

THAÍS ELOI DA SILVA

DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE INFECÇÃO POR  
*TRYPANOSOMA CRUZI*, DETERMINAÇÃO DE *DISCRETE*  
*TYPING UNIT* E SUA ASSOCIAÇÃO COM O PERFIL  
IMUNOLÓGICO EM AMOSTRAS DE PACIENTES  
CHAGÁSICOS AGUDOS



Instituto de Ciências Biológicas  
Universidade Federal de Minas Gerais  
Fevereiro/2016

THAÍS ELOI DA SILVA

DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE INFECÇÃO POR  
*TRYPANOSOMA CRUZI*, DETERMINAÇÃO DE *DISCRETE*  
*TYPING UNIT* E SUA ASSOCIAÇÃO COM O PERFIL  
IMUNOLÓGICO EM AMOSTRAS DE PACIENTES  
CHAGÁSICOS AGUDOS

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

Área de concentração: Biologia Celular

Orientador(a): Profa. Dra. Walderez Ornelas Dutra

Instituto de Ciências Biológicas  
Universidade Federal de Minas Gerais

Fevereiro/2016

*O correr da vida embrulha tudo.  
A vida é assim: esquenta e esfria,  
aperta e daí afrouxa,  
sossega e depois desinquieta.  
O que ela quer da gente é coragem.*

**Grande Sertão Veredas - João Guimarães Rosa**

## **LOCAL DE REALIZAÇÃO DA DISSERTAÇÃO**

Laboratório de Biologia das Interações Celulares – LBIC – UFMG

## **ORIENTAÇÃO**

Profa. Dra. Walderez Ornelas Dutra

## **COLABORADORES**

### **Universidade Federal de Minas Gerais**

Instituto de Ciências Biológicas - ICB

Laboratório de Genética Bioquímica – Dep. de Bioquímica e Imunologia

Profa. Dra. Andréa Mara Macedo

Ms. Priscilla Almeida da Costa

### **Universidade Federal do Pará**

Hospital das Clínicas Gaspar Vianna

Dra. Adriana Almeida

Dra. Dilma Souza

### **Hospital Mario Pena**

Dr. Kenneth John Gollob

## **AGÊNCIAS FINANCIADORAS**

CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior.

FAPEMIG - Fundação de Amparo a Pesquisa de Minas Gerais.

## **AGRADECIMENTOS**

---



Agradeço primeiramente a sociedade brasileira que financiou esta pesquisa e a minha formação. Todos os nossos esforços são em busca de compreender mais profundamente esta doença que ainda põe em risco milhões de brasileiros.

Agradeço a minha orientadora, professora Walderez Dutra pelo incentivo, confiança e conhecimento compartilhado durante todo o mestrado.

Às colaboradoras, professora Andréa Mara Macedo e a doutoranda Priscilla Almeida da Costa pelas grandes contribuições a este trabalho.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular pelos ensinamentos e dedicação.

Aos colegas da Pós-graduação pela boa convivência e pelos bons momentos durante as disciplinas.

Aos pacientes, sujeitos desse estudo, sem os quais, nada disso seria possível.

Aos meus queridos amigos do Laboratório de Biologia das Interações Celulares, pelos dias de convívio, pela parceria, pela força em vários momentos, pelas boas risadas e boas histórias tanto nas bancadas do laboratório quanto nas mesas de bar.

Às minhas parceiras da PNE, por muitos dos dias mais loucos da minha vida e pelos que ainda estão por vir. Pela parceria e amizade que vou levar pra vida toda.

Aos meus amigos da vida, alguns de longa data e outros presentes que a graduação me deu, com quem sempre contei nos momentos difíceis e com quem dividi momentos maravilhosos, pela parceria, pela torcida, pelo amor e pelos muitos momentos que ainda virão.

A minha família, base da minha vida, pelo amor e por sempre acreditar no meu sucesso, compreendendo os muitos momentos de ausência.

Aos meus pais, Sebastião e Elizabeth, pelo apoio e dedicação, por embarcarem comigo em todas as empreitadas. Por acreditarem sempre no meu potencial. A quem sempre quero orgulhar. Meu amor e gratidão eternos.



Segundo a Organização Mundial de Saúde, existem cerca de 7 milhões de pessoas infectadas pelo *Trypanosoma cruzi* em todo o mundo (WHO, 2014). A doença de Chagas foi, por muito tempo, considerada uma doença endêmica de áreas rurais e países latinos. No entanto, hoje, apresenta um novo perfil de incidência, dada a sua disseminação para áreas não endêmicas, principalmente por transfusão sanguínea, transplante de órgãos e o surgimento de surtos de contaminação por via oral, tornando-se uma preocupação global. Um dos grandes desafios no tocante à doença é a identificação de biomarcadores de prognóstico e evolução clínica diferencial em indivíduos infectados compreendendo como os eventos imunológicos da fase aguda podem direcionar a progressão da doença na fase crônica. *T. cruzi* é classificado atualmente em seis *discrete typing unit* (DTUs) (Tc I – VI) de acordo com Zingales (2009). Muitos autores acreditam que a diversidade genética do parasito pode influenciar no curso da infecção, e que cepas de pertencentes a diferentes DTUs induzem respostas distintas nos indivíduos infectados, polarizando as formas clínicas. Nosso estudo objetivou: (1) diagnosticar, por reação em cadeia da polimerase, a infecção por *Trypanosoma cruzi*, (2) determinar o seu respectivo DTU utilizando testes sequenciais de PCR, baseados em 3 marcadores: o gene COII, o espaçador intergênico do gene miniéxon e gene rDNA 24S $\alpha$ , e (3) analisar o perfil imunológico em amostras de pacientes chagásicos agudos, provenientes do estado do Pará, correlacionando a DTU ao perfil imunológico e clínico apresentado por esses indivíduos. Em nossas análises, foi possível a identificação de três DTU distintas nas amostras de 13 dos 31 pacientes provenientes do Estado do Pará (TcI, TcIII e TcIV) utilizando metodologia proposta por Ávila (2009), dentre estes, dois casos de co-infecção por TcIII e TcIV ainda não relatados na literatura. Importante destacar que TcIII é raramente encontrada infectando humanos sendo nosso registro o primeiro a identificar TcIII em humanos no estado do Pará. Os indivíduos que apresentaram baixa parasitemia mostraram maiores frequências de células T CD8<sup>+</sup> ativadas expressando granzima A, IFN- $\gamma$  e IL-17, sugerindo que os indivíduos com baixa parasitemia têm um perfil de resposta mais efetor no controle do parasito. Não houve diferenças significativas entre a frequência de células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> e produção das citocinas IFN- $\gamma$  e IL-17 entre indivíduos infectados por *T. cruzi* pertencentes ao TcI, TcIII e TcIV. No entanto, observou-se uma maior frequência de expressão de IL-10 por células T CD8<sup>+</sup> em pacientes onde foram identificados TcIII e TcIV. Deste modo, nossos dados vêm trazer novas contribuições para o



entendimento da fase aguda da doença e a influência de presença/níveis de parasitemia e da diversidade genética nos eventos imunológicos durante curso da infecção por *T. cruzi*.

**Palavras-chave:** *T. cruzi*, diversidade genética, DTU, TcIII, TcI, TcIV, resposta imunológica, fase aguda, parasitemia.



According to the World Health Organization, there are about 7 million people infected with *Trypanosoma cruzi* worldwide (WHO, 2014). Chagas disease has long been considered an endemic disease in rural areas and Latin countries. However, its spread to non-endemic areas mainly by blood transfusion, and organ transplantation has been observed. Moreover, the emergence of outbreaks, mainly due to oral infection is becoming a global concern. A major challenge with regards to the disease is the identification of prognostic biomarkers of differential clinical outcome in chronically infected individuals, as well as the understanding as to how the immunological events in the acute phase can drive disease progression in chronic phase. *T. cruzi* is currently classified in six *discrete type units* DTUs (Tc I - VI) according to Zingales (2009). Many authors believe that the genetic diversity of the parasite can influence the course of infection, and that strains belonging to different DTU induce different responses in infected individuals, polarizing clinical forms. Our study aimed to (1) diagnose, by polymerase chain reaction, *T. cruzi* infection in acute patients, (2) determine parasite DTU using sequential tests PCR, based on 3 markers: the COII gene, the intergenic spacer miniéxon gene and gene rDNA 24S $\alpha$ , and (3) analyze the immune profile of the acute patients, correlating the DTU to the immune and clinical profile presented by these individuals. In our analysis, it was possible to identify three distinct DTU in samples from 13 of the 31 patients from Pará (TcI, TcIII and TcIV) using the methodology proposed by Avila (2009). Among these, two cases of co-infection TcIII and TcIV, not yet reported in the literature, were observed. Importantly, TcIII is rarely found infecting human, being our record the first to identify TcIII in humans in the state of Pará. The individuals who presented low parasitemia showed higher frequencies of CD8<sup>+</sup> T cells expressing activated granzyme A, IFN- $\gamma$  and IL-17, suggesting that individuals with low parasitemia have a more effector response profile, favouring parasite control. There were no significant differences between the frequency of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells and production of IFN- $\gamma$  and IL-17 from the *T. cruzi* -infected individuals belonging to the TcI, TcIII and TcIV. However, a higher frequency IL-10 expression by CD8<sup>+</sup> T cells was observed in patients infected with TcIII and TcIV. Thus, our data brings new contributions to the understanding of the acute phase of the disease and the influence of presence / levels of parasitemia and parasite genetic diversity in immunological events during the course of *T. cruzi* infection.

**Keywords:** *T. cruzi* , genetic diversity, DTU, TcIII, TcI, TcIV, immune response, acute phase, parasitemia.



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Ciclo de vida do <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	24
<b>Figura 2</b> - Mapa de distribuição das seis DTU na América Latina e o ciclo de transmissão ao qual está associado.....	33
<b>Figura 3</b> - Esquema do ensaio triplo utilizado para discriminação das seis linhagens principais de <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	43
<b>Figura 4</b> - Exemplo da estratégia de análise para determinação dos valores de pixels por área das bandas de 330pb do kDNA para estimativa da parasitemia .....	47
<b>Figura 5</b> - Gel da reação de PCR para amplificação da região variável do minicírculo do kDNA.....	53
<b>Figura 6</b> - Gel da reação de PCR FRLP para a amplificação do gene da Citocromo Oxidase II .....	55
<b>Figura 7</b> - Gel da reação de PCR para amplificação da região intergênica dos genes do miniéxon.....	56
<b>Figura 8</b> - Gel da reação de PCR para a amplificação da região 3' do gene rDNA 24sa.....	57

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1-</b>	Sequências dos iniciadores utilizados neste trabalho.....	44
<b>Quadro 2-</b>	Dados clínicos dos pacientes positivos para a PCR do KDNA de <i>T. cruzi</i> . Idade, tempo decorrido do diagnóstico até o momento da coleta, data da coleta, localidade de residência e sintomas relatados.....	51
<b>Quadro 3-</b>	Lista de pacientes infectados por <i>T. cruzi</i> e a respectiva caracterização da DTU do parasito, identificadas pelas reações de PCR para amplificação dos genes da COII, Região intergênia do Miniexon e rDNA24sa.....	58

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1-</b>	Parasitemia determinada para cada amostra positiva para a reação de PCR da região variável do minicírculo do kDNA usada como diagnóstico para infecção por <i>T. cruzi</i> .....	59
<b>Tabela 2-</b>	Frequência de LT CD4 <sup>+</sup> , LT CD8 <sup>+</sup> e razão de CD4/CD8 no sangue periférico de pacientes chagásicos positivos para PCR de amplificação da região variável do kDNA de <i>T. cruzi</i> .....	61
<b>Tabela 3-</b>	Frequência de LT CD4 <sup>+</sup> CD28 <sup>-</sup> e LT CD8 <sup>+</sup> CD28 <sup>-</sup> , CD4 <sup>+</sup> CTLA-4 <sup>+</sup> e CD8 <sup>+</sup> CTLA-4 <sup>+</sup> e CD4 <sup>+</sup> HLA-DR <sup>+</sup> e CD8 <sup>+</sup> HLA-DR <sup>+</sup> no sangue periférico de pacientes chagásicos positivos para a reação de PCR para amplificação da região variável do minicírculo do kDNA de <i>T. cruzi</i> .....	62
<b>Tabela 4-</b>	Porcentagem de expressão de citocinas dentro da população linfocitária total e frequência de células TCD4 <sup>+</sup> e TCD8 <sup>+</sup> positivas para cada uma das citocinas analisadas no sangue periférico de pacientes chagásicos agudos com alta (n=10) e baixa (n=9) parasitemia.....	68
<b>Tabela 5-</b>	Grupos de pacientes divididos de acordo com a DTU a qual pertencem, grupo TcI (n=10) e o grupo TcIII/TcIV (n=3) e os respectivos valores para parasitemia.....	70
<b>Tabela 6-</b>	Frequência de LT CD4 <sup>+</sup> e CD8 <sup>+</sup> totais, frequência de LT CD4 <sup>+</sup> CD28 <sup>-</sup> e LT CD8 <sup>+</sup> CD28 <sup>-</sup> , CD4 <sup>+</sup> CTLA-4 <sup>+</sup> e CD8 <sup>+</sup> CTLA-4 <sup>+</sup> e CD4 <sup>+</sup> HLA-DR <sup>+</sup> e CD8 <sup>+</sup> HLA-DR <sup>+</sup> em pacientes pertencentes aos grupos TcI e TcIII/TcIV.....	72
<b>Tabela 7-</b>	Porcentagem de expressão de citocinas dentro da população linfocitária total e frequência de células TCD4 <sup>+</sup> e TCD8 <sup>+</sup> positivas para cada uma das citocinas analisadas no sangue periférico de pacientes chagásicos agudos pertencente ao TcI (n=9) e TcIV (n=3).....	73



## LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1** - Análise da frequência de células TCD4<sup>+</sup> CD45-RO<sup>+</sup> (A) e TCD8<sup>+</sup> CD45-RO<sup>+</sup> (B) presentes no sangue periférico de pacientes chagásicos agudos com alta (barras escuras, n=10) e baixa (barras claras, n=9) parasitemia..... 64
- Gráfico 2** - Porcentagem de expressão de Granzima A por células TCD8<sup>+</sup> no sangue periférico de pacientes chagásicos agudos com alta (barra escura, n=6) e baixa (barra clara, n=5) parasitemia..... 66
- Gráfico 3** - Análise de correlação entre parasitemia e a frequência de LTCD8<sup>+</sup> GRA<sup>+</sup> (n=11)..... 66

## LISTA DE ABREVIATURAS

DC	- Doença de Chagas
<i>T. cruzi</i>	- <i>Trypanosoma cruzi</i>
kDNA	- DNA do cinetoplasto
IL-12	- Interleucina 12
IL-10	- Interleucina 10
IL-17	- Interleucina 17
IFN- $\gamma$	- Interferon gama
TNF- $\alpha$	- Fator de Necrose Tumoral alfa
IL-6	- Interleucina 6
ROS	- Espécies reativas de oxigênio
NO	- Óxido nítrico
GRA A	- Granzima A
DTU	- <i>Discrete typing unit</i> (Unidade discreta de tipagem)
APC	- Célula Apresentadora de Antígeno
CO II	- Citocromo oxidase II
iNOS	Óxido nítrico sintase
MHC	Complexo de histocompatibilidade

## SUMARIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	21
1.1 Considerações gerais sobre a Doença de Chagas.....	22
1.2 Manifestações Clínicas.....	26
1.3 Aspectos imunológicos da Doença de Chagas.....	27
1.4 Variabilidade intraespecífica de <i>T. cruzi</i> .....	31
1.5 Aspectos epidemiológicos da Doença de Chagas.....	33
1.6 Diagnóstico molecular da infecção por <i>T. cruzi</i> .....	35
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	38
2.1 Objetivo geral.....	39
2.2 Objetivos específicos.....	39
<b>3. METODOLOGIA</b> .....	40
3.1 Pacientes e critério de inclusão.....	41
3.2 Coletas, armazenamento de sangue para extração de DNA e obtenção de células para citometria de fluxo.....	41
3.3 Extração de DNA do sangue para genotipagem de <i>T. cruzi</i> .....	42
3.4 Diagnóstico Molecular de infecção por <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	42
3.4.1 PCR da região variável do minicírculo do kDNA.....	44
3.4.2 Caracterização das subpopulações de <i>T. cruzi</i> .....	45
3.4.2.1 PCR – RFLP do gene mitocondrial Citocromo Oxidase subunidade II.....	45
3.4.2.2 Amplificação da região intergênica dos genes do miniéxon.....	45
3.4.2.3 Amplificação da região 3' do gene rDNA 24Sa.....	46
3.5 Estimativa da parasitemia através de análise pelo software Image J.....	46
3.6 Análises estatísticas.....	47
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	48
4.1 Aspectos clínicos de pacientes que apresentaram resultado positivo para PCR utilizando iniciadores para kDNA de <i>T. cruzi</i> .....	49
4.2 Diagnóstico molecular da infecção por <i>T. cruzi</i> .....	53
4.2.1 Genotipagem do DNA de <i>Trypanosoma cruzi</i> extraído das amostras de pacientes.....	54
4.2.2 Aspectos imunológicos de pacientes que apresentaram resultado positivo para PCR utilizando iniciadores para kDNA de <i>T. cruzi</i> .....	58
4.3 Determinação da Parasitemia e cálculo da Mediana.....	58
4.4 Avaliação da correlação entre parasitemia estimada e parâmetros demográficos.....	60
4.5 Estudo das populações de células T em pacientes chagásicos agudos e seu estado de ativação entre os indivíduos com alta e baixa parasitemia.....	60
4.6 Análise do status de memória de células T de pacientes chagásicos com alta e baixa parasitemia.....	63

4.7	Expressão diferencial de Granzima A em células TCD8 <sup>+</sup> de pacientes chagásicos agudos com alta e baixa parasitemia.....	65
4.8	Comparação do perfil de citocinas entre pacientes chagásicos agudos com alta e baixa parasitemia.....	67
4.9	Aspectos imunológicos de pacientes agudos infectados por <i>T. cruzi</i> com DTU determinada por PCR.....	69
4.9.1	Discriminação dos pacientes infectados por <i>T. cruzi</i> com DTU determinada em TcI, TcIII e TcIV.....	69
4.9.2	Estudo das populações de células T em pacientes chagásicos agudos, seu estado de ativação e produção de citocinas entre os indivíduos pertencentes aos grupos TcI e TcIII/TcIV.....	72
5.	<b>CONCLUSÃO</b> .....	74
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	76

## 1. INTRODUÇÃO

---

## 1.1 Considerações gerais sobre a Doença de Chagas

A Tripanosomíase americana, ou Doença de Chagas (DC), carrega o nome do pesquisador brasileiro Carlos Chagas que a identificou em 1909. A competência científica de Carlos Chagas permitiu que este descrevesse a biologia, os reservatórios, transmissores, epidemiologia, manifestações clínicas e patologia associada à doença em um curto espaço de tempo (CHAGAS, 1909). Poucas vezes uma enfermidade foi descrita de maneira tão completa por um mesmo pesquisador.

A DC é uma doença infecciosa potencialmente fatal cujo agente etiológico é o protozoário hemo-flagelado *Trypanosoma cruzi*. Na infecção clássica, o protozoário é transmitido junto às fezes e urina do inseto hematófago durante o repasto sanguíneo. O vetor, popularmente conhecido como barbeiro, pertence à família Reduviidae cujos gêneros *Triatoma*, *Rhodnius* e *Panstrongylus* são os de maior importância epidemiológica no mundo. No Brasil, o vetor triatomíneo é o de maior distribuição, sendo encontrado em praticamente todas as regiões do país (DIAS, 2000). A doença é comum em localidades rurais e ribeirinhas, pelo maior contato entre a população e o vetor, além da proximidade com os reservatórios naturais do agente.

A transmissão por transplante de órgãos, transfusão de sangue e transmissão congênita são menos frequentes (MONCAYO, 2003), porém demandam atenção dos órgãos responsáveis pelos bancos de sangue e de órgãos, principalmente naquelas regiões onde o controle é ainda deficiente e onde a doença não é endêmica. A transmissão por via oral, consequente ao consumo de produtos oriundos de regiões endêmicas, como o consumo crescente do açaí, por exemplo, apesar de menos comum, tem aumentado nos últimos anos e vem despertando a atenção dos órgãos de controle (ANDRADE *et al.*, 2014).

Em 2010, a 63<sup>a</sup> *World Health Assembly* publicou a resolução WHA63.20 destacando a gravidade da Doença de Chagas em países endêmicos e não endêmicos, mostrando a necessidade de medidas para controlar a transmissão da doença, diagnóstico e tratamento (WHO, 2010; ANDRADE *et al.*, 2014). Segundo a Organização Mundial de Saúde (WHO, 2014) estima-se que cerca de 7 a 8 milhões

de pessoas estão infectadas em todo o globo. Apesar de países como o Brasil, Chile, Argentina e Uruguai terem controlado a transmissão nas últimas décadas, em outros países latinos ainda é grande a sua incidência, demonstrando a necessidade de se manter medidas de vigilância epidemiológicas no país. O controle de vetores, a triagem de sangue e órgãos ainda são os métodos mais úteis de controle da doença em regiões endêmicas.

Morfologicamente, o *Trypanosoma cruzi* apresenta-se sob quatro formas durante o seu ciclo de vida (Figura 1), que passa de hospedeiro invertebrado aos mamíferos: as formas tripomastigota, amastigota, epimastigota. A forma tripomastigota metacíclica é a forma infectante do parasito no mamífero, incluindo o homem, e se desenvolve no intestino no vetor triatomíneo. Após infectar o hospedeiro vertebrado (2), os tripomastigotas invadem as células e se diferenciam na forma amastigota, aflagelada, se replicando no citoplasma das células do hospedeiro (3). Após vários ciclos de divisão binária se diferenciam novamente em tripomastigotas flagelados rompendo as células e ganhando a circulação sanguínea para infectar outras células (4), espalhando a infecção por todo o organismo do hospedeiro, ou para ser ingerido pelo triatomíneo durante o repasto sanguíneo, quando se transforma na forma epimastigota (5 e 6). Estes se replicam no intestino do hospedeiro invertebrado se diferenciando em tripomastigotas metacíclicos (7 e 8) que então são eliminados nas fezes e urina do triatomíneo no momento do repasto (1), completando, assim, o ciclo de vida do parasita (DaRocha *et.al.*; 2002).

