 infectados com a cepa Colombiana, CL Brener e Y (mesmas cepas utilizadas no presente trabalho). Como CL Brener é uma cepa híbrida derivada de TcII e TcIII, é possível que os epítomos polimórficos nos pares de alelos também poderiam ser polimórficos nos genótipos parentais. Um total de 36 peptídeos foi considerado reativo e interessantemente, a reatividade cruzada entre as cepas foi concordante com a origem evolucionária dos diferentes DTUs de *T. cruzi*. Porém, mesmo utilizando-se o proteoma de CL Brener na busca dos epítomos, um menor número de peptídeos foi reconhecido por soro de animais infectados com CL Brener em comparação com soro de animais infectados com as cepas Y e

Colombiana (FIGURA 26). Nossa hipótese é que a co-expressão de alelos que codificam epítomos polimórficos na cepa híbrida CL Brener poderia afetar os títulos dos anticorpos e/ou sua afinidade para os epítomos variantes. De fato, dois peptídeos polimórficos para os quais verificamos co-expressão dos pares de alelos geram anticorpos de baixa afinidade. Um fenômeno similar, conhecido como cortina de fumaça, foi descrito para a família polimórfica das trans-sialidases de *T. cruzi*. Foi demonstrado diferentes membros desta família possuem uma rede de epítomos de célula B polimórficos que retardam a geração a anticorpos de alta afinidade com capacidade neutralizante comprometendo a geração de uma resposta humoral efetiva contra estas proteínas (PITCOVSKY, *et al.*, 2002). Se esta é uma estratégia mais generalizada de escape do sistema imune, em especial no caso das cepas híbridas, é uma questão a ser investigada. Assim, como demonstrado no presente estudo, o trabalho de MENDES e colaboradores (2013) revela um dos aspectos relacionados às implicações da variabilidade genética do parasito no estabelecimento da resposta imune pelo hospedeiro.

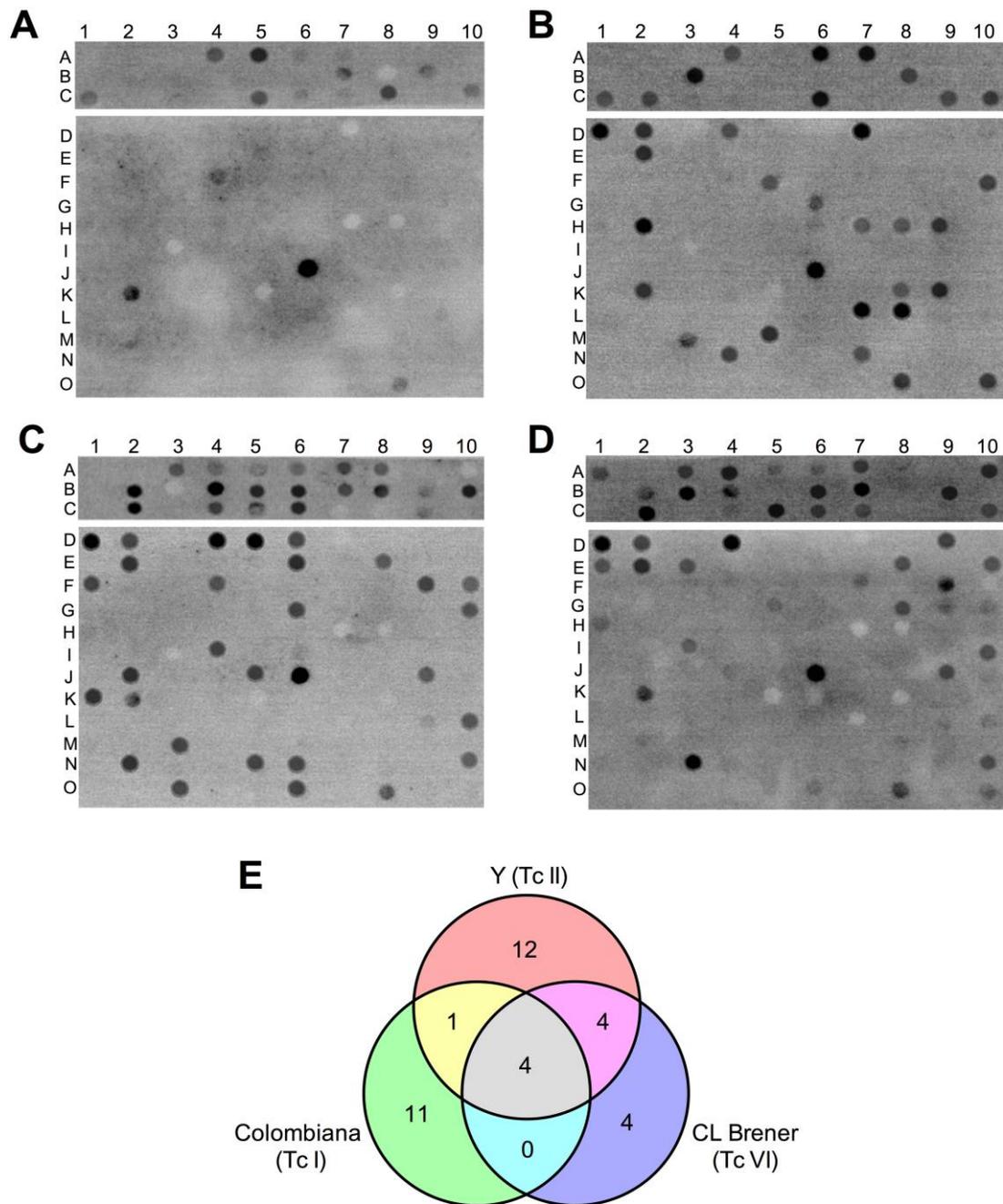


Figure 26 – Teste da reatividade dos peptídeos com soro de camundongos infectados com diferentes cepas de *T. cruzi*. (A) Soro de camundongos não infectados; soro de camundongos infectados com Colombiana (TcI) (B), Y (TcII) (C), e CL Brener (TcVI) (D). (E) Diagrama de Venn mostrando os epitópos específicos e compartilhados entre as cepas de *T. cruzi*.

7 CONCLUSÃO

Em conjunto nossos resultados revelam que a infecção causada por diferentes cepas de *T. cruzi* promove uma ativação diferencial do receptor TLR9, gerando uma produção variável de citocinas pró-inflamatórias que são necessárias para o controle de parasitemia. O conteúdo de motivos CpG nos genomas das diferentes cepas de *T. cruzi* é, portanto, um importante fator que afeta a virulência, patogênese, e adaptação do parasito ao hospedeiro vertebrado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACKERMANN, A. A.; PANUNZI, L. G.; COSENTINO, R. O.; SANCHEZ, D. O.; AGUERO, F. A genomic scale map of genetic diversity in *Trypanosoma cruzi*. *BMC Genomics*, v. 13, p. 736, 2012.

ADACHI, O. *et al.* Targeted disruption of the MyD88 gene results in loss of IL-1- and IL-18-mediated function. *Immunity*, v. 9, p. 143–150, 1998.

AHMAD-NEJAD, P.; HÄCKER, H.; RUTZ, M.; BAUER, S.; VABULAS, R. M.; WAGNER, H. Bacterial CpG-DNA and lipopolysaccharides activate Toll-like receptors at distinct cellular compartments. *Eur. J. Immunol.*, v. 32, p. 1958-68, 2002.

AKIRA, S.; UEMATSU, S.; TAKEUCHI, O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*, v. 124, p. 783– 801, 2006.

ALIBERTI, J. C. S. ; CARDOSO, M. A. G. ; MARTINS, G. A. ; GAZZINELLI, R. T. ; VIEIRA, L. Q. IL-12 mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* infection in mice and is produced by normal murine macrophages in response to live trypomastigote. *Infect Immun*, v. 64, n. 6, p. 1961–1967, 1996.

ALIBERTI, J. C.; MACHADO, F. S.; SOUTO, J. T., CAMPANELLI, A. P.; TEIXEIRA, M. M., GAZZINELLI, R. T.; SILVA, J. S. Chemokines enhance parasite uptake and promote nitric oxide-dependent microbistatic activity in murine inflammatory macrophages infected with *Trypanosoma cruzi*. *Infect. Immun.* v. 67, p. 4819–4826, 1999.

ANDRADE, L. O.; ANDREWS, N. W. Lysosomal fusion is essential for the retention of *Trypanosoma cruzi* inside host cells. *J Exp Med*, v. 200 n. 9, p. 1135-43, 2004.

ANDRADE, L. O.; GALVÃO, L. M. C.; MEIRELLES, M. N. S. L.; CHIARI, E.; PENA, S. D. J., MACEDO, A. M. Differential tissue tropism of *Trypanosome cruzi* strains: an *in vitro* study. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 105, n. 6, p. 834-837, 2010.

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. *Mol Biochem Parasitol* v. 100, p. 163-172, 1999.

ANDRADE, S. G.; CAMPOS, R. F.; SOBRAL, K. S.; MAGALHÃES, J. B.; GUEDES, R. S.; GUERREIRO, M. L. Reinfections with strains of *Trypanosoma cruzi*, of different biotopes as a factor of aggravation of myocarditis and myositis in mice. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v. 39, n. 1, p. 1-8, 2006.

ANDREWS, N. W.; ABRAMS, C. K., SLATIN, S. L.; GRIFITHS, G. A. *T. cruzi*-Secreted Protein Immunologically Related to the Complement Component C9: Evidence for Membrane Pore-Forming Activity at Low pH. *Cell*, v. 61, p. 1277-1287, 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. *Trop. Med. Int. Health.*, v. 9, n. 12, p. 1319-26, 2004.

ANTUNES, M. I.; CARDONI, R. L. IL-12 and IFN-g production, and NK cell activity, in acute and chronic experimental *Trypanosoma cruzi* infections *Immunology Letters*, v. 71 p. 103–109, 2000.

APT, B. W.; HEITMANN, G. I.; JERCIC, L. M. I.; *et al.* Guidelines for the Chagas disease: Part II. Chagas disease in adults, infancy and adolescence. *Rev. Chil. Infectol.*, v. 25, n. 3, p. 194-9, 2008.

BAFICA, A.; SANTIAGO, H. C.; GOLDSZMID, R.; ROPERT, C.; GAZZINELLI, R. T.; SHER, A. Cutting edge: TLR9 and TLR2 signaling together account for MyD88-dependent control of parasitemia in *Trypanosoma cruzi* infection. *J. Immunol.*, v. 177, n. 6, p. 3515-9, 2006.

BARTHOLOMEU, D. C.; ROPERT, C.; MELO, M. B.; PARROCHE, P.; JUNQUEIRA, C. F.; TEIXEIRA, S. M.; SIROIS, C.; KASPERKOVITZ, P.; KNETTER, C. F.; LIEN, E.; LATZ, E.; GOLENBOCK, D. T.; GAZZINELLI, R. T. Recruitment and endo-lysosomal activation of TLR9 in dendritic cells infected with *Trypanosoma cruzi*. *J. Immunol.*, v. 181, n. 2, p. 1333-44, 2008.

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 Res*, v. 37, n. 10, p. 3407-17, 2009.

BEUTLER, B. Inferences, questions and possibilities in Toll-like receptor signalling. *Nature*, v. 430, p. 257, 2004.

BIRON, C. A.; GAZZINELLI, R. T. Effects of IL-12 on immune responses to microbial infections: a key mediator in regulating disease outcome. *Current Opinion in Immunology*, v. 7, p. 485-496, 1995.

BORGES, E. L.; PINHEIRO, M. B.; ELETTO-SILVA, A.; CALIARI, M. V.; RODRIGUES-MACHADO, M. G. Glycogen content is affected differently in acute pulmonary and extra-pulmonary lung injury. *Hum Exp Toxicol.* v. 9, p. 583-90, 2009.

BLANCO, A.; MONTAMAT, E. E. Genetic variation among *Trypanosoma cruzi* populations. *J. Exp. Zool.* v. 282, n. 1-2, p. 62-70, 1998.

- BRENER, Z.; GAZZINELLI, R. T. Immunological control of *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas' disease. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, v. 114, n. 2, p. 103-10, 1997.
- BRISSE, S.; DUJARDIN, J. C.; TIBAYRENC, M. Identification of six *Trypanosoma cruzi* lineages by sequence-characterised amplified region markers. *Mol Biochem Parasitol*, v. 111, n. 1, p. 95-105, 2000.
- BRISSE, S.; VERHOEF, J.; TIBAYRENC, M. Characterisation of large and small subunit rRNA and mini-exon genes further supports the distinction of six *Trypanosoma cruzi* lineages. *Int J Parasitol*, v. 31, p. 1218-1226, 2001.
- BROWN, W. C.; CORRAL, R. S. Stimulation of B lymphocytes, macrophages, and dendritic cells by protozoan DNA. *Microbes Infect.* v. 4, p. 969–974, 2002.
- BUSCAGLIA, C. A.; DI NOIA, J. M. *Trypanosoma cruzi* clonal diversity and the epidemiology of Chagas' disease. *Microbes Infect.*, v. 5, n. 5, p. 419-27, 2003.
- CAETANO, L. C.; DO PADRO, J. C. JR.; TOLDO, M. P.; ABRAHÃO, A. A. *Trypanosoma cruzi*: do different sylvatic strains trigger distinct immune responses? *Exp Parasitol.* v. 124, n. 2, p. 219-24, 2010.
- CAETANO, B. C.; CARMO, B. B.; MEMO, M. B.; CERNY, A.; DOS SANTOS, S. L.; BARTHOLOMEU, D. C.; GOLENBOCK, D. T.; GAZZINELLI, R. T. Requirement of UNC93B1 reveals a critical role for TLR7 in host resistance to primary infection with *Trypanosoma cruzi*. *J Immunol*, v.187, n. 4, p. 1903-11, 2011.
- CALIARI, M. V. Princípios de morfometria digital: KS300 para iniciantes. Editora UFMG, 149 páginas, 1997.
- CAMPOS, M. A.; ALMEIDA, I. C.; TAKEUCHI, O.; AKIRA, S.; VALENTE, E. P.; PROCÓPIO D. O.; TRAVASSOS, L. R.; SMITH, J. A.; GOLENBOCK, D. T.; GAZZINELLI, R. T. Activation of Toll-like receptor-2 by glycosylphosphatidylinositol anchors from a protozoan parasite. *J. Immunol.*, v. 167, n. 1, p. 416-23, 2001.
- CAMPOS, M. A. ; CLOSEL, M. ; VALENTE, E. P. ; CARDOSO, J. E. ; AKIRA, S. ; ALVAREZ-LEITE, J. I. ; ROPERT, C. ; GAZZINELLI, R. T. Impaired production of proinflammatory cytokines and host resistance to acute infection with *Trypanosoma cruzi* in mice lacking functional myeloid differentiation factor 88. *J. Immunol.* v. 172, p. 1711–1718, 2004.
- CARDILLO, F. ; VOLTARELLI, J. C. ; REED, S. G. ; SILVA, J. S. Regulation of *Trypanosoma cruzi* infection in mice by gamma interferon and interleukin 10: role of NK cells. *Infect Immun*, v. 64, n. 1, p. 128-34, 1996.

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

CHAGAS, C.; Nova entidade mórbida do homem. Rezumo geral de estudos etiológicos e clínicos. *Mem. Inst Oswaldo Cruz*, v. 3, p. 219-275, 1911a.

CHANDRASEKAR, B.; MELBY, P. C.; TROYER, D. A., FREEMAN, G. L. Induction of proinflammatory cytokine expression in experimental acute Chagasic cardiomyopathy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* v. 223, p. 365–71, 1996.

CHENG, K. Y.; CHANG, C. D.; SALBILLA, V. A.; KIRCHHOFF, L. V.; LEIBY, D. A. SCHOCHETMAN, G.; SHAH, D. O. Immunoblot Assay Using Recombinant Antigens Supplemental Test To Confirm the Presence of Antibodies to *Trypanosoma cruzi*. *Clinical and Vaccine Immunology*, v. 14, n. 4, p. 355-361, 2007.

