

**DARLENE APARECIDA PENA**

**Caracterização biológica e molecular de cepas de *Trypanosoma cruzi*  
isoladas durante o surto de doença de chagas agudo em Santa Catarina**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Santa Catarina, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, para obtenção do título de mestre em Biotecnologia.

Orientadores: Prof. Mário Steindel  
Prof. André Luiz Barbosa Báfica

FLORIANÓPOLIS  
SANTA CATARINA - BRASIL  
2010

Catálogo na fonte pela Biblioteca Universitária da  
Universidade Federal de Santa Catarina

P397c Pena, Darlene Aparecida

Caracterização biológica e molecular de cepas de Trypanosoma cruzi isoladas durante o surto de doença de Chagas agudo em Santa Catarina (dissertação) / Darlene Aparecida Pena ; orientadores, Mário Steindel, André Luiz Barbosa Báfica. - Florianópolis, SC , 2010.

100 p.: il., grafs., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-graduação em Biotecnologia.

Inclui referências

1. Biotecnologia. 2. Tripanossoma cruzi. 3. Macrófagos murinos. 4. Marcador molecular. 5. Sistema complemento. 6. Seleção de populações. I. Steindel, Mario. II. Báfica, André Luiz Barbosa. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. IV. Título.

CDU 577.23

**“Caracterização biológica e molecular de cepas de  
*Trypanosoma cruzi* isoladas durante o surto de doença  
de Chagas agudo em Santa Catarina”**

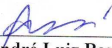
POR

**DARLENE APARECIDA PENA**

Dissertação julgada e aprovada em sua forma final, pelos  
Orientadores e membros da Comissão Examinadora.

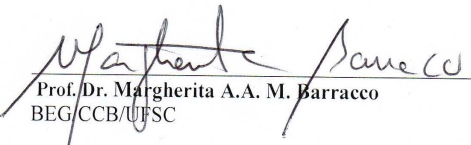
Orientadores:

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Mário Steindel  
MIP/CCB/UFSC

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. André Luiz Barbosa Báfica  
MIP/CCB/UFSC

Comissão Examinadora:

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Jamil Assneuy Filho  
FMC/CCB/UFSC

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Margherita A.A. M. Barracco  
BEG/CCB/UFSC

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Alvaro José Romanha  
FIOCRUZ/MG

\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Edmundo Carlos Garsard – MIP/CCB/UFSC  
Coordenador do Programa de  
Pós-Graduação em Biotecnologia da UFSC

Florianópolis, Fevereiro de 2010

**DEDICO**

Aos meus pais Maria e Domingos (*in memoriam*) pelo dom da vida e amor incondicional. Ao meu irmão Adriano pelo carinho e ao meu noivo Klaus pelo afeto e incentivo.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço à Deus pela proteção nos momentos firmes e trêmulos.

À Universidade Federal de Santa Catarina e ao programa de Pós-Graduação em Biotecnologia pela oportunidade de realizar o mestrado em Biotecnologia.

À CAPES, CNPQ e FAPESC pelo apoio financeiro.

Ao meu querido orientador prof. Mário Steindel, pela orientação, comprometimento e confiança depositada. Agradeço também pela amizade e por sempre me tratar como filha.

Ao prof. André Báfica pelos momentos de descontração, orientação e pelas sugestões ao longo do desenvolvimento deste trabalho.

Ao prof. Edmundo por disponibilizar seu laboratório para o desenvolvimento de parte deste estudo.

Ao prof. Carlos Zanetti pela amizade e exemplo de respeito ao trabalho e às pessoas.

À prof. Margherita Barraco pelo exemplo de professora e pelas inúmeras conversas de incentivo e motivação, as quais foram muito importantes para superação dos momentos de angústia e incertezas.

À minha mãe Maria por ter me concedido o dom da vida e pelo amor constante. Agradeço também por sempre me apoiar e pelo exemplo de força e coragem. Nos méritos desta conquista a muito de sua presença.

Ao meu pai Domingos pelo exemplo de honestidade e simplicidade. Mesmo não estando mais presente, sinto sua mão sobre a minha, transmitindo a segurança necessária para seguir...

Ao meu irmão Adriano minha eterna gratidão pelo carinho e apoio sempre presentes. Ao meu irmão Lindomar pelo incentivo durante o curso de graduação e às minhas cunhadas Flávia e Elizeth pela amizade.

Ao meu noivo Klaus pelas preciosas correções, apoio constante, amor e companhia agradável. Agradeço também por cada palavra de afeto, as quais aliviaram meu cansaço e serviram como fonte de inspiração e esperança.

Aos meus familiares pelo constante estímulo e carinho. Em especial às minhas tias Nely (*in memoriam*), Efigênia e Rose. Agradeço também à Marlene e Edmilson por dedicaram tanto amor e carinho à nossa família.

Aos colegas de turma, em especial à amiga Danila pelas várias noites de estudo, amizade sincera e convivência agradável.

À Cristiane Guertler pela amizade e troca de experiências.

Aos colegas de laboratório: Ane, Rebeca, Renata, Larissa, Mariana, Elisa Orlandi, Elisa Ferreira, Alexandre, Juliano, Yuri, Leandra, Marivânia, Gabriela, Elisa Prestes, Glauber, Patrícia, Débora, Thaís, Aline, Mayara, Camile e Laís. Em especial a Ane e Mariana pela constante disponibilidade na condução dos experimentos. Agradeço também à Ane pelas correções e valiosas sugestões na escrita.

Os amigos do LIDI, em especial à Nicole e Lucas pelo auxílio em alguns experimentos, e à Simone pela graciosidade, sinceridade e energia contagiante.

Aos inestimáveis amigos Zé Maria, Tarciane, Ellen, Flávia, Renata, Anna Luiza, Viviany, Natália, Letícia e Priscilla Barrios. A distância nunca será suficiente para separar nossa grande amizade, vocês estarão sempre presentes no meu coração!

À todos os professores cujos ensinamentos foram essenciais em minha formação.

À todos aqueles, que mesmo não mencionados, estiveram ao meu lado, contribuindo para a minha formação e para a realização deste estudo, o meu mais sincero e carinhoso muito obrigada.

## RESUMO

Estudos moleculares e de biologia demonstram que o táxon *Trypanosoma cruzi* é composto por diferentes linhagens. Em 2005, foi descrito um surto de doença de Chagas Agudo (DCA) no município de Navegantes em Santa Catarina associado ao consumo de caldo de cana contaminado com o *T. cruzi*. Análises moleculares identificaram as linhagens TcI em gambás (cepas SC90 e SC91), TcI/TcII em triatomíneos (cepas SC92 e SC93) e TcII em pacientes (cepas SC94-SC102). Neste sentido, o presente trabalho objetivou estudar possíveis mecanismos envolvidos na seleção de populações do grupo TcII em infecções humanas ocasionadas por cepas mistas TcI/TcII de *T. cruzi*. Para tanto, as cepas SC90, SC92, SC93, SC94, SC95, SC96 e Y foram utilizadas nos ensaios de lise pelo sistema complemento, interação com macrófagos murino e humano na presença e ausência de soro imune e IFN- $\gamma$ , ensaios de Western blot e cinética da proporção das linhagens TcI e TcII em cepas mistas após diferentes passagens em macrófagos humanos por meio de PCR semiquantitativo e PCR quantitativo. Os ensaios de lise pelo sistema complemento não mostraram diferenças de sensibilidade entre as cepas estudadas. Já nos estudos de interação *T. cruzi*-macrófagos murinos verificou-se um aumento na taxa de infecção e no número médio de amastigotas quando formas tripomastigotas das diferentes cepas foram previamente incubadas com soro chagásico. Além disso, as cepas do grupo TcII apresentaram uma maior taxa de infecção em macrófagos e após 72 horas de interação, apresentaram valores médios do número de amastigotas duas vezes superiores ao observado para cepas TcI. Contudo, não houve diferença significativa no número médio de amastigotas no tempo inicial de infecção entre TcI e TcII. Ensaios de Western blot confirmaram uma maior expressão da gp82 em formas tripomastigotas das cepas TcII. Macrófagos ativados com IFN- $\gamma$  infectados com as cepas Y, SC90 e SC96 foram capazes de controlar a proliferação dos parasitos independente da cepa utilizada, de forma dependente da NOS2. A análise da proporção de TcI e TcII nas cepas mistas SC92, SC93 e na mistura artificial, SC90+SC96, antes e após a conclusão do ciclo biológico em macrófagos murinos revelou uma alteração no perfil molecular dessas cepas, sendo observado um completo desaparecimento do fragmento de DNA de 200 pb (TcI) na cepa mista artificial (SC90+SC96), enquanto nas cepas SC92 e SC93 verificou-se uma diminuição de cerca de 3 vezes na intensidade do fragmento de 200 pb. Quando os ensaios foram realizados com a cepa SC92 (três passagens seriadas em macrófagos humanos), constatou-se um progressivo aumento na proporção de TcII, uma vez que a proporção inicial era de 77,4% para TcI e 22,6% para TcII e após a terceira passagem foi verificado 93,2% para TcII. Em conjunto, estes

resultados sugerem que a manutenção de populações de *T. cruzi* II em infecções humanas ocasionadas por cepas mistas pode estar relacionada com características intrínsecas do parasito, como a capacidade infectiva e o tempo de duplicação intracelular. Embora seja ainda possível que mecanismos efetores dos macrófagos estejam envolvidos com essa seleção.

Palavras-chave: *Trypanosoma cruzi*, macrófagos murinos, marcadores moleculares, sistema complemento; seleção de populações.

## VIII

### ABSTRACT

Molecular studies and biology of the parasite showed that *T. cruzi* is composed by different lineages. In 2005, an outbreak of acute Chagas' disease (ACD) in the city of Navegantes in Santa Catarina was reported. This infection was associated with the ingestion of sugar cane juice contaminated with *T. cruzi*-infected triatomine bugs. Molecular analysis identified the lineages TcI in opossums (SC90 and SC91), TcI/TcII in triatomines (SC92 and SC93) and TcII in isolates from humans (SC94-SC102). The present study aims to investigate possible mechanisms involved in the differential selection of TcII population in human infections caused by TcI/TcII mixed strains of *T. cruzi*. Therefore, the SC90, SC92, SC93, SC94, SC95, SC96 and Y strains were used in assays, of growth curve of the parasites, complement-mediated lysis, *T. cruzi*-macrophages human and murine interaction in the presence and absence of serum immune and IFN- $\gamma$  assays, Western blot with monoclonal anti-gp82 and kinetics of the proportion of lineages TcI and TcII in mixed strains after different passages in human macrophages by semiquantitative and quantitative PCR. No differences in growth were found when the strains were exposed to LIT medium *in vitro*. Likewise, no differences in sensitivity between the strains studied when were exposed to by complement-mediated lysis. *T. cruzi*-macrophages interaction assays revealed an increase in infection rate and mean number of amastigotes when trypomastigotes of SC90, SC91, SC92, SC93, SC95, SC96 and Y strains were first incubated with serum chagasic. Moreover, it was found the TcII strains showed a higher rate of infection. Following 72 h post-infection, we observed that TcII strains presented mean values of amastigotes twice higher than that measured for TcI strains. However, no significant difference in the mean number of amastigotes per infect cell after initial contact was observed. Western blot assays confirmed the higher expression of gp82 of trypomastigotes of TcII strains. Macrophages activated with IFN- $\gamma$  and infected with Y, SC90 and SC96 strains were able to control the parasite proliferation in a similar manner, regardless of strain used. These effects were found to be dependent on L-NMMA, an inhibitor of NOS2 activity. Analysis of proportion TcI and TcII in SC92, SC93 and SC90+SC96 mixed strains before infecting murine macrophages and after complete of the biological cycle, showed changes in the molecular profile of these strains. Observed a complete disappearance of 200 bp DNA fragment (TcI) in artificial mixed strain (SC90+SC96), while the SC92 and SC93 strains there was a decrease of about three times the intensity of the 200 bp fragment. A progressive increase in the proportion of TcII population in SC92 strain was observed, whereas the original ratio was 77,4% for TcI and



22,6% for TcII, was verified 93,19% of TcII after the third passage. Together, these results suggest that maintaining *T. cruzi* II populations in human infections caused by mixed strains may be related to intrinsic characteristics of the parasite, as the infective capacity and intracellular doubling time. In contrast, there remains possible that effector mechanisms of macrophages are involved in this selection.

Key-words: *Trypanosoma cruzi*, murine macrophage, molecular markers, complement system; selection of populations.

# X

## LISTA DE ABREVIATURAS

cAMP - AMP cíclico  
CRIT - Complement C2 Receptor Inhibitor Trispanning  
DAF - Decay-Accelerating Factor  
DAG - 1,2-diacylglicerol  
DMEM - Meio de Eagle Modificado por Dulbecco  
DTU - Discrete Typing Units  
Fab – Fragment Antigen-Binding  
Fc - Fragment Crystallizable  
Gp - Glicoproteína  
GPI - Glicosilfosfatidilinositol  
IFN- $\gamma$  – Interferon gama  
IL-12 – Interleucina tipo 12  
IP3 - 1,4,5-inositol trifosfato  
kDNA-RFLP - Restriction Fragment Length Polymorphism of Kinetoplast DNA  
LIT - Liver Infusion Tryptose  
L-NMMA - 1mM N<sup>G</sup>-monometil-L-arginina  
LSSP-PCR - Low Stringency Single Specific Primer  
MAC - Complexo de Ataque à Membrana  
MHC - Complexo Principal de Histocompatibilidade  
NO - óxido nítrico  
NOS2 - óxido nítrico sintase tipo 2  
pb - pares de bases  
PBS – Tampão Salina Fosfato  
PCR- Reação da Polimerase em Cadeia  
PLC - Fosfolipase C  
PTK - Proteína Tirosina Quinase  
qPCR - PCR quantitativa  
RAPD - Random Amplification of Polymorphic DNA  
ROS - Espécies reativas de oxigênio  
SC – Soro chagásico crônico  
SCI – Soro chagásico inativado  
SFB – Soro fetal bovino  
SN - Soro normal  
SNI - Soro normal inativado  
TcCRT - *Trypanosoma cruzi* calreticulina  
TcI - *Trypanosoma cruzi* I  
TcII - *Trypanosoma cruzi* II  
T-DAF - Trypomastigota Decay-Accelerating Factor  
TNF- $\alpha$  – Fator de necrose tumoral alfa

TSSA - Tripomastigote Small Surface Antigen

UPGMA - Unweighted Pair-Group Method Using Arithmetic Means

Z- Zimodena

## XII

### LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Ciclo biológico do *Trypanosoma cruzi* 4
- Figura 2.** Representação esquemática da sequência de aminoácidos da glicoproteína gp82 de *Trypanosoma cruzi* 8
- Figura 3.** Ativação de diferentes cascatas sinalizadoras de  $Ca^{2+}$  em formas tripomastigotas metacíclicas de *Trypanosoma cruzi* das cepas CL (TcII) e G (TcI) durante o processo de invasão celular 9
- Figura 4.** Perfil eletroforético representativo de cepas de *Trypanosoma cruzi* caracterizadas por RAPD com o oligonucleotídeo 3303 33
- Figura 5.** Dendograma obtido a partir dos perfis eletroforéticos gerados por meio da amplificação do DNA total de cepas de *Trypanosoma cruzi* utilizando os iniciadores 3303, 3304, 3306, 3307, AB1 e AB5 36
- Figura 6.** Avaliação do perfil molecular representativo da região do espaçador não transcrito do gene do mini-exon (amostras 1-8), região divergente do gene 24S $\alpha$  rDNA (amostras 9-17), e gene do RNA ribossomal 18S (amostras 18-24) de cepas de *Trypanosoma cruzi* 38
- Figura 7.** Ensaio de lise pelo complemento com formas tripomastigotas (A) e epimastigotas (B) das cepas Y e SC94 (TcII), SC90 (TcI), SC92 e SC93 (mistas) 42
- Figura 8.** Micrografias representativas da avaliação microscópica de macrófagos murinos infectados com a cepa Y 42
- Figura 9.** Efeito de diferentes concentrações de soro chagásico e normal na taxa de infecção (A) e número médio de amastigotas (B) em macrófagos murinos 44
- Figura 10.** Taxa de infecção de cepas de *Trypanosoma cruzi* em macrófagos murinos derivados de medula óssea 46

Figura 11. Número médio de amastigotas de cepas de <i>Trypanosoma cruzi</i> em macrófagos murinos derivados de medula óssea	47
Figura 12. Taxa de infecção de cepas de <i>Trypanosoma cruzi</i> em macrófagos murinos derivados de medula óssea	49
Figura 13. Número médio de amastigotas de cepas de <i>Trypanosoma cruzi</i> em macrófagos murinos derivados de medula óssea	50
Figura 14. Curvas de crescimento de cepas de <i>Trypanosoma cruzi</i>	52
Figura 15. Análise da expressão de gp82 por Western blot em formas tripomastigotas metacíclicas de <i>Trypanosoma cruzi</i>	56
Figura 16. Taxa de infecção (A) e número médio de amastigotas (B) de cepas de <i>Trypanosoma cruzi</i> em macrófagos murinos ativados com IFN- $\gamma$ e tratados com L-NMMA	58
Figura 17. Intensidade de fragmentos de DNA obtidos pela amplificação do gene do mini-exon após a interrupção da reação em diferentes ciclos	59
Figura 18. Avaliação do perfil eletroforético de cepas mistas de <i>Trypanosoma cruzi</i> antes e após a conclusão do ciclo biológico em macrófagos murinos por PCR semiquantativa	61
Figura 19. Micrografias representativas de macrófagos humanos infectados com a cepa SC96	61
Figura 20. Estimativa da proporção de populações TcI e TcII por PCR quantitativo em cepa mista submetida a passagens seriadas em macrófagos humanos	63

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Cepas de <i>Trypanosoma cruzi</i> utilizadas nos experimentos de caracterização biológica e molecular	20
<b>Tabela 2.</b> Iniciadores utilizados nas reações de RAPD	22
<b>Tabela 3.</b> Iniciadores utilizados para genotipagem das cepas de <i>Trypanosoma cruzi</i>	24
<b>Tabela 4.</b> Matriz dos coeficientes de similaridade de DICE de cepas de <i>Trypanosoma cruzi</i> utilizando os oligonucleotídeos 3303, 3304, 3306, 3307, AB1 e AB5	35
<b>Tabela 5.</b> Tempo de duplicação intracelular de amastigotas das cepas de <i>Trypanosoma cruzi</i> na presença e ausência de soro chagásico	50
<b>Tabela 6.</b> Tempo para conclusão do ciclo biológico de cepas de <i>Trypanosoma cruzi</i> em macrófagos murinos	50

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	1
1.1. Aspectos gerais da doença de Chagas	1
1.2. Ciclo de Vida	2
1.3. Variabilidade intraespecífica de <i>T. cruzi</i>	4
1.4. Interação parasito-célula hospedeira	7
1.5. Aspectos imunológicos da doença de Chagas	13
<b>2. OBJETIVOS</b>	19
2.1. Objetivo geral	19
2.2. Objetivos específicos	19
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b>	20
3.1. Obtenção e manutenção de cepas de <i>T. cruzi</i>	20
3.2. Extração de DNA	21
3.3. Análise da variabilidade genética das cepas de <i>T. cruzi</i>	21
3.4. Genotipagem das cepas de <i>T. cruzi</i>	22
3.5. Ensaio de lise mediada pelo sistema complemento	24
3.5.1. Soro normal	24
3.5.2. Soro chagásico crônico	24
3.5.3. Ensaio de lise mediada pelo sistema complemento com formas tripomastigotas e epimastigotas de <i>T. cruzi</i>	24
3.6. Curvas de crescimento	25
3.7. Ensaio de interação <i>T. cruzi</i> -macrófagos murinos	25
3.7.1. Obtenção e manutenção de macrófagos murinos derivados de medula óssea	25
3.7.2. Infecção de macrófagos murinos com <i>T. cruzi</i>	26
3.7.3. Cálculo do tempo de duplicação intracelular de cepas <i>T. cruzi</i>	27
3.8. Análise da expressão de gp82 por Western Blot	27
3.9. Infecção de macrófagos murinos ativados com IFN- $\gamma$	28
3.10. Caracterização genotípica de cepas mistas antes e após infecção de macrófagos murinos	29
3.10.1. Padronização da PCR semiquantitativa	29
3.10.2. Caracterização genotípica de cepas mistas por PCR semiquantitativa	30
3.11. Caracterização genotípica de cepas mistas antes e após infecção de macrófagos humanos	30
3.11.1. Obtenção e manutenção de macrófagos humanos	30
3.11.2. Infecção de macrófagos humanos com <i>T. cruzi</i>	30
3.11.3. Caracterização genotípica de cepas mistas por qPCR	31

<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	32
4.1. Caracterização molecular das cepas de <i>T. cruzi</i> por RAPD	32
4.2. Genotipagem das cepas de <i>T. cruzi</i> por PCR do mini-exon, 24S $\alpha$ rDNA e 18S rDNA	37
4.3. Sensibilidade das formas tripomastigotas e epimastigotas de <i>T. cruzi</i> ao sistema complemento	38
4.4. Ensaio de interação <i>T. cruzi</i> -macrófagos murinos	42
4.4.1. Determinação da concentração de soro para os ensaios de infecção	42
4.4.2. Influência dos soros chagásico crônico e normal na interação <i>T. cruzi</i> -macrófagos	45
4.4.3. Variabilidade biológica entre cepas dos grupos TcI, TcII e mistas	48
4.4.4. Análise da expressão de gp82 em formas tripomastigotas metacíclicas de <i>T. cruzi</i>	54
4.4.5. Infecção de macrófagos murinos ativados com IFN- $\gamma$	56
4.4.6. Caracterização genotípica de cepas mistas antes e após passagens em macrófagos	59
4.4.6.1. PCR semiquantitativo	59
4.4.6.2. qPCR	61
<b>5. CONCLUSÕES</b>	64
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	65



# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. Aspectos gerais da doença de Chagas

A Tripanossomíase Americana ou doença de Chagas é uma infecção parasitária, causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi* (CHAGAS, 1909). A doença causa cerca de 50.000 mortes ao ano, sendo estimado que desde o México até o sul da Argentina, existam 16 a 18 milhões de pessoas cronicamente infectadas e 100 milhões consideradas sob risco de adquirir a infecção (THE LANCET, 2006). Cerca de 30% da população infectada desenvolve manifestações clínicas da doença, o que torna a patologia relevante em termos de saúde pública e impacto econômico (BRENER et al., 2000).

A doença de Chagas é transmitida por insetos hematófagos conhecidos popularmente como barbeiros, os quais pertencem à ordem Hemiptera, família Reduviidae e subfamília Triatominae. Essa família possui mais de cem espécies, entre as quais várias são vetoras potenciais do parasito. As espécies mais importantes relacionadas com a doença são *Triatoma infestans*, *T. dimidiata*, *T. brasiliensis*, *T. sordida*, *Rhodnius prolixus* e *Panstrongylus megistus* (GAUNT e MILES, 2000; RASSI et al., 2000).

A transmissão natural do *T. cruzi* para humanos ocorre quando triatomíneos infectados liberam fezes e urina sobre a pele lesionada ou mucosa íntegra, durante o repasto sanguíneo (BRENER et al., 2000). A transmissão pode ainda ocorrer por transfusão sanguínea e, com menor frequência, via congênita, acidentes de laboratório e transplantes de órgãos. Também pode ocorrer a transmissão oral, através da ingestão de alimentos contaminados com triatomíneos infectados (DIAS, 1989; BITTENCOURT, 2000).

Em 2005, foi descrito um surto de doença de Chagas aguda (DCA) no Estado de Santa Catarina, o qual foi associado ao consumo de caldo de cana contaminado com *T. cruzi* (STEINDEL et al., 2005). Nesse episódio, segundo nota técnica do Ministério da Saúde (2007), 24 pacientes foram infectados, sendo que três evoluíram para óbito.

A doença apresenta uma fase aguda, de curta duração, que na maioria dos pacientes progride para uma fase crônica. A fase aguda é geralmente assintomática, entretanto em 10% dos casos os sinais clínicos começam 6 a 10 dias após a infecção e se caracterizam por um quadro febril passageiro e inespecífico, linfadenopatia, esplenomegalia branda e, mais raramente, uma intensa miocardite (RASSI et al., 2000).

Após uma fase aguda sintomática ou não, os pacientes evoluem para uma fase crônica silenciosa, podendo permanecer assintomáticos (fase indeterminada) ou evoluir para uma forma cardíaca, digestiva ou mista. Na forma cardíaca, ocorre principalmente miocardite crônica progressiva e fibrosante e/ou hipertrofia do coração. Essas alterações podem se manifestar por meio de arritmias e insuficiência cardíaca congestiva. A forma cardíaca é a principal responsável pela ocorrência de morte súbita, que é um fenômeno considerado como a principal causa de morte na doença de Chagas. Os pacientes com a forma digestiva apresentam alterações hipertróficas no esôfago (megaesôfago) e colón intestinal (megacolón), que levam a problemas como disfagia e constipação intestinal, respectivamente. A forma mista é caracterizada pelo comprometimento cardíaco e digestivo concomitantemente (BRENER et al., 2000; RASSI et al., 2000). Ao contrário do que ocorre na fase aguda, na crônica há poucos parasitos circulantes, os quais tem sua proliferação controlada pelos componentes celulares e humorais da resposta imune adquirida, provavelmente pela destruição das formas circulantes no sangue (ARAÚJO-JORGE e CASTRO, 2000).

Atualmente, não se dispõe de vacinas ou qualquer fármaco profilático para o controle da doença de Chagas e os medicamentos utilizados no tratamento de pacientes na fase aguda, como o nifurtimox (Lampit<sup>®</sup>, Bayer) e o benzonidazol (Rochagan<sup>®</sup>, Roche) são de uso limitado devido à alta toxicidade. Além disso, ambos os fármacos apresentam eficiência limitada na fase crônica da doença, onde a maior parte dos diagnósticos são realizados (CASTRO et al., 2006, DIAS, 2006).

## 1.2. Ciclo de Vida

O *T. cruzi* é um protozoário flagelado da Ordem Kinetoplastida, Família Trypanosomatidae, caracterizado pela existência de um único flagelo e de cinetoplasto, cuja organela se localiza próximo ao flagelo e contém o DNA mitocondrial (TELLERIA et al., 2006).

Durante o ciclo de vida, o *T. cruzi* apresenta basicamente três formas distintas dependendo do hospedeiro em que se encontre. Nos hospedeiros mamíferos são observadas as formas amastigotas intracelulares e tripomastigotas sanguíneas, enquanto nos hospedeiros invertebrados ocorrem as formas epimastigotas e tripomastigotas metacíclicas. Os tripomastigotas possuem aproximadamente 25 µm de comprimento e se caracterizam pela presença do núcleo na região

central, o cinetoplasto localizado na porção posterior da célula e presença da membrana ondulante. As formas amastigotas, com aproximadamente 5 µm de comprimento, são caracterizadas pelo formato arredondado, cinetoplasto visível, corpo achatado com flagelo interno e ausência de membrana ondulante. Já as formas epimastigotas, com 20 a 40 µm de comprimento, se caracterizam pelo cinetoplasto anterior ao núcleo, membrana ondulante curta e flagelo livre bem desenvolvido (TYLER e ENGMAN, 2001; BURLEIGH e WOOLSEY, 2002).