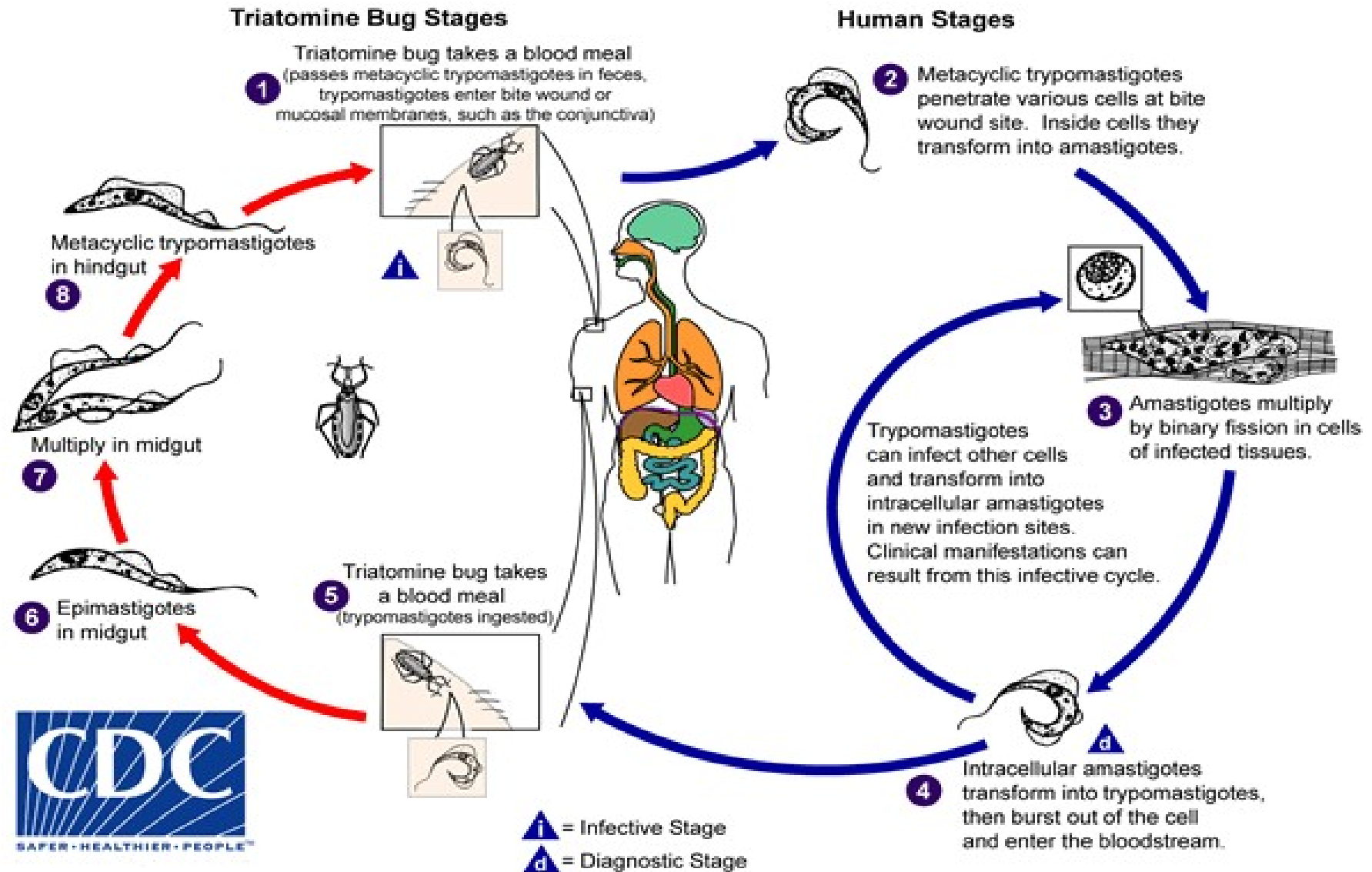


Figura 1: Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi* nos hospedeiros invertebrado e vertebrado (Adaptado de Centers of Disease Control and Prevention - CDC, 2014).



O protozoário *Trypanosoma cruzi* pertencente à ordem Kinetoplastida e a família *Trypanosomatidae* (REY, 2001) é caracterizado por possuir uma única estrutura mitocondrial: o cinetoplasto. Este possui de 20-25% do DNA total da célula denominado DNA do citenoplasto ou kDNA (BRENER, 1997; SOUZA, 2009). O kDNA organiza-se em uma complexa rede de moléculas circulares concatenadas: o maxicírculo e o minicírculo. Organiza-se próximo ao núcleo e sua forma e organização estrutural podem variar de acordo com a fase da vida do protozoário (SOUZA, 2009).

Os maxicírculos variam de 22 a 50 cópias por célula e 22.000 pares de base (pb) em média. Funcional e estruturalmente, o DNA dos maxicírculos são equivalentes aos DNA mitocondrial em outros eucariotos, codificando RNA e subunidades do complexo respiratório (JUNQUEIRA *et al.*, 2005). O maxicírculo organiza-se em uma região transcrita contendo genes de RNA ribossomal, estruturais, de uma região variável, e repetidas sequências variadas cuja função ainda não se conhece (SIMPSON, 1987). Uma importante característica do DNA do maxicírculo é a falta de elementos-chave para a tradução, como janelas de leitura descontínua e alguns códons de iniciação; então, após a transdução, são adicionadas ou removidas uridinas à sequência do RNA mensageiro transcrito (SIMPSON, 1987). Após o sequenciamento do DNA dos maxicírculos da cepa Esmeraldo e do clone CL Brener, revelou-se que as regiões codificantes apresentam pouca variação de nucleotídeos, apresentando algumas poucas inserções e/ou deleções cepa-específicas, mostrando uma alta conservação de gene da ordem Kinetoplastida com padrões semelhantes dentro do gênero *Trypanosoma* spp. Estes achados sugeriram que o maxicírculo pode ser um ótimo marcador para a diferenciação das DTU (WESTERBERGER *et al.*, 2006).

Os minicírculos possuem 95% do kDNA total. Estão organizados em quatro regiões distintas, extremamente variáveis quanto às suas sequências e que podem ser diferentes entre os isolados do parasito (TEIXEIRA *et al.*, 2006). Estas sequências hipervariáveis se organizam de maneira intercalada com quatro regiões extremamente conservadas que correspondem a aproximadamente 10% do DNA do minicírculo e estão dispostas em 90° em relação às outras. A região variável dos minicírculos está envolvida na formação de RNAs guias que controlam o processo

de edição (inserção e remoção de uridinas) do RNA mensageiro originado dos maxicírculos (JUNQUEIRA *et al.*, 2005; WESTERBERGER *et al.*, 2006). Os minicírculos são muito variáveis entre as populações de *T. cruzi*, evoluindo rapidamente, o que permite a diferenciação de cepas que são evolutivamente muito próximas. Além disso, o elevado número de cópias dos minicírculos colocou-os como alvo preferencial para o diagnóstico por amplificação por reação em cadeia da polimerase em indivíduos infectados pelo parasito, pois pode apresentar um único marcador comum às todas as cepas de *T. cruzi* (ÁVILA *et al.*, 1991; MEIRA *et al.*, 2002; JUNQUEIRA *et al.*, 2005).

## 1.2 Manifestações Clínicas

Clinicamente, a doença de Chagas apresenta-se em duas fases sucessivas e distintas: aguda e crônica (PRATA, 2001). A **fase aguda** é caracterizada por intenso parasitismo, acometimento parasitário em vários órgãos e tecidos e, ainda, inflamação; sendo crítica para o desenvolvimento da doença por vários fatores. Por ser a fase inicial da infecção, é o espelho da interação parasito-hospedeiro, muitas vezes assintomática. Quando aparecem, os sintomas mais frequentes são febre persistente por mais de sete dias, geralmente acompanhada de cefaleia, mal estar e astenia. Além de adenomegalia, exantema, edema de face ou membros, hepatomegalia, esplenomegalia, cardiopatia aguda, manifestações hemorrágicas, icterícia, sinal de Romanã ou chagoma de inoculação (SOUZA *et al.*, 2013). Deve-se mencionar que os surtos de contaminação aguda que vem sendo observados nos últimos anos no Brasil, levam a uma fase aguda atipicamente sintomática, onde os indivíduos desenvolvem vários dos sintomas mencionados acima, inclusive tendo sido identificada a ocorrência de óbitos (PINTO *et al.*, 2008; 2009; BELTRÃO *et al.*, 2009; ANDRADE *et al.*, 2011; ANDRADE *et al.*, 2014). Os eventos imunológicos durante a fase aguda podem direcionar a evolução da doença na fase crônica. Manifestações graves na fase aguda da doença geralmente estão associadas ao desenvolvimento de formas clínicas graves da fase crônica. O diagnóstico ainda

nesta fase permite a introdução de tratamentos que podem levar a cura (PINTO *et al.*; 2008).

Controlada a parasitemia pelo sistema imune do hospedeiro, com o envolvimento principalmente das células do sistema imune inato, em um primeiro momento, e posterior desenvolvimento de uma resposta específica com o envolvimento de linfócitos T e B sensibilizados, a **fase crônica** da doença é estabelecida. Duas formas são típicas da fase crônica: indeterminada e sintomática. A maior parte dos pacientes, cerca de 70% dos casos, desenvolve a forma indeterminada que é caracterizada por ausência de sintomas específicos, porém com sorologia positiva para *T. cruzi*, enquanto que, na forma sintomática, além da sorologia positiva há o aparecimento de lesões em órgãos/sistemas específicos.

A forma sintomática é subdividida de acordo com o sistema a que acomete: digestiva, cardíaca e cardiodigestiva (RASSI JR *et al.*, 2010). A forma digestiva é caracterizada por lesões no sistema nervoso entérico do esôfago e cólon levando ao desenvolvimento de dilatações denominadas megaesôfago e megacólon. A forma cardiodigestiva é a mais incomum e está associada a alterações no sistema cardiovascular e digestivo. Já a forma cardíaca é caracterizada pelo acometimento do sistema nervoso autônomo cardíaco, hipertrofia do miocárdio, degeneração dos miócitos e fibrose intersticial grave caracterizando os diferentes espectros da forma clínica cardíaca da doença de Chagas que, dentre as três formas, é a que apresenta maior morbidade (RIBEIRO, 1998).

### **1.3 Aspectos imunológicos da Doença de Chagas**

A mobilização do sistema imunológico na doença de Chagas é de extrema importância para a redução da carga parasitária ou até mesmo na eliminação do patógeno. Porém, esta mesma resposta imune que auxilia no controle do parasito tem sido associada ao desenvolvimento das formas sintomáticas da doença (DUTRA & GOLLOB, 2008).

No curso da infecção por *T. cruzi*, a resposta inata e a adaptativa são atuantes. No entanto, a resposta imune inata está mais associada aos momentos iniciais da infecção, uma vez que a resposta imune adaptativa precisa de um tempo para ser gerada. Num primeiro momento, a ativação de macrófagos na infecção por *T. cruzi* é um evento de extrema importância, pois confere resistência ao parasito. A grande maioria dos estudos durante a infecção aguda foram realizados utilizando-se modelos experimentais. Nestes estudos, observou-se que, após os parasitas serem fagocitados, os macrófagos liberam IL-12 e TNF- $\alpha$ , induzindo a produção de IFN- $\gamma$  pelas células Natural killer (NK) (SILVA *et al.*, 1992). O IFN- $\gamma$  pode desempenhar um importante papel protetor na infecção por *T. cruzi* atuando na redução da parasitemia ativando macrófagos e induzindo a produção de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS) e Óxido Nítrico (NO) por estas células (ALIBERTI *et al.*, 1999; MACHADO *et al.*, 2000).

Dados experimentais mostram uma auto regulação do sistema imune, reduzindo a ativação dos macrófagos e a produção de NO. Citocinas como IL-10 desempenham um importante papel regulador da resposta. De modo geral, a IL-10 reduz a expressão de MHC-II, regula algumas funções de macrófagos diminuindo, por exemplo, a produção de TNF- $\alpha$  por estas células, além de regular a proliferação de linfócitos T e a produção de citocinas inflamatórias como IFN- $\gamma$  (FIORENTINO *et al.*, 1989). Na doença de Chagas, ela atua inibindo a produção de NO por macrófagos ativados por IFN- $\gamma$  diminuindo assim, a sua atividade tripanocida (ABRAHAMSOHN & COFFMAN, 1996) o que reduz a reatividade do sistema imune ao *T. cruzi*, mas, por outro lado, favorece o parasito.

Outro importante elemento regulador da resposta na infecção por *T. cruzi* é a citocina IL-17, que tem como fonte principal células Th17, sendo produzidas também por LT CD8<sup>+</sup> e Natural Killer (NK) (revisado por ANNUNZIATO *et al.*, 2010). Em modelo experimental, foi demonstrado que esta citocina induz a produção de IL1- $\beta$  e TNF- $\alpha$  por macrófagos, desempenhando um papel protetor contra o parasito (MIYAZAKI *et al.*, 2010). Em 2010, utilizando modelos experimentais de doença de chagas crônica, Guedes e colaboradores demonstraram que a IL-17 desempenha o papel de reguladora do influxo de células para o miocárdio, controlando a miocardite induzida pelo *T. cruzi*. Em humanos, no contexto *ex vivo*, nosso grupo de pesquisa

demonstrou que a IL-17 está relacionada a um melhor prognóstico em pacientes cardíacos chagásicos (MAGALHÃES *et al.*, 2013). Essa autoregulação é, possivelmente, necessária para antagonizar efeitos potencialmente tóxicos da produção de citocinas inflamatórias como o IFN-  $\gamma$  e a IL-12. Além disso, embora células da imunidade inata atuem como primeira linha de defesa, moléculas do parasito podem modular a resposta do hospedeiro resultando na persistência do *T. cruzi*. Dessa forma, a autoregulação do sistema imune e a modulação da resposta pelo parasito, podem contribuir para o aparecimento das manifestações crônicas graves da doença (revisado por ANDRADE, 1999; KUMAR & TARLETON, 1998).

A persistência do antígeno estimula células do sistema imune adaptativo, em especial os linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>, através da sua ativação policlonal, que participam ativamente na busca da retomada da homeostasia do organismo. A importância dessas populações celulares na resposta à Doença de Chagas já é amplamente conhecida e demonstrada por diversos autores. Sabe-se que a ausência de células T CD4<sup>+</sup> ou CD8<sup>+</sup> em modelos experimentais, gera uma infecção aguda sem controle, com altos índices de morte (PADILLA *et. al* 2008; VIEIRA *et. al*, 2012; DOMINGUES *et. al*, 2012).

A maioria dos estudos sobre resposta imunológica na Doença de Chagas foram realizados na fase crônica, sendo a fase aguda pouco estudada. Nosso grupo de pesquisa já demonstrou que nas fases aguda e crônica recente em pacientes chagásicos não há diferenças na frequência de células CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> em relação a indivíduos não infectados. No entanto, este mesmo trabalho demonstrou haver intensa reatividade celular caracterizada por aumento da frequência de células TCD4<sup>+</sup> expressando HLA-DR e essa mesma população celular tem contribuição significativa na expressão da molécula citotóxica Granzima A. Observou-se ainda que a frequência da expressão de citocinas inflamatórias IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ , as quais tem participação fundamental no recrutamento linfocitário para os focos inflamatórios, em células TCD8<sup>+</sup> expressando a molécula citotóxica Granzima A em indivíduos ainda em fase aguda e uma menor frequência de células TCD8<sup>+</sup> expressando IFN- $\gamma$  em indivíduos crônicos recentes, poderiam contribuir para o descontrole do parasito e resposta inflamatória danosa (ANDRADE, 2012). Ainda neste estudo, células duplo-negativas demonstraram ter grande destaque, uma vez

que foram importantes fontes produtoras tanto de IL-10 quanto de IFN- $\gamma$ , indicando um mecanismo imunorregulatório na fase aguda da doença e na fase crônica recente, por sua vez, essas células parecem ser importantes elementos regulatórios sendo fonte de IL-10 e IL-17.

Estudos anteriores, realizados em pacientes de fase crônica, também mostraram a elevada ativação de células T em pacientes das formas indeterminada e cardíaca (DUTRA *et al.*, 1994), assim como a produção de citocinas imunoregulatórias por estes pacientes (DUTRA *et al.*, 1996), evidenciando um perfil inflamatório nos pacientes cardiopatas (SOUZA *et al.*, 2004; MENEZES *et al.*, 2003; GOMES *et al.*, 2003) e anti-inflamatório nos indeterminados (SOUZA *et al.*, 2004; DE ARAÚJO *et al.*, 2011; 2012). Nosso grupo de pesquisa demonstrou, ainda, em pacientes chagásicos com diferentes formas clínicas, níveis elevados de células CD4<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> e CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> comparados à indivíduos não infectados (DUTRA *et al.*, 1996). Em outro estudo, foi demonstrada uma correlação positiva entre LT CD4<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> e a produção de TNF- $\alpha$  em pacientes chagásicos cardíacos, e entre essas células e a produção de IL-10 em pacientes indeterminados (MENEZES *et al.*, 2004) sugerindo um papel regulatório importante dessas células na doença de Chagas humana. Também em pacientes na fase crônica, Villani *et al.* (2010) observaram que a estimulação *in vitro* com *T. cruzi* levou a uma expansão de LT duplo-negativos em pacientes indeterminados e cardíacos, com perfil diferencial de produção de citocinas.

O estado de ativação das subpopulações de linfócitos T tem sido demonstrado como importante no processo de desenvolvimento das formas graves da doença. Moléculas co-estimulatórias como CD28, CD80 e CD86 expressas pelas APC, e que participam da ativação de linfócitos T, estão envolvidas na patologia da doença de Chagas (SOUZA *et al.*, 2004) assim como o HLA-DR e CTLA-4 (DUTRA *et al.*, 1994; SOUZA *et al.*, 2006). Vitelli-Avelar e colaboradores (2005), avaliando o fenótipo celular de pacientes com as três principais formas clínicas da doença (indeterminada, cardíaca e digestiva) no contexto *ex vivo*, observaram uma maior frequência de LT CD4<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup> nos pacientes chagásicos quando comparados aos não infectados, confirmando dados de Dutra *et al.* (1994) em relação às formas indeterminada e cardíaca da doença.

Avaliando a resposta imune no tecido miocárdico de pacientes cardiopatas crônicos, Higuchi *et al.* (1993) observaram um aumento de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e TCD8<sup>+</sup> com predominância dessa última subpopulação em infiltrados inflamatórios do tecido cardíaco. Em 2007, Fonseca e colaboradores, corroborando dados de Higuchi *et al.* (1993) e Reis *et al.* (1993), identificaram por imunohistoquímica uma proporção de 2:1 de linfócitos CD8<sup>+</sup> em relação a CD4<sup>+</sup> em infiltrados inflamatórios de indivíduos com cardiopatia chagásica e um perfil típico de citocinas Th1 sugerindo ainda que a produção local de citocinas, como IL-15 e IL-7, relacionadas a sobrevivência celular podem estar associadas o predomínio de LT CD8<sup>+</sup> nesses locais.

A ativação de linfócitos T gera, além de diferenciação funcional dessas células, a produção e liberação de citocinas e outros mediadores imunológicos que serão de extrema importância na resposta frente à infecção por *T. cruzi*. Além das citocinas, moléculas citolíticas como a Granzima A são importantes elementos no curso da infecção, estando diretamente envolvidas na patologia associada à infecção por *T. cruzi* (REIS *et al.*, 1993). A Granzima A, que tem como fontes principais células NK e linfócitos T citotóxicos (TRAPANI, 2001), desempenha um importante papel no controle do parasitismo. No entanto, também está envolvida no processo de degradação da matriz extracelular e destruição da miofibra cardíaca na cardiopatia chagásica gerando fibrose, devido a sua capacidade citolítica (CUNÃ & CUNÃ, 1995).

#### **1.4 Variabilidade intraespecífica de *T. cruzi***

O *Trypanosoma cruzi* reproduz-se por fissão binária e apresenta uma inusitada diversidade genética e de características bioquímicas entre as suas cepas. Tibayrenc e colaboradores (1986) propuseram que a diversidade presente nas linhagens de *T. cruzi* devia-se a uma evolução predominantemente clonal. No entanto, hoje, acredita-se que as trocas genéticas entre estes parasitos contribuíram de maneira importante para a estrutura populacional encontrada dentro desta espécie. Graças à grande variabilidade presente em *T. cruzi*, buscaram-se marcadores moleculares que fossem capazes de melhor classificar as diferenças

genéticas do parasito. Os primeiros estudos da genética da população de *T. cruzi* basearam-se na análise de perfil eletroforético de isoenzimas, que permitiram dividir a espécie em três grupos denominados zimodemas. Posteriormente, a análise de um maior número de isolados, ampliou o número de zimodemas para 43 (MILES *et al.*, 1977; 1978). Vários estudos foram realizados buscando uma melhor caracterização das diferenças genéticas observadas em *Trypanosoma cruzi* propondo distintas designações (ANDRADE, 1974; MILES *et al.* 1977, 1978, 1981; MOREL *et al.*, 1980; TIBAYRENC & AYALA 1991). No entanto, dada a natureza das metodologias utilizadas que se baseiam em marcadores de evolução rápida, não foi possível categorizar os parasitos em grupos associando as suas características moleculares às epidemiológicas (revisado por ZINGALES, 2012).

Alternativamente, a análise de genes cujas sequências se conservaram ao longo da evolução, como por exemplo, genes de RNA ribossômico e genes de minixon mostraram-se interessantes, indicando claro dimorfismo entre os isolados de *T. cruzi* e possibilitando a definição de dois grupos denominados *T. cruzi* I e *T. cruzi* II (SOUTO *et al.*, 1996; ANÔNIMO, 1999). Porém, esta definição não atribuiu nenhuma classificação taxonômica a esses grupos, ou seja, não ficou estabelecido se os dois grupos constituiriam subespécies, espécies crípticas ou quase-espécies, além de não classificar aqueles isolados híbridos encontrados, recomendando estudos mais profundos para a melhor caracterização desses grupos (ANÔNIMO, 1999). Nos anos seguintes ao conselho, a comunidade científica continuou explorando a diversidade de *T. cruzi* realizando estudos acerca das características genéticas de isolados híbridos em busca de uma melhor classificação (KAWASHITA *et al.*, 2001; FREITAS *et al.*, 2006, HERRERA *et al.*, 2007). A partir dos achados de diversos pesquisadores, surgiu novamente a necessidade de padronização da nomenclatura de classificação dos grupos de *T. cruzi*, importante para facilitar o entendimento de questões de biologia básica do parasito, de características epidemiológicas e de sua ecologia e diferença na patogenicidade dos grupos.

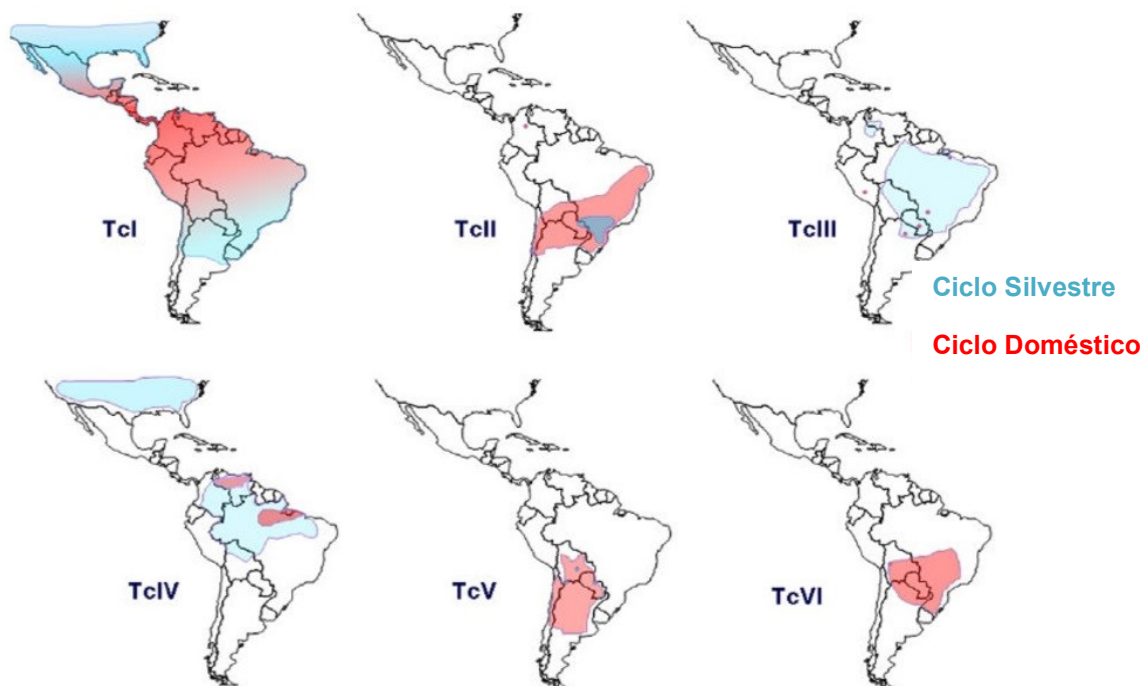
Então, em 2009, na reunião de celebração do centenário da descoberta da Doença de Chagas, um conselho recomendou uma nova classificação para os grupos de *T. cruzi*. Definiu-se então que *T. cruzi* seria classificado em seis grupos (T. cruzi I–VI) e cada grupo foi denominado DTU (“Discrete Typing Unit”), que, por definição, é um



conjunto de isolados, geneticamente semelhantes e que podem ser identificados por marcadores moleculares ou imunológicos comuns (TIBAYRENC, 1998). Além disso, a DTU *T. cruzi* I corresponde ao grupo originalmente definido na primeira reunião do conselho e *T. cruzi* II foi redividida dando origem aos demais DTUs TcII - TCIV (ANÔNIMO, 1999; ZINGALES, *et al*, 2009).