CHUANG, T. H.; ULEVITCH, R. J. Cloning and characterization of a sub-family of human Toll-like receptors: hTLR7, hTLR8 and hTLR9. *Eur. Cytokine Network* v. 11, p. 372, 2000.

CHUANG, T. H; ULEVITCH, R. J. Identification of hTLR10: a novel human Toll-like receptor preferentially expressed in immune cells. *Biochim. Biophys. Acta.* v. 1518, p. 157, 2001.

COBAN, C. *et al.* Toll-like receptor 9 mediates innate immune activation by the malaria pigment hemozoin. *J. Exp. Med.* v. 201, p. 19–25, 2005.

COURA, J. R. Chagas disease: what is known and what is needed – a background article. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 102, suppl. 1, p. 113-22, 2007.

COURA, J. R. Epidemiologic determinants of Chagas' disease in Brazil: the infection, the disease and its morbidity/mortality. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 83 suppl. 1, p. 392-402, 1988.

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. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 78, n. 3, p. 363-72, 1983.

COURA, J. R.; BORGES-PEREIRA, J. Chagas disease: 100 years after its discovery. A systemic review. 2010 Jul-Aug; *Acta Trop.* v. 115, n. 1-2, p. 5-13, 2010.

COURA, J. R.; DIAS, J. C. P. Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease – 100 years after its discovery. *Mem do Ins Oswaldo Cruz.* v. 104, p. 31-40, 2009.

COURA, J. R.; JUNQUEIRA, A. C.; BÓIA, M. N.; FERNANDES, O. Chagas disease: from bush to huts and houses. Is it the case of the Brazilian Amazon?. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 94, suppl. 1, p. 379-84, 1999.

COURA, J. R.; JUNQUEIRA, A. C.; FERNANDES, O.; VALENTE, S. A.; MILES, M. A. *Trends Parasitol.*, v. 18, n. 4, p. 171-6, 2002.

CUNHA-NETO, E.; DURANTI, M.; GRUBER, A.; ZINGALES, B.; DE MESSIAS, 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. *Proc. Nati. Acad. Sci. U. S. A.*, v. 92, n. 8, p. 3541-5, 1995.

DA SILVA, N. N.; CLAUSELL, D. T.; NÓLIBOS, H.; DE MELO, A. L.; OSSANAI, J.; RAPONE, T.; SNELL, T. Epidemic outbreak of Chagas disease probably due to oral contamination. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, v. 10, n. 5, p. 265-76, 1968.

DE FREITAS, J. M.; AUGUSTO-PINTO, L.; PIMENTA, J. R.; BASTOS-RODRIGUES, L.; GONÇALVES, V. F. *et al.* Ancestral genomes, sex, and the population structure of *Trypanosoma cruzi*. *PLoS Pathog*, v. 2, p. 24, 2006.

DEBIERRE-GROCKIEGO, F.; AZZOUZ, N.; SCHMIDT, J.; DUBREMETZ, J. F.; GEYER, H.; GEYER, R.; WEINGART, R.; SCHMIDT, R. R.; SCHWARZ, R. T. Roles of glycosylphosphatidylinositols of *Toxoplasma gondii*. Induction of tumor necrosis factor- α production in macrophages. *J. Biol. Chem.*, v. 278, p. 32987-93, 2003.

DE VEER, M. J.; CURTIS, J. M.; BALDWIN, T. M.; DIDONATO, J. A.; SEXTON, A.; MCCONVILLE, M. J.; HANDMAN, E.; SCHOFIELD, L. MyD88 is essential for clearance of *Leishmania major*: possible role for lipophosphoglycan and Toll-like receptor 2 signaling. *Eur. J. Immunol.* v. 33, n. 10, p. 2822-31, 2003.

DENKERS, E. Y.; BUTCHER, B. A. Sabotage and exploitation in macrophages parasitized by intracellular protozoans. *Trends Parasitol*, v. 21, n. 1, p. 35-41, 2005.

DIAS, J.; SCHOFIELD, C. The evolution of Chagas disease [American trypanosomiasis] control after 90 years since Carlos Chagas discovery. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 94, suppl. 1, p. 103-21, 1999.

DIAS, J. C. P.; SILVEIRA, A. C.; SCHOFIELD, C. J. The impact of Chagas disease control in Latin America: a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. v. 97 n. 5, p. 603-12, 2002.

DI NOIA, J. M.; BUSCAGLIA, C. A.; DE MARCHI, C. R.; ALMEIDA, I. C.; FRASCH, A. C. A *Trypanosoma cruzi* small surface molecule provides the first immunological evidence that Chagas' disease is due to a single parasite lineage. *J. Exp. Med.*, v. 195, p. 401-413, 2002.

DOBROVOLSKAIA, M. A.; VOGEL, S. N. Toll receptors, CD14, and macrophage activation and deactivation by LPS. *Microbes Infect.* v. 4, p. 903–914, 2002.

DRENNAN, M. B. STIJLEMANS, B.; VAN DEN ABEELE, J.; QUESNIAUX, V. J.; BARKHUIZEN, M.; BROMBACHER, F.; DE BAETSELIER, P.; RYFFEL, B.; MAGEZ, S. The induction of a type 1 immune response following a *Trypanosoma brucei* infection is MyD88 dependent. *J. Immunol.* 175, 2501–2509, 2005.

DU, X.; POLTORAK, A.; WEI, Y.; BEUTLER, B. Three novel mammalian toll-like receptors: gene structure, expression, and evolution. *Eur Cytokine Netw*, v. 11, n. 3, p. 362-71, 2000.

DUNNE, A.; EJDEBACK, M.; LUDIDI, P. L. ; O'NEILL, L. A.; GAY, N. J. Structural complementarity of Toll/interleukin-1 receptor domains in Toll-like receptors and the adaptors Mal and MyD88. *J Biol Chem.* 2003 v. 278, n. 42, p. 41443-51, 2003.

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.; ONTEMPI, 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.

FRANÇA, J. L.; VASCONCELLOS, A. C. Normalização de Publicações Técnico-Científicas. 8. ed. rev. e ampl. Belo Horizonte: UFMG, 2007. 255p.

FRANZÉN, O.; OCHAYA, S.; SHERWOOD, E.; LEWIS, W. D.; LLEWELLYN, M. S.; MILES, M. A.; ANDERSON, B. Shotgun sequencing analysis of *Trypanosoma cruzi* I Sylvio X10/1 and comparison with *T. cruzi* VI CL Brener. *PLoS Negl Trop Dis.* v. 8, p. 5, n. 3, 2011.

FREITAS, L. M.; DOS SANTOS, S. L.; RODRIGUES-LUIZ, G. F.; MENDES, T. A.; RODRIGUES, T. S.; GAZZINELLI, R. T.; TEIXEIRA, S. M.; FUJIWARA, R. T.; BARTHOLOMEU, D. C. Genomic analyses, gene expression and antigenic profile of the trans-sialidase superfamily of *Trypanosoma cruzi* reveal an undetected level of complexity. *PLoS One* v. 6, p. 10, 2011.

GAO, W.; PEREIRA, M. A. Interleukin-6 is required for parasite specific response and host resistance to *Trypanosoma cruzi*. *Int J Parasitol.* v. 32, n. 2, p. 167-70, 2002.

GAY, N. J.; KEITH, F. J. *Drosophila* Toll and IL-1 receptor. *Nature*, v. 351, p. 355, 1991.

GAZZINELLI, R. T.; DENKERS, E. Y. Protozoan encounters with Toll-like receptor signalling pathways: implications for host parasitism. *Nat. Rev. Immunol.*, v. 6, n. 12, p. 895-906, 2006.

GAZZINELLI, R. T.; OSWALD, I. P.; HIENY, S.; JAMES, S. L.; SHER, A. The microbicidal activity of interferon-g treated macrophages against *Trypanosoma cruzi* involves an L-arginine-dependent, nitrogen oxide-mediated mechanism inhibitable by IL-10 and transforming growth factor- β . *Eur. J. Immunol.* v. 22, p. 2501–2506, 1992.

GAZZINELLI, R. T.; ROPERT, C.; CAMPOS, M. A. Role of the Toll/interleukin-1 signaling pathway in host resistance and pathogenesis during infection with protozoan parasites. *Immunol Rev.*, v. 201, p. 9-25, 2004.

GOLGHER, D.; GAZZINELLI, R. T. Innate and acquired immunity in the pathogenesis of Chagas disease. *Autoimmunity*, v. 37, n. 5, p. 399-409, 2004.

GRAVINA, H. D.; ANTONELLI, L.; GAZZINELLI, R. T.; ROPERT, C. Differential use of TLR2 and TLR9 in the regulation of immune responses during the infection with *Trypanosoma cruzi*. *PLoS One*, v. 8, n. 5, e63100, 2013.

GUEDES, P. M.; VELOSO, V. M.; AFONSO, L. C.; CALIARI, M. V.; CARNEIRO, C. M.; DINIZ, L. F.; MARQUES-DA-SILVA, E. A.; CALDAS, I. S.; DO VALLE MATTA, M. A.; SOUZA, S. M.; LANA, M.; CHIARI, E.; GALVÃO, L. M.; BAHIA, M. T. Development of chronic cardiomyopathy in canine Chagas disease correlates with high IFN- γ , TNF- α , and low IL-10 production during the acute infection phase. *Vet Immunol Immunopathol.* v. 130, n. 1-2, p. 43-52, 2009.

HARRIS, T. H.; COONEY, N. M.; MANSFIELD, J. M.; PAULNOCK, D. M. Signal transduction, gene transcription, and cytokine production triggered in macrophages by exposure to trypanosome DNA. *Infect. Immun.* v. 74, p. 4530–4537, 2006.

HASAN, U.; CHAFFOIS, C.; GAILLARD, C.; SAULNIER, V.; MERCK, E.; TANCREDI, S.; GUIET, C.; BRIÈRE, F.; VLACH, J.; LEBECQUE, S.; TRINCHIERI, G.; BATES, E. E. Human TLR10 is a functional receptor, expressed by B cells and plasmacytoid dendritic cells, which activates gene transcription through MyD88. *J Immunol.* v. 174, n. 5, p. 2942-50, 2005.

HEGUY, A.; BALDARI, C. T. MACCHIA, G.; TELFORD, J. L.; MELLI, M. Amino acids conserved in interleukin-1 receptors (IL-1Rs) and the *Drosophila* toll protein are essential for IL-1R signal transduction. *J. Biol. Chem.* v. 267, p. 2605, 1992.

HEMMI, H.; TAKEUCHI, O.; KAWAI, T.; KAISHO, T.; SATO, S.; SANJO, H.; MATSUMOTO, M.; HOSHINO, K.; WAGNER, H.; TAKEDA, K.; AKIRA, S. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature*, v. 408, n. 6813, p. 740-5, 2000.

HIBBS, J. B. Jr.; TAINTOR, R. R.; VAVRIN, Z.; RACHLIN, E. M. Nitric oxide: a cytotoxic activated macrophage effector molecule. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v. 157, n. 1, p. 87-94, 1988.

HOSHINO, K.; TAKEUCHI, O.; KAWAI, T. Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product. *J Immunol* v. 162, p. 3749-3752, 1999.

HUNTER, C. A.; ELLIS-NEYES, L. A.; SLIFER, T.; KANALY, S.; GRUNIG, G.; FORT, M.; RENNICK, D.; ARAUJO, F. G. IL-10 is required to prevent immune hyperactivity during infection with *Trypanosoma cruzi*. *J Immunol*, v. 158, n. 7, p. 3311-6, 1997.

IWASAKI, A.; MEDZHITOV, R. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat. Immunol.*, v. 5, n. 10, p. 987-95, 2004.

JANEWAY, C. A. Jr. How the immune system works to protect the host from infection: a personal view. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, v. 98, p. 7461-7468 2001.

JANSSENS, S.; BEYAERT, R. Role of Toll-like receptors in pathogen recognition. *Clin. Microbiol. Rev.*, v. 16, n. 4, p. 637-46, 2003.

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, 2010.

KRIEG, A. M. Lymphocyte activation by CpG dinucleotide motifs in prokaryotic DNA. *Trends Microbiol.* v. 4, p.73-76, 1996.

KRIEG, A. M. CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects. *Annual Review of Immunology*, v. 20, p. 709-760, 2002.

KRISHNEGOWDA, G.; HAIJAR, A. M.; ZHU, J.; DOUGLASS, E. J.; UEMATSU, S.; AKIRA, S.; WOODS, A. S.; GOWDA, D. C. Induction of proinflammatory responses in macrophages by the glycosylphosphatidylinositols of *Plasmodium falciparum*: cell signaling receptors, glycosylphosphatid ylinositol (GPI) structural requirement, and regulation of GPI activity. *J. Biol. Chem.*, v. 280, p. 8606–8616, 2005.

KUZIEL, W. A.; MORGAN, S. J.; DAWSON, T. C.; GRIFFIN, S.; SMITHIES, O.; LEY, K.; MAEDA, N. Severe reduction in leukocyte adhesion and monocyte extravasation in mice deficient in CC chemokine receptor 2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 94, p. 12053–12058, 1997.

LI, L.; STOECKERT, C. J. JR.; ROOS, D. S. OrthoMCL: identification of ortholog groups for eukaryotic genomes. *Genome Res*, v. 13, n. 9, p. 2178-89, 2003.

LEIRIÃO, P.; RODRIGUES, C. D.; ALBUQUERQUE, S. S.; MOTA, M. M. Survival of protozoan intracellular parasites in host cells. *Embo rep*, v. 5, n. 12, p. 1142-7, 2004.

LEMAITRE, B.; NICOLAS, E.; MICHAUT, L.; REICHHART, J. M.; HOFFMAN, J. A. 1996. The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell*, v. 86, p. 973, 1996.

LEWINSOHN, R. Carlos Chagas and the discovery of Chagas' disease (American trypanosomiasis). *J. R. Soc. Med.*, v. 74, n. 6, p. 451-5, 1981.

LEWINSOHN, R. Prophet in his own country: Carlos Chagas and the Nobel Prize. *Perspect. Biol. Med.*, v. 46, n. 4, p. 532-49, 2003.

LIEN, E.; INGALLS, R. R. Toll-like receptors. *Crit. Care Med.* v. 30, p. S1–S11, 2002.

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. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.*, v. 99, p. 1-12, 2004.

MACEDO, A. M.; OLIVEIRA, R. P.; PENA, S. D. Chagas disease: role of parasite genetic variation in pathogenesis. *Expert. Rev. Mol. Med.*, v. 5, p. 1-16, 2002.

MACEDO, G. C.; MAGNANI, D. M.; CARVALHO, N. B.; BRUNA-ROMERO, O.; GAZZINELLI, R. T.; OLIVEIRA, S. C. Central role of MyD88-dependent dendritic cell maturation and proinflammatory cytokine production to control *Brucella abortus* infection. *J. Immunol*, v. 180, p. 1080–1087, 2008.

MACEDO A. M.; PENA S. D. Genetic Variability of *Trypanosoma cruzi*: implications for the Pathogenesis of Chagas Disease. *Parasitol. Today*, v. 14, n. 3, p. 119-24, 1998.

MACEDO, A. M.; SEGATTO, M. Implications of *Trypanosoma cruzi* Intraspecific Diversity in the Pathogenesis of Chagas Disease. In: American Trypanosomiasis Chagas Disease: One Hundred Years of Research. TELLERIA J.; TIBAYRENC, M., editors. London: Elsevier. p489, 2011.

MAGEZ, S. STIJLEMANS, B.; RADWANSKA, M.; PAYS, E.; FERGUSON, M. A.; DE BAETSELIER, P. The glycosyl-inositol-phosphate and dimyristoylglycerol moieties of the glycosylphosphatidylinositol anchor of the trypanosome variant-specific surface glycoprotein are distinct macrophage activating factors. *J. Immunol.* v. 160, p. 1949–1956, 1998.

MALTOS, K. L.; MENEZES, G. B.; CALIARI, M. V.; ROCHA, O. A., SANTOS, J. M.; ALVES, D. L.; DUARETE, I. D.; FRANCISCHI, J. N. 2004. Vascular and cellular responses to pro-inflammatory stimuli in rat dental pulp. *Arch. Oral Biol.* v. 49, p. 443–450, 2004.