O *T. cruzi* apresenta um ciclo de vida heteroxeno alternado entre hospedeiros invertebrados (barbeiros), que atuam como vetores do parasito e uma grande variedade de hospedeiros mamíferos. Durante a fase no hospedeiro invertebrado, que se infecta pela ingestão de sangue de animais infectados durante o repasto sanguíneo, formas tripomastigotas de *T. cruzi* sofrem um arredondamento no estômago, originando formas esferomastigotas. Estas se transformam em epimastigotas ainda no estômago e se aderem à superfície do intestino médio e posterior, multiplicando-se intensamente. Posteriormente, os epimastigotas migram para o intestino posterior atingindo o reto, transformando-se em tripomastigotas metacíclicas, os quais são eliminados nas fezes e urina do inseto vetor (BRENER et al., 2000; TYLER e ENGMAN, 2001). Essa forma é capaz de infectar e replicar em uma ampla variedade de células do hospedeiro vertebrado usando componentes de sua superfície e do hospedeiro (BURLEIGH e WOOLSEY, 2002; YOSHIDA, 2006).

Uma vez que as formas infectivas são depositadas na pele dos hospedeiros mamíferos, elas encontram as primeiras barreiras do sistema imune inato, como a pele e mucosas, que constituem barreiras físicas e o sistema complemento (KIPNIS e DA SILVA, 1989). No hospedeiro vertebrado, os tripomastigotas infectam as células e diferenciam-se em amastigotas, uma forma proliferativa intracelular. Posteriormente, os amastigotas se diferenciam em formas tripomastigotas, as quais rompem as células hospedeiras e atingem a corrente sanguínea podendo infectar novas células do hospedeiro ou serem ingeridas por triatomíneos na ocasião de um novo repasto. Dentro do inseto vetor, os parasitos transformam-se em epimastigotas, reiniciando o ciclo (BRENER et al., 2000; TYLER e ENGMAN, 2001) (Figura 1).

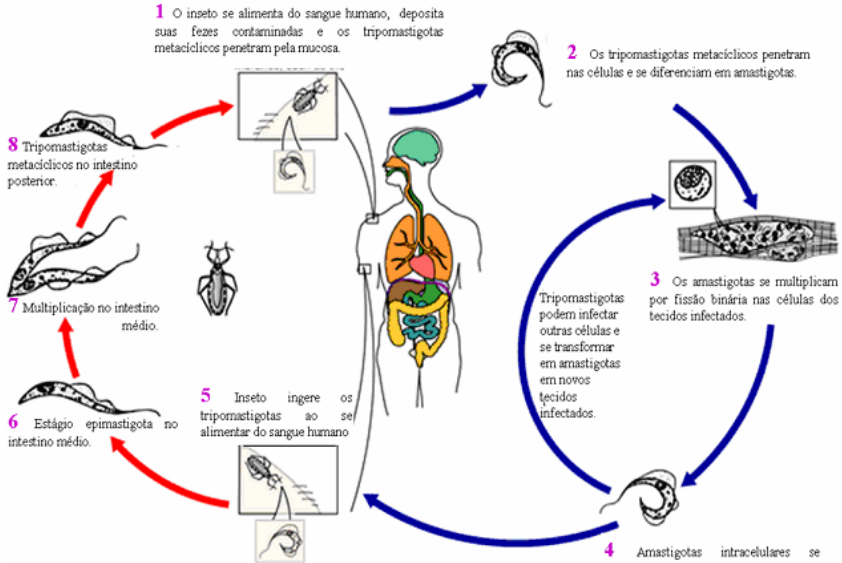


Figura 1. Ciclo biológico do *Trypanosoma cruzi* (Modificado de CDC, 2009).

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

O *T. cruzi* é considerado uma espécie heterogênea, consistindo de várias subpopulações, que apresentam cepas distribuídas em hospedeiros mamíferos domésticos e selvagens, e em insetos vetores (ZINGALES et al., 1998). Esse parasito apresenta uma alta variabilidade genética, como evidenciado em análises de isoenzimas (MILES et al., 1977, 1978, 1980; ROMANHA, 1982), kDNA-RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism of Kinetoplast DNA*) (MOREL et al., 1980), LSSP-PCR (*Low Stringency Single Specific Primer*) (VAGO et al., 1996) e RAPD (*Random Amplification of Polymorphic DNA*) (STEINDEL et al., 1993).

Os primeiros estudos que demonstraram a grande diversidade genética de *T. cruzi* foram realizados por Miles e colaboradores no final da década de 1970. Esses autores analisaram o polimorfismo dos perfis eletroforéticos de seis enzimas e sugeriram uma classificação em três grupos distintos, os quais foram denominados zimodemas Z1, Z2 e Z3 (MILES et al., 1977, 1978, 1980). Estudos epidemiológicos mostraram

que Z1 e Z3 estão associados às cepas que circulam no ciclo silvestre e Z2 àquelas que circulam no ciclo de transmissão doméstico (MILES et al., 1978, 1980; BARRET et al., 1980).

Romanha (1982) analisando o perfil isoenzimático de amostras de *T. cruzi* isoladas de pacientes chagásicos, verificou a presença de 4 zimodemas distintos, denominados ZA, ZB, ZC e ZD. A comparação dos zimodemas descritos por Romanha (1982), com aqueles descritos por Miles et al. (1977; 1978), mostrou grande similaridade entre os zimodemas ZA e Z2, enquanto que os demais zimodemas foram distintos entre si. Dessa forma, admite-se que no Brasil, o *T. cruzi* esteja distribuído em pelo menos 6 grupos isoenzimáticos principais: Z1, Z2 ou ZA, Z3, ZB, ZC e ZD.

Apesar da elevada diversidade genética evidenciada pelas técnicas mencionadas, a análise de sequências com uma taxa de evolução menor mostrou um claro dimorfismo entre as cepas. Souto et al. (1996), demonstraram que a amplificação de uma região do espaçador não transcrito do gene do mini-éxon e da região divergente correspondente ao terminal 3' do gene 24Sα rDNA produzia uma clara divisão das cepas de *T. cruzi* em duas linhagens. Os autores observaram uma associação entre as cepas que produziam fragmentos de DNA amplificados de 125 pb e 300 pb, sendo assim designadas linhagem 1. Da mesma forma, foi observada uma correlação entre as cepas que geravam fragmentos de DNA amplificados de 110 pb e 350 pb, denominadas linhagem 2.

Com o objetivo de padronizar a nomenclatura das duas linhagens principais de *T. cruzi* definidas por várias metodologias, em 1999 durante o Simpósio Internacional Comemorativo da Descoberta da Doença de Chagas foi adotada a subdivisão da espécie *T. cruzi* em duas linhagens principais, denominadas *T. cruzi* I (TcI) e *T. cruzi* II (TcII) (ANONYMOUS, 1999). Posteriormente, baseado em análises de outros marcadores genéticos, foi proposta a subdivisão do grupo TcII em cinco subgrupos, denominados TcIIa-TcIIe (BRISSE et al., 2000; 2001).

Recentemente, foi proposta uma revisão da nomenclatura, onde cada subgrupo passou a ser classificado como um grupo independente, referido como DTU (*Discrete Typing Units*) (TIBAYRENC, 1998; ZINGALES et al., 2009). Os grupos TcI e TcIIb correspondem, respectivamente, aos grupos TcI e TcII originalmente recomendados durante o Simpósio Internacional Comemorativo da Descoberta da Doença de Chagas. Propõe-se ainda que os subgrupos TcIIa, TcIIc,

TcIId e TcIIe sejam denominados TcIV, TcIII, TcV e TcVI respectivamente (ZINGALES et al., 2009).

Trabalhos recentes sugerem que o grupo TcI pode ser dividido em quatro subgrupos (HERREIRA et al., 2007; FALLA et al., 2009), entretanto estes não foram inseridos na revisão da nomenclatura de *T. cruzi* (ZINGALES et al., 2009).

Estudos prévios apontam que o *T. cruzi* é uma espécie diplóide com estrutura predominantemente clonal com rara troca genética (GIBSON e MILES, 1986; TIBAYRENC et al., 1986; OLIVEIRA et al., 1998; EL-SAYED et al., 2005). Entretanto, a recombinação entre populações de *T. cruzi* é sugerida (GAUNT et al., 2003; LEWIS et al., 2009; STURM e CAMPBELL, 2009). Isso foi primeiramente documentado por Gaunt et al. (2003), que demonstraram por meio da obtenção de híbridos, a capacidade de troca genética entre dois clones parentais. Sugere-se que esse tipo de recombinação envolva a fusão de dois genomas diplóides, formando um indivíduo tetraplóide, seguida pela perda de alelos e recombinação intragênica, não envolvendo meiose (GAUNT et al., 2003). Nesse contexto, especula-se que TcI e TcII sejam grupos ancestrais, que deram origem a TcIII e TcIV por meio de um evento de hibridização, sendo que TcII e TcIII originaram TcV e TcVI também por um evento de hibridização (MACHADO e AYALA, 2001; BRISSE et al., 2003; WESTENBERGER et al., 2005).

Com base em características epidemiológicas dos grupos TcI e TcII, foi possível associar cepas do grupo TcI ao ciclo de transmissão silvestre e cepas do grupo TcII ao ciclo de transmissão doméstico (ANONYMOUS, 1999). Em países do Cone Sul, isolados do grupo TcII são os principais responsáveis pelas manifestações clínicas da doença de Chagas. Entretanto, em países ao norte da Bacia Amazônica, como Venezuela e México, infecções humanas por *T. cruzi* estão comumente associadas ao grupo TcI (MILES et al., 1981; BOSSENO et al., 2002).

Na natureza, verifica-se que espécies hospedeiras de *T. cruzi* podem ser infectadas por múltiplos contatos com diferentes triatomíneos e estes podem alimentar-se em diferentes espécies hospedeiras infectadas. Esse comportamento propicia a formação de populações de cepas multiclonais, tanto nas espécies hospedeiras quanto nos vetores (TORRES et al., 2004). Infecções com cepas multiclonais envolvendo clones TcI e TcII tem sido descritas na Bolívia e no Brasil (BOSSENO et al., 1996; DI NOIA et al., 2002; HERRERA et al., 2004).

Análises de microssatélites permitem verificar se uma determinada cepa de *T. cruzi* é constituída por um único clone

(monoclonal) ou por mais de um clone (multiclonal). A utilização dessa técnica tem demonstrado que a porcentagem de populações multiclonais diminui quando cepas isoladas do ciclo silvestre são comparadas com cepas isoladas de pacientes. Isso sugere que o homem atua como filtro biológico ao selecionar populações mais adaptadas a se desenvolverem no seu organismo (OLIVEIRA et al., 1998; 1999; MACEDO et al., 2001).

#### **1.4. Interação parasito-célula hospedeira**

O estabelecimento da infecção por *T. cruzi* depende de uma série de eventos envolvendo interações entre moléculas do parasito e do hospedeiro (YOSHIDA, 2006). Esse processo tem sido extensivamente estudado *in vitro*, sendo que a maioria desses estudos foi realizada com linhagens de células transformadas (SCHENKMAN et al., 1988; MORTARA, 1991; CALER et al., 2001; FERNANDES et al., 2007).

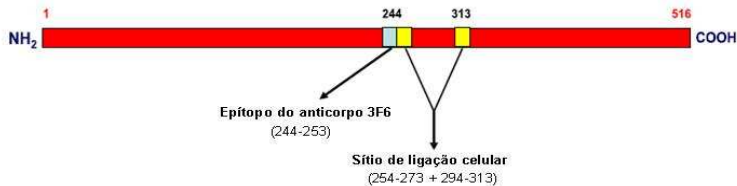
A infecção natural pelo *T. cruzi* ocorre por meio de penetração do parasito na pele lesionada ou mucosa íntegra. Ao completar o ciclo de replicação intracelular após 3-5 dias, formas tripomastigotas são liberadas na corrente sanguínea e invadem rapidamente as células hospedeiras, como um mecanismo de escape da lise mediada pelo sistema complemento. A habilidade de infectar e replicar em vários tipos celulares é uma característica essencial do ciclo de vida do *T. cruzi* no hospedeiro mamífero (BURLEIGH e WOOLSEY, 2002)

A fase inicial do processo de interação *T. cruzi*-célula hospedeira envolve adesão do parasito à superfície da célula, decorrente de um processo de reconhecimento celular em que moléculas presentes na membrana plasmática do parasito e da célula hospedeira estão envolvidas (YOSHIDA, 2006). Algumas moléculas de superfície envolvidas no processo de adesão foram descritas nas formas tripomastigotas metacíclicas do *T. cruzi*, como as glicoproteínas gp82, gp35/50 e gp90, as quais reconhecem receptores celulares ainda desconhecidos (YOSHIDA et al., 1990; RAMIREZ et al., 1993; PREVIATO et al., 1994).

Formas tripomastigotas metacíclicas da cepa CL, a qual é altamente invasiva, apresentam em sua superfície a glicoproteína gp82 requerida para interação e invasão na célula hospedeira (RAMIREZ et al., 1993). Gp82 é uma proteína N-glicosilada ancorada por glicosilfosfatidilinositol (GPI) à superfície do parasito (CARDOSO DE ALMEIDA e HEISE, 1993). Essa glicoproteína está relacionada ao

aumento dos níveis de cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) intracelular na célula hospedeira e no parasito durante o estabelecimento da infecção, um evento fundamental para a internalização do *T. cruzi* (MANQUE et al., 2003). Formas epimastigotas, as quais não expressam níveis detectáveis de gp82 e não induzem um aumento de  $\text{Ca}^{2+}$ , quando são transfectadas com um vetor carregando cDNA codificando gp82 produzem esta glicoproteína funcional. Isso torna as formas epimastigotas capazes de se aderir e elevar os níveis de  $\text{Ca}^{2+}$  em células HeLa (MANQUE et al., 2003).

Usando peptídeos sintéticos e gp82 truncada, Manque et al. (2000) demonstraram que o sítio de ligação celular de gp82 é contíguo ao epítipo de reconhecimento do anticorpo monoclonal anti-gp82 (AcMo 3F6). É ainda provável que o sítio de ligação celular seja conformacional, sendo formado pelo dobramento de duas sequências adjacentes e lineares de aminoácidos (Figura 2).



**Figura 2.** Representação esquemática da sequência de aminoácidos da glicoproteína gp82 de *Trypanosoma cruzi* (Adaptado de YOSHIDA, 2006).

Em infecções por via oral em modelo murino, tem sido demonstrado que gp82 é a principal molécula de superfície de tripomastigotas metacíclicos, especializada na adesão à mucina gástrica e consequente penetração na mucosa adjacente (NEIRA et al., 2003).

Uma segunda glicoproteína ancorada por GPI à superfície do parasito é a gp35/50, a qual é uma glicoproteína O-glicosilada rica em treonina, serina e prolina, sendo enquadrada no grupo das mucinas. Ela é expressa em formas tripomastigotas metacíclicas e epimastigotas de *T. cruzi* (PREVIATO et al., 1994).

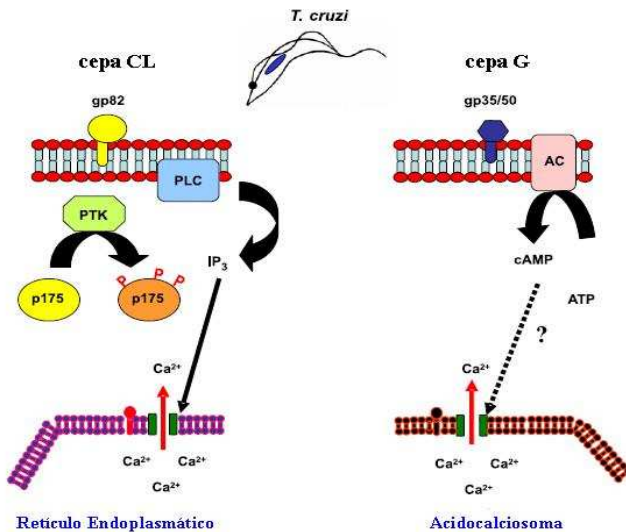
Ruiz et al. (1993) e Yoshida et al. (1993) demonstraram que a incubação do anticorpo monoclonal anti-gp35/50 ou da glicoproteína gp35/50 purificada com formas tripomastigotas metacíclicas de *T. cruzi*,



promoviam a inibição da internalização dos parasitos. Assim como gp82, gp35/50 se liga a célula alvo de uma maneira dependente de receptor e ativa a liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  dos estoques intracelulares. Entretanto, a via de transdução de sinais é distinta da via ativada por gp82 (Figura 3).

Estudos com formas tripomastigotas de várias cepas de *T. cruzi*, revelaram a existência de dois grupos distintos de parasitos, que se diferenciam quanto à expressão de glicoproteínas de superfície e capacidade de invasão de células de mamíferos (Figura 3). Cepas altamente invasivas ligam-se à superfície da célula hospedeira através da glicoproteína gp82. Esta ligação promove a transmissão do sinal para o interior do parasito e da célula, o que resulta na ativação da proteína tirosina quinase (PTK) e fosforilação da proteína p175 (FAVORETO et al., 1998). Esta sinalização envolve a ativação de fosfolipase C (PLC), a qual catalisa a hidrólise de moléculas de fosfatidilinositol-bisfosfato presente na membrana plasmática, resultando na geração de 1,2-diacilglicerol (DAG) e 1,4,5-inositol trifosfato (IP3). IP3 induz a mobilização de  $\text{Ca}^{2+}$  dos estoques intracelulares para o citosol, possivelmente do retículo endoplasmático (YOSHIDA et al., 2000; 2006).

Por outro lado, em cepas com menor capacidade infectiva, a cascata de sinalização celular é menos eficiente do que a cascata induzida por gp82. Nesses isolados, a interação com a superfície da célula hospedeira ocorre principalmente via gp35/50, sendo um processo dependente de AMP cíclico (cAMP) e independente de PTK e PLC. O  $\text{Ca}^{2+}$  requerido para a invasão da célula possivelmente é liberado para o citosol a partir de vacúolos contendo um sistema de troca iônica  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ , conhecidos como acidocalciosomas. Ainda não se sabe como gp35/50 transmite o sinal externo para o interior do parasito e quais são os componentes requeridos para o processo ocorrer (YOSHIDA, 2006) (Figura 3).



**Figura 3.** Ativação de diferentes cascatas sinalizadoras que resultam na liberação Ca<sup>2+</sup> em formas tripomastigotas metacíclicas de *Trypanosoma cruzi* das cepas CL (TcII) e G (TcI) durante o processo de invasão celular. AC – adenilato ciclase, IP3 – Inositol trifosfato, cAMP – AMP cíclico, PLC – fosfolipase C, PTK – tirosina quinase (Adaptado de YOSHIDA, 2006).

Cortez e colaboradores (2003) verificaram que formas tripomastigotas de *T. cruzi* deficientes na expressão de gp82, expressam gp30, uma glicoproteína de 30kDa reconhecida pelo mesmo anticorpo monoclonal que reconhece gp82 (3F6). Gp30, assim como gp82, é capaz de ativar tirosina quinases e induzir um aumento nos níveis de Ca<sup>2+</sup> intracelular em células HeLa, processos importantes para permitir a internalização do parasito. Por meio de estudos de infecção por via oral realizados em camundongos, estes autores demonstraram que gp30 está envolvida no processo de invasão celular, entretanto a interação de gp30 com a mucina gástrica não ocorre de forma eficaz (CORTEZ et al., 2003).

Uma outra glicoproteína envolvida na invasão celular é glicoproteína gp90, a qual modula negativamente a entrada do parasito na célula hospedeira (YOSHIDA et al., 1990). Málaga e Yoshida (2001) usando oligonucleotídeos “antisense” complementares a uma região da sequência que codifica para o gene gp90, demonstraram que esta glicoproteína é um regulador negativo da invasão celular. O tratamento de formas tripomastigotas da cepa G, que possui uma menor capacidade

infectiva, com oligonucleotídeos antisense promoveu uma redução na expressão de gp90 e consequente aumento na invasão dos parasitos nas células hospedeiras.

Gp90 é uma glicoproteína ancorada por GPI à superfície do parasito, capaz de se ligar em células de mamíferos de uma maneira dependente de receptor sem induzir um aumento dos níveis de  $Ca^{2+}$  intracelular. A expressão de gp90 varia entre diferentes cepas de *T. cruzi* e sua expressão está inversamente correlacionada com a capacidade de invasão do parasito a células de mamíferos em cultura, uma vez que cepas com menor capacidade infectiva expressam grandes quantidades de gp90 (RUIZ, 1998; YOSHIDA, 2006). Acredita-se que a interação de gp90 com seu receptor celular ative uma via inibitória, semelhante ao que ocorre com algumas células do sistema imune (VIVIER et al., 2004). Células NK (*Natural Killers*), por exemplo, possuem receptores inibitórios na superfície que antagonizam as vias de ativação usando tirosina fosfatases. De maneira análoga, gp90 promove a ativação de tirosina fosfatase de tripomastigotas metacíclicos e consequentemente a defosforilação de p175 (VIVER et al., 2004).

Como já mencionado, durante a adesão ocorre um aumento intracelular de cálcio ( $Ca^{2+}$ ) e mobilização de lisossomos da célula hospedeira até o local de penetração (DOCAMPO et al. 1996; BURLEIGH e ANDREWS, 1998; YOSHIDA, 2003). Após a adesão, ocorrem mudanças na membrana do parasito e da célula hospedeira, o que irá culminar na penetração do *T. cruzi*, sendo que essas modificações irão variar com o tipo celular (YOSHIDA, 2006).

No caso de macrófagos, a maior parte dos parasitos é interiorizada via mecanismo do tipo fagocítico, envolvendo polimerização de filamentos de actina necessária à formação de projeções de membrana, chamadas pseudópodes (NOGUEIRA e COHN, 1976; MEIRELLES et al., 1982). É ainda possível que um mecanismo de invasão ativo e independente da polimerização de actina também possa ocorrer nessas células (NOGUEIRA e COHN, 1976; KIPNIS et al., 1979).

Em células não-fagocíticas, estudos por microscopia eletrônica revelaram que formas tripomastigotas parecem deslizar gradualmente para dentro da célula, sem nenhuma evidência de formação de pseudópodes. Esse processo de invasão é, portanto, independente da polimerização de actina, sugerindo um mecanismo de invasão ativo (SCHENKMAN et al., 1988). Durante a penetração, um aumento intracelular de  $Ca^{2+}$  promove a mobilização e fusão gradual de

lisossomos, fornecendo assim a membrana requerida para a formação do vacúolo parasitóforo no interior da célula hospedeira (TARDIEUX et al., 1992). Nesses casos, uma pequena depressão é formada na superfície da célula por onde o parasito é interiorizado (BRENER et al., 2000).

À medida que o parasito penetra a célula, este vai sendo envolvido por uma membrana inicialmente proveniente da membrana plasmática em células fagocíticas (SCHENKMAN et al., 1988) e em células não-fagocíticas o parasito é envolvido por uma membrana oriunda da membrana dos lisossomos, os quais são recrutados para a periferia celular pela via de sinalização do  $Ca^{2+}$  (ANDREWS et al., 1990; TARDIEUX et al., 1992). No decorrer do processo, o vacúolo se funde com organelas do sistema endolisossomal da célula hospedeira. A exposição das formas tripomastigotas ao ambiente ácido no interior do vacúolo é requerido para a secreção e atividade da proteína TcTox, que tem capacidade de incorporar-se na membrana do vacúolo parasitóforo, levando a destruição da membrana vacuolar e, conseqüentemente, liberação do parasito para o citoplasma (ANDREWS et al., 1990). O meio ácido possui papel importante no início da diferenciação de formas tripomastigotas em amastigotas. Esse processo se inicia no vacúolo e termina no citoplasma (TANOWITZ et al., 1992; KIRCHHOFF, 1996; BURLEIGH e WOOLSEY, 2002).

Após a completa diferenciação em formas amastigotas, o *T. cruzi* se multiplica sucessivas vezes e em seguida se diferencia novamente em tripomastigotas. Acredita-se que a grande motilidade e a secreção de enzimas pelas formas tripomastigotas levem ao rompimento da membrana plasmática e posterior liberação das formas tripomastigotas para o meio extracelular, tornando-os capazes de infectar novas células (BRENER, 1973; SOUZA, 2000).

Desde os primeiros estudos, sabe-se que, dependendo da cepa, o *T. cruzi* leva menos de 20 minutos para entrar na célula hospedeira. O parasito prolifera por divisão binária por 2 a 9 ciclos até preencher completamente o citoplasma, em 3 a 5 dias, levando então à ruptura e liberação de novos tripomastigotas (DIAS, 1934; KOFOID et al., 1935; MEYER e XAVIER DE OLIVEIRA, 1948). Cerca de 2 horas após a invasão, ocorre a fragmentação da membrana do vacúolo parasitóforo e a liberação do parasito para o citoplasma (BURLEIGH e ANDREWS, 1998; BRENER et al., 2000). Uma vez no citoplasma, as formas amastigotas permanecem quiescentes de 24 a 44 horas, período em que ocorre a síntese de DNA, RNA e proteínas, posteriormente inicia o processo de divisão (BRENER et al., 2000). O tempo de geração dos

amastigotas pode variar de 8 a 15 horas, dependendo da cepa e a citocinese ocorre em 20 a 30 minutos (HYDE e DVORAK, 1973). O processo de transformação das formas amastigotas em tripomastigotas ocorre após 2-5 dias, sendo necessário para ocorrência da ruptura celular (BRENER et al., 2000).

### 1.5. Aspectos imunológicos da doença de Chagas

As formas infectivas ao serem depositadas na pele do hospedeiro por triatomíneos infectados, se deparam com as barreiras iniciais do sistema imune inato, que inclui barreiras físicas (pele e mucosas), macrófagos, células dendríticas, células NK e proteínas do sistema complemento (FERREIRA, 2002; TARLETON, 2007). A resposta imune inata é responsável por controlar a replicação do parasito no início da infecção, assim como preparar o sistema imune para gerar a resposta adquirida do tipo Th1 (BRENER e GAZZINELLI, 1997; GAZZINELLI e DENKERS, 2006; TARLETON, 2007).

O *T. cruzi* é capaz de induzir a ativação de proteínas e enzimas efetoras do sistema complemento, que é formado por um conjunto de proteínas séricas termolábeis e de superfície celular, muitas das quais possuem atividade enzimática. Tais proteínas são ativadas de maneira sequencial na presença do patógeno, culminando com a formação de um complexo de ataque à membrana (MAC) que causa lise do parasito (ANZIANO et al., 1972; NOGUEIRA et al., 1975; KPINIS et al., 1981; CESTARI et al., 2008).

As proteínas do sistema complemento presentes na circulação sanguínea encontram-se inativadas ou em um baixo nível de ativação espontânea, podendo então ser ativadas pelas vias clássica, alternativa ou das lectinas (SILVA e MOTA, 2003). Brevemente, a via clássica é ativada quando imunoglobulinas das classes IgG e IgM se ligam à superfície do patógeno e formam um complexo enzimático com a molécula do soro C1q (ABBAS e LICHTMAN, 2005). A via alternativa é ativada pela ligação do componente C3b à proteínas na superfície do parasito, sendo portanto independente de anticorpos (ABBAS e LICHTMAN, 2005). Já a via das lectinas, é ativada pela ligação das lectinas MBL (*Mannan-Binding Lectin*) e ficolinas presentes no soro, a resíduos de manose e outros carboidratos da superfície do parasito (JI et al., 1993). Todas essas vias culminam na formação do MAC, que levará a lise osmótica da célula (SILVA e MOTA, 2003).

As formas epimastigotas não infectantes são sensíveis as três vias do sistema complemento (ANZIANO et al., 1972; NOGUEIRA et al., 1975; CESTARI, 2008), entretanto formas tripomastigotas infectantes são resistentes à ação lítica da cascata do complemento (FERREIRA et al., 2004; CESTARI et al., 2008). Essa resistência está relacionada a expressão de proteínas na superfície do parasito, com propriedades semelhantes ao DAF humano (*Decay-Accelerating Factor*), uma proteína de membrana que desestabiliza a estrutura da C3 convertase, ao deslocar C2b de C4b da via clássica e Bb de C3b da via alternativa (ABBAS et al., 2008).