### 1.5 Aspectos epidemiológicos da Doença de Chagas

A doença de Chagas apresenta diferentes manifestações clínicas cuja prevalência varia geograficamente. A distribuição diferencial das formas clínicas da doença e os diferentes níveis de suscetibilidade ao tratamento podem estar relacionados à fatores ambientais, à variabilidade genética presente dentro da espécie, às características genéticas e imunes do hospedeiro ou um combinado destes fatores (COURA, 2015). Estudos epidemiológicos tem buscado demonstrar o perfil de distribuição das diferentes DTUs e das manifestações clínicas associadas a cada uma delas. Abaixo, o mapa de distribuição das DTU e seu ciclo de transmissão (Figura 2).



**Figura 2:** Mapa de distribuição das seis DTU na América Latina e o ciclo de transmissão ao qual está associado (Adaptado de ZINGALES, 2012).

TcI é a DTU mais amplamente distribuída dentre todas. Está associada a ciclo silvestre e doméstico com predomínio no norte da América do Sul e América Central, incluindo a região amazônica. Está diretamente relacionada às formas cardíaca e indeterminada da doença, e parece não favorecer a forma digestiva. Em pacientes imunossuprimidos que apresentam reativação da DC está é a DTU mais prevalente, estando associada a complicações no sistema nervoso central e meningoencefalite nesses indivíduos (COURA, 2007).

TcII é a estirpe mais prevalente na região do cone sul e central da América do sul. Está comumente associada a forma cardíaca podendo estar associada concomitantemente às formas digestivas da doença. TcII, TcVI e TcV parecem ser as DTUs mais patogênicas, estando associadas as manifestações cardíacas e digestivas. Esta última, mais frequentemente encontrada na Bolívia, Chile e Paraguai e com casos já registrados na Argentina (revisado por ZINGALES, 2012). TcIII e TcIV estão comumente associadas a ciclo silvestre (MILES *et al.*, 2009; YEO *et al.*, 2005) sendo raramente identificado em ciclos domésticos. TcIII já foi isolado de animais no oeste da Venezuela e Chaco argentino (revisado por ZINGALES, 2012). No entanto, diversos autores vêm relatando a identificação de TcIII em humanos em diversas localidades como Argentina e semi-árido brasileiro, inclusive na Bacia amazônica (LELWELLYN *et al.*, 2009; MONTEIRO *et al.*, 2010; CURA *et al.*, 2012; K MARTINS *et al.*, 2015). TcIV tem uma distribuição muito semelhante a TcIII, com exceção da região do Chaco argentino, no entanto, é a segunda causa de infecção na Venezuela (COURA, 2007).

Em regiões endêmicas, como o Brasil, a transmissão vetorial sempre foi a principal causa de infecção por *T. cruzi*. O Brasil foi certificado em 2006 como livre da transmissão vetorial por *Triatoma infestans* pela Organização Mundial de Saúde (OMS) e Organização Pan-americana de Saúde (OPAS) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016) e com o sucesso do controle da transmissão vetorial, outras formas de transmissão têm ganhado importância em saúde pública. A infecção oral passou a ser então a principal rota de infecção registrada no país atualmente. O crescente consumo de açaí (*Euterpe oleracea*) e o consumo do fruto da palmeira (Arecaceae) que é muito comum em áreas peridomiciliares na região amazônica e caldo de cana de açúcar (*Saccharum spp.*) estão sendo relacionados à diversas micro-epidemias

de Doença de Chagas Aguda na região amazônica (NÓBREGA *et al.*, 2009; PEREIRA *et al.*; 2009; SOUZA-LIMA *et al.*, 2013; XAVIER *et al.*, 2014). Vários países da América do Sul vem notificando nos últimos anos, surtos de Doença de Chagas aguda cujo meio de transmissão seja provavelmente por via oral: Bolívia, Venezuela, Colômbia e principalmente no Brasil, com a maior parte desses casos registrados em localidades da região amazônica, incluindo vários surtos em Belém (COURA, 2015). O maior surto foi de 103 casos registrados em Caracas, Venezuela em 2007 (ALARCON DE NOYA *et al.* 2010; 2015). Desde então, 10 casos de surtos ocorreram no continente com 249 indivíduos infectados. Em uma revisão publicada em 2014, Andrade e colaboradores levantaram o número surpreendente de 73 casos nos últimos 10 anos de Doença de Chagas aguda em literatura indexada, em contraste com os 41 casos registrados nos 20 anos anteriores (1981-2001). A situação pode ainda ser mais grave, já que em muitas localidades os casos são subnotificados ou o diagnóstico não é satisfatório.

### **1.6 Diagnóstico laboratorial da infecção por *Trypanosoma cruzi***

O diagnóstico laboratorial da infecção por *T. cruzi* deve ser determinado pela fase da infecção. A avaliação clínica inicial, realizada pelo profissional de saúde, vai direcionar a escolha do método de acordo com a sintomatologia apresentada pelo paciente e/ou antecedentes epidemiológicos, e o diagnóstico de infecção pode ser confirmado ou excluído pelos testes laboratoriais. Neste tópico, faremos um breve resumo dos métodos diagnósticos utilizados.

Na fase aguda devem ser priorizados os exames parasitológicos, sendo o exame direto do sangue o método de escolha. Nesta fase, há um elevado número de formas tripomastigotas na circulação periférica do indivíduo permitindo a identificação direta do parasito no sangue.

No caso de suspeita de infecção crônica, o exame parasitológico é insatisfatório. Testes parasitológicos indiretos como a Hemocultura e o Xenodiagnóstico dependem da presença de pelo menos um tripomastigota íntegro na amostra para o

seu crescimento em meio de cultura (CHIARI & BRENER, 1966), o que pode gerar falsos negativos. Isso porque, esta fase é caracterizada pela baixa parasitemia. O indicado é a pesquisa de anticorpos específicos contra o parasito, com a realização de dois métodos de análise distintos ou de diferentes preparações de antígenos que podem ser: Reação de imunofluorescência indireta (RIFI), Hemaglutinação indireta (HAI) ou *Emzyme Linked Immunosorbent assay* (ELISA) (GOMES *et al.*, 2009). No entanto, os métodos sorológicos têm a sua especificidade limitada, podendo haver reação cruzada com outros tripanosomatídeos presentes em áreas endêmicas, como a *Leishmania* sp. e *Trypanosoma rangeli* (ARAÚJO, 1986; SILVEIRA *et al.*, 2001; CABALLERO *et al.*, 2007). Após o tratamento anti-*T. cruzi*, a sorologia continua positiva por alguns anos. A reversão da sorologia positiva do paciente crônico pós tratamento é menor do que 10%, o que prejudica a avaliação da eficácia do tratamento aplicado (GOMES *et al.*, 2009).

As dificuldades no diagnóstico da Doença de Chagas na fase crônica pelos métodos citados anteriormente, justificam a busca por métodos mais sensíveis e específicos. Entre as técnicas moleculares usadas recentemente, a Reação em cadeia da polimerase (PCR) tem sido a mais promissora, por fornecer resultados em um curto espaço de tempo ao contrário de testes parasitológicos como a hemocultura, por exemplo, que pode levar até 30 dias e ainda assim fornecer um resultado falso negativo (BRITO, 2009; MARCON *et al.*, 2002). O *T. cruzi*, por possuir um genoma abundante em sequências repetitivas de DNA que podem ser utilizadas como alvo para a detecção, torna essa abordagem altamente viável (CARRIAZO *et al.*, 1998; MARCON *et al.*, 2002) e estudos vem mostrando que a técnica é altamente sensível (Luquetti & Rassi, 2000). Reações de amplificação de DNA do cinetoplasto (kDNA), DNA nuclear e satélite tem sido utilizadas para o diagnóstico de infecção por *T. cruzi* (D'AVILA *et al.*, 2009). A abordagem mais utilizada é a amplificação da região variável do minicírculo do kDNA, que tem se mostrado específica para o parasito em alguns trabalhos (ÁVILA *et al.*, 1990; STURM *et al.*, 1989). No entanto, alguns autores vêm questionando essa especificidade, relatando que a amplificação dessa região pode amplificar DNA de outros parasitos (CASTRO *et al.*, 2002; VIRREIRA *et al.*, 2003). Alguns trabalhos propuseram ensaios de amplificação de outras sequências gênicas que mostraram melhor especificidade, mas com baixa sensibilidade (DIEZ *et al.*, 2007; FREITAS *et al.*, 2005; HERWALDT *et al.*, 2000;

VIRREIRA *et al.*, 2003). Diante de resultados tão controversos, busca-se melhores marcadores ou combinações de ensaios de amplificação para a realização do diagnóstico molecular. No entanto, apesar das suas limitações, o diagnóstico molecular por amplificação de genes específicos através da reação de PCR tem se mostrado a melhor alternativa aos testes parasitológicos.

O diagnóstico da infecção por *T. cruzi* muitas vezes não é realizado nas fases iniciais da doença que costuma ser assintomática, porém crítica em vários aspectos. Aliado a isso, o tratamento da doença tem eficácia limitada e ainda não há vacina contra o parasito. Todos esses aspectos geram dificuldades para o controle da doença que, se diagnosticada na fase aguda, permite a intervenção quimioterápica com melhores prognósticos de cura. No entanto, tais dificuldades muito se devem a escassez de dados imunológicos sobre a fase aguda e a associação da genética do parasito com o perfil imunológico apresentado pelos indivíduos nesta fase da doença. Nossa hipótese de trabalho é de que há associação entre a presença/níveis do parasito e os eventos imunológicos que se desenvolvem na fase aguda da doença e que estes são determinantes pra a progressão da doença na fase crônica.

Visto isso, nosso estudo traz elementos que fornecem subsídios únicos para o melhor entendimento da relação entre a genética do parasito e os eventos imunológicos que se desenrolam na fase aguda da doença: 1) diagnóstico e genotipagem da infecção por *T. cruzi* em pacientes agudos provenientes da região amazônica brasileira por métodos moleculares e associação indireta com os níveis de parasitemia desses indivíduos; (2) associação dos níveis de parasitemia com o perfil imunológico desses mesmos indivíduos, buscando uma melhor compreensão quanto à interação parasito/hospedeiro; e, por fim (3) identificação de diferenças no perfil imunológico de indivíduos frente à infecção por cepas diferentes de *T. cruzi*. Dessa forma, acreditamos que o presente trabalho vem esclarecer algumas questões ainda obscuras quanto à fase aguda da doença trazendo subsídios para trabalhos futuros.



## 2. OBJETIVOS

---

## 2.1 Objetivo geral

Identificar e classificar *Trypanosoma cruzi* em amostras de pacientes na fase aguda da doença de Chagas, correlacionando a classificação genética do parasito ao perfil imunológico observado nestes pacientes por Andrade (2012).

## 2.2 Objetivos específicos

- Determinar a presença de DNA de *T. cruzi* em amostras de sangue de pacientes agudos provenientes de provável surto de infecção oral no estado do Pará, em 2009;
- Determinar a qual DTU o *T. cruzi* encontrado nas amostras pertence;
- Relacionar a DTU identificada aos parâmetros clínicos apresentados pelos pacientes;
- Relacionar a DTU aos seguintes parâmetros imunológicos, encontrados por Andrade (2012):
  - a) frequência de células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>;
  - b) estado de ativação de células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> através da expressão das moléculas de ativação CD28, CTLA-4 e do marcador de ativação tardio HLA-DR;
  - c) perfil de memória/ativação, através do marcador CD45-RO;
  - d) produção de citocinas IFN- $\gamma$ , IL-10 e IL-17;
  - e) atividade citotóxica, através da produção de Granzima A.

### 3. METODOLOGIA





### **3.1 Pacientes e critério de inclusão**

A pesquisa atendeu aos preceitos éticos de autonomia, beneficência, não maleficência, justiça e equidade, tendo aprovação do Conselho de OEP (Parecer ETIC #077/06). Os indivíduos voluntários participantes desse estudo foram recrutados no estado do Pará, sob a responsabilidade das Dras. Adriana Almeida e Dilma Souza no Hospital de Clínicas Gaspar Vianna, em Belém. As coletas de sangue foram realizadas no ano de 2009 após a assinatura do Termo de consentimento livre e esclarecido pelos indivíduos e o acesso ao tratamento e acompanhamento foram independentes da participação no estudo. Como critério de inclusão, foram selecionados pacientes em fase aguda da Doença de Chagas, apresentando a seguinte sintomatologia: febre por mais de sete dias além de uma ou mais das seguintes manifestações clínicas: adenomegalia, exantema, edema de face ou membros, hepatomegalia, esplenomegalia, cardiopatia aguda, manifestações hemorrágicas e icterícia. Exames parasitológicos, sorológicos e epidemiológicos foram efetuados a fim de se confirmar os casos.

### **3.2 Coletas, armazenamento de sangue para extração de DNA e obtenção de células para citometria de fluxo**

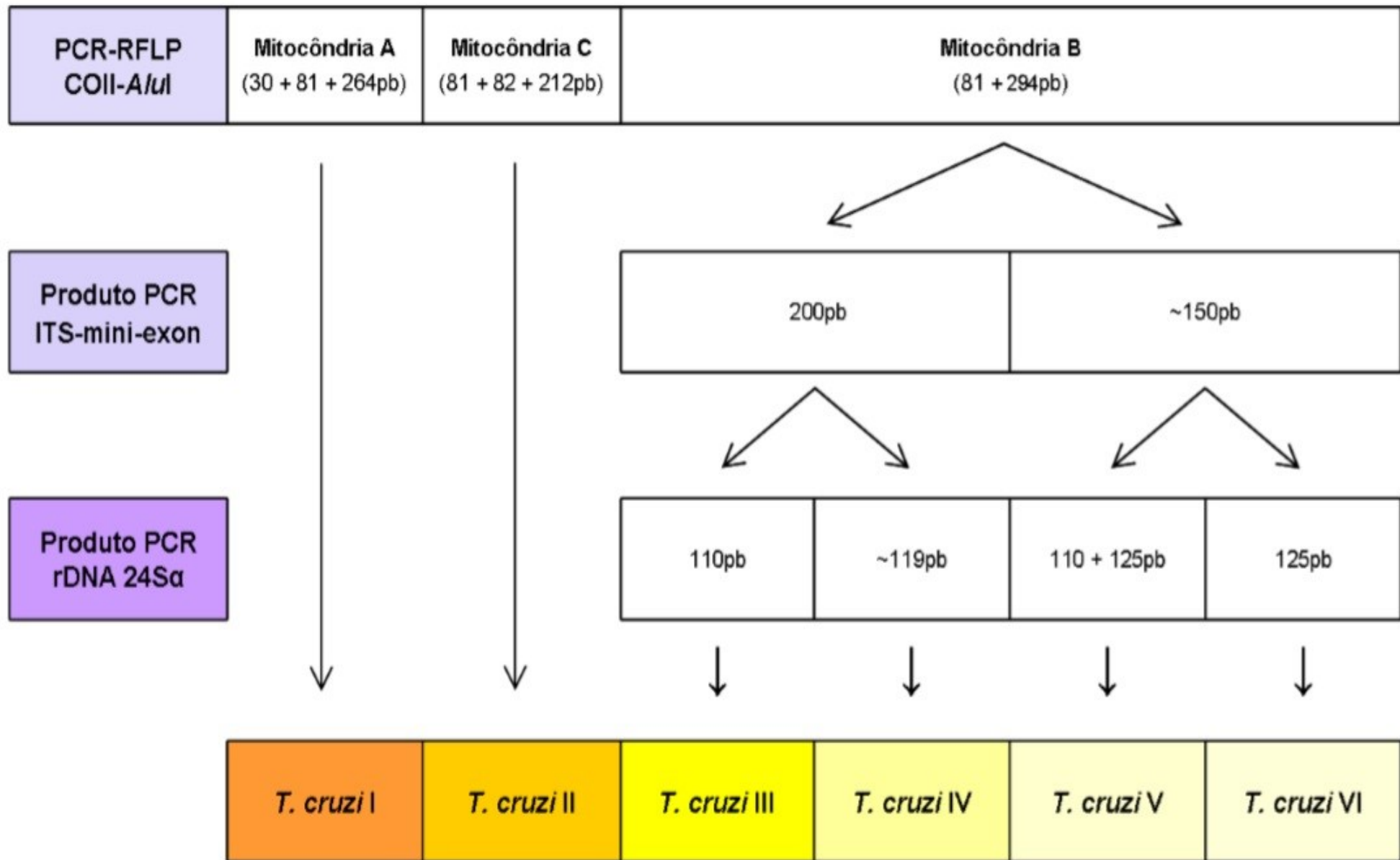
Uma amostra de 10 mL de sangue periférico foi coletada de cada paciente e distribuída em alíquotas de 1mL de sangue em criotubos. As amostras foram armazenadas em freezer -20 °C overnight e então transferidas para freezer -80 °C, conforme descrito por Dutra (2002). O processamento do sangue total e a marcação de moléculas de superfície e intracitoplasmáticas foram realizados por Andrade, 2012. As alíquotas de sangue total armazenados em freezer -80°C foram utilizadas para extração de DNA.

### **3.3 Extração de DNA do sangue para genotipagem de *T. cruzi***

As alíquotas de 1mL de sangue armazenadas em freezer -80°C foram submetidas a descongelamento lento a temperatura ambiente. Desses, 200µL de sangue foram submetidos à lavagem com 1mL PBS 1x gelado e centrifugados a 1.540g por 20 minutos a 4°C. O sobrenadante foi recolhido e armazenado em freezer -80°C, e o pellet submetido à fervura por 15 min para auxiliar na desnaturação de proteínas. As amostras foram então incubadas com 20µL de Proteinase K a 56°C por 20 minutos e o restante da extração foi realizada utilizando-se Kit comercial QIAamp® DNA Mini Kit (Qiagen), seguindo o protocolo proposto pelo fabricante. Uma amostra de sangue infectado experimentalmente com  $1 \times 10^3$  tripomastigotas da cepa Colombiana clone 1.7G2 foi utilizado como controle positivo da extração. Uma amostra de sangue de indivíduo não infectado da área endêmica foi utilizado como controle negativo da infecção.

### **3.4 Diagnóstico Molecular de infecção por *Trypanosoma cruzi***

Para o diagnóstico molecular, utiliza-se a seguinte estratégia, descrita por Macedo & Pena (1998). Primeiramente, realiza-se a reação para detecção do parasito, utilizando-se iniciadores para região variável do minicírculo do kDNA. Amostras positivas para a reação de amplificação da região variável do minicírculo do kDNA são submetidas à caracterização por métodos moleculares, buscando classificar o *T. cruzi* em uma das seis DTUs principais (TcI – TcVI) (Zingales *et al.*; 2009). Não havendo um marcador individual que permita a caracterização completa das seis DTUs, D'Ávila e colaboradores (2009) propuseram uma estratégia baseada em três marcadores: Gene COII (de Freitas *et al.* 2006), espaçador intergênico dos genes de minixon (Burgos *et. al.*; 2007) e o gene rDNA 24Sα (Souto *et al.*; 1996) disponíveis sob a forma de um ensaio sequencial, sendo a estratégia escolhida para a realização deste trabalho, apresentada na Figura 3. O quadro 1 mostra as sequencias dos iniciadores utilizados neste trabalho.



**Figura 3:** Esquema do ensaio triplo utilizado para discriminação das seis linhagens principais de *Trypanosoma cruzi* (MACEDO & SEGATTO, 2010).

Técnica	Iniciadores	Sequência	Referência
<b>PCR-kDNA</b>	S35 – direto	5'-AAATAATGTACGGGKAGATGCATGA-3'	Wincker et al., 1994
	S36 – reverso	5'-GGTTCGATTGGGGTTGGTGTAAATATA-3'	
<b>Gene CO II</b>	DsMit – direto	5'-TGCATTACTCCTTTCTACAG-3'	Freitas et al., 2006
	DsMit – reverso	5'-AACTCGCTACATTGTCCATA-3'	
	Tcmit – 10	5'-CCATATATTGTTGCATTATT-3'	
	Tcmit – 21	5'-TTGTAATAGGAGTCATGTTT-3'	
<b>Região intergênica do miniexon</b>	TCac – direto	5'-CTCCCCAGTGTGGCCTGGG-3'	Burgos et al., 2007
	UTCC – reverso	5'-CGTACCAATATAGTACAGAAACTG-3'	
<b>rDNA 24 sa</b>	D71 – direto	5'-AAGGTGCGTCGACAGTGTGG-3'	Souto et al., 1993
	D72 – reverso	5'-TTTTTCAGAATGGCCGAACAGT-3'	
	D75 – direto	5'-CAGATCTTGGTTGGCGTAG-3'	

**Quadro 1:** Sequências dos iniciadores utilizados neste trabalho.

### 3.4.1 PCR da região variável do minicírculo do kDNA

A detecção de DNA de *T. cruzi* foi realizada pela amplificação específica do fragmento de 330pb que corresponde à região variável do minicírculo do kDNA. Na reação, foram utilizados 1,5mM de MgCl<sub>2</sub>, Tampão Green Go Taq pH 8,5 (Promega, Madison, Winsconsin, EUA), 250mM de DNTPs e os iniciadores S35 E S36 (Wincker *et. al*; 1994) a 1mM (Tabela 1), 1U de Go Taq Flexi DNA polimerase (Promega, Madison, Winsconsin, EUA) e 3µL de amostra de DNA.

A reação consistiu de uma etapa de desnaturação por 5 minutos a 94°C, seguida por 35 ciclos de amplificação com temperatura de anelamento de 60°C, extensão de 72°C e desnaturação a 94°C por 1 minuto em cada uma das etapas. A etapa de extensão final foi ampliada para 10 minutos. Os produtos da PCR foram mantidos a 4°C até a corrida em gel de poliácridamida 7% e coloração por Brometo de etídio e visualização em transluminador UV.

Como controle positivo foi utilizado o DNA extraído do sangue experimentalmente infectado, como controle negativo foi utilizada amostra de DNA de indivíduo não infectado da área endêmica.

### **3.4.2 Caracterização das subpopulações de *T. cruzi***

#### *3.4.2.1 PCR – RFLP do gene mitocondrial Citocromo Oxidase subunidade II*

Para amplificação do marcador mitocondrial COII foi realizada uma “*full nested*” PCR (Valadares *et al.*, 2008). Os iniciadores DsMit-F/DsMit-R e TcMit10/TcMit21 foram utilizados para a primeira e a segunda rodadas de PCR, respectivamente. Após as amplificações, os produtos das PCR foram submetidos à digestão pela enzima de restrição AluI (Promega) seguindo as recomendações do fabricante. A análise do perfil de fragmentos de restrição do gene COII permite a discriminação de TcI (fragmentos de 30, 81 e 264pb) e TcII (fragmentos de 81 e 212pb), mas não das demais DTU (TcIII, TcIV, TcV e TcVI). Como padrões de comparação dos RFLP foram utilizados DNAs de cepas características das linhagens TcI (Col1.7G2) e TcII (cepa JG).