MATSUMOTO, M.; FUNAMI, K.; TANABE, M.; OSHIUMI, H.; SHINGAI, M.; SETO, Y.; YAMAMOTO, A.; SEYA, T. Subcellular localization of Toll-like receptor 3 in human dendritic cells. *J Immunol.* v. 171, n. 6, p. 3154-62, 2003.

McCONVILLE, M. J.; SCHNUR, L. F.; JAFFE, C. e SCHNEIDER, P. Structure of *Leishmania* lipophosphoglycan: inter- and intra-specific polymorphism in Old World species. *Biochem. J.* 310, 807–818, 1995.

MEDZHITOV, R.; JANEWAY, C. A. Jr. Innate immune recognition and control of adaptative immune responses. *Semin Immunol.* v. 10, n. 5, p. 351-3, 1998.

MEDZHITOV, R.; PRESTON-HURLBURT, P.; JANEWAY, C. A. Jr. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 388: 394, 1997.

MENDES, T. A. O.; CUNHA, J. L. R.; LOURDES, R. A.; RODRIGUES-LUIZ, G. F.; LEMOS, D. L.; DOS SANTOS, R. R. A.; CÂMARA, A. C. J.; GALVÃO, L. M. C.; BERN, C.; GILMAN, R. H.; FUJIWARA, R. T.; GAZZINELLI, R. T.; BARTHOLOMEU, D. C. Identification of strain-specific B-cell epitopes in *Trypanosoma cruzi* using genome-scale epitope prediction and high-throughput immunoscreening with peptide arrays. *Plos Negl Trop Dis* NO PRELO.

MENDES, R. M.; SILVA, G. A.; CALIARI, M. V.; SILVA, E. E.; LADEIRA, L. O.; FERREIRA, A. J. Effects of single wall carbon nanotubes and its functionalization with sodium hyaluronate on bone repair. *Life Sci.*, v. 87, n. 7-8, p. 215-22, 2010.

MENDES, T. A.; LOBO, F. P.; RODRIGUES, T. S.; RODRIGUES-LUIZ, G. F.; DAROCHA, W. D.; FUJIWARA, R. T.; TEIXEIRA, S. M.; BARTHOLOMEU, D. C. Repeat-enriched proteins are related to host cell invasion and immune evasion in parasitic protozoa. *Mol Biol Evol.* v. 30, n. 4, p. 951-63, 2013.

MICHAILOWSKY, V.; MURTA, S. M. F.; CARVALHO-OLIVEIRA, L.; PEREIRA, M. E. S.; FERREIRA, L. R. P.; BRENER, Z.; ROMANHA, A. J.; GAZZINELLI, R. T. Interleukin-12 enhances in vivo parasitocidal effect of benznidazole during acute experimental infection with a naturally drug-resistant strain of *Trypanosoma cruzi*. *Antimicrob Agents Chemother.* v. 42, n. 10, p. 2549-56, 1998.

MILES, M. A.; CEDILLOS, R. A.; PÓVOA, 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.* 1981 v. 1, n. 8234, p. 1338-40, 1981.

MILES, M. A.; FELICIANGELI, M. D.; DE ARIAS, A. R. American trypanosomiasis (Chagas' disease) and the role of molecular epidemiology in guiding control strategies. *B. M. J.*, v. 326, n. 7404, p. 1444-8, 2003.

MILES, M. A.; LLEWELLYN, M.; LEWIS, M. D.; YEO, M.; BALEELA, S.; FITZPATRICK, S.; GAUNT, M. W.; MAURICIO, I. L. The molecular epidemiology and phylogeography of *Trypanosoma cruzi* and parallel research on *Leishmania*: looking back and to the future. *Parasitology.* v. 136:, p. 1509-1528, 2009.

MONCAYO, A. Chagas disease: current Epidemiological trends after the interruption of vectorial and transfusional transmission in the Southern Cone countries. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 98, n. 5, p. 577-91, 2003.

MURAILLE, E. *et al.* Genetically resistant mice lacking MyD88-adaptor protein display a high susceptibility to *Leishmania major* infection associated with a polarized TH2 response. *J. Immunol.* 170, 4237–4241, 2003.

NOBEL PRIZE, 2011. http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/2011/press.html Acesso em: 10/10/2013.

NOGUEIRA, N.; ELLIS, J.; CHAPLAN, S.; COHN, Z. *Trypanosoma cruzi*: in vivo and *in vitro* correlation between T-cell activation and susceptibility in inbred strains of mice. *Exp Parasitol.* v. 51, n. 3, p. 325-34, 1981.

OKUSAWA, T.; FUJITA, M.; NAKAMURA, J.; INTO, T.; YASUADA, M.; YOSHIMURA, A.; HARA, Y.; HASEBE, A.; GOLENBOCK, D. T.; MORITA, M.; KUROKI, Y.; OGAWA T.; SHIBATA, K. Relationship between structures and biological activities of mycoplasmal diacylated lipopeptides and their recognition by Toll-like receptors 2 and 6. *Infect Immun.*, v. 72, n. 3, p. 1657-65, 2004.

OLIVEIRA, A. C.; PEIXOTO, J. R.; DE ARRUDA, L. B.; CAMPOS, M. A.; GAZZINELLI, R. T.; GOLENBOCK, D. T.; AKIRA, S.; PREVIATO, J. O.; MENDONÇA-PREVIATO, L.; NOBREGA, A.; BELLIO, M. Expression of functional TLR4 confers proinflammatory responsiveness to *Trypanosoma cruzi* glycoinositolphospholipids and higher resistance to infection with *T. cruzi*. *J. Immunol.*, v. 173, p. 5688–5696, 2004.

O'NEILL, L. A.; FITZGERALD, K. A.; BOWIE, A. G. The Toll-IL-1 receptor adaptor family grows to five members. *Trends Immunol.* v. 24, p. 286–290, 2003.

OZINSKY, A.; UNDERHILL, D. M.; FONTENOT, J. D.; HAJJAR, A. M.; SMITH, K. D.; WILSON, C. B.; SCHROEDER, L.; ADEREM, A. The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between Toll-like receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 97, p. 13766, 2000.

PACHECO, C. M.; QUEIROZ-JUNIOR, C. M.; MALTOS, K. L.; CALIARI, M. V.; PACHECO, D. F.; DUARTE, I. D.; FRANCISCHI, J. N. Crucial role of peripheral kappa-opioid receptors in a model of periodontal disease in rats. *J Periodontal Res*, p. 6, v. 730-6, 2008.

PARROCHE, P.; LAUW, F. N.; GOUTAGNY, N.; LATZ, E.; MONKS, B. G.; VISINTIN, A.; HALMEN, K. A.; LAMPHIER, M.; OLIVIER, M.; BARTHOLOMEU, D. C.; GAZZINELLI, R. T.; GOLENBOCK, D. T. Malaria hemozoin is immunologically inert but radically enhances innate responses by presenting malaria DNA to Toll-like receptor 9. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, v. 104, n. 6, p. 1919-24, 2007.

PERLETH, M. The discovery of Chagas' disease and the formation of the early Chagas disease concept. *History and Philosophy of the Life Sciences*, v. 19, p. 211-236, 1997.

PITCOVSKY, T. A.; BUSCAGLIA, C. A.; MUCCI, J.; CAMPETELLA, O. A functional network of intramolecular cross-reacting epitopes delays the elicitation of neutralizing antibodies to *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase. *J Infect Dis*, v. 186, p. 397-404, 2002.

POLTORAK, A.; HE, X.; SMIRNOVA, I.; LIU, M. Y.; VAN HUFFEL, C.; DU, X.; BIRDWELL, D.; ALEJOS, E.; SILVA, M.; GALANOS, C.; FREUDENBERG, M.; RICCIARDI-CASTAGNOLI, P.; LAYTON, B.; BEUTLER, B. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: Mutations in Tlr4 gene. *Science*, v. 282, p. 2085-2088, 1998.

PORTELA-LINDOSO, A. A.; SHIKANAI-YASUDA, M. A. Chronic Chagas' disease: from xenodiagnosis and hemoculture to polymerase chain reaction. *Rev. Saúde Pública*, v. 37, n. 1, p. 107-15, 2003.

PUNUKOLLU, G.; GOWDA, R. M.; KHAN, I. A. Early twentieth century descriptions of Chagas heart disease. *Int. J. Cardiol.*, v. 95, n. 2-3, p. 347-9, 2004.

ROCK, F. L.; HARDIMAN, G.; TIMANS, J. C.; KASTELEIN, R. A.; BAZAN, J. F. A family of human receptors structurally related to Drosophila Toll. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 95, p. 588, 1998.

RODRIGUES, C. M.; VALADARES, H. M. S.; FRANCISCO, F. A.; ARANTES, J. M.; CAMPOS, F. C.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; MARTINS-FILHO, O. A.; ARAUJO, M. S. S.; ARANTES, R. M. E.; CHIARI, E.; FRANCO, G. R.; MACHADO, C. R.; PENA, S. D. J.; FARIA, A. M. C.; MACEDO, A. M. Coinfection with different *Trypanosoma cruzi* strains interferes with the host immune response to infection. *Plos Negl Trop Dis*, v. 4, n.10, 2010.

ROFFÊ, E.; ROTHFUCHS, A. G.; SANTIAGO, H. C.; MARINO, A. P.; RIBEIRO-GOMES, F. L.; ECKHAUS, M.; ANTONELLI, L. R.; MURPHY, P. M. IL-10 limits parasite burden and protects against fatal myocarditis in a mouse model of *Trypanosoma cruzi* infection. *J Immunol*, v. 188, n. 2, p. 649-60, 2012.

ROGGERO, E.; PEREZ, A.; TAMAE-KAKAZU, M.; PIAZZON, I.; NEPOMMASCHY, I.; WIETZEBIN, J.; SERRA, E.; REVELLI, S.; BOTTASSO, O. Differential susceptibility to acute *Trypanosoma cruzi* infection in BALB/c and C57BL/6 mice is not associated with a distinct parasite load but cytokine abnormalities. *Clin. Exp. Immunol.*, v. 128, n. 3, p. 421-8, 2002.

ROPERT, C; ALMEIDA, I. C.; CLOSEL, M.; TRAVASSOS, L. R.; FERGUSON, M. A.; COHEN, P.; GAZZINELLI, R.T. Requirement of mitogen-activated protein kinases and I kappa B phosphorylation for induction of proinflammatory cytokines synthesis by macrophages indicates functional similarity of receptors triggered by glycosylphosphatidylinositol anchors from parasitic protozoa and bacterial lipopolysaccharide. *J Immunol.*, v. 166, n. 5, p. 3423-31, 2001.

ROPERT C, FERREIRA LR, CAMPOS MA, PROCÓPIO DO, TRAVASSOS LR, FERGUSON MA, REIS LF, TEIXEIRA MM, ALMEIDA IC, GAZZINELLI RT. Macrophage signaling by glycosylphosphatidylinositol-anchored mucin-like glycoproteins derived from *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes. *Microbes Infect.*, v. 4, n. 9, p. 1015-25, 2002.

ROPERT, C.; GAZZINELLI, R. T. Regulatory role of Toll-like receptor 2 during infection with *Trypanosoma cruzi*. *J. Endotoxin Res.* v. 10, p. 425–430, 2004.

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* or *Trypanosoma brucei*. *Infect Immun*, v. 61, n. 12, p. 5129-33, 1993.

ROTTENBERG, M, E.; CARDONI, R. L.; ANDERSSON, R.; SEGURA, E. L.; ORN, A. Role of T helper/inducer cells as well as natural killer cells in resistance to *Trypanosoma cruzi* infection. *Scand J Immunol.*, v. 28, n. 5, p. 573-82, 1988.

SERBINA, N. V.; JIA, T.; HOHL, T. M.; PAMER, E. G. Monocyte mediated defense against microbial pathogens. *Annu. Rev. Immunol.* v. 26, p. 421–452, 2008.

SHARMA, S.; DeOLIVEIRA, R. B.; KALANTARI, P.; PARROCHE, P.; GOUTAGNY, N.; JIANG, Z.; CHAN, J.; BARTHOLOMEU, D. C.; LAUW, F.; HALL, J. P.; BARBER, G. N.; GAZZINELLI, R. T.; FITZGERALD, K. A.; GOLENBOCK, D. T. Innate immune recognition of an AT-rich stem-loop DNA motif in the *Plasmodium falciparum* genome. *Immunity*. v. 35, n. 2, p. 194-207, 2011.

SHIKANAI-YASUDA, M. A.; MARCONDES, C. B.; GUEDES, L. A.; SIQUEIRA, G. S.; BARONE, A. A.; DIAS, J. C.; AMATO NETO, V.; TOLEZANO, J. E.; PERES, B. A.; ARRUDA JÚNIOR, E. R.; *et al.* Possible oral transmission of acute Chagas' disease in Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, v. 33, n. 5, p. 351-7, 1991.

SHIMOSATO, T.; KIMURA, T.; TOHNO, M.; ILIEV I. D.; KATOH, S.; ITO, Y.; KAWAY, Y.; SASAKI, T.; SAITO, T.; KITAZAWA, H. Strong immunostimulatory activity of AT-oligodeoxynucleotide requires a six-base loop with a self-stabilized 5'-C...G-3' stem structure. *Cell Microbiol*, v. 8, n. 3, p. 485-95, 2006.

SHIMOSATO, T.; KITAZAWA, H.; KATOH, S.; TOHNO, M.; ILIEV, I. D.; NAGASAWA, C.; KIMURA, T.; KAWAI, Y.; SAITO, T. Augmentation of T(H)-1 type response by immunoactive AT oligonucleotide from lactic acid bacteria via Toll-like receptor 9 signaling. *Biochem Biophys Res Commun*. v. 326, n. 4, p. 782-7, 2005.

SHODA, L. K.; KEGERREIS, K. A.; SUAREZ, C. E.; RODITI, I.; CORRAL, R. S.; BERTOT, G. M.; NORIMINE, J.; BROWN, W. C. DNA from protozoan parasites *Babesia bovis*, *Trypanosoma cruzi*, and *T. brucei* is mitogenic for B lymphocytes and stimulates macrophage expression of interleukin-12, tumor necrosis factor alpha, and nitric oxide. *Infection and Immunity* 69, 2162-2171, 2001.

SILVA, J. S.; VESPA, G. N.; CARDOSO, M. A.; ALIBERTI, J. C.; CUNHA, F. Q. Tumor necrosis factor alpha mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* infection in mice by inducing nitric oxide production in infected gamma interferon-activated macrophages. *Infect Immun*, v. 63, n. 12, p. 4862-7, 1995.

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

SOUZA, R. T.; LIMA, F. M.; BARROS, R. M.; CORTEZ, D. R. SANTOS, M. F.; CORDERO, E. M.; RUIZ, J. C.; GOLDENBERG, S.; TEIXEIRA, M. M.; DA SILVEIRA, J. F. Genome size, karyotype polymorphism and chromosomal evolution in *Trypanosoma cruzi*. *PLoS One*, v. 6, n. 8, 2011.

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

SUZUKI, R.; SHIMODAIRA, H. Pvclost: an R package for assessing the uncertainty in hierarchical clustering, *Bioinformatics*, v. 22, n. 12, p. 1540-2, 2006.

TAKEUCHI, O.; AKIRA, S. MyD88 as a bottle neck in Toll/IL-1 signaling. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* v. 270, p. 155–167, 2002.

TAKEUCHI, O.; AKIRA, S. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell.* v. 140, n. 6, p. 805-20, 2010.

TAKEUCHI, O.; HOSHINO, K.; KAWAI, T.; SANKO, H.; TAKADA, T. OGAWA, T.; TAKEDA, S. AKIRA, S. Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of Gram-negative and Gram-positive bacterial cell wall components. *Immunity* v. 11, p. 443, 1999.

TAKEUCHI, O.; KAWAI, T.; SANJO, H.; COPELAND, N. G.; GILBERT, D. J.; JENKINS, N. A.; TAKEDA, K.; AKIRA, S. TLR6: A novel member of an expanding Toll-like receptor family. *Gene*, v. 231, p. 59-65, 1999.

