

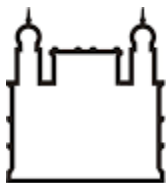
INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Mestrado em Biologia Celular e Molecular

**Imunoproteoma da doença de Chagas: busca de candidatos a biomarcadores de
progressão de lesão cardíaca**

MARCELLE ALMEIDA CAMINHA

Rio de Janeiro

Junho de 2016



Ministério da Saúde
Fiocruz
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de pós-graduação em Biologia Celular e Molecular

MARCELLE ALMEIDA CAMINHA

**Imunoproteoma da doença de Chagas: busca de candidatos a biomarcadores de
progressão de lesão cardíaca**

Dissertação apresentada à pós-graduação do Instituto
Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção
do título de Mestre em Biologia Celular e Molecular.

Orientadores: Prof. Dr. Rubem Menna-Barreto
Prof. Dr. Richard Hemmi Valente

Rio de Janeiro
Junho de 2016

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

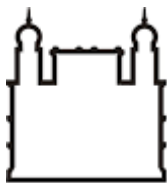
C183 Caminha, Marcelle Almeida

Imunoproteoma da doença de Chagas: busca de candidatos a biomarcadores de progressão de lesão cardíaca / Marcelle Almeida Caminha. – Rio de Janeiro, 2016.
xiii, 121 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2016.
Bibliografia: f. 97-121

1. *Trypanosoma cruzi*. 2. Tripomastigotas. 3. Doença de Chagas. 4. Proteômica. 5. Proteína imunorreativa. I. Título.

CDD 616.9363



Ministério da Saúde
Fiocruz
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de pós-graduação em Biologia Celular e Molecular

MARCELLE ALMEIDA CAMINHA

**Imunoproteoma da doença de Chagas: busca de candidatos a biomarcadores de
progressão de lesão cardíaca**

Orientadores: Prof. Dr. Rubem Menna-Barreto
Prof. Dr. Richard Hemmi Valente

Aprovada em: 02/06/2016

EXAMINADORES:

Prof. Dra. Mariana Waghbi (Presidente)

Prof. Dra. Patrícia Cuervo

Prof. Dr. Fábio César Nogueira

Prof. Dra. Cámen Penido (Suplente)

Prof. Dra. Andréa Pons (Suplente)

Rio de Janeiro, 02 de junho de 2016.

AGRADECIMENTOS

A todos dos laboratórios de Toxinologia e Biologia Celular (LBC) que de alguma forma colaboraram para a realização deste projeto.

Ao Dr. Jonas Perales por abrir o seu laboratório para o nosso grupo.

À Dra. Nazaré Soeiro pela ajuda indireta, porém essencial para o desenvolvimento deste estudo.

Às Dras. Yara Gomes, Virgínia Lorena, Maria da Glória Cavalcanti e Sílvia Martins e ao Dr. Wilson de Oliveira Jr por aceitarem o convite de colaboração e por nos ajudarem a tornar este projeto possível ao disponibilizar amostras bem caracterizadas.

Aos Drs. André Ferreira, Francisco Gomes Neto, Paulo Carvalho e Diogo Borges pela disponibilidade e ajuda indispensável.

Às técnicas Joelma Saldanha, Monique Nunes e Viviane Tostes e ao Marcos Meuser por sempre estarem dispostos a me ajudar quando precisei e pelo excelente trabalho realizado.

Aos amigos da sala 7 por sempre promoverem momentos de descontração e risadas na rotina de trabalho. Em especial, obrigada à Nunes, Bolinho, Riso e Vivi Tostes pelas conversas de confessionário.

À Ana e ao Renan pelo companheirismo e cumplicidade. O mestrado não seria o mesmo sem vocês.

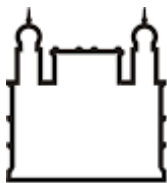
Aos meus orientadores, Drs. Rubem Menna-Barreto e Richard Hemmi Valente, pelas excelentes orientações; vcs foram incríveis! À Mami Poderosa por mais dois anos de parceria, confiança e aprendizado. Vou ser eternamente grata a vc por ter me ensinado a pensar ciência. Ao Papi Soberano por ter aceitado e abraçado este projeto com a gente. Richard, muito obrigada pelo comprometimento e paciência, vc foi essencial em todos os aspectos. Espero que as próximas fases sejam acompanhadas de mais sorrisos NOSSOS. Nesta etapa final não posso deixar de dizer que eu adorei ser orientanda de vcs. Mais uma vez, muito obrigada por tudo!

À Andrea Henriques-Pons pela revisão e sugestões sempre muito bem vindas.

Ao CNPq pelo financiamento do projeto e ao PDTIS e ao IOC/FIOcruz pela disponibilização de equipamentos.

À Izabelle Gomes, Lívia Gouvêa, Lílian Ximenes e Fabiane Ticom pelo apoio, compreensão e cumplicidade.

Aos meus pais e irmãs por simplesmente tudo, sem eles nada disso seria possível.



Ministério da Saúde
Fiocruz
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Imunoproteoma da doença de Chagas: busca de candidatos a biomarcadores de progressão de lesão cardíaca

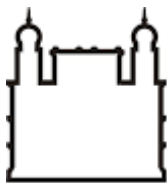
RESUMO

Dissertação de mestrado em Biologia Celular e Molecular

Marcelle Almeida Caminha

A doença de Chagas, causada pelo *Trypanosoma cruzi*, atinge milhões de pessoas pelo mundo, apresentando maior predominância na América Latina. Historicamente, nesta região, a transmissão desse protozoário ocorre por meio de insetos vetores, os quais também estão relacionados à infecção oral. Já em países não endêmicos, a transfusão de sangue corresponde à principal forma de transmissão do *T. cruzi*. Entre os indivíduos infectados que evoluem para a fase crônica da doença, a qual pode persistir assintomática por décadas, cerca de 30 a 40% desenvolvem manifestações clínicas. Estas estão associadas a lesões no tecido cardíaco e/ou no trato gastrointestinal, resultantes da ação direta do parasito, da resposta imune e do comprometimento do sistema nervoso. Diante da eficácia variável do tratamento na fase crônica da doença e da gravidade e maior frequência dos sintomas relacionados à forma cardíaca da doença, este trabalho teve como foco principal a busca de potenciais biomarcadores proteicos de progressão de lesão no tecido cardíaco. Para isto, foi realizada a extração de proteínas da forma tripomastigota sanguínea do *T. cruzi* (cepa Y) isolada de camundongo. As proteínas imunorreativas foram obtidas a partir do reconhecimento de IgG humanas imobilizadas em *beads* magnéticas. Os anticorpos utilizados nesses experimentos foram previamente purificados por cromatografia de afinidade a partir de soros de pacientes na fase crônica indeterminada e cardíaca (B1 e C) e de doadores saudáveis. Através das análises de espectrometria de massas, as proteínas imunorreativas foram identificadas e quantificadas, sendo posteriormente comparado o padrão de reconhecimento entre as condições avaliadas. Os anticorpos derivados de pacientes com lesão cardíaca diagnosticada foram capazes de detectar dez proteínas diferencialmente abundantes. As proteínas CAP5.5 associada aos microtúbulos (gi|71401694 e gi|71415498) e hipotética (gi|71407149) foram detectadas em maior quantidade nos ensaios realizados com amostras de pacientes classificados em B1, enquanto as proteínas triparedoxina peroxidase (gi|17224953, gi|70873019 e gi|3776134), hipotética (gi|71401264), trans-sialidases (gi|70860135 e gi|71404821) e de superfície TolT (gi|71402301) foram mais abundantes nas frações obtidas a partir do reconhecimento de amostras purificadas de pacientes no estágio C. Em suma, foi observado que ao longo da infecção ocorre uma alteração na abundância e no perfil de reconhecimento de proteínas imunorreativas de formas tripomastigotas sanguíneas. A alta variação significativa na quantidade destas proteínas, especialmente a partir de interações de IgG de B1, sugere que estas moléculas são candidatas promissoras a marcadores do estabelecimento da forma cardíaca da doença, ainda no estágio inicial. No entanto, esses dados precisam ser validados com um grupo amostral de pacientes maior.

Palavras-chave: *Trypanosoma cruzi*, tripomastigotas, doença de Chagas, proteômica, proteína imunorreativa



Ministério da Saúde
Fiocruz
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Immunoproteome of Chagas disease: search for biomarkers candidates for cardiac damage progression

ABSTRACT

Master dissertation in Biologia Celular e Molecular

Marcelle Almeida Caminha

Chagas disease, caused by the protozoan *Trypanosoma cruzi*, affects millions of people worldwide, especially in Latin America. This illness is classically transmitted by an insect vector, which is also associated to the oral infection. In non-endemic countries, the parasite transmission occurs mainly by blood transfusion. Seldomly, the infected individuals do not evolve to the chronic phase, which can persist as asymptomatic for decades; approximately 30% of the cases develop cardiac and/or digestive clinical manifestations accompanied by nervous system impairment as a result of the direct action of the parasite and subsequent inflammatory response. Since the treatment in the chronic stage presents a variable efficacy, and the most severe and frequent symptoms related to the cardiac form occur in this phase, here, we focused on the search of potential protein biomarkers for injury progression in cardiac tissue. In this scenario, the proteins from *T. cruzi* (Y strain) bloodstream trypomastigotes, isolated from infected mice, were extracted. The parasite's immunoreactive proteins were obtained by immunoprecipitation through the interaction with IgG immobilized on magnetic beads. The antibodies were previously purified by affinity chromatography from serum of patients in the indeterminate and cardiac (B1 and C) stages and from healthy donors. Through mass spectrometry analysis, the immunoreactive proteins were identified and quantified, and the pattern of recognition among the conditions was subsequently evaluated. The antibodies derived from patients with diagnosed cardiac lesions led to the detection of ten differentially abundant proteins. The CAP 5.5 microtubule associated (gi|71401694 and gi|71415498) and hypothetical (gi|71407149) proteins were detected in higher amounts in our experimental conditions in samples from B1 patients, while the trypanothione peroxidase (gi|17224953, gi|70873019 e gi|3776134), hypothetical (gi|714001264), trans-sialidases (gi|70860135 and gi|71404821), and the surface TolT (gi|71402301) proteins had greater abundance in the fractions obtained by the reaction with samples from stage C patients. Thus, it was observed an alteration in the abundancy and profile of bloodstream trypomastigotes' proteins recognition in the course of the disease. The significative variation in the abundance of the immunoreactive proteins, especially through the interaction with IgG from B1, suggests that these proteins are promising candidates of markers for the establishment of the cardiac form of the infection. Nevertheless, these results need to be validated in a large number of patients.

Key words: *Trypanosoma cruzi*, trypomastigotes, Chagas disease, proteomic, immunoreactive protein

SUMÁRIO

1. Introdução.....	1
1.1. Doença de Chagas	2
1.2. Ciclo evolutivo do <i>T. cruzi</i>	4
1.3. Aspectos clínicos da doença de Chagas	5
1.4. Resposta imune.....	8
1.5. Influência da resposta imune na cardiopatia chagásica	12
1.6. Biomarcadores imunológicos de progressão da doença de Chagas	14
1.7. Justificativa.....	17
2. Objetivos.....	18
2.1. Geral	19
2.2. Específicos.....	19
3. Materiais e métodos.....	20
3.1. Obtenção de parasitos.....	21
3.2. Extração de proteínas.....	21
3.3. Dosagem de proteínas.....	22
3.4. Eletroforese em gel de poliacrilamida	22
3.4.1. Unidimensional (SDS-PAGE).....	22
3.4.2. Bidimensional (2D-PAGE)	23
3.5. Coloração.....	24
3.5.1. Impregnação por prata.....	24
3.5.2. Coomassie R-250	24
3.5.3. Azul de Coomassie coloidal	24
3.6. <i>Western blot</i> seguido de imunorevelação	24
3.7. Purificação de IgG humana	25
3.7.1. Pacientes e doadores saudáveis	25
3.7.2. Cromatografia.....	26
3.7.2.1. Afinidade.....	26
3.7.2.2. Exclusão molecular	27
3.8. Imunoprecipitação	27
3.8.1. Imunoprecipitação com <i>cross-linking</i>	28
3.8.2. Imunoprecipitação sem <i>cross-linking</i>	28

3.9. Densitometria	29
3.10. Tripsinização	30
3.10.1. Em gel.....	30
3.10.2. Em solução	31
3.11. Dessanilização	31
3.12. Espectrometria de massas.....	32
3.12.1. MALDI-MS/MS	32
3.12.2. nanoESI-MS/MS	32
3.12.2.1. nanoESI-LTQ/Orbitrap XL	33
3.12.2.2. nanoESI-Q Exactive Plus Orbitrap.....	34
3.13. Interpretação dos espectros e validação dos resultados obtidos.....	35
3.13.1. Banco de dados utilizado.....	35
3.13.2. Busca por <i>peptide-spectrum match</i> e corte por taxa de falsa descoberta	35
3.14. Análise bioinformática e estatística.....	35
4. Resultados.....	37
4.1. Extração de proteínas.....	38
4.2. Purificação de IgG humana por cromatografia.....	45
4.3. Caracterização do perfil imunorreativo por <i>western blot</i>	52
4.4. Padronização da imunoprecipitação por <i>bead</i> magnética.....	54
4.5. Proteínas imunorreativas obtidas por imunoprecipitação e identificadas por espectrometria de massas.....	66
5. Discussão	80
6. Conclusões.....	93
7. Perspectivas	95
8. Referências	97