#### *3.4.2.2 Amplificação da região intergênica dos genes do miniéxon*

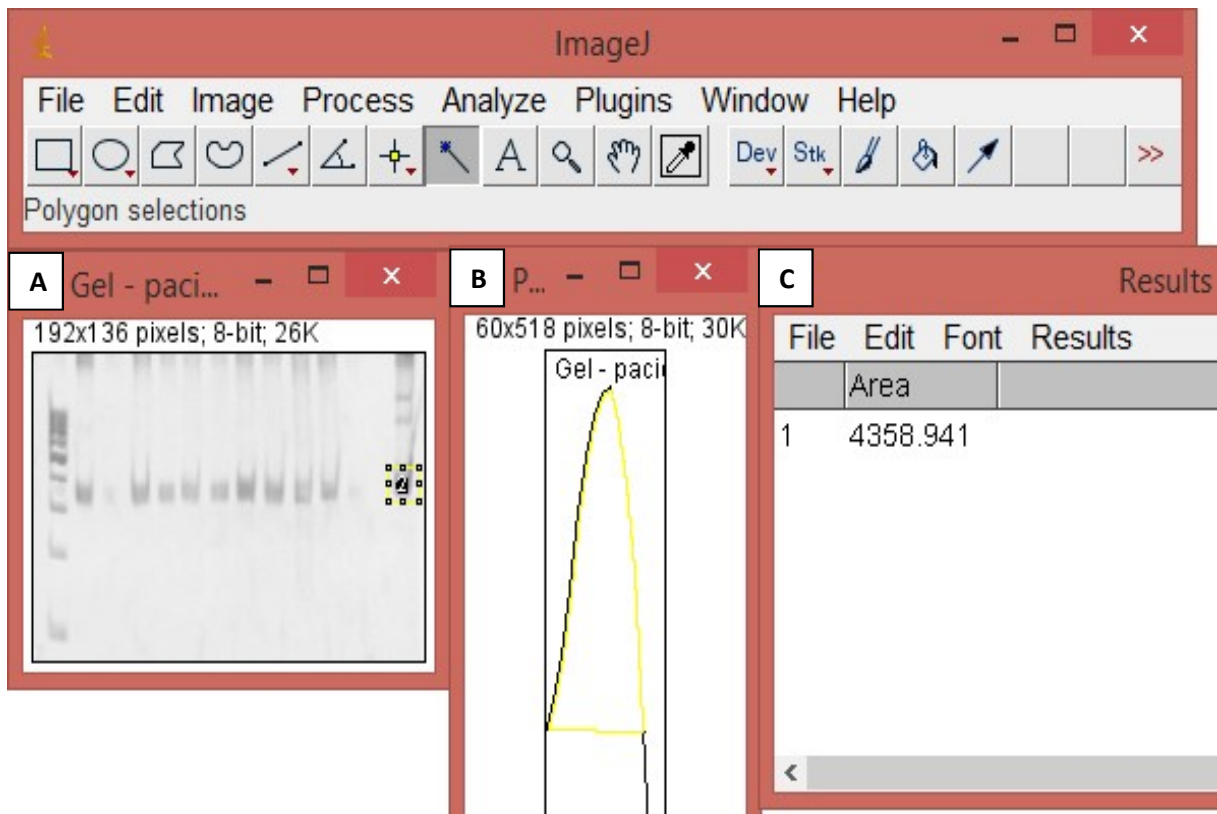
Para a amplificação da região intergênica dos genes do miniéxon, utilizou-se o ensaio proposto por Burgos e colaboradores (2007). Foram utilizados os iniciadores TCac e UTCC. A análise dos produtos amplificados em gel de agarose 1% corado por brometo de etídio permite distinguir as cepas pertencentes as TcIII e TcIV (fragmento de 200pb) das TcI, TcII, TcV e TcVI (fragmentos entre 150pb e 157pb). Como padrões de comparação foram utilizados DNA das cepas 231 e CL Brener, respectivamente características das linhagens TcIII-TcIV e TcV-TcVI.

### 3.4.2.3 Amplificação da região 3' do gene rDNA 24S $\alpha$

Um protocolo de “hemi nested” PCR, adaptado de Souto e colaboradores (1996) foi utilizado para a amplificação do gene rDNA 24S $\alpha$ . Os iniciadores D75/D72 e D71/D72 foram utilizados para a primeira e a segunda etapa, respectivamente. A visualização ocorreu por eletroforese em gel de poliacrilamida 7% corado por Nitrato de prata. Esta última reação permite a resolução das quatro DTUs que não foram completamente discriminadas nas reações anteriores (TCIII-IV,V e VI). Como padrões de comparação foram utilizados DNA de cepas ou clones característicos das TcI (Clone Col1.7G2, fragmento de 110pb) TcII (cepa JG, fragmento de 125pb) e do TcV (clone SO3 CI5, fragmentos de 110 e 125pb).

### 3.5 Estimativa da parasitemia através de análise pelo software Image J

Para estimar a parasitemia, foi utilizada uma estratégia de análise baseada na detecção da quantidade de pixels por área na banda de 330pb do gel da PCR do kDNA adaptado de Vieira (2005). Com o auxílio do *software* Image J, as imagens digitalizadas dos géis da PCR do kDNA foram inicialmente normalizadas quanto ao tamanho e a qualidade da imagem (mesmos valores de DPI). E ainda, para excluir a possibilidade de diferenças entre a intensidade de coloração de cada gel, foram selecionadas as bandas de 200pb e 400pb do padrão de pares de base de cada um dos 3 géis e estimados os valores de pixels por área. Não houve diferença significativa entre os valores encontrados para as bandas de 200pb e 400pb de cada um dos três géis. Após essa normalização, foi realizada então a análise da intensidade das bandas das amostras. A seguir, esquema demonstrativo da estratégia utilizada para a análise pelo software Image J (Figura 4).



**Figura 4:** Exemplo da estratégia de análise para determinação dos valores de pixels por área das bandas de 330pb do kDNA para estimativa da parasitemia. Com a utilização de ferramentas de análise de géis, foi determinada uma área ao redor da banda de 330pb da primeira amostra. Determinando esta primeira marcação como referência, utilizando o comando “*analyze > Gels > Select first lane*”, esta foi copiada para todas as outras canaletas, de forma que a área foi a mesma para todas as amostras (A). Após a marcação em todas as amostras, utilizando-se o comando “*analyze > Gels > Plot lane*”, foi gerado o gráfico de intensidade de pixels. Com a ferramenta “*Straight*” foi traçada uma linha na base do pico, e com a ferramenta “*wand*” foi selecionada a área do pico marcada em amarelo (B) e gerado o valor da intensidade de pixels por área (C).

### 3.6 Análises estatísticas

Os dados obtidos do citômetro de fluxo foram analisados no Excel, sendo aplicado o teste T-student para cálculo estatístico das diferenças entre os grupos de comparação. Para avaliar a frequência e a expressão dos marcadores em estudo comparando-se indivíduos chagásicos com alta e baixa parasitemia e entre os grupos TcI e TcIII/TcIV foi utilizado o teste T não pareado. As análises de correlação foram baseadas no coeficiente de correlação de Pearson, análise essa realizada no software GraphPad Prism. Foram consideradas significativas as comparações em que  $p < 0,05$ .

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

---



#### **4.1 Aspectos clínicos de pacientes que apresentaram resultado positivo para PCR utilizando iniciadores para kDNA de *T. cruzi***

O quadro 2 mostra os dados dos pacientes participantes deste estudo. Dos 31 pacientes positivos para Doença de Chagas, 45,16% pertencem ao sexo feminino e, portanto, 54,84% pertencem ao sexo masculino. Quanto à idade, a média foi de 37,03 anos. Não encontramos diferenças estatísticas nos casos de infecção por *T. cruzi* entre os sexos. Outros estudos também não evidenciaram diferenças entre os sexos (FREITAS, 2009). A maior parte dos pacientes foi proveniente do município de Currealinhos (41,93%), seguido pelos municípios de Breves (12,90%), Terra Alta e São Sebastião da Boa Vista (9,67%), Capanema e Muaná (6,45%) e Belém, Cachoeira do Arari e Garrafão (3,22%). Segundo o Boletim epidemiológico do Ministério da Saúde (2015), o levantamento de registros de Doença de Chagas aguda no período de 2000 a 2013, a região norte contribuiu com maior proporção de casos no país (91,1%), sendo o Pará o estado com o maior número de casos registrados, cerca de 75%. Ainda segundo o boletim, mais de 50% apresentaram início de sintomas no período entre os meses de agosto e novembro para os anos de 2007 a 2013, período este que coincide com os meses de safra do açaí no Pará. Curiosamente, estes dados coincidem de certa forma com o período de diagnóstico de grande parte dos pacientes sujeitos deste estudo.

O tempo do diagnóstico (parasitológico) foi de, em média, 41 dias até o dia da coleta. Os sintomas mais comuns relatados pelos pacientes foram: a febre persistente (77,4%), Cefaléia (64,51%), fraqueza e dores no corpo (67,64%) e inchaço no rosto ou pernas (41,93%), muito comuns na fase aguda da doença. Além desses, alguns pacientes relataram dores no peito e estômago e vômito. Clinicamente, quando há sintomas, os pacientes chagásicos agudos apresentam sintomatologia inespecífica com o aparecimento de febre e dores no corpo (SOUZA, 2010). Cerca de 70% dos indivíduos infectados passam pela fase aguda sem sintomas aparentes, ou sintomatologia leve (DUTRA, 2009). No entanto, alguns pacientes podem apresentar sintomas mais graves que incluem febre persistente, mal estar, inchaço de gânglios linfáticos e inchaço abdominal com a presença de dor (SOUZA-LIMA RC *et al.*, 2013). No presente trabalho, grande parte dos pacientes

apresentaram sintomas comuns à fase aguda como febre persistente, cefaleia, fraqueza e dores no corpo e inchaço no rosto ou pernas. No entanto, parte dos pacientes relataram dores no peito e estômago, enquanto um paciente apresentou inchaço do coração o que pode sugerir o desenvolvimento de manifestações graves da fase aguda, o que é comum para indivíduos infectados por via oral (PINTO *et al.*, 2008; DIAS *et al.*, 1982).

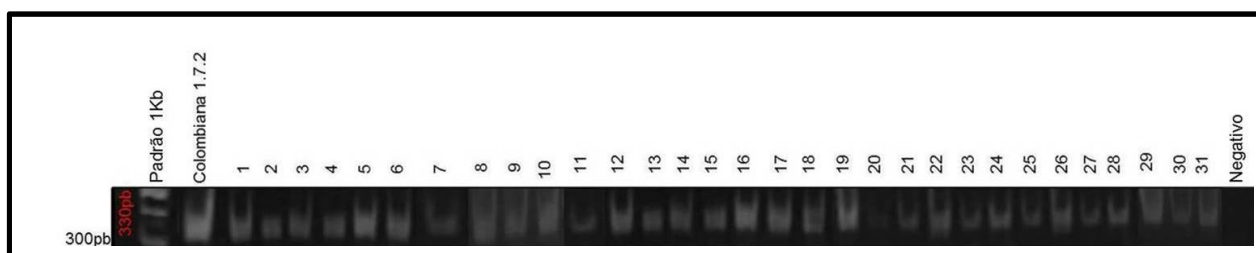
Nº	Idade	Sexo	Tempo de diagnóstico	Data da coleta	Localidade	Sintomas
1	81	Masculino	9 dias	29/09/2009	São Seb. da Boa Vista	Quentura no corpo; Inchaço dos olhos; tonteira
2	63	Masculino	30 dias	29/09/2009	São Seb. da Boa Vista	Febre; dor na nuca; dor nos olhos; tonteira
3	-	Masculino	30 dias	29/09/2009	São Seb. da Boa Vista	Febre; aumento do coração; dor na nuca, olhos; vômitos; tonteira
4	26	Masculino	37 dias	29/09/2009	Capanema	Febre; fraqueza
5	22	Feminino	34 dias	29/09/2009	Capanema	Febre; inchaço das pernas; dor no corpo; diarreia; vômito; tonteira
6	61	Feminino	63 dias	29/09/2009	Breves	Febre; dor no corpo; calafrios; cefaléia; vômito; dor no estômago e pernas
7	63	Masculino	60 dias	29/09/2009	Breves	Febre; dor no corpo; cefaléia; dor na coluna
8	36	Masculino	60 dias	29/09/2009	Breves	Febre; cefaléia; dor no corpo; tonteira; dor nos olhos e nuca
9	18	Feminino	20 dias	29/09/2009	Currálinhos	Cefaléia; fraqueza
10	34	Feminino	20 dias	29/09/2009	Currálinhos	Dor no estômago, no peito e nas pernas; fraqueza
11	48	Feminino	20 dias	29/09/2009	Currálinhos	Não apresentou sintomas (alergia ao medicamento)
12	57	Feminino	20 dias	29/09/2009	Currálinhos	Cefaléia; dor na nuca
13	33	Masculino	62 dias	29/09/2009	Currálinhos	Febre; cefaléia; dor no corpo; enjôo; calafrios; tonteira
14	8	Masculino	62 dias	29/09/2009	Currálinhos	Febre; inchaço no corpo
15	26	Feminino	60 dias	29/09/2009	Currálinhos	Febre; cefaléia; vômito; inchaço no corpo; manchas no corpo
16	7	Feminino	60 dias	29/09/2009	Currálinhos	Febre; cefaléia; vômito; dor no corpo
17	63	Feminino	60 dias	29/09/2009	Currálinhos	Cefaléia; dor na nuca; tonteira; fraqueza
18	63	Masculino	60 dias	29/09/2009	Currálinhos	Dor no estômago, na nuca e nos olhos; inchaço nos olhos; fraqueza
19	10	Feminino	30 dias	30/09/2009	Garrafão	Febre; cefaléia; inchaço nas pernas e nos olhos; tonteira; fraqueza; desmaio
20	13	Masculino	90 dias	30/09/2009	Breves	Febre; cefaléia; dor no corpo, no estômago e na nuca; inchaço na barriga, vômito; tonteira; fraqueza
21	20	Masculino	15 dias	01/10/2009	Belém	Febre; dor nas pernas e na nuca; inchaço nas pernas; vômito; tonteira; Fraqueza
22	21	Feminino	30 dias	01/10/2009	Terra Alta	Febre; cefaléia; dor nos olhos; inchaços nas pernas e rosto; vômito; diarreia; fraqueza; Desmaio
23	61	Masculino	30 dias	01/10/2009	Terra Alta	Febre; cefaléia; dor no corpo; inchaço no rosto; fraqueza
24	49	Feminino	30 dias	01/10/2009	Terra Alta	Febre; cefaléia; dor nos olhos; inchaços nas pernas e rosto; vômito; diarreia; fraqueza
25	32	Feminino	2 dias	01/10/2009	Belém	Febre; cefaléia; dor nos olhos, nuca e estômago; inchaços nas pernas; vômito; fraqueza

26	29	Masculino	62 dias	01/10/2009	Cachoeira do Arari	Febre; dor no corpo
27	31	Dado não informado	60 dias	30/09/2009	Muaná	Febre; cefaléia; dor no corpo e na nuca; calafrios; tonteira; fraqueza
28	54	Masculino	90 dias	30/09/2009	Currálinhos	Febre; cefaléia; dor no corpo e nos olhos; inchaço nas pernas;
29	28	Dado não informado	20 dias	29/09/2009	Currálinhos	Cefaléia; dor no peito; dor nas pernas; fraqueza
30	17	Feminino	30 dias	30/09/2009	Currálinhos	Febre; cefaléia; vômito; calafrios; inchaço nas pernas; fraqueza
31	31	Feminino	60 dias	30/09/2009	Muaná	Febre; cefaléia; dor no corpo e na nuca; calafrios; tonteira; fraqueza

**Quadro 2:** Dados clínicos dos pacientes positivos para a PCR do KDNA de *T. cruzi*. Idade, tempo decorrido do diagnóstico até o momento da coleta, data da coleta, localidade de residência e sintomas relatados.

## 4.2 Diagnóstico molecular da infecção por *T. cruzi*

Todas as 31 amostras analisadas foram positivas para a PCR de detecção de *Trypanosoma cruzi* com a amplificação do fragmento de 330pb correspondente à região variável do minicírculo do kDNA - (Figura 5).



**Figura 5:** PCR para amplificação da região variável do minicírculo do kDNA. Todos os indivíduos (amostras mostradas nas canaletas de 1-31) mostraram reação de amplificação positiva para o fragmento de 330pb. Amostra infectada experimentalmente com tripomastigotas pertencentes a cepa Colombiana cl. 1.7G2, como descrito em materiais e métodos foi utilizada como controle positivo da amplificação.

Em fase aguda, os diagnósticos parasitológicos são os mais utilizados sendo considerados padrão ouro. Porém, dependem de um período que pode chegar a 30 dias para fornecer resultados, com a possibilidade de gerar um resultado falso negativo (BRITO, 2009; MARCON *et al.*, 2002). Neste contexto, o diagnóstico por PCR, amplamente utilizado no diagnóstico da doença na fase crônica, se mostra uma boa alternativa. O principais alvos de ensaios de PCR para diagnóstico de DC são o kDNA ou DNA satélite (DIAZ *et al.*, 1992; DIEZ *et al.*, 2007; BRASIL *et al.*, 2010; SCHIJMAN *et al.*, 2011), ambos possuem cópias múltiplas no genoma de *T. cruzi*, aumentando a sensibilidade de detecção (GONZALEZ *et al.*, 1984; STURM *et al.*, 1989). No presente estudo, foi utilizado para diagnóstico o ensaio de amplificação do fragmento de 330pb do kDNA, técnica muito utilizada em diversos estudos proposto por Macedo & Pena (1998). Foi possível a detecção de material genético do parasito em 100% das amostras de pacientes agudos (31/31). Schijman e colaboradores (2011) testando o desempenho de diversos métodos de extração, marcadores e protocolos de amplificação para a detecção de *T. cruzi*, em amostras de sangue de pacientes chagásicos, mostrou que o ensaio de PCR para

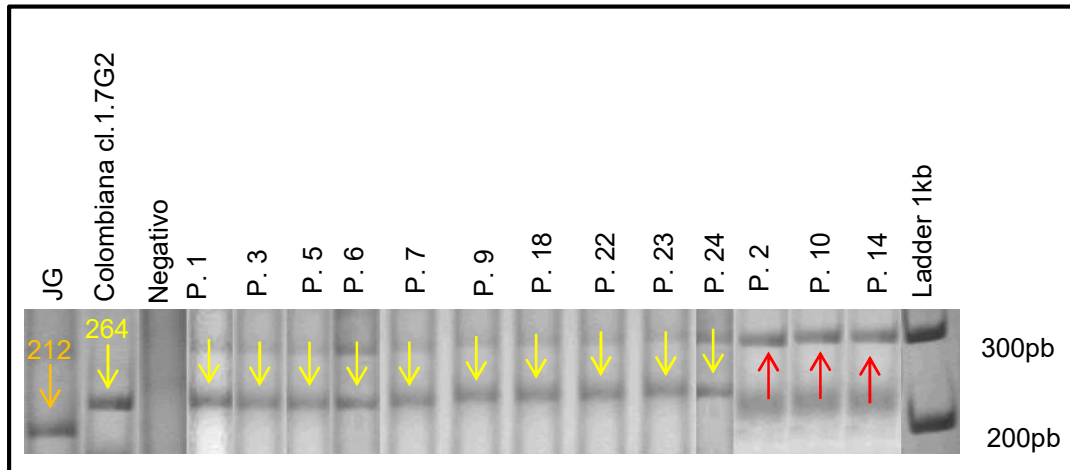
amplificação da região pacientes chagásicos mostrou que o ensaio de PCR para amplificação da região hipervariável do minicírculo kDNA foi um dos métodos de melhor desempenho, apresentando sensibilidade de 75%. Ainda, Borges-Pereira e colaboradores (2002) em estudo composto por 106 pacientes com sorologia positiva para Chagas, encontraram 74,5% de sensibilidade para a técnica. O fato de, neste trabalho, ter sido possível a identificação de DNA de *T. cruzi* em todas as amostras em contraste aos trabalhos citados que alcançaram índices de 75% pode ser explicado pelo fato destes terem utilizado amostras de pacientes crônicos ao passo que os pacientes do presente estudo eram de fase aguda quando os níveis de parasitemia são bem altos, facilitando a detecção do parasito por métodos moleculares.

#### **4.2.1 Genotipagem do DNA de *Trypanosoma cruzi* extraído das amostras de pacientes**

A genotipagem do *T. cruzi* foi realizada em material oriundo de 31 pacientes chagásicos agudos antes do tratamento. O objetivo foi determinar a classificação dos parasitos presentes nos indivíduos infectados, de acordo com a classificação em diferentes DTUs, utilizando o protocolo proposto por D'Ávila *et al.* (2009). Na genotipagem do parasito, de acordo com essa abordagem, foram utilizados três marcadores moleculares: COII (DE FREITAS *et al.*, 2006), SL-IRac (BURGOS *et al.*, 2007) e rDNA 24S $\alpha$  (SOUTO *et al.*, 1996). A seguir, serão apresentados os resultados para as avaliações destes três marcadores.

O resultado da amplificação do gene CO II revelou a presença de fragmentos de 30, 81 e 264 pares de bases, característicos do haplogrupo mitocondrial A que é um marcador de parasitos pertencentes ao DTU I, em 10 amostras de pacientes (Figura 6). Estes dados mostram que parasitos do DTU I foram encontrados em 32.2% das amostras analisadas (10 em 31). O perfil de haplogrupo mitocondrial B (Tc III, IV, V ou VI), com produtos amplificados de 81 e 294pb foi observado em amostras de outros 3 dos 31 pacientes (9,67%), excluindo a possibilidade de pertencerem ao TcI (264pb) ou TcII (212, 81 e 82pb) (Figura 6). Dezenove das 31

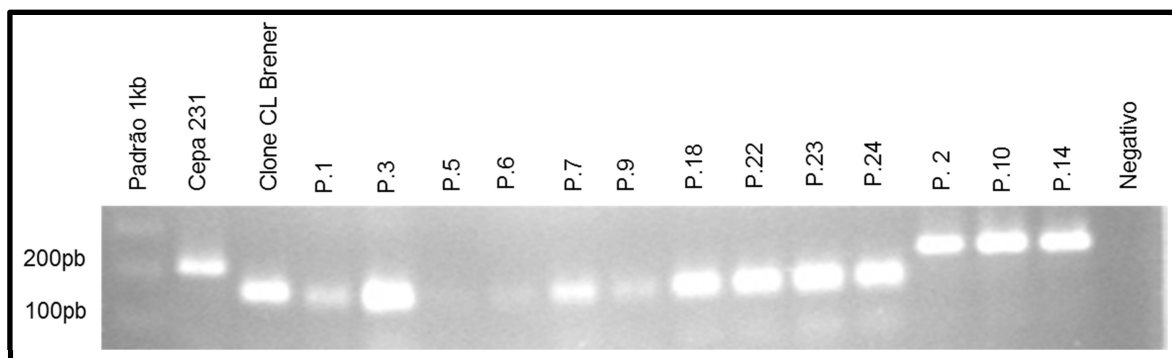
amostras (61,9%) não tiveram amplificação utilizando-se os iniciadores para o gene da CO II (dados não mostrados).



**Figura 6:** PCR FRLP do gene da Citocromo Oxidase II. Após a digestão pela enzima Alul, os amplicons geraram dois padrões de bandamento, mostrados pelo resultado obtido com as cepas Colombiana 1.7G2 e JG, onde observam-se bandas de 264 e 212pb, respectivamente. Amostras de dez indivíduos apresentaram reação de amplificação positiva para o fragmento de 264pb (setas amarelas) característico do haplótipo mitocondrial A, correspondente ao TcI (P.1, P.3, P.5, P.7, P.9, P.18, P.22, P.23, P.24). Amostras de três indivíduos apresentaram reação de amplificação positiva para o fragmento de 294pb (setas vermelhas) característico do haplótipo mitocondrial B, associado aos Tc III e IV. DNA das cepas Colombiana cl.1.7.2 (264pb) e JG (212pb), indicada pela seta laranja, foram utilizadas como controle positivo.