TALVANI, A.; RIBEIRO, C. S.; ALIBERTI, J. C.; MICHAILOWSKY, V.; SANTOS, P. V.; MURTA, S. M.; ROMANHA, A. J.; ALMEIDA, I. C.; FARBER, J.; LANNES-VIEIRA, J.; SILVA, J. S.; GAZZINELLI, R. T. Kinetics of cytokine gene expression in experimental chagasic cardiomyopathy: tissue parasitism and endogenous IFN-gamma as important determinants of chemokine mRNA expression during infection with *Trypanosoma cruzi*. *Microbes Infect.* v. 2, n. 8, p. 851-66, 2000.

TALVANI, A.; SANTANA, G.; BARCELOS, L. S.; ISHII, S.; SHIMIZU, T.; ROMANHA, A. J.; SILVA, J. S.; SOARES, M. B.; TEIXEIRA, M. M. Experimental *Trypanosoma cruzi* infection in platelet-activating factor receptor-deficient mice. *Microbes Infect.* v. 5, p. 789–796, 2003.

TANJI, T.; IP, Y. T. Regulators of the Toll and Imd pathways in the *Drosophila* innate immune response. *Trends Immunol*, v. 26, n. 4, p. 193-8, 2005.

TRUYENS, C.; ANGELO-BARRIOES, A.; TORRICO, F.; VAN DAMME, J.; HEREMANS, H.; CARLIER, Y. Interleukin-6 (IL-6) production in mice infected with *Trypanosoma cruzi*: effect of its paradoxical increase by anti-IL-6 monoclonal antibody treatment on infection and acute-phase and humoral immune responses. *Infect. Immun.* v. 62, p. 692–6, 1994.

TEIXEIRA, A. R.; NASCIMENTO, R. J.; STURM, N. R. Evolution and pathology in Chagas disease – a review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 101, n. 5, p. 463-91, 2006.

TEIXEIRA, S. M.; RUSSEL, D. G.; KIRCHHOFF, L. V.; DONELSON, J. E. A differentially expressed gene family encoding “amastin”, a surface protein of *Trypanosoma cruzi* amastigotes. *J. Biol. Chem.*, v. 269, n. 32, p. 20509-16, 1994.

THEINER, G.; ROSSNER, S.; DALPKE, A.; BODE, K.; BERGER, T.; GESSNER, A.; LUTZ, M. B. TLR9 cooperates with TLR4 to increase IL-12 release by murine dendritic cells. *Mol. Immunol.* v. 45, n. 1, p. 244-52, 2008.

TIMENETSKY, J.; SANTOS, L. M.; BUZINHANI, M.; METTIFOGO, E. Detection of multiple *Mycoplasma* infection in cell cultures by PCR. *Braz. J. Med. Bio. Res.*, v. 39, n. 7, p. 907-14, 2006.

TIBAYRENC, M. Integrated genetic epidemiology of infectious diseases: the Chagas model. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* v. 93, n. 5, p. 577-80, 1998.

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

UPHOFF, C. C.; DREXLER, H. G. Comparative antibiotic eradication of *Mycoplasma* infections from continuous cell lines. *In vitro Cell. Dev. Biol. Anim.*, v. 38, n. 2, p. 86-9, 2002.

VESPA, G. N.; CUNHA, F. Q.; SILVA, J. S. Nitric oxide is involved in control of *Trypanosoma cruzi*-induced parasitemia and directly kills the parasite *in vitro*. *Infect Immun* 62: 5177-5182, 1994.

WILLIAMS, M. J.; RODRIGUEZ, A.; KIMBRELL, D. A.; ELDON, E. D. 1997. The 18-wheeler mutation reveals complex antibacterial gene regulation in *Drosophila* host defense. *EMBO J.* v. 16, p. 6120, 1997.

YAMAMOTO, S.; YAMAMOTO, T.; TOKUNAGA, T. The discovery of immunostimulatory DNA sequence. *Spring. Ser. Immunopathol.* v. 22, p. 11-19, 2000.

YAROVINSKY, F.; ZHANG, D.; ANDERSEN, J. F.; BANNENBERG, G. L.; SERHAN, C. N.; HAYDEN, M. S.; HIENY, S.; SUTTERWALLA, F. S.; FLAVELL, R. A.; GHOSH, S.; SHER, A. TLR11 activation of dendritic cells by a protozoan profilin-like protein. *Science*, v. 308, p. 1626–1629, 2005.

YASUDA, K.; RICHEZ, C.; UCCELLINI, M. B.; RICHARDS, R. J.; BONEGIO, R, G.; AKIRA, S.; MONESTIER, M.; CORLEY, R. B.; VIGLIANTI, G. A.; MARSHAK-ROTHSTEIN, A.; RIFKIN, I. R. Requirement for DNA CpG content in TLR9-dependent dendritic cell activation induced by DNA-containing immune complexes. *J. Immunol.*, v. 183, n. 5, p. 3109-17, 2009.

YEO, M.; ACOSTA, N.; LLEWELLYN, M.; SÁNCHEZ, H.; ADAMSON, S.; MILES, G. A.; LÓPEZ, E.; GONZÁLEZ, N.; PATTERSON, J. S.; GAUNT, M. W.; DE ARIAS, A. R.; MILES, M. A. Origins of Chagas disease: Didelphis species are natural hosts of *Trypanosoma cruzi* I and armadillos hosts of *Trypanosoma cruzi* II, including hybrids. *Int J Parasitol.* v. 2, p. 225-33, 2005.

YOSHIDA, N. Surface antigens of metacyclic trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *Infect. Immun.*, v. 40, p. 836-839, 1983.

YOUNG, C.; LOSIKOFF, P.; CHAWLA, A.; GLASSER, L.; FORMAN, E. Transfusion-acquired *Trypanosoma cruzi* infection. *Transfusion*, v. 47, n. 3, p. 540-44, 2007.

ZELEDÓN, R.; RABINOVICH, J. E. Chagas' disease: an ecological appraisal with special emphasis on its insect vectors. *Annu. Rev. Entomol.*, v. 26, p. 101-33, 1981.

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

ZINGALES, B.; MILES, M. A.; CAMPBELL, D. A.; TIBAYRENC, M.; MACEDO, A. M.; TEIXEIRA, M. M. G.; SCHIJMAN, A. G.; LLEWELLYN, M. S.; LAGES-SILVA, E.; MACHADO, C. R.; ANDRADE, S. G.; STURM, N. R. The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: Rationale, epidemiological relevance and research applications. *Infection, Genetics and Evolution*, v. 12, p. 240-253, 2012.

ANEXO I - Aprovação do projeto pelo CETEA



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

CERTIFICADO

Certificamos que o **Protocolo nº 92/2009**, relativo ao projeto intitulado "**Estudo de seqüências nucleotídicas imunoestimulatórias em diferentes cepas do parasito Trypanosoma cruzi**", que tem como responsável(is) **Daniella Castanheira Bartholomeu**, está(ão) de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo **Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG)**, tendo sido aprovado na reunião de **20/ 05/2009**.

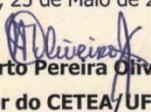
Este certificado expira-se em **20/ 05/ 2014**.

CERTIFICATE

We hereby certify that the **Protocol nº 92/2009**, related to the project entitled "**Study of immunestimulatory sequences in different strains of the parasite Trypanosoma cruzi**", under the supervisors of **Daniella Castanheira Bartholomeu**, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the **Ethics Committee in Animal Experimentation (CETEA/UFMG)**, and was approved in **May 20, 2009**.

This certificate expires in **May 20, 2014**.

Belo Horizonte, 25 de Maio de 2009.


Prof. Humberto Pereira Oliveira
Coordenador do CETEA/UFMG

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

(Mod.Cert. v1.0)

ANEXO II – Carta de aceite e cópia do artigo aceito para publicação na revista PLoS Neglected Tropical Diseases

Dear Dr. Bartholomeu, (Dear Daniela)

We are pleased to inform you that we will be delighted to publish your manuscript entitled "Identification of strain-specific B-cell epitopes in *Trypanosoma cruzi* using genome-scale epitope prediction and high-throughput immunoscreening with peptide arrays" (PNTD-D-13-00584R2) in PLOS Neglected Tropical Diseases. Please review the rest of this message carefully.

Before your article is formally accepted and passed on to the PLOS Production Department, the files will be checked by our staff, who will contact with final requests. At that time, the manuscript will be returned to you one last time to enable you to make any requested changes and to correct any errors or oversights. We kindly request your patience while you wait to be contacted by our production staff.

IMPORTANT NOTES

* Copyediting and Author Proofs: To ensure prompt publication, your manuscript will NOT be subject to detailed copyediting and you will NOT receive a typeset proof for review. The corresponding author will have one final opportunity to correct any errors when our Production team sends the requests mentioned above. Please review the PDF of your manuscript created by the online submission system for any errors.

*Note to LaTeX users only - Production will ask you to upload your LaTeX files as a Supporting Information file, so please carefully review our Latex Guidelines (<http://www.plosntds.org/static/latexGuidelines.action>) in the meantime.

Now that your manuscript has been accepted, please log into EM and update your profile. Go to <http://www.editorialmanager.com/pntd>, log in, and click on the "Update My Information" link at the top of the page. Please update your user information to ensure an efficient production and billing process.

Thank you again for supporting open-access publishing; we are looking forward to publishing your work in PLOS Neglected Tropical Diseases.

Best regards,

Ernesto T. A. Marques, M.D./Ph.D
Guest Editor
PLOS Neglected Tropical Diseases

Elodie Ghedin, Ph.D.
Deputy Editor

Identification of strain-specific B-cell epitopes in *Trypanosoma cruzi* using genome-scale epitope prediction and high-throughput immunoscreening with peptide arrays

Tiago Antônio de Oliveira Mendes¹, João Luís Reis Cunha¹, Rodrigo de Almeida Lourdes¹, Gabriela Flávia Rodrigues Luiz¹, Lucas Dhom Lemos¹, Ana Rita Rocha dos Santos¹, Antônia Cláudia Jácome da Câmara², Lúcia Maria da Cunha Galvão², Caryn Bern³, Robert H. Gilman^{4,5}, Ricardo Toshio Fujiwara¹, Ricardo Tostes Gazzinelli^{6,7,8}, Daniella Castanheira Bartholomeu^{1*}

¹Departamento de Parasitologia, ⁶Departamento de Bioquímica Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brasil; ²Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, Brasil; ³University of California, San Francisco, California, United States of America; ⁴Universidad Cayetano Heredia, Lima, Peru; ⁵Johns Hopkins University, Baltimore, Maryland, United States of America; ⁷Centro de Pesquisas Rene Rachou – Fundação Oswaldo Cruz, Belo Horizonte, Brasil; ⁸Division of Infectious Diseases and Immunology, University of Massachusetts Medical School, Worcester, Massachusetts, United States of America.

*Corresponding author. E-mail: daniella@icb.ufmg.br

Abstract

Background

The factors influencing variation in the clinical forms of Chagas disease have not been elucidated; however, it is likely that the genetics of both the host and the parasite are involved. Several studies have attempted to correlate the *T. cruzi* strains involved in infection with the clinical forms of the disease by using hemoculture and/or PCR-based genotyping of parasites from infected human tissues. However, both techniques have limitations that hamper the analysis of large numbers of samples. The goal of this work was to identify conserved and polymorphic linear B-cell epitopes of *T. cruzi* that could be used for serodiagnosis and serotyping of Chagas disease using ELISA.

Methodology

By performing B-cell epitope prediction on proteins derived from pair of alleles of the hybrid CL Brener genome, we have identified conserved and polymorphic epitopes in the two CL Brener haplotypes. The rationale underlying this strategy is that, because CL Brener is a recent hybrid between the TcII and TcIII DTUs (discrete typing units), it is likely that polymorphic epitopes in pairs of alleles could also be polymorphic in the parental genotypes. We excluded sequences that are also present in the *Leishmania major*, *L. infantum*, *L. braziliensis* and *T. brucei* genomes to minimize the chance of cross-reactivity. A peptide array containing 150 peptides was covalently linked to a cellulose membrane, and the reactivity of the peptides was tested using sera from C57BL/6 mice chronically infected with the Colombiana (TcI) and CL Brener (TcVI) clones and Y (TcII) strain.

Findings and Conclusions

A total of 36 peptides were considered reactive, and the cross-reactivity among the strains is in agreement with the evolutionary origin of the different *T. cruzi* DTUs. Four peptides were tested against a panel of chagasic patients using ELISA. A conserved peptide showed 95.8% sensitivity, 88.5% specificity, and 92.7% accuracy for the identification of *T. cruzi* in patients infected with different strains of the parasite. Therefore, this peptide, in association with other *T. cruzi* antigens, may improve Chagas disease serodiagnosis. Together, three polymorphic epitopes were able to discriminate between the three parasite strains used in this study and are thus potential targets for Chagas disease serotyping.

Author Summary

Serological tests are preferentially used for the diagnosis of Chagas disease during the chronic phase because of the low parasitemia and high anti-*T. cruzi* antibody titers. However, contradictory or inconclusive results, mainly related to the characteristics of the antigens used, are often observed. Additionally, the factors influencing variation in the clinical forms of Chagas disease have not been elucidated, although it is likely that host and parasite genetics are involved. Several studies attempting to correlate the parasite strain with the clinical forms have used hemoculture and/or PCR-based genotyping. However, both techniques have limitations. Hemoculture requires the isolation of parasites from patient blood and the growth of these parasites in animals or *in vitro* culture, thereby possibly selecting certain subpopulations. Moreover, the level of parasitemia in the chronic phase is very low, hindering the detection of parasites. Additionally, direct genotyping of parasites from infected tissues is an invasive procedure that requires medical care and hinders studies with a large number of

samples. The goal of this work was to identify conserved and polymorphic linear B-cell epitopes of *T. cruzi* on a genome-wide scale for use in the serodiagnosis and serotyping of Chagas disease using ELISA. Development of a serotyping method based on the detection of strain-specific antibodies may help to understand the relationship between the infecting strain and disease evolution.

Introduction

Chagas disease, a zoonosis caused by the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*, affects approximately 10 million people in the Americas. Approximately 14,000 deaths occur annually, and 50,000-200,000 new cases are diagnosed each year [1]. During the acute phase of infection, diagnosis is based on parasitological methods [2]; however, in the chronic phase, such parasitological approaches have a low sensitivity, between 50-65%, because of low levels of parasitemia [3,4]. The chronic phase is also characterized by a strong and persistent humoral immune response, thus the measurement of IgG antibodies specific for parasite antigens should be performed for diagnosis [5]. However, serological methods from different laboratories have been observed to be inconclusive or contradictory [6-8]. These discrepancies are mainly related to technical errors and antigen composition because crude or semi-purified protein extracts of epimastigotes, a parasite stage not found in the mammalian host, are generally used [6,9]. Moreover, false-positive results are frequently observed because of the cross-reactivity of crude preparations of *T. cruzi* antigens with sera from individuals infected with *Leishmania sp.* and *T. rangeli* [10-12]. The use of recombinant antigens and synthetic peptides as a substitute for parasite lysates has increased reproducibility and, in addition, does not require the maintenance and processing of live parasites [13,14].

Despite recent advances in Chagas disease diagnostics, the methods available still have limitations related to low specificity and sensitivity [15,16]. Among the factors that compromise the performance of diagnostic tests, the genetic variability of the parasite is known to contribute to false-negative results in Chagas disease serodiagnosis [17].

Epidemiological, biochemical, and molecular studies have demonstrated that the *T. cruzi* taxon is extremely polymorphic [18-21]. Recently, *T. cruzi* strains were reclassified into six DTUs (discrete typing units) called TcI to TcVI [22], and there is much speculation regarding whether this parasite variability could be associated with different disease prognoses. Although *T. cruzi* infection results in a broad spectrum of clinical forms as indeterminate, cardiac, and digestive forms, the determinant factors involved in the development of each clinical form have not been elucidated, though it is likely that genetic factors of the host and parasite are involved [23]. However, no study to date has found an unequivocal association between the infecting parasite DTU and the clinical forms of the disease. Nevertheless, this hypothesis has not been discarded because correlations between the geographic distribution profiles of different *T. cruzi* DTUs and a higher frequency of specific clinical forms have been reported [21]. Indeed, digestive manifestations are more common in the central region of Brazil and the southern part of South America, where infection by TcII, TcV, and TcVI predominates; in contrast, such manifestations are rare in the northern part of South America and in Central America, where infection caused by TcI is more common [24].