Uma série de moléculas implicadas na resistência à lise mediada pelo complemento com homologia com o DAF foram descritas em *T. cruzi*, permitindo ao parasito infectar as células hospedeiras com sucesso. Um exemplo é a glicoproteína T-DAF (*Trypomastigota Decay-Accelerating Factor*) que foi identificada e caracterizada em formas tripomastigotas, sendo capaz de inibir a lise pelas vias alternativa e clássica pelo mesmo mecanismo descrito para DAF (JOINER et al., 1988; TAMBOURGI, 1993). Norris et al. (1989) identificaram uma glicoproteína de 160 kDa em formas tripomastigotas da cepa Y, denominada gp160. Essa proteína é capaz de se ligar a C3b e C4b acelerando a dissociação da C3 convertase e, portanto prevenindo a lise tanto pela via clássica quanto pela via alternativa. Entretanto, propõem-se que na presença de anticorpos anti-gp160, a ligação de gp160 a C3b é bloqueada, permitindo a formação de C3 convertase e subsequente lise do parasito. Essa característica tem sido utilizada como parâmetro em ensaios de lise mediada pelo complemento, os quais são úteis para mensurar a cura parasitológica pós-tratamento, uma vez que o resultado do ensaio de lise torna-se gradualmente negativo após a quimioterapia específica (KRETTLI e BRENER, 1982; KRAUTZ et al., 2000).

Uma outra proteína envolvida na resistência a lise pelo complemento é calreticulina (TcCRT). Esta proteína foi descrita em formas tripomastigotas, sendo capaz de se ligar a C1q inibindo a lise pela via clássica. TcCRT também foi capaz de se ligar as lectinas MBL, impedindo a ligação destas com a resíduos de manose, sugerindo uma inibição da via das lectinas (FERREIRA et al., 2004). Recentemente, foi demonstrado que a proteína CRIT (*Complement C2 Receptor Inhibitor Trispanning*) expressa exclusivamente em formas tripomastigotas de *T. cruzi* II, tem a capacidade de se ligar ao componente C2 e inibir a formação da C3 convertase das vias clássica e lectina (CESTARI et al., 2008).

Durante a fase aguda da doença de Chagas ocorre uma síntese sistêmica de citocinas pró-inflamatórias, que são responsáveis por ativar componentes da imunidade inata, como células NK e macrófagos (ORTIZ-ORTIZ et al., 1976; LIEKE et al., 2006). A função protetora das células NK está ligada à produção da IFN- $\gamma$  e ativação de macrófagos (GAZINELLI et al., 1992, CARDILLO et al., 1996).

As formas tripomastigotas ao serem fagocitadas por macrófagos se diferenciam em formas amastigotas, tendo a sua sobrevivência determinada pelo estado de ativação do macrófago. Dessa forma, macrófagos ativados por IFN- $\gamma$  são capazes de destruir parcialmente os parasitos (GAZZINELLI et al., 1992; SANTIAGO et al., 2005). Quando ativados, os macrófagos produzem enzimas proteolíticas nos fagolisossomos, sendo também capazes de produzir espécies reativas de oxigênio (ROS). Os macrófagos também produzem óxido nítrico (NO), pela ação da enzima óxido nítrico sintase tipo 2 (NOS2), responsável por catalisar a conversão da L-arginina e L-citrulina em NO (MURAD, 1994).

A ativação do sistema imune inato está aparentemente envolvida na resistência do hospedeiro ao *T. cruzi*. A síntese de IL-12 e TNF- $\alpha$  por macrófagos ativa células NK que passam a produzir IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ . Essas citocinas favorecem a diferenciação de linfócitos T CD4<sup>+</sup> com o fenótipo secretório de células Th1, que consiste na principal população celular produtora de IFN- $\gamma$ , razão pela qual uma onda de ativação de células Th1 ocorre primeiro na infecção chagásica, predominando no início da fase aguda (ZHANG e TARLETON, 1996). Os macrófagos ativados pelo INF- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  irão produzir NO, responsável pelo controle parcial da replicação do parasito na fase aguda da doença (VESPA et al., 1994; ALIBERTI et al., 1996; HOLSCHEER et al., 1998).

A resposta imune adquirida, mediada por linfócitos T CD4<sup>+</sup>, linfócitos T CD8<sup>+</sup> e pelos anticorpos produzidos pelos linfócitos B, é essencial para o controle da parasitemia e para a sobrevivência do hospedeiro. Embora esse controle seja parcial, não protegendo o hospedeiro contra re-infecções (TARLETON et al., 1992; ROTTENBERG et al., 1996).

Estudos da resposta imune humoral durante a infecção por *T. cruzi* demonstram que anticorpos estão envolvidos na defesa do hospedeiro contra o *T. cruzi*. No início da infecção, o parasito induz uma resposta imune humoral poli-isotípica com produção de IgM e IgG (BOUHDID et al., 1994), sendo que em sua maioria, reconhecem o epítipo galactosil  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 3) galactose, presente nas glicoproteínas

ancoradas na membrana do parasito por GPI (GAZZINELLI et al., 1991; ALMEIDA et al., 1994). Com a evolução do quadro, o nível de parasitemia será modulado principalmente por anticorpos da classe IgG que começam a surgir a partir da segunda semana de infecção e alcançam seus níveis máximos ao fim da terceira ou quarta semana, assim permanecendo nos indivíduos não curados até o fim da vida (KRETTLI e BRENER, 1982; BOUHDID et al., 1994).

Linfócitos T CD4<sup>+</sup> com fenótipo Th1 possuem diferentes funções na resistência ao *T. cruzi*, como a secreção de INF- $\gamma$ , importante citocina envolvida na ativação de macrófagos (SILVA et al., 1992). Além disso, os linfócitos Th1 são responsáveis por ativar linfócitos T CD8<sup>+</sup>, mediado pelas citocinas IL-2 e INF- $\gamma$  (BRENER e GAZZINELLI, 1997). De fato, a ativação da atividade citotóxica em linfócitos T CD8<sup>+</sup> durante a doença de Chagas experimental é bloqueada pela redução dos níveis de linfócitos T CD4<sup>+</sup>. A ativação policlonal de linfócitos B também é completamente inibida pela depleção de linfócitos T CD4<sup>+</sup> (MINOPRIO et al., 1986).

A necessidade de linfócitos T CD8<sup>+</sup> na defesa está relacionada com a capacidade do parasito infectar qualquer tipo celular do hospedeiro, inclusive células que só expressam MHC da classe I (NICKELL et al., 1993; ABBAS et al., 2008). Por essa razão, linfócitos T CD8<sup>+</sup> constituem um dos principais grupos de células responsável pelo controle da replicação de *T. cruzi in vivo* (BRENER e GAZZINELLI, 1997).

Achados imunológicos sugerem que a doença de Chagas é provocada por cepas da linhagem TcII. Di Noia e colaboradores (2002) identificaram uma glicoproteína de superfície da família das mucinas em *T. cruzi*, denominada TSSA (*Tripomastigote Small Surface Antigen*), a qual é altamente imunogênica. TSSA é codificada por dois alelos diferentes, sendo que o alelo *tssa-I* é restrito a cepas TcI e *tssa-II* é restrito a cepas TcII. Por essa razão, TSSA pode ser utilizada como marcador imunológico para a identificação da linhagem causadora da doença de Chagas a partir de amostras de soro. A análise de 460 soros de pacientes provenientes do Brasil, Argentina e Chile resultou em alta prevalência de anticorpos que reconhecem TSSA-II, sendo que uma pequena proporção apresentou reconhecimento misto (anticorpos anti-TSSA-I e anti-TSSA-II), o que sugere a existência de casos de co-infecção por cepas TcI/TcII (DI NOIA et al., 2002). Em concordância com tais resultados, Freitas e colaboradores (2005) analisaram amostras de tecido (esôfago, coração e cólon) de 25 pacientes e identificaram



somente cepas do grupo TcII. Essa foi a primeira constatação direta que parasitos do grupo TcII são os agentes causadores das lesões teciduais da doença de Chagas no Brasil.

Durante o surto de DCA em Santa Catarina, análises moleculares realizadas no laboratório de Protozoologia identificaram linhagens mistas TcI/TcII em cepas isoladas de triatomíneos da espécie *Triatoma tibiamaculata*, enquanto que em cepas isoladas de pacientes foi encontrada somente a linhagem TcII (STEINDEL et al., 2008). A identificação de cepas somente do grupo TcII em pacientes na fase crônica é uma característica descrita em estudos realizados com amostras de pacientes provenientes de países do Cone Sul (FERNANDES et al. 1998; ZINGALES et al. 1998; DI NOIA et al., 2002; FREITAS et al., 2005; FERNANDES, 2008; D'ÁVILA et al., 2009).

Neste sentido, vários trabalhos têm mostrado que no Brasil e em países ao sul da bacia amazônica, a maioria das cepas isoladas de pacientes chagásicos crônicos são do grupo TcII, enquanto que cepas mistas TcI/TcII são encontradas em pacientes na fase aguda (LUQUETTI et al., 1986; DI NOIA et al., 2002). Corroborando essas informações, alguns trabalhos relatam que cepas isoladas de pacientes na fase aguda são geneticamente mais complexas do que cepas isoladas de pacientes crônicos (MACEDO e PENA, 1998; DEVERA et al., 2003).

Muitas das cepas de *T. cruzi* que circulam na natureza são multiclonais, sendo compostas por populações de clones dos grupos TcI e TcII (MEJÍA e TRIANA, 2005; BOTERO et al., 2007). No entanto, a composição destas linhagens pode mudar com o tempo de infecção, uma vez que durante a fase crônica da doença, certas populações são provavelmente eliminadas devido a fatores imunológicos do hospedeiro (FRANCO et al., 2003). Em sistemas *in vitro*, clones com um menor tempo de duplicação podem ser selecionados daqueles que apresentam um tempo de duplicação longo (MANGIA, 1995). Portanto, além de fatores imunológicos do hospedeiro, características intrínsecas do parasito como capacidade multiplicativa e infectiva podem estar envolvidas na seleção de determinadas populações do parasito no hospedeiro vertebrado.

Baseado nessas evidências é possível que quando o homem é infectado por cepas mistas de *T. cruzi*, clones da linhagem TcII poderiam ser selecionadas favoravelmente pelo hospedeiro por mecanismos pouco compreendidos. É possível ainda que as cepas

pertencentes às linhagens TcI e/ou TcII apresentem diferenças nas suas taxas de infecção e taxa de multiplicação. O conhecimento destes mecanismos poderá trazer informações importantes acerca da patogênese da doença de Chagas.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo geral

Estudar possíveis mecanismos envolvidos na seleção diferencial de populações do grupo TcII em infecções humanas ocasionadas por cepas mistas TcI/TcII de *T. cruzi*, caracterizando cepas isoladas durante o surto de doença de Chagas aguda em Santa Catarina em 2005.

### 2.2. Objetivos específicos

- ✓ Avaliar a variabilidade intra-específica entre cepas de *T. cruzi* isoladas durante o surto de doença de Chagas aguda;
- ✓ Determinar os subgrupos das cepas de *T. cruzi* isoladas de pacientes utilizando os marcadores mini-exon, 24Sα rDNA e 18S rDNA;
- ✓ Determinar se as cepas do grupo TcI, TcII e mistas diferem na sensibilidade à lise pelo complemento;
- ✓ Avaliar a influência dos soros humanos chagásico inativado e normal na interação entre *T. cruzi* e macrófagos murinos;
- ✓ Determinar se as cepas dos grupos TcI, TcII e mistas diferem na taxa de infecção, número médio de amastigotas por célula, tempo de duplicação e tempo para conclusão do ciclo biológico em macrófagos murinos;
- ✓ Avaliar a expressão da glicoproteína gp82 em cepas dos grupos TcI e TcII e mistas;
- ✓ Avaliar a susceptibilidade das cepas Y, SC96 e SC90 aos mecanismos tripanocidas de macrófagos ativado com IFN- $\gamma$ ;
- ✓ Verificar a ocorrência de seleção de populações de *T. cruzi* em macrófagos murinos e macrófagos humanos.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. Obtenção e manutenção de cepas de *T. cruzi*

Foram utilizadas diferentes cepas de *T. cruzi* isoladas de pacientes, reservatórios e vetores durante o surto de doença de Chagas aguda no município de Navegantes no Estado de Santa Catarina em 2005 (SC90-SC102). As cepas SC28 (grupo TcI), Y (grupo TcII) e SC58 (*T. rangeli*) foram utilizadas como controles nas reações de PCR, ensaios de lise pelo complemento, ensaios de infecção e Western blot. A origem das cepas está descrita na Tabela 1 (Adaptada de STEINDEL et al., 2008).

**Tabela 1.** Cepas de *Trypanosoma cruzi* utilizadas nos experimentos de caracterização biológica e molecular

Parasito	Cepas	Hospedeiro	Grupo
<i>T. rangeli</i>	SC58	<i>Echymys dasythrix</i>	-
<i>T. cruzi</i>	SC28	<i>Didelphis aurita</i>	TcI
	Y	Humano (fase aguda)	TcII
	SC90	<i>D. aurita</i>	TcI/TcII
	SC91	<i>D. albiventris</i>	TcI/TcII
	SC92-SC93	<i>Triatoma tibiamaculata</i>	TcI/TcII
	SC94-SC102	Humano (fase aguda)	TcII

As cepas SC90-SC102 utilizadas neste estudo foram isoladas durante o surto de DCA em 2005.

Inicialmente, as cepas utilizadas neste estudo foram reativadas em meio NNN + LIT (McNeal, Novy & Nicolle + Liver Infusion Tryptose), um meio bifásico que possui como fase sólida o meio Àgar-sangue (NaCl 0,6%; Agar 1,4%; sangue humano defibrinado e inativado 15%) e como fase líquida o meio LIT (NaCl 0,4%; KCl 0,04%; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,8%; Glicose 0,2%; Triptose 0,5%; Infuso de fígado 0,5%, Hemina 0,0025%; Soro Fetal Bovino 20%; Penicilina 100 unidades.mL<sup>-1</sup>; Estreptomina 100 µg.mL<sup>-1</sup>; Ampicilina 10 mg.mL<sup>-1</sup>; Gentamicina 10 mg.L<sup>-1</sup>; pH 7,2). A partir do primeiro repique, procedeu-se novos repiques em meio LIT até se obter uma cultura com grande densidade de parasitos e livre de resíduos de sangue humano.

A cultura foi submetida a condições de exaustão de nutrientes em meio LIT, visando promover a diferenciação de formas epimastigotas em formas tripomastigotas metacíclicas (CAMARGO, 1964).

### 3.2. Extração de DNA

Para extração de DNA total, aproximadamente cinco mililitros de cultura de *T. cruzi* em fase exponencial de crescimento foram centrifugados a 1500 g por 10 minutos, seguida por duas lavagens em PBS pH 7,4. O sedimento contendo parasitos foi ressuspensionado em tampão de extração (Tris-HCl 100 mM, pH 7,4; EDTA 25 mM; NaCl 10 mM; SDS 1%; proteinase K 50  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) e incubado a 65°C por 2 horas, sendo homogeneizado por inversão a cada 10 minutos. A extração do DNA total das cepas de *T. cruzi* pelo método fenol-clorofórmio foi realizada segundo Sambrook et al. (1989). Os ácidos nucléicos foram precipitados em isopropanol na proporção 1:1 e incubados a -20°C por 2 horas. A seguir, o material foi centrifugado a 14.500 g por 30 minutos e o sedimento foi lavado em etanol 70% gelado e seco à temperatura ambiente por 30 minutos. O sedimento foi então ressuspensionado em 50  $\mu\text{L}$  de água Milli-Q contendo RNase (10 mg/mL) e incubado por 1 hora a 37°C seguido por estocagem em freezer a -20°C. A quantidade de DNA foi estimada por comparação com padrões com quantidades conhecidas em gel agarose 0,8% corado com brometo de etídio e por espectrofotometria.

### 3.3. Análise da variabilidade genética das cepas de *T. cruzi* por RAPD

O estudo de variabilidade intra-específica das cepas de *T. cruzi* foi realizado pela técnica de RAPD segundo Steindel et al. (1993). Inicialmente foram testados 10 oligonucleotídeos, sendo selecionados os oligonucleotídeos 3303, 3304, 3306, 3307, AB1 e AB5 (Tabela 2), os quais geraram um maior número de amplicons polimórficos e reprodutíveis. As reações de RAPD foram realizadas em um volume final de 10  $\mu\text{L}$  contendo 10 ng de DNA; 200  $\mu\text{M}$  de cada dNTP (dGTP, dCTP, dATP e dTTP); 10  $\mu\text{M}$  de cada oligonucleotídeo; 10 mM de Tris-HCl pH 8,5; 50 mM KCl; 1,5 mM  $\text{MgCl}_2$  e 1 U de Taq DNA polimerase.

As amostras de DNA foram amplificadas utilizando o termociclador Mastercycler Plus® (Eppendorf, Hamburg), usando as seguintes condições: desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, 30 ciclos consistindo de uma etapa de desnaturação a 94°C por 30 segundos, ligação a 30°C por 2 minutos, extensão a 72 °C por 1 minuto. Após o 35º ciclo, foi realizado uma extensão final de 72 °C por 5

minutos. Reações controle sem DNA foram realizadas e cada reação repetida três vezes a fim de confirmar a reprodutibilidade da técnica.

Os fragmentos de DNA amplificados foram resolvidos em gel de poliacrilamida 6%. Em seguida, os géis foram fixados em etanol 10% e ácido acético 0,5% por 20 minutos, corados com 0,2% de nitrato de prata por 30 minutos e revelados com 0,75 M de NaOH e 0,1 M de formaldeído por 10 minutos, conforme descrito por Santos (1993). Os géis foram digitalizados usando o sistema de fotodocumentação Macro Vue UV 20<sup>®</sup> (Hoefer Pharmacia Biotech Inc., San Francisco).

Para a análise dos dados, a cada fragmento de DNA com mobilidade eletroforética diferente foi designada um número de posição e atribuído valor “1” para presença e “0” para ausência do fragmento. A partir dessa análise foi gerada uma matriz binária, a qual foi submetida a análise de agrupamento pelo método UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method Using Arithmetic Means*) utilizando o programa TreeView (PAGE, 2000), sendo empregado o coeficiente de similaridade de Dice ( $S = 2a / 2a + b + c$ ) onde, ‘a’ representa o número de fragmentos compartilhadas entre o organismo 1 e 2, ‘b’ representa o número de fragmentos exclusivos do organismo 1 e ‘c’ representa o número de fragmentos exclusivos do organismo 2 (DICE, 1945). Nos dendogramas gerados foi criada a linha de fenon que representa a média dos valores de similaridade entre os pares e indica o ponto de referência para a divisão dos organismos em grupos separados (SNEATH e SOKAL, 1962).

**Tabela 2.** Iniciadores utilizados nas reações de RAPD

<b>Iniciador</b>	<b>Sequência de bases (5'-3')</b>	<b>Referência</b>
3303	TCA CGA TGC A	STEINDEL et al. (1993)
3304	GCA CTG TCA	STEINDEL et al. (1993)
3306	AGC ATC TGT T	STEINDEL et al. (1993)
3307	AGT GCT ACG T	STEINDEL et al. (1993)
AB1	ACG GAT CCT G	LEE et al. (2000)
AB5	GGC ACT GAG G	LEE et al. (2000)

### 3.4. Genotipagem das cepas de *T. cruzi*

As cepas isoladas dos pacientes (SC94-SC102) foram genotipadas segundo metodologia proposta por Brisse et al. (2001). Para a amplificação da região não transcrita do gene do mini-exon, região

divergente correspondente ao terminal 3' do gene 24Sα rDNA e do domínio de tamanho variável do gene 18S rDNA foram utilizados os oligonucleotídeos TC/TC1/TC2; D71/D72; V1/V2 (Invitrogen) (Tabela 3) respectivamente. As reações de amplificação foram realizadas em volumes de 10 µL contendo 10 ng de DNA molde; 10 µM de cada oligonucleotídeo; 10 mM de Tris-HCl, pH 8,5; 50 mM KCl; 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>; 200 µM de cada dNTP (dGTP, dCTP, dATP e dTTP) e 1 U de Taq DNA polimerase.

As amostras de DNA foram amplificadas utilizando o termociclador Mastercycler Plus<sup>®</sup> (Eppendorf, Hamburg). A amplificação da região não transcrita do gene do mini-exon foi realizada nas seguintes condições: desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, 30 ciclos consistindo de um passo de desnaturação a 94°C por 30 segundos, um passo de ligação a 55°C por 30 segundos, seguido por um passo de extensão a 72°C por 1 minuto. A amplificação da região divergente do gene 24Sα rDNA foi realizada nas seguintes condições: desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, desnaturação a 94°C por 1 minuto, ligação a 60°C por 1 minuto, seguido extensão a 72°C por 1 minuto, sendo as reações interrompidas após o 30º ciclo. A amplificação do gene 18S rDNA foi realizado nas seguintes condições: uma desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, desnaturação a 94°C por 1 minuto, ligação a 60 °C por 1 minuto, seguido por um passo de extensão de 72 °C por 1 minuto, sendo as reações interrompidas após o 30º ciclo. Para a amplificação das três regiões citadas, após o 30º ciclo foi realizada uma extensão final de 72 °C por 5 minutos. Em todas as PCRs foram realizadas reações controle sem DNA com o propósito de verificar a presença de possíveis contaminantes.

Os fragmentos de DNA obtidos foram resolvidos em gel de poliacrilamida 8% e corados com nitrato de prata como descrito no item anterior. Os géis foram fotodocumentados utilizando o sistema Macro Vue UV 20<sup>®</sup> (Hoefler Pharmacia Biotech Inc., San Francisco).

**Tabela 3.** Iniciadores utilizados para genotipagem das cepas de *Trypanosoma cruzi*

Iniciador	Seqüência de bases (5'-3')	Referência
TC	CCC CCC TCC CAG GCC ACA CTG	SOUTO et al. (1996)
TC1	GTG TCC GCC ACC TCC TTC GGG CC	SOUTO et al. (1996)
TC2	CCT GCA GGC ACA CGT GTG TGT G	SOUTO et al. (1996)
D71	AAG GTG CGT CGA CAG TGT GG	SOUTO et al. (1996)
D72	TTT TCA GAA TGG CCG AAC AGT	SOUTO et al. (1996)
V1	CAA GCG GCT GGG TGG TTA TTC CA	CLARK e PUNG (1994)
V2	TTG AGG GAA GGC ATG ACA CAT GT	CLARK e PUNG (1994)

### 3.5. Ensaios de lise mediada pelo sistema complemento

#### 3.5.1. Soro normal

O soro humano normal fresco (SN) foi obtido de um único doador no dia em que os ensaios de lise mediada pelo sistema complemento foram executados. Quando necessário os soros foram inativados por 1 hora a 56°C.

#### 3.5.2. Soro chagásico crônico

Os soros humanos chagásicos crônicos (SC) foram obtidos do banco de soros do Laboratório de Protozoologia. Foi realizada uma mistura de dez soros provenientes de pacientes chagásicos crônicos que apresentaram título superior a 160 pela técnica Imunofluorescência Indireta. A mistura de soros foi inativada por 1 hora a 56°C e congelada a -20°C até o momento do uso.

#### 3.5.3. Ensaios de lise mediada pelo sistema complemento com formas tripomastigotas e epimastigotas de *T. cruzi*

Os ensaios de lise pelo complemento foram realizados com formas epimastigotas e tripomastigotas. As formas epimastigotas das cepas Y, SC90, SC92, SC93 e SC94, colhidas na fase exponencial de crescimento em meio LIT, foram centrifugadas a 2000 g por 10 minutos, lavadas duas vezes e suspendidas em PBS pH 7,4 na concentração de  $1 \times 10^6$  parasitos.mL<sup>-1</sup>. Já as formas tripomastigotas de cultura de células das cepas Y, SC90, SC92, SC93 e SC94 foram obtidas do sobrenadante de cultura de células VERO. As células mantidas em garrafas de cultura



com meio DMEM suplementado com 2,5% de soro fetal bovino (SFB), foram inicialmente infectadas com tripomastigotas metacíclicos obtidos da cultura de parasitos no final da fase estacionária.

Como fonte de complemento foram utilizados soro normal fresco ou soro de paciente chagásico inativado suplementado com soro normal fresco. Os controles consistiram em soro chagásico inativado ou soro chagásico inativado suplementado com soro normal inativado.

Os parasitos foram incubados com o mesmo volume das diferentes combinações de soros na diluição 1:2 por 37°C por 1 hora, de modo que  $1,5 \times 10^5$  parasitos em 150  $\mu\text{L}$  de PBS pH 7,4 foram misturados com 150  $\mu\text{L}$  de soro puro (1:2). Após o tempo de incubação, os tubos foram mantidos em banho de gelo e em seguida foi determinado o número de parasitos sobreviventes em câmara de Neubauer em microscópio óptico.

### **3.6. Curvas de crescimento**

O estudo da dinâmica de crescimento das formas epimastigotas das cepas Y, SC90, SC91, SC92, SC93, SC95 e SC96 foi realizado inoculando-se  $5 \times 10^6$  parasitos.mL<sup>-1</sup> em 5 mL de meio LIT. Contagens em quintuplicata foram realizadas durante 10 dias em câmara de Neubauer em microscópio óptico.

### **3.7. Ensaios de interação *T. cruzi*-macrófagos murinos**

#### **3.7.1. Obtenção e manutenção de macrófagos murinos derivados de medula óssea**

Para o estabelecimento da cultura de macrófagos murinos derivados de medula óssea, utilizou-se camundongos Balb/C com 30 dias, provenientes do Biotério-UNIVALI da Universidade do Vale do Itajaí.

Os procedimentos experimentais basearam-se na metodologia proposta por Weischenfeldt e Porse (2008). Os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e os ossos da perna (fêmur e tíbia) foram removidos e coletados em PBS pH 7,4 suplementado com 10 U.mL<sup>-1</sup> de penicilina e 10  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  de estreptomicina. Em seguida, as extremidades dos ossos foram cortadas, a medula óssea foi coletada e centrifugada a 1000 g por 5 minutos. O sedimento contendo os promonócitos foi suspenso em 90% de SFB e 10% dimetilsulfóxido

(DMSO) e em seguida submetido ao congelamento em nitrogênio líquido.

Após o descongelamento, as células foram cultivadas em meio DMEM, suplementado com 10% de SFB, 10 U.mL<sup>-1</sup> de penicilina, 10 µg.mL<sup>-1</sup> de estreptomicina e 30% de sobrenadante resultante do cultivo da linhagem celular L929. Os promonócitos foram mantidos em estufa umidificada a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Após o sétimo dia de cultivo, os promonócitos já diferenciados em macrófagos, foram tripsinizados e distribuídos em placas de 96 poços na concentração de 5 x 10<sup>4</sup> células por cada poço.

### **3.7.2. Infecção de macrófagos murinos com *T. cruzi***

Os macrófagos foram infectados com formas tripomastigotas de cultura de células das cepas Y, SC90, SC91, SC92, SC93, SC95 e SC96 as quais foram previamente incubadas por 1 hora a 37°C com soro chagásico inativado (SCI), soro normal (SN) e soro normal inativado (SNI) na diluição 1:2. A seguir, os parasitos foram centrifugados, lavados em PBS pH 7,4 e utilizados para infecção das monocamadas de macrófagos por 4 horas a 37°C, obedecendo-se a proporção de 1 parasito para cada célula (1:1). Como controle, foi utilizado tripomastigotas sem nenhum tratamento. Após o período de 4 horas, foi realizada a troca do meio de cultura (DMEM, 10% SFB e antibióticos), com o objetivo de remover os parasitos que não foram internalizados, sendo as células novamente incubadas a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. A infecção foi monitorada diariamente em microscópio invertido e interrompida após o contato inicial de 4 horas (tempo 0), 24, 48, 72 horas e após a conclusão do ciclo biológico.