A PCR para amplificação do espaçador intergênico dos genes do minixon (SL-IRac) é capaz de diferenciar as DTU III e IV das demais DTUs do *T. cruzi* pela amplificação de um fragmento de 200pb correspondente ao TcIII e ao TcIV, além de um fragmento de 150pb relacionado à DTU I e 157pb correspondente às DTUs II, V e VI (BURGOS et al., 2007). As 13 amostras das quais foi possível observar produtos na reação de amplificação do gene da CO II foram submetidos à PCR para SL-IRac. Destas, 10 amostras caracterizadas como DTU I pela reação de amplificação da CO II (acima), amplificaram um produto de ~150pb confirmando pertencerem ao haplogrupo mitocondrial A (DTU I). Um fragmento de 200pb foi observado como resultado da reação de amplificação SL-IRac nas 3 amostras ainda não caracterizadas com base nos resultados acima, sugerindo que estas pertençam

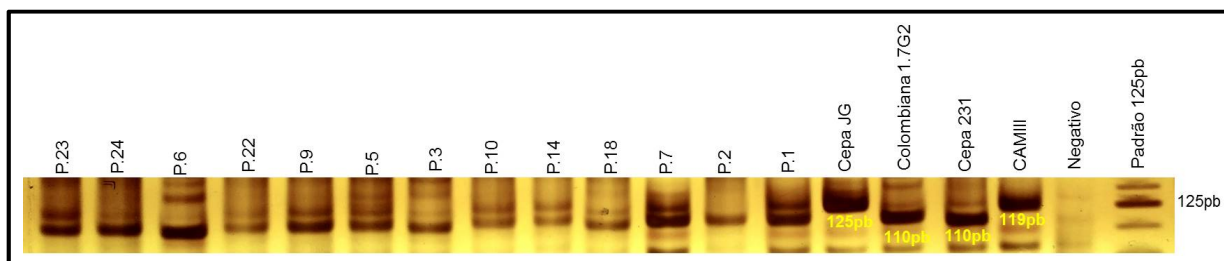
aos DTU Tc III ou IV, excluindo a possibilidade de pertencerem TcV ou TcVI (~150pb) (Figura 7).



**Figura 7:** PCR do espaçador intergênico dos genes do miniexon. Os amplicons geraram dois padrões de bandamento. Amostras de dez indivíduos mostraram reação de amplificação positiva para o fragmento de ~150pb, correspondente ao TcI (P.1, P.3, P.5, P.7, P.9, P.18, P.22, P.23, P.24). Amostras de três indivíduos apresentaram reação de amplificação positiva para o fragmento de 200pb correspondente aos Tc III e IV (P.2, P.10 e P.14). DNA das cepas 231 (200pb) e do clone CL Brener (157pb), TcIII e TcVI respectivamente, foram utilizadas como controles positivos.

Para a diferenciação das DTUs TcIII, IV, V e VI foi realizado à amplificação da região 3' do gene rDNA 24 S $\alpha$  através do hemi nested PCR, adaptado de Souto e colaboradores (1996). Esta reação permitiu a completa caracterização das 3 amostras cuja DTU ainda não havia sido determinada completamente nos ensaios anteriores. As 10 amostras anteriormente genotipadas como TcI (P.1, P.3, P.5, P.7, P.9, P.18, P.22, P.23, P.24), apresentaram um padrão de bandamento de 110pb característico de TcI (além de TcIII) confirmando a caracterização destas amostras como pertencentes a esse DTU. Amostras de 3 indivíduos que, pelas reações anteriores haviam sido determinadas como pertencentes ao TcIII ou TcIV apresentaram um padrão de bandamento diferente entre si. A amostra (P.2) apresentou reação positiva para o fragmento de 110pb característico do TcIII. No entanto, as outras duas amostras (P.10 e P.14) apresentaram um padrão de bandamento misto, com a amplificação de um fragmento de 110pb pertencente ao TcIII e 119pb pertencente ao TcIV indicando haver uma co-infecção nestes indivíduos (Figura 8).





**Figura 8:** Reação de PCR de amplificação do gene rDNA 24sα de *Trypanosoma cruzi*. Os amplicons geraram três padrões de bandejamento. Amostras de dez indivíduos anteriormente caracterizados como TcI mostraram reação de amplificação positiva para o fragmento de 110pb, correspondente ao TcI ou TcIII (P.1, P.3, P.5, P.7, P.9, P.18, P.22, P.23, P.24). Amostras de dois indivíduos anteriormente caracterizados como pertencentes ao TcIII ou TcIV, apresentaram reação de amplificação positiva para o fragmento de 110pb correspondente ao Tc III (P.10 e P.14) e também apresentaram reação de amplificação positiva para o fragmento de 119pb correspondente ao TcIV. Uma das amostras anteriormente caracterizada como pertencentes ao TcIII ou TcIV, apresentou reação de amplificação positiva para o fragmento de 110pb correspondente ao Tc III (P.2). DNA das cepas 231 (110pb), JG (125pb), clone Colombiana 1.7G2 (110pb) e CAMIII (119pb), TcIII, TcII, TcI e TcVI respectivamente, foram utilizadas como controles positivos.

Portanto, das 13 amostras cuja genotipagem foi possível realizar, dez pertenciam ao DTU TcI, dois apresentaram co-infecção entre TcIII e TcIV e uma das amostras foi caracterizada como pertencente ao TcIII. O quadro 3 apresenta um resumo dos pacientes e da DTU do *T. cruzi* identificado em suas amostras. Como já mencionado, TcI é a estirpe mais amplamente distribuída no norte da América do Sul e América Central, sendo a DTU mais frequentemente encontrada em amostras de pacientes da região da Amazônia brasileira (ZINGALES, 2012). Apesar de mais rara em território brasileiro, a TcIV é amplamente distribuída na Venezuela sendo a segunda principal causa de infecção do país (COURA, 2015). Diversos estudos identificaram TcI em indivíduos infectados oralmente na Venezuela (DÍAZ-BELLO *et al.*, 2014) e Tc I e Tc IV na Colômbia (SANTALA *et al.*, 2011; RAMÍREZ *et al.*, 2013). Ambas, TcI e TcIV, estão relacionadas a vários casos de infecção oral, especialmente na Bacia Amazônica (MARCILI *et al.*, 2009; VALENTE *et al.*, 2009 ; ANDRADE *et al.*, 2011). TcIII é muito relacionada ao ciclo silvestre, sendo raramente identificada em infecção humana com casos esporádicos na Argentina e semi-árido brasileiro (CURA *et al.*, 2012; K MARTINS *et al.*, 2015), alguns casos foram relatados na Bacia amazônica (MONTEIRO *et al.*, 2010). É importante destacar que está é a primeira vez que TcIII é identificada no estado o Pará.

Paciente	<i>Discrete Typing Unit (DTU)</i>
1	Tc I
2	Tc III
3	Tc I
5	Tc I
6	Tc I
7	Tc I
9	Tc I
10	Tc III e Tc IV
14	Tc III e Tc IV
18	Tc I
22	Tc I
23	Tc I
24	Tc I

**Quadro 3:** Lista de pacientes infectados por *T. cruzi* e a respectiva caracterização da DTU do parasito, identificadas pelas reações de PCR para amplificação dos genes da COII, Região intergência do Miniexon e rDNA24sa. Foi possível a genotipagem de treze dos trinta e um pacientes positivos para a amplificação da região variável do minicírculo do kDNA de *T. cruzi*. Destes, dez pacientes pertencem ao TcI, um foi caracterizado como pertencente ao TcIII e dois são co-infectados de TcIII e TcIV.

#### 4.2.2 Aspectos imunológicos de pacientes que apresentaram resultado positivo para PCR utilizando iniciadores para kDNA de *T. cruzi*

### 4.3 Determinação da Parasitemia e cálculo da Mediana

Para avaliar a parasitemia, foi utilizada a estratégia de análise baseada na determinação de um valor arbitrário pela contagem de pixels por área da banda obtida da reação de amplificação com os iniciadores para kDNA, observada em imagem digitalizada de gel de Poliacrilamida 7%, usando como ferramenta o *software* Image J, como descrito na metodologia. Tais valores foram utilizados para a determinação de alta e baixa parasitemia através do cálculo da Mediana. Como mediana, foi obtido o valor de 16.770 (sem unidade). Amostras que tiveram valores acima da mediana de todas as amostras positivas foram consideradas como

provenientes de pacientes com alta parasitemia e, abaixo da mediana, como de baixa parasitemia. Os valores arbitrários encontrados para parasitemia nos 31 indivíduos positivos para kDNA de *T. cruzi* encontram-se discriminados na tabela 1. Os métodos mais utilizados para determinação da parasitemia são o de contagem de parasitos de amostra sanguínea em microscópio de luz seja pelo exame direto do sangue fresco (GOMES, 1996) pela técnica de gota espessa (LUQUETTI & RASSI, 2000) ou por esfregaço (RASSI, 1992). Mais recentemente, através de quantificação pela técnica de PCR quantitativa (FREITAS, 2009; RAMIREZ *et al.*, 2015). Optamos por utilizar uma abordagem diferente já que as amostras, por estarem congeladas a pelo menos 5 anos, dificultavam a realização da contagem em microscópio de luz. A quantificação de pixels por área é uma metodologia muito utilizada na quantificação de proteínas em gel (VIEIRA, 2005) e se mostrou uma ferramenta útil para estimar também a quantidade de DNA em géis de eletroforese.

<b>Paciente</b>	<b>Parasitemia</b> (Unidades arbitrárias)	<b>Paciente</b>	<b>Parasitemia</b> (Unidades arbitrárias)
1	21.014	17	20.767
2	19.765	18	20.769
3	19.777	19	2.930
4	19.763	20	16.770
5	19.773	21	15.763
6	19.769	22	15.767
7	16.741	23	15.764
8	19.771	24	15.767
9	19.774	25	15.769
10	11.142	26	15.766
11	14.762	27	15.761
12	22.100	28	15.764
13	20.768	29	15.759
14	20.764	30	15.764
15	20.769	31	15.753
16	19.403	<b>Mediana</b>	<b>16.770</b>

**Tabela 1:** Parasitemia determinada para cada amostra positiva para a reação de PCR da região variável do minicírculo do kDNA usada como diagnóstico para infecção por *T. cruzi*. Análise de pixels por área através do software Image J. Os valores são arbitrários, sem unidade.

#### **4.4 Avaliação da correlação entre parasitemia estimada e parâmetros demográficos**

Para determinar se havia relação entre a parasitemia e a idade e o tempo de diagnóstico dos pacientes realizou-se a análise do Coeficiente de Correlação de Pearson ( $\rho$ ). Não foram observadas correlações estatisticamente significativas entre os valores estimados de parasitemia e a idade ou ao tempo de diagnóstico dos pacientes (dados não mostrados).

Para determinar se havia diferenças nos valores de parasitemia encontrados entre homens e mulheres, foi realizado o Teste T não pareado ( $p < 0,05$ ). Não foi observada diferença significativa entre os valores de parasitemia entre os pacientes do sexo feminino ( $18.007 \pm 2.978$ ) em comparação aos pacientes do sexo masculino ( $17.039 \pm 4.441$ ).

#### **4.5 Estudo das populações de células T em pacientes chagásicos agudos e seu estado de ativação entre os indivíduos com alta e baixa parasitemia**

A primeira análise de perfil imunológico foi baseada na investigação de uma possível expansão das principais populações de células T durante os estágios iniciais da infecção por *T. cruzi*, as quais já foram demonstradas como determinantes na imunopatologia chagásica crônica. Dessa forma, avaliamos a frequência de células TCD4<sup>+</sup> e TCD8<sup>+</sup>, além das moléculas de ativação CD28 e CTLA-4 e do marcador de ativação tardio HLA-DR, buscando determinar o status de ativação destas células no sangue periférico de pacientes chagásicos agudos com alta e baixa parasitemia.

	% de CD4 <sup>+</sup>	% de CD8 <sup>+</sup>	CD4/CD8
<b>Alta (n=10)</b>	*32,4 ± 6,9	18,5 ± 7,3	*2,3 ± 1,9
<b>Baixa (n=9)</b>	24,3 ± 3,5	*33,1 ± 14,6	0,9 ± 0,5

**Tabela 2:** Frequência de LT CD4<sup>+</sup>, LT CD8<sup>+</sup> e razão de CD4/CD8 no sangue periférico de pacientes chagásicos positivos para PCR de amplificação da região variável do kDNA de *T. cruzi*. Valores significativos para p<0.05.

Apesar de nosso grupo de pesquisa não ter observado uma expansão de células T nesses mesmos pacientes agudos, quando comparados a indivíduos não infectados (ANDRADE, 2012) corroborando com dados da literatura (SATHLER-AVELAR *et al.*, 2003), no presente estudo foi observada uma maior frequência de células T CD4<sup>+</sup> em pacientes com alta parasitemia (32,4 ± 6,9) em comparação aos pacientes com baixa parasitemia (24,3 ± 3,5). De maneira contrária, houve uma maior frequência de células T CD8<sup>+</sup> em pacientes com baixa parasitemia (33,1 ± 14,6) em comparação a pacientes com alta parasitemia (18,5 ± 7,3). Encontramos ainda, valores significativamente maiores para a razão CD4/CD8 em pacientes com alta parasitemia (2,3 ± 1,9) em comparação a indivíduos com baixa parasitemia (0,9 ± 0,5) (Tabela 2). O que sugere haver um perfil diferencial de frequências dessas células em níveis diferentes de parasitemia. Rottenberg e colaboradores (1993), em modelo experimental, encontraram uma maior frequência de células CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> em camundongos com alta parasitemia e baixa frequência de CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> com baixa parasitemia, mas registrou também uma menor sobrevida neste último grupo. Marinho (1998), em modelo experimental em que avaliou diversos parâmetros na infecção por diferentes quantidades de parasitos, identificou no baço de camundongos infetados com alta dose de parasitos uma expansão de células T CD8<sup>+</sup> quando comparados ao grupo infectado com baixas doses. Tzelepis e colaboradores (2006) demonstraram em modelo experimental que a diferenciação e multiplicação de células T CD8<sup>+</sup> está diretamente relacionada ao controle do parasito, demonstrando que a população de células CD8<sup>+</sup> tem um papel protetor na fase aguda, uma vez que os indivíduos com baixa parasitemia apresentam maior frequência de células CD8<sup>+</sup>, perfil também visto por Tarleton (1992).

Sabe-se que o perfil de ativação pode ter uma importância funcional de grande relevância nos eventos imunes desencadeados durante a infecção por *T. cruzi*. Durante a progressão da doença, há uma constante estimulação por antígenos autólogos e heterólogos (CUNHA-NETO *et al.*, 1994). Por isso, a expressão de marcadores de ativação como CD28 e CTLA-4 e do marcador de ativação tardio HLA-DR são de grande importância nos contextos de nossos estudos. Então, foi avaliada a expressão de marcadores de ativação nos linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> em pacientes classificados de acordo com a intensidade da parasitemia. De forma interessante, houve uma maior frequência de células CD8<sup>+</sup> expressando o marcador de ativação tardio HLA-DR em indivíduos com baixa parasitemia (1,9 ± 1,2), em relação aos pacientes com alta parasitemia (Tabela 3).

	%CD4 <sup>+</sup> CD28 <sup>-</sup>	%CD4 <sup>+</sup> CTLA-4 <sup>+</sup>	%CD4 <sup>+</sup> HLA-DR <sup>+</sup>
<b>Alta (n=11)</b>	3,4 ± 3,0	0,2 ± 0,2	1,7 ± 0,4
<b>Baixa (n=9)</b>	2,1 ± 1,5	0,5 ± 0,4	2,0 ± 1,1
	%CD8 <sup>+</sup> CD28 <sup>-</sup>	%CD8 <sup>+</sup> CTLA-4 <sup>+</sup>	%CD8 <sup>+</sup> HLA-DR <sup>+</sup>
<b>Alta (n=11)</b>	11,0 ± 5,1	0,2 ± 0,2	0,6 ± 0,3
<b>Baixa (n=9)</b>	24,3 ± 9,5	0,3 ± 0,3	*2,0 ± 1,2

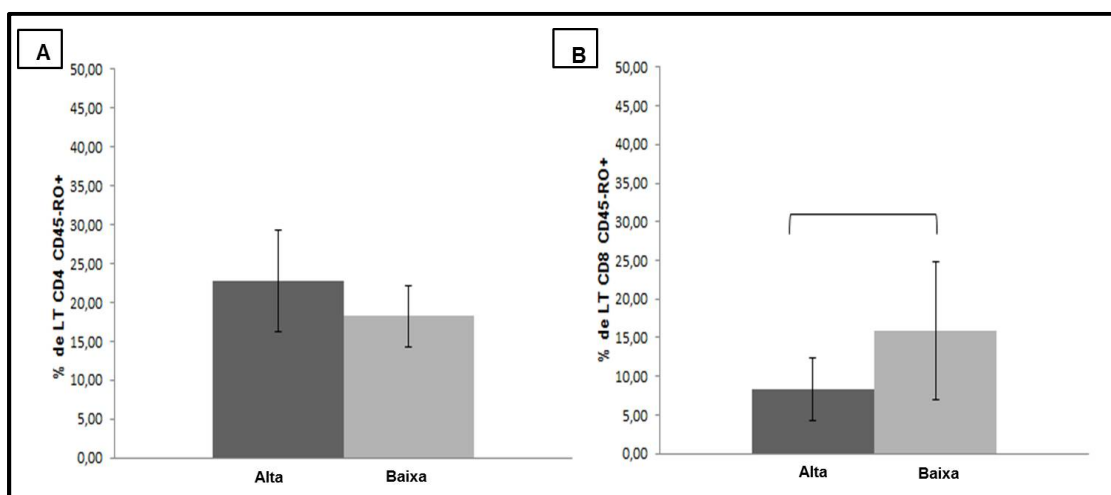
**Tabela 3:** Frequência de LT CD4<sup>+</sup> CD28<sup>-</sup> e LT CD8<sup>+</sup> CD28<sup>-</sup>, CD4<sup>+</sup> CTLA-4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> CTLA-4<sup>+</sup> e CD4<sup>+</sup> HLA-DR<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> HLA-DR<sup>+</sup> no sangue periférico de pacientes chagásicos positivos para a reação de PCR para amplificação da região variável do minicírculo do kDNA de *T. cruzi*. Valores significativos para p<0.05 indicados por \*.

Marinho (1998) em modelo animal identificou uma maior frequência de linfócitos T CD8<sup>+</sup> com perfil de diferenciação tardio (CD45RA<sup>-</sup>CD27<sup>-</sup>CD28<sup>-</sup>) em camundongos com a forma crônica da doença de Chagas. De maneira semelhante, Albareda e colaboradores (2010) identificaram maior frequência de células T CD8<sup>+</sup> CD45RA<sup>-</sup> CD27<sup>-</sup>CD28<sup>-</sup> em pacientes crônicos, mas não viram alteração na frequência de CD8<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup> em crianças ainda na fase aguda. Dutra e colaboradores (1994) comparando pacientes crônicos chagásicos indeterminados e cardíacos, e entre estes grupos e indivíduos não infectados, encontraram uma maior frequência de linfócitos T expressando a molécula HLA-DR e uma diminuição na frequência de células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> expressando a molécula CD45RA em indivíduos infectados

quando comparados aos não infectados, indicando haver um maior número de células T ativadas circulantes em indivíduos infectados. A maior frequência de células T CD8<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup> acompanha os resultados encontrados para a frequência de LT CD8<sup>+</sup> totais, mostrando uma maior frequência dessas células ativadas em indivíduos com baixa parasitemia. Estes resultados sugerem o envolvimento de células T CD8<sup>+</sup> como importante personagem no controle do parasito, como já demonstrado em estudos em que animais depletados dessa população celular apresentaram um aumento da parasitemia na fase aguda (ROTTEMBERG *et al.*, 1995; TARLETON *et. al.*; 1992). Não foram observadas diferenças na frequência de expressão dos marcadores CD28 ou CTLA-4 por linfócitos CD4<sup>+</sup> ou CD8<sup>+</sup>, dentre os diferentes grupos.

#### **4.6 Análise do status de memória/ativação de células T de pacientes chagásicos com alta e baixa parasitemia**

Células de memória são importantes componentes da resposta imunológica por persistirem por tempo prolongado no indivíduo sendo rapidamente ativadas em casos de reestimulação pelo patógeno, o que resulta em uma alta proliferação e leva à ativação de outras células imunes gerando assim, respostas efetivas mediadas por estas células, que são capazes de secretar citocinas prontamente ao serem estimuladas pelo antígeno previamente conhecido (BUTCHER & PICKER, 1996; revisado por DUTTON *et al.*, 1998; APPAY *et al.*, 2002; WHERRY *et al.*, 2003). Um dos marcadores de memória de células T é a isoforma CD45-RO da molécula de superfície CD45 (MICHIE *et al.*, 1992). Investigou-se, então, a expressão de CD45-RO em linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>, buscando determinar se havia diferença na frequência dessas sub-populações entre pacientes com alta e baixa parasitemia. Foi observada uma maior expressão de CD45-RO em linfócitos T CD8<sup>+</sup> de indivíduos com baixa (15,8±8,8) em comparação a indivíduos com alta parasitemia (8,3±4,1) (Gráfico 1- A), o mesmo não foi observado para a população de LTCD4<sup>+</sup> de pacientes com alta (22,3±6,5) e baixa (18,2±3,9) parasitemia (Gráfico 1 – B).



**Gráfico 1:** Análise da frequência de células TCD4<sup>+</sup> CD45-RO<sup>+</sup> (A) e TCD8<sup>+</sup> CD45-RO<sup>+</sup> (B) presentes no sangue periférico de pacientes chagásicos agudos com alta (barras escuras, n=10) e baixa (barras claras, n=9) parasitemia. As barras representam as médias ± desvio-padrão (p<0,05).

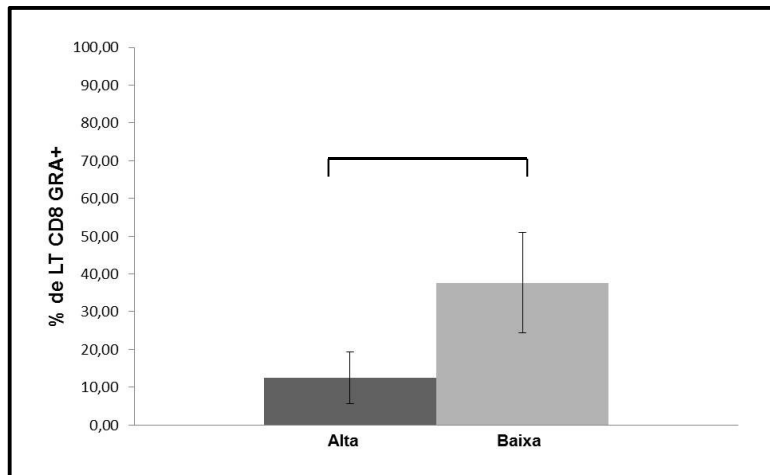
O papel de células de memória na patologia chagásica ainda não está completamente elucidado. Fiuza e colaboradores (2009) demonstraram um aumento da frequência de células CD4<sup>+</sup>CD45-RO<sup>high</sup> e uma diminuição de células CD4<sup>+</sup>CD45-RA<sup>high</sup> em pacientes com a forma indeterminada da doença quando comparados a indivíduos não infectados, mas não houve diferenças entre os indivíduos cardíacos e indeterminados e também quando avaliada a população de células CD8<sup>+</sup> de memória. No entanto, Albareda e colaboradores (2006) identificaram um aumento na frequência de células de memória efetora (CD45RA<sup>-</sup>CCR7<sup>-</sup>) em indivíduos cardíacos. Ainda no trabalho de Fiuza, foi identificada uma maior frequência de células efetoras de memória central e periférica em pacientes cardiopatas e indeterminados, quando comparados com não infectados (FIUZA *et al.*, 2009). O papel de células de memória na fase aguda da doença de Chagas e sua associação com os níveis de parasitemia ainda não estão claros. Foi demonstrado, em modelo animal, que células T de memória efetora antígeno-específicas parecem manter o fenótipo de memória efetora durante a infecção persistente *T. cruzi* (MARTIN & TARLETON, 2005; TZELEPIS *et al.*, 2006), sugerindo que estas células podem desempenhar um papel importante na patogênese da doença de Chagas assim como em outras infecções. A diminuição de células T virgens e o aumento de células de memória podem ocorrer durante a cronificação da doença, podendo estar relacionada a uma exaustão clonal de LT



decorrente da contínua estimulação antigênica por parasitas persistentes, ou seja, células T CD8<sup>+</sup> antígeno-específicas que eram importantes para o controle da parasitemia nas fases iniciais da doença são levadas a exaustão pela constante estimulação por antígenos do parasito (MINOPRIO *et al.*, 1986; DUTRA *et al.*, 1994).