Correlation studies between the parasite DTU and clinical forms of Chagas disease are challenging because most of the techniques require parasite isolation from patient blood or parasite genotyping directly from infected tissues. Because many *T. cruzi* populations are polyclonal, hemoculture may select sub-populations of parasites more adapted to *in vitro* growth conditions [25]. Moreover, because of different tissue

tropisms of some *T. cruzi* strains [26], in infections caused by polyclonal populations and/or co-infections, the clones circulating in the patient blood may not be the same as those found in tissue lesions. The current methodologies to genotype the parasite from tissue biopsies are laborious and expensive, thus limiting the number of samples that can be analyzed. Within this context, a parasite typing method based on the detection of strain-specific antibodies from patient sera could resolve many of these problems. Thus far, there is only one study that proposes the use of an antigen to discriminate among *T. cruzi* DTUs [17]. This study is based on an antigen named TSSA (trypomastigote small surface antigen), belonging to the TcMUC III protein family, which can differentiate between humans infected with TcI, TcIII, and TcIV and those infected with TcII, TcV, and TcVI.

In the present study, we performed a genomic screen to identify polymorphic and conserved linear B-cell epitopes in the predicted proteome of the CL Brener *T. cruzi* strain in an attempt to identify targets for the serotyping and serodiagnosis, respectively, of *T. cruzi*-infected patients. The results were validated using sera from experimentally infected mice and chagasic patients.

Materials and Methods

Ethics Statement

The design and methodology of all experiments involving mice were in accordance with the guidelines of COBEA (Brazilian College of Animal Experimentation), strictly followed the Brazilian law for “Procedures for the Scientific Use of Animals” (11.794/2008), and were approved by the animal-care ethics committee of the Federal University of Minas Gerais (protocol number 143/2009).

The study protocol involving human samples from Bolivia was approved by the ethics committees of the study hospital, A.B. PRISMA, Johns Hopkins University and the U.S. Centers for Disease Control and Prevention. All subjects provided written informed consent before blood was collected. As for the Brazilian patients, written informed consent was obtained from the participants and was approved by the Ethics Committee of the Federal University of Minas Gerais (UFMG), under protocol number No. 312/06.

Mouse sera

Each experimental group was composed of six 2-4-week-old C57BL/6 male mice. The mice were infected with 50 Colombiana or 500 Y trypomastigotes. For the CL Brener clone, we used three mouse groups infected with 50, 100, or 500 trypomastigotes. Infection was confirmed by the observation of trypomastigote forms in blood collected from the tail at seven days after intraperitoneal inoculation. One additional group was infected with 1×10^5 *T. rangeli* trypomastigotes, and the infection was confirmed by PCR [27]. Six un-infected mice were used as the control group. The chronic phase of infection was confirmed after approximately 3 months by negative parasitemia and the presence of anti-parasite IgG (as tested against *T. cruzi* and *T. rangeli* crude antigens) by ELISA [28]. Mouse blood was then obtained by cardiac puncture; coagulation was performed at room temperature for 30 minutes, and the serum was obtained after centrifugation at 4000 x g for 15 minutes.

Human sera

Blood samples from chagasic patients from Bolivia were collected in a public hospital in Santa Cruz de la Sierra. DNA was extracted from patient blood samples and parasite genotyping was performed as previously described [29]. Infection by TcI parasite lineage was confirmed for six samples (Supplementary Figure S1). Samples from 10 chagasic patients previously characterized to be infected with TcII [30] and 56 samples from chagasic patients infected with untyped parasites collected from Rio Grande do Norte State, Brazil, were also used. Samples from 14 patients infected with *L. braziliensis* and 14 patients with visceral *Leishmaniasis* both known to be uninfected with *T. cruzi* and the sera from 24 un-infected humans were used as specificity and negative controls, respectively.

Parasites

Epimastigotes of the Colombiana and CL Brener clones, and Y strain of *T. cruzi* and *T. rangeli* SC-58 were maintained in a logarithmic growth phase at 28°C in liver infusion tryptose (LIT) medium supplemented with 10% fetal bovine serum, 100 µg/mL streptomycin, and 100 units/mL penicillin [31]. A total of 1×10^6 *T. cruzi* epimastigotes/mL were incubated in triatomine artificial urine (TAU) medium for 2 hours at 28°C. L-proline (10 mM) was added to the medium, and the metacyclic forms were obtained after 72 hours at 28°C [32]. Trypomastigotes and amastigotes were obtained from rhesus-monkey epithelial LLC-MK2 cells infected with metacyclic forms cultured in RPMI medium supplemented with 2% fetal bovine serum at 37°C and 5% CO₂ [31]. Differentiation of *T. rangeli* epimastigotes to trypomastigotes was induced with 10^6 parasites/mL in DMEM medium (pH 8) for 6 days at 28°C [33].

***In silico* prediction of linear B-cell epitopes**

Linear B-cell epitopes were predicted for all the proteins of the CL Brener genome release 4.1 [34] using the Bepipred 1.0 program with a cutoff of 1.3 [35]. The BepiPred program assigns a score to each individual amino acid in a sequence, therefore only amino acids with prediction Bepipred score ≥ 1.3 were considered for the downstream analysis. Proteins encoded by the pair of Esmo and Non-Esmo alleles were aligned using the CLUSTALW program [36], and each pair of amino acids aligned received a polymorphism score according to the following scale: 0 for identical amino acids; 1 for different amino acids with similar physical-chemical properties; 2 for a mismatch involving amino acids with dissimilar physical-chemical properties; and 3 for a gap position. A perl script based on a sliding window approach that uses a fixed window size of 15 amino acids and an increment of one amino acid identified all 15-mer subsequences in which each individual amino acid has a bepipred score ≥ 1.3 . Those peptides with a polymorphism score above 6 (sum of the individual amino acid polymorphism scores) and a mean BepiPred score ≥ 1.3 were classified as polymorphic epitopes; those peptides identical between the Esmo and Non-Esmo haplotypes and with a mean BepiPred prediction score ≥ 1.3 were classified as conserved epitopes. The selected peptides were compared with the predicted proteins from the genomes of *L. infantum*, *L. major*, *L. braziliensis*, and *T. brucei* (release 4.1) [37] using the BLASTp algorithm [38]. Peptides with at least 70% similarity along 70% of the length were discarded. After elimination of peptides with potential cross-reactivity with *Leishmania* and *T. brucei*, 50 Esmo-like peptides, 50 Non-esmo-like peptides and 50 peptides conserved with the highest mean Bepipred score were selected.

Spot synthesis and immunoblotting

Peptides were synthesized on pre-activated cellulose membranes according to the SPOT synthesis technique [39]. Briefly, Fmoc-amino acids were activated with 0.05 mM HOBt and 0.1 mM DIC and automatically spotted onto pre-activated cellulose membranes using the MultiPep SPOT synthesizer (Intavis AG). The non-binding sites of the membrane were blocked with 10% acetic anhydride, and the Fmoc groups were removed with 25% 4-methyl piperidine. These processes were repeated until peptide chain formation was complete. After synthesis, side-chain deprotection was performed by adding a 25:25:1.5:1 solution of trifluoroacetic acid, dichloromethane, triisopropylsilane, and water. The amino acid coupling and side-chain deprotection were monitored by staining the membrane with 2% bromophenol blue. The immunoblotting methodologies followed a previously described protocol [39]. First, the membrane containing peptides was blocked with 5% BSA and 4% sucrose in PBS overnight and incubated with infected and control mouse sera diluted 1:5,000 in blocking solution for 1 hour. After washing three times with PBS-T (PBS; 0.1% Tween 20), the membrane was incubated with the secondary HRP-conjugated anti-mouse IgG antibody (Sigma-Aldrich) diluted 1:10,000 in blocking solution for 1 hour. After a third wash, detection was performed using ECL Plus Western blotting (GE Healthcare), following the manufacturer's instructions, with the Gel Logic 1500 Imaging System (Kodak). The densitometry measurements and analysis of each peptide were performed using Image Master Platinum (GE), and the relative intensity ratio (RI) cutoff for positivity was determined at 2.0.

Soluble peptide synthesis

The soluble peptides were synthesized in solid phase on a 30- μ mol scale using N-9-fluorenylmethoxycarbonyl [40] with PSSM8 equipment (Shimadzu). Briefly, Fmoc-amino acids were activated with a 1:2 solution of HOBt and DIC. The active amino acids were incorporated into Rink amide resin with a substitution degree of 0.61. Fmoc deprotection was then performed using 25% 4-methylpiperidine. These steps were repeated until the synthesis of each peptide was complete. The peptides were deprotected and released from the resin by treatment with a solution of 9.4% trifluoroacetic acid, 2.4% water, and 0.1% triisopropylsilane. The peptides were precipitated with cold diisopropyl ether and purified by high-performance liquid chromatography (HPLC) on a C18 reverse-phase column using a gradient program of 0 to 25% acetonitrile. The peptides were obtained with 90% purity, as confirmed by mass spectrometry using Autoflex Speed MALDI/TOF equipment.

ELISA and affinity ELISA

Each well of flexible ELISA polyvinylchloride plates (BD Falcon) was coated with 2 μ g of soluble peptide. After blocking with 5% BSA in PBS for 1 hour at 37°C, followed by three washing steps with PBS containing 0.05% Tween 20 (PBS-T), the plates were incubated with human or mouse serum (dilution 1:100). The plates were washed three times with PBS-T, and secondary HRP-conjugated anti-human or anti-mouse IgG antibody was added for 1 hour at 37°C, followed by four washes. A solution containing 0.1 M citric acid, 0.2 M Na₂PO₄, 0.05% OPD, and 0.1% H₂O₂ at pH 5.0 was used for detection; the reaction was stopped with 4 N H₂SO₄, and the absorbance was

measured at 492 nm. The mean optical density value at 492 nm plus three times the standard deviation of the negative serum was used as the cutoff value. For affinity ELISA, 6 M urea was added for 5 min at 37°C after incubation with the primary antibodies; the remainder of the protocol was the same [41]. The results are shown as an affinity index (AI) determined as the ratio between the absorbance values of the samples treated and not treated with urea. An AI value lower than 40% represented low-affinity antibodies, between 41 and 70% was classified as intermediate affinity and higher than 70% as high affinity.

DNA extraction and sequencing

Genomic DNA extraction was performed using the GFXTM Genomic Blood DNA Purification kit (GE Healthcare) following the manufacturer's instructions. The DNA samples were quantified using a NanoDrop[®] Spectrophotometer ND-1000 (Thermo Scientific). The PCR products amplified with the primers listed in Supplementary Table S1 were subjected to sequencing at both ends using the ABI Prism 3730xl DNA Analyzer (Applied Biosystems) by Macrogen Inc (Korea).

RNA extraction and cDNA synthesis

Total RNA was isolated from 10⁸ epimastigotes, 10⁶ trypomastigotes, and 10⁸ LLC-MK2 cells infected with approximately 10⁵ intracellular amastigotes of the Colombiana, Y, and CL Brener strains using the NucleoSpin RNA II RNA extraction kit (Macherey-Nagel) following the procedures described by the manufacturer. RNA from 10⁸ LLC-MK2 cells was also extracted and used as a negative control. The

concentration and purity of the RNA samples were measured with a NanoDrop[®] Spectrophotometer ND-1000 (Thermo Scientific). cDNA was synthesized using 10 ng of total RNA and the High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA) using random hexamer primers according to the manufacturer's instructions.

Real-time PCR

Specific primers for each Esmo and Non-Esmo allele were designed, and the primer specificity was verified by electronic PCR using the entire parasite genome as a template. The primers used are listed in the Supplementary Table S2. Real-time PCR reactions were performed in an ABI 7500 sequence detection system (Applied Biosystems). The reactions were prepared in triplicate and contained 1 mM forward and reverse primers, SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems), and 20 ng of cDNA. Standard curves were prepared for each experiment for each pair of primers using serially diluted *T. cruzi* CL Brener genomic DNA to calculate the relative quantity (Rq) values for each sample. qRT-PCRs for the constitutively expressed GAPDH gene were performed to normalize the expression of the specific alleles.

Statistical analysis

All statistical analyses were performed using Graph Prism 5.0 software. First, the normal distribution of data was evaluated by the Kolmogorov-Smirnov test; because all they showed a Gaussian profile, an unpaired t test was used for the comparative analysis between the two sets of data, and an ANOVA was used for three or more experimental

groups. P-values lower than 0.05 were considered statistically significant. The sensitivity, specificity, and accuracy of the peptides were also calculated for the human samples. The sensitivity is represented by $Se = TP / (TP + FN)$, where TP (true positive) is the number of sera from individuals infected with *T. cruzi* above the cutoff value and FN (false negative) is the number of sera from infected individuals below the cutoff for the conserved peptide. For the polymorphic peptides, TP was defined as the number of sera from individuals infected with a specific strain above the cutoff value, and FN is the number of these sera below the cutoff for polymorphic peptides. The specificity is represented by $Sp = TN / (TN + FP)$, where TN (true negative) is the number of sera from individuals infected with *L. braziliensis* or un-infected individuals below the cutoff and FP (false positive) is the number of sera from these samples with reactivity for the conserved peptide. For the polymorphic peptides, TN was defined as the number of sera from individuals infected with a non-specific strain or *L. braziliensis* and uninfected individuals below the cutoff, and FP is the number of sera from these samples with reactivity. The accuracy is calculated as $Ac = (TP + TN) / (TP + TN + FP + FN)$.

Results

Epitope prediction using the *T. cruzi* CL Brener proteome and immunoblotting screening

We performed B-cell epitope prediction for 3,983 proteins derived from pair of alleles of CL Brener genome. We decided to restrict our analysis to this dataset because the CL Brener clone is a recent hybrid between the TcII and TcIII DTUs and evidence suggests that the latter is an ancient hybrid between TcI and TcII [42]. Therefore, it is

likely that polymorphic epitopes in the pairs of alleles of CL Brener could also be polymorphic for its parental genotypes and other *T. cruzi* strains. In the CL Brener hybrid diploid genome, it is possible to identify two haplotypes: “Esmo”, which is more similar to TcII; and “Non-Esmo”, which is more similar to TcIII [34]. A total of 1,488 predicted epitopes were classified as conserved between the two haplotypes, and 428 were classified as polymorphic. We next excluded epitopes also present in *Leishmania major*, *L. infantum*, *L. braziliensis* and *T. brucei* to minimize the chance of cross-reactivity, because these parasites share many antigens with *T. cruzi* [10,12,16], thus reducing the number of conserved and polymorphic epitopes to 1,086 and 242, respectively.

A total of 50 conserved, 50 polymorphic Esmo-specific, and 50 polymorphic Non-Esmo-specific peptides with high epitope prediction scores were selected for the construction of peptide arrays. The reactivity of the peptides was tested using a pool of sera from six C57BL/6 mice chronically infected with Colombiana (TcI), Y (TcII), or CL Brener (TcVI) strains and un-infected mice as the control group (Figure 1). The quantification of the reactivity was performed by densitometric analysis (Supplementary Table S3). A peptide was considered reactive and antigenically conserved if its intensity signal with all *T. cruzi* strains was two times higher than its signal with the sera from un-infected mice. A peptide was considered reactive and antigenically polymorphic if its intensity signal with a specific strain was two times higher than the values with the other two strains and the un-infected mice. A total of 36 peptides were considered reactive with at least one strain (Figure 1E). A conserved peptide with the highest reactivity with all *T. cruzi* strains (C6_30_cons) and three polymorphic peptides specific for Colombiana (A6_30_col), Y (B2_30_y), and CL Brener (B9_30_cl) were selected for soluble synthesis, and their reactivity was validated by ELISA.