O sobrenadante das culturas foi removido e as placas foram então lavadas em PBS pH 7,4, sendo imediatamente secas com jato de ar, fixadas com metanol por 2 minutos e coradas com solução Giemsa. Para a determinação da porcentagem de células infectadas e o número médio de amastigotas intracelulares, foram contadas aleatoriamente 200 células por poço em microscópio óptico em objetiva de 40 vezes (CHANG, 1980).

Os experimentos foram realizados com duas repetições em triplicatas, sendo as médias analisadas pelo teste T ou análise de variância (ANOVA), utilizando o programa Graph Prism Instat 3<sup>®</sup>. A diferença mínima significativa entre as médias foi calculada pelo teste de Tukey com nível de significância de 0,05.

### 3.7.3. Cálculo do tempo de duplicação intracelular de cepas *T. cruzi*

O tempo de duplicação das diferentes cepas de *T. cruzi* foi determinado usando a seguinte fórmula (JAWETZ et al., 1991):

$$T_d = \frac{\text{Ln } 2 (t_1 - t_0)}{2,3 \log(N_1/N_0)}$$

Onde:

Td-tempo de duplicação

t<sub>1</sub>-tempo final de observação

t<sub>0</sub>-tempo inicial de observação

N<sub>1</sub>-número de parasitos por célula após 72 horas de interação

N<sub>0</sub>-número de parasitos por célula após 24 horas de interação

### 3.8. Análise da expressão de gp82 por Western Blot

As análises de expressão da glicoproteína gp82 por Western blot foi realizada com formas tripomastigotas metacíclicas purificadas a partir de cultura em fase estacionária segundo protocolo descrito por Souza (1983). A resina de troca iônica DE-52 celulose (Whatman) foi hidratada em água destilada, seguida por lavagens em tampão fosfato (PS) 1X pH 8,0 (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.12H<sub>2</sub>O 0,34%; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O 0,069%; NaCl 0,425%) pH 8,0. Após isso, cinco mililitros de resina em tampão PS 1X pH 8,0 foram empacotados em uma seringa de 10 mL. A coluna foi equilibrada com tampão PS 1X pH 8,0.

Sobrenadante de cultura envelhecida em meio LIT das cepas Y, SC90, SC91, SC92, SC93, SC95 e SC96 contendo aproximadamente 70% de tripomastigotas foi lavado uma vez em tampão PS 1X pH 8,0. A suspensão de células foi aplicada na coluna de DEAE celulose e o material coletado foi concentrado por meio de centrifugação a 2000 g por 10 minutos e ressuspendido em PBS pH 7,4.

Após a obtenção das formas tripomastigotas metacíclicas purificadas, os parasitos foram lisados em tampão de lise (NaCl 50 mM; Tris HCl pH 8,0 200 mM; detergente nonidet P-40 1%). O lisado celular foi submetido a centrifugação a 12.000 g por 20 minutos para remoção

de restos celulares, sendo coletado o sobrenadante. Este teve a quantidade de proteínas totais mensuradas pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976).

Trinta microgramas do extrato protéico total foram aquecidas a 95°C por 5 minutos em tampão de amostra sob condições redutoras (Tris-HCl pH 6,8 100 mM; SDS 2%; Glicerol 20%; azul de bromofenol 0,2%;  $\beta$ -mercaptoetanol 2%) e submetidas à separação eletroforética (25 mA) em gel de poliacrilamida (gel de concentração 5%, gel de separação 10%). Após isso, as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose (Amersham, UK) em tampão de transferência (Trizma base 125 mM; Glicina 190 mM; Metanol 20%) usando o sistema Semi-Dry Transfer Cell (BIO-RAD).

Após a transferência, a membrana foi corada com Ponceau-S (Ponceau 0,1% e ácido acético 10%). A membrana foi descorada em água destilada e em seguida foi bloqueada em solução Blotting Buffer (Tris-HCl pH 7,4 25 mM; NaCl 0,15 mM; Tween 80 0,1%) contendo 5% de leite em pó desnatado por 2 horas à temperatura ambiente. Após este tempo, a membrana foi incubada com os AcMo anti-gp82 (3F6) (gentilmente cedidos pelos professores da UNIFESP Nobuco Yoshida e Renato Mortara) e anti- $\alpha$ -tubulina diluídos adequadamente em solução de Blotting Buffer contendo 2,5% de leite em pó desnatado por 1 hora à temperatura ambiente, seguida pela incubação com o anticorpo secundário (IgG de camundongo conjugado a peroxidase) 1 hora a temperatura ambiente. A revelação da membrana foi feita por quimioluminescência, utilizando o sistema ECL (Amersham, UK).

### **3.9. Infecção de macrófagos murinos ativados com IFN- $\gamma$**

Macrófagos murinos obtidos como descrito no item 3.7.1. foram infectados com formas tripomastigotas de cultura de células das cepas Y, SC90 e SC96 por 4 horas, obedecendo-se a proporção de 1 parasito para cada célula (1:1). As infecções foram realizadas na presença e ausência de rIFN- $\gamma$  murino (2, 20, 200 U/mL). Após esse período, foi realizado a troca do meio de cultura (DMEM, 10% SFB e antibióticos) com ou sem a adição de IFN- $\gamma$ , sendo as células incubadas a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. As infecções foram monitoradas diariamente em microscópio invertido e interrompidas após o contato inicial de 4 horas (tempo 0) e após 24, 48 e 72 horas.

Em alguns experimentos, as células foram tratadas com 1 mM N<sup>G</sup>-monometil-L-arginina (L-NMMA), objetivando inibir a atividade da

enzima óxido nítrico sintase induzida (NOS2). O sobrenadante das placas foi removido e as placas foram coradas com Giemsa e avaliadas como descrito no item 3.6.2.

### **3.10. Caracterização genotípica de cepas mistas antes e após infecção de macrófagos murinos**

#### **3.10.1. Padronização da PCR semiquantitativa**

Para a padronização da PCR semiquantitativa baseada no perfil molecular da região do espaçador não transcrito do gene do mini-exon, realizou-se o estudo da cinética da reação com os oligonucleotídeos TC1: 5' ACACTTTCTGTGGCGCTGATCG 3'; TC2: 5' TTGCTCGCA CACTCGGCTGCAT 3'; TC3: 5' CCGCGWACAACCCCTMATAAA AAT 3'; TR: 5' CCTATTGTGATCCCCATCTTCG 3'; ME: 5' TACC AATATAGTACAGAACTG 3' (FERNANDES et al., 2001).

Para determinar o melhor tempo de reação na fase exponencial, em que era possível a visualização das diferentes proporções dos grupos TcI e TcII numa cepa mista, uma mistura equimolar dos DNAs das cepas Y e SC28 foi utilizada, sendo a reação interrompida nos ciclos 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30 e 32.

As reações de amplificação foram realizadas em volumes de 10 µL contendo 10 ng de DNA; 10 µM de cada oligonucleotídeo; 10 mM de Tris-HCl, pH 8,5; 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 µM de cada dNTP (dGTP, dCTP, dATP e dTTP) e 1 U de Taq DNA polimerase (LGC Biotecnologia).

As amostras de DNA foram amplificadas utilizando o termociclador Mastercycler Plus<sup>®</sup> (Eppendorf, Hamburg). A amplificação foi realizada nas seguintes condições: uma etapa de desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, desnaturação a 94°C por 30 segundos, ligação a 60°C por 30 segundos, seguido por extensão a 72 °C por 1 minuto, sendo as reações interrompidas nos ciclos supracitados. Após o último ciclo, as reações sofreram um passo de extensão final a 72 °C por 5 minutos. Os fragmentos de DNA obtidos foram resolvidos em gel de poliacrilamida 8% e corados com brometo de etídio. Os géis foram fotodocumentados utilizando o sistema Macro Vue UV 20<sup>®</sup> (Hoefler Pharmacia Biotech Inc., San Francisco).

### **3.10.2. Caracterização genotípica de cepas mistas por PCR semiquantitativa**

As cepas SC92, SC93 (mistas naturais) e SC90 + SC96 (mista artificial) foram utilizadas para infectar macrófagos murinos com o objetivo de verificar a existência de uma possível seleção nessas células. Assim, a determinação da proporção de cada grupo TcI e TcII presente nas cepas mistas antes de infectar macrófagos e após a conclusão do ciclo biológico foi estimada por PCR semiquantitativa. As imagens obtidas foram analisadas pelo programa Scion Image<sup>®</sup> (Scion Corporation).

### **3.11. Caracterização genotípica de cepas mistas antes e após infecção de macrófagos humanos**

#### **3.11.1. Obtenção e manutenção de macrófagos humanos**

A partir de sangue obtido de indivíduos adultos e saudáveis, os monócitos primários foram isolados por centrifugação em gradiente de densidade (Separador de Linfócitos, Lonza) como descrito por Boyum (1976) com modificações. O sangue foi misturado com igual volume de solução salina (NaCl 0,9%) e adicionado sobre o Separador de Linfócitos. Após a centrifugação a 1500 g por 40 minutos, a camada de células mononucleares foi coletada, sendo submetida a três lavagens em solução salina a 1.500 g por 10 minutos. O total de células viáveis foi ressuspenso em meio RPMI sem soro, para a adesão dos monócitos em placas de 24 poços. As células foram então incubadas a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> por 40 minutos, após este período, o sobrenadante contendo linfócitos foi removido e adicionado novo meio RPMI com 5% SFB. Os monócitos primários humanos foram cultivados em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> por 7 dias, quando a maioria das células se encontrava completamente diferenciadas em macrófagos.

#### **3.11.2. Infecção de macrófagos humanos com *T. cruzi***

As monocamadas de macrófagos humanos foram infectados após 7 dias de cultivo com formas tripomastigotas metacíclicas da cepa mista SC92 obtidas de cultura em fase estacionária e purificados em coluna de DEAE celulose, obedecendo-se a proporção de 5 parasitos para cada célula (5:1). Após 4 horas de interação, foi realizada a troca do meio de

cultura (RPMI, 5% SFB e antibióticos), sendo a infecção monitorada diariamente em microscópio invertido até a conclusão do ciclo biológico, período este que correspondeu a 96 de cultivo.

Após a conclusão do ciclo biológico, os parasitos foram coletados e utilizados para infectar outra placa de macrófagos, sendo que este procedimento foi repetido três vezes, ou seja, foram realizadas três passagens seriadas de parasitos da cepa SC92 em macrófagos humanos. Após cada passagem, os parasitos foram coletados para posterior caracterização genotípica por PCR quantitativa (qPCR).

### **3.11.3. Caracterização genotípica de cepas mistas por qPCR**

A extração de DNA foi realizada pelo método fenol-clorofórmio (item 2.2), a partir de parasitos provenientes do sobrenadante de macrófagos infectados com as cepas mistas. O DNA das cepas mistas obtido foi utilizado para estimar as proporções TcI e TcII por qPCR como descrito por Freitas et al. (2005) com modificações.

Todas as reações foram realizadas em triplicata contendo 10 ng de DNA; 10  $\mu$ M dos oligonucleotídeos D71 e D72 (Tabela 2), 5  $\mu$ L de 2x SYBR<sup>®</sup> Green PCR-Master Mix (Applied Biosystems) em volume final de 10  $\mu$ L. A leituras foram realizadas no equipamento StepOne<sup>™</sup> Real-Time PCR System (Applied Biosystems) utilizando a opção 'quantificação absoluta'. As condições de termociclagem foram 50°C por 2 minutos, 95°C por 10 minutos, seguido por 40 ciclos a 95°C por 30 segundos, 60°C por 30 segundos e 72°C por 1 minuto. Após a amplificação, os produtos de DNA foram desnaturados para obtenção da curva de dissociação. A estimativa das proporções dos grupos TcI e TcII foi realizada pela análise dos valores de fluorescência de cada amplicon.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

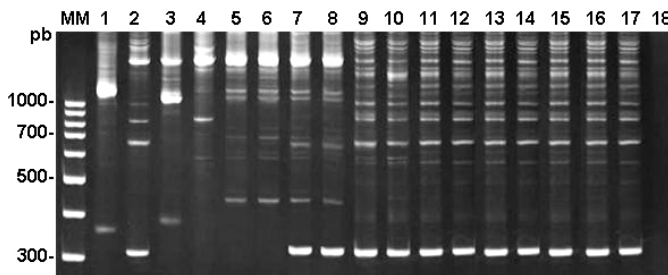
### 4.1. Caracterização molecular das cepas de *T. cruzi* por RAPD

Todas as cepas de *T. cruzi* (SC90-SC102) foram analisadas usando a técnica de RAPD. Essa técnica é amplamente empregada em estudos de diversidade genética de populações de *T. cruzi*, por proporcionar inúmeras vantagens em relação a outras técnicas moleculares, como não requerer o conhecimento prévio da sequência a ser amplificada e por considerar a variabilidade de todo o genoma em análise (STEINDEL et al., 1993; TIBAYRENC et al., 1993).

Foram testados 10 oligonucleotídeos, sendo escolhidos seis iniciadores 3303, 3304, 3306, 3307, AB1 e AB5 por produzirem amplicons polimórficos e reprodutíveis, gerando fragmentos de DNA com tamanhos variando de 300 a 1500 pb. Um total de 60 amplicons foram considerados para a determinação da similaridade genética das cepas em estudo.

As cepas isoladas de gambás (SC90 e SC91) pertencentes ao grupo TcI apresentaram perfil molecular idêntico, indicando baixa variabilidade genética. As cepas mistas isoladas de triatomíneos (SC92 e SC93) apresentaram um perfil molecular misto (TcI/TcII) e idêntico entre si. Já as cepas isoladas de pacientes (SC94-SC102) pertencentes ao grupo TcII geraram um perfil eletroforético complexo e também idêntico entre si (Figura 4).





**Figura 4. Perfil eletroforético representativo de cepas de *Trypanosoma cruzi* caracterizadas por RAPD com o oligonucleotídeo 3303.** Os fragmentos de DNA foram amplificados utilizando o oligonucleotídeo 3303 e separados em gel de poliacrilamida 6%. MM- Marcador molecular; 1- SC58 (*T. rangeli*); 2- Y; 3- SC28; 4- Colombiana; 5- SC90; 6- SC91; 7- SC92; 8- SC93; 9- SC94; 10- SC95; 11- SC96; 12- SC97; 13- SC98; 14- SC99; 15- SC100; 16- SC101; 17- SC102; 18- Controle sem DNA.

A análise de agrupamento permitiu a separação das cepas em quatro grupos (Figura 5, Tabela 4). O grupo A, formado pela cepa SC58 de *T. rangeli*, o grupo B compreendendo as cepas isoladas de pacientes (SC94-SC102), juntamente com a cepa Y, pertencentes ao grupo TcII, o grupo C formado pela cepas TcI (SC90 e SC91) e mistas (SC92 e SC93) e o grupo D compreendendo as cepas SC28 e Colombiana (TcI)

A baixa probabilidade de se moer mais de um exemplar de triatomíneo infectado juntamente com alta similaridade observada entre as cepas isoladas de pacientes, são fatores que sugerem que surto de DCA ocorreu a partir de um único exemplar de barbeiro infectado que contaminou o caldo de cana durante a moagem. Por outro lado, essa alta similaridade genética pode ser explicada pelo fato do isolamento das cepas ter sido realizado 45 dias após a infecção. Esse período pode ter sido suficiente para a seleção de populações do parasito mais adaptadas a sobreviver no hospedeiro humano (OLIVEIRA et al., 1998, 1999; MACEDO et al, 2001). Além disso, a etapa de isolamento do parasito a partir do sangue e sua manutenção em cultura podem levar a ocorrência de seleção clonal, de maneira que as populações disponíveis para as análises moleculares podem ser mais homogêneas e diferir daquelas que realmente causam as manifestações clínicas (MACEDO e PENA, 1998).

Baseados no princípio de seleção de determinadas populações no hospedeiro humano, alguns trabalhos mostram que cepas isoladas de

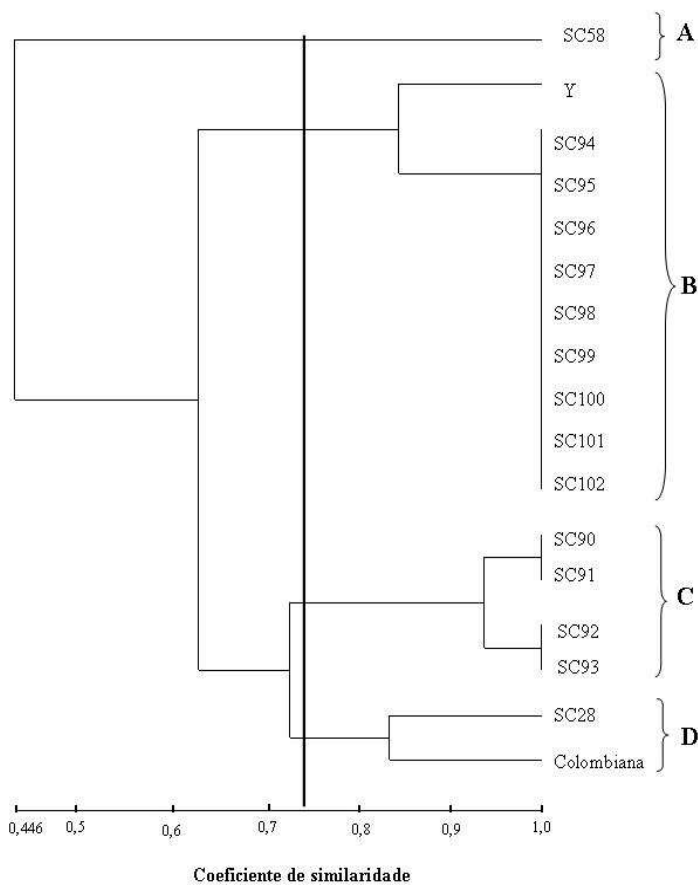
pacientes crônicos apresentam uma menor variabilidade genética quando comparada a cepas isoladas de pacientes em fase aguda (MACEDO e PENA, 1998; DEVERA et al., 2003). A grande similaridade genética observada entre as cepas isoladas de pacientes pode ser ainda atribuída ao predomínio de uma determinada população de parasitos no momento do isolamento (LANA et al., 1996).

O táxon *T. cruzi* exibe um alto grau de variabilidade intra-específica, incluindo aspectos morfológicos (CHAGAS, 1909), comportamento biológico (RISSO et al., 2004; LISBOA et al., 2007), características epidemiológicas (ANONYMOUS, 1999), imunológicas (SANTOS et al., 2009), bioquímicas (RISSO et al., 2004) e moleculares (STEINDEL et al., 1993; 1995; VAGO et al., 1996; LEWIS et al., 2009). Essa grande diversidade genética do *T. cruzi* pode ser explicada pela sua especificidade a hospedeiros (GOMES et al., 1998; LISBOA et al., 2007), ocorrência de recombinação assexual (GAUNT et al., 2003), elementos transponíveis (EL-SAYED et al., 2005; BRINGAUD et al., 2008) e mutações (CERQUEIRA et al., 2008).

Gomes et al. (1998) analisaram 30 cepas de *T. cruzi* isoladas de pacientes em fase crônica utilizando as técnicas de RAPD e SSR-PCR (*Single Sequence Repeat-Anchored Polymerase Chain Reaction*) e observaram uma grande similaridade genética entre cepas de pacientes oriundas de diferentes áreas endêmicas do Brasil. Os autores sugerem que o hospedeiro humano pode selecionar populações a partir de uma população multiclonal circulante na natureza. Resultados semelhantes foram obtidos por D'Ávila e colaboradores (2006) ao estudar 47 cepas isoladas de pacientes chagásicos crônicos usando a técnica de RAPD.

Recentemente, foi proposto a subdivisão do grupo TcI em quatro subgrupos (HERREIRA et al., 2007; FALLA et al., 2009). Luna-Marín et al. (2009) analisaram pelas técnicas de RAPD e ITS-RFLP (*Internal Spacer-Restriction Fragment Length Polymorphism*) 18 cepas provenientes da Colômbia, isoladas de pacientes e vetores. Os autores mostraram que todas as cepas isoladas de pacientes, as quais pertenciam ao grupo TcI, apresentaram um nível de similaridade maior do que aquelas isoladas dos vetores.



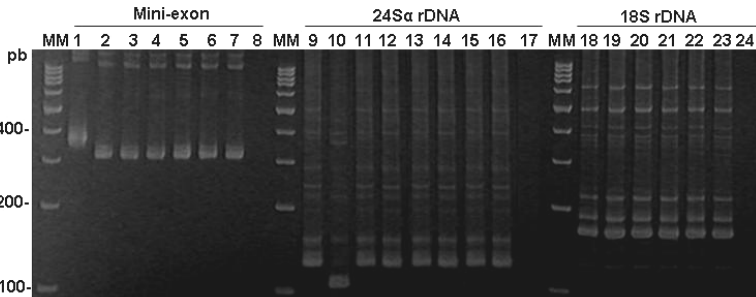


**Figura 5.** Dendrograma obtido a partir dos perfis eletroforéticos gerados por meio da amplificação do DNA total de cepas de *Trypanosoma cruzi* utilizando os iniciadores 3303, 3304, 3306, 3307, AB1 e AB5. A matriz de similaridade foi calculada utilizando o coeficiente de DICE e o dendrograma gerado pelo método UPGMA. A linha vertical representa a linha de feñon.

#### **4.2. Genotipagem das cepas de *T. cruzi* por PCR do mini-exon, 24S $\alpha$ rDNA e 18S rDNA**

As cepas de *T. cruzi* isoladas de pacientes também foram caracterizadas pela análise de três regiões genômicas distintas (mini-exon, 24S $\alpha$  rDNA e 18S rDNA), objetivando classificá-las em linhagens (BRISSE et al., 2001). No presente estudo, todas as cepas isoladas de humanos apresentaram amplicons de 300 pb, 125 pb e 165 pb nas PCR de mini-exon, 24S $\alpha$  rDNA e 18S rDNA respectivamente, caracterizando o perfil TcIib, atualmente denominado TcII (ZINGALES, 2009) (Figura 6). Os resultados corroboram os dados de RAPD e sugerem que populações da linhagem TcIib foram mantidas em humanos após a ingestão de cepas mistas TcI/TcII de *T. cruzi* presentes no caldo de cana.

Estudo realizado por Avelar (2008) mostrou que de 30 cepas (25 cepas isoladas de gestantes e cinco cepas de mulheres não gestantes) provenientes do Brasil, 96,66% pertenciam ao grupo TcIib e 3,33% ao grupo TcIId. Higo et al. (2004) relataram a grande prevalência (78,6%) do subgrupo TcIib ao estudar 44 cepas provenientes de países do Cone Sul. Por outro lado, estudo recente realizado por Fernandes et al., 2009 revelou que de 80 cepas isoladas de pacientes chagásicos crônicos indeterminados procedentes do Rio Grande do Sul, 51,25% foram classificadas como TcIId e 48,75% como TcIib, mostrando que diferentes genótipos do parasito são encontrados em pacientes chagásicos crônicos.



**Figura 6.** Avaliação do perfil molecular representativo da região do espaçador não transcrito do gene do mini-exon (amostras 1-8), região divergente do gene 24S $\alpha$  rDNA (amostras 9-17), e gene do RNA ribossomal 18S (amostras 18-24) de cepas de *Trypanosoma cruzi*. Os fragmentos de DNA foram separados em gel de poliacrilamida 12% e corados com nitrato de prata. MM- Marcador molecular; 1, 10- controle TcI; 2, 9 e 18- controle TcIIb; 3-7, 11-16, 19-23- cepas isoladas de pacientes; 8, 17, 24- controles sem DNA.

#### 4.3. Sensibilidade das formas tripomastigotas e epimastigotas de *T. cruzi* ao sistema complemento

O primeiro grupo de experimentos visando estudar os possíveis mecanismos envolvidos na seleção diferencial de populações de *T. cruzi*, consistiu em verificar se formas tripomastigotas e epimastigotas das cepas Y, SC90, SC92, SC93 e SC94 possuíam susceptibilidade diferencial à lise pelo sistema complemento.

Ensaio preliminares de lise pelo complemento usando formas epimastigotas da cepa Y foram realizados para determinar a melhor condição de soro para a realização dos ensaios. Assim, padronizou-se que nos ensaios seria utilizado soro de paciente chagásico inativado suplementado com soro normal fresco ou somente soro normal na diluição 1:2. Como controles foram utilizados soro chagásico inativado ou soro normal inativado (dados não mostrados).

Formas tripomastigotas de cultura celular incubadas com as diferentes combinações de soro não foram lisadas pela ação do complemento, não havendo portanto diferenças na sensibilidade à lise pelo complemento entre as cepas (Figura 7A).

Estudos iniciais sobre ativação das vias do complemento em *T. cruzi* mostraram que formas tripomastigotas sanguíneas são parcialmente susceptíveis à lise pelo sistema complemento (KRETTLI et al., 1979). Por outro lado, Abelha et al. (1981) demonstraram que

formas tripomastigotas de cultura de células não são lisadas quando incubadas com soro de paciente chagásico crônico e não perdem a capacidade de infectar camundongos. Corroborando os resultados de Abelha et al. (1981), não foi observada lise das formas tripomastigotas de cultura, quando estas foram incubados com soro chagásico suplementado com soro normal.

Diversas proteínas envolvidas na resistência à lise pelo complemento foram identificadas sendo expressas na superfície de formas tripomastigotas de *T. cruzi* (JOINER et al., 1988; TAMBOURGI, 1993; FERREIRA et al., 2004; CESTARI et al., 2008). Dentre elas, destacam-se as glicoproteínas T-DAF (JOINER et al., 1988; TAMBOURGI, 1993) e gp160 (NORRIS et al., 1989), as quais são capazes de inibir as vias clássica e alternativa, além da proteína calreticulina (FERREIRA et al., 2004) e CRIT (CESTARI et al., 2008), envolvidas na inibição das vias clássica e das lectinas. Acredita-se que a resistência à lise por tripanossomatídeos seja um processo multifatorial com o envolvimento de várias proteínas (TOMLINSON e RAPER, 1996). Dessa forma, a expressão de proteínas de superfície capazes de bloquear a cascata do complemento e a rápida invasão da célula hospedeira, são fatores essenciais para a ocorrência da infecção (CESTARI, 2008).