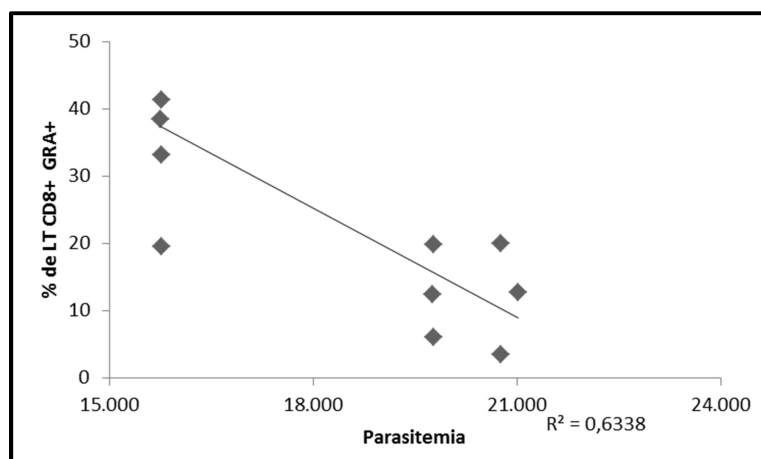
#### **4.7 Expressão diferencial de Granzima A em células TCD8<sup>+</sup> de pacientes chagásicos agudos com alta e baixa parasitemia**

Dependendo do balanço entre citocinas pró e anti-inflamatórias no meio em que está inserida, a célula ativada pode desempenhar um importante papel citotóxico, levando, muitas vezes, à injúria tecidual ou ao controle do patógeno. Dentre as vias citolíticas descritas, a das granzimas tem recebido grande destaque, sendo a Granzima A um de seus principais componentes (METKAR *et al.*, 2008). Ela é predominantemente expressa por linfócitos T citotóxicos e células NK (TRAPANI, 2001). Buscando determinar se há uma produção diferencial de Granzima A em pacientes com alta e baixa parasitemia, foi realizada a marcação dessa molécula em linfócitos T CD8<sup>+</sup> de pacientes agudos. Observou-se uma maior expressão de Granzima A em pacientes com baixa parasitemia ( $37,6 \pm 13,2$ ) quando comparado aos pacientes com alta parasitemia ( $12,4 \pm 6,8$ ) – (Gráfico 2). Reis e colaboradores (1993) encontraram uma predominância de linfócitos T CD8<sup>+</sup> expressando Granzima A no infiltrado inflamatório no tecido cardíaco de indivíduos com Cardiopatia chagásica, onde tem grande importância na regulação imune (CHOWDHURY & LIEBERMAN, 2008).



**Gráfico 2:** Porcentagem de expressão de Granzima A por células TCD8<sup>+</sup> no sangue periférico de pacientes chagásicos agudos com alta (barra escura, n=6) e baixa (barra clara, n=5) parasitemia. Para determinar se há diferença entre os diferentes grupos foi utilizado o Teste T não pareado. As barras apresentam a média e desvio padrão. Resultados significativos são indicados pela barra superior ( $p < 0,05$ ).

Foi investigada, ainda, a correlação entre parasitemia e a frequência de células CD8<sup>+</sup> expressando a molécula citolítica Granzima A. Foi encontrada uma correlação negativamente forte entre os níveis de parasitemia e a frequência de células CD8<sup>+</sup> GRA<sup>+</sup> ( $\rho = -0,80$ ) (Gráfico 3).



**Gráfico 3:** Análise de correlação entre parasitemia e a frequência de LTCD8<sup>+</sup> GRA<sup>+</sup> (n=11).

Elevados níveis de Granzima A circulantes e a clivagem de substratos extracelulares mediadas pelas granzimas sugerem que estas podem desempenhar um papel extracelular importante na rejeição a tumores e em infecções virais, e também na patogênese de doenças inflamatórias (ROMERO & ANDRADE, 2008). Nosso grupo de pesquisa já demonstrou o aumento dessa molécula citotóxica em pacientes com cardiopatia dilatada após estímulo (Villani, 2010). Em outro trabalho, também do nosso grupo com estes mesmos indivíduos Andrade (2012) observou uma maior frequência de células TCD4<sup>+</sup>GRA-A<sup>+</sup> nos pacientes chagásicos agudos em relação aos não infectados. Na infecção por HIV, há uma expansão de células TCD4<sup>+</sup> produtoras de Granzima A durante os estágios iniciais da infecção controlando a replicação viral (SOGHOIAN *et al.*, 2012), o que pode também ocorrer nos estágios iniciais da infecção por *T. cruzi*. Curiosamente, identificamos uma maior produção de Granzima A nos indivíduos com baixa parasitemia o que pode reforçar essa teoria.

#### **4.8 Comparação do perfil de citocinas entre pacientes chagásicos agudos com alta e baixa parasitemia**

Além do status de ativação, a produção de citocinas é ponto crucial na reatividade celular, estas derivam de populações celulares diversas que estão em constante interação, sendo fundamentais para determinar o curso da infecção. Nesse contexto, analisamos a frequência das citocinas IFN- $\gamma$ , IL-10 e IL-17 conhecidamente importantes no contexto da infecção por *T. cruzi* (DUTRA *et al.*, 2000; GOMES *et al.*, 2003; CUNHA-NETO *et al.*, 2005, MAGALHAES *et al.*, 2013) dentro da população de linfócitos totais e das sub-populações CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>, nos grupos de pacientes segregados de acordo com a parasitemia. Comparando-se os dados de pacientes chagásicos com alta e baixa parasitemia, não foram observadas diferenças significativas na frequência das citocinas analisadas dentro da população linfocitária total. No entanto, foi observada uma maior frequência de células T CD8<sup>+</sup> expressando as citocinas IFN- $\gamma$  (2,4 $\pm$ 1,6) e IL-17 (3,7 $\pm$ 3,1) em pacientes com baixa parasitemia, comparando-se aos pacientes com alta parasitemia (1,2 $\pm$ 0,7e 1,5 $\pm$ 1,1, respectivamente). Comparando-se a frequência de células TCD4<sup>+</sup> e TCD8<sup>+</sup>

expressando a citocina IL-10 em pacientes com baixa e alta parasitemia não foram observadas diferenças significativas (Tabela 4).

	Grupos	Citocinas Totais	% de CD4 <sup>+</sup> expressando citocina	% de CD8 <sup>+</sup> expressando citocina
IFN- $\gamma$	Alta (n=10)	8,3 $\pm$ 3,7	2,8 $\pm$ 1,9	1,1 $\pm$ 0,7
	Baixa (n=9)	7,4 $\pm$ 3,3	2,9 $\pm$ 1,9	*2,4 $\pm$ 1,6
IL-10	Alta (n=10)	1,7 $\pm$ 2,3	0,4 $\pm$ 0,2	0,4 $\pm$ 0,2
	Baixa (n=9)	2,2 $\pm$ 2,0	0,3 $\pm$ 0,2	0,7 $\pm$ 0,7
IL-17	Alta (n=10)	4,8 $\pm$ 2,6	2,1 $\pm$ 1,5	1,5 $\pm$ 1,1
	Baixa (n=9)	6,5 $\pm$ 4,3	4,7 $\pm$ 5,0	*3,7 $\pm$ 3,1

**Tabela 4:** Porcentagem de expressão de citocinas dentro da população linfocitária total e frequência de células TCD4<sup>+</sup> e TCD8<sup>+</sup> positivas para cada uma das citocinas analisadas no sangue periférico de pacientes chagásicos agudos com alta (n=10) e baixa (n=9) parasitemia. Para determinar se há diferença entre os diferentes grupos foi utilizado o Teste T não pareado ( $p > 0.05$ ). Em cada parâmetro avaliado, diferenças estatisticamente significativas entre os grupos alta e baixa parasitemia estão indicadas por \*.

Hohler e colaboradores (1998) em estudo com camundongos *knock out* para IFN- $\gamma$  e na presença de inibidor de iNOS, mostrou que estes foram mais susceptíveis à infecção por *T. cruzi* apresentando maiores níveis de parasitemia e histopatologia grave. Já camundongos *knock out* para IL-10 apresentam baixa parasitemia e aumento da expressão de IFN-  $\gamma$  e NO (ABRAHAMASOHN & COFFMAN, 1996) reforçando a importância do IFN-  $\gamma$  para o controle do parasito através da ativação da produção de NO por macrófagos. Em pacientes chagásicos, Bahia-Oliveira e colaboradores (1998) identificaram uma maior produção de IFN- $\gamma$  em indivíduos curados tratados com Benznidazol quando comparados aos indivíduos não curados demonstrando um papel protetor desta citocina após o tratamento auxiliando na eliminação do parasito. Guedes e colaboradores (2012) utilizando modelo murino, demonstraram alta expressão de IL-10 em células CD4<sup>+</sup> em camundongos não cardiopatas e alta expressão de TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  em camundongos com cardiopatia leve a grave mostrando que além do controle do parasito, citocinas inflamatórias

como IFN- $\gamma$  estão envolvidas no dano tecidual associado à infecção. A citocina IL-17 muito associada a patologias auto-imunes, tem uma papel protetor na Doença de Chagas. Ainda no estudo de Guedes (2012) houve uma menor produção de IL-17 por LT CD4<sup>+</sup> em camundongos com cardiopatia severa. Nosso grupo já demonstrou o papel protetor de IL-17 na cardiopatia chagásica crônica (MAGALHÃES *et al.*, 2012, assim como outros autores (MIYAZAKI *et al.*, 2010; DE ARAÚJO *et al.*, 2012). A IL-17 tem sido relacionada ao controle dos níveis de parasitemia em modelo experimental (MOU *et al.*, 2010; MIYAZAKI *et al.*, 2010; TOSELLO-BOARI *et al.*, 2012; ERDMANN *et al.*, 2013). Interessantemente, em nossos dados observa-se que os linfócitos T CD8<sup>+</sup> encontram-se mais ativados e sendo a principal fonte de IL-17 e IFN-  $\gamma$  em indivíduos com baixa parasitemia. Alguns autores já relataram a importância de células T CD8<sup>+</sup> com esse perfil no controle da parasitemia em outras doenças infecciosas (SILVA *et al.*, 2014) em resposta anti-tumoral (TAJIMA *et al.*, 2011) e em doenças autoimunes (DONGGOU *et al.*, 2006; HUBER *et al.*, 2012). Nossos achados trazem um novo olhar sobre o papel de citocinas como IFN-  $\gamma$  e IL-17 na fase aguda da doença, mostrando que estão diretamente relacionadas a baixos níveis de parasitemia.

#### **4.9 Aspectos imunológicos de pacientes agudos infectados por *T. cruzi* com DTU determinada por PCR**

##### **4.9.1 Discriminação dos pacientes infectados por *T. cruzi* com DTU determinada em TcI, TcIII e TcIV**

Dentre as 31 amostras de pacientes que foram positivos para a reação de amplificação do fragmento de 330pb correspondente a região do minicírculo do kDNA, em treze deles foi possível determinar a DTU ( TcI-VI).

Buscando avaliar se a DTU tem influência sobre os parâmetros imunológicos apresentados, os pacientes foram divididos em dois grupos baseados nas genotipagens realizadas pelo ensaio triplo proposto por D'ávila (2009). Os pacientes infectados por *T. cruzi* identificados como pertencentes ao TcI foram nomeados como Grupo TcI (n=10) e os pacientes infectados por *T. cruzi* identificados como pertencentes ao Tc III e TcIV foram nomeados como Grupo TcIII/TcIV (n=3). TcIII e TcIV foram condensados em um único grupo por conta do número amostral ser pequeno, o que impossibilitaria a realização das análises comparativas. Avaliou-se, inicialmente, se havia diferença na parasitemia entre os dois grupos. Verificou-se que não há diferenças estatisticamente significativas entre a média de valores encontrados entre os grupos - (Tabela 5).

	Paciente	Parasitemia
<b>Grupo TcIII/TcIV</b>	2	19.765
	10	19.774
	14	20.768
	<b>Média</b>	20.102
	<b>Desvio padrão</b>	577
	Paciente	Parasitemia
<b>Grupo TcI</b>	1	21.014
	3	19.777
	4	19.763
	5	19.773
	6	19.769
	7	16.741
	18	20.767
	22	15.763
	23	15.767
	24	15.764
	<b>Média</b>	18.703
<b>Desvio padrão</b>	2.198	

**Tabela 5:** Grupos de pacientes divididos de acordo com a DTU a qual pertencem, grupo TcI (n=10) e o grupo TcIII/TcIV (n=3) e os respectivos valores para parasitemia. Os valores são arbitrários, sem unidade.

Alguns autores acreditam que a diversidade genética pode influenciar no curso da infecção, e que cepas diferentes, pertencentes a diferentes DTUs induzem respostas distintas nos indivíduos, polarizando as formas clínicas (CAETANO *et al.*, 2010; MAGALHÃES *et al.*, 2015). No entanto, estudos comparativos entre as diferentes DTUs principalmente TcIII e Tc IV são escassos, principalmente quanto a avaliação de infectividade, parasitemia e resposta imunológica gerada no hospedeiro. Grande parte dos estudos tem como foco apenas características epidemiológicas das cepas pertencentes a esses DTUs.

Monteiro e colaboradores (2013), avaliaram em modelo animal diversos parâmetros diferentes na infecção experimental com TcI e TcIV isolada na região amazônica. Neste estudo, foram observadas diferenças significativas entre 15 dos 17 parâmetros avaliados, mostrando um perfil bem diferente entre as DTUs. Naquele estudo, foram observados níveis de parasitemia muito mais elevados nos camundongos infectados com TcIV quando comparados aos indivíduos infectados por TcI. TcI apresentou parasitemia predominantemente subpatente, resultado também encontrado por Lisboa e colaboradores (2007) usando TcI isolado da região amazônica. Além de maior parasitemia, a DTU TcIV se mostrou muito mais virulenta. No entanto, de maneira interessante, os três pacientes pertencentes ao grupo TcIII/TcIV apresentaram valores de parasitemia acima da mediana (16.770) calculada com base nos valores encontrados para os 31 indivíduos que amplificaram para a reação de PCR do kDNA, enquanto que apenas 60% (6/10) indivíduos do grupo TcI apresentaram valores acima da mediana apesar de não observarmos diferenças nas médias dos valores de parasitemia entre as DTUs, o que pode ser explicado pelo pequeno número amostral o que pode estar mascarando esta diferença. Ainda no estudo de Monteiro, foram identificadas maiores níveis de infectividade em TcIV e em contrapartida foi observada maior processo inflamatório e parasitismo tecidual em camundongos infectados por TcI, além de maior susceptibilidade ao Benzonidazol.

#### 4.9.2 Estudo das populações de células T em pacientes chagásicos agudos, seu estado de ativação e produção de citocinas entre os indivíduos pertencentes aos grupos TcI e TcIV

Para determinar se há uma expansão diferencial de células T entre as duas diferentes DTUs e seu perfil de ativação, foi avaliada a frequência de células TCD4<sup>+</sup> e TCD8<sup>+</sup> além da avaliação da expressão das moléculas de ativação CD28 e CTLA-4 e do marcador de ativação tardio HLA-DR por estas células. Não foram observadas diferenças na frequência de células CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> totais, bem como na expressão das moléculas de ativação CD28 e CTLA-4 e do marcador de ativação tardio HLA-DR entre os pacientes pertencentes aos grupos TcI e TcIII/TcIV.

	%LTCD4 <sup>+</sup>	%CD4 <sup>+</sup> CD-28 <sup>-</sup>	%CD4 <sup>+</sup> CTLA-4 <sup>+</sup>	%CD4 <sup>+</sup> HLA-DR <sup>+</sup>
<b>TcI (n=9)</b>	29,4 ± 7,5	2,6 ± 2,6	0,21± 0,19	1,7 ± 0,5
<b>TcIII/TcIV (n=3)</b>	31,7 ± 7,9	2,5 ± 2,4	0,33±0,22	1,5 ± 0,3
	%CD8 <sup>+</sup>	%CD8 <sup>+</sup> CD-28 <sup>-</sup>	%CD8 <sup>+</sup> CTLA-4 <sup>+</sup>	%CD8 <sup>+</sup> HLA-DR <sup>+</sup>
<b>TcI (n=11)</b>	26,0 ± 16,0	15,8 ±12,1	0,2 ± 0,2	1,0 ± 0,8
<b>TcIII/TcIV (n=9)</b>	17,3 ± 7,7	10,5 ± 3,3	0,2 ± 0,1	1,0 ± 1,0

**Tabela 6:** Frequência de LT CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> totais, frequência de LT CD4<sup>+</sup> CD28<sup>-</sup> e LT CD8<sup>+</sup> CD28<sup>-</sup>, CD4<sup>+</sup> CTLA-4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> CTLA-4<sup>+</sup> e CD4<sup>+</sup> HLA-DR<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> HLA-DR<sup>+</sup> em pacientes pertencentes aos grupos TcI e TcIII/TcIV. Valores significativos para p<0.05.

Analisamos a frequência das citocinas IFN-γ, IL-10 e IL-17 dentro da população de linfócitos totais. Comparando os dados de pacientes chagásicos pertencentes ao grupo TcI e TcIV, não foram observadas diferenças significativas na frequência das citocinas analisadas dentro da população linfocitária total. No entanto, foi observada uma maior frequência de células T CD8<sup>+</sup> expressando a citocina IL-10 (0,6 ± 0,2) em indivíduos pertencentes ao grupo TcIII/TcIV em comparação aos indivíduos pertencentes ao grupo TcI (0,3 ± 0,2). Esse resultado se mostra interessante, uma vez que todos os componentes grupo TcIII/TcIV apresentam níveis de parasitemia acima da mediana e suas células CD8<sup>+</sup> produzem mais IL-10 do que o grupo TcI, o



que reforça o papel regulador dessa citocina na resposta frente o parasito diminuindo a capacidade tripanocida dos macrófagos através da inibição da produção de ROS e NO por estas células.

	Grupos	Citocinas Totais	% de CD4 <sup>+</sup> expressando citocina*	% de CD8 <sup>+</sup> expressando citocina*
IFN- $\gamma$	Tcl (n=9)	7,0 $\pm$ 4,0	3,3 $\pm$ 2,2	1,3 $\pm$ 1,3
	TclIV (n=3)	10,0 $\pm$ 0,5	1,8 $\pm$ 0,7	1,5 $\pm$ 0,7
IL-10	Tcl (n=9)	1,8 $\pm$ 2,3	0,4 $\pm$ 0,3	0,3 $\pm$ 0,2
	TclIV (n=3)	1,2 $\pm$ 0,8	0,4 $\pm$ 0,2	*0,6 $\pm$ 0,2
IL-17	Tcl (n=9)	5,7 $\pm$ 3,5	3,7 $\pm$ 5,0	2,3 $\pm$ 2,6
	TclIV (n=3)	4,5 $\pm$ 2,2	2,2 $\pm$ 2,5	1,6 $\pm$ 1,9

**Tabela 7:** Porcentagem de expressão de citocinas dentro da população linfocitária total e frequência de células TCD4<sup>+</sup> e TCD8<sup>+</sup> positivas para cada uma das citocinas analisadas no sangue periférico de pacientes chagásicos agudos pertencente ao Tcl (n=9) e TclIV (n=3). Para determinar se há diferença entre os diferentes grupos foi utilizado o Teste T não pareado. Em cada parâmetro avaliado, diferenças estatisticamente significativas entre os grupos estão indicadas por \*.

Buscando na literatura estudos que mostrassem o perfil de resposta imunológica frente à infecção por *T. cruzi* III e IV, e não somente dados epidemiológicos e sobre parasitemia para discutir nossos achados, não foi possível encontrá-los. Então tendo mostrado pela primeira vez, segundo nosso conhecimento, dados sobre o perfil de resposta celular frente a infecção por *T. cruzi* TclIII e TclIV; além da resposta da infecção por Tcl em humanos, acreditamos que o presente trabalho traz uma grande contribuição para o entendimento do desenvolvimento de um perfil de sintomas e gravidade diferentes entre as DTUs. Estudos futuros, incluindo outros componentes importantes envolvidos na resposta frente o *T. cruzi* se fazem necessários para que possamos compreender melhor toda a dinâmica da infecção por esse parasito que é tão diverso.

## 4. CONCLUSÃO

---

Tendo em vista os resultados apresentados, concluímos que:

- ✓ Foi possível a identificação de três DTU distintas nas amostras de pacientes provenientes do Estado do Pará, TcI, TcIII e TcIV , sendo a TcI a mais prevalente naquela região, TcIII que é raramente encontrada infectando humanos foi identificada pela primeira vez no estado do Pará e a última envolvida em diversos relatos de infecção oral na região amazônica brasileira;
- ✓ Os indivíduos que apresentaram baixa parasitemia mostraram maiores frequências de células T CD8+ ativadas expressando granzima A, IFN-  $\gamma$  e IL-17, sugerindo que os indivíduos com baixa parasitemia têm um perfil de resposta mais efetor no controle do parasito;

Não houve diferenças significativas entre a frequência de células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> e produção das citocinas IFN- $\gamma$  e IL-17 entre o indivíduos infectados por *T. cruzi* pertencentes ao TcI, TcIII e TcIV, no entanto, observou-se uma maior frequência de expressão de IL-10 por células T CD8<sup>++</sup> em pacientes onde foram identificados TcIII e TcIV.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAHAMSOHN IA, COFFMAN RL. Trypanosoma cruzi: IL-10, TNF, IFN-g and IL-12 regulate innate and acquired immunity to infection (1996). *Exp Parasitol*; 84:231–44.
- ABRAHAMSOHN IA, COFFMAN RL. Trypanosoma cruzi: IL-10, TNF, IFN-gamma, and IL-12 regulate innate and acquired immunity to infection (1996). *Exp Parasitol*. 84(2):231-44.
- ALARCÓN DE NOYA, B; DÍAZ-BELLO, Z; COLMENARES, C; RUIZ-GUEVARA, R; MAURIELLO, L; MUÑOZ-CALDERÓN, A; NOYA, O. Update on oral Chagas disease outbreaks in Venezuela: epidemiological, clinical and diagnostic approaches (2015). *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, Vol. 110(3): 377-386.
- ALBAREDA MC, LAUCELLA SA, ALVAREZ MG, ARMENTI AH, BERTOCHI G, TARLETON RL, POSTAN M. Trypanosoma cruzi modulates the profile of memory CD8<sup>++</sup> T cells in chronic Chagas' disease patients (2006). *Int Immunol*. 18(3):465-71.
- ALBAREDA, M.C., OLIVERA, G.,C., DE RISSIO, A.M., POSTAN, A.M. Short Report: Assessment of CD8<sup>++</sup> T cell differentiation in Trypanosoma cruzi-infected children (2010). *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v.82, p.861-864,
- ALIBERTI JC, MACHADO FS, SOUTO JT, CAMPANELLI AP, TEIXEIRA MM, GAZZINELLI RT, SILVA JS. beta-Chemokines enhance parasite uptake and promote nitric oxide-dependent microbistatic activity in murine inflammatory macrophages infected with Trypanosoma cruzi (1999) . *Infect ImmunSep*;67(9):4819-26.
- ANDRADE, S. G. Caracterização de cepas de Trypanosoma cruzi isoladas do Recôncavo Baiano: contribuição ao estudo da patologia geral da doença de Chagas em nosso meio (1974). *Revista de Patologia Tropical*, v. 3, p. 65-121.=
- ANDRADE, Z.A. Immunopathology of Chagas disease (1999). *Memórias Instituto Oswaldo Cruz*, v.94, p.71-80.
- ANDRADE, J. A.; MARIN-NETO, J. A.; PAOLA, A. A. V.; VILAS-BOAS, F.; OLIVEIRA, G. M. M.; BACAL, F.; BOCCHI, E. A; ALMEIDA, D. R.; FRAGATA FILHO, A. A.; MOREIRA M. C.V.; XAVIER S. S.; OLIVEIRA JUNIOR, W. A.; DIAS, J. C. P. (2011) I Diretriz Latino Americana para o Diagnóstico e Tratamento da Cardiopatia Chagásica. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, v. 97, p.1-48.
- ANDRADE, DV. Aspectos imunorregulatórios nas fases aguda e crônica recente da doença de Chagas: expressão de citocinas e análise de potencial citotóxico (2012). Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Minas Gerais.
- ANDRADE, D. V.; GOLLOB, K. J.; DUTRA, W.O. Acute Chagas disease: new global challenges for an old neglected disease (2014). *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v.8, n.7, e3010.
- ANNUNZIATO F, COSMI L, ROMAGNANI S. Human and murine Th17 (2010). *Curr Opin HIV AIDS*. 5(2):114-9.
- ANONYMOUS Recommendations from an international symposium to commemorate the 90th anniversary of the discovery of Chagas disease (1999). *Mem Ins Oswaldo Cruz* 94:429-432..
- APPAY V, DUNBAR PR, CALLAN M, KLENERMAN P, GILLESPIE GM, PAPAGNO L, OGG GS, KING A, LECHNER F, SPINA CA, LITTLE S, HAVLIR DV, RICHMAN DD, GRUENER N, PAPE G, WATERS A, EASTERBROOK P, SALIO M, CERUNDOLO V, MCMICHAEL AJ, ROWLAND-JONES SL. Memory CD8<sup>++</sup> T cells vary in differentiation phenotype in different persistent virus infections (2002). *Nat Med*. 8(4):379-85..