Epitope validation with ELISA and affinity ELISA

Because immunoblotting assays are semi-quantitative techniques, we validated the results with quantitative ELISA and affinity ELISA assays using individual sera from six C57BL/6 mice chronically infected with the Colombiana (TcI), Y (TcII), or CL Brener (TcVI) strains and the un-infected mice as a control group. For the conserved peptide C6_30_cons, no significant difference in the reactivity among the sera from animals infected with different *T. cruzi* strains was observed (Figure 2A). The sera from mice infected with the Colombiana strain had a higher antibody titer against the A6_30_col peptide compared to the sera from mice infected with the Y strain. More importantly, the affinity antibodies discriminated Colombiana infection from those caused by the other two strains (Figure 2B). An expected recognition profile was also observed for the peptide B2_30_y (Figure 2C): sera from mice infected with the Y strain had a significantly higher antibody titer than those from mice infected with Colombiana, and the highest affinity antibodies generated by the Y strain discriminated its infection from those caused by Colombiana and CL Brener. With regard to peptide B9_30_cl, conventional ELISA was able to discriminate CL Brener infection from that caused by Y and Colombiana (Figure 2D).

Because the infection caused by different *T. cruzi* strains has specific evolution and mortality rates in a mouse model [43], we infected mice with a distinct parasite inoculum for each strain to reach the chronic phase when the sera were collected. Thus, to evaluate whether the differences in reactivity observed in the ELISA experiments were dependent on the inoculum, we tested the reactivity of sera from mice infected with 50, 100, or 500 CL Brener trypomastigotes (Supplementary Figure S2). There was

no significant variation among the different CL Brener inocula, suggesting that the antigenic variability among the parasite strains is the main factor responsible for the distinct recognition profile of the peptides tested in the ELISA experiments. The evaluation of cross-reactivity with sera from mice infected with *T. rangeli* and from *Leishmaniasis* patients demonstrated that the peptides are *T. cruzi* specific (Supplementary Figures S3 and S4).

Prediction of specific epitope reactivity with different *T. cruzi* DTUs

We next analyzed the polymorphisms of the epitopes identified in this study and predicted their reactivity with sera from individuals infected with *T. cruzi* strains representative of each DTU (TcI to TcVI). To this end, we first subjected the peptide sequences to an AlaScan analysis [44] to identify the amino acid residues critical to antibody binding. We found that the pattern GXXXXMRQNE in the carboxy-terminal region of conserved peptide C6_30_cons is important for the interaction with the antibodies generated in infection caused by the three *T. cruzi* strains (Figures 3A, B, and C). As for the polymorphic epitopes, the patterns PPXDXSLXXP in peptide A6_30_col (Figure 3D), QPQPXPQXXXQP in B2_30_y (Figure 3E), and DEXXXXG in B9_30_cl (Figure 3F) are critical for binding with the antibodies generated by Colombiana, Y, and CL Brener infections, respectively.

We then sequenced the genomic DNA encoding these four epitopes in strains representative of the six *T. cruzi* DTUs to predict whether the peptides would be recognized in infections caused by different parasite DTUs. It is expected that a peptide would be recognized in infections caused by a specific strain if the amino acid residues critical for antibody recognition are encoded by its genome. Based on this criterion, we

predicted that conserved peptide C6_30 would be able to identify infection caused by four of the six *T. cruzi* DTUs (Figure 4A), whereas peptides A6_30_col and B2_30_y are expected to identify infections caused only by TcI and TcVI (Figure 4B) and TcII and TcVI (Figure 4C), respectively. Interestingly, the A6_30_col and B2_30_y epitopes are identical to the Non-Esmo- and Esmo-like CL Brener haplotypes, respectively, reinforcing the hypothesis that the nature of the CL Brener hybrid may have contributions of both the TcI and TcII genomes. B9_30_cl is predicted to identify patients infected with TcIII or TcVI (Figure 4D).

Epitope expression at different parasite stages and strains

Although all peptides are derived from the CL Brener genome, the sera from mice infected with this strain had lower antibody affinities for the A6_30_col and B2_30_y peptides than did the sera from mice infected with the Colombiana or Y strain (Figure 2). Because CL Brener is a hybrid strain [34, 42, 45], the polymorphic epitopes encoded by its pairs of alleles may have distinct expression levels that could explain the differences in their reactivity. To investigate this further, we designed allele-specific primers for the genes that encode the epitopes to evaluate their expression levels in the trypomastigote and amastigote forms, the parasite stages found in mammalian hosts (Figure 5). As expected based on the *T. cruzi* phylogeny [46], Y expressed only the Esmo-like variants, and Colombiana expressed only the Non-Esmo variants, except for the B9_30 transcript. CL Brener expressed both alleles of all genes, except for the B9_30 transcript. The conserved peptide was expressed by both the Esmo and Non-Esmo haplotypes of CL Brener (Figure 5A). The polymorphic Non-Esmo peptide A6_30_col was expressed by the Colombiana and CL Brener strains (Figure 5B), and

CL Brener also expressed the Esmo-like allele for this peptide. The opposite profile was observed for the polymorphic Esmo B2_30_y peptide, whereby only the Y and CL Brener strains expressed the Esmo-like allele and CL Brener also expressed the Non-Esmo allele of this peptide (Figure 5C). CL Brener only expressed the Esmo-like variant of the B9_30_CL epitope, and its level of expression was approximately 5 times higher than in the Y strain (Figure 5D).

Potential use of epitopes for human serodiagnosis and serotyping

All previous results were based on a mouse model because the amount of the inoculum, infective strain, and time of infection can be adequately controlled. To test the potential application of these peptides for serodiagnosis and serotyping of human infection, we performed ELISA experiments with sera from chagasic patients with parasites genotyped as TcI or TcII, and healthy individuals. The conserved peptide C6_30_cons showed 95.8% sensitivity, 88.5% specificity, and 92.7% accuracy for the identification of chagasic patients, and no significant differences in the reactivity of sera from patients infected with TcI or TcII was observed (Figure 6A). As expected, peptide A6_30_col showed much higher reactivity with the sera from patients infected with TcI (Figure 6B), with 100% sensitivity, 91.9% specificity, and 92.6% accuracy; peptide B2_30_y identified most of the individuals infected with TcII (Figure 6C), with 80% sensitivity, 94.8% specificity, and 92.6% accuracy. Additionally, none of the sera from patients infected with TcI recognized the B2_30_y peptide, and peptide B9_30_cl showed a low reactivity with both TcI and TcII (Figure 6D). All peptides were also *T. cruzi* specific because the majority of the sera from the patients infected with *L. braziliensis* were non-reactive (Supplementary Figure S4).

Discussion

Despite efforts to identify new targets for the immunodiagnosis of Chagas disease, the impressive genetic variability of *T. cruzi* strains has imposed serious limitations on the development of high-sensitivity methods [48-50]. Additionally, serological cross-reactivity with *Leishmania* and *T. rangeli* infections [11,12,16] compromises the specificity of Chagas disease diagnosis. Therefore, the identification of new *T. cruzi*-specific antigens conserved among the parasite strains has been recognized as an important research area for Chagas disease diagnosis and control [47]. The polymorphic nature of *T. cruzi* isolates, on the other hand, opens new avenues for the development of serotyping methodologies to identify the parasite DTU causing infection based on a serological survey. For instance, this would allow large-scale epidemiological studies aimed at correlating the strain causing the infection with the clinical forms of Chagas disease, an open question that has been hampered by the limited number of samples that can be analyzed by the current genotyping methodologies [48]. To the best of our knowledge, only one study has identified a polymorphic epitope among the *T. cruzi* DTUs [49]. This marker is an immunodominant B-cell epitope of TSSA (trypomastigote small surface antigen), a representative of the TcMUC III gene family. The TSSA-I and TSSA-II isoforms serologically discriminate between animals infected with *T. cruzi* I from those infected with *T. cruzi* II, according to the previous DTU classification (TcII-VI in the current classification), respectively. In a serological survey of chagasic patients from Argentina, Brazil, and Chile, anti-TSSA antibodies recognized only the TSSA-II isoform, suggesting that the TcII-VI DTUs are the cause of Chagas disease in those regions. In a more recent study, however, this same research group

analyzed the diversity of the TSSA gene in several representatives of each of the six *T. cruzi* DTUs and found a complex pattern of sequence polymorphism. Based on their analysis, the epitope considered to be specific for TcII-VI was shown to identify the TcII, V, and VI DTUs. In addition, the peptide previously described as TcI specific shares key features with TcIII and IV. Therefore, there is no *T. cruzi* DTU-specific serological marker identified thus far.

The goal of this work was to identify conserved and polymorphic linear B-cell epitopes of *T. cruzi* for Chagas disease serodiagnosis and serotyping using ELISA. This technique was selected because it is a quantitative assay and easily automated, thus allowing the analysis of a large number of samples. In recent years, synthetic peptides used as antigens have shown high sensitivity and specificity in diagnostic tests [50]. Peptides have several advantages over chemically purified or recombinant antigens because their production does not involve the manipulation of living organisms and can be obtained with a high level of purity [51]. Recently, the use of peptide arrays has allowed the immunoscreening of a large number of epitope candidates [39]. Thus, an approach based on a synthetic peptide array was chosen to screen of a large number of potential antigens by immunoblotting, followed by ELISA validation.

Initially, we screened the CL Brener genome to predict epitopes that are polymorphic and conserved between the Esmo and Non-Esmo haplotypes. The rationale underlying this strategy is that, because the CL Brener strain is a recent hybrid between the TcII and TcIII DTUs and there is evidence suggesting that the latter is an ancient hybrid between TcI and TcII [46], it is likely that the polymorphic epitopes between the CL Brener alleles would also be polymorphic among distinct *T. cruzi* strains. The Colombiana (TcI) and CL Brener (TcVI) clones and Y (TcII) strain were selected for this study to evaluate the degree of polymorphism of epitopes in TcII, a direct

representative of one CL Brener parental DTU, and TcI, a more distant DTU of CL Brener, along with CL Brener.

The immunoscreening of 150 high-scoring peptides resulted in the identification of 36 novel epitopes, indicating that our computational approach for the prediction and prioritization of epitope candidates was successful. Our rate of success (24%) was slightly higher than previously described (19.5%) for *T. cruzi* using a similar validation approach [50]. We found that only 11% (4/36) of the reactive peptides are shared among the three parasite strains (Figure 1E), highlighting the problem with identifying high-sensitivity antigens for the serodiagnosis of Chagas disease due to the high degree of *T. cruzi* polymorphism. One of the conserved epitopes identified in this study, peptide C6_30_cons, has proven to be a new conserved *T. cruzi* antigen with a potential application in Chagas disease serodiagnosis (Figures 2A, 6A, S2, and S3).

Together, the three polymorphic epitopes were able to discriminate among infections caused by the three different *T. cruzi* strains included in this study and, thus, have the potential to be used for the serotyping of infections caused by this parasite. ELISA experiments using human sera confirmed the predictive reactivity of A6_30_col and B2_30_y (Figure 6). A6_30_col was able to identify 100% of the patients infected with TcI. As expected, the serum samples obtained from Brazilian patients known to be infected with TcII were reactive only with the C6_30 conserved and B2_30_y peptides. These results confirm the potential use of this peptide set for Chagas disease serotyping.

The peptide A6_30_col and B9_30_cl are derived from RNA binding proteins and RNA polymerase III, respectively (Supplementary Table S3). Both are predicted to have an intracellular localization. Indeed, humoral response against intracellular antigens is quite common in trypanosomatids as shown by the work described by da Rocha *et al.*, 2002 [52] that performed immunoscreening of an amastigote cDNA library using sera

from chagasic patients. About 70% of the amastigote antigens identified in this study is derived from intracellular parasite proteins. Similar to *Leishmania* infection, it is postulated that during *T. cruzi* infection a proportion of trypomastigotes/amastigotes cells are destroyed, thus releasing substantial amounts of multicomponent complexes containing intracellular antigens [53]. This reactivity could be the result of high abundance of these antigens as circulating complexes during the parasite infection due to high and constant expression of nuclear and house-keeping genes; higher stability due to formation of nucleoprotein particles more resistant to degradation; and their increased capacity to be processed by antigen-presenting cells because multicomponent particles are taken into the cell more efficiently than soluble antigens [54].

It is worth noting that the conserved and polymorphic epitopes identified in this study encompass repetitive regions. Interestingly, two of these peptides have proline-rich regions (Figure 4) that may be involved in protein-protein interactions in prokaryotes [55] and eukaryotes [56]. It has been demonstrated that the overall immunogenicity of proteins harboring tandem repeats is increased, as is the antigenicity of epitopes contained within repetitive units [52,57]. Therefore, one expects that repeats receive a high B-cell epitope prediction score. Furthermore, the polymorphic epitopes containing repeats were top ranked for an additional reason: our polymorphic scale applied to the CL Brener pair of alleles attributes the highest score to a gap position in the alignment, a situation always present when the contraction or expansion of a repetitive region occurs in one sequence but not in another. This criterion was used because it is well known that repetitive sequences evolve faster than other regions of the genome [58], hence it is expected that they display a high level of polymorphism among distinct parasite strains. Additionally, because it is known that the number of repetitive antigenic motifs may affect antibody binding affinity [59], we hypothesized that

polymorphic repetitive epitopes would be differentially recognized by the sera of animals and human infected with distinct parasite DTUs, an assumption that was reinforced by our results.

The cross-reactivity of the epitopes among the sera from mice infected with distinct parasite strains is in agreement with an origin hypothesis of the different *T. cruzi* DTUs. In two-way comparisons, the CL Brener and Y strains, the two more phylogenetically related strains, shared a higher number of epitopes (4) compared to Y and Colombiana (1), whereas CL Brener and Colombiana did not share any epitope (Figure 1E).

Interestingly, despite the fact that all of the peptides are derived from the CL Brener genome, a smaller number of epitopes were identified in this strain compared with Y and Colombiana (Figure 1E). We speculate that the co-expression of alleles that encode the polymorphic epitopes in CL Brener may affect the titer of the antibody and/or its affinity for the variant epitopes. For example, the pattern of expression and the reactivity of the polymorphic peptides A6_30_col and B2_30_y (Figures 4B, 4C, 5B, and 5C) suggest that the co-expression of polymorphic epitopes in CL Brener could induce low-affinity antibodies. A similar phenomenon has been described for the polymorphic *T. cruzi* trans-sialidase (TS) multigene family, whereby TS displays a network of B-cell cross-reactive and polymorphic epitopes that delays the generation of high-affinity neutralizing antibodies and hamper an effective elicitation of a humoral response against these proteins [60]. Whether this is a more general adaptive immune evasion strategy that affects antibody affinity maturation, particularly in the case of hybrid strains, remains to be investigated.

Altogether, the results demonstrated that peptide C6_30_cons is a new *T. cruzi* antigen conserved in the majority of DTUs of this parasite. Using this peptide, in

association with other *T. cruzi* antigens, may improve the serodiagnosis of Chagas disease. The three polymorphic epitopes identified were able to discriminate among infections caused by the three different *T. cruzi* strains included in this study and, thus, have the potential to be used for the serotyping of infections caused by this parasite. This is the first study on the genomic scale to identify DTU-specific antigens. The genome sequencing of other *T. cruzi* strains will help identify new strain-specific and conserved epitopes and increase the number of antigen candidates for Chagas disease serodiagnosis and serotyping. The development of a robust panel of strain-specific epitopes may allow large-scale epidemiological studies aimed at correlating the infective strain with the variability in clinical outcomes observed in chagasic patients.

References

1. Martins-Melo FR, Alencar CH, Ramos AN Jr, Heukelbach J (2012) Epidemiology of mortality related to Chagas' disease in Brazil, 1999-2007. PLoS Negl Trop Dis. 6(2):e1508.
2. Bern C, Montgomery SP, Herwaldt BL, Rassi A, Jr., Marin-Neto JA, *et al.* (2007) Evaluation and treatment of chagas disease in the United States: a systematic review. JAMA 298: 2171-2181.
3. Chiari E, Dias JC, Lana M, Chiari CA (1989) Hemocultures for the parasitological diagnosis of human chronic Chagas' disease. Rev Soc Bras Med Trop. 22:19-23.
4. Ávila HA, Pereira JB, Thiemann O, Paiva E, Degraeve W, Morel CM, Simpson L (1993) Detection of *Trypanosoma cruzi* in blood specimens of chronic chagasic patients by polymerase chain reaction amplification of kinetoplast minicircle DNA: comparison with serology and xenodiagnosis. J. Clin. Microbiol, 31: 2421-2426.