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1. Principais rotas de imigrantes da América Latina para países não endêmicos.....	3
Figura 1.2. Estrutura química do benzinidazol utilizado no tratamento da doença de Chagas.....	4
Figura 1.3. Ciclo evolutivo do <i>T. cruzi</i>	5
Figura 1.4. Sinal de Romaña: edema bipalpebral unilateral com enfartamento ganglionar satélite.....	6
Figura 1.5. Manifestações clínicas da fase crônica da doença de Chagas.....	8
Figura 3.1. Estratificação do comprometimento cardíaco em pacientes com doença de Chagas com base na disfunção ventricular esquerda.....	26
Figura 4.1. Quantidade de proteína extraída de 5×10^7 de formas tripomastigotas sanguíneas pelas 4 soluções de lise.....	38
Figura 4.2. Padrão de bandas das amostras biológicas independentes (A, C e D) extraídas com as 4 soluções de lise.....	39
Figura 4.3. Perfil proteico dos extratos de cada solução de lise obtidos a partir de uma mesma replicata biológica. Géis bidimensionais corados por impregnação por prata.....	40
Figura 4.4. Agrupamento das extrações com as quatro soluções de lise de acordo com a semelhança no perfil peptídico identificado nessas amostras.....	41
Figura 4.5. Quantificação das proteínas identificadas nos extratos das replicatas biológicas A, B e C.....	43
Figura 4.6. Nível de similaridade entre as populações proteicas extraídas com cada solução de lise.....	44
Figura 4.7. Variação da diversidade proteica gerada pela extração com cada solução de lise a partir de amostras biológicas distintas (A, C e D).....	45
Figura 4.8. Purificação de IgG de soro humano (S) por cromatografia de afinidade com coluna de proteína G.....	47
Figura 4.9. Cromatografia de exclusão molecular.....	49
Figura 4.10. Cadeias polipeptídicas detectadas no gel da fração enriquecida em IgG e analisadas por MALDI-TOF/TOF.....	49
Figura 4.11. Perfil eletroforético e rendimento das diferentes frações enriquecidas em IgG obtidas por cromatografia de afinidade.....	52

Figura 4.12. Titulação da concentração de anticorpo purificado por cromatografia de afinidade.....	53
Figura 4.13. Imunorreatividade dos anticorpos purificados às proteínas de formas tripomastigotas sanguíneas.....	54
Figura 4.14. Esquema experimental detalhando as quantidades de anticorpo (Ac) e proteínas totais do <i>T. cruzi</i> (PT) aplicadas aos ensaios de imunoprecipitação realizados a partir de diferentes abordagens de imobilização de IgG.....	55
Figura 4.15. SDS-PAGE das frações coletadas nos ensaios de padronização do tempo de imobilização de IgG.....	56
Figura 4.16. Perfil eletroforético das frações coletadas nas imunoprecipitações realizadas com <i>cross-linking</i>	57
Figura 4.17. Imunoprecipitação com <i>cross-linking</i> realizada após a troca de tampão do conjunto de proteínas das formas tripomastigotas sanguíneas para TBS e teste de imobilização de complexos antígeno-anticorpo formados anteriormente ao passo de imunoprecipitação....	58
Figura 4.18. Experimentos de imunoprecipitação realizados na ausência da reação de <i>cross-linking</i>	61
Figura 4.19. Influência da quantidade de anticorpo na capacidade de detecção das proteínas imunorreativas de formas tripomastigotas sanguíneas.....	63
Figura 4.20. Ensaios realizados com 50% da capacidade de ligação com 1:0,5 (m/m) e 1:1 (m/m) de IgG para extrato proteico do parasito, para avaliar a saturação da interação antígeno-anticorpo.....	64
Figura 4.21. Imunoprecipitação com <i>cross-linking</i> seguindo as condições do protocolo definido na ausência de imobilização covalente de IgG.....	65
Figura 4.22. Gel representativo do perfil eletroforético das frações eluídas de um experimento de imunoprecipitação realizado após a padronização.....	67
Figura 4.23. Análise por LC-MS/MS dos volumes eluídos nos experimentos de imunoprecipitação.....	68
Figura 4.24. Quantidade e nível de similaridade das proteínas imunorreativas de <i>T. cruzi</i> identificadas nos volumes eluídos nas imunoprecipitações.....	69
Figura 4.25. Análise em pares (<i>TFold</i>) realizada a partir da quantificação por <i>XIC</i> das populações proteicas de <i>Trypanosoma</i> sp. identificadas em cada condição biológica.....	72

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1. Soluções de lise utilizadas para a extração de proteínas de formas tripomastigotas sanguíneas.....	22
Tabela 3.2. Combinação de tampões de equilíbrio (A) e eluição (B) utilizados na padronização da purificação de IgG por cromatografia de afinidade.....	27
Tabela 4.1. <i>Clusters</i> de proteínas identificadas por MALDI-TOF/TOF a partir da fração enriquecida em IgG obtida por cromatografia de afinidade.....	50
Tabela 4.2. Quantidade de IgG adsorvida às proteínas G ligadas nas <i>beads</i> magnéticas.....	66
Tabela 4.3. Proteínas imunorreativas detectadas com maior abundância nas frações eluídas nos ensaios realizados com amostras purificadas de pacientes em relação aos de doadores saudáveis.....	74
Tabela 4.4. Proteínas imunorreativas de formas tripomastigotas sanguíneas menos abundantes nas frações resultantes dos ensaios feitos com IgG de indivíduos infectados em comparação aos de doadores saudáveis.....	75
Tabela 4.5. Proteínas imunorreativas de formas tripomastigotas sanguíneas diferencialmente abundantes nas frações adquiridas a partir das diferentes condições clínicas da doença de Chagas.....	77

LISTA DE ABREVIATURA

Bz: benznidazol
CDR: *complementarity determining region*
CRA: *cytoplasmic repetitive antigen*
DMP: dimetil pimelimidato
DNA: *deoxyribonucleic acid*
DTT: ditioneitol
FRA: *flagellar repetitive antigen*
GPI: glicosilfosfatidilinositol
IFN- γ : interferon gama
IL: interleucina
iNOS: *inducible nitric oxide synthase*
MHC: *major histocompatibility complex*
MyD88: *myeloid differentiation primary-response protein 88*
NF- κ B: *nuclear factor kappa B*
NK: *natural killer*
NO: *nitric oxide*
NOD: *nucleotide-binding oligomerization domain*
NP-40: nonidet P-40
NSAF: *normalized spectral abundance factor*
Nx: nifurtimox
PBS: *phosphate-buffered saline*
ROS: *reactive oxygen species*
SDS: *sodium docecil sulfate*
SDS-PAGE: *sodium docecil sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis*
TBS: *tris-buffered saline*
TFA: *trifluoroacetic acid*
TGI: trato gastrointestinal
TGF- β : *transforming growth factor-beta*
TLR: *Toll-like receptor*
TNF- α : *fator de necrose tumoral-alfa*
Treg: célula T reguladora
TFD: taxa de falsa descoberta
XIC: *extracted ion chromatogram*

1. Introdução

1.1. Doença de Chagas

Em 1909, logo após descobrir o protozoário hemoflagelado *Trypanosoma cruzi*, Carlos Chagas descreveu o seu ciclo de vida e o seu papel como agente etiológico da tripanossomíase americana, mais tarde denominada doença de Chagas (Chagas, 1909). Esta doença consiste em uma zoonose transmitida historicamente por insetos vetores hematófagos (triatomíneos) encontrados predominantemente na América Latina (Dujardin *et al.*, 2015; revisto em Juberg & Galvão, 2006). Desta forma, a doença de Chagas se tornou endêmica nessa região, atingindo inicialmente a população pobre de áreas rurais, onde são comuns péssimas condições de moradia que propiciam a presença dos triatomíneos (revisto em Coura, 2007). Com base em iniciativas regionais e nacionais empregadas desde a década de 40, países do Cone Sul deram início em 1991 a programas com enfoque no controle dos principais vetores e na triagem nos bancos de sangue. Essas abordagens reduziram expressivamente o surgimento de novos casos por transmissão vetorial em áreas endêmicas, incentivando projetos com propostas similares em países da América Central, andinos e na região amazônica (revisto em Yamagata & Nakagawa, 2006; Dias, 2015). Entretanto, a evasão rural bem como o fluxo migratório de latino-americanos para países não endêmicos têm ampliado a distribuição geográfica da doença e o perfil de indivíduos portadores e sob o risco de adquirir a infecção, principalmente a partir dos anos 2000 (**Figura 1.1**). Nessas regiões, onde o controle de pessoas infectadas por esse parasito é recente e ainda não compreende estratégias bem estabelecidas e de proporção nacional (Paricio-Talayero *et al.*, 2008; Muñoz *et al.*, 2009; WHO, 2010; Requena-Méndez *et al.*, 2014; Soriano-Arandes *et al.*, 2016), a transmissão do *T. cruzi* ocorre principalmente por meio de transfusão sanguínea, pela via vertical ou transplacentária e, em menor escala, por transplante de órgãos (revisto em Coura & Viñas, 2010). Outras formas de transmissão também podem ocorrer, como pela ingestão de bebidas ou alimentos contaminados com vetores infectados (revisto em Coura, 2007). Esta via de transmissão é mais frequente na Amazônia, embora tenha sido associada a surtos de infecção aguda em diferentes áreas endêmicas (Beltrão *et al.*, 2009; de Noya *et al.*, 2010; revisto em Shikanai-Yasuda & Carvalho, 2012; Dias & Neto, 2011). No cenário atual, estima-se que 7 milhões de pessoas sejam portadoras da doença e que pelo menos 25 milhões estejam expostas ao risco de serem infectadas na América Latina (WHO, 2015).

A doença de Chagas apresenta duas fases: aguda e crônica. No entanto, esta é subdividida em indeterminada e sintomática. No estágio crônico sintomático, são observados danos cardíacos e/ou lesões digestivas, ambos resultantes de reações inflamatórias com

fibrose e comprometimento do sistema nervoso (revisto em Teixeira *et al.*, 2006; Lescure *et al.*, 2010). Por outro lado, na fase aguda os sintomas geralmente são inespecíficos, por isso, na maioria dos casos o diagnóstico é realizado durante a fase crônica.

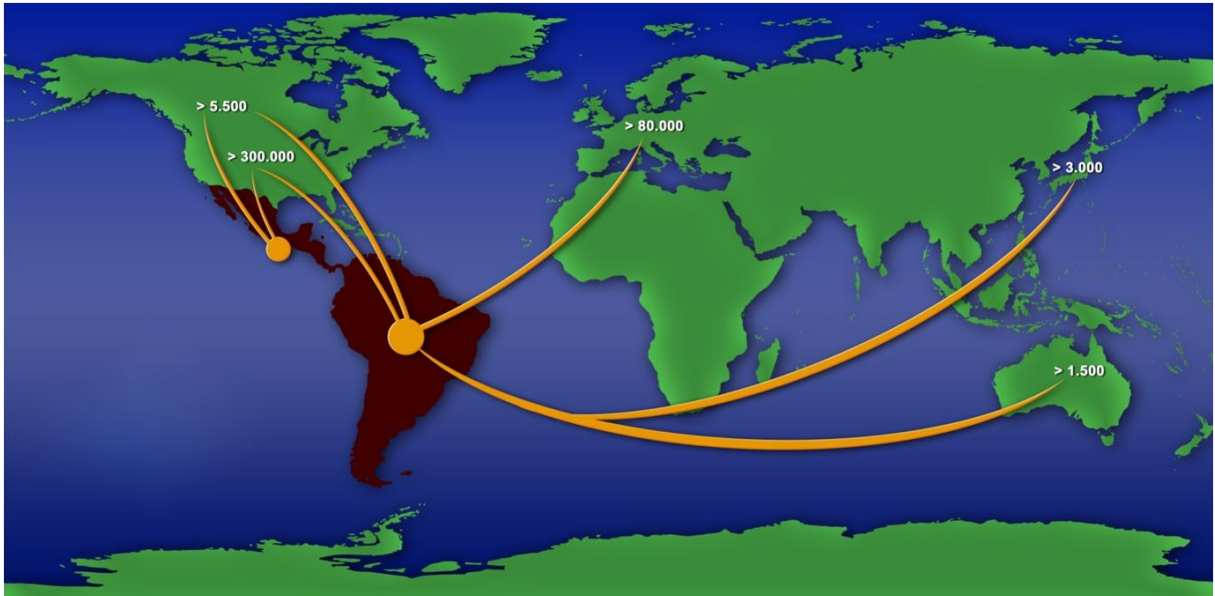


Figura 1.1. Principais rotas de imigrantes da América Latina para países não endêmicos. Os valores representam a estimativa do número de indivíduos infectados nessas regiões (adaptado de Coura & Viñas, 2010).

O tratamento da doença de Chagas pode ser realizado pela administração do nifurtimox (Nx) ou benznidazol (Bz). O Nx teve a sua comercialização interrompida a partir de 1980 no Brasil, Argentina, Uruguai e Chile. Entretanto, após um acordo firmado entre a Organização Mundial da Saúde e a Bayer, esta empresa farmacêutica se comprometeu a produzir e distribuir gratuitamente o medicamento com a finalidade de eliminar as tripanossomíases americana e africana. Independente disto, o Bz (**Figura 1.2**) continua sendo a droga de primeira escolha. Diversos fatores influenciam na sua eficácia, como o período do tratamento e a dose, a origem geográfica do paciente e especialmente a idade e a fase da doença. Em casos de fase aguda, infecção crônica recente (em crianças menores de 12 anos), infecção congênita, acidentes de laboratório e em quadros de re-agudização de pacientes imunossuprimidos, o tratamento com o Bz é eficiente (revisto em Amato-Neto, 1999; Urbina, 2001, 2002; Dias, 2006). Já na fase crônica, esta droga possui baixa atividade (Morillo *et al.*, 2015), assim como o Nx (revisto em Coura & de Castro, 2002). Outra limitação importante dos dois compostos é decorrente dos efeitos colaterais sérios que levam à suspensão ou ao abandono do tratamento. No caso do Bz podem ser observados casos de dermatite com erupção cutânea, edema generalizado, linfadenopatia, dores articular e muscular, depressão

da medula óssea, trombocitopenia púrpura e agranulocitose, parestesia e polineurite nos nervos periféricos (revisto em Coura & de Castro, 2002).

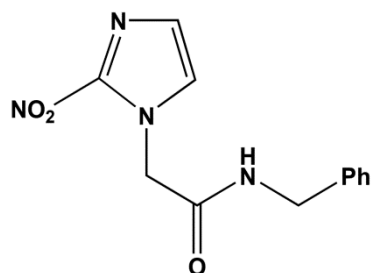


Figura 1.2. Estrutura química do Bz utilizado no tratamento da doença de Chagas.