ARAÚJO FG. Analysis of *Trypanosoma cruzi* antigens bound by specific antibodies and by antibodies to related trypanosomatids (1986). *Infect Immun.* 53(1):179-85.

ARAÚJO, F. F.; VITELLI-AVELAR, D. M. TEIXEIRA-CARVALHO, A. ANTAS, P. R. Z.; GOMES JAS; AVELAR, R. S.; ROCHA, M. O. C.; SANTOS, S. E.; PINHO, R. T.; CORREA-OLIVEIRA, R. ; MARTINS FILHO, O. A. 'Regulatory t cells phenotype in different clinical forms of Chagas' disease '(2011). *PLoS Neglected Tropical Diseases* v. 5, p. e992 1-8.

ARAÚJO, F.F.; CORRÊA-OLIVEIRA, R. ; ROCHA, M.O.C. ; CHAVES, A.T. ; FIUZA, J.A. ; FARES, R.C.G. ; FERREIRA, K.S. ; NUNES, M.C.P. ; KEESSEN, T.S. ; DAMASIO, M.P.S. ; TEIXEIRA-CARVALHO, A. ; GOMES, J.A.S. ; GOMES, JAS. Foxp3+CD25high CD4+ regulatory T cells from indeterminate patients with Chagas disease can suppress the effector cells and cytokines and reveal altered correlations with disease severity (2012). *Immunobiology* v. 217, p. 768-777.

ÁVILA HA, SIGMAN DS, COHEN LM, MILLIKAN RC, SIMPSON L. Polymerase chain reaction amplification of *Trypanosoma cruzi* kinetoplast minicircle DNA isolated from whole blood lysates: diagnosis of chronic Chagas disease (1991). *Mol Biochem Parasitol* 48: 211-222.

AVILA, H.; GOLCALVES, A. M.; NEHME, N. S.; MOREL, C. M.; SIMPSON, L. Schizodeme analysis of *Trypanosoma cruzi* stocks from South and Central America by analysis of PCR amplified minicircle variable region sequences (1990). *Molecular and Biochemical Parasitology*, v. 42, n.2, p.175-187.

BAHIA-OLIVEIRA L.M.G. et al. IFN $\gamma$  in human Chagas disease: protection or pathology (1998) *Braz. J. Med. Bio. Res.*

BAHIA-OLIVEIRA, L.M. et al Immunological and clinical evaluation of chagasic patients subjected to chemotherapy during the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection 14-30 years ago (2000). *J infect Dis* n.182, p. 634-638.

BELTRÃO HDE B, CERRONI MDE P, FREITAS DR, PINTO AY, VALENTE VDA C, VALENTE SA, COSTA EDE G, SOBEL J. Investigation of two outbreaks of suspected oral transmission of acute Chagas disease in the Amazon region, Para State, Brazil, in 2007 (2009). *Trop Doct.* 39(4):231-2.

BORGES-PEREIRA J, DE CASTRO JA, DA SILVA AG, ZAUZA PL, BULHÕES TP, GONÇALVES ME, DE ALMEIDA ES, DO AMPARO SALMITO M, PEREIRA LR, ALVES FILHO FI, CORREIA-LIMA FG, COURA JR. Seroprevalence of Chagas disease infection in the State of Piauí (2002). *Rev Soc Bras Med Trop.* 2006 Nov-Dec;39(6):530-9.

BRASIL, P. E.; CASTRO L.; HASSLOCHER-MORENO, A. M.; SANGENIS, L. H.; BRAGA, J. U. ELISA versus PCR for diagnosis of chronic Chagas disease: systematic review and metaanalysis (2010). *BMC Infectious Diseases*, v.10: 337.

BRENER, Z. *Trypanosoma cruzi*: Morfologia e ciclo evolutivo. In: Dias, J. C. P.; Coura, J. R. Clínica e terapêutica da doença de Chagas: Uma abordagem prática para o clínico geral (1997). *Fiocruz*, p. 25-31.

BRITTO, C.C. Usefulness of PCR-based assays to assess drug efficacy in Chagas disease chemotherapy: value and limitations (2009). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 104, p. 122-135.

BURGOS, J. M.; ALTICHEH, J.; BISIO, M.; DUFFY, T.; VALADARES, H. M. ET AL. Direct molecular profiling of minicircle signatures and lineages of *Trypanosoma cruzi* bloodstream populations causing congenital Chagas disease (2007). *International Journal for Parasitology*, v.37, n. 12, p.1319-1327.

BUTCHER EC, PICKER LJ. Lymphocyte homing and homeostasis (1996). *Science.* 5;272(5258):60-6.

CAETANO LC, DO PRADO JC JR, TOLDO MP, ABRAHÃO AA. Trypanosoma cruzi: do different sylvatic strains trigger distinct immune responses? (2010) *Exp Parasitol*. Feb;124(2):219-24.

CABALLERO ZC, SOUSA OE, MARQUES WP, SAEZ-ALQUEZAR A, UMEZAWA ES. Evaluation of serological tests to identify Trypanosoma cruzi infection in humans and determine cross-reactivity with Trypanosoma rangeli and Leishmania spp. (2007) *Clin Vaccine Immunol*. 14(8):1045-9.

CARRIAZO CS, SEMBAJ A, AGUERRI AM, REQUENA JM, ALONSO C, BUA J ET AL.. Polymerase chain reaction procedure to detect Trypanosoma cruzi in blood samples chronic chagasic patients (1998). *Diagn Microbiol Infect Dis* 30: 183-6.

CASTRO, A. M.; LUQUETTI, A. O; RASSI, A.; RASSI, G. G.; CHIARI, E. ET AL. Blood culture and polymerase chain reaction for the diagnosis of the chronic phase of human infection with Trypanosoma cruzi (2002). *Parasitology Research*, v.88, n.10, p.894-900.

CDC – Centers of disease and prevention disponível em: <http://www.cdc.gov/parasites/chagas/biology.html>.

CHAGAS, C. Nova tripanozomíase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do Schizotrypanum cruzi., agente etiológico de nova entidade mórbida do homem (1909). *Memórias Instituto Oswaldo Cruz*, v.1, p.11-80.

CHIARI E, BRENER Z. Contribuição ao diagnóstico parasitológico da doença de Chagas na sua fase crônica (1966). *Rev Inst Med Trop de São Paulo* 8: 134-138.

CHOWDHURY, D., LIEBERMAN, J. Death by a thousand cuts: granzyme pathways of programmed cell death (2008). *Annual Review of Immunology*, v.26, p.389-420.

COURA, J. R.; ABREU, L. L.; PEREIRA, J. B.; WILLCOX, H. P. Morbidade da doença de Chagas. IV Estudo longitudinal de dez anos em Pains e Iguatama, Minas Gerais, Brasil (1985). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 80, n. 1, p. 73- 80.

COURA, J. R. Chagas disease: what is known and what is needed- A background article (2007). *Memórias Instituto Oswaldo Cruz*, v.102, p.113-122.

COURA JR, JUNQUEIRA AC. Surveillance, health promotion and control of Chagas disease in the Amazon Region - Medical attention in the Brazilian Amazon Region: a proposal (2015). *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 110(7):825-30.

CUNA, W.R., CUNA, C.R. Characterization of T cell clones from chagasic patients: predominance of CD8+ surface phenotype in clones from patients with pathology (1995). *Memórias Instituto Oswaldo Cruz*, v.90, p.503-506.

CUNHA-NETO, E., DZAU, V.J., ALLEN, P.D., STAMATIOU, D., BENVENUTTI, L., HIGUCHI, M.L., KOYAMA, N.S., SILVA, J.S., KALIL, J., LIEW, C. Cardiac gene expression profiling provides evidence for cytokinopathy as a molecular mechanism in Chagas' disease cardiomyopathy (2005). *American Journal of Pathology*, v.167, p.305-313.

CUNHA-NETO, E., MOLITERNO, R., COELHO, V., GUILHERME, L., BOCCHI, E., HIGUCHI, MDE.L., STOLF, N., PILEGGI, F., STEINMAN, L., KALIL, J. Restricted heterogeneity of T cell receptor variable alpha chain transcripts in hearts of Chagas' disease cardiomyopathy patients (1994). *Parasite Immunology*, v.16, p.171-179.

CURA CI, LUCERO RH, BISIO M, OSHIRO E, FORMICHELLI LB, BURGOS JM, LEJONA S, BRUSÉS BL, HERNÁNDEZ DO, SEVERINI GV, VELAZQUEZ E, DUFFY T, ANCHART E, LATTES R, ALTCHER J, FREILIJ H, DIEZ M, NAGEL C, VIGLIANO C, FAVALORO L, FAVALORO RR, MERINO DE, SOSA-ESTANI S, SCHIJMAN AG. Trypanosoma cruzi discrete typing units in Chagas disease patients from endemic and non-endemic regions of Argentina (2012). *Parasitology*. 139(4):516-21.

DAROCHA, W. D.; BARTHOLOMEU, D. C.; MACEDO, C. D.S.; FÁTIMA H. M.; EDÉCIO, C.N.; JOHN, E. D.; SANTUZA, M. R. T. Characterization of cDNA clones encoding ribonucleoprotein antigens expressed in *Trypanosoma cruzi* amastigotes (2002). *Parasitology Research*, v. 88, p. 292-300.

D'AVILA, D. A.; MACEDO, A. M.; VALADARES, H. M.; GONTIJO E. D.; CASTRO A. M. ET AL. Probing population dynamics of *Trypanosoma cruzi* during progression of the chronic phase in chagasic patients (2009). *Journal of Clinical Microbiology*, v.47, n.6, p.1718-1725.

DE ARAÚJO, F.F., CORRÊA-OLIVEIRA, R., ROCHA, M.O.C., CHAVES, A.T., FIUZA, JA., FARES, R.C.G., FERREIRA, K.S., NUNES, M.C.P., KEESEN, T.S., DAMASIO, M.P.S., TEIXEIRA-CARVALHO, A.GOMES, J.A.S. Foxp3+CD25high CD4+ regulatory T cells from indeterminate patients with Chagas disease can suppress the effector cells and cytokines and reveal altered correlations with disease severity (2012). *Immunobiology*, v.8, p.768-777.

DIAS JCP. Doença de Chagas em Bambuí, Minas Gerais, Brasil. Estudo Clínicoepidemiológico a Partir da Fase Aguda, entre 1940 e 1982, Tese de Doutorado, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1982.

DIAS. J.C.P.; et al. *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas (2000). *Epidemiologia*. Rio de Janeiro. 2ed. Guanabara Koogan. Cap. 5, pag. 48-74..

DIAZ, C.; NUSSENZWEIG, V.; GONZALEZ, A. An improved polymerase chain reaction assay to detect *Trypanosoma cruzi* in blood (1992). *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v.46, n.5, p.616-623.

DÍAZ-BELLO Z, THOMAS MC, LÓPEZ MC, ZAVALA-JASPE R, NOYA O, DE NOYA BA, ABATE T. *Trypanosoma cruzi* genotyping supports a common source of infection in a school-related oral outbreak of acute Chagas disease in Venezuela (2014). *Epidemiol Infect.* 142(1):156-62.

DIEZ, M.; FAVALORO, L.; BERLOTTI, A.; BURGOS, J. M.; VIGLIANO, C. ET AL. Usefulness of PCR strategies for early diagnosis of Chagas' disease reactivation and treatment follow-up in heart transplantation (2007). *American Journal of Transplantation*, v.7, n.6, p.1633-1640.

DOMINGUEZ MR, ERSCHING J, LEMOS R, MACHADO A, RODRIGUES O, DE VASCONCELOS MM, RONNIE J. Re-circulation of lymphocytes mediated by shingosine-1-phosphate receptor-1 contributes to resistance against experimental infection with the protozoan parasite (2012). *Vaccine*, v.30 2882-2891.

DONGGOU HE, LIZHI WU, HEE KYUNG KIM, HUI LI, CRAIG A. ELMETS AND HUI XU CD8<sup>+</sup> IL-17-Producing T Cells Are Important in Effector Functions for the Elicitation of Contact Hypersensitivity Responses (2006). *The Journal of Immunology* vol. 177 no. 10 6852-6858.

DUTRA WO, MARTINS-FILHO O, CANÇADO JR, DIAS JCP, BRENER Z, FREEMAN JR GL, COLLEY DG, GAZZINELLI G, PARRA JC. Activated T and B lymphocytes in peripheral blood of patients with Chagas disease (1994). *International Immunology*, v.6, p. 499-506.

DUTRA, W.O., MARTINS-FILHO, O.A., CANÇADO, J.R., PINTO-DIAS, J.C., BRENER, Z., GAZZINELLI, G., CARVALHO, J.F., COLLEY, D.G. Chagasic patients lack CD28 expression on many of their circulating T lymphocytes (1996). *Scandinavian Journal of Immunology*, v.43, p.88-93.

DUTRA, W.O., COLLEY, D.G., PINTO-DIAS, J.C., GAZZINELLI, G., BRENER, Z., PEREIRA, M.E.S., COFFMAN, R.L., CORREA-OLIVEIRA, R., CARVALHO-PARRA, J.F. Self and nonself stimulatory molecules induce preferential expansion of CD5+ B cells or activated T cells of chagasic patients, respectively (2000). *Scandinavian Journal of Immunology*, v.51, p.91-97.

DUTRA, W.O., GOLLOB, K.J. Current concepts in immunoregulation and pathology of human Chagas disease (2008). *Current Opinion in Infectious Diseases*, v.21, p.287-92.

DUTRA WO, MENEZES CA, VILLANI FN, DA COSTA GC, DA SILVEIRA AB, REIS DD, GOLLOB KJ. Cellular and genetic mechanisms involved in the generation of protective and pathogenic immune responses in human Chagas disease (2009). *Mem Inst Oswaldo Cruz.* ; 104 Suppl 1:208-18.



DUTTON RW, BRADLEY LM, SWAIN SL. T cell memory (1998). *Annu Rev Immunol.* 16:201-23.

FIUZA JA, FUJIWARA RT, GOMES JA, ROCHA MO, CHAVES AT, DE ARAÚJO FF, FARES RC, TEIXEIRA-CARVALHO A, MARTINS-FILHO OA, CANÇADO GG, CORREA-OLIVEIRA R. Profile of central and effector memory T cells in the progression of chronic human chagas disease (2009). *PLoS Negl Trop Dis.* 9;3(9):e512.

FREITAS, J. M.; LAGES-SILVA, E.; CREMA, S. D. PENA; MACEDO, A. M. Real time PCR strategy for the identification of major lineages of *Trypanosoma cruzi* directly in chronically infected human tissues (2005). *International Journal for Parasitology*, v. 35, n.4, p.411417.

FREITAS, J.M.; AUGUSTO-PINTO, L.; PIMENTA, J.R.; BASTOS-RODRIGUES, L., GONCALVES, V.F., TEIXEIRA, S.M.; CHIARI, E.; JUNQUEIRA, A.C.; FERNANDES, O.; MACEDO, A.M.; MACHADO CR, PENA SD. Ancestral genomes, sex, and the population structure of *Trypanosoma cruzi* (2006). *PLOS Pathogens*, v. 2, n.3, p. e24.

FONSECA SG, REIS MM, COELHO V, NOGUEIRA LG, MONTEIRO SM, MAIRENA EC, BACAL F, BOCCHI E, GUILHERME L, ZHENG XX, LIEW FY, HIGUCHI ML, KALIL J, CUNHA-NETO E. Locally produced survival cytokines IL-15 and IL-7 may be associated to the predominance of CD8+ T cells at heart lesions of human chronic Chagas disease cardiomyopathy (2007). *Scand J Immunol.* Aug-Sep;66(2-3):362-71.

FREITAS, VLT; Avaliação dos níveis de parasitemia por PCR em tempo real em pacientes com doença de Chagas crônica e pacientes com co-infecção HIV-*Trypanosoma cruzi*, com e sem reativação da doença (2009). Tese de doutorado. Universidade de São Paulo.

GOMES, Y. M. Diagnóstico Etiológico. In: Malta J. Doença de Chagas (1996). *Editora Savier*, p. 119-132.

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

GOMES, J.A., BAHIA-OLIVEIRA, L.M., ROCHA, M.O., MARTINS-FILHO, O.A., GAZZINELLI, G., CORRÊAOLIVEIRA, R. Evidence that development of severe cardiomyopathy is human Chagas' disease is due to a Th1-specific immune response (2003). *Infection and Immunity*, v.71, p.1185-1193.

GONZALEZ, A.; PREDIGER, E.; HUECAS, M. E.; NOGUEIRA, N.; LIZARDI, P. M. Minichromosomal repetitive DNA in *Trypanosoma cruzi*: its use in a high-sensitivity parasite detection assay (1984). *Proceedings of The National Academy of Sciences*, v.81, n.11, p.3356-3360.

GUEDES PMM, GUTIERREZ FRS, MAIA FL, MILANEZI CM, SILVA GK, PAVANELLI WR, SILVA JS. IL17 produced during *Trypanosoma cruzi* infection plays a central role in regulating parasite-induced myocarditis (2010). *PLoS Negl Trop Dis* 4(2): e604.

GUEDES, P.M.M., GUTOERREZ, R.M.S., SILVA, G.K., DELLALIBERA-JOVILIANO, R., RODRIGUES, G.J., BENDHACK, L.M., RASSI, A., SCHMIDT, A.MACIEL, B.C., NETO, J.A.M., SILVA, J.S. Deficient regulatory T cell activity and low frequency of IL-17-producing T cells correlate with the extent of cardiomyopathy in human Chagas' disease (2012). *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v.6, e4.

HEDRICH CM, BREM JH. Cell type-specific regulation of IL-10 expression in inflammation and disease (2010). *Immunol Res.* 47(1-3):185-206.

HERRERA, C.; BARGUES, M. D.; FAJARDO, A.; MONTILLA, M; TRIANA, O. et al. Identifying four *Trypanosoma cruzi* I isolate haplotypes from different geographic regions in Colombia (2007). *Infection, Genetics and Evolution*, v. 7, n.4, p. 535-539.

HERWALDT, B. L.; GRIJALVA, M. J.; NEWSOME, A. L.; MCGHEE, C. R.; POWELL, M. R. ET AL. Use of polymerase chain reaction to diagnose the fifth reported US case of autochthonous transmission of *Trypanosoma cruzi*, in Tennessee, 1998 (2000). *Journal of Infectious Diseases*, v.181, n.1, p. 395-399.

HIGUCHI, M. L.; GUTIERREZ, P. S.; AIELLO, V. D.; PALOMINO, S.; BOCCHI, E.; KALIL, J.; BELLOTI, G.; PILEGGI, F. Immunohistochemical characterization of infiltrating cells in human chronic Chagas' disease myocarditis: comparison with myocardial rejection process (1993a). *Virchows Arch. Pathol. Anat.*, v. 423, p. 157-160.

HIGUCHI, M. L.; De BRITO, T.; REIS, M. M.; BARBOSA, A.; BELLOTI, G.; PEREIRABARETO, A.C.; MEGGI, F. Correlation between *Trypanosoma cruzi* parasitism and myocardial inflammatory infiltrate in human chronic chagasic myocarditis: light microscopy and immunohistochemical findings (1993b). *Cardiovasc. Pathol.*, v.2, p. 101-105.

KAWASHITA, S.Y.; SANSON, G.F.O.; FERNANDES, O.; ZINGALES, B.; BRIONES, M.R.S.; Maximum-likelihood divergence data estimates based on rRNA gene sequences suggest two scenarios of *Trypanosoma cruzi* intraspecific evolution (2001). *Molecular Biology and Evolution*, v.18, p.2250-2259.

HÖHLER, T.; KRUGER, A.; GERKEN, G.; SCHNEIDER, P.M.; MEYER ZUM BÜSCHENEFELDE, K.H.; RITTNER, C. Tumor necrosis factor alpha promoter polymorphism at position -238 is associated with chronic active hepatitis C infection (1998). *J. Med. Virol.*, New York, v. 54, n. 3, p. 173-177.

HUBER M<sup>1</sup>, HEINK S, PAGENSTECHE A, REINHARD K, RITTER J, VISEKRUNA A, GURALNIK A, BOLLIG N, JELTSCH K, HEINEMANN C, WITTMANN E, BUCH T, PRAZERES DA COSTA O, BRÜSTLE A, BRENNER D, MAK TW, MITTRÜCKER HW, TACKENBERG B, KAMRADT T, LOHOFF M IL-17A secretion by CD8+ T cells supports Th17-mediated autoimmune encephalomyelitis (2013). *J Clin Invest.* 123(1):247-60.

JUNQUEIRA AC, DEGRAVE W, BRANDÃO A. Minicircle organization and diversity in *Trypanosoma cruzi* populations (2005). *Trends Parasitol.* 21(6):270-2.

K MARTINS; ANDRADE CM; BARBOSA-SILVA AN; NASCIMENTO GB; CHIARI E; GALVÃO LMC; CAMARA ACJ. *Trypanosoma cruzi* III causing indeterminate form of Chagas disease in a semi-arid region of Brazil (2015). *International Journal of infectious disease* 39 (68-75).

KUMAR S, TARLETON RL. The relative contribution of antibody production and CD8++ T cell function to immune control of *Trypanosoma cruzi* (1998). *Parasite Immunol.* May;20(5):207-16;.

LISBOA CV, PINHO AP, MONTEIRO RV, JANSEN AM. *Trypanosoma cruzi* (kinetoplastida Trypanosomatidae): biological heterogeneity in the isolates derived from wild hosts (2007). *Exp Parasitol.* 116(2):150-5.