5. Prata A (2001) Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. *Lancet Infect Dis* 1: 92-100.
6. Gomes YM (1997) PCR and sero-diagnosis of chronic Chagas' disease. *Biotechnological advances. Appl Biochem Biotechnol* 66: 107-119.
7. Furucho CR, Umezawa ES, Almeida I, Freitas VL, Bezerra R, *et al.* (2008) Inconclusive results in conventional serological screening for Chagas' disease in blood banks: evaluation of cellular and humoral response. *Trop Med Int Health* 13: 1527-1533.
8. Ramirez JD, Guhl F, Umezawa ES, Morillo CA, Rosas F, *et al.* (2009) Evaluation of adult chronic Chagas' heart disease diagnosis by molecular and serological methods. *J Clin Microbiol* 47: 3945-3951.
9. Tarleton RL (2001) Parasite persistence in the aetiology of Chagas disease. *Int J Parasitol* 31: 550-554.
10. Andrade CR, Andrade PP, Wright EP (1988) *Leishmania donovani donovani* antigens recognized by kala-azar patient sera and identification of cross-reacting antigens to Chagas' disease. *Braz J Med Biol Res* 21: 511-515.
11. Guhl F, Hudson L, Marinkelle CJ, Morgan SJ, Jaramillo C (1985) Antibody response to experimental *Trypanosoma rangeli* infection and its implications for immunodiagnosis of South American trypanosomiasis. *Acta Trop* 42: 311-318.
12. Vexenat Ade C, Santana JM, Teixeira AR (1996) Cross-reactivity of antibodies in human infections by the kinetoplastid protozoa *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania chagasi* and *Leishmania (viannia) braziliensis*. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 38: 177-185.
13. Meira WS, Galvao LM, Gontijo ED, Machado-Coelho GL, Norris KA, *et al.* (2002) *Trypanosoma cruzi* recombinant complement regulatory protein: a novel antigen for use

in an enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of Chagas' disease. *J Clin Microbiol* 40: 3735-3740.

14. da Silveira JF, Umezawa ES, Luquetti AO (2001) Chagas disease: recombinant *Trypanosoma cruzi* antigens for serological diagnosis. *Trends Parasitol* 17: 286-291.

15. Afonso AM, Ebell MH, Tarleton RL (2012) A systematic review of high quality diagnostic tests for Chagas disease. *PLoS Negl Trop Dis* 6: e1881.

16. Caballero ZC, Sousa OE, Marques WP, Saez-Alquezar A, Umezawa ES (2007) Evaluation of serological tests to identify *Trypanosoma cruzi* infection in humans and determine cross-reactivity with *Trypanosoma rangeli* and *Leishmania* spp. *Clin Vaccine Immunol* 14: 1045-1049.

17. Bhattacharyya T, Brooks J, Yeo M, Carrasco HJ, Lewis MD, *et al.* (2010) Analysis of molecular diversity of the *Trypanosoma cruzi* trypomastigote small surface antigen reveals novel epitopes, evidence of positive selection and potential implications for DTU-specific serology. *Int J Parasitol* 40: 921-928.

18. Brisse S, Verhoef J, Tibayrenc M (2001) Characterisation of large and small subunit rRNA and mini-exon genes further supports the distinction of six *Trypanosoma cruzi* lineages. *Int J Parasitol* 31: 1218-1226.

19. de Freitas JM, Augusto-Pinto L, Pimenta JR, Bastos-Rodrigues L, Goncalves VF, *et al.* (2006) Ancestral genomes, sex, and the population structure of *Trypanosoma cruzi*. *PLoS Pathog* 2: e24.

20. Souto RP, Fernandes O, Macedo AM, Campbell DA, Zingales B (1996) DNA markers define two major phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol* 83: 141-152.

21. Ackermann AA, Panunzi LG, Cosentino RO, Sanchez DO, Agüero F (2012) A genomic scale map of genetic diversity in *Trypanosoma cruzi*. *BMC Genomics* 13: 736.

22. Zingales B, Andrade SG, Briones MR, Campbell DA, Chiari E, *et al.* (2009) A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104: 1051-1054.
23. Bellini MF, Silistino-Souza R, Varella-Garcia M, de Azeredo-Oliveira MT, Silva AE (2012) Biologic and genetics aspects of chagas disease at endemic areas. *J Trop Med* 2012: 357948.
24. Buscaglia CA, Di Noia JM (2003) *Trypanosoma cruzi* clonal diversity and the epidemiology of Chagas' disease. *Microbes Infect* 5: 419-427.
25. Macedo AM, Pena SD (1998) Genetic Variability of *Trypanosoma cruzi*: Implications for the Pathogenesis of Chagas Disease. *Parasitol Today* 14: 119-124.
26. Andrade LO, Machado CR, Chiari E, Pena SD, Macedo AM (1999) Differential tissue distribution of diverse clones of *Trypanosoma cruzi* in infected mice. *Mol Biochem Parasitol* 100: 163-172.
27. Morales L, Romero I, Diez H, Del Portillo P, Montilla M, *et al.* (2002) Characterization of a candidate *Trypanosoma rangeli* small nucleolar RNA gene and its application in a PCR-based parasite detection. *Exp Parasitol* 102: 72-80.
28. Brasil PE, De Castro L, Hasslocher-Moreno AM, Sangenis LH, Braga JU (2010) ELISA versus PCR for diagnosis of chronic Chagas disease: systematic review and meta-analysis. *BMC Infect Dis* 10: 337.
29. DeFreitas JM, Augusto-Pinto L, Pimenta JR, Bastos-Rodrigues L, Gonçalves VF, *et al.* (2006) Ancestral genomes, sex, and the population structure of *Trypanosoma cruzi*. *PLoS Pathog* 2(3):e24.

30. Câmara AC, Varela-Freire AA, Valadares HM, Macedo AM, D'Avila DA, *et al.* (2010) Genetic analyses of *Trypanosoma cruzi* isolates from naturally infected triatomines and humans in northeastern Brazil. *Acta Trop* 115(3):205-11.
31. Bartholomeu DC, Silva RA, Galvao LM, el-Sayed NM, Donelson JE, *et al.* (2002) *Trypanosoma cruzi*: RNA structure and post-transcriptional control of tubulin gene expression. *Exp Parasitol* 102: 123-133.
32. Bonaldo MC, Souto-Padron T, de Souza W, Goldenberg S (1988) Cell-substrate adhesion during *Trypanosoma cruzi* differentiation. *J Cell Biol* 106: 1349-1358.
33. Koerich LB, Emmanuelle-Machado P, Santos K, Grisard EC, Steindel M (2002) Differentiation of *Trypanosoma rangeli*: high production of infective Trypomastigote forms in vitro. *Parasitol Res* 88: 21-25.
34. El-Sayed NM, Myler PJ, Bartholomeu DC, Nilsson D, Aggarwal G, *et al.* (2005) The Genome Sequence of *Trypanosoma cruzi*, Etiologic Agent of Chagas Disease. *Science* 309:409-415.
35. Larsen JE, Lund O, Nielsen M (2006) Improved method for predicting linear B-cell epitopes. *Immunome Res* 2: 2.
36. Chenna R, Sugawara H, Koike T, Lopez R, Gibson TJ, *et al.* (2003) Multiple sequence alignment with the Clustal series of programs. *Nucleic Acids Res* 31: 3497-3500.
37. Aslett M, Aurrecochea C, Berriman M, Brestelli J, Brunk BP, *et al.* (2010) TriTrypDB: a functional genomic resource for the Trypanosomatidae. *Nucleic Acids Res* 38: D457-462.
38. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215: 403-410.

39. Frank R (2002) The SPOT-synthesis technique. Synthetic peptide arrays on membrane supports--principles and applications. *J Immunol Methods* 267: 13-26.
40. Wellings DA, Atherton E (1997) Standard Fmoc protocols. *Methods Enzymol* 289: 44-67.
41. Hedman K, Hietala J, Tiilikainen A, Hartikainen-Sorri AL, Raiha K, *et al.* (1989) Maturation of immunoglobulin G avidity after rubella vaccination studied by an enzyme linked immunosorbent assay (avidity-ELISA) and by haemolysis typing. *J Med Virol* 27: 293-298.
42. Westenberger SJ, Barnabe C, Campbell DA, Sturm NR (2005) Two hybridization events define the population structure of *Trypanosoma cruzi*. *Genetics* 171: 527-543.
43. Monteiro WM, Margioto Teston AP, Gruending AP, Dos Reis D, Gomes ML, *et al.* (2013) *Trypanosoma cruzi* I and IV Stocks from Brazilian Amazon Are Divergent in Terms of Biological and Medical Properties in Mice. *PLoS Negl Trop Dis* 7: e2069.
44. Wells JA (1991) Systematic mutational analyses of protein-protein interfaces. *Methods Enzymol* 202: 390-411.
45. Porcile PE, Santos MR, Souza RT, Verbisck NV, Brandao A, *et al.* (2003) A refined molecular karyotype for the reference strain of the *Trypanosoma cruzi* genome project (clone CL Brener) by assignment of chromosome markers. *Gene* 308: 53-65.
46. Zingales B, Miles MA, Campbell DA, Tibayrenc M, Macedo AM, *et al.* (2012) The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: rationale, epidemiological relevance and research applications. *Infect Genet Evol* 12: 240-253.
47. Gomes YM, Lorena VM, Luquetti AO (2009) Diagnosis of Chagas disease: what has been achieved? What remains to be done with regard to diagnosis and follow up studies? *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104: 115-121.

48. Llewellyn MS, Miles MA, Carrasco HJ, Lewis MD, Yeo M, *et al.* (2009) Genome-scale multilocus microsatellite typing of *Trypanosoma cruzi* discrete typing unit I reveals phylogeographic structure and specific genotypes linked to human infection. PLoS Pathog 5: e1000410.
49. Di Noia JM, Buscaglia CA, De Marchi CR, Almeida IC, Frasch AC (2002) A *Trypanosoma cruzi* small surface molecule provides the first immunological evidence that Chagas' disease is due to a single parasite lineage. J Exp Med 195: 401-413.
50. Carmona SJ, Sartor PA, Leguizamon MS, Campetella OE, Agüero F (2012) Diagnostic peptide discovery: prioritization of pathogen diagnostic markers using multiple features. PLoS One 7: e50748.
51. Aguirre S, Silber AM, Brito ME, Ribone ME, Lagier CM, *et al.* (2006) Design, construction, and evaluation of a specific chimeric antigen to diagnose chagasic infection. J Clin Microbiol 44: 3768-3774.
52. DaRocha WD, Bartholomeu DC, Macedo CD, Horta MF, Cunha-Neto E, *et al.* (2002) Characterization of cDNA clones encoding ribonucleoprotein antigens expressed in *Trypanosoma cruzi* amastigotes. Parasitol Res 88: 292-300.
53. Soto M, Requena JM, Garcia M, Gómez LC, Navarrete I, Alonso C. Genomic organization and expression of two independent gene arrays coding for two antigenic acidic ribosomal proteins of *Leishmania* (1993) J Biol Chem 268(29):21835-21843.
54. Requena JM, Alonso C, Soto M. Evolutionarily conserved proteins as prominent immunogens during *Leishmania* infections (2000) Parasitol Today 16(6):246-250.
55. Gu W, Helms V (2005) Dynamical binding of proline-rich peptides to their recognition domains. Biochim Biophys Acta 1754(1-2):232-238.

56. Ball LJ, Kühne R, Schneider-Mergener J, Oschkinat H (2005) Recognition of proline-rich motifs by protein-protein-interaction domains. *Angew Chem Int Ed Engl* 44(19):2852-2869.
57. Pais FS, DaRocha WD, Almeida RM, Leclercq SY, Penido ML, *et al.* (2008) Molecular characterization of ribonucleoproteic antigens containing repeated amino acid sequences from *Trypanosoma cruzi*. *Microbes Infect* 10: 716-725.
58. Carlton JM, Adams JH, Silva JC, Bidwell SL, Lorenzi H, *et al.* (2008) Comparative genomics of the neglected human malaria parasite *Plasmodium vivax*. *Nature* 455: 757-763.
59. Valiente-Gabioud AA, Veaute C, Perrig M, Galan-Romano FS, Sferco SJ, *et al.* (2011) Effect of repetitiveness on the immunogenicity and antigenicity of *Trypanosoma cruzi* FRA protein. *Exp Parasitol* 127: 672-679.
60. Pitcovsky TA, Buscaglia CA, Mucci J, Campetella O (2002) A functional network of intramolecular cross-reacting epitopes delays the elicitation of neutralizing antibodies to *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase. *J Infect Dis* 186: 397-404.

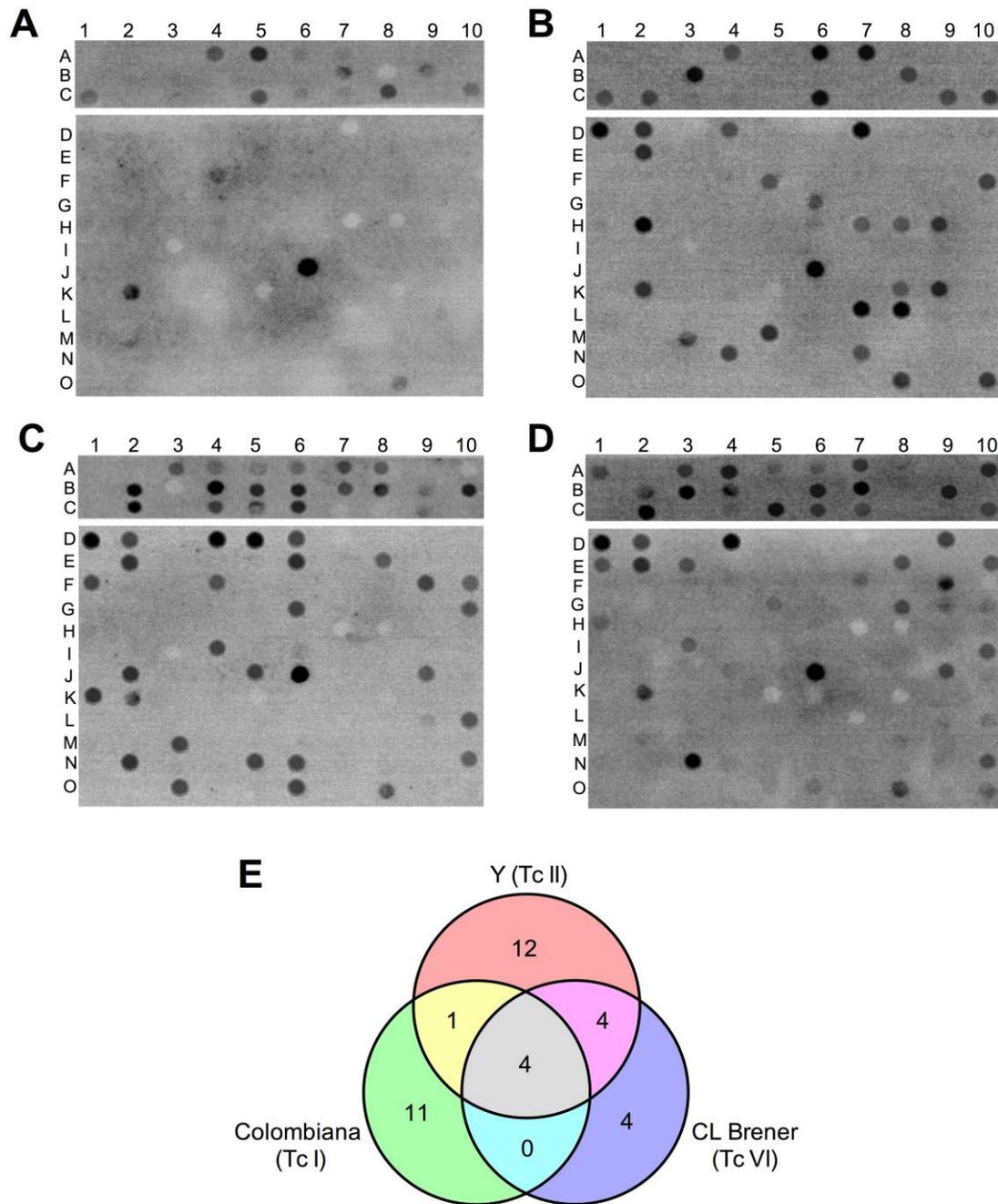


Figure 1 – Immunoscreening of peptide arrays with sera from mice infected with different *T. cruzi* strains. (A) Sera from un-infected mice; sera from mice infected with Colombiana (TcI) (B), Y (TcII) (C), or CL Brener (TcVI) (D). (E) Venn diagram showing the specific and shared epitopes among *T. cruzi* strains.