1.2. Ciclo evolutivo do *T. cruzi*

O *T. cruzi* pertence à família Trypanosomatidae, ordem Kinetoplastida. O seu ciclo evolutivo compreende dois hospedeiros, um invertebrado (família Reduviidae, subfamília Triatominae) e outro vertebrado, inclusive o homem, os quais apresentam diferentes formas do parasito. No intestino médio do vetor infectado encontra-se a forma epimastigota, que adere à membrana permicrovilar que recobre as células intestinais do inseto e prolifera intensamente por divisão binária (**Figura 1.3-1**) (Alves *et al.*, 2007, Nogueira *et al.*, 2007). No intestino posterior e no reto, as formas epimastigotas se diferenciam em tripomastigotas metacíclicos infectantes e não-proliferativos (**Figura 1.3-2**) (Schaub *et al.*, 1989). Estes são eliminados juntamente com as fezes e urina do inseto após o repasto sanguíneo e ao atingirem alguma lesão ou mucosa, infectam o hospedeiro vertebrado. Neste, as formas tripomastigotas metacíclicas invadem principalmente células do tecido no sítio de infecção e do sistema imune inato ali presentes. Este evento ocorre de forma ativa ou passiva na célula hospedeira (revisto em Romano *et al.*, 2012), através de um processo dependente da fusão de lisossomos à vesícula internalizada, originando o vacúolo parasitóforo (Tardieux *et al.*, 1992). No interior desta estrutura, as formas tripomastigotas metacíclicas iniciam a diferenciação em amastigota, porém este processo se completa apenas quando o parasito chega ao citoplasma (**Figura 1.3-3**) (de Carvalho & de Souza, 1989; Andrade & Andrews, 2004). Subsequentemente, a forma amastigota se prolifera intensamente por divisão binária no citosol e, por fim, se diferencia na forma tripomastigota sanguínea, a qual rompe mecanicamente a célula, sendo liberada na corrente sanguínea, podendo invadir células vizinhas ou disseminar para os demais tecidos (**Figura 1.3-4**). O ciclo se fecha quando novos triatomíneos se infectam durante o seu repasto sanguíneo.

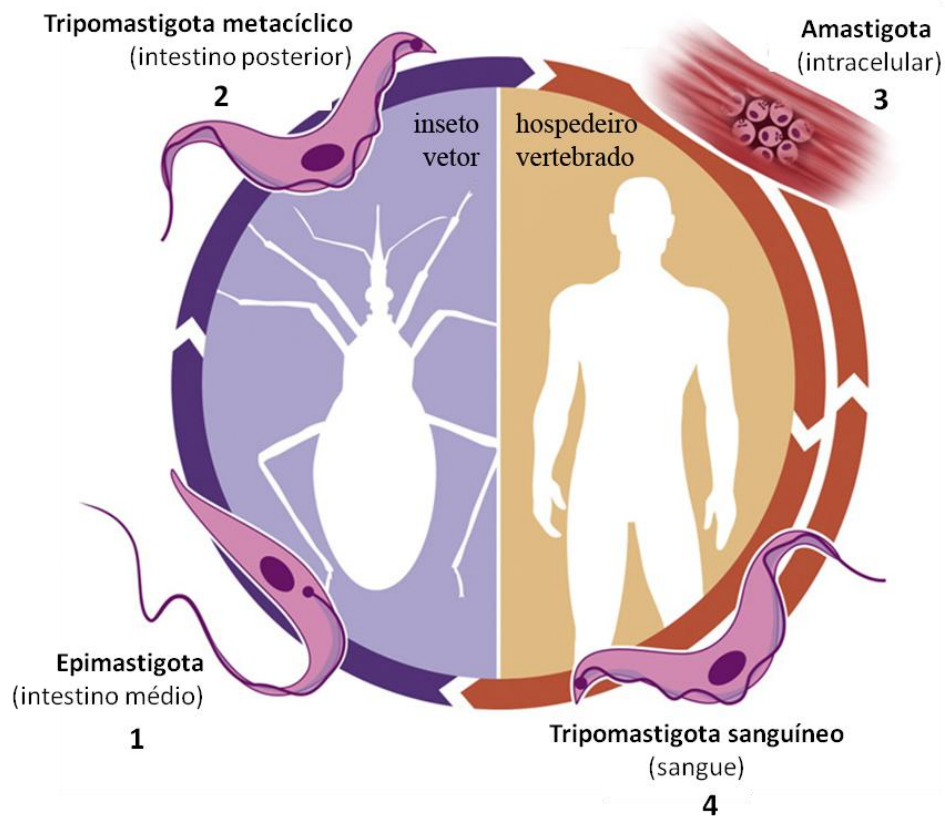


Figura 1.3. Ciclo evolutivo do *T. cruzi* (adaptado de Cuervo *et al.*, 2010).

1.3. Aspectos clínicos da doença de Chagas

A fase aguda da doença de Chagas é caracterizada por uma alta parasitemia circulante, síntese de IgM específica para o *T. cruzi* e pela presença de infiltrados inflamatórios nos tecidos infectados (Consenso Brasileiro, 2005). Na maioria dos casos decorrentes da transmissão vetorial, este estágio da infecção é assintomático, podendo ser observados sinais no sítio de entrada do parasito mediante uma reação inflamatória tardia, a qual origina lesões cutâneas ou lesões na mucosa ocular, denominadas chagoma de inoculação ou sinal de Romaña (**Figura 1.4**), respectivamente. Além disto, nos demais casos podem ocorrer quadros de febre, indisposição, linfadenopatia, esplenomegalia e hepatomegalia, diarreia, vômito, miocardite. A fase aguda pode persistir por aproximadamente 8 semanas, porém a ausência e/ou inespecificidade dos sintomas acarretam no subdiagnóstico da doença, e sem o tratamento adequado, os indivíduos entram na fase crônica indeterminada (revisado em Bern *et al.*, 2015). Apesar de menos frequente nesse período, quadros de insuficiência cardíaca e meningoencefalite podem resultar em óbito, principalmente em crianças menores de 2 anos com doença de Chagas congênita (revisado em Pitella, 1993; Machado *et al.*, 2012). Em adultos, a inflamação do sistema nervoso central está relacionada à incapacidade do

organismo em estabelecer uma resposta imune eficiente, seja devido a uma co-infecção, como pelo vírus da imunodeficiência humana, doenças sistêmicas ou por meio do uso de drogas imunossupressoras (revisto em Pitella, 1993; Madalosso *et al.*, 2004; Machado *et al.*, 2012). Nas infecções orais e por transfusão de sangue, a sintomatologia é similar, mas pode variar quanto à intensidade e frequência; nestas duas vias de transmissão, a febre consiste no sintoma mais observado (revisto em Dias & Brener, 1984; Shikanai-Yasuda & Carvalho, 2012). Na infecção oral, os casos sintomáticos, inclusive com alterações cardíacas severas, são mais comuns, provavelmente devido à alta carga parasitária ingerida, de modo a levar os pacientes a óbito principalmente por miocardite aguda (Bastos *et al.*, 2010; de Noya *et al.*, 2010; Marques *et al.*, 2013; de Noya *et al.*, 2016; revisto em Shikanai-Yasuda & Carvalho, 2012).



Figura 1.4. Sinal de Romaña: edema bupalpebral unilateral com enfartamento ganglionar satélite (Teixeira *et al.*, 1978).

Ao atingir o período indeterminado, o paciente atende aos seguintes critérios: possui sorologia e/ou exame parasitológico positivo, exames eletrocardiográficos e radiológicos (coração, esôfago e cólon) normais e ausência de sintomas (Consenso Brasileiro, 2005). Entretanto, alguns estudos têm demonstrado que apesar de serem considerados assintomáticos, os indivíduos classificados nesse estágio da infecção apresentam alterações em exames mais sensíveis ou sofisticados que avaliam por diferentes abordagens as estruturas e funções cardiovasculares e digestivas (Barretto *et al.*, 1990; Molina *et al.*, 2006; Sanchez-Lermen *et al.*, 2007; revisto em Menezes *et al.*, 2011). Geralmente esses resultados não indicam lesões graves e, portanto, não invalidam o prognóstico da fase crônica assintomática

(revisto em Ribeiro & Rocha, 1998), que pode durar décadas. Aproximadamente 30-40% das pessoas evoluem para a fase crônica sintomática, na qual se observam principalmente danos cardíacos e/ou digestivos associados ao acometimento ganglionar do sistema nervoso. Este processo se inicia na fase aguda e contribui para a pluralidade clínica observada na doença de Chagas. Fatores genéticos do parasito e do hospedeiro determinam o tecido a ser predominantemente infectado e influenciam a progressão da lesão, principalmente via modulação da resposta inflamatória (Andrade *et al.*, 1999, 2002; Caetano *et al.*, 2010).

O *T. cruzi* raramente invade células nervosas (de Souza *et al.*, 1996; Bombeiro *et al.*, 2012; revisto em Pittella *et al.*, 1991); entretanto, o parasitismo intracelular de células gliais (astrócito e micróglia), (da Mata *et al.*, 2000; Morocoima *et al.*, 2012; Vargas-Zambrano *et al.*, 2013; de Almeida-Leite *et al.*, 2014; Silva *et al.*, 2015), a resposta inflamatória acompanhada de fibrose e a presença de anticorpos capazes de interagir com moléculas próprias (Van Voorhis *et al.*, 1991; Gea *et al.*, 1993; Tekiel *et al.*, 1997; Feldman *et al.*, 1999; Oliveira, 2009) desencadeiam lesões neuronias periféricas, levando à neurodegeneração. Consequentemente, ocorre a desnervação dos tecidos cardíaco e do trato gastrointestinal (TGI) (Koberle, 1970; Silva *et al.*, 2016; revisto em Chuenkova & Perrin, 2011). Neste, os gânglios parassimpáticos localizados nos plexos de Auerbach e Meissner são afetados (Koerbele, 1963; Adad *et al.*, 2001; revisto em Teixeira *et al.*, 2006), provocando alterações na motilidade, secreção e absorção e a dilatação de porções do TGI (mega síndromes), principalmente esôfago e cólon (**Figura 1.5**) (revisto em Matsuda *et al.*, 2009). Paralelamente, a ação direta do parasito sobre as demais células do tecido contribui para aumentar o dano local (Hagger *et al.*, 2000).

A infecção no tecido cardíaco é caracterizada por uma miocardite difusa severa associada à redução seletiva da população de neurônios pós-ganglionares vagais e a mudanças estruturais, as quais compreendem principalmente hipertrofia do ventrículo esquerdo e aneurisma apical (revisto em Aiello & de Campos, 2015). A dilatação cardíaca é a manifestação clínica mais frequente e de maior gravidade, comumente associada a quadros de arritmia, tromboembolismo, morte súbita e insuficiência cardíaca congestiva, geralmente decorrente da disfunção sistólica do ventrículo esquerdo (Parada *et al.*, 1989; revisto em Ribeiro *et al.*, 2012; Nunes *et al.*, 2013b). Em pacientes sem dilatação do miocárdio podem ser observados defeitos na condução elétrica (bloqueio atrioventricular ou de ramos) (revisto em Menezes *et al.*, 2011).

As alterações estruturais e funcionais dos tecidos atingidos influenciam no prognóstico do paciente e, portanto, devem ser averiguadas cuidadosamente (Espinosa *et al.*, 1985; Carrasco *et al.*, 1994; revisto em Mady & Nacruth, 1995; Acquatella, 2007; Rassi Jr. *et al.*, 2007; Nunes *et al.*, 2010). Por exemplo, de acordo com Rassi Jr e colaboradores (2009), os achados de classes II ou III de capacidade funcional (*New York Heart Association*), cardiomegalia e disfunção ventricular esquerda observadas por raio-X e ecocardiografia, respectivamente, e taquicardia ventricular não-sustentada podem ser utilizados como marcadores para estratificação do risco de mortalidade entre indivíduos com a forma cardíaca da infecção, de maneira a auxiliar na escolha do tipo de tratamento a ser seguido e na forma de acompanhamento do paciente (revisto em Rassi Jr. *et al.*, 2010).

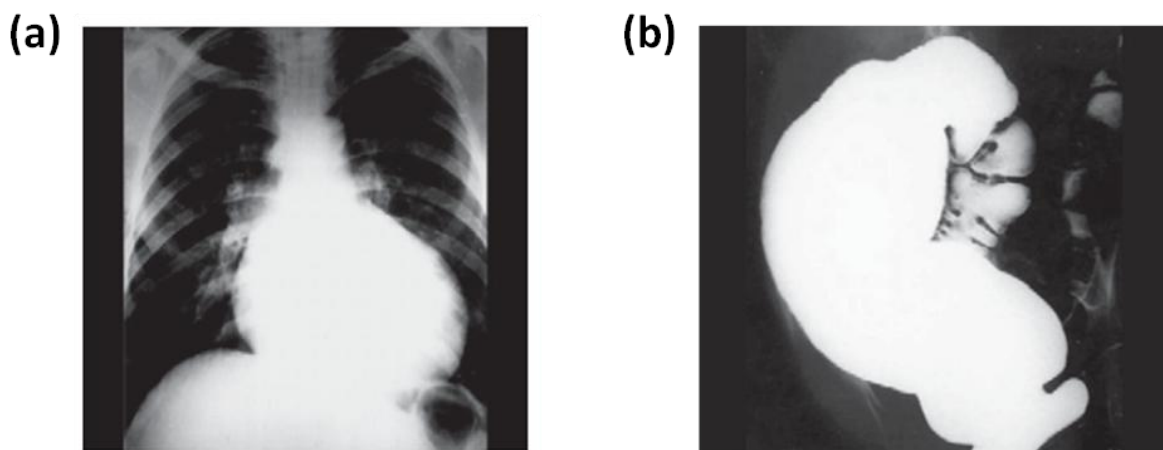


Figura 1.5. Manifestações clínicas da fase crônica da doença de Chagas: (a) cardiomegalia e (b) megacólon (Rassi Jr *et al.*, 2010).

1.4. Resposta imune

As análises patológicas e estudos experimentais descrevem a presença constante da resposta inflamatória nos tecidos afetados, nos quais são detectados o DNA (*deoxyribonucleic acid*) ou antígenos do *T. cruzi*. Apesar do pouco conhecimento sobre os mecanismos de patogênese, esses aspectos demonstram que a resposta imune e a ação direta do parasito, assim como a sua persistência, possuem um papel crucial no desenvolvimento da doença (Zhang & Tarleton, 1999; revisto em Golgher & Gazzinelli, 2004; Gutierrez *et al.*, 2009).