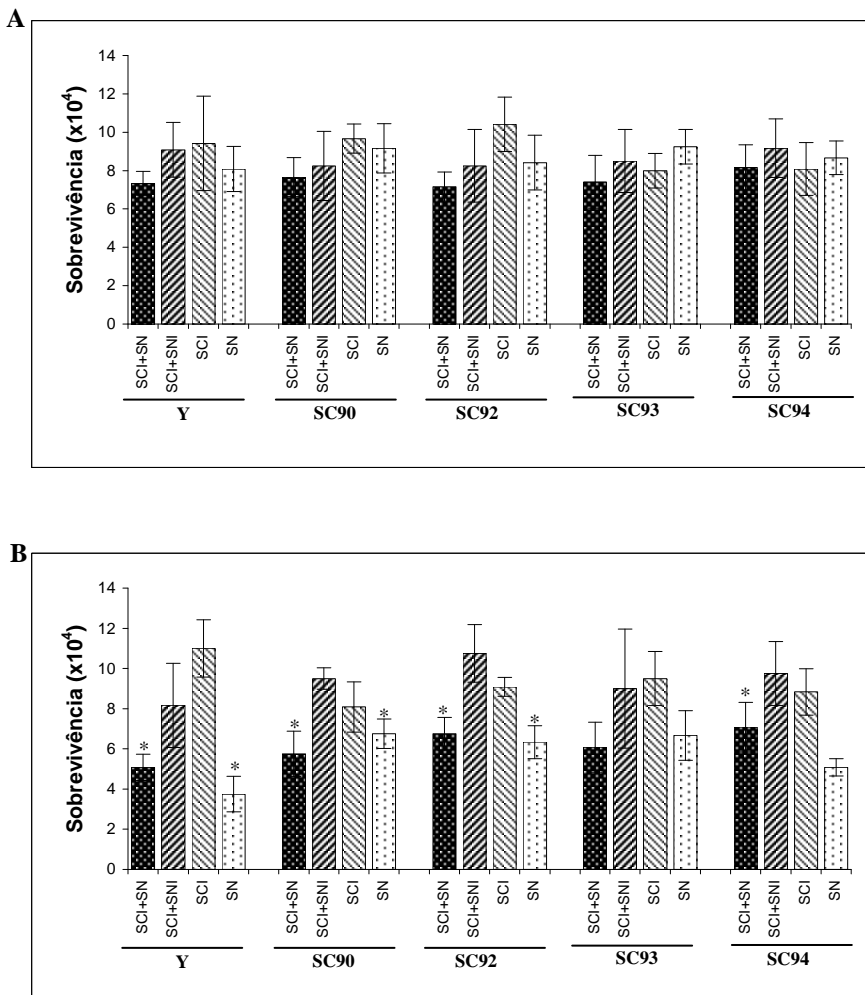
A funcionalidade dos modelos de lise pelas vias clássica e alternativa foi demonstrada pela incubação de formas epimastigotas, sabidamente sensíveis à lise pelo sistema complemento, com as diferentes combinações de soros. Dessa forma, a incubação das formas epimastigotas com soro chagásico inativado suplementado com soro normal fresco resultou em lise parcial dos parasitos. Foi possível também observar lise quando os parasitos foram incubados somente com soro normal (Figura 7B). A lise das formas epimastigotas na presença de soro normal é dependente da glicoproteína gp72, a qual é o principal receptor de C3 e permite a formação do complexo lítico. Formas tripomastigotas também expressam gp72, no entanto, a ligação de C3 ocorre de maneira ineficiente (JOINER et al., 1985).

As formas epimastigotas quando pré-incubadas com os soros, se mostraram imóveis e com alterações morfológicas acentuadas como arredondamento celular. Não foi possível verificar diferenças na sensibilidade à ação lítica do sistema complemento entre as cepas. Como esperado, o soro chagásico ou normal inativado não induziram a lise dos parasitos, embora tenham provocado aglutinação dos mesmos. Essa aglutinação, também observada de forma sutil quando formas

tripomastigotas foram incubadas com os soros, possivelmente ocorreu devido a presença de anticorpos específicos e inespecíficos (ABELHA et al. 1981; STEINDEL, 1993). Abelha et al. (1981) verificaram que 30 a 70% das formas tripomastigotas eram aglutinadas quando previamente incubadas com soro chagásico crônico, enquanto que a incubação com soro normal foi mais branda, provocando cerca de 5 a 20% de aglutinação.

De forma análoga aos nossos resultados, alguns estudos apontam que formas epimastigotas de *T. cruzi* são sensíveis às vias clássica, alternativa e a das lectinas do sistema complemento (ANZIANO et al., 1972; NOGUEIRA et al., 1975; CESTARI, 2008). Análises ultra-estruturais da membrana de formas epimastigotas tratadas com soro fresco de paciente chagásico, mostram a formação de microlesões de 8 a 10 nm de diâmetro, tamanho característico de poros formados por MAC, distribuídos aleatoriamente pela superfície da membrana celular (ANZIANO et al., 1972). Foi demonstrado que a via alternativa é suficiente para lisar formas epimastigotas, apesar da lise ser mais eficiente na presença de anticorpos (NOGUEIRA et al., 1975). Recentemente, Cestari et al. (2008) mostraram diferenças na sensibilidade à lise pelo complemento entre formas epimastigotas das cepas Y (TcII) e colombiana (TcI). A cepa Y apresentou maior resistência as vias clássica e das lectinas. Nossos resultados não evidenciaram diferenças na sensibilidade à lise entre formas tripomastigotas das diferentes cepas, indicando que o sistema complemento parece não estar envolvido na seleção de populações TcII.





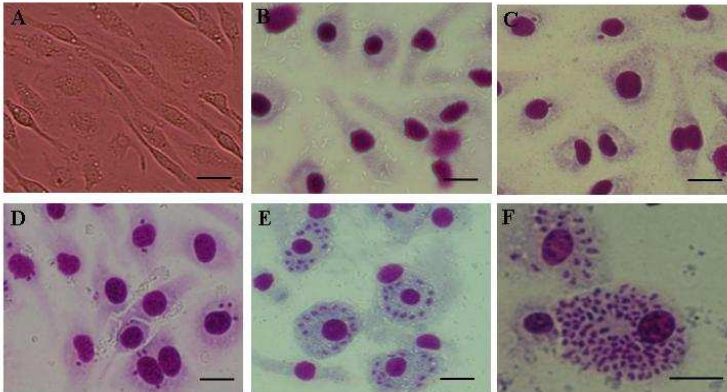
**Figura 7. Ensaio de lise pelo complemento com formas tripomastigotas (A) e epimastigotas (B) das cepas Y e SC94 (TcII), SC90 (TcI), SC92 e SC93 (mistas).** Os parasitos foram incubados com soro chagásico inativado suplementado com soro normal fresco (SCI+SN), soro normal (SN), soro chagásico inativado suplementado com soro normal inativado (SCI+SNI) e soro chagásico inativado (SCI) por 1 hora a 37°C. Posteriormente os parasitos sobreviventes foram contados em câmara de Neubauer em microscópio óptico. Os valores representam a média de 2 experimentos independentes realizados em triplicata. \* Diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) em relação aos controles (parasito+SCI+SNI e parasitos+SCI).

#### 4.4. Ensaios de interação *T. cruzi*-macrófagos murinos

##### 4.4.1. Determinação da concentração de soro para os ensaios de infecção

Macrófagos são células do sistema imune inato que se tornam hospedeiras do *T. cruzi* e provavelmente, as primeiras células do hospedeiro mamífero que o parasito invade (NOGUEIRA e COHN, 1976; KIPNIS et al., 1979; MEIRELLES et al., 1982). No presente estudo optou-se por utilizar macrófagos primários derivados de medula óssea de camundongo, os quais constituem um modelo utilizado para mimetizar a interação do *T. cruzi* com macrófagos (Figura 8).

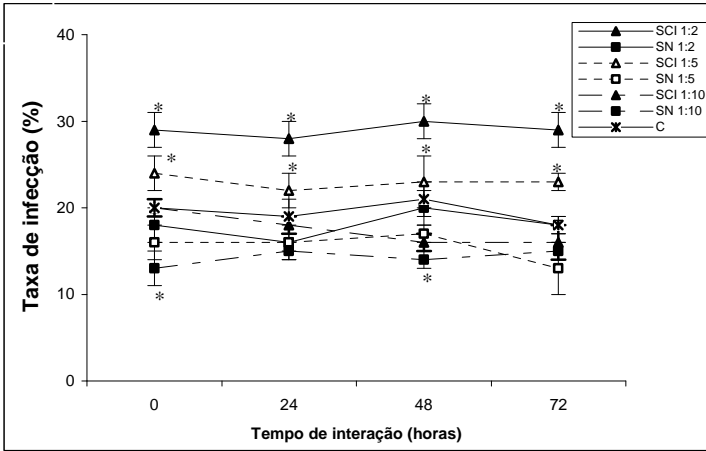
Diferentes linhagens celulares como VERO, L929, J774 entre outras, que também são permissivas às infecções por *T. cruzi* são largamente utilizadas em ensaios de interação parasito-célula hospedeira (MORTARA, 1991; TOMA et al., 2000; CALER et al., 2001; YOSHIDA, 2006; FERNANDES et al., 2007). Entretanto, estas são células tumorais imortalizadas e constituem um modelo de estudo artificial. Além disso, a intensa proliferação celular que ocorre durante os ensaios pode levar a valores subestimados de taxa de infecção (TOMA et al., 2000).



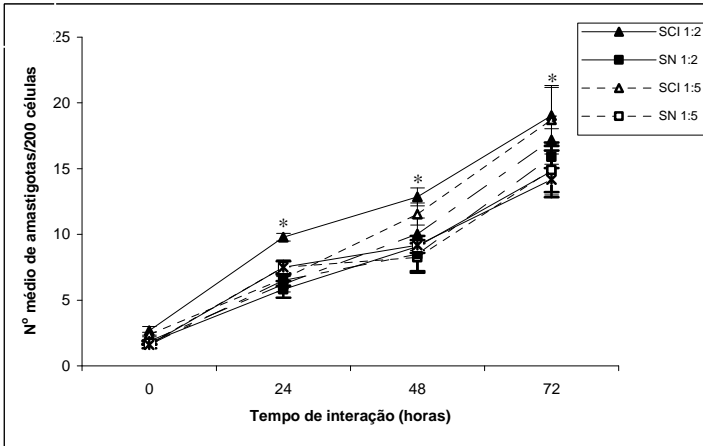
**Figura 8. Micrografias representativas da avaliação microscópica de macrófagos murinos infectados com a cepa Y.** A) macrófagos não infectados sem coloração; B) macrófagos não infectados C) macrófagos após 4 horas de interação com parasito (tempo 0); D) macrófagos após 24 horas de infecção; E) macrófagos após 48 horas de infecção; F) macrófagos após 72 horas de infecção. Com exceção de 'A', nas demais micrografias utilizou-se coloração pelo Giemsa. A barra representa 10  $\mu$ m.

Inicialmente, foi determinada a concentração de soro ideal a ser utilizado nos experimentos de infecção. Assim, formas tripomastigotas da cepa Y foram pré-incubadas com as diluições 1:2, 1:5 e 1:10 dos soros chagásico e normal, e em seguida utilizadas para infectar macrófagos. Após os tempos de interação, foi verificado que a taxa de infecção e o número médio de amastigotas foi semelhante entre os parasitos tratados com soro normal e o controle (parasito sem incubação prévia com soro). Por outro lado, foi possível constatar que na presença de soro chagásico na diluição 1:2 ocorreu um aumento na porcentagem de células infectadas e no número médio de amastigotas por célula. Da mesma forma, verificou-se um aumento na porcentagem de células infectadas quando utilizou-se a diluição 1:5, entretanto foi constatado aumento no número médio de amastigotas somente após 72 horas de interação. Nota-se também que não houve diferença significativa na taxa de infecção e no número médio de amastigotas quando os parasitos foram pré-incubados com soro chagásico na diluição 1:10 em relação ao controle (Figura 9). Em função desses resultados, optou-se por utilizar os soros na diluição 1:2 nos ensaios subsequentes.

A



B



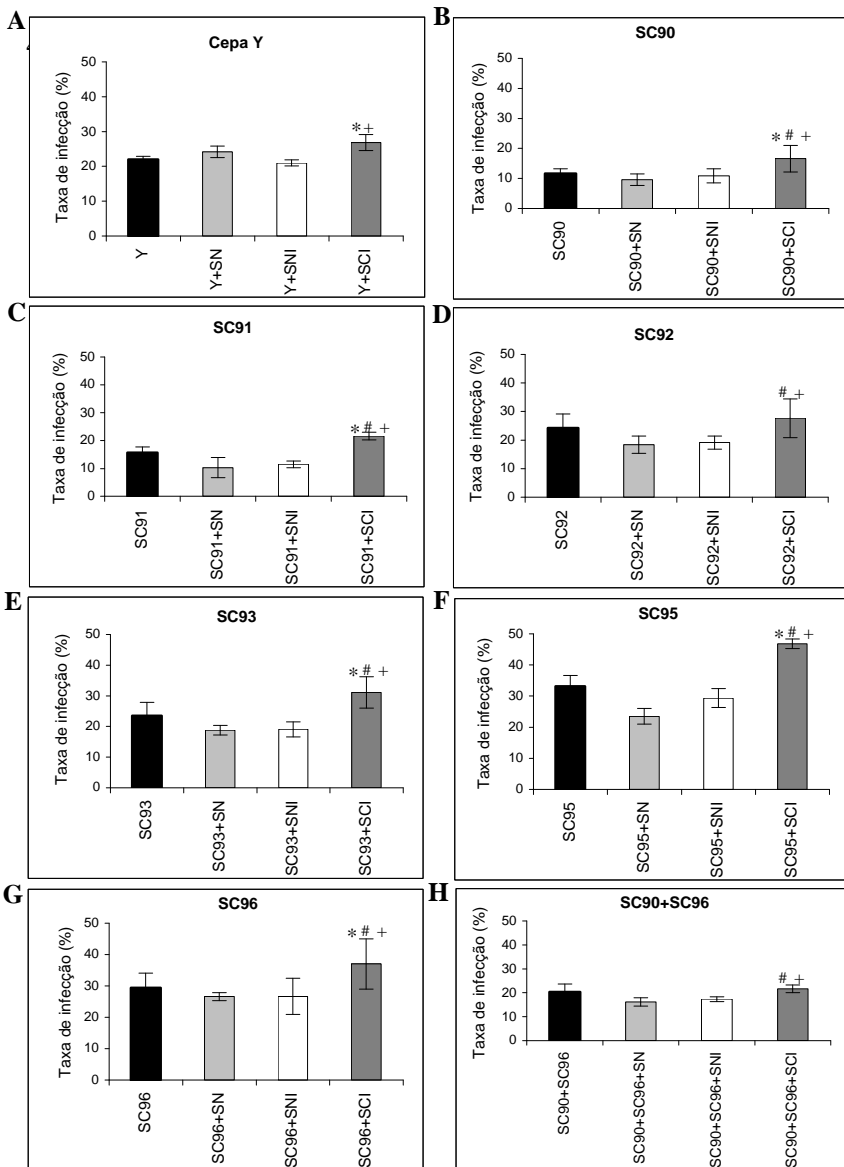
**Figura 9.** Efeito de diferentes concentrações de soro chagásico e normal na taxa de infecção (A) e número médio de amastigotas (B) em macrófagos murinos. Formas tripomastigotas da cepa Y foram pré-incubadas por 1 hora a 37°C com soro chagásico inativado (SCI) e soro normal (SN) nas diluições 1:2, 1:5 e 1:10. O controle (C) consistiu no parasito sem incubação prévia com soro. Posteriormente, parasitos foram lavados e utilizados para infectar macrófagos. Os valores representam a média de 2 experimentos com triplicata. \* Diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) em relação ao controle.

#### 4.4.2. Influência dos soros chagásico crônico e normal na interação *T. cruzi*-macrófagos

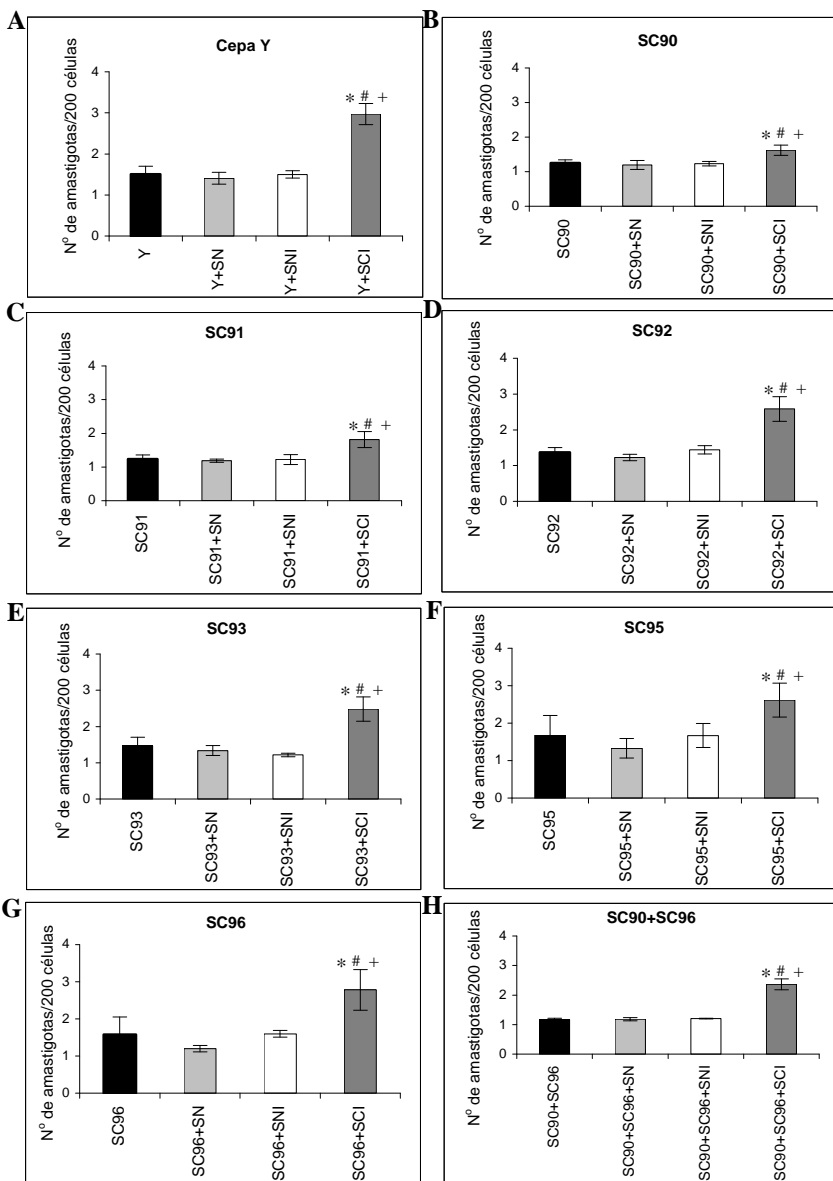
A fim de verificar o efeito dos soros chagásico e normal no processo de infecção, as cepas Y, SC90, SC91, SC92, SC93, SC95 e SC96 foram previamente incubadas com soros na diluição 1:2 e após isso, foram utilizadas para infectar macrófagos primários. Conforme mostrado na figura 10, quando os parasitos foram pré-incubados com soro chagásico ocorreu um aumento significativo na taxa de infecção. Não houve diferença significativa nas taxas de infecção quando os parasitos foram pré-incubados com soro normal ou soro normal inativado em relação ao controle (parasitos sem incubação prévia com soro). O número médio de amastigotas por célula após o contato inicial (tempo 0) foi maior quando os parasitos foram pré-incubados com soro chagásico, sendo que os soros normal e normal inativado não afetaram o número médio de amastigotas por célula (Figura 11).

Aumento nas taxas de infecção e no número médio de amastigotas quando os parasitos foram pré-incubados com soro chagásico inativado foi verificado para todas cepas analisadas (Figuras 10 e 11). O soro chagásico crônico é rico em anticorpos específicos, os quais possuem a capacidade de se ligar ao parasito por meio da região Fab (*Fragment antigen-binding*), sendo que a região Fc (*Fragment crystallizable*) do anticorpo pode interagir com os receptores expressos por macrófagos e neutrófilos (ABBAS et al., 2008). Esse processo, denominado opsonização, é responsável por aumentar as taxas de infecção e número médio de amastigotas por célula (NOGUEIRA e COHN, 1976; ALCÂNTARA e BRENER, 1978; NOGUEIRA et al., 1980).

Os parasitos podem ainda ser opsonizados por C3b, iC3b ou C4b, proteínas do sistema complemento que estão presentes no soro normal (MOTA e UMEKITA, 1989, ABBAS et al., 2008). Entretanto, no presente estudo não foi observado efeito opsonizante quando os parasitos foram pré-incubados com soro normal. A pré-incubação com soro normal inativado contendo anticorpos inespecíficos (ou de baixa afinidade) não alterou a taxa de infecção e o número médio de amastigotas. Estes dados sugerem que a opsonização foi mediada por anticorpos específicos (ou de alta afinidade), presentes no soro chagásico, contra antígenos presentes na superfície do *T. cruzi*.



**Figura 10.** Taxa de infecção de cepas de *Trypanosoma cruzi* em macrófagos murinos derivados de medula óssea. Formas tripomastigotas das seis cepas de *T. cruzi* (A-G) e da cepa mista artificial SC90+SC96 (H) foram pré-incubadas por 1 hora a 37°C com soro normal (parasito+SN), soro normal inativado (parasito+SNI) e soro chagásico inativado (parasito+SCI). Posteriormente, os macrófagos foram infectados por 4 horas. Os valores representam a média de 2 experimentos com triplicata. \* Diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) em relação ao controle (parasito sem soro), # em relação ao controle (parasito+SN), + em relação ao controle (parasito+SNI).



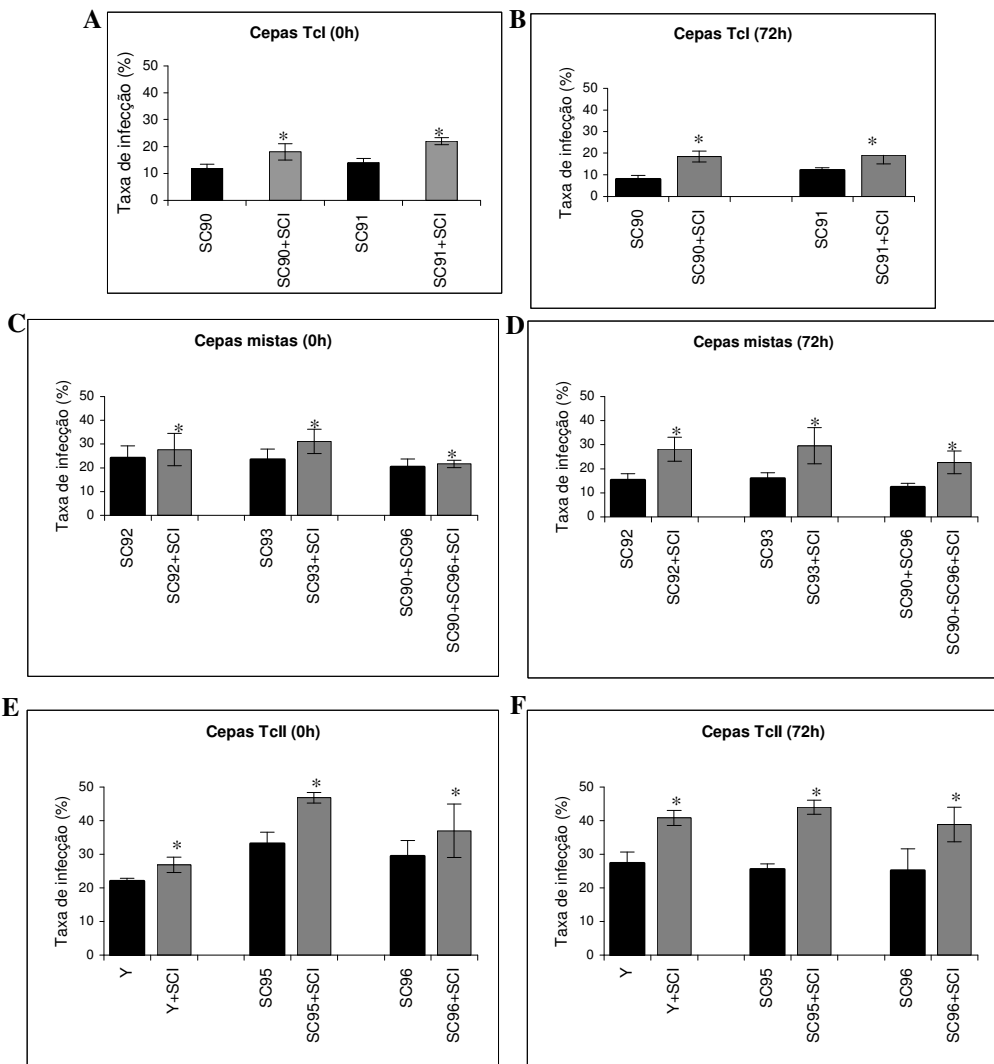
**Figura 11. Número médio de amastigotas de cepas de *Trypanosoma cruzi* em macrófagos murinos derivados de medula óssea.** Formas tripomastigotas das seis cepas de *T. cruzi* (A-G) e da cepa mista artificial SC90+SC96 (H) foram pré-incubadas por 1 hora a 37°C com soro normal (parasito+SN), soro normal inativado (parasito+SNI) e soro chagásico inativado (parasito+SCI). Posteriormente, os macrófagos foram infectados por 4 horas. Os valores representam a média de 2 experimentos com triplicata. \* Diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) em relação ao controle (parasito sem soro), # em relação ao controle (parasito+SN), + em relação ao controle (parasito+SNI).

#### 4.4.3. Variabilidade biológica entre cepas dos grupos TcI, TcII e mistas

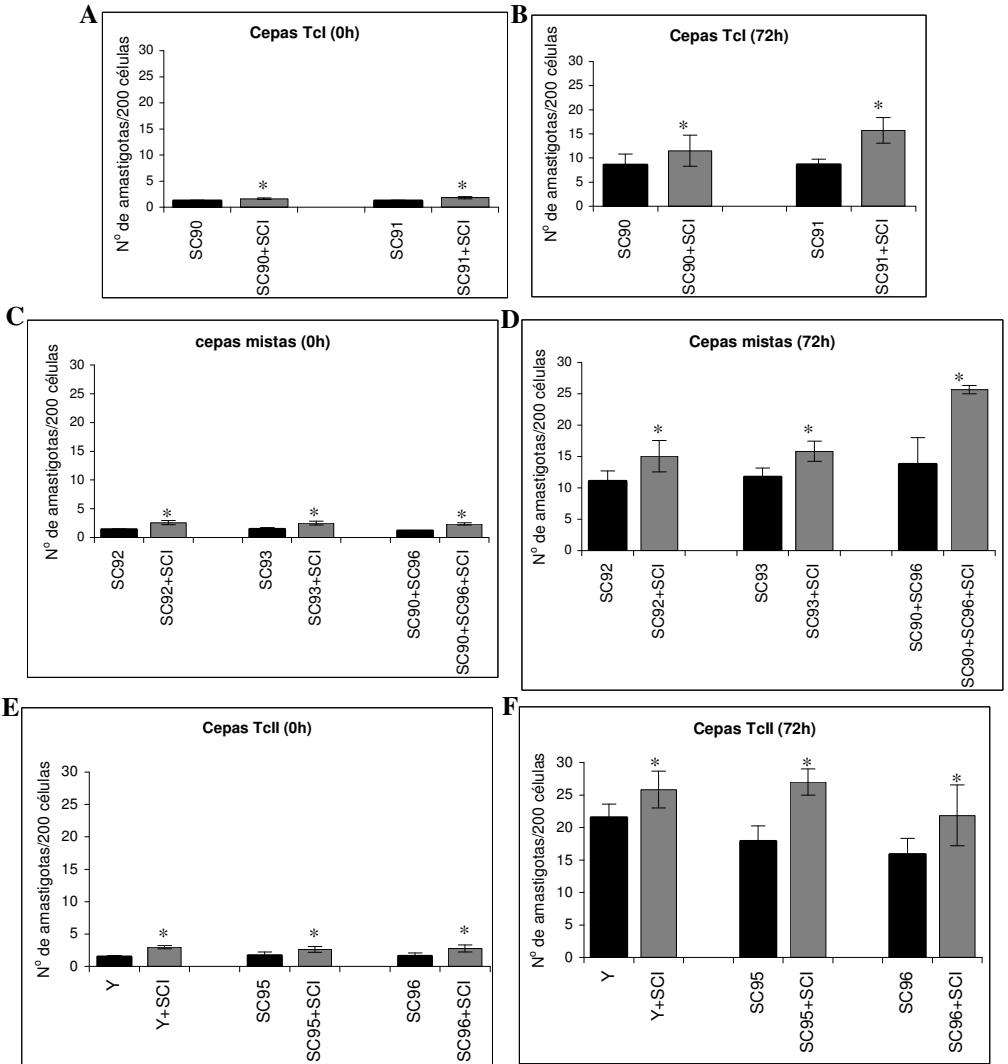
Na infecção primária pelo *T. cruzi* a participação de anticorpos parece ser pouco importante enquanto que as características biológicas da cepa do parasito parecem exercer um papel fundamental no processo. No presente estudo, na presença ou ausência de soro chagásico inativado, as taxas de infecção foram sempre mais altas em macrófagos expostos as cepas do grupo TcII (SC95 e SC96), menores em macrófagos infectados por cepas do grupo TcI (SC90 e SC91), enquanto as cepas mistas naturais (SC92 e SC93), mista artificial (SC90+SC96) e a cepa Y apresentaram taxas de infecção intermediárias. As taxas de infecção entre os tratamentos variaram de 9,6% a 46,8% após o contato inicial (tempo 0) e de 7,9% a 44,0% após 72 horas (Figura 12).