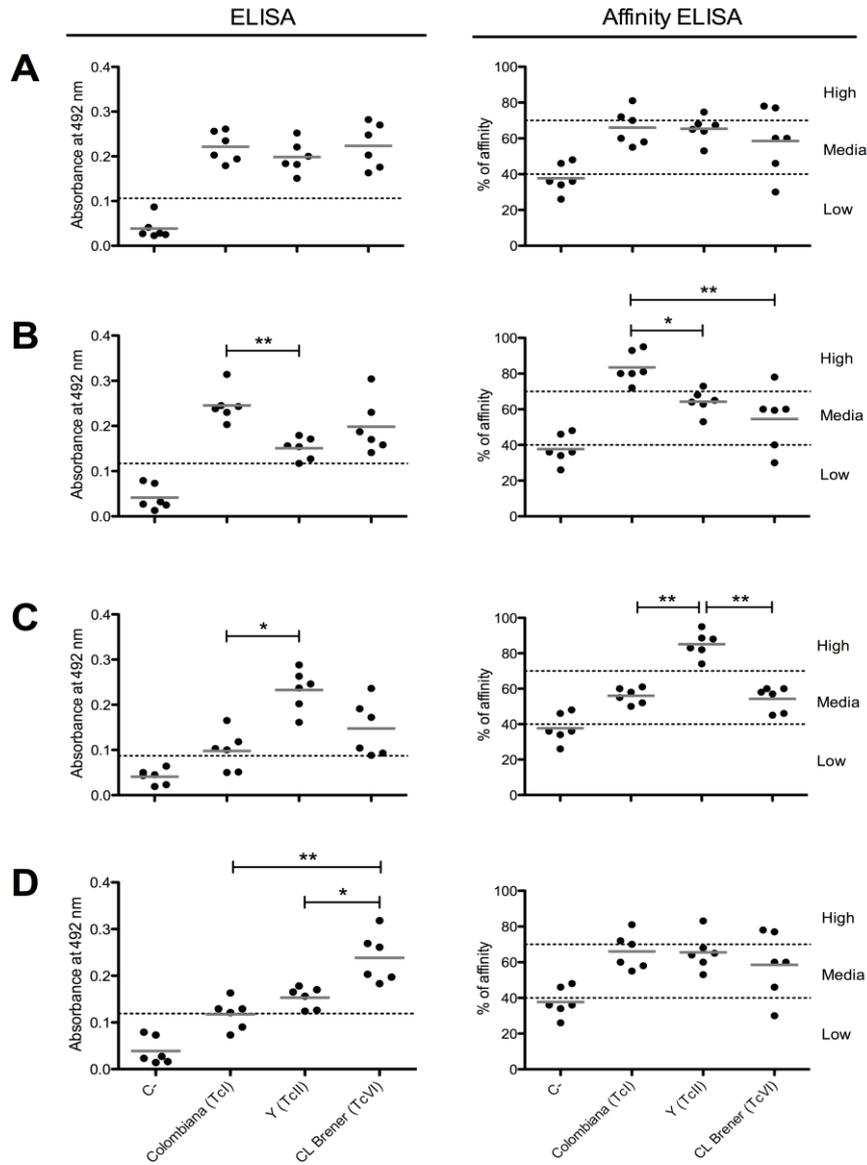


Figure 2 – Reactivity and affinity of sera from *T. cruzi*-infected mice against conserved and polymorphic epitopes. (A) Peptide C6_30_cons. (B) Peptide A6_30_col. (C) Peptide B2_30_y. (D) Peptide B9_30_cl. The dotted line represents the cutoff value. The solid gray line represents the mean values. C-, un-infected mice. Colombiana (TcI), mice infected with the Colombiana strain. Y (TcII), mice infected with the Y strain. CL Brener (TcVI), mice infected with the CL Brener strain. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.005$.

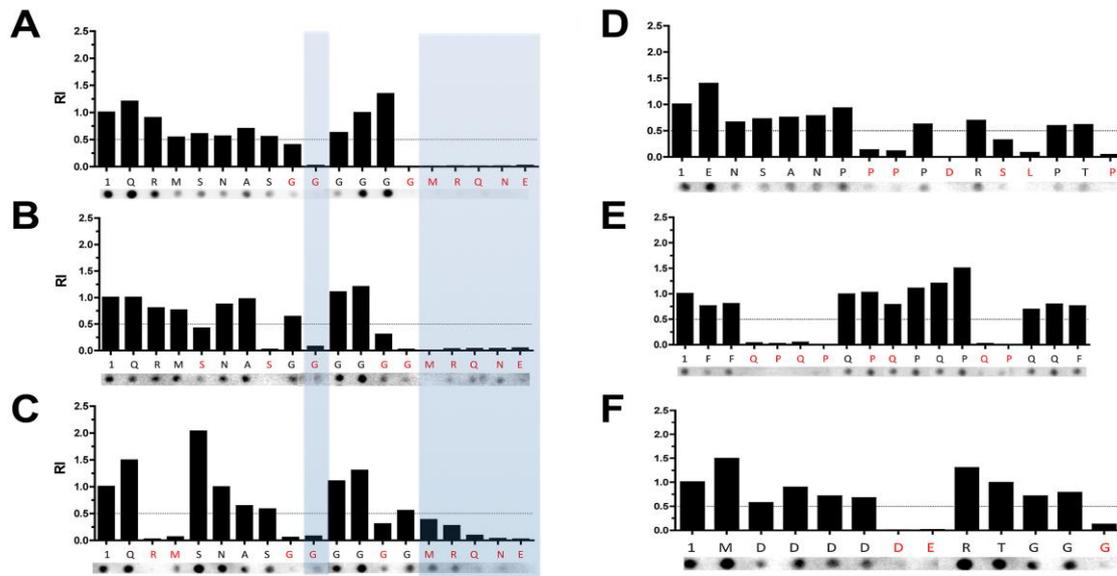


Figure 3 – Mapping of antibody binding sites on the conserved and polymorphic epitopes by Ala-Scan. Reactivity of peptide C6_30_cons against the sera from mice infected with Colombiana (A), Y (B), and CL Brener (C). Reactivity of peptide A6_30_col against the sera from mice infected with the Colombiana clone (D). Reactivity of peptide B2_30_y against the sera from mice infected with the Y strain (E). Reactivity of peptide B9_30_cl against the sera from mice infected with the CL Brener clone (F). 1, original peptide. RI, relative intensity calculated by the ratio between the reactivity of the peptide with a specific amino acid substitution and the original peptide. The dotted line indicates half of the intensity value obtained with the original peptide. The red letters represent amino acid substitutions that reduce the reactivity to at least half of the value obtained with the original peptide. The blue squares show the conserved amino acids critical for antibody binding with the sera from mice infected with different *T. cruzi* strains.

A	Colombiana (TcI)	QRMSNAS--GGGGG--MRQNE
	Y (TcII)	KKKANGC--GGGGG--MRQNE
	231 (TcIII)	QRM---LGGGGG--MRQNE
	CanIII (TcIV)	QRMPNASGGGGGGGETRQNE
	115 (TcV)	QRMSNASGGG-----MRQNE
	CL Brener Esmo (TcVI)	QRMSNASGGGGG--MRQNE
	CL Brener Non-esmo (TcVI)	QRMSNASGGGGG--MRQNE
B	Colombiana (TcI)	---ENSANPPPPDRSLPTP
	Y (TcII)	-----RRILPPPDR---TP
	231 (TcIII)	---ENGGNHPPPGRDHPRP
	CanIII (TcIV)	----KKPTPPPPPA--PTP
	115 (TcV)	KISANRVKTPHPPR--KTP
	CL Brener Esmo (TcVI)	---ENSANPP--DRSLPT-
	CL Brener Non-esmo (TcVI)	--- ENSANPPPPDRSLPTP
C	Colombiana (TcI)	FFQPQPQP----QPQQF
	Y (TcII)	FF QPQPQPQPQPQPQPQQF
	231 (TcIII)	FFQPQPQPQP--QPQQS
	CanIII (TcIV)	FFQPQPQP----QPQQF
	115 (TcV)	SFQPQPQP----QPQQF
	CL Brener Esmo (TcVI)	FFQPQPQPQPQPQPQPQQF
	CL Brener Non-esmo (TcVI)	FFQLQPQP----QPFOY
D	Colombiana (TcI)	MDDDDDDERTGGG
	Y (TcII)	YDKDDDD-ERTGGG
	231 (TcIII)	MDDDD D --ETYRGG
	CanIII (TcIV)	MDDDDDD-ERTGGG
	115 (TcV)	MDDDDDDERTGGG
	CL Brener Esmo (TcVI)	MDDDDD--ETYRGG
	CL Brener Non-esmo (TcVI)	MDDDDDDERTGGG

Figure 4 – Reactivity prediction of epitopes based on the sequences encoding the identified peptides in different *T. cruzi* strains. (A) Peptide C6_30_cons. (B) Peptide A6_30_col. (C) Peptide B2_30_y. (D) Peptide B9_30_cl. The bold sequences represent the synthetic peptide tested. The red letters represent key amino acids for antibody binding.

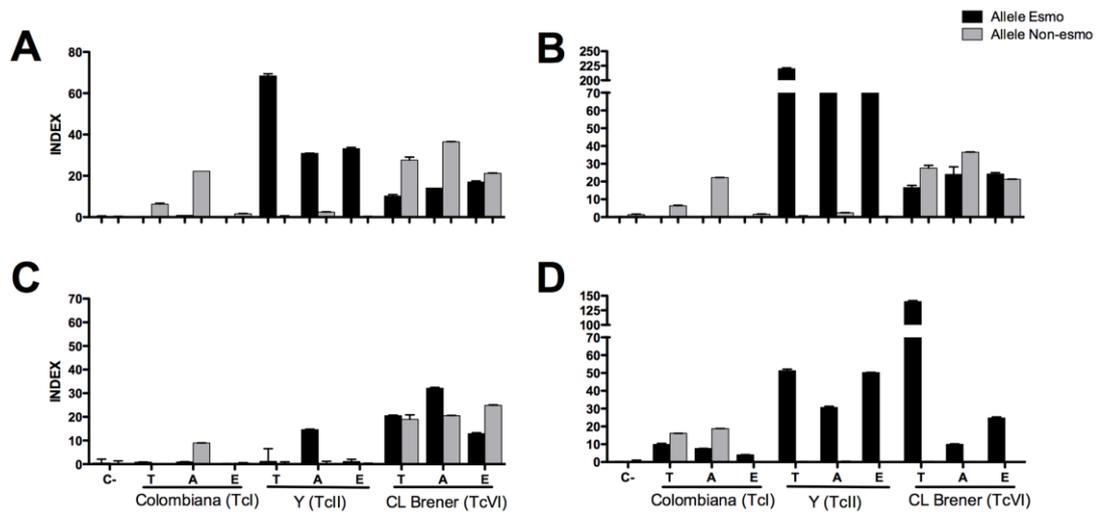


Figure 5 – Expression levels of allele-specific genes encoding the identified conserved and polymorphic peptides. (A) Peptide C6_30_cons. (B) Peptide A6_30_col. (C) Peptide B2_30_y. (D) Peptide B9_30_cl. INDEX was calculated by the copy number from the mRNA level of each gene normalized by the GAPDH mRNA level. C-, negative control. T, trypomastigote. A, amastigote. E, epimastigote. The alleles were classified based on the annotation of the hybrid CL Brener genome.

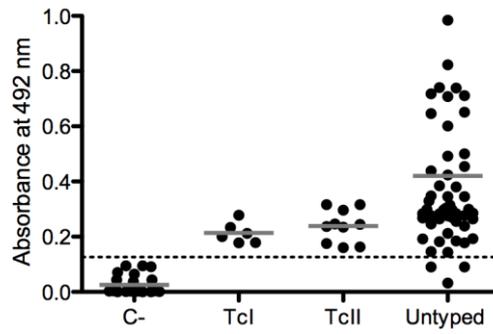


Figure 6 – Reactivity of sera from humans infected with *T. cruzi* against the conserved peptide C6_30_cons. The dotted line represents the cutoff value. The solid gray line represents the mean values. C-, uninfected human. TcI, Chagasic patients infected with TcI DTU. TcII, Chagasic patients infected with the TcII DTU. Untyped, Chagasic patients infected with untyped parasites.

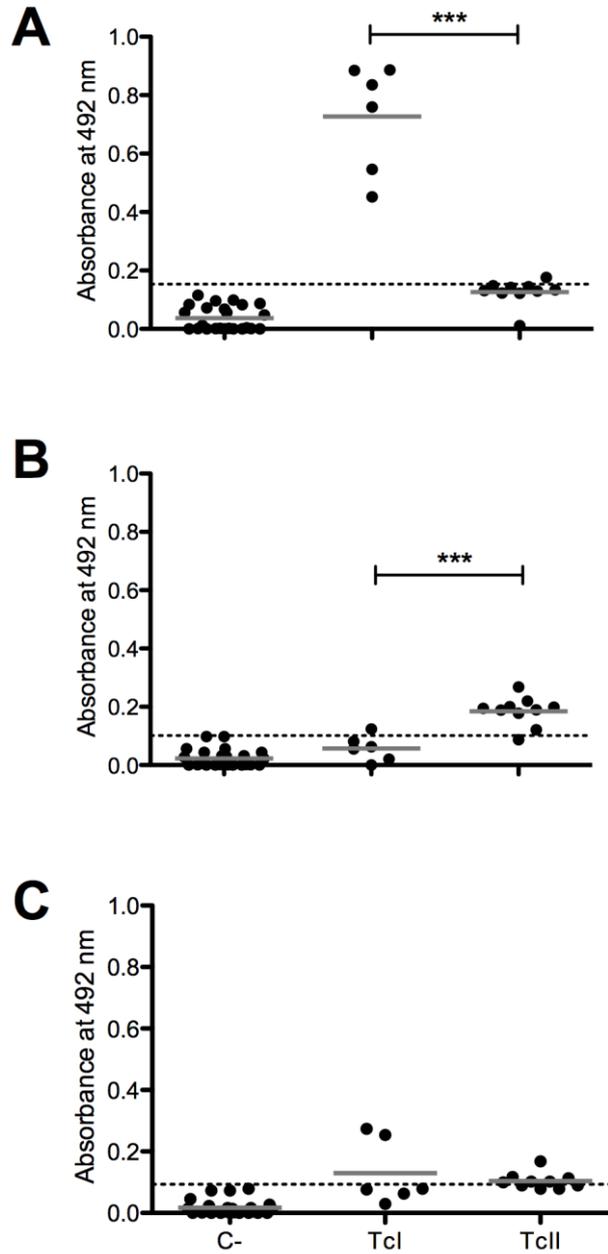


Figure 7 – ELISA with sera from humans infected with TcI and TcII *T. cruzi* DTUs against the polymorphic peptides. (A) Peptide A6_30_col. (B) Peptide B2_30_y. (C) Peptide B9_30_cl. The dotted line represents the cutoff value. The solid gray line represents the mean values. C-, uninfected human. TcI, Chagasic patients infected with TcI DTU. TcII, Chagasic patients infected with the TcII DTU. *p < 0.001.**