Tendo em vista que esse protozoário possui alta variabilidade genética, suas populações apresentam diferenças morfológicas e bioquímicas que refletem sobre a sua virulência. Adicionalmente, interações entre moléculas do hospedeiro e do parasito podem estimular a regulação da expressão gênica no *T. cruzi* por meio de mecanismos de controle pós-transcricionais e epigenéticos de modo a influenciar na sua virulência (Cliffe *et al.*, 2012;

Ekanayake & Sabatini, 2011; Ekanayake *et al.*, 2011; Brandán *et al.*, 2006; Magalhães *et al.*, 1996). A diferença de patogenicidade entre as cepas e formas evolutivas do *T. cruzi* bem como o microambiente do hospedeiro podem estar associadas à diversidade e abundância de moléculas expressas principalmente na superfície celular. Estas influenciam no processo de invasão da célula alvo, permitem a adesão e proteólise de componentes da matriz extracelular e ainda conferem ao parasito vias de evasão ao sistema imune (revisto em de Souza *et al.*, 2010; Osório *et al.*, 2012).

Como dito anteriormente, o *T. cruzi* é capaz de infectar qualquer célula nucleada. No entanto, para que isso aconteça é necessário que haja um reconhecimento mútuo de moléculas presentes na superfície do parasito e da célula hospedeira. A este processo segue a adesão dessas células, que também pode ser influenciada pela morfologia no caso das formas tripomastigotas sanguíneas. A sinalização em ambas células envolvidas é decorrente das duas primeiras etapas e define o desfecho da invasão, de maneira que o tipo celular do hospedeiro também constitui um fator determinante na interação (revisto em de Souza *et al.*, 2010).

As células do sistema imune inato são essenciais no controle da multiplicação do parasito, principalmente no início da infecção, quando a quantidade de formas tripomastigotas sanguíneas circulantes é maior. A interação de macrófagos e células dendríticas com o parasito é mediada principalmente por receptores que reconhecem padrões patogênicos, como os receptores tipo NOD (*nucleotide-binding oligomerization domain*) ou Toll (TLR) (Silva *et al.*, 2010). TLR2, 4, 7 e 9 são ativados por glicoproteínas ligadas à membrana do protozoário por âncoras de glicosilfosfatidilinositol (GPI), essencialmente mucinas e trans-sialidades, moléculas derivadas de glicoinositolfosfolípídeo ou regiões do DNA ricas em citosina e guanina (CpG), levando ao recrutamento de proteínas intracelulares, como a MyD88 (*myeloid differentiation primary-response protein 88*), que ativam fatores de transcrição como o NF- κ B (*nuclear factor kappa B*) (revisto em Rodrigues *et al.*, 2012). Este fator, por sua vez, induz a expressão de genes de citocinas pró-inflamatórias como a interleucina-12 (IL-12), o interferon gama (IFN- γ) e o fator de necrose tumoral (TNF) (revisto em Campos & Gazzinelli, 2004; Tarleton, 2007). A IL-12 atua de modo a estimular a síntese de IFN- γ por subgrupos de linfócitos T e células NK (*natural killers*), principais produtoras desta citocina no início da infecção (Cardillo, *et al.*, 1996; Une *et al.*, 2003; revisto em Silva *et al.*, 1998).

Macrófagos ativados por IFN- γ são capazes de matar o parasito intracelular devido ao aumento da expressão da enzima iNOS (*inducible nitric oxide synthase*), que catalisa a produção de óxido nítrico (NO), molécula com potente ação tripanocida (Hölscher *et al.*,

1998; Muñoz-Fernández *et al.*, 1992; revisto em Gutierrez *et al.*, 2009). Por meio de um estudo *in vitro*, Silva e colaboradores (1995) observaram que o TNF possui um papel importante nesse processo, atuando de forma autócrina como um amplificador da resposta contra o *T. cruzi* (revisto em Machado *et al.* 2012). O NO promove a nitrosilação de grupos prostéticos Fe-S complexados a proteínas essenciais na fisiologia do parasito (revisto em James *et al.*, 1995). Assim como as células do sistema imune, células não fagocitárias também são capazes de interagir com as formas tripomastigotas sanguíneas via receptores tipo *Toll*. A infecção de cardiomiócitos *in vitro* resulta na produção de NO e RNA (*ribonucleic acid*) mensageiro de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas (Machado *et al.*, 2000).

IFN- γ tem sido apontado como a principal citocina relacionada à resistência do hospedeiro à infecção pelo *T. cruzi* (Silva *et al.*, 1992). Entretanto, a extensa liberação de IFN- γ e outras moléculas pró-inflamatórias podem resultar em danos teciduais. Em camundongos *knockout* para IL-10 infectados, o aumento da produção IFN- γ e TNF resultaram no desenvolvimento de uma síndrome semelhante ao choque endotóxico (Hölscher *et al.*, 2000). Assim, nessa infecção, IL-10 e TGF- β (*transforming growth factor*) são citocinas-chave na imunorregulação da resposta inflamatória, sendo a primeira responsável pela inibição da síntese de IFN- γ (Silva *et al.*, 1992), enquanto o TGF- β suprime a produção de NO, inibindo a ativação de macrófagos (Silva *et al.*, 1991). Essa modulação é dinâmica, ao passo que diferentes moléculas podem influenciar no perfil de citocinas expresso. Por exemplo, mediadores lipídicos podem favorecer a resposta pró-inflamatória, enquanto altas concentrações de NO podem inibir a síntese de IL-12 e de TNF, o qual pode promover apoptose pela ativação de seus receptores TNFR1 ou pela indução de Fas/FasL (Martins *et al.*, 2001; Rodrigues Jr *et al.*, 2008; revisto em Gutierrez *et al.*, 2009; Machado *et al.*, 2012).

O tipo de quimiocina sintetizado por células infectadas e fagócitos ativados é induzido ou regulado por citocinas e pela própria interação parasito-célula hospedeira. Essas quimiocinas contribuem para o estabelecimento das respostas inata e adaptativa, sinalizando pela via autócrina a liberação de NO por macrófagos ativados e estimulando o recrutamento, a proliferação e diferenciação das células T (revisto em Machado *et al.*, 2012; Rezende-Oliveira *et al.*, 2012).

Assim como as células NK e os macrófagos, a hiperprodução de imunoglobulinas, decorrente da resposta intensa dos linfócitos B, representa um evento importante no controle da parasitemia na fase aguda. Além dos anticorpos específicos que realizam a opsonização, também são sintetizados anticorpos capazes de induzir a lise por complemento apenas das

formas tripomastigotas do parasito, sendo, portanto, chamados de anticorpos líticos (revisto em Krettli & Brener, 1982). Em indivíduos portadores da doença de Chagas, o anticorpo natural anti-Gal reconhece mucinas do parasito associadas a âncoras de GPI, atuando como um potente indutor da lise pelo sistema complemento; o anti-Gal é detectado em altas concentrações no soro de pacientes, representando uma população expressiva entre os anticorpos líticos (Gazzinelli *et al.*, 1991; revisto em Brener & Gazzinelli, 1997). No entanto, os anticorpos produzidos ante o estímulo de epitopos originários do *T. cruzi* podem apresentar reatividade a moléculas próprias do hospedeiro. Esta reação cruzada pode ser atribuída à ativação policlonal não específica de células B (Minoprio *et al.*, 1988; Bento *et al.*, 1996; Reina-San-Martín *et al.*, 2000). Alternativamente, são consideradas outras hipóteses para esse evento, como a ocorrência de mimetismo molecular entre sequências do protozoário e do hospedeiro que são reconhecidas (revisto em Gironès & Fresno, 2003) e a liberação de antígenos próprios após a lise celular mecânica promovida pelo parasito (revisto por Bonney & Engman, 2008). As células B também atuam como apresentadoras de antígenos, produtoras de citocinas (IL-10, TGF- β , IFN- γ , IL-12, IL-17) e contribuem para a maturação e manutenção de linfócitos T, especialmente a subpopulação CD8⁺ no contexto da infecção pelo *T. cruzi* (Cardillo *et al.*, 2007; revisto em Cardillo *et al.*, 2015).

Embora o parasito possa apresentar proteínas, como mucinas e a AGC10, capazes de limitar a resposta de linfócitos T a partir da redução na expressão de IL-2 e o seu receptor (Kierszenbaum *et al.*, 1990, 2002; Nunes *et al.*, 2013c; revisto em Nardy *et al.*, 2015), as células T CD4⁺ e CD8⁺ também participam da resposta contra o parasito. Quando ativados, os linfócitos T CD4⁺ se diferenciam em subpopulações que possuem perfis diferentes, principalmente quanto à produção de citocinas. As células T CD4⁺ que atuam em conjunto com a resposta inflamatória ativando fagócitos a partir da liberação de IFN- γ são chamadas de Th1, enquanto as Th2 são as células relacionadas com a síntese de citocinas não inflamatórias (IL-10, IL-4); perfis correspondentes à Th17 (IL-17A, IL-17F, IFN- γ , IL10, IL-4) e à T reguladora (Treg) (CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺), a qual produz principalmente TGF- β , também podem ser observados na doença de Chagas (revisto em Henriques-Pons & Gomes, 2013; Cardillo *et al.*, 2015). Em experimentos realizados com camundongos infectados, foi demonstrado que a citocina IL-17 compreende um fator protetor contra a infecção e pode atuar na modulação da resposta pró-inflamatória (Guedes *et al.*, 2010; revisto em Henriques-Pons & Gomes, 2013). Dessa forma, as células T CD4⁺ possuem papel fundamental no controle do parasitismo e na progressão da manifestação clínica da doença. Os linfócitos T

CD8⁺ são ativados mediante a apresentação de antígenos associados a moléculas de MHC (*major histocompatibility complex*) por leucócitos e demais células do hospedeiro (revisto em Tarleton, 2007). Além da atividade citotóxica, as perforinas secretadas pelas células T CD8⁺ regulam a resposta inflamatória no tecido cardíaco infectado (Henriques-Pons *et al.*, 2002). O intenso dano tecidual apresentado por camundongos infectados *knockout* para perforina sugere que outras moléculas resultem na extensa lesão do miocárdio (Henriques-Pons *et al.*, 2002).

1.5. Influência da resposta imune na cardiopatia chagásica

Nos indivíduos no período indeterminado, são sintetizadas citocinas pró e anti-inflamatórias, especialmente a IL-10, que regulam a intensidade da resposta imune, de maneira a manter o controle do parasito sem acarretar em uma extensa lesão tecidual (Souza *et al.*, 2004; Souza *et al.*, 2007; revisto em Dutra & Gollob, 2008). Esses pacientes geralmente apresentam uma maior concentração de anticorpos líticos e maior frequência de células Treg (Cordeiro *et al.*, 2001; de Araujo *et al.*, 2011). Em contrapartida, os pacientes com cardiomiopatia apresentam uma resposta pró-inflamatória mais intensa (Gomes *et al.*, 2003). Os mecanismos determinantes para essa alteração ainda são desconhecidos.

Na cardiomiopatia chagásica crônica, as células T correspondem a 96,3% do infiltrado inflamatório, sendo os linfócitos T CD8⁺ o subtipo predominante; as células B e NK estão presentes com frequência de 2,2 e 1,5%, respectivamente (Higuchi *et al.*, 1993). Geralmente, neste estágio da infecção, a produção de citocinas pró-inflamatórias, em especial IFN- γ e TNF, consegue sobrepor as concentrações de IL-10, IL-4 e IL-2 (Reis *et al.*, 1993, 1997; Abel *et al.*, 2001). Em resposta às citocinas liberadas, quimiocinas são sintetizadas e secretadas e pode ocorrer um aumento na expressão de moléculas de adesão, MHC I e II e receptores de quimiocinas (CCR5, CXCR3 e CCR7) no miocárdio dos pacientes (Zhang & Tarleton, 1996; Cunha-Neto *et al.*, 2005; Nogueira *et al.*, 2012; revisto em Higuchi *et al.*, 2003). O polimorfismo nos genes de proteínas envolvidas nessa resposta, como MHC, IL-10, IL-12, CCL2, CXCL9, CXCL10 e CCR5, pode afetar o desenvolvimento da cardiomiopatia, assumindo um papel de proteção ou de fator de risco para a miocardite (Deghaide *et al.*, 1998; Costa *et al.*, 2009; Calzada *et al.*, 2001; Frade *et al.*, 2013).

Em paralelo à síntese de NO pela iNOS, a ativação de macrófagos também leva à produção de O₂⁻ pela NADPH oxidase. A presença destas moléculas no microambiente constitui um fator importante no estabelecimento da resposta imune pró-inflamatória, contribuindo para a ativação e proliferação de fagócitos e células T (Dhiman & Garg, 2011;

revisado em Gutierrez *et al.*, 2009). Entretanto, na infecção crônica do miocárdio ocorre uma maior geração de ROS (*reactive oxygen species*) (H_2O_2 , O_2^-), principalmente devido à disfunção mitocondrial observada (revisado em Gupta *et al.*, 2009). Apesar de serem detectadas no miocárdio (Teixeira *et al.*, 2006), trabalhos em camundongos sugerem que a atividade das enzimas antioxidantes é reduzida devido ao extenso estímulo de estresse oxidativo (Wen *et al.*, 2004). Dessa forma, as moléculas de ROS alteram a viabilidade das células do tecido cardíaco mediante a oxidação de lipídeos, proteínas e DNA (revisado em Gupta *et al.*, 2009). Pacientes na fase crônica sintomática apresentam altos níveis plasmáticos de TNF e NO, porém apenas em indivíduos com cardiopatia foi observada uma correlação entre esse evento e a diminuição da concentração sérica de proteínas antioxidantes; nos quadros mais graves, essas enzimas podem chegar a menos da metade da quantidade detectada na fase indeterminada (Pérez-Fuentes *et al.*, 2003).

Por outro lado, a progressão das lesões também pode estar associada a maior frequência de linfócitos T CD8⁺ no tecido infectado, especialmente devido à presença de subpopulações positivas para a expressão de granzimas (Reis *et al.*, 1993, revisado em Machado *et al.*, 2012). Estas consistem em serino proteases envolvidas na indução de apoptose na célula-alvo. Frente à lesão cardíaca, células T e macrófagos podem induzir fibrose por meio da liberação de fatores de crescimento, os quais podem atuar estimulando a proliferação de fibroblastos e síntese de colágeno (Reis *et al.*, 2000). As principais moléculas detectadas em associação com a fibrose foram PDGF-A e PDGF-B (*Platelet-derived growth factor*) (Reis *et al.*, 2000). Adicionalmente, o TGF- β também estimula o processo de fibrose ao aumentar a síntese de componentes da matriz extracelular, como o colágeno e a fibronectina, e de inibidores de proteases, além de reduzir a liberação de enzimas associadas à degradação da matriz extracelular (Ferreira *et al.*, 2016; Araújo-Jorge *et al.*, 2002; revisado em Araújo-Jorge *et al.*, 2008). A infecção pelo *T. cruzi* resulta em alterações na microcirculação, de modo que a hipofusão ou isquemia contribuem para a resposta pró-inflamatória e amplificam o grau de fibrose no tecido (revisado em Higuchi *et al.*, 2003). As moléculas ET-1 (*21-amino acid peptide endothelin-1*) e TXA₂ (*tromboxane A2*) são sintetizadas por células do miocárdio e em maior escala pelo parasito, respectivamente, e estimulam a agregação plaquetária no endotélio (revisado em Machado *et al.*, 2012). Adicionalmente, a remoção de ácido siálico da superfície endotelial realizado por trans-sialidases da forma tripomastigota sanguínea também favorece a adesão de plaquetas, o que constitui um forte fator para o tromboembolismo (Dias *et al.*, 2008; revisado em Higuchi *et al.*, 2003).

Assim como em cardiomiopatias de outras etiologias (Skylouriotis *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 2003; Mascaro-Blanco *et al.*, 2008; revisto em Caforio *et al.*, 2002), ao longo da infecção pelo *T. cruzi* podem ser detectados anticorpos reativos a moléculas do hospedeiro, como miosina, troponina T e proteínas presentes em células nervosas, destacando-se o reconhecimento de receptores β adrenérgicos e muscarínicos, o que contribui para a disfunção autonômica observada (Daliry *et al.*, 2014). A redução da resposta vagal descrita acima é capaz de induzir um aumento na quantidade de receptores muscarínicos na região pós-sináptica em animais infectados. Entretanto, as IgG interagem com esses receptores como agonistas, de forma a ativá-los (Borda *et al.*, 1991). Este evento pode estar associado à bradicardia e ao bloqueio atrioventricular descritos em pacientes com cardiomiopatia chagásica (Goin *et al.*, 1999; revisto em Chuenkova & Perrin, 2011). Porém, a exposição crônica à IgG pode levar à dessensibilização do receptor (Leiros *et al.*, 1997). Da mesma forma, IgG reativas aos receptores β adrenérgicos atuam como agonistas, podendo gerar um efeito conotrópico positivo (Chiale *et al.*, 1995; Elies *et al.*, 1996). Em ratos, proteínas antigênicas secretadas pelas formas tripomastigotas sanguíneas ocasionam arritmias e condução nervosa defeituosa na ausência de anticorpos (Rodríguez-Angulo *et al.*, 2015).

1.6. Biomarcadores imunológicos de progressão da doença de Chagas

Nesta infecção, as lesões progridem de maneira insidiosa e apenas uma parcela dos casos culmina no estabelecimento da fase crônica sintomática. Ainda não é possível determinar se, e quando, o indivíduo infectado vai evoluir para as formas cardíaca ou digestiva da doença e os possíveis quadros a serem observados. Nesse sentido, estudos estão sendo realizados com o intuito de avaliar a viabilidade do uso de moléculas do parasito ou do hospedeiro como biomarcadores de progressão clínica. Esses biomarcadores em potencial geralmente são de caráter imunológico devido à participação ativa e constante da resposta imune no desenvolvimento da infecção. Entretanto, proteínas e peptídeos envolvidos em outras vias de resposta a lesões e com associação tecido-específica ou decorrente de alteração metabólica também estão sendo testados como biomarcadores de manifestações clínicas na doença de Chagas (Sherbuk *et al.*, 2015; revisto em Requena-Méndez *et al.*, 2013).

A alteração para um perfil de citocinas predominantemente pró-inflamatórias, especificamente o aumento da síntese de TNF e INF- γ , pode ser relacionada ao grau de severidade da cardiopatia chagásica (Gomes *et al.*, 2003; Talvani *et al.*, 2004; Vitelli-Avelar *et al.*, 2008). Altos níveis séricos de TNF foram correlacionados à redução da fração de ejeção de forma expressiva (< 50%) (Ferreira *et al.*, 2003; Talvani *et al.*, 2004; Vasconcelos *et al.*,

2015). Lula e colaboradores (2009) demonstraram que outras proteínas da superfamília de TNF, Fas-ligante/CD95L e, principalmente, TRAIL (*TNF-related apoptosis-inducing ligand*), também podem ser associadas ao mesmo quadro clínico e ao aumento do diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo. Uma maior produção de INF- γ e TNF pode ser observada em pacientes na fase indeterminada, porém apenas esta última citocina possui a sua quantidade reduzida na forma digestiva, eliminando o emprego do INF- γ como molécula capaz de diferenciar a progressão entre as formas clínicas da doença (Crema *et al.*, 2006; Pisseti *et al.*, 2009). Sendo assim, mais estudos devem ser realizados para caracterizar, relacionar e estratificar a síntese e concentração de TNF com a evolução do estágio indeterminado para a forma cardíaca e suas diferentes manifestações.

A quantidade da quimiocina CCL2 e do NO foram avaliadas em paralelo ao TNF. Assim como esta citocina, as demais moléculas também apresentaram um aumento no nível plasmático em pacientes com cardiopatia severa. CCL2 demonstrou correlação inversa e direta à fração de ejeção e ao diâmetro do ventrículo esquerdo, respectivamente (Talvani *et al.*, 2004), ao passo que a maior concentração de TNF e NO associada à menor expressão de proteínas antioxidantes pode estar relacionada ao quadro de dilatação cardíaca (Habib *et al.*, 1996; Pérez-Fuentes *et al.*, 2003; Pérez-Fuentes *et al.*, 2008). Entretanto, CCL2 não foi avaliada em indivíduos com a forma digestiva e assim como o NO, não foi apropriadamente estudada em pacientes no período indeterminado (resvito em requena-Méndez *et al.*, 2013).

Em comparação a indivíduos saudáveis e àqueles com a forma digestiva da doença, nos pacientes nos estágios indeterminado e com cardiopatia foi detectado um aumento na produção de IgG reativa à miosina e troponina T, o qual apresentou uma baixa correlação com a redução na fração de ejeção do ventrículo esquerdo (Nunes *et al.*, 2013a). Laguens e colaboradores (1994) demonstraram que IgG presentes no soro de pessoas infectadas pelo *T. cruzi* reagem com glicolipídeos extraídos de células musculares esqueléticas, apresentando maior titulação em pacientes com insuficiência cardíaca que em indivíduos na forma crônica indeterminada ou com alteração no eletrocardiograma. A produção de anticorpos reativos aos receptores muscarínicos M2 foi correlacionada negativamente à variação de frequência cardíaca e bradicardia (Sterin-Borda & Borda, 2000; Ribeiro *et al.*, 2007). Entretanto, estes também atuam nos nervos do TGI e podem indicar disfunção autonômica cardíaca e esofageal (Sterin-Borda & Borda, 2000). De acordo com Muñoz e colaboradores (2010), a detecção de padrões de combinação desses anticorpos com IgG reativa aos receptores β -adrenérgicos pode estar relacionada à progressão para as formas cardíaca (IgG anti- β 1 e M2) ou digestiva (IgG

anti- β 2 e M2). Esses autores ainda sugerem que a presença de anticorpos reativos ao receptor M2 em pacientes no período indeterminado pode sinalizar uma potencial progressão para a fase crônica sintomática. Anticorpos com interação à proteína galectina-1, encontrada em diferentes células do sistema imune e no tecido cardíaco, foram observados em maior quantidade em pacientes com cardiomegalia e insuficiência cardíaca congestiva (Giordanengo *et al.*, 2001).

A miosina e o receptor adrenérgico β -1 possuem homologia com os epitopos dos antígenos B13 e P2 β de *T. cruzi*, respectivamente (Abel *et al.*, 1997; Kaplan *et al.*, 1997). O aumento da produção de anticorpos contra B13 foi associado ao agravamento do dano cardíaco, apresentando correlação com quadros de ecocardiograma anormal, principalmente dilatação cardíaca com diminuição da fração de ejeção, e de insuficiência cardíaca com alto risco de mortalidade. Já a detecção de anticorpos contra proteína ribossomal P2 β não teve variação expressiva entre as condições avaliadas (Vicco *et al.*, 2013). Laucella e colaboradores (1996) demonstraram que a abordagem de ensaios competitivos de ELISA (*enzyme linked immuno sorbent assay*) entre anticorpos monoclonais 5F2, os quais foram produzidos a partir da fração microssomal do *T. cruzi* e selecionados pela característica de reação cruzada com proteínas de tecido de mamífero, e anticorpos presentes no soro de indivíduos infectados podem diferenciar os estágios inicial e grave da cardiomiopatia chagásica. Nenhum desses trabalhos contemplou amostras de pacientes com alterações no TGI, sendo necessários mais estudos para validar os respectivos achados. Em contrapartida, altos níveis de IgA contra as proteínas recombinantes CRA e FRA de *T. cruzi* foram detectados com diferença significativa em pessoas com a forma cardiodigestiva ou digestiva da doença, em comparação aos indivíduos no período indeterminado ou com cardiomiopatia. Esses testes apresentaram sensibilidade de aproximadamente 80% e 76% e especificidade de 75% e 77% para CRA (*cytoplasmic repetitive antigen*) e FRA (*flagellar repetitive antigen*), respectivamente (Vasconcelos *et al.*, 2010).

Apesar de alguns trabalhos apresentarem resultados animadores, não foram obtidas respostas definitivas sobre o emprego dessas moléculas como biomarcadores de progressão (revisto em Requena-Méndez *et al.*, 2013), sendo necessário validar esses achados por meio de estudos complementares que envolvam um grupo amostral mais amplo e que englobe a diversidade clínica observada nessa patologia.

1.7. Justificativa

A doença de Chagas apresenta morbidade precoce e alta mortalidade, sendo a cardiomiopatia a manifestação clínica mais frequente e com maior impacto socioeconômico (revisto em Ribeiro *et al.*, 2012). Essa infecção gera um gasto mundial de US\$ 7 bilhões anuais, mediante a perda de produtividade dos indivíduos acometidos, além dos custos na área da saúde, que podem variar de US\$ 7 a 19 bilhões (Lee *et al.*, 2013; Parker & Sethi, 2011). Isto ocorre principalmente devido ao alto valor do tratamento sintomático da doença, uma vez que a cardiomiopatia de etiologia chagásica é mais severa quando comparada às demais, apresentando maior risco de óbito (Abuhab *et al.*, 2013; Bestetti & Muccino, 1997). No Brasil, a morte súbita ocorre em 55 a 65% dos casos (Bocchi *et al.*, 2009).

A cardiomiopatia decorrente da infecção pelo *T. cruzi* é diagnosticada a partir de imunoenaios associados a achados clínicos, eletrocardiográficos e de imagem, sendo esses exames também empregados para avaliar a progressão do quadro clínico (Acquatella, 2007). Dado que as lesões inflamatórias presentes em indivíduos no período indeterminado se assemelham às observadas no estágio crônico sintomático, embora em menor intensidade (revisto em Teixeira *et al.*, 2006), identificar o acometimento do tecido cardíaco antes do estabelecimento de alterações funcionais e estruturais severas pode representar um diferencial importante no prognóstico da infecção. Embora os resultados quanto à eficácia do tratamento no período indeterminado sejam controversos, vários especialistas recomendam o uso do Bz com a finalidade de retardar o avanço da doença (revisto em Ribeiro *et al.*, 2012; Coura & Borges-Pereira, 2011; Coura & de Castro, 2002).

Enquanto os estágios indeterminado e crônico sintomático diferem em relação à regulação da resposta imune (revisto em Machado *et al.*, 2012), em ambas circunstâncias anticorpos podem ser detectados, uma vez que a persistência do parasito pode atuar como um estímulo constante para a síntese dessas proteínas. Entretanto, o perfil de moléculas expressas pelo parasito pode ser modulado pelo microambiente, de forma a promover a expansão clonal de populações de anticorpos distintas ao longo da infecção. Visando compreender a relação da resposta humoral no desenvolvimento da cardiomiopatia, neste estudo foi avaliado o padrão de reconhecimento de proteínas extraídas da forma tripomastigota sanguínea por anticorpos de pacientes em diferentes estágios da doença, tendo como foco principal a busca por potenciais biomarcadores de progressão de lesão cardíaca.

2. Objetivos

2.1. Geral

- ✓ Identificar proteínas imunorreativas da forma tripomastigota sanguínea de *T. cruzi* (cepa Y) em diferentes estágios da infecção, a fim de estudar potenciais biomarcadores de progressão de lesão cardíaca em portadores da doença de Chagas.

2.2. Específicos

- ✓ Determinar a solução de lise a ser utilizada para a extração de proteínas do *T. cruzi* em condições não desnaturantes;
- ✓ Definir a melhor condição cromatográfica para a purificação de IgG presente no soro de pacientes (nas formas indeterminada e cardíaca) e de doadores saudáveis para obter níveis de rendimento e homogeneidade superiores a 95%;
- ✓ Estabelecer um protocolo quali-quantitativo de imunoprecipitação por *beads* magnéticas;
- ✓ A partir da análise de espectrometria de massas, identificar e quantificar as proteínas imunorreativas da forma tripomastigota sanguínea;
- ✓ Avaliar diferenças nos níveis de abundância das proteínas imunorreativas identificadas em cada condição experimental, a fim de estabelecer possíveis relações com os estágios da doença.

3. Materiais e métodos

3.1. Obtenção de parasitos

As formas tripomastigotas sanguíneas de *T. cruzi* (cepa Y) foram obtidas por punção cardíaca no pico de parasitemia (7º dia pós infecção) de camundongos suíços (inóculo de 3×10^5 parasitos pela via peritoneal) (Gonçalves *et al.*, 2011). Semanalmente, 20 camundongos foram infectados e submetidos a este processo, de modo que a amostra final de parasito foi formada pela junção das formas tripomastigotas sanguíneas isoladas de todos os animais utilizados. Assim, foram consideradas como amostras biológicas independentes, conjuntos de tripomastigotas sanguíneos obtidos por grupos de camundongos inoculados em dias distintos.

Para reduzir os contaminantes provenientes do sangue de mamífero, os conjuntos de parasitos foram submetidos à centrifugação diferencial (500 g por 10 min) e ressuspensos em meio RPMI (LGC Biotecnologia, Cotia, Brasil) contendo soro fetal bovino a 10% (Cutilab, Campinas, Brasil). Os experimentos foram realizados de acordo com os princípios éticos da experimentação animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e com as condições de biossegurança adequadas para execução do trabalho, sendo os referidos experimentos aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEUA) da Fiocruz (licença LW16/13).

3.2. Extração de proteínas

Primeiramente, as formas tripomastigotas sanguíneas foram lavadas 3 vezes tampão fosfato (PBS, pH 7,4), centrifugando a 6.500 g por 10 min a 4 °C. Após ressuspender os sedimentos com as soluções de lise (**Tabela 3.1**), contendo 10 µM de E-64 e coquetel de inibidores de proteases (Roche Applied Science, Indianapolis, EUA), foram realizados 10 ciclos de congelamento e descongelamento. Por último, as amostras foram centrifugadas a 16.000 g por 20 min a 4 °C e os sobrenadantes armazenados a -80 °C.

Tabela 3.1. Soluções de lise utilizadas para a extração de proteínas das formas tripomastigotas sanguíneas.

Solução 1	Solução 2	Solução 3	Solução 4
Tris a 20 mM	Tris a 20 mM	Tris a 40 mM	Tris a 40 mM
NP-40* a 1%	NP-40* a 1%	NP-40* a 1%	NP-40* a 1%
NaCl a 300 mM	NaCl a 300 mM	-	-
KCl a 50 mM	KCl a 50 mM	-	-
Sacarose a 200 mM	-	Sacarose a 200 mM	-
pH 7,5	pH 7,5	pH básico**	pH básico**

*NP-40: nonidet P-40. ** O pH não foi ajustado, mas foi aferido apresentando valor $\cong 9,5$.

3.3. Dosagem de proteínas

As concentrações proteicas das amostras foram determinadas utilizando o 2-D Quant Kit (GE Healthcare, Buckinghamshire, Inglaterra) seguindo as instruções do fabricante. A curva padrão foi realizada de 0 a 50 μg de albumina bovina sérica (BSA) a 2 mg/mL. Apenas para a dosagem de proteínas do parasito, a quantidade de BSA referente a cada ponto da curva padrão foi diluída com a solução de lise utilizada na extração, sendo estabelecido um volume final fixo de 50 μL para todas as amostras. Desta forma, os extratos obtidos com diferentes soluções de lise foram dosados separadamente e a possível interferência (no método de dosagem) dos componentes das diferentes soluções de lise foi avaliada.

3.4. Eletroforese em gel de poliacrilamida

3.4.1. Unidimensional (SDS-PAGE)

A eletroforese unidimensional foi realizada em géis de poliacrilamida descontínuos contendo dodecil sulfato de sódio (SDS). Os géis de empilhamento foram feitos com tris-HCl a 0,5 M pH 6,8 e os de fracionamento com tris-HCl a 1,5 M pH 8,8, a 4 e 12% de acrilamida (30% T, 2,67% C) (Biorad, Hercules, EUA), respectivamente; a polimerização foi realizada no sistema Vert-i10 (Loccus Biotecnologia, São Paulo, Brasil). Antes de serem aplicadas nos géis, as amostras foram solubilizadas em tampão Laemmli (1970) modificado à concentração final de tris-HCl a 0,06 M pH 6,8, SDS 2%, ditioneitol (DTT) a 100 mM, glicerol a 10%, azul de bromofenol a 0,025%, fervidas por 5 min e centrifugadas a 16.100 g por 2 min. As corridas foram realizadas a 200 V constantes por 70 min em tampão tris-glicina (tris a 25 mM, glicina a 192 mM, SDS a 0,1%, pH 8,3). Foram utilizadas como padrões de massa molecular

(GE Healthcare) as proteínas fosforilase B (97 kDa), BSA (66 kDa), ovalbumina (45 kDa), anidrase carbônica (20,1 kDa) e a α -lactoalbumina (14,4 kDa).

3.4.2. Bidimensional (2D-PAGE)

Para realizar este ensaio, as amostras foram primeiramente submetidas a uma etapa de precipitação por etanol e acetona. Neste processo, os solventes orgânicos gelados foram adicionados sucessivamente, sendo o volume de cada qual correspondente a quatro vezes o volume inicial do extrato proteico. Após a adição dos precipitantes, as amostras foram homogeneizadas no agitador tipo vórtex por 20 s e então mantidas por 16 h a -20 °C. Posteriormente, foram centrifugadas por 30 min a 16.100 g a 4 °C. Os sobrenadantes foram descartados e os sedimentos lavados 3 vezes com 500 μ L de solução (gelada) contendo etanol a 40% e acetona a 40%, centrifugando por 10 min a 16.100 g a 4 °C. Após a secagem dos sedimentos à temperatura ambiente, os mesmos foram ressuspensos 16 h em DTT a 60 mM, tiouréia a 7 M, uréia a 2 M, CHAPS a 4%, anfólitos (pH 3-10) a 1% (v/v) e coquetel de inibidores. Em seguida, as amostras foram centrifugadas por 10 min a 16.100 g, dosadas e armazenadas a -80 °C.

Após uma etapa de diluição na solução descrita acima, acrescida de azul de bromofenol a 0,002% (p/v), as amostras foram incubadas por 1 h à temperatura ambiente e centrifugadas a 16.100 g por 5 min. Para a realização da primeira dimensão, para cada amostra, 20 μ g de proteínas foram aplicados em fitas (7 cm) de poliacrilamida com gradiente de pH imobilizado no intervalo de 3 a 10 (GE Healthcare). As etapas de reidratação e isoeletrofocalização foram realizadas utilizando o sistema Ettan IPGphor (GE Healthcare) sob as seguintes condições, respectivamente: 30 V por 12 h e 200 V por 1 h, 500 V por 1 h, 1.000 V por 1 h, 1.000-3.500 V por 30 min, 3.500 V por aproximadamente 5 h (18.000 Vh) (revisto em Görg *et al.*, 2000). Ao término da primeira dimensão, as fitas foram incubadas por 15 min sob agitação em 5 mL de tampão de equilíbrio [tris-HCl a 1,5 M pH 8,8, uréia a 6 M, glicerol a 30% (v/v), SDS a 2% e azul de bromofenol a 0,002% (p/v)] contendo DTT a 100 mg. Esta solução foi descartada e o procedimento repetido com iodoacetamida a 400 mg. Depois destes passos de redução e alquilação, as fitas foram posicionadas sobre SDS-PAGE 12% (Laemmli, 1970) e os sistemas (Loccus Biotecnologia) foram selados com agarose 0,5% em tampão tris-glicina a 80 °C. À câmara interna foi adicionado tampão tris-glicina contendo o dobro da concentração usual de SDS e à câmara externa adicionou-se o tampão tris-glicina-SDS tradicional. As condições elétricas empregadas na segunda dimensão foram de 2,5 mA por gel por 30 min e 10 mA por gel até o final da corrida.

3.5. Coloração

Para todos os métodos de coloração, o volume das soluções descritas abaixo foi fixado em 50 mL e as etapas de incubação foram realizadas sob agitação moderada.

3.5.1. Impregnação por prata

Para fixar as proteínas na malha dos géis, estes foram mantidos por 16 h em etanol a 30% (v/v) e ácido acético a 10% (v/v) (solução fixadora). Em seguida, esta solução foi desprezada e os géis foram sensibilizados por 30 min em etanol 30% (v/v), tiosulfato de sódio a 0,2% (p/v) e acetato de sódio triidratado a 12% (p/v). Após 3 lavagens de 2 min com água, os géis foram incubados com nitrato de prata a 0,25% (p/v) e formaldeído a 0,04% (v/v) por 20 min e então lavados 3 vezes com água por 20 s. A revelação foi realizada com carbonato de sódio a 2,5% (p/v), formaldeído a 0,02% (v/v) e tiosulfato de sódio a 0,001% (p/v), por 2 a 5 min, agitando-se manualmente. A reação foi interrompida com EDTA- $\text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ a 1,5% (p/v) por 10 min (Rabilloud *et al.*, 1994).

3.5.2. Coomassie R-250

A etapa de fixação foi realizada como descrito para impregnação por prata. Após descartar a solução fixadora, os géis foram incubados por 16 h em nova solução fixadora acrescida de 0,2% (p/v) de azul de Coomassie R-250. A coloração inespecífica dos géis foi reduzida ao incubá-los na solução de fixação novamente por aproximadamente 2 h (Rabilloud & Charmont, 2000).

3.5.3. Azul de Coomassie coloidal

Os géis foram incubados 3 vezes por 30 min em etanol a 30% (v/v) e ácido fosfórico a 1,8% (v/v). Após a fixação, os géis foram lavados 3 vezes por 20 min com ácido fosfórico a 1,8% (v/v) e então incubados com ácido acético a 2% (v/v), etanol a 18% (v/v) e sulfato de amônio a 15% (p/v) por 30 min. Em seguida, foi adicionado a cada gel 1% (v/v) da solução de azul de Coomassie G-250 a 2% (p/v). Os géis permaneceram nessa solução por 72 h sob agitação moderada. A solução corante foi descartada e os géis foram guardados em ácido acético a 1% (v/v) em água (Rabilloud & Charmont, 2000).

3.6. Western blot seguido de imunorevelação

Foram aplicados 10 μg de proteína em cada poço dos géis e, imediatamente após o término da eletroforese, estes foram submetidos à transferência de proteínas para membrana de nitrocelulose (GE Healthcare) utilizando sistema Semi-seco (TE 77 PWR, Amersham

Biosciences, Buckinghamshire, Inglaterra). A transferência foi realizada a 45 mA por 90 min em solução contendo Tris a 25 mM, glicina a 192 mM, SDS a 0,1% (p/v) e metanol a 20% (v/v). Para verificação do sucesso da etapa de transferência, as membranas foram coradas com vermelho de Ponceau [*Ponceau Red* a 0,2% (p/v) e ácido acético a 2% (v/v)] e em seguida lavadas com TBS-tween pH 8,0 [Tris-HCl a 25 mM, NaCl a 0,14 M, KCl a 2 mM e Tween 20 a 0,05% (v/v)]. O bloqueio foi feito por 16 h sob agitação moderada em geladeira com TBS-Tween contendo leite desnatado em pó a 5% (p/v). As membranas foram lavadas 4 vezes por 10 min e então incubadas por 1 h, sob agitação, com anticorpos (IgG) purificados de pacientes (ver item 3.7.1) e indivíduos saudáveis diluídos em TBS-Tween. Após 4 lavagens de 10 min, as membranas foram mantidas em TBS-Tween contendo anticorpo secundário contra IgG humana conjugado à peroxidase (1:25.000) (GE Healthcare) por 1 h sob agitação. Depois de lavadas 4 vezes por 10 min, as membranas foram reveladas por quimioluminescência (SuperSignal West Dura, Thermo Scientific).

3.7. Purificação de IgG humana

3.7.1. Pacientes e doadores saudáveis

Os soros utilizados nesta dissertação foram obtidos de pacientes assistidos no Ambulatório de Doença de Chagas e Insuficiência Cardíaca, coordenado pelo Pronto-Socorro Cardiológico de Pernambuco Professor Luiz Tavares (PROCAPE) da Universidade de Pernambuco (UPE). Neste ambulatório, os pacientes são periodicamente acompanhados e o quadro clínico bem caracterizado. Os indivíduos participantes foram selecionados de acordo com os seguintes critérios: 1) possuir sorologia reagentes para a infecção chagásica e 2) possuir exames clínicos/complementares (exame físico, eletrocardiograma, ecocardiograma, radiografia de tórax e de esôfago quando necessários) que permitissem sua caracterização nos estágios de envolvimento cardíaco (A, B1, B2, C e D) (**Figura 3.1**) estabelecidos pela Diretriz Latino-Americana para o Diagnóstico e Tratamento da Cardiopatia Chagásica (Andrade *et al.*, 2011). Adicionalmente, foram incluídas apenas as amostras de pacientes que não apresentaram dilatação do esôfago e queixas digestivas (engasgos e constipação) até o início deste estudo. No grupo de indivíduos no período indeterminado estão os pacientes sem alterações nos exames de eletro e ecocardiograma classificados no estágio A (n=5), enquanto os pacientes com lesão cardíaca foram subdivididos em dois grupos de acordo com a classificação em estágios B1 (n=5) e C (n=5) (**Figura 3.1**); todas as pessoas agrupadas no

nível C de cardiomiopatia foram diagnosticadas com dilatação. Por fim, o grupo controle foi composto por indivíduos saudáveis (n=5) moradores de áreas não endêmicas da doença.

Fase aguda	Fase crônica				
	Forma indeterminada	Forma cardíaca sem disfunção ventricular	Forma cardíaca com disfunção ventricular		
	A	B1	B2	C	D
Pacientes com quadro compatível com doença de Chagas aguda.	Pacientes sob o risco de desenvolver ICC. Possuem sorologia positiva, não têm cardiopatia estrutural ou sintomas de ICC. Também não têm alterações digestivas.	Pacientes com cardiopatia estrutural evidenciada por alterações eletrocardiográficas ou ecocardiográficas, mas com função ventricular global normal e sem sinais e sintomas atuais ou prévios de ICC.	Pacientes com cardiopatia estrutural caracterizada por disfunção ventricular global, mas sem sinais e sintomas prévios ou atuais de ICC.	Pacientes com disfunção ventricular e com sintomas prévios ou atuais de ICC (NYHA I, II, III ou IV).	Pacientes com sintomas refratários de ICC em repouso, apesar de tratamento clínico otimizado, necessitando intervenções especializadas.

Figura 3.1. Estratificação do comprometimento cardíaco em pacientes com doença de Chagas com base na disfunção ventricular esquerda (adaptado de Andrade *et al.*, 2011). ICC: insuficiência cardíaca congestiva; NYHA: *New York Heart Association*.

Este estudo obedeceu aos princípios éticos na experimentação em seres humanos adotado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP), de forma que todos os indivíduos foram informados antes do início do estudo, sendo incluídos apenas após consentimento de acordo com os princípios da Declaração de Helsinki (1975). Os experimentos realizados com as amostras concedidas foram incorporados como objetivo secundário do projeto “Avaliação de marcadores imunológicos em portadores da cardiopatia da doença de Chagas utilizando os antígenos CRA e FRA de *Trypanosoma cruzi*” vigente (coordenação: Dra. Yara M. Gomes, CEP/CPqAM: 33/10, CAAE: 0032.0.095.000-10).

3.7.2. Cromatografia

3.7.2.1. Afinidade

Para a purificação de IgG, os soros foram diluídos 10 vezes no tampão A apropriado (**Tabela 3.2**), centrifugados por 10 min a 16.100 g a 4 °C, quantificados e submetidos à cromatografia de afinidade. Para isto, foi utilizada uma coluna de Proteína G (HiTrap rProtein G 0,7 x 2,5 cm, GE Healthcare) acoplada ao Äkta Purifier (GE Healthcare). Durante a fase de padronização, foram avaliadas 3 combinações de tampões de equilíbrio (tampão A) e eluição

(tampão B) (**Tabela 3.2**), sendo todas as corridas cromatográficas realizadas à temperatura ambiente sob o fluxo de 1 mL/min. Uma vez que os tampões foram selecionados, em todas as purificações foram utilizados 5 volumes de coluna tanto no passo de equilíbrio quanto no passo de eluição. A fim de preservar a função do analito, as frações eluídas com 100% de B foram imediatamente neutralizadas com tris a 1 M, pH 9; para cada 500 µL da fração coletada foram adicionados 70 µL deste tampão. O monitoramento da absorvância foi feito a 280 nm e todas as frações proteicas coletadas foram quantificadas. A homogeneidade da fração retida, de cada amostra injetada, foi avaliada por SDS-PAGE.

Tabela 3.2. Combinação de tampões de equilíbrio (A) e eluição (B) utilizados na padronização da purificação de IgG por cromatografia de afinidade.

Tampão A	Tampão B
fosfato de sódio a 20 mM pH 7,0	glicina-HCl a 100 mM pH 2,7
fosfato de sódio a 20 mM, NaCl a 300 mM pH 7,0	glicina-HCl a 100 mM pH 2,7
fosfato de sódio a 20 mM pH 7,0	glicina-HCl a 100 mM pH 2,1

3.7.2.2. Exclusão molecular

Neste experimento foi utilizado o mesmo sistema cromatográfico acima com uma coluna Superdex G-200 (10 x 30 cm, GE Healthcare). A separação foi feita à temperatura ambiente sob o fluxo de 0,5 mL/min, sendo a fase móvel PBS pH 7,4. As frações foram coletadas a 0,5 mL por tubo.

3.8. Imunoprecipitação

Estes ensaios foram realizados para a purificação de proteínas imunorreativas do *T. cruzi*. Para isto, as IgG purificadas anteriormente foram incubadas com matriz cromatográfica magnetizada (*bead* magnética) e quimicamente modificada pela ligação covalente de proteína G em sua superfície (GE Healthcare). Após a interação das IgG com a Proteína G, foram testados os protocolos de imobilização covalente por *cross-linking* ou não-covalente (protocolo clássico) destes anticorpos na matriz cromatográfica, de acordo com as recomendações do fabricante.

Antes de iniciar os experimentos de imunoprecipitação, o tampão das IgG foi trocado para TBS (tris a 50 mM e NaCl a 150 mM, pH 7,5) utilizando filtros de 10 kDa (Amicon Ultra-4, Merck Millipore, Tullagreen, Irlanda), de forma que as amostras foram concentradas

ao término deste processo. Foram feitos 4 ciclos de centrifugação por 25 min a 7.000 g a 4 °C. Posteriormente, as concentrações proteicas dos anticorpos foram determinadas por leitura de sua absorvância a 280 nm, em sistema NanoDrop 2000 (Thermo Scientific), utilizando-se o valor de coeficiente de extinção molar apropriado ($13,7 \text{ cm}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$).

3.8.1. Imunoprecipitação com *cross-linking*

Para imobilizar permanentemente os anticorpos às proteínas G presentes nas *beads* magnéticas foram feitos ensaios de imunoprecipitação com *cross-linking*. Neste processo, 2 μL de *beads* foram inicialmente equilibrados com 500 μL de TBS. Após desprezar essa solução, as IgG foram adicionadas e incubadas por 60 min à temperatura ambiente sob agitação por inversão. Em seguida, a solução foi coletada, sendo denominada de fração de anticorpo não-retido, e as *beads* foram lavadas 3 vezes com uréia a 2 M em TBS. Quinhentos microlitros de trietanolamina a 200 mM pH 8,9 foram adicionados, homogeneizados e rapidamente descartados. A reação de *crosslinking* foi feita com dimetil pimelimidato (DMP) (Sigma-Aldrich, Saint Louis, EUA) a 50 mM em trietanolamina por 60 min à temperatura ambiente, sob agitação moderada por inversão. Esta solução foi descartada e a reação bloqueada com 500 μL de etanolamina a 100 mM pH 8,9, ressuspensão por inversão por 15 min. O sobrenadante foi removido e os anticorpos não-retidos covalentemente foram eluídos com 500 μL de uréia a 2 M e glicina-HCl a 0,1 M pH 2,9, homogeneizando brevemente, e coletados. As *beads* foram então equilibradas 2 vezes com TBS e o extrato proteico do parasito diluído em TBS foi adicionado. A incubação foi realizada por 16 h a 4 °C sob agitação por inversão. Ao término desse período, o volume contendo proteínas não-retidas foi coletado e as *beads* lavadas 3 vezes com o tampão descrito acima. A fração contendo eventuais proteínas imunorreativas foi produto da eluição pela adição de 10 volumes (em relação ao volume de *beads*) de uma solução de uréia a 2 M e glicina-HCl a 0,1 M pH 2,9 seguida de agitação por inversão por 5 min. Este processo de eluição foi repetido uma vez e os dois volumes de eluição foram juntados. Todas as frações coletadas (retidas e não-retidas) foram avaliadas por SDS-PAGE.

3.8.2. Imunoprecipitação sem *cross-linking*

Para a imobilização de complexos antígeno-anticorpo, estes foram previamente formados a partir da interação de 13 μg de IgG com 130 μg de proteínas totais do parasito. A incubação foi realizada por 16 h a 4 °C sob agitação por inversão. Essa mistura foi adicionada a 2 μL de *beads* já equilibrados com 500 μL de TBS. A imobilização dos possíveis complexos

foi feita por 60 min à temperatura ambiente. O volume contendo as proteínas não retidas foi coletado e as *beads* lavadas 3 vezes com TBS. Por último, foram feitos dois passos de eluição, adicionando 20 µL de glicina a 0,1 M pH 2,9 e agitando por inversão à temperatura ambiente por 5 min. Todas as frações geradas foram avaliadas por SDS-PAGE.

No protocolo clássico da imunoprecipitação, as *beads* foram equilibradas com 500 µL de TBS. Esta solução foi desprezada e os anticorpos em TBS foram adicionados. O volume final destes correspondeu a 10 vezes o volume de *beads*. Após o período de incubação à temperatura ambiente, o volume contendo IgG eventualmente não-retidas foi coletado e as *beads* lavadas 3 vezes com 500 µL de TBS, suspendendo as partículas por pipetagem suave. Em seguida, o extrato proteico do parasito diluído em TBS foi adicionado e mantido sob agitação moderada por inversão. As proteínas de *T. cruzi* não-retidas foram coletadas e as *beads* lavadas como descrito anteriormente. A eluição foi feita 2 vezes com glicina-HCl a 0,1 M pH 2,9, adicionando 10 vezes o volume de *beads* e mantendo sob agitação moderada por inversão por 10 min. O perfil proteico dos volumes coletados foi acompanhado por SDS-PAGE e a concentração protéica da fração retida foi determinada.

Os volumes de *beads*, a proporção de anticorpo para proteínas do parasito e o tempo de incubação estão indicados nos respectivos resultados.

3.9. Densitometria

A fim de estimar o rendimento de imobilização de IgG nos experimentos de imunoprecipitação, a quantidade de anticorpos que não foi retida nas *beads* magnéticas foi calculada a partir da análise de densitometria, feita com o programa Image Master 2DElite (GE Healthcare). As estimativas foram feitas separadamente para cada amostra purificada dos soros dos 15 pacientes e dos 5 doadores saudáveis.

Para cada uma das amostras de IgG purificadas foram coletados 100 µL de fração não-retida (**Vc**) quando do teste de interação com as *beads* magnéticas de Proteína G. Em seguida, 2 µg do *pool* de IgG e 20 µL de **Vc** foram aplicados no mesmo gel, posteriormente corado por Coomassie R-250. A quantidade de proteína total do *pool* foi fixada para que os volumes das bandas detectadas nesta amostra pudessem ser utilizados como referência. Assim, a primeira etapa na análise consistiu em determinar o percentual relativo representado pela banda eletroforética correspondente à cadeia pesada de imunoglobulina, para cada um dos *pools* de IgG. Em seguida, dado que a quantidade total de proteína aplicada no gel era conhecida (2 µg), o percentual correspondente à banda de cadeia pesada foi convertido para

massa de proteína (μg), sendo denominado de Q_{CP} . Este valor foi utilizado posteriormente para calcular a quantidade de proteína presente no volume de amostra aplicado no gel ($V_{\text{a}} = 0,2 V_{\text{c}}$). Para tal, tivemos que primeiro determinar o percentual relativo da densidade da banda da cadeia pesada detectada no V_{a} em relação à banda equivalente detectada na raia contendo os 2 μg de *pool* de IgG; este percentual foi definido como P . Logo, a quantidade (em μg) relativa, QR , dos anticorpos não-retidos foi calculada como:

$$QR (\mu\text{g}) = Q_{\text{cp}} (\mu\text{g}) \times P (\%) \times [V_{\text{c}} (\mu\text{L}) / V_{\text{a}} (\mu\text{L})]$$

É importante ressaltar que as análises foram feitas considerando apenas a banda de cadeia pesada de IgG, pois estas apresentaram maior intensidade nas amostras obtidas nos ensaios de imunoprecipitação, o que auxilia na reprodutibilidade da detecção destas bandas entre os diferentes géis analisados pelo programa utilizado.

3.10. Tripsinização

3.10.1. Em gel

As cadeias polipeptídicas presentes nas bandas excisadas dos géis das frações retidas coletadas na cromatografia de afinidade foram digeridas segundo Shevchenko e colaboradores (1996) com modificações. Esses fragmentos de gel foram descorados em solução de acetonitrila a 50% (v/v) e bicarbonato de amônio a 25 mM pH 8,0 através de 3 lavagens de 15 min, sob agitação. O descorante foi então retirado e as bandas desidratadas com 200 μL de acetonitrila por 5 min. Esta solução foi descartada e as bandas levadas à centrífuga concentradora sob vácuo (*Speed Vac Plus SC210A Savant*) por 15 min para a secagem. As cadeias polipeptídicas foram reduzidas e alquiladas sucessivamente com 100 μL de DTT a 65 mM por 30 min a 56 °C e 100 μL de iodoacetamina a 200 mM por 30 min à temperatura ambiente, respectivamente. As bandas foram então lavadas e desidratadas com 200 μL de bicarbonato de amônio a 100 mM por 10 min e 200 μL de acetonitrila por 5 min, respectivamente. Essas etapas foram repetidas, sendo seguidas por mais um passo de desidratação e secagem das bandas como descrito anteriormente. Posteriormente, foram adicionados 15 μL da solução de tripsina (Sequencing Modified Trypsin, Promega, Madison, EUA) (20 μg de tripsina em 100 μL de ácido acético a 50 mM) diluída 10 vezes com bicarbonato de amônio a 40 mM. As bandas foram mantidas no gelo por 10 min para que a

penetração da tripsina fosse completa, sem autólise. Após retirar o excesso de enzima, os géis foram incubados por 16 h em bicarbonato de amônio a 40 mM a 37 °C. Esta solução foi coletada e a reação foi interrompida pela adição de 30 µL de ácido fórmico a 5% em acetonitrila a 50%. Para a extração dos peptídeos, as bandas foram mantidas nesta solução por 15 min e sonicadas por 2 min e a solução coletada. Depois de repetir esta etapa, todas as frações coletadas de uma mesma banda foram reunidas, concentradas até 10 µL e os peptídeos estocados a -80 °C para posterior análise por espectrometria de massas.

3.10.2. Em solução

Extratos proteicos das formas tripomastigotas sanguíneas (10 µg) obtidas com as diferentes soluções de lise (**Tabela 3.1**) foram diluídos 25 vezes em solução desnaturante (uréia a 8 M e tris-HCl a 0,15 M pH 8,5), enquanto as frações eluídas nos experimentos de imunoprecipitação foram diluídas 2,5 vezes. As amostras foram então reduzidas com DTT em tris-HCl a 0,15 M pH 8,5 por 1 h a 37 °C, e em seguida alquiladas por 1h à temperatura ambiente com iodoacetamida dissolvida no mesmo tampão. Os volumes desses reagentes acrescentados às amostras corresponderam às concentrações finais de 65 e 108 mM, respectivamente. Após diluir a uréia a 0,6 M adicionando às amostras tris-HCl a 0,1 M pH 8,5, a tripsinização foi iniciada. Para isto, 20 µg de tripsina (Sequencing Modified Trypsin, Promega) foram solubilizados em 200 µL de ácido acético a 50 mM e duas etapas de adição dessa enzima foram realizadas. No primeiro momento, foi obedecida a proporção 1:50 (m/m) (enzima:substrato), sendo a reação mantida a 37 °C. Ao término de 2h de incubação, 1:100 (m/m) de tripsina foi adicionado às amostras, permanecendo na temperatura anterior por mais 16 h. A clivagem foi interrompida com ácido trifluoroacético (TFA) com concentração final de 1% (modificado de Faça *et al.*, 2014).

3.11. Dessanilização

Os peptídeos oriundos da tripsinização em gel foram dessanilizados em minicoluna de fase reversa C18 (ZipTip, Millipore, Bedford, EUA), sendo a resina ativada com 10 µL de acetonitrila e equilibrada 8 vezes com 10 µL de TFA a 0,1% (v/v). Após aplicação dos digestos trípticos à coluna foram efetuados 8 ciclos de lavagem, cada qual com 10 µL de solução de equilíbrio. Finalmente, os peptídeos foram eluídos em 1,5 µL de acetonitrila a 50% (v/v) em TFA a 0,1% (v/v).

Para a dessanilização das amostras provenientes da digestão em solução, foi utilizada matriz Poros R2 (Applied Biosystems, Foster City, EUA) com capacidade de ligação de 10

$\mu\text{g}/\mu\text{L}$, de forma que colunas de 1 cm (10 μL de resina) foram empacotadas em ponteiras de 200 μL . Primeiramente, as colunas foram lavadas com 20 μL de acetonitrila e equilibradas 3 vezes com 20 μL de TFA a 1%. As amostras com a mesma concentração de TFA (último passo da tripsinização em solução) foram aplicadas em 40 μL por vez até o final do volume. A etapa de lavagem foi feita 4 vezes com 20 μL de TFA a 0,1% (v/v). Os peptídeos foram eluídos com 20 μL de acetonitrila a 70% em TFA a 0,1% (v/v), por duas vezes, e as amostras foram secas em *Speed Vac Plus SC210A* e armazenadas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.12. Espectrometria de massas

3.12.1. MALDI-MS/MS

As amostras dessanilizadas com ZipTip foram plaqueadas juntamente com uma solução aquosa de ácido alfa-ciano-4-hidroxicinâmico (10 mg/mL) em acetonitrila a 50% (v/v) e TFA a 0,3% (v/v) na proporção 1:1 (v/v), de acordo com a metodologia *dried-droplet*, e analisadas pelo espectrômetro de massas MALDI-TOF/TOF (ABI 5800 Applied Biosystems) no modo *reflectron*. A mistura dos seguintes peptídeos foi utilizada como calibrante em todos os casos (modo de calibração externo): arg-bradicinina (m/z 904,46), angiotensina I (m/z 1.296,68), glu-fibrinopeptídeo B (m/z 1.570,67), ACTH-(1-17) (m/z 2.093,08) e ACTH-(18-39) (m/z 2.465,19) (Applied Biosystems). Em cada amostra, os 15 íons mais intensos detectados no intervalo de m/z de 800 a 3.500 foram fragmentados por processo de decaimento pós-fonte sem fazer uso da câmara de colisão (CID). As buscas foram feitas no Mascot (<http://www.matrixscience.com>) conforme os parâmetros: 0,6 Da e 50 ppm de tolerância para íon-fragmento e íon precursor, respectivamente. Escolheu-se carbamidometilação de cisteína como modificação fixa e oxidação de metionina como modificação variável. Foi utilizado o banco de dados de *Homo sapiens* do NCBI e os resultados das identificações foram em seguida validados pelo programa Scaffold 4.3.4 (Proteome Software Inc).

3.12.2. nanoESI-MS/MS

Os extratos peptídicos dessanilizados em colunas R2 foram totalmente secos (*Speed Vac Plus SC210A*, Savant) e ressuspensos por sonicação (10 min) em 20 μL de ácido fórmico a 1% (v/v). Em seguida, essas amostras foram submetidas à nanocromatografia de fase reversa acoplada ao espectrômetro de massas. Os digestos trípticos oriundos das extrações com as quatro soluções de lise foram analisadas no LTQ XL/Orbitrap (Thermo Scientific),

enquanto as amostras provenientes dos ensaios de imunoprecipitação foram analisadas no Q Exactive Plus (Thermo Scientific).

3.12.2.1. nanoESI-LTQ/Orbitrap XL

As amostras independentes extraídas com as diferentes soluções de lise foram fracionadas e analisadas em triplicata técnica por nanocromatografia de fase reversa acoplada ao sistema de *nanoelectrospray* e espectrômetro de massas de alta resolução. Para eliminar a contaminação interamostra, ao término de cada triplicata técnica, a coluna foi extensivamente lavada com acetonitrila a 80% em ácido fórmico a 0,1% (v/v) (336 min a 200 nL/min). Para o monitoramento da qualidade da cromatografia, este passo foi seguido pela injeção de 60 fmol de digesto trípico de BSA (Michrom Bioresources Inc., USA).

Para a análise de cada replicata técnica, 2 µL de peptídeos dessalinizados foram injetados a 2 µL/min no sistema cromatográfico *Easy-nLC II* (Thermo Scientific, USA), passando inicialmente pela coluna *trap* de 2 cm de comprimento e 100 µm de diâmetro interno, empacotada com a matriz *Magic C18 AQ* (Michrom Bioresources, USA) de 5 µm e 200 Å. Os peptídeos eluídos foram então fracionados em uma coluna de 30 cm (75 µm de diâmetro interno) formada a partir do empacotamento da matriz descrita acima diretamente em PicoFrit (New Objective, USA) vazio com ponta de 15 µm. A separação foi realizada sob o fluxo de 200 nL/min, sendo o eluente A composto por ácido fórmico a 0,1% (v/v) em água e o eluente B por ácido fórmico a 0,1% (v/v) em acetonitrila. A eluição foi realizada com gradiente de 2 a 60% de B por 162 min; a concentração de B foi aumentada para 80% em 4 min, sendo mantida por mais 2 min. Ao serem eluídos, os peptídeos foram diretamente introduzidos no *nanoESI LTQ Orbitrap XL* (Thermo, USA). Para a ionização destes, à fonte *nanoelectrospray* foi aplicada uma voltagem de 1,9 kV e o capilar de entrada e o tubo de lentes foram ajustados para 200 °C e 100 V, respectivamente. A varredura dos espectros foi feita no intervalo de *m/z* de 300 a 1.700 no analisador *Orbitrap* de alta resolução (60.000 a *m/z* de 400) com valor-alvo de controle de ganho automático (AGC) configurado para 500.000. Para cada espectro, os 7 íons precursores mais intensos foram submetidos à fragmentação por CID (*collision-induced dissociation*) conforme os seguintes parâmetros: energia de colisão normalizada em 35%, sinal mínimo requerido de 10.000, janela de isolamento de 2,0 *m/z*, ativação Q de 0,25 e tempo de ativação de 30 ms. Os espectros de MS2 foram então adquiridos no analisador *Linear Trap* de baixa resolução, com valor-alvo de AGC MSn de 10.000. A opção de exclusão dinâmica foi ativada e realizada de acordo com estas configurações: número de repetições = 1, duração de repetição = 30 s, tamanho de lista

de exclusão = 500, duração da exclusão = 45 s e tolerância da massa de exclusão = 10 ppm. Somente íons com carga ≥ 2 foram selecionados para dissociação.

3.12.2.2. nanoESI-Q Exactive Plus Orbitrap

As proteínas imunorreativas obtidas nos ensaios de imunoprecipitação também foram analisadas em triplicata técnica por nanocromatografia de fase reversa acoplada ao sistema de *nanoelectrospray* e espectrômetro de massas de alta resolução. Neste caso, para evitar a contaminação entre as amostras, após a análise de cada triplicata técnica, quatro ciclos de corrida cromatográfica foram realizados na ausência de analito. Estas corridas foram feitas sob fluxo de 200 nL/min com gradiente de 2 a 80% de B [ácido fórmico a 0,1% (v/v) em acetonitrila] em 2 min, mantendo esta concentração por 30 min; 80 a 2% de B em 2 min, permanecendo em 2% de B por 10 min.

O mesmo volume de cada replicata técnica descrito anteriormente foi aplicado a 2 μ L/min no sistema *DIONEX ULTIMATE 3000 RSLCnano* (Thermo Scientific, USA). Os peptídeos foram concentrados em uma coluna *trap* preparada como informado acima; ao serem eluídos, foram imediatamente submetidos à separação em uma coluna de 30 cm (75 μ m de diâmetro interno) constituída pela matriz *ReproSil-Pur C18 AQ* (Dr. Maisch GmbH, Germany) de 1,9 μ m e 120 Å, diretamente empacotada em capilar *laser-puller* com ponta de 4 μ m. O fracionamento foi feito a 200 nL/min, sendo o tampão A composto por ácido fórmico a 0,1% (v/v) em água e o tampão B, o mesmo mencionado no início deste tópico. A eluição foi realizada com gradiente de 2 a 40% de B por 162 min; a concentração de B foi aumentada para 80% em 4 min, sendo mantida por mais 2 min. Ao serem eluídos, os peptídeos foram diretamente introduzidos no *Q Exactive Plus Orbitrap* (Thermo, USA). A ionização foi alcançada pela voltagem da fonte a 1,9 kV, temperatura do capilar a 250 °C e pelo nível RF das lentes-S a 60 V. A varredura completa de MS1 foi adquirida no modo *profile* com uma microvarredura a resolução de 70.000, valor-alvo de AGC de 1×10^6 e tempo máximo de injeção de 100 ms. Para cada espectro, os 12 íons precursores mais intensos na janela de isolamento e deslocamento de 2,0 e 0,5 m/z , respectivamente, foram selecionados para fragmentação por HCD (*higher-energy collision dissociation*) com energia de colisão normalizada a 30 %. Os espectros de MS2 (200 a 2.000 m/z) foram adquiridos em modo centróide com uma microvarredura à resolução de 17.500, valor-alvo de AGC de 5×10^4 e tempo máximo de injeção de 50 ms. A exclusão dinâmica foi ajustada para 60 s e a rejeição de estado da carga foi habilitada para cargas desconhecidas e para aquelas com $z = 1$.

3.13. Interpretação dos espectros e validação dos resultados obtidos

3.13.1. Banco de dados utilizado

O banco de dados de proteínas utilizado foi inicialmente composto por 301,643 entradas, obtidas em 27/10/2015, a partir de: a) 182,191 entradas relativas ao organismo *Trypanosoma* presentes no NCBIInr; b) 49,246 para *Mus musculus* do UniProt; c) 70,090 para *Homo sapiens* do UniProt e d) 116 entradas relativas a contaminantes conhecidos em experimentos de proteômica, baixado em <ftp://ftp.thegpm.org/fasta/cRAP>. Em seguida, utilizamos a ferramenta *Generate Search DB* do programa de domínio público *PatternLab for Proteomics* (www.patternlabforproteomics.org) para eliminar a redundância do banco de dados, ou seja, entradas apresentando 100% de identidade sequencial, contidas ou não dentro de outras entradas, foram transformadas em entradas únicas. O banco não-redundante foi então reduzido para 209,593 entradas. Por último, para todas as entradas, foram geradas sequências reversas (*decoy*), as quais foram incluídas ao banco de dados, para um banco final de trabalho contendo 419,186 entradas.

3.13.2. Busca por *peptide-spectrum match* e corte por taxa de falsa descoberta

As buscas foram realizadas pela ferramenta *Comet PSM* integrada ao programa *PatternLab* (www.patternlabforproteomics.org) contra o banco de dados acima descrito (419,186 entradas). Os parâmetros utilizados foram: erro tolerado para massa do precursor (40 ppm), enzima (tripsina); clivagem (semi-tríplica); número máximo de clivagens perdidas (2); carbamidometilação de cisteína, +57,02146 Da, como modificação fixa; oxidação de metionina, +15,99490 Da, e desamidação de asparagina e/ou glutamina, +0,98400 Da, como modificações variáveis. Os valores para *fragment bin tolerance*, *fragment bin offset* e *theoretical fragment ions* foram 1,0005, 0,4 e 1 para dados gerados pelo espectrômetro LTQ/Orbitrap XL e 0,02, 0 e 0 para aqueles gerados pelo Q Exactive Plus. A validação foi feita usando o algoritmo SEPro (*Search Engine Processor*) (Carvalho *et al.*, 2012a). A partir da quantidade de proteínas *decoy* identificadas foram calculadas as taxas de falsa descoberta (TFD), sendo estabelecido como critério de confiabilidade de identificação o limite máximo de 1% de TFD. Adicionalmente, foram consideradas apenas as proteínas identificadas seguindo o princípio da máxima parcimônia (Zhang *et al.*, 2007).

3.14. Análise bioinformática e estatística

Os gráficos foram feitos utilizando o GraphPad Prism 5 (GraphPab Software, San Diego, EUA), de maneira que todos os dados computados foram submetidos a testes

estatísticos realizados por esse programa. Primeiramente, o teste de normalidade Shapiro-Wilk foi aplicado em todos os grupos amostrais para definir o tipo de distribuição destes. Os diagramas de Venn foram organizados a partir de uma ferramenta *online* disponível em <http://bioinfo.gp.cnb.csic.es/tools/venny/> (Oliveros, 2015).

As proteínas identificadas nas diferentes soluções de extração foram quantificadas no *Patternlab* por *spectral counting* de peptídeos únicos, mantendo o critério da máxima parcimônia. Os dados foram normalizados pelo NSAF (*normalized spectral abundance factor*) (Carvalho *et al.*, 2016).

Para as proteínas de *Trypanosoma* sp. identificadas nas frações eluídas nos experimentos de imunoprecipitação foi empregada a abordagem de quantificação por *XIC* (*extracted ion chromatogram*). Os mesmos parâmetros de peptídeos únicos e máxima parcimônia foram seguidos. Os dados de MS1 necessários para a realização desse processo foram extraídos com o RawReader. Os resultados de *XIC* foram analisados pelo *TFold* integrado ao *Patternlab* (Carvalho *et al.*, 2012b; Carvalho *et al.*, 2016). Foram estabelecidos como *cut-off*: q e p-valores $\leq 0,05$, L-estringência de 0,6 e mínimo de três replicatas biológicas. Os gráficos foram otimizados utilizando o recurso *Optimize F* (Carvalho *et al.*, 2012c). Os testes t foram realizados para cada proteína individualmente.

O alinhamento local das sequências primárias das proteínas hipotéticas de interesse identificadas foi