No tempo 0, não houve diferença significativa no número médio de amastigotas por célula entre as cepas (parasito sem soro e parasito + SCI), sendo que os valores variaram de 1,27 a 1,65. Contudo, os valores das taxas de infecção foram sempre maiores para as cepas TcII. Por outro lado, após 72 horas de infecção foi observado uma grande variação no número médio de amastigotas entre as cepas. As cepas do grupo TcII apresentaram o maior número médio de amastigotas por célula, sendo que este valor foi de 17,96 amastigotas/célula para a cepa SC95; 15,86 para a cepa SC96 e 21,55 para a cepa Y. Cepas do grupo TcI apresentaram valores médios de amastigotas por célula cerca de duas vezes inferior ao observado para as cepas TcII, sendo que estes valores foram de 8,56 e 8,64 para as cepas SC90 e SC91 respectivamente. Já as cepas mistas naturais e artificiais apresentaram valores médios de amastigotas por célula intermediários em relação as cepas do grupo TcI e TcII. O número médio de amastigotas para as cepas SC92 e SC93 foi de 11,04 e 11,73 respectivamente. Estes resultados foram muito semelhantes aos observados para cepa mista artificial que apresentou um número médio de amastigotas por célula de 13,75. O número médio de amastigotas entre os tratamentos variou de 1,17 a 2,97 após o contato inicial e de 7,08 a 27,01 após 72 horas (Figura 13). Após 72 horas de infecção o número médio de amastigotas foi maior quando os parasitos foram pré-incubados com SCI. Isso era esperado, pois o SCI atua aumentando a entrada dos parasitos na célula por fagocitose (opsonização), não interferindo na taxa de multiplicação dos mesmos.





**Figura 12.** Taxa de infecção de cepas de *Trypanosoma cruzi* em macrófagos murinos derivados de medula óssea. Formas tripomastigotas das cepas SC90, SC91 (A e B); SC92, SC93 (C e D); Y, SC95 e SC96 (E e F) foram pré-incubadas por 1 hora a 37°C com soro chagásico inativado (parasito+SCI) ou soro normal (parasito+SN). Posteriormente, os macrófagos foram infectados por 4 horas (tempo 0) (A, C e E) e 72 horas (B, D e F). O controle consistiu no parasito sem incubação prévia com soro. Os valores representam a média de 2 experimentos com triplicata. \* Diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) em relação ao controle.



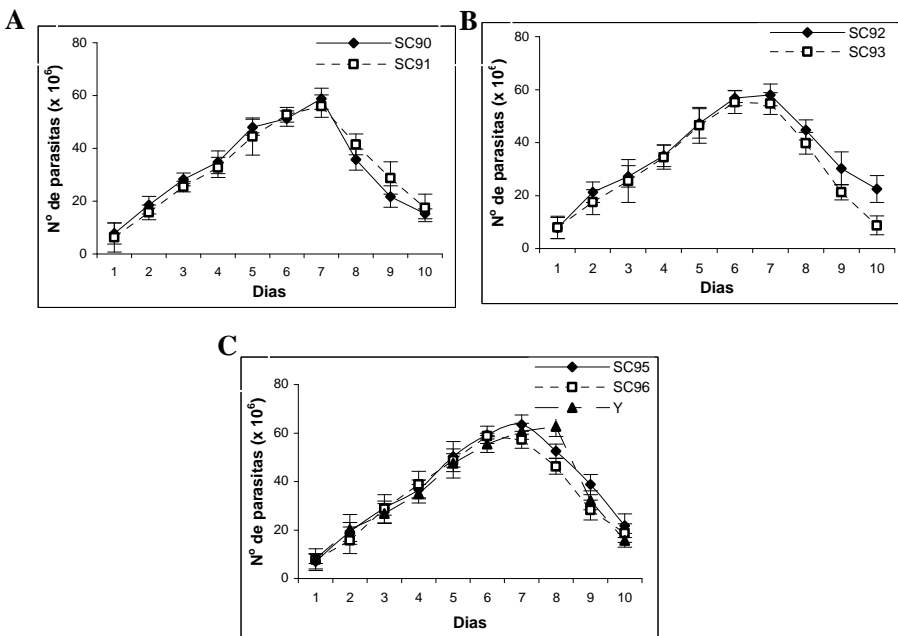
**Figura 13.** Número médio de amastigotas de cepas de *Trypanosoma cruzi* em macrófagos murinos derivados de medula óssea. Formas tripomastigotas das cepas SC90, SC91 (A e B); SC92, SC93 (C e D); Y, SC95 e SC96 (E e F) foram pré-incubadas por 1 hora a 37°C com soro chagásico inativado (parasito+SCI) e soro normal (parasito+SN). Posteriormente, os macrófagos foram infectar por 4 horas (tempo 0) (A, C e E) e 72 horas (B, D e F). O controle consistiu no parasito sem incubação prévia com soro. Os valores representam a média de 2 experimentos com triplicata. \* Diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) em relação ao controle.

Estes resultados indicam que as cepas do grupo TcII apresentam uma maior capacidade multiplicativa em relação as cepas do grupo TcI. De fato, as cepas do grupo TcII apresentaram um tempo de duplicação intracelular significativamente menor que as cepas TcI, conforme mostrado na tabela 5. Isso foi evidenciado também pela avaliação do tempo necessário para a conclusão do ciclo biológico intracelular, onde observou-se que as cepas do grupo TcII concluíram seu ciclo em um menor tempo (Tabela 6). Contudo, quando foram realizadas as curvas de crescimento destas cepas em meio LIT, não foram observadas diferenças entre elas (Figura 14). Em conjunto, estes resultados sugerem que a manutenção de populações de *T. cruzi* II em infecções humanas ocasionadas por cepas mistas pode estar relacionada com características intrínsecas do parasito, como a capacidade infectiva e o tempo de duplicação intracelular.

Estudos de dinâmica populacional de *T. cruzi* utilizando simulação computacional baseados em modelos matemáticos, sugerem que clones que apresentam uma maior taxa de multiplicação são favorecidos em condições de cultivo *in vitro*, tornando-se o membro predominante da população, mesmo estando em menor quantidade (DVORAK, 1985). De forma análoga, foi demonstrado que após 30 dias de cultivo de misturas artificiais contendo cinco clones de *T. cruzi* em igual proporção, apenas o clone que apresentava a maior taxa de multiplicação foi detectado (FINLEY e DVORAK, 1987). Esses resultados demonstraram a ocorrência de diminuição da heterogeneidade de populações originais de *T. cruzi* e sugerem que clones com baixa capacidade multiplicativa provenientes de cepas obtidas de pacientes chagásicos podem desaparecer da população original, o que pode impossibilitar a reprodução dos sinais clínicos em modelos murinos e a consequente associação dos sinais clínicos com o genótipo do parasito (DVORAK, 1985; FINLEY e DVORAK, 1987)

Diferenças biológicas entre cepas dos grupos TcI e TcII foram também observadas por Lisboa et al. (2007), os quais demonstraram que cepas do grupo TcII apresentam maior parasitemia e mortalidade de camundongos. Risso et al. (2004) demonstraram que cepas do grupo TcII provocaram uma mortalidade de 100% dos camundongos durante a fase aguda, enquanto que a infecção com cepas do grupo TcI não levou os animais à morte, mesmo quando utilizado inóculo contendo mil vezes mais parasitos que o administrado para o grupo TcII. Por outro lado, Fernandes et al. (1997) estudaram o comportamento biológico de cepas isoladas de pacientes chagásicos crônicos, triatomíneos naturalmente

infectados e gambás e demonstraram que todas as 29 cepas isoladas de humanos (grupo TcII) apresentaram baixa parasitemia e virulência para camundongos, enquanto as cepas isoladas de *P. megistus* (TcI) apresentaram alta virulência para camundongos. Foi também demonstrado, que das 48 cepas na sua maioria pertencentes ao grupo TcI (91%) e isoladas de gambás, roedores e triatomíneos, 4,2% produziam alta virulência em camundongos infectados; 39,6% média virulência, 31,2% baixa virulência e 25% produzia parasitemia subpatente (STEINDEL et al., 1995).



**Figura 14. Cinética de crescimento de cepas de *Trypanosoma cruzi*.** Formas epimastigotas das cepas SC90, SC91 (A), SC92, SC93 (B), SC95, SC96 e Y (C) foram crescidas em meio LIT por 10 dias. O número de parasitos foi mensurado pela contagem em câmara de Neubauer em microscópio óptico. Os valores representam a média de 1 experimento em quintuplicata.

A opsonização com soro imune não interferiu no desenvolvimento intracelular dos parasitos, uma vez que os tempos de duplicação foram semelhantes na presença e ausência de soro chagásico

(Tabela 5). Segundo Alcântara e Brener (1978), parasitos opsonizados escapam normalmente do vacúolo parasitóforo.

O efeito da pré-incubação de parasitos com soro imune no processo de fagocitose foi estudado por Kumaratilake e Ferrante (2000), os quais mostraram que a pré-incubação de merozoítos de *Plasmodium falciparum* com soro imune obtido de pacientes com malária promoveu um aumento de seis vezes na internalização dos parasitos. Foi também demonstrado, que voluntários imunizados com uma vacina contra malária em estudo apresentavam anticorpos opsonizantes que atuavam ativando a fagocitose e destruição de esporozoítos em monócitos humanos (SCHWENK et al., 2003).

Assim como observado para *T. cruzi*, cepas virulentas de *Brucella melitensis* opsonizadas com anticorpos específicos sobrevivem e se desenvolvem normalmente no interior do vacúolo parasitóforo de monócitos humanos, isso em função da fusão do fagossomo com o lisossomo ser prejudicada (EZE et al., 2000; BELLAIRE et al., 2005). Entretanto, existem casos em que a opsonização afeta o desenvolvimento do microrganismo no macrófago. *Toxoplasma gondii*, por exemplo, é um parasito intracelular que se multiplica no interior do vacúolo parasitóforo e inibe a formação do fagolisossomo (JONES et al., 1975; CHARIF et al., 1990). No entanto, na presença de anticorpos específicos, foi demonstrado que *T. gondii* é fagocitado e destruído no interior do macrófago, sugerindo que a fusão de fagossomo com lisossomo ocorre normalmente quando o parasito encontra-se opsonizado (ERBE et al., 1991). Cepas menos virulentas de *Brucella abortus* também são destruídas no interior dos monócitos humanos quando opsonizadas com anticorpos específicos (BELLAIRE et al., 2005).

As taxas de infecção para as diferentes cepas mantiveram-se relativamente constantes nos tempos crescentes de interação (0, 24, 48 e 72 horas) na presença e ausência de soro, confirmando a baixa capacidade proliferativa dos macrófagos (Figura 13). Além disso, a manutenção das taxas de infecção e o aumento progressivo do número médio de amastigotas, sugere que os macrófagos não foram capazes de inibir o crescimento e/ou destruir as formas amastigotas de *T. cruzi*. Resultados semelhantes foram relatados por Alcântara e Brener (1978) ao estudar a interação das cepas Y e CL com macrófagos peritoniais de camundongos. Esses autores verificaram que as taxas de infecção eram mantidas constantes após 3, 24, 48 e 72 horas de interação, levando-os a

sugerir que a destruição de formas intracelulares de *T. cruzi* não ocorria em macrófagos não ativados.

**Tabela 5.** Tempo médio de duplicação intracelular de amastigotas das cepas de *Trypanosoma cruzi* na presença e ausência de soro chagásico inativado

Cepas	Tempo (horas)		
	Grupo	Parasito sem soro	Parasito+soro chagásico inativado
Y	TcII	14 (1,7)	13 (1,1)
SC90	TcI	25 (1,9)	22 (2,1)
SC91	TcI	23 (2,6)	21 (1,6)
SC92	TcI/TcII	17 (1,8)	18 (2,5)
SC93	TcI/TcII	18 (2,2)	20 (2,3)
SC95	TcII	15 (1,6)	15 (1,9)
SC96	TcII	15 (2,1)	16 (1)
SC90+SC96	TcI/TcII	19 (3)	20 (1,5)

Os valores entre parênteses representam o desvio padrão de 2 experimentos com triplicata.

**Tabela 6.** Tempo para conclusão do ciclo biológico de cepas de *Trypanosoma cruzi* em macrófagos murinos

Cepas	Grupo	Tempo (horas)
Y	TcII	72
SC90	TcI	120
SC91	TcI	120
SC92	TcI/TcII	96
SC93	TcI/TcII	96
SC95	TcII	96
SC96	TcII	96
SC90+SC96	TcI/TcII	96

#### 4.4.4. Análise da expressão de gp82 em formas tripomastigotas metacíclicas de *T. cruzi*

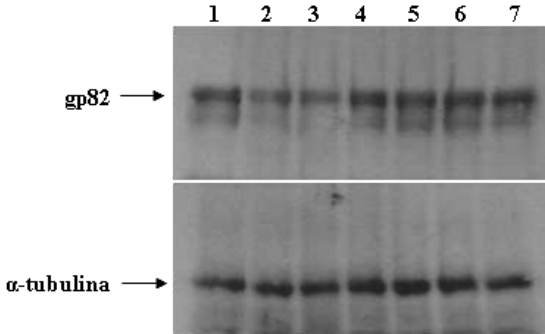
Cepas de *T. cruzi* que são altamente invasivas expressam em sua superfície gp82, uma glicoproteína de 82 kDa requerida para interação e invasão na célula hospedeira (RAMIREZ et al., 1993; YOSHIDA, 2006). Por essa razão, a expressão de gp82 nas cepas SC90, SC91, SC92, SC93, SC95 e SC96 foi avaliada, uma vez que uma maior de expressão de gp82 em cepas TcII poderia explicar sua maior capacidade

infectiva em macrófagos. Como esperado, a análise da expressão por Western blot utilizando o anticorpo monoclonal 3F6 identificou uma proteína com massa molecular de 82kDa(Figura 15).

Estudos com formas tripomastigotas metacíclicas de várias cepas de *T. cruzi*, demonstraram que geralmente cepas altamente invasivas, como a cepa CL, ligam-se à superfície da célula hospedeira por meio da glicoproteína gp82. Por outro lado, cepas com menor capacidade infectiva, como a cepa G, interage com a superfície da célula hospedeira principalmente via gp35/50 (YOSHIDA et al., 2000, 2006). Nossos resultados demonstram que as cepas SC90 e SC91, ambas TcI, apresentaram uma menor expressão de gp82 em relação as cepas TcII o que poderia explicar a menor capacidade infectiva. A quantificação da expressão de gp82 por meio de densitometria mostrou que o nível de expressão das cepas SC90 e SC91 foi 75% e 69% menores. Por outro lado, as cepas TcII e mistas apresentaram um nível de expressão semelhante ao apresentado pela cepa Y (Figura 15).

O tipo de glicoproteína envolvida na etapa de adesão é fundamental para ativação de vias de transdução de sinais na célula hospedeira, o que pode acarretar diferenças na eficiência na internalização do parasito. Por essa razão, é relevante avaliar a expressão de outras glicoproteínas envolvidas na invasão, como gp35/50 e gp90.

Formas epimastigotas não expressam níveis detectáveis de gp82 e não induzem um aumento de  $Ca^{2+}$  no interior celular (MANQUE et al., 2003). Por outro lado, estes autores demonstraram que formas epimastigotas transfectadas com um vetor carregando cDNA codificando gp82 produzem esta glicoproteína funcional e se tornam capazes de se aderir e elevar os níveis de  $Ca^{2+}$  em células HeLa. Em nosso estudo, não foi observado expressão detectável de gp82 em formas epimastigotas das cepas analisadas (dados não mostrados).



**Figura 15.** Análise da expressão de gp82 por Western blot em formas tripomastigotas metacíclicas de *Trypanosoma cruzi*. As formas tripomastigotas de *T. cruzi* foram purificadas em colunas de DEAE celulose e posteriormente lisadas. Trinta microgramas do extrato protéico total foram separados em gel SDS-PAGE e transferidas para membrana de nitrocelulose. A presença das proteínas de gp82 e  $\alpha$ -tubulina foi revelada com anticorpo específico anti-gp82 ou anti- $\alpha$ -tubulina (controle de quantidade de proteína) respectivamente. 1- Cepa Y, 2- SC90, 3- SC91, 4- SC92, 5- SC93, 6- SC95 e 7- SC96.

#### 4.4.5. Infecção de macrófagos murinos ativados com IFN- $\gamma$

Em condições naturais de infecção, provavelmente, os macrófagos constituem as primeiras células do hospedeiro vertebrado que o parasito invade. Dessa forma, os macrófagos representam um importante sítio de replicação e controle do crescimento do parasito (NOGUEIRA e COHN, 1976; KIPNIS et al., 1979; MEIRELLES et al., 1982; GOLGHER e GAZZINELLI, 2004).

Como as cepas do grupo TcI apresentaram uma menor proliferação e um maior tempo de duplicação em macrófagos, foi avaliado se essas células estavam envolvidas no controle da proliferação dos parasitos. Para isso, macrófagos ativados com IFN- $\gamma$  e infectados com as cepas SC90 (TcI), Y e SC96 (TcII) foram avaliados nos tempos 0, 24, 48 e 72 horas pós infecção, visando determinar se essas cepas apresentavam uma susceptibilidade diferencial aos mecanismos microbicidas do macrófago. Independente da cepa, a porcentagem de células infectadas diminuiu com o tempo de interação (dados não mostrados) e com o aumento da concentração de IFN- $\gamma$  (Figura 16A). Esta redução na taxa de infecção pode ser atribuída à destruição de todos os amastigotas presentes em alguns macrófagos. A figura 16B, mostra uma drástica redução no número médio de parasitos por macrófago infectado, quando estes foram ativados com  $2 \text{ U.mL}^{-1}$  de IFN- $\gamma$  e



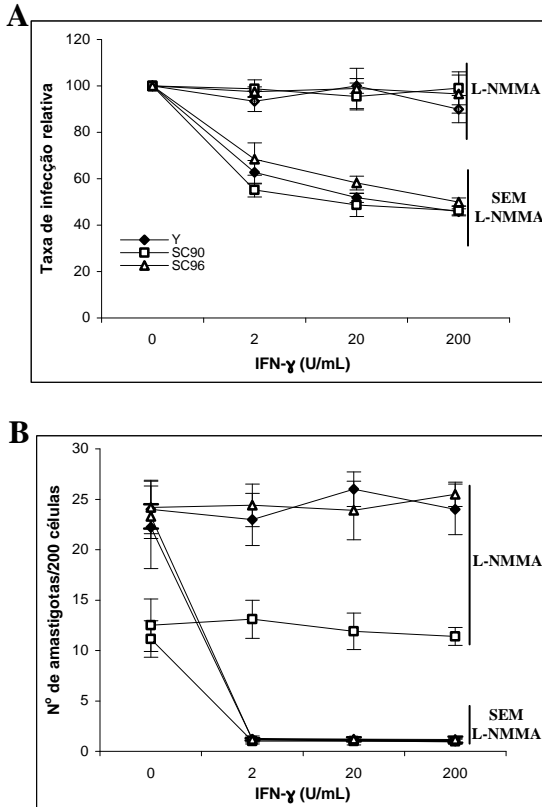
comparados ao controle (macrófagos não ativados). Entretanto, houve uma estabilização no número médio de amastigotas por célula com o aumento da concentração de IFN- $\gamma$ . Isso pode ser explicado pela pequena proporção parasito:célula (1:1) utilizada nos experimentos de infecção, sendo responsável pelo pequeno valor médio de parasitos por célula infectada após 4 horas de interação. Assim, macrófagos ativados com pequenas concentrações de IFN- $\gamma$  ( $2 \text{ U.mL}^{-1}$ ) apresentavam após 72 horas de interação valores médios de parasitos por célula próximo a um.

Esses resultados demonstram claramente que os macrófagos ativados com IFN- $\gamma$  foram capazes de controlar a proliferação dos parasitos de forma similar independente da cepa utilizada e são consistentes com trabalhos anteriores que demonstraram amplamente a importância de IFN- $\gamma$  no controle da infecção de *T. cruzi* (METZ et al., 1993; REED, 1995, SANTIAGO et al., 2005). Estudos utilizando camundongos geneticamente deficientes no receptor de IFN- $\gamma$  (ROTTENBERG et al., 1996) ou tratando os animais com anticorpos monoclonais anti-IFN- $\gamma$  (CARDILLO et al., 1996) confirmaram o papel do IFN- $\gamma$  no controle da infecção.

Vários trabalhos demonstram que o NO é uma das principais moléculas efetoras responsáveis pela destruição parcial dos parasitos em macrófagos infectados com *T. cruzi* (ABRAHAMSOHN e COFFMANN, 1995). Por essa razão, foi realizado um ensaio de infecção com o objetivo de determinar se o controle do crescimento dos parasitos nos macrófagos era devido à produção de NO. Assim, macrófagos infectados com as cepas SC90, SC96 e Y e ativados com diferentes concentrações de IFN- $\gamma$  na presença e ausência de L-NMMA, um inibidor não seletivo de NOS2. Como representado na figura 16, o tratamento com o inibidor restaurou o crescimento dos parasitos em macrófagos tratados com IFN- $\gamma$ . Esses resultados demonstraram que o efeito de IFN- $\gamma$  no controle da proliferação dos parasitos é dependente da NOS2.

O NO resultante da ativação da NOS2 possui ação citotóxica e citostática, promovendo a destruição de microrganismos e células tumorais. A citotoxicidade do NO resulta da sua ação sobre metaloproteínas e modificação química de proteínas contendo cisteína (JAMES et al., 1995; GUTIERREZ et al., 2009). Venturini et al. (2000) relataram a inibição da atividade catalítica da enzima cruzipaina, devido a ação de NO e doadores de NO. Como o NO é capaz de induzir a nitrosilação de grupos heme da hemoglobina, hematina e hemina, importantes fontes de ferro para o parasito, a sua ação pode

comprometer a disponibilidade de fatores de crescimento e, conseqüentemente, afetar o metabolismo do *T. cruzi* (CICCARELLI et al., 2007; GUTIERREZ et al., 2009).



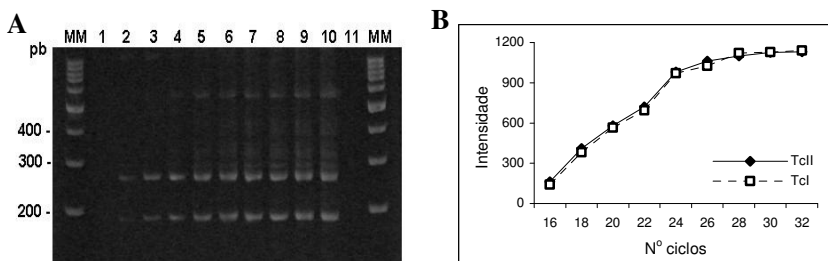
**Figura 16.** Taxa de infecção (A) e número médio de amastigotas (B) de cepas de *Trypanosoma cruzi* em macrófagos murinos ativados com IFN- $\gamma$  e tratados com L-NMMA. Os macrófagos foram infectados com as cepas Y, SC90 e SC96 na presença de diferentes concentrações de IFN- $\gamma$  e de 1 mM de L-NMMA. A taxa de infecção e o número médio de amastigotas foram avaliados após 72 horas de interação. Os resultados representam a média de 1 experimento com quadruplicata. \* Diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) em relação ao controle (cepa Y).

#### 4.4.6. Caracterização genotípica de cepas mistas antes e após passagens em macrófagos

##### 4.4.6.1. PCR semiquantitativo

Primeiramente, foi realizada a padronização da PCR semiquantitativa com o intuito de estimar as proporções dos grupos TcI e TcII em uma cepa mista. Para isso, realizou-se um estudo da cinética da reação, onde esta foi interrompida após diferentes ciclos. A fim de minimizar qualquer variação que não fosse ao acaso, foram padronizados e mantidos constantes a concentração de poliacrilamida, espessura dos géis e quantidade do produto amplificado aplicado no gel. Além disso, todas as reações de PCR foram realizadas em duplicata, a fim de se assegurar a reprodutibilidade dos resultados.

A partir da análise dos géis optou-se por interromper a reação após o 20º ciclo, onde a reação apresentava-se ligeiramente anterior ao início da fase de saturação, mas ainda na fase exponencial (Figura 17). Nessa fase, a quantidade de DNA final é função da quantidade inicial de DNA molde e proporcional ao número de ciclos.



**Figura 17. Intensidade de fragmentos de DNA obtidos pela amplificação do gene do min-exon após a interrupção da reação em diferentes ciclos.** Os fragmentos de DNA foram separados em gel de poliacrilamida 12% e corados com brometo de etídeo. MM- Marcador molecular; 2-16 ciclos; 3- 18 ciclos; 4- 20 ciclos; 5- 22 ciclos; 6- 24 ciclos; 7- 26 ciclos; 8- 28 ciclos; 9- 30 ciclos; 10- 32 ciclos; 1 e 11- controle negativo sem DNA (A). As imagens foram analisadas pelo programa Scion Image® (B).

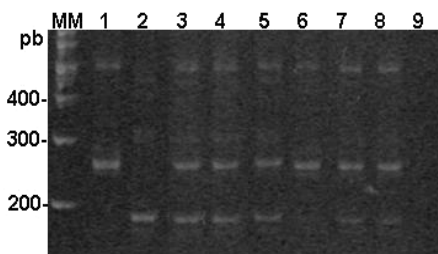
O passo seguinte consistiu em misturar quantidades conhecidas de DNA das cepa Y (TcII) e SC28 (TcI), visando validar a padronização da PCR semiquantitativa e simular a constituição genética de uma cepa mista (dados não mostrados). Pela análise densitométrica das imagens

pode-se concluir que a PCR semiquantitativa baseada no perfil molecular da região não transcrita do gene do mini-exon se mostrou adequada para a quantificação de grupos TcI e TcII em uma cepa mista.

Freitas et al. (2005) propuseram a utilização da PCR quantitativa para estimar as proporções TcI e TcII em uma cepa mista (FREITAS et al., 2005). Embora seja altamente sensível e específica, essa metodologia ainda é cara e requer equipamentos específicos, o que limita a sua utilização (MARIN et al., 2000). Assim, faz-se necessário a adaptação de metodologias mais simples e menos onerosas, como a PCR semiquantitativa.

Após a padronização da PCR semiquantitativa, as cepas SC92, SC93 (mistas naturais) e SC90+SC96 (mista artificial) foram utilizadas para infectar macrófagos murinos a fim de verificar a existência de uma possível seleção de populações de *T. cruzi* nestas células. Para isso, a proporção de cada grupo TcI e TcII presente nas cepas mistas antes de infectar macrófagos e após a conclusão do ciclo biológico foi estimada por PCR semiquantitativa. A análise do gel mostra que as três cepas antes de infectar macrófagos apresentam um perfil misto, com amplificação dos fragmentos de 200 e 250 pb característicos de cepas TcI e TcII respectivamente. Entretanto, após a conclusão do ciclo biológico em macrófagos foi possível verificar uma alteração no perfil molecular das cepas mistas, sendo observado um completo desaparecimento do fragmento de DNA de 200 pb na cepa mista artificial. Nas cepas SC92 e SC93 observou-se uma diminuição de cerca de 3 vezes na intensidade do fragmento de 200 pb (Figura 18).

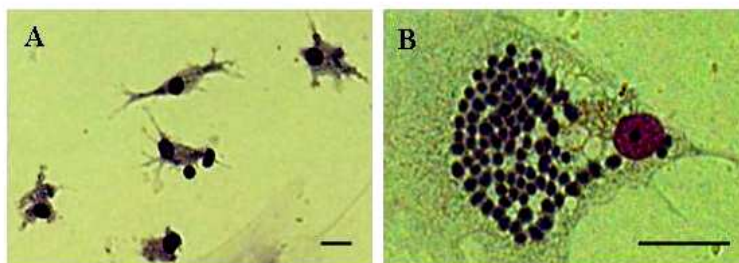
Esses dados reforçam a hipótese de que características intrínsecas do parasito como infectividade e tempo de duplicação, entre outros, podem ser fatores de grande relevância para seleção de populações TcII em infecções ocasionadas por cepas mistas. Por outro lado, os dados encontrados acima revelam que mecanismos efetores dos macrófagos podem estar envolvidos com essa seleção. Experimentos mais detalhados serão de grande valia para determinar quais os fatores do parasito bem como quais os mecanismos inatos dos macrófagos são responsáveis por tal seleção.



**Figura 18. Avaliação do perfil eletroforético de cepas mistas de *Trypanosoma cruzi* antes e após a conclusão do ciclo biológico em macrófagos murinos por PCR semiquantitativa.** Os fragmentos de DNA amplificados foram separados em gel de poliacrilamida 12% e corado com brometo de etídeo. MM- Marcador molecular; 1- Y (controle TcII); 2- SC28 (controle TcI); 3 e 6- cepa mista artificial; 4 e 7- SC92; 5 e 8- SC93; 9- controle sem DNA. As canaletas 3, 4 e 5 se refere a amostras antes de infectar macrófagos e 6, 7 e 8 a amostras após conclusão do ciclo biológico.

#### 4.4.6.2. qPCR

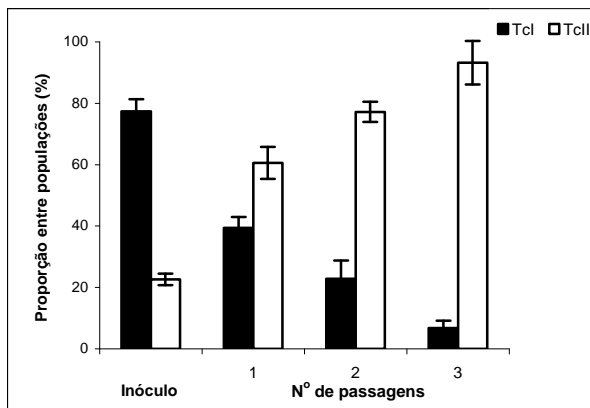
Pela relevância dos resultados obtidos com a PCR semiquantitativa, fez-se necessário investigar melhor o mecanismo de seleção de populações *T. cruzi* II em macrófagos na seleção. Dessa forma, ensaios de infecção com três passagens da cepa SC92 usando macrófagos humanos foram realizados (Figura 19) e a metodologia de qPCR foi adaptada para a estimar as proporções de populações TcI e TcII em cepas mistas de *T. cruzi*.



**Figura 19. Micrografias representativas de macrófagos humanos infectados com a cepa SC96.** A) Controle negativo com macrófagos não infectados; B) macrófago após 72 horas de infecção corados com Giemsa. A barra representa 10 µm.

Mudanças na proporção das populações TcI e TcII foram observadas durante as passagens seriadas em macrófagos. A proporção inicial era de 77,4% de TcI e 22,6% de TcII, entretanto houve um progressivo aumento na proporção de populações TcII e diminuição na proporção de populações TcI, sendo observado 93,19% de TcII e 6,81 de TcI após a terceira passagem (Figura 20). Essa alteração nas proporções de TcI e TcII provavelmente ocorreu devido a maior capacidade multiplicativa de populações TcII na cepa mista SC92, o que corrobora os resultados anteriores que demonstram que as cepas TcI (SC90 e SC91) apresentaram maior tempo de duplicação intracelular e para conclusão do ciclo biológico.

Resultados semelhantes foram obtidos por Finley e Dvorak (1987) ao estudar a cinética de crescimento *in vitro* de dois clones de *T. cruzi* com taxas de multiplicação distintas. Esses autores observaram que após 30 dias de cultivo em meio LIT de populações mistas contendo dois clones de *T. cruzi*, ocorria uma progressiva redução do clone com menor taxa de multiplicação até seu desaparecimento, mesmo sendo a proporção deste clone 20 vezes maior. Quando células musculares esqueléticas de embrião de bovino foram infectadas com estes clones de *T. cruzi*, também foi observado o desaparecimento do clone com menor capacidade multiplicativa após 12 dias de cultivo. Entretanto, estudos de simulação computacional baseados em modelos matemáticos demonstraram que se dois clones tiverem taxas de multiplicação semelhantes, um longo período de tempo pode ser requerido para que um clone predomine sobre os demais (FINLEY e DVORAK, 1987).



**Figura 20. Estimativa da proporção de populações TcI e TcII por PCR quantitativo em cepa mista submetida a passagens seriadas em macrófagos humanos.** Macrófagos foram infectados com formas tripomastigotas metacíclicas da cepa SC92. O tempo de interação para cada passagem foi de 96 horas e após este período os parasitos foram coletados e a proporção de TcI e TcII foi estimada.

No presente estudo, foi constatado diferenças nos tempos de duplicação intracelular e capacidade infectiva entre cepas do grupo TcI, mistas e TcII, sendo que estas sempre apresentaram os valores mais elevados, enquanto as cepas do grupo TcI apresentaram os menores valores. Corroborando tais resultados, verificou-se um progressivo aumento da proporção de populações TcII e diminuição na proporção de populações TcI após passagens seriadas da cepa mista SC92 em macrófagos humanos. Em virtude disso, os resultados sugerem que características intrínsecas do parasito, como tempo de duplicação e capacidade infectiva, podem ser fatores de grande relevância envolvidos na manutenção de populações de *T. cruzi* II em infecções humanas ocasionadas por cepas mistas contendo clones dos grupos TcI e TcII. Entretanto, é ainda possível que mecanismos efetores dos macrófagos podem estar envolvidos com essa seleção. Portanto, faz-se necessário estudar os fatores do parasito e os mecanismos inatos dos macrófagos responsáveis por tal seleção.

## 5. CONCLUSÕES

✓ As cepas de *T. cruzi* isoladas de humanos pertencem ao grupo TcII (DTU IIB), as quais apresentam alta similaridade genética, sugerindo que o surto de DCA no município de Navegantes ocorreu a partir de um único exemplar de barbeiro infectado;

✓ As formas tripomastigotas das cepas SC90 (TcI), SC92, SC93 (mistas), SC94 e Y (TcII) de *T. cruzi* não são lisadas pela ação do sistema complemento, o que indica que este sistema não está envolvido na seleção de populações *T. cruzi* II;

✓ As cepas Y, SC95 e SC96 pertencentes ao grupo TcII possuem maior capacidade infectiva, multiplicativa e maior expressão de gp82 em relação as cepas SC90 e SC91 (TcI) e SC92, SC93 e SC90+SC96 (mistas), o que pode estar contribuindo para a manutenção de populações TcII no hospedeiro humano;

✓ Macrófagos ativados com IFN- $\gamma$  e infectados com as cepas Y, SC96 (TcII) e SC90 (TcI) são capazes de controlar parcialmente a proliferação dos parasitos de forma dependente de NOS2, apesar de não haver diferenças na susceptibilidade entre cepas aos mecanismos microbicidas do macrófago.

✓ Em conjunto, os resultados sugerem que a manutenção de populações de *T. cruzi* II em infecções humanas ocasionadas por cepas mistas TcI/TcII pode estar relacionada com características intrínsecas do parasito, como a capacidade infectiva e o tempo de duplicação intracelular. Embora seja ainda possível que mecanismos efetores dos macrófagos estejam envolvidos com essa seleção.



## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A., LICHTMAN, A.; PILLAI, SHIV. **Imunologia celular e molecular**. 6ª Edição. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008. 564p.

ABELHA, J.; AZEVEDO, M.A.; TEIXEIRA, A.R.L. *Trypanosoma cruzi*: antigen-receptor mediated endocytosis of antibody. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.76, p.213-225, 1981.

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

ALCANTARA, A.; BRENER, Z. The *in vitro* interaction of *Trypanosoma cruzi* bloodstream forms and mouse peritoneal macrophages. **Acta Tropica**, v.35, p.209-219, 1978.

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

ALMEIDA, I.C.; FERGUSON, M.A.; SCHENKMAN, S.; TRAVASSOS, L.R. Lytic anti-alpha-galactosyl antibodies from patients with chronic Chagas' disease recognize novel O-linked oligosaccharides on mucin-like glycosyl-phosphatidylinositol-anchored glycoproteins of *Trypanosoma cruzi*. **Biochemical Journal**, v.15; p.793-802, 1994.

ANDREWS, N.W., ABRAMS, C.K., SLATIN, S.L., GRIFFITHS, F. A *Trypanosoma cruzi*-secreted protein immunologically related to the complement component C9: evidence for membrane pore forming activity at low pH. **Cell**, v.61, p.1277-1287, 1990.

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

ANZIANO, D.F.; DALMASSO, A.P.; LELCHUK, R.; VASQUEZ, C. Role of complement in immune lysis of *Trypanosoma cruzi*. **Infection and Immunity**, v.6 (5), p.860-864, 1972.

ARAÚJO-JORGE, T.C.; CASTRO, S.L. **Doença de Chagas: Manual para Experimentação Animal**. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz/Instituto Oswaldo Cruz, 2000, 368 p.

AVELAR, J.B. **Caracterização molecular de isolados de *Trypanosoma cruzi* obtidos de mulheres durante a fase crônica da doença de Chagas.** Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Goiás, 2006.

BARRET, T.V., HOFF, R.H., MOTT, K.E., MILES, M.A., GODFREY, D.G., TEIXEIRA, R., ALMEIDA DE SOUZA, J.A., SHERLOCK, I.A. Epidemiological aspects of tree *Trypanosoma cruzi*: two types of parasite populations presenting distinct characteristics. **PAHO Scientific Publication**, v.347, p.11-21, 1980.

BELLAIRE, B.H.; ROOP, R.M.; CARDELLI, J.A. Opsonized Virulent *Brucella abortus* Replicates within Nonacidic, Endoplasmic Reticulum-Negative, LAMP-1-Positive Phagosomes in Human Monocytes. **Infection and Immunity**, v.73, p.3702–3713, 2005.

BITTENCOURT, A.L. Transmissão Vertical da doença de Chagas. In: BRENER, Z.; ANDRADE, Z.A.; BARRAL-NETO, M. ***Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas.** 2ª Edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. 4 p.

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

BOSSENO, M.F., TELLERIA, J., VARGAS, F., YAKSIC, N., NOIREAU, F., MORIN, A., BRENIÈRE, S.F. *Trypanosoma cruzi*: study of the distribution of two widespread clonal genotypes in Bolivian *Triatoma infestans* vectors shows a high frequency of mixed infections. **Experimental Parasitology**, v.83, n.3, p.275-282, 1996.

BOTERO, L.A.; MEJIA, A.M.; TRIANA, O. Caracterización biológica y genética de dos clones pertenecientes a los grupos I y II de *Trypanosoma cruzi* de Colombia. **Biomédica**, v.27, p.64-74, 2007.

BOYUM, A. Isolation of lymphocytes, granulocytes and macrophages. **Scandinavian Journal of Immunology Supplement**, v.5, p.9–15, 1976.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p.248-254, 1976.

BRENER Z, GAZZINELLI RT. Immunological control of *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas' disease. **International Archives of Allergy and Immunology**, v.114, p.103-10, 1997.

- BRENER, Z. Biology of *Trypanosoma cruzi*. **Annual Review of Microbiology**, v. 27, p.347-382, 1973.
- BRENER, Z., ANDRADE, Z., BARRAL-NETTO, M. *Trypanosoma cruzi e doença de Chagas*, 2ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.
- BRINGAUD, F.; GHEDIN, E.; EL-SAYED, N.M.A.; PAPADOPOULOU, B. Role of transposable elements in trypanosomatids. **Microbes and Infection**, v.10, p.575-581, 2008.
- BRISSE, S., VERHOEF, J., TIBAYRENC, M. Characterization of large and small subunit rRNA and mini-exon genes further supports the distinction of six *Trypanosoma cruzi* lineages. **International Journal for Parasitology**, v.31, p.1218-1226, 2001.
- BRISSE, S.; BARNABÉ, C.; TIBAYRENC, M. Identification of six *Trypanosoma cruzi* phylogenetic lineages by random amplified polymorphic DNA and multilocus enzyme electrophoresis. **International Journal for Parasitology**, v.30, p.35-44, 2000.
- BURLEIGH, B., ANDREWS, N.W. Signaling and host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. **Current Opinion in Microbiology**, v.1, p.461-465, 1998.
- BURLEIGH, B.A., WOOLSEY, A.M. Cell signalling and *Trypanosoma cruzi* invasion. **Cellular Microbiology**, v.4, n.11, p.701-711, 2002.
- CALER, E.V., CHAKRABARTI, S., FOWLER, K.T., RAO, S., ANDREWS, N.W. The Exocytosis-regulatory protein synaptotagmin VII mediates cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. **The Journal of Experimental Medicine**, v.193, n.9, p. 1097-1104, 2001.
- CAMARGO, E.P. Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi*. I. Origin of metacyclic trypomastigotes in liquid media. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.6, p.93-100, 1964.
- CARDILLO, F.; VOLTARELLI, J.C.; REED, S.G.; SILVA, J.S. Regulation of *Trypanosoma cruzi* infection in mice by gamma interferon and interleukin 10: role of NK cells. **Infection and Immunity**, v.64, p.128-138, 1996.
- CARDOSO DE ALMEIDA, M.L.; HEISE, N. Proteins anchored via glycosylphosphatidylinositol and solubilizing phospholipases in *Trypanosoma cruzi*. **Biological Research**, v.26, p.285-312, 1993.
- CDC (Centers for Disease Control & Prevention). Division of Parasitic Disease. Laboratory identification of Parasites of Public Health Concern. National Center

for infectious Diseases, DPDx Identification and Diagnosis of Parasites of Public Health Concern. Disponível em <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx>. Acesso em 18 de setembro de 2009.

CERQUEIRA, G.C.; BARTHOLOMEU, D.C.; DAROCHA, W.D.; HOU, L.; FREITAS-SILVA, D.M.; MACHADO, C.R.; EL-SAYED, N.M.; SANTUZA, M.R. Sequence diversity and evolution of multigene families in *Trypanosoma cruzi*. **Molecular & Biochemical Parasitology**, v.157, p. 65–72, 2008.

CESTARI, I.S. ***Trypanosoma cruzi* e o Sistema Complemento: Mecanismos de ativação e o papel do gene CRIT (Complement C2 Receptor Inhibitor Trispanning) na resistência à lise em cepas de classe I e II.** Dissertação de mestrado. Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz, Brasil, 2006.

CESTARI, I.S.; EVANS-OSSES, I.; FREITAS, J.C.; INAL, J.M.; RAMIREZ, M.I. Complement C2 Receptor Inhibitor Trispanning Confers an Increased Ability to Resist Complement-Mediated Lysis in *Trypanosoma cruzi*. **The Journal of Infectious Diseases**, v.198, p.1276-1283, 2008.

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

CHANG, K.P. Human cutaneous leishmania in a mouse macrophage line: propagation and isolation of Intracellular Parasites. **Science**, v.209, p.1240-1242, 1980.

CHARIF, H.; DARCY, F.; TORPIER, G.; CESBRON-DELAUW, M.F.; CAPRON, A. *Toxoplasma gondii*: Characterization and localization of antigens secreted from tachyzoites. **Experimental Parasitology**, v.71, p.114-124, 1990.

CICCARELLI, A.; ARAUJO, L.; BATTLE, A.; LOMBARDO, E. Effect of haemin on growth, protein content and the antioxidant defence system in *Trypanosoma cruzi*. **Parasitology**, v.134, p.959-965, 2007.

CORTEZ, M.; NEIRA, I.; FERREIRA, D.; LUQUETTI, A.O.; RASSI, A.; ATAYDE, V.D.; YOSHIDA, N. Infection by *Trypanosoma cruzi* metacyclic forms deficient in gp82 but expressing a related surface molecule gp30. **Infection and Immunity**, v.71, p.6184-6191, 2003.

D'ÁVILA, D.A.; MACEDO, A.M.; VALADARES, H.M.S.; GONTIJO, E.D.; CASTRO, A.M.; MACHADO, C.R.; CHIARI, E.; GALVA, A.L.M.C. Probing Population Dynamics of *Trypanosoma cruzi* during Progression of the Chronic

Phase in Chagasic Patients. **Journal Of Clinical Microbiology**, v.47, p.1718-1725, 2009.

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

DEVERA, R.; FERNANDES, O.; COURA, J.R. Should *Trypanosoma cruzi* be Called .cruzi. Complex? A Review of the Parasite Diversity and the Potential of Selecting Population after in Vitro Culturing and Mice Infection. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.98, p.1-12, 2003.

DI NOIA, J.M., BUSCAGLIA, C.A., DE MARCHI, C. R., ALMEIDA, I.C., FRASCH, A.C.C. A *Trypanosoma cruzi* small surface molecule provides the first immunological evidence that Chagas' Disease is due to a single parasite lineage. **The Journal of Experimental Medicine**, v.195, n.4, p.401-413, 2002.

DIAS, A.C.P. The indeterminate form of Human Chronic Chagas' disease. A clinical epidemiological study. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.22, n.3, p.147-156, 1989.

DIAS, E. Estudos sobre o *Schizotrypanum cruzi*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.27, p.100-110, 1934.

DIAS, J.C.P. Doença de Chagas: sucessos e desafios. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v.22(10), p.2020-2021, 2006.

DICE, L. R Measure of the amount of ecological association between species. **Ecology**, v.26, p.297-302, 1945.

DOCAMPO R., SCOTT, D.A., VERCESI A.E. e MORENO S.N.J. The role of  $Ca^{2+}$  in the process of cell invasion by intracellular parasites. **Parasitology Today**, v.12, p.61-65, 1996.

EL-SAYED, N.M.; MYLER, P.J.; BARTHOLOMEU, D.C.; NILSSON, D.; AGGARWAL, G.; TRAN, A.; GHEDIN, E.; WORTHEY, E.A.; DELCHER, A.L.; BLANDIN, G.; WESTENBERGER, S.J.; CALER, E.; CERQUEIRA, G.C.; BRANCHE, C.; HAAS, B.; ANUPAMA, A.; ARNER, E.; ASLUND, E.; ATTIPOE, F.; BONTEMPI, E.; BRINGAUD, F.; BURTON, P.; CADAG, E.; CAMPBELL, D.A.; CARRINGTON, M.; CRABTREE, J.; DARBAN, H.; DA SILVEIRA, J.F.; JONG, P.; EDWARDS, K.; ENGLUND, P.T.; FAZELINA, G.; FELDBLYUM, T.; FERELLA, M.; FRASCH, A.C.; GULL, K.; HORN, D.; HOU, L.; HUANG, Y.; KINDLUND, E.; KLINGBEIL, M.; KLUGE, S.; KOO, H.; LACERDA, D.; LEVIN, M.J.; LORENZI, H.; LOUIE, T.; MACHADO,

C.R.; MCCULLOCH, R.; MCKENNA, A.; MIZUNO, Y.; MOTTRAM, J.C.; NELSON, S.; OCHAYA, S.; OSOEGAWA, K.; PAI, G.; PARSONS, M.; PENTONY, M.; PETERSSON, U.; POP, M.; RAMIREZ, J.L.; RINTA, J.; ROBERTSON, L.; SALZBERG, S.L.; SANCHEZ, D.O.; SEYLER, A.; SHARMA, R.; SHETTY, J.; SIMPSON, A.J.; SISK, E.; TAMMI, M.T.; TARLETON, R.; TEIXEIRA, S.; VAN AKEN, S.; VOGT, C.; WARD, P.N.; WICKSTEAD, P.; WORTMAN, P.; WHITE, O.; FRASER, C.M.; STUART, K.D.; ANDERSSON, B. The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. **Science**, v.309, p.409-415, 2005.

ERBE, D.V.; PFEFFERKORN, E.R.; FANGER, M.W. Functions of the various IgG Fc receptors in mediating killing of *Toxoplasma gondii*. **The Journal of Immunology**, v.146, p.3145-3151, 1991.

EZE, M.O.; YUAN, L.; CRAWFORD, R.M.; PARANAVITANA, C.M.; HADFIELD, T.L.; BHATTACHARJEE, A.K.; WARREN, R.L.; HOOVER, D.L. Effects of Opsonization and Gamma Interferon on Growth of *Brucella melitensis* 16M in Mouse Peritoneal Macrophages *in vitro*. **Infection and Immunity**, v.68, p. 257-263, 2000.

FALLA, A.; HERRERA, C.; FAJARDO, A.; MONTILLAB, M.; VALLEJO, G.A.; GUHLA, F. Haplotype identification within *Trypanosoma cruzi* I in Colombian isolates from several reservoirs, vectors and humans. **Acta Tropica**, v.110, p.15–21, 2009.

FAVORETO, J.R.S; DORTA, M.L.; YOSHIDA, N. *Trypanosoma cruzi* 175 kDa protein tyrosine phosphorylation is associated with host cell invasion. **Experimental Parasitology**, v.89, p.188-194, 1998.

FERNANDES, C. D. ; MURTA, S. M. F. ; CERAVOLO, I. P. ; KRUG, L. P. ; VIDIGAL, P. G. ; STEINDEL, M. ; NARDI, N. ; ROMANHA, A. J. Characterization of *Trypanosoma cruzi* strains Isolated from Chronic Chagasic Patients Triatomines and Opossums Naturally Infected from the State of Rio Grande do Sul, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.92, p.343-351, 1997.

FERNANDES, C. D. ; PENA, D. A. ; GARCIA, L. C. ; ROMANHA, A. J. ; STEINDEL, M. . Two *Trypanosoma cruzi* subgroup Infect Chronic Chagasic Patients from the State of Rio Grande do Sul, Brazil. In: **XIII International Congress of Protistology**, 2009, Buzíos.

FERNANDES, C.D. **Avaliação imunoparasitológica de pacientes chagásicos submetidos ao tratamento específico e estudo da heterogeneidade genética de cepas de *Trypanosoma cruzi* isoladas de pacientes do Estado do Rio Grande do Sul**. Tese de doutorado, Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz, 2008.

FERNANDES, M.C., CORTEZ, M., YONEYAMA, K.A.G., STRAUS, A.H., YOSHIDA, N., MORTARA, R.A. Novel strategy in *Trypanosoma cruzi* cell invasion: Implication of cholesterol and host cell microdomains. **International Journal for Parasitology**, v.37, n.13, p.1431-1441, 2007.

FERNANDES, O., SANTOS, S.S., CUPOLILLO, E., MENDONÇA, B., DERRE, R., JUNQUEIRA, A.C., SANTOS, L.C., STURM, N.R., NAIFF, R.D., BARRETT, T.V., CAMPBELL, D.A., COURA, J.R. A mini-exon multiplex polymerase chain reaction to distinguish the major groups of *Trypanosoma cruzi* and *T. rangeli* in the Brazilian Amazon. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.95, p.97-99, 2001.

FERNANDES, O.; SOUTO, R.P.; CASTRO, J.A.; PEREIRA, J.B.; FERNANDES, N.C.; JUNQUEIRA, A.C.; NAIFF, R.D.; BARRETT, T.B.; DEGRAVE, W.; ZINGALES, B.; CAMPBELL, D.A.; COURA, J.R. Brazilian isolates of *Trypanosoma cruzi* from human and triatomines classified into two lineages using mini-exon and ribosomal RNA sequence. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.58, p.807-811, 1998.

FERREIRA, M.S., LOPES, E.R., CHAPADEIRO, E., DIAS, J.C.P., OSTERMAYER, A.L. **Doença de Chagas**. In: VERONESI, R.; FOCACCIA, R. Tratado de Infectologia. 2ª Edição Ed. Atheneu, 2002. 38p.

FERREIRA, V.; VALCK, C.; SÁNCHEZ, G.; GINGRAS, A., TZIMA, S.; MOLINA, M.C.; SIM, R.; SCHWAEBLE, W.; FERREIRA, A. The Classical Activation Pathway of the Human Complement System Is Specifically Inhibited by Calreticulin from *Trypanosoma cruzi*. **The Journal of Immunology**, v. 172, p.3042-3050, 2004.

FINLEY, R.W.; DVORAK, J.A. *Trypanosoma cruzi*: Analysis of the Population Dynamics of Heterogeneous Mixtures **The Journal of Protozoology**, v.34, p.409-15, 1987.

FRANCO, D.A.; VAGO, A.R.; CHIARI, E.; MEIRA, F.C.A.; GALVÃO, L.M.C.; MACHADO, C.R.S. *Trypanosoma cruzi*: mixture of two populations can modify virulence and tissue tropism in rat. **Experimental Parasitology**, v.104, p.54-61, 2003.

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

GAUNT, M.; MILES, M. The Ecotopes and Evolution of Triatomine Bugs (Triatominae) and their Associated Trypanosomes. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.95, p.557-565, 2000.

GAUNT, M.W.; YEO, M.; FRAME, I.A.; STOTHARD, J.R.; CARRASCO, H.J.; TAYLOR, M.C.; MENA, S.S.; VEAZEY, P.; MILES, G.A.J.; ACOSTA, N.; DE ARIAS, A.R.; MILES, M.A. Mechanism of genetic exchange in American trypanosomes. **Nature**, v.421, p.936-939, 2003.

GAUNT, M.W.; YEO, M.; FRAME, I.A.; STOTHARD, J.R.; CARRASCO, H.J.; TAYLOR, M.C.; MENA, S.S.; VEAZEY, P.; MILES, G.A.; ACOSTA, N.; ARIAS, A.R.; MILES, M.A. Mechanism of genetic exchange in American trypanosomes. **Nature**, v.421, p.936-939, 2003.

GAZZINELLI, R.T.; DENKERS, E.Y. Protozoan encounters with Toll-like receptor signalling pathways: implications for host parasitism. **Nature Reviews Immunology**, v.6, p.895-906, 2006.

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

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

GIBSON, W., MILES, M. The karyotype and ploidy of *Trypanosoma cruzi*. **The EMBO journal**, v.5, p.1299-1305, 1986.

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

GOMES, M.L.; MACEDO, A.M.; PENA, S.D.J.; CHIARI, E. Genetic relationships between *Trypanosoma cruzi* strains isolated from chronic chagasic patients in southern Brazil as revealed by RAPD and SSR-PCR analysis. **Acta Tropica**, v.69; p.99-109, 1998.

GUTIERREZ, F.R.S.G.; MINEO, T.W.P.; PAVANELLI, W.R.; GUEDES, P.M.M.; SILVA, J.S. The effects of nitric oxide on the immune system during *Trypanosoma cruzi* infection. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.104, p.236-245, 2009.



HERRERA, C.; BARGUES, M.D.; FAJARDO, A.; MONTILLA, M.; TRIANA, O.; VALLEJO, G.A.; GUHL, F. Identifying four *Trypanosoma cruzi* I isolate haplotypes from different geographic regions in Colômbia. **Infection, Genetics and Evolution**, v.7, p.535-539, 2007.

HERRERA, L., XAVIER, S.C., VIEGAS, C., MARTINEZ, C., COTIAS, P.M., CARRASCO, H., URDANETA-MORALES, S., JANSEN, A.M. *Trypanosoma cruzi* in a caviomorph rodent: parasitological and pathological features of the experimental infection of *Trichomys apereoides*. **Experimental Parasitology**, v.107, p.78-88, 2004.

HIGO, H.; MIURA, S.; HORIO, M.; MIMORI, T.; HAMANO, S.; AGATSUMA, T.; YANAGI, T.; CRUZ-REYES, A.; UYEMA, N.; ARIASI, R.D.; MATTA, V.; AKAHANEK, H.; YAMAL, K.H.; TAKEUCHIB, T.; TADAA, I.; HIMENO, K. Genotypic variation among lineages of *Trypanosoma cruzi* and its geographic aspects. **Parasitology International**, v.53, p.337-344, 2004.

HOLSCHER, C.; KOHLER, G.; MULLER, U.; MOSSMANN, H.; SCHAUB, G.A.; BROMBACHER, F. Defective nitric oxide effector functions lead to extreme susceptibility of *Trypanosoma cruzi*-infected mice deficient in gamma interferon receptor or inducible nitric oxide synthase. **Infection and Immunity**, v.66, n.3, p.1208-1215, 1998.

JAMES, S.L. Role of nitric oxide in parasitic infections. **Microbiological reviews**, v.59, p.533-547, 1995.

JAWETZ, E., MELNICK, J.L., ADELBERG, E.A., BROOKS, G.F., BUTEL, J.S., ORNSTON, L.N. **O crescimento, a sobrevivência e a morte de microorganismos**. In: Microbiologia médica. 18ª Edição Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991.

JI, Y.H., FUJITA, T., HATSUSE, H., TAKAHASHI, A., MATSUSHITA, M., KAWAKAMI, M. Activation of the C4 and C2 components of complement by a proteinase in serum bactericidal factor, Ra reactive factor. **The Journal of Immunology**, v.15, n.2, p.571-578, 1993.

JOINER, K.; HIENY, S.; KIRCHHOFF, L.V.; SHER, A. Gp72, the 72 kilodalton glycoprotein, is the Membrane acceptor site for c3 on *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. **Journal of Experimental Medicine**, v.161, p. 1196-1212, 1985.

JOINER, K.W.; DIAS DA SILVA, M.; RIMOLDI, C.; HAMMER, A.Q.; SHER, A.; KIPNIS, T. Biochemical characterization of the factor produced by

trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi* the accelerates the decay of complement C3 convertases. **The Biochemical Journal**, v.263, p.11327-11335, 1988.

JONES, T.C.; LEN, L.; HIRSCH, J.G. Assessment in vitro of immunity against *Toxoplasma gondii*. **The Journal of experimental medicine**, v.141, p.466-482, 1975.

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

KIPNIS, T.L., DA SILVA, W.D. Evasion of *Trypanosoma cruzi* from complement lysis. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.22, n.1, p.1-16, 1989.

KIPNIS, T.L.; CALICH, V.L.; SILVA, W.D. Active entry of bloodstream forms of *Trypanosoma cruzi* into macrophages. **Parasitology**, v.78, p.89-98, 1979.

KIRCHHOFF, L.V., VOTAVA, J.R., OCHS, D.E., MOSER, D.R. Comparison of PCR and microscopic methods for detecting *Trypanosoma cruzi*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.34, n.5, p.1171-1175, 1996.

KOFOID, C.A.; WOOD, F.D.; MCNEIL, E. The cycle of *Trypanosoma cruzi* in tissue culture of embryonic heart muscle cell. **University of California Publications in Zoology**, v.41, p.23-24, 1935.

KRAUTZ, G.M.; KISSINGER, J.C.; KRETTLI, A.U. The Targets of the Lytic Antibody Response against *Trypanosoma cruzi*. **Parasitology Today**, v.16, n.1, p.31-34, 2000.

KRETTLI, A.U., BRENER, Z. Resistance against *Trypanosoma cruzi* associated to anti-living trypomastigote antibodies. **The Journal of Immunology**, v.128, p.2009-2012, 1982.

KRETTLI, A.U.; WEISZ-CARRINGTON, P. NUSSENZWEING, R.S. Membrane-bound antibodies to bloodstream *Trypanosoma cruzi* in mice: strain differences in susceptibility to complement mediated lysis. **Clinical and Experimental Immunology**, v.37, p.416-423, 1979.

KUMARATILAKE, L.M.; FERRANTE, A. Opsonization and Phagocytosis of *Plasmodium falciparum* Merozoites Measured by Flow Cytometry. **Parasite Immunology**, v.25, p.17-25, 2003.

LANA, M.; CHIARI, C.L.; CHIARI, E.; MOREL, C.M.; GONÇALVES, A.M.; ROMANHA, A.J. Characterization of two isolates of *Trypanosoma cruzi* obtained from the patient Berenice, the first human case of Chagas' disease described by Carlos Chagas in 1909 **Journal Parasitology Research**, v.82, p.257-260, 1996.

LEE, Y.K.; CHANG, H.H.; KIM, J.S.; KIM, J.K.; LEE, K.S. Lignocellulolytic mutants of *Pleurotus ostreatus* induced by gamma-ray radiation and their genetic similarities. **Radiation Physics and Chemistry**, v.57, p.145-150, 2000.

LEWIS, M.D.; LLEWELLYN, M.S.; GAUNT, M.W.; YEO, M., CARRASCO, H.S.; MILES, M.A. Flow cytometric analysis and microsatellite genotyping reveal extensive DNA content variation in *Trypanosoma cruzi* populations and expose contrasts between natural and experimental hybrids. **International Journal for Parasitology**, v.39, p.1305-1317, 2009.

LIEKE, T.; STEEG, C.; GRAEFE, S.E.; FLEISCHER, B.; JACOBS, T. Interaction of natural killer cells with *Trypanosoma cruzi*-infected fibroblasts. **Clinical and Experimental Immunology**, v.145, p.357-364, 2006.

LISBOA, C.V., PINHO, A.P., MONTEIRO, R.V., JANSEN, A.M. *Trypanosoma cruzi* (kinetoplastida Trypanosomatidae): Biological heterogeneity in the isolates derived from wild hosts. **Experimental Parasitology**, v.116, p.150-155, 2007.

LUNA-MARÍN, K.P.; JARAMILLO-LONDOÑO, C.J.; HERNÁNDEZ-TORRES, J., GUTIÉRREZ-MARÍN, R.; VALLEJO, G.A.; ANGULO-SILVA, A.V. ITS-RFLP- and RAPD-based genetic variability of *Trypanosoma cruzi* I, human and vector strains in Santander (Colombia). **Parasitology Research**, v. 105, p.1432-1955, 2009.

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

MACEDO, A. M.; PIMENTA, J.R.; AGUIAR, R.S.; MELO, A.I.R.; CHIARI, E.; ZINGALES, B.; PENA, S.D.J. Usefulness of microsatellite typing in population genetic studies of *Trypanosoma cruzi*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.96, p.407-413, 2001.

MACEDO, A.M.; PENA, S.D.J. Genetic variability of *Trypanosoma cruzi*: implications for the pathogenesis of Chagas disease. **Parasitology today**, v.14, p.119–123, 1998.

MACHADO, C.A.; AYALA, F.J. Nucleotide sequences provide evidence of genetic exchange among distantly related lineages of *Trypanosoma cruzi*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.98, p.7396-7401, 2001.

MÁLAGA, S., YOSHIDA, N. Targeted reduction in expression of *Trypanosoma cruzi* surface glycoprotein gp90 increases parasite infectivity. **Infection and Immunity**, v.69, p.353-359, 2001.

MANGIA R.H.R. *Trypanosoma cruzi*: **Caracterização Biológica e Bioquímica de Clones de um Mesmo Isolado Obtido de Didelphis marsupialis Naturalmente Infectado**. Dissertação de Mestrado, Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz, Brasil, 1995, 50 p.

MANQUE, P.M., NEIRA, I., ATAYDE, V.D., CORDERO, E., FERREIRA, A. T., DA SILVEIRA, J.F., RAMIREZ, M., YOSHIDA, N. Cell adhesion and Ca<sup>2+</sup> signaling activity in stably transfected *Trypanosoma cruzi* epimastigotes expressing the metacyclic stage-specific surface molecule gp82. **Infection and Immunity**, v.71, n.3, p.1561-1565, 2003.

MANQUE, P.M.; EICHINGER, D.; JULIANO, M.A.; JULIANO, L.; ARAYA, J.E.; YOSHIDA, N. Characterization of the Cell Adhesion Site of *Trypanosoma cruzi* Metacyclic Stage Surface Glycoprotein gp82. **Infection and immunity**, v.68, p.478-484, 2000.

MARIN, L.J.; CUNHA, A.A.; AQUINO, V.H.; FIGUEIREDO, L.T.M. Desenvolvimento de uma metodologia de PCR semiquantitativa utilizando plasmídeo clonado com parte do gene gB de citomegalovírus/Development of a semi-quantitative PCR method using a plasmid cloned with part of the gB gene of cytomegalovirus. **Medicina (Ribeirão Preto)**, v.35, p.85-94, 2002.

MEIRELLES, M.N.; ARAÚJO JORGE, T.C.; SOUZA, W. Interaction of *Trypanosoma cruzi* with macrophages in vitro: dissociation of the attachment and internalization phases by low temperature and cytochalasin B. **Zeitschrift für Parasitenkunde**, v.68, p.7-14, 1982.

MEJÍA, A.M.; TRIANA, O. Análisis por LSSP-PCR de La variabilidad genética de *Trypanosoma cruzi* en sangre y órganos de ratones. **Biomédica**, v.25, p.76-86, 2005.

METZ, G.; CARLIER, Y.; VRAY, B. *Trypanosoma cruzi* upregulates nitric oxide release by IFN-gamma-preactivated macrophages, limiting cell infection

independently of the respiratory burst. **Parasite Immunology**, v.15, p.693-699, 1993.

MEYER, H.; XAVIER DE OLIVEIRA, M. Cultivation of *Trypanosoma cruzi* in tissue culture: a four year study. **Parasitology**, v.39, p.91-94. 1948.

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

MILES, M.A., LANHAN, S.M., DE SOUZA, A.A., POVOA, D.G. Further enzymic characters of *Trypanosoma cruzi* and their evaluation for strain identification. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.74, p.221-242, 1980.

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

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

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Manual Prático de Subsídio à Notificação Obrigatória no SINAN. 20 p., 2004.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Nota técnica: doença de Chagas Aguda por transmissão oral, 2007.

[http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/nota\\_chagas2308.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/nota_chagas2308.pdf).

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

MOREL, C., CHIARI, E., CAMARGO, E.P., MATTEI, D.M., ROMANHA, A.J., SIMPSON, L. Strains and clones of *Trypanosoma cruzi* can be characterized by pattern of restriction endonuclease products of kinetoplast DNA minicircles. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.77, p.6810-6814, 1980.

MORTARA, R.A. *Trypanosoma cruzi*: amastigotes and trypomastigotes interact with different structures on the surface of HeLa cells. **Experimental Parasitology**, v.73, p.1–14, 1991.

MOTA, I.; UMEKITA, L.F. The effect of C3 depletion on the clearance of *Trypanosoma cruzi* induced by IgG antibodies. **Immunology letters**, v.21, p.223-225, 1989.

MURAD, F. Regulation of cytosolic guanylyl cyclase by nitric oxide: the NO-cyclic GMP signal transduction system. **Advances in pharmacology**, v.26, p.19-33, 1994.

NEIRA, I.; SILVA, F. A.; CORTEZ, M.; YOSHIDA, N. Involvement of *Trypanosoma cruzi* Metacyclic Trypomastigote Surface Molecule gp82 in Adhesion to Gastric Mucin and Invasion of Epithelial Cells. **Infection and immunity**, v.71, p. 557-561, 2003.  
g antibodies

NICKELL, S.P.; STRYKER, G.A.; AREVALO, C. Isolation from *Trypanosoma cruzi*-infected mice of CD8+, MHC-restricted cytotoxic T cells that lyse parasite-infected target cells. **The Journal of Immunology**, v.150, N.4, 1446-1457, 1993.

NOGUEIRA, N.; BIANCO, C.; COHN, Z. Studies on the selective lysis and purification of *Trypanosoma cruzi*. **The Journal of Experimental Medicine**, v.142, n.1, p.224-229, 1975.

NOGUEIRA, N.; COHN, Z. *Trypanosoma cruzi*: mechanism of entry and intracellular fate in mammalian cells. **The Journal of Experimental Medicine**, v.1, p.1402–1420, 1976.

NORRIS, K.A.; HARTH, G.; SO, M. Purification of a *Trypanosoma cruzi* membrane glycoprotein which elicits lytic antibodies. **Infection and immunity**, v.57, p.2372-2377, 1989.

OLIVEIRA, R.P.; BROUDE, N.E.; MACEDO, A.M.; CANTOR, C.R.; SMITH, C.L.; PENA, S.D.J. Probing the genetic population structure of *Trypanosoma cruzi* with polymorphic microsatellites. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.95, p.3776–3780, 1998.

OLIVEIRA, R.P.; BROUDE, N.E.; MACEDO, A.M.; CANTOR, C.R.; SMITH, CL.; PENA, S.D. Probing the genetic population structure of *Trypanosoma cruzi* with polymorphic microsatellites. **Genetics**, v.95, p.3776–3780, 1998.

OLIVEIRA, R.P.; MELO, A.I.R.; MACEDO, A.M.; CHIARI, E.; PENA, S.D.J. The Population Structure of *Trypanosoma cruzi*. Expanded Analysis of 54 Strains Using Eight Polymorphic CA-repeat Microsatellites. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.94, p.65-70, 1999.

ORTIZ-ORTIZ L.; ORTEGA, T.; CAPIN, R.; MARTINEZ, T. Enhanced mononuclear phagocytis activity during *Trypanosoma cruzi* infection in mice. **International archives of allergy and applied immunology**, v.50, p.232-242, 1976.

PREVIATO, J.O.; JONES, C.; GONÇALVES, L.P.; WAIT, R.; TRAVASSOS, L.R.; MENDONÇA-PREVIATO, L. O-glycosidically linke N-acetylglucosaminebound oligosaccharides from glycoproteins of *Trypanosoma cruzi*. **The Biochemical Journal**, v.301, p.151-159, 1994.

RAMIREZ, M.I., RUIZ, R.C., ARAYA, J.E., FRANCO DA SILVEIRA, J.E., YOSHIDA, N. Involvement of the stage-specific 82-kilodalton adhesion molecule of *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigotes in host cell invasion. **Infection and immunity**, v.61, p.3636-3641, 1993.

RASSI, A., RASSI, A. J., LITTLE, W.C. Chagas' heart disease. **Clinical Cardiology**, v.23, p.883-889, 2000.

REED, S.G. Cytokine controlo f the macrophage parasites *Leishmania* and *Trypanosoma cruzi*. In: **Molecular Approaches to Parasitology**. New York: Wiley-Liss, Inc, p.443-453, 1995.

RISSO, M.G., GARBARINO, G.B., MOCETTI, E., CAMPETELLA, O., CAPPÀ, S.M.G., Differential expression of a virulence factor, the trans-sialidase, by the main *Trypanosoma cruzi* phylogenetic lineages. **Journal of Infectious Diseases**, v.15, n.12, p.2250-2259, 2004.

ROMANHA, A.J. **Heterogeneidade enzimática em *Trypanosoma cruzi***. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Minas gerais, 1982.

ROTTENBERG, M.E.; CASTAÑOS-VELEZ, E.; DE MESQUITA, R.; LAGUARDIA, O.G.; BIBERFELD, P.; ORN, A. Intracellular co-localization of *Trypanosoma cruzi* and inducible nitric oxide synthase (iNOS): evidence for dual pathway of iNOS induction. **European Journal of Immunology**, v.26, p.3203-13, 1996.

RUIZ RC. ***Trypanosoma cruzi*: associação entre infectividade e expressão de glicoproteínas com atividade sinalizadora de cálcio**. Tese de doutorado. Universidade Federal de São Paulo, SP, Brasil, 1998.

RUIZ, R.C.; FAVORETO, S.; DORTA, M.L.; OSHIRO, M.E.M.; FERREIRA, A.T.; MANQUE, P.M.; YOSHIDA, N. Infectivity of *Trypanosoma cruzi* stains is associated with differential expression of surface glycoproteins with differential Ca<sup>2+</sup> signaling activity. **The Biochemical journal**, v.330, p. 505-511, 1998.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning: a laboratory manual**. 2ª Edição N.Y., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 1659 p.

SANTIAGO, H.C.; GENG, C.G.; BÁFICA, A.; ROFFE, E.; ARANTES, R.M.; CHEEVER, A.; TAYLOR, G.; VIERIRA, L.Q.; ALIBERYI, J.; GAZZINELLI, R.; SHER, A. Mice Deficient in LRG-47 Display Enhanced Susceptibility to *Trypanosoma cruzi* Infection Associated with Defective Hemopoiesis and Intracellular Control of Parasite Growth. **The Journal of Immunology**, v. 15, p.8165-72, 2005.

SANTOS, D.M.; TALVANI, A.; GUEDES, P.M.M.; MACHADO-COELHO, G.L.L.; LANA, M.; BAHIA, M.T. *Trypanosoma cruzi*: Genetic diversity influences the profile of immunoglobulins during experimental infection. **Experimental Parasitology**, v.121, p.8-14, 2009.

SANTOS, F.R.; PENA, S.D.; EPPLIN, J.T. Genetic and population study of a Y-linked tetranucleotide repeat DNA polymorphism with a simple non-isotopic technique. **Human Genetics**, v.90, p.655-656, 1993.

SCHENKMAN, S., ANDREWS, N.W., NUSSENZWEIG, V., ROBBINS, E.S. *Trypanosoma cruzi* invade a mammalian epithelial cell in a polarized manner. **Cell**, v.55, p.157-165, 1988.

SCHWENK, R.; ASHER, L.V.; CHALOM, I.; LANAR, D.; SUN, P.; WHITE, K.; KEIL, D.; KESTER, K.E.; STOUTE, J.; HEPPNER, D.G.; KRZYCH, A. Opsonization by antigen-specific antibodies as a mechanism of protective immunity induced by *Plasmodium falciparum* circumsporozoite protein-based vaccine. **Parasite immunology**, v.25, p.17-25, 2003.

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

SILVA, W.D., MOTA, I. **Imunologia Básica e Aplicada**. 5ª Edição. Rio de janeiro: Ed. Guanabara Koogan, 2003. 388p.



- SNEATH, P.H.A., SOKAL, R.R. Numerical taxonomy. **Nature**, v.193, p.853-860, 1962.
- SOUTO, R.P., FERNANDES, O., MACEDO, A.M., CAMPBELL, D.A., ZINGALES, B. DNA markers define two major phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v.3, p.141-152, 1996.
- SOUZA, M.A. A simple Method to Purify Biologically and Antigenically Preserved Bloodstream Trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi* DEAE-Celulose Columns. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.78, p.317-333, 1983.
- SOUZA, W. **O parasita e sua interação com os hospedeiros**. In: *Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas. 2 ed. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan. 2000, 38p.
- STEINDEL, M., DIAS NETO, E., MENEZES, C.L.P., ROMANHA, A.J., SIMPSON, A.J.G. Random Amplified Polymorphic DNA analysis of *Trypanosoma cruzi* strains. **Molecular Biochemical Parasitology**, v.60, p.71-80, 1993.
- STEINDEL, M., DIAS, J.C.P., ROMANHA, A.J. Doença de Chagas: Mal que ainda preocupa. **Ciência Hoje**, v.37, n.217, p.32-37, 2005.
- STEINDEL, M., PACHECO, L.K., SCHOLL, D., SOARES, M., MORAES, M.H., EGER, I., KOSMANN, C., SINCERO, T.C.M., STOCO, P.H., MURTA, S.M.F., CARVALHO PINTO, C.J, GRISARD, E.C. Characterization of *Trypanosoma cruzi* isolated from humans, vectors, and animal reservoirs following an outbreak of acute human Chagas disease in Santa Catarina State, Brazil. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v.60, p.25-32, 2008.
- STEINDEL, M., TOMA, H.K., ISHIDA, M.M., MURTA, S.M., PINTO C.J.C., GRISARD, E.C., SCHLEMPER Jr, B.R., RIBEIRO-RODRIGUES, R., ROMANHA, A.J. Biological and isoenzymatic characterization of *Trypanosoma cruzi* strains isolated from sylvatic reservoirs and vectors from the State of Santa Catarina, Southern Brazil. **Acta Tropica**, v.60, p.167-177, 1995.
- STURM, N.R.; CAMPBELL, D.A. Alternative lifestyles: The population structure of *Trypanosoma cruzi*. **Acta Tropica**, In Press, 2009.
- TAMBOURGI, D.V. A parcial cDNA clone of trypomastigote the decay accelerating factor (T-DAF), a developmentally regulated complement inhibitor of the *Trypanosoma cruzi* has genetic and functional similarities to the human complement inhibitor DAF. **Infection and Immunity**, v.61, p.3656-3663, 1993.

TANOWITZ, H.B., KIRCHHOFF, L.V., SIMON, S.A., MORRIS, L.M., WITTNER, M. Chagas' disease. **Clinical Microbiology Reviews**, v.5, p.400-419, 1992.

TARDIEUX I, WEBSTER P, RAVESLOOT J, BORON W, LUNN JA, HEUSER JE, ANDREWS NW. Lysosome recruitment and fusion are early events required for *Trypanosoma cruzi* invasion of mammalian cells. **Cell**, v.71, p.1117-1130, 1992.

TARLETON, R.L. Immune system recognition of *Trypanosoma cruzi*. **Current Opinion in Immunology**, v.19, p.430-434, 2007.

TARLETON, R.L.; KOLLER, B.L.; LATOUR, A.; POSTAN, M. Susceptibility of  $\beta_2$ -microglobulin-deficient mice to *Trypanosoma cruzi* infection. **Nature**, v.356, p.338-340, 1992.

TELLERIA, J.; LAFAY, B.; VIRREIRA, M.; BARNABÉ, C.; TIBAYREBC, M.; SVOBODA, M. *Trypanosoma cruzi*: Sequence analysis of the variable region of kinetoplast minicircles. **Experimental parasitology**, v.114, p.279-288, 2006.

THE LANCET. Chagas' disease - An epidemic that can no longer be ignored. **The Lancet**, v.368, p.368, 2006.

TIBAYRENC, M., AYALA, F. J. Isoenzyme variability in *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas' disease: Genetical, taxonomical and epidemiological significance. **Evolution**, v.42, p. 277-292, 1988.

TIBAYRENC, M.; WARD, P.; MOYA, A.; AYALA, F.J. Natural populations of *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease, have a complex multiclonal structure. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.83, p.115-119, 1986.

TOMA, H. K. ; CERAVOLO, I. P.; GUERRA, H. L. ; STEINDEL, M. ; ROMANHA, A. J. . *Trypanosoma cruzi*: parasitemia produced in mice does not seem to be related to in vitro parasite-cell interaction. **International Journal for Parasitology**, v. 30, n. 5, p. 593-597, 2000.

TOMLINSON, R.J. The lysis of *Trypanosoma brucei* by human serum. **Nature Biotechnology**, v.14, p.717-721, 1996.

TORRES, J.P., ORTIZ, S., MUNOZ, S., SOLARI, A. *Trypanosoma cruzi* isolates from Chile are heterogeneous and composed of mixed populations when characterized by schizodeme and Southern analyses. **Parasitology**, v.128, p.161-168, 2004.

TYLER, K.M.; ENGMAN, D.M. The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. **International Journal for Parasitology**, v.1, p.472-81, 2001.

VAGO, A.R., MACEDO, A.M., OLIVEIRA, R.P., ANDRADE, L.O., CHIARI, E., GALVÃO, L.M.C, SIMPSON, A.J.G., TOSTES, S., PENA, S.D.J. Kinetoplast DNA signatures of *Trypanosoma cruzi* strains obtained directly from infected tissues. **The American Journal of Pathology**, v.149, p.2153-2159, 1996.

VENTURINI, G.; SALVATI, L.; MUOLO, M.; COLASANTI, M.; GRADONI, L.; ASCENZI, P. Nitric Oxide Inhibits Cruzipain, the Major Papain-like Cysteine Proteinase from *Trypanosoma cruzi*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.270, p. 437-441, 2000.

VESPA, G.N.; CUNHA, F.Q.; SILVA, J.S. Nitric Oxide is involved in control of *Trypanosoma cruzi*-induced parasitemia and directly kills the parasite in vitro. **Infection and Immunity**, v.62, n.11, p.5177-5182, 1994.

VIVIER E, NUNÉS JA AND VÉLY F. Natural killer cell signaling pathways. **Science**, v.306, p.1517-1519, 2004.

WEISCHENFELDT, J.; PORSE, B. Bone Marrow-Derived Macrophages (BMM): Isolation and Applications. **Protocol**, 2008.

WESTENBERGER, S.J.; BARNABÉ, C.; CAMPBELL, D.A.; STURM, N.R. Two Hybridization Events Define the Population Structure of *Trypanosoma cruzi*. **Genetics**, v.171, p.527-543, 2005.

YOSHIDA, N. Molecular basis of mammalian cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.78, n.1, p.87-111, 2006.

YOSHIDA, N. ***Trypanosoma cruzi* cell invasion mechanisms**. In: World Class Parasites: American Trypanosomiasis. TYLER, K.M., MILES, M.A. (Eds), Kluwer Academic Publishers, v.7, p.69–79, 2003.

YOSHIDA, N., BLANCO, S.A., ARAGUTH, M.F., RUSSO, M., GONZALEZ, J. The stage-specific 90-kilodalton surface antigen of metacyclic trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v.39, p.39–46, 1990.

YOSHIDA, N.; ARAYA, J.E.; FRANCO DA SILVEIRA, J.; GIORGIO, S. Antibody production and T cell response induced by stage-specific surface glycoproteins purified from metacyclic trypomastigotes. **Experimental Parasitology**, v.77, p.405-413, 1993.

ZHANG, L.; TARLETON, R.L. Persistent production of inflammatory and anti-inflammatory cytokines and associated MHC and adhesion molecule expression at the site of infection and disease in experimental *Trypanosoma cruzi* infection. **Experimental Parasitology**, v. 84, p.203-213, 1996.

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

ZINGALES, B.; ANDRADE, S.G.; BRIONES, M.R.S.; CAMPBELL, D.A.; CHIARI, E.; FERNANDES, O.; GUHL, F.; LAGES-SILVA, E.; MACEDO, A.M.; MACHADO, C.R.; MILES, M.A.; ROMANHA, A.J.; STURM, N.R.; TIBAYRENC, M.; SCHIJMAN, G. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.104, p. 051-1054, 2009