LUQUETTI, A. O.; RASSI, A. Diagnóstico laboratorial da Infecção pelo *Trypanosoma cruzi*, In: Brener Z, Andrade ZA, Barral-Neto M. *Trypanosoma cruzi* e a Doença de Chagas (2000). Editora Guanabara Koogan, 2ª edição, p. 344-378.

MACEDO, A. M. & PENA, S. D. Genetic Variability of *Trypanosoma cruzi*: Implications for the pathogenesis of Chagas disease (1998). *Parasitology Today*, v. 14, n. 3, p. 119- 124.

MACEDO, A. M. & SEGATTO, M. Implications of *Trypanosoma cruzi* intraspecific diversity in the pathogenesis of Chagas disease. In: Tibayrenc, M & Telleria, J. American Trypanosomiasis Chagas disease one hundred years of research (2010). Elsevier, v.1, p. 498-522.

MACHADO FS, MARTINS GA, ALIBERTI JC, MESTRINER FL, CUNHA FQ, SILVA JS. Trypanosoma cruzi-infected cardiomyocytes produce chemokines and cytokines that trigger potent nitric oxide-dependent trypanocidal activity (2000). *Circulation*. 12;102(24):3003-8.

MAGALHÃES LMD, VILLANI FNA, NUNES MCP, GOLLOB KJ, ROCHA MOC, DUTRA WO. High Interleukin 17 expression is correlated with better cardiac function in human Chagas disease (2013). *The Journal of Infectious Disease* 207: 661-5.

MAGALHÃES LM, VIANA A, CHIARI E, GALVÃO LM, GOLLOB KJ, DUTRA WO. Differential Activation of Human Monocytes and Lymphocytes by Distinct Strains of Trypanosoma cruzi (2015). *PLoS Negl Trop Dis*. 6;9(7):e0003816.

MARCILI A, VALENTE VC, VALENTE SA, JUNQUEIRA AC, DA SILVA FM, PINTO AY, NAIFF RD, CAMPANER M, COURA JR, CAMARGO EP, MILES MA, TEIXEIRA MM. Trypanosoma cruzi in Brazilian Amazonia: Lineages TCI and TCIIa in wild primates, Rhodnius spp. and in humans with Chagas disease associated with oral transmission (2009). *Int J Parasitol*. 39(5):615-23.

MARCON GE, ANDRADE PD, DE ALBUQUERQUE DM, WANDERLEY JDA S, DE ALMEIDA EA, GUARIENTO ME, COSTA SC. Use of a nested polymerase chain reaction (N-PCR) to detect Trypanosoma cruzi in blood samples from chronic chagasic patients and patients with doubtful serologies (2002). *Diagn Microbiol Infect Dis*. 43(1):39-43.

MARINHO, CRF; Correlação entre a carga parasitária na fase aguda e a intensidade da patologia, parasitismo e ativação do sistema imune na fase crônica da doença de Chagas experimental (1998). Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo.

MARTIN, D., TARLETON, R. Generation, specificity and function of CD8++ T cells in Trypanosoma cruzi infection (2004). *Immunological reviews*, v. 201, p. 304-317.

MEIRA, W. S. F.; GALVÃO, L. M. C.; GONTIJO, E. D.; MACHADO-COELHO, G. L. L.; NORRIS, K. A.; CHIARI, E. Trypanosoma cruzi recombinant complement regulatory protein: a novel antigen for use in an enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of Chagas' disease (2002). *Journal of Clinical Microbiology*, v. 40, n. 100095, p. 3735- 3740.

MENEZES, C.A., ROCHA, M.O., SOUZA, P.E., CHAVES, A.C. , GOLLOB, K.J., DUTRA,W.O. Phenotypic and functional characteristics of CD28+ and CD28- cells from chagasic patients: distinct repertoire and cytokine expression (2004). *Clinical Experimental Immunology*, v.137, p.129-138.

METKAR, S.S., MENAA, C., PARDO , J., WANG, B., WALLICH, R., FREUDENBERG, M., KIM, .S., RAJA, S.M., SHI, L., SIMON, M.M., FROELICH, C.J. Human and mouse granzyme A induce a proinflammatory cytoline response (2008). *Immunity*, v. 29, p. 720-733.

MICHIE CA, MCLEAN A, ALCOCK C, BEVERLEY PC. Lifespan of human lymphocyte subsets defined by CD45 isoforms (1992). *Nature*. 19;360(6401):264-5.

MILES, M. A.; TOYE, P. J.; OSWALD, S. C; GODFREY, D. G. The identification by isoenzyme patterns of two distinct strain-groups of Trypanosoma cruzi, circulating independently in a rural area of Brazil (1977). *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 71, n.3, p. 217-225.

MILES, M. A.; SOUZA, A.; POVOA, M.; SHAW, J. J.; LAINSON, R. et al. Isozymic heterogeneity of Trypanosoma cruzi in the first autochthonous patients with Chagas' disease in Amazonian Brazil (1978). *Nature*, v. 272, n. 5656, p. 819-821.

MILES, M. A.; POVOA, M. M.; DE SOUZA, A. A; LAINSON, R.; SHAW, J. J. et al. Chagas's disease in the Amazon Basin. The distribution of Trypanosoma cruzi zymodemes 1 and 3 in Para State, north

Brazil (1981). *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 75, n.5, p. 667-674.

MILES, A. M.; LLEWELLYN, M. S.; LEWIS, M. D.; YEO, M.; BALEELA, R.; 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 (2009). *Parasitology*, v.136, p.1509–1528.

MINISTÉRIO DA SAÚDE Disponível em: < <http://portalsaude.saude.gov.br/>> Acesso em 03/02/2016.

MINOPRIO, P.M., EISEN, H., FORNI, L., D'IMPÉRIO LIMA, M.R., JOSKOWICZ, M., COUTINHO, A. Polyclonal lymphocyte responses to murine *Trypanosoma cruzi* infection. Quantitation of both T and B-cell responses (1986). *Scandinavian Journal of Immunology*, v.24, p.661-668.

MIYAZAKI, Y., HAMANO, S., WANG, S., SHIMANO, Y., IWAKURA, Y., YOSHIDA, H. IL-17 is necessary for host protection against acute-phase *Trypanosoma cruzi* infection (2010). *Journal of Immunology*, v.185, p.1150-1157.

MONCAYO, A. Chagas disease: current epidemiological trends after the interruption of vectorial and transfusional transmission in the Southern Cone countries (2003). *Mem Inst Oswaldo Cruz*. Jul;98(5):577-91.

MONTEIRO WM, MAGALHÃES LK, SANTANA FILHO FS, BORBOREMA M, SILVEIRA H, BARBOSA Md. *Trypanosoma cruzi* TcIII/Z3 genotype as agent of an outbreak of Chagas disease in the Brazilian Western Amazonia (2010). *Trop Med Int Health*. 15(9):1049-51.

MONTEIRO WM, MARGIOTO TESTON AP, GRUENDLING AP, DOS REIS D, GOMES ML, DE ARAÚJO SM, BAHIA MT, MAGALHÃES LK, DE OLIVEIRA GUERRA JA, SILVEIRA H, TOLEDO MJ, VALE BARBOSA MD. *Trypanosoma cruzi* I and IV stocks from Brazilian Amazon are divergent in terms of biological and medical properties in mice (2013). *PLoS Negl Trop Dis*. 7(2):e2069.

MOORE, K.W., O'GARRA, A., DE WAAL MALEFYT, R., VIEIRA, P., MOSMANN, T.R. Interleukin-10 (1993). *Annu. Rev. Immunol.* 11, 165-190.

MOREL, C.; CHIARI, E.; CAMARGO, E. P.; MATTEI, D. M.; ROMANHA, A. J. et al. Strains and clones of *Trypanosoma cruzi* can be characterized by pattern of restriction endonuclease products of kinetoplast DNA minicircles (1980). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 77, n.11, p. 6810-6814.

NÓBREGA AA, GARCIA MH, TATTO E, OBARA MT, COSTA E, SOBEL J, ARAUJO WN. Oral transmission of Chagas disease by consumption of açai palm fruit, Brazil (2009). *Emerg Infect Dis*. Apr;15(4):653-5.

PADILLA, A.M., BUSTAMANTE, J.M., TARLETON, R.L. CD8<sup>++</sup> T cells in *Trypanosoma cruzi* infection (2008). *Current Opinion in Immunology*, v.21, p.385-390.

PEREIRA KS, SCHMIDT FL, GUARALDO AM, FRANCO RM, DIAS VL, PASSOS LA. Chagas' disease as a foodborne illness (2009). *J Food Prot*. Feb;72(2):441-6.

PINTO AYN, VALENTE AS, VALENTE VC, FERREIRA JÚNIOR AG, COURA JR. Fase aguda da doença de Chagas na Amazônia brasileira. Estudo de 233 casos do Pará, Amapá e Maranhão observados entre 1988 e 2005 (2008). *Rev Soc Bras Med Trop* 41(6): 602-614.

PINTO AY, FERREIRA AG JR, VALENTE VDA C, HARADA GS, VALENTE SA. Urban outbreak of acute Chagas disease in Amazon region of Brazil: four-year follow-up after treatment with benznidazole (2009). *Rev Panam Salud Publica*. 25(1):77-83.

PRATA, A. Clinical and epidemiological aspects of Chagas' disease (2001). *The Lancet Infectious disease*. V.1 N.2, P.92-100.

RAMÍREZ JD, GUHL F, RENDÓN LM, ROSAS D, MARIN-NETO JA, MORILLO CA. Chagas cardiomyopathy manifestations and Trypanosoma cruzi genotypes circulating in chronic chagasic patients (2010). *PLoS Negl Trop Dis* 4, e899 .

RAMÍREZ JD, MONTILLA M, CUCUNUBÁ ZM, FLORÉZ AC, ZAMBRANO P, GUHL F. Molecular epidemiology of human oral Chagas disease outbreaks in Colombia (2013). *PLoS Negl Trop Dis*. 7(2):e2041.

RAMÍREZ JC, CURA CI, DA CRUZ MOREIRA O, LAGES-SILVA E, JUIZ N, VELÁZQUEZ E, RAMÍREZ JD, ALBERTI A, PAVIA P, FLORES-CHÁVEZ MD, MUÑOZ-CALDERÓN A, PÉREZ-MORALES D, SANTALLA J, MARCOS DA MATTA GUEDES P, PENEAU J, MARCET P, PADILLA C, CRUZ-ROBLES D, VALENCIA E, CRISANTE GE, GREIF G, ZULANTAY I, COSTALES JA, ALVAREZ-MARTÍNEZ M, MARTÍNEZ NE, VILLARROEL R, VILLARROEL S, SÁNCHEZ Z, BISIO M, PARRADO R, MARIA DA CUNHA GALVÃO L, JÁCOME DA CÂMARA AC, ESPINOZA B, ALARCÓN DE NOYA B, PUERTA C, RIASTE A, DIOSQUE P, SOSA-ESTANI S, GUHL F, RIBEIRO I, AZNAR C, BRITTO C, YADÓN ZE, SCHIJMAN AG. Analytical Validation of Quantitative Real-Time PCR Methods for Quantification of Trypanosoma cruzi DNA in Blood Samples from Chagas Disease Patients (2015). *J Mol Diagn*. 17(5):605-15.

RASSI JR. A., RASSI, A.; MARIN-NETO J.A.; Chagas disease (2010). *Lancet*. V.375, p.1388-1402.

RIBEIRO AL, ROCHA MO. Indeterminate form of Chagas disease: considerations about diagnosis and prognosis (1998). *Rev Soc Bras Med Trop*. 31(3):301-14.

REIS, D.D., JONES, E.M., TOSTES, S., GAZZINELLI, G., COLLEY, D.G., MCCURLEY, T. Characterization of inflammatory infiltrates in chronic chagasic myocardial lesions: presence of TNF- $\alpha$  cells and dominance of granzyme A+, CD8++ lymphocytes (1993). *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v.43, p.637-644.

REY, L. Parasitologia (2001) 3.ed. Rio de Janeiro: *Guanabara Koogan*, pag. 856.

ROMERO V, ANDRADE F. Non-apoptotic functions of granzymes (2008). *Tissue Antigens*. 71(5):409-16.

ROTTENBERG M; BAKHIET M; OLSSON T; KRISTENSSON K; MAK T; WIGZELL H; ORN A; Differential susceptibilities of mice genomically deleted of CD4+ and CD8+ to infectious with Trypanosoma cruzi or Trypanosoma brucei (1993). *Infect. Immun*. 61: 51129-33.

ROTTENBERG, M.; RIASTE, A.; SPORRONG, L.; ALTCHER, J.; PETRAY, A.; RUIZ, M.; WIGZELL, H.; ORN, A. Outcome of infection with different strains of Trypanosoma cruzi in mice lacking CD4+ and/or CD8+ (1995). *Immunol. Lett.*, v.45, p. 53-60.

SATHLER-AVELAR, R., LEMOS, E.M., REIS, D.D., MEDRANO-MERCADO, N., ARAÚJO-JORGE, T.C., ANTAS, P.R., CORRÊA-OLIVEIRA, R., TEIXEIRA-CARVALHO, A., ELÓI-SANTOS, S.M., FAVATO, D., MARTINS-FILHO, O.A. Phenotypic features of peripheral blood leucocytes during early stages of human infection with Trypanosoma cruzi (2003). *Scandinavian Journal of Immunology*, v.58, p.655-663.

SCHIJMAN, A. G.; BISIO, M.; ORELLANA, L.; SUED, M.; DUFFY, T. et al. International study to evaluate PCR methods for detection of Trypanosoma cruzi DNA in blood samples from Chagas disease patients (2011). *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v.5, n. 1, p. e931.

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

SILVA JL, REZENDE-OLIVEIRA K, DA SILVA MV, GÓMEZ-HERNÁNDEZ C, PEGHINI BC, SILVA NM, MINEO JR, RODRIGUES JÚNIOR V. IL-17-expressing CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T lymphocytes in human toxoplasmosis (2014). *Mediators Inflamm.*;2014:573825.

SILVEIRA AC. New challenges and the future of control (2011). *Rev Soc Bras Med Trop.* 4 Suppl 2:122-4.

SILVÉRIO, J.C., PEREIRA, I.S., CIPITELLI, M.C., VINAGRE, N.F., RODRIGUES, M.M., GAZZINELLI, R.T., LANNES-VIEIRA, J. CD8<sup>++</sup> T-cells expressing interferon gamma or perforin play antagonistic roles in heart injury in experimental T. cruzi- elicited cardiomyopathy (2012). *PLoS Pathogens*, v.8, e1002645.

SIMPSON, L. The mitochondrial genome of kinetoplastid protozoa: genomic organization, transcription, replication, and evolution (1987). *Annual Review of Microbiology* v.41, p.363-382.

SOGHOIAN ,D. Z, JESSEN, H, FLANDERS, M, SIERRA-DAVIDSON, K, CUTLER, S, PERTEL, T, RANASINGHE S, LINDQVIST, M, DAVIS, I, LANE, K, RYCHERT, J, ROSENBERG, E.S, PIECHOCKA-TROCHA, A, BRASS A.L, BRENCHLEY, J.M, WALKER, B.D, STREECK H. HIV-specific cytolytic CD4<sup>+</sup> T cell responses during acute HIV infection predict disease outcome (2012). *Science Translational Medicine*, v.29.

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

SOUZA W, ATTÍAS M, RODRIGUES JC. Particularities of mitochondrial structure in parasitic protists (Apicomplexa and Kinetoplastida) (2009). *Int J Biochem Cell Biol.* Oct;41(10):2069-80.

SOUZA, DSM; MONTEIRO, MRC. Manual de recomendações para diagnóstico, tratamento e seguimento ambulatorial de portadores da Doença de Chagas (2013). Universidade Estadual do Pará. Secretaria de Estado do saúde do Pará. Belém.

SOUZA-LIMA, RC; BARBOSA, MG; COURA, JR; ARCANJO, ARL; NASCIMENTO, ASN; FERREIRA, JMBBF; MAGALHÃES, LK; ALBUQUERQUE, BC; ARAÚJO, GAN; GUERRA, JAO. Outbreak of acute Chagas disease associated with oral transmission in the Rio Negro region, Brazilian Amazon (2013). *Rev Soc Bras Med Trop* 46(4):510-514.

SOUTO, R. P.; FERNANDES, O.; MACEDO, A. M.; CAMPBELL, D. A.; ZINGALES, B. DNA markers define two major phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi* (1996). *Molecular and Biochemical Parasitology*, v. 83, n.2, p.141-152.

STURM NR, DEGRAVE W, MOREL C, SIMPSON L. Sensitive detection and schizodeme classification of *Trypanosoma cruzi* cells by amplification of kinetoplast minicircle DNA sequences: use in diagnosis of Chagas' disease (1989). *Mol Biochem Parasitol.* 33(3): 205-214.

TAJIMA M, WAKITA D, SATOH T, KITAMURA H, NISHIMURA T. IL-17/IFN- $\gamma$  double producing CD8<sup>+</sup> T (Tc17/IFN- $\gamma$ ) cells: a novel cytotoxic T-cell subset converted from Tc17 cells by IL-12 (2011). *Int Immunol* ;23(12):751-9.

TARLETON RL, KOLLER BH, LATOUR A, POSTAN M. Susceptibility of beta 2-microglobulin-deficient mice to *Trypanosoma cruzi* infection (1992). *Nature.* 26;356(6367):338-40.

TEIXEIRA, M. M.; DASILVA, F. M., MARCILI, A.; UMEZAWA, E. S.; SHIKANAIYASUDA, M. A.; CUNHA-NETO E, KALIL, J.; STOLF, N. E.; STOLF, A. M.. *Trypanosoma cruzi* lineage I in endomyocardial biopsy from a north-eastern Brazilian patient at end-stage chronic chagasic cardiomyopathy (2006). *Trop. Med. Int. Health*, v. 11, n. 3, p. 294-298.

TEIXEIRA, A. R. L.; NASCIMENTO, R. J.; STURN, N. Evolution and pathology in Chagas disease – A review (2006). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 10, n. 5, p. 463-491.

TIBAYRENC M, WARD P, MOYA A, AYALA FJ. Natural populations of *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease, have a complex multiclonal structure (1986). *Proc Nat Acad Sci USA* 83: 115-119.

TIBAYRENC, M. & AYALA, F. J. Towards a population genetics of microorganisms: The clonal theory of parasitic protozoa (1991). *Parasitology Today*, v. 7, n. 9, p. 228-232.

TIBAYRENC M. Genetic epidemiology of parasitic protozoa and other infectious agents: the need for an integrated approach (1998). *Int J Parasitol* 25: 85-104.

TRAPANI JA. Granzymes: a family of lymphocyte granule serine proteases (2001). *Genome Biol.* 2(12):REVIEWS3014.

TZELEPIS F, DE ALENCAR BC, PENIDO ML, GAZZINELLI RT, PERSECHINI PM, RODRIGUES MM. Distinct kinetics of effector CD8<sup>++</sup> cytotoxic T cells after infection with *Trypanosoma cruzi* in naive or vaccinated mice (2006). *Infect Immun.* 74(4):2477-81.

VALADARES, H. M.; PIMENTA, J. R.; DE FREITAS, J. M.; DUFFY, T.; BARTHOLOMEU, D. C.; DE PAULA, O. R.; CHIARI, E.; MOREIRA, M. D. A. C.; FILHO, G. B.; SCHIJMAN, A. G.; FRANCO, G. R.; MACHADO, C. R.; PENA, S. D.; MACEDO, A. M. Genetic profiling of *Trypanosoma cruzi* directly in infected tissues using nested PCR of polymorphic microsatellites (2008). *International Journal for Parasitology*, v. 38, n.7, p. 839-55.

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

VIEIRA, D. Técnicas de PCR: Aplicações e padronizações de reações (2005). *Apostila do Laboratório de Biologia Molecular – IPEN*. 1-10. Disponível em: <http://etallcorp.xpg.uol.com.br/aula3.pdf>

VIEIRA PM, FRANCISCO AF, MACHADO EM, NOGUEIRA NC, FONSECA KDA S, REIS AB, TEIXEIRA-CARVALHO A, MARTINS-FILHO OA, TAFURI WL, CARNEIRO CM. Different infective forms trigger distinct immune response in experimental Chagas disease (2012). *PLoS One.* 7(3):e32912.

VILLANI, F.N.A., ROCHA, M.O., NUNES, M.C.P., ANTONELLI, L.R.V., MAGALHÃES, L.M.D., SANTOS, J.S.C., GOLLOB, K.J., DUTRA, W.O. *Trypanosoma cruzi*-Induced Activation of Functionally Distinct and CD4<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T Cells in Individuals with Polar Forms of Chagas' Disease (2010). *Infection and Immunity*, v. 78, p.4421- 4430.

VILLANI, F.N.A. Imunorregulação na doença de Chagas humana: estudo das células TCD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> e mecanismos de controle de expressão de citocinas (2010). Tese de Doutorado, Universidade Federal de Minas Gerais.

VITELLI-AVELAR D.M. et al. Chagasic patients with indeterminate clinical form of disease have a high frequencies of circulation CD3<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> Natural Killer T cells and CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> regulatory T lymphocytes (2005). *Scandinavian Journal of immunology.* V.62, p. 297-308.

VIRREIRA, M.; TORRICO, F.; TRUYENS, C.; VEGA, A. C.; SOLANO, M. et al. Comparison of polymerase chain reaction methods for reliable and easy detection of congenital *Trypanosoma cruzi* infection (2003). *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 68, n.5, p.574-582.

WESTENBERGER, S. J.; BARNABÉ, C.; CAMPBELL, D. A.; STURM; N. R. Two hybridization events define the population structure of *Trypanosoma cruzi* (2005). *Genetics*, v. 171, p. 527-543.

WHERRY EJ, TEICHGRÄBER V, BECKER TC, MASOPUST D, KAECH SM, ANTIA R, VON ANDRIAN UH, AHMED R. Lineage relationship and protective immunity of memory CD8<sup>+</sup> T cell subsets (2003). *Nat Immunol.* 4(3):225-34.

WHO, World Health Organization. Sixty-third World Health Assembly. (2010). Disponível em [http://apps.who.int/gb/ebwha/pdf\\_files/WHA63-REC1/WHA63\\_REC1-en.pdf](http://apps.who.int/gb/ebwha/pdf_files/WHA63-REC1/WHA63_REC1-en.pdf) Acesso em: 04/02/2016.

WHO. World Health Organization. Keywords: chagas disease (2014). Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>. Acesso em: 20/01/2016.

XAVIER SC, ROQUE AL, BILAC D, DE ARAÚJO VA, DA COSTA NETO SF, LOROSA ES, DA SILVA LF, JANSEN AM Distantiae transmission of *Trypanosoma cruzi*: a new epidemiological feature of acute Chagas disease in Brazil (2014).. *PLoS Negl Trop Dis*. 22;8(5):e2878.

YEO, M.; ACOSTA, N.; LLEWELLYN, M.; SANCHEZ, H.; ADAMSON, S. et al. Origins of Chagas disease, *Didelphis* species are natural hosts of *Trypanosoma cruzi* I and armadillos hosts of *Trypanosoma cruzi* II, including hybrids (2005). *International Journal for Parasitology*, v.35, n.2, p.225-233.

YSSEL, H., SPITS, H. Generation and maintenance of cloned human T cell lines (2002). *In Current Protocols in Immunology*, John Wiley e Sons, New York.

ZINGALES, B.; ANDRADE, S. G.; BRIONES, M. R.; CAMPBELL, D. A.; CHIARI, E. et al. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI (2009). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.104, n.7, p.1051-1054.

ZINGALES, B. *Trypanosoma cruzi*: one parasite, two parasites or several parasites of chagas disease? (2011). *Revista da Biologia*, v. 6, p. 44-48.

ZINGALES, B.; MILES, M. A.; CAMPBELL, D. A.; TIBAYRENC, M.; MACEDO, A. M. et al. The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: rationale, epidemiological relevance and research applications(2012). *Infection, Genetics and Evolution*, v. 12, n. 2, p. 240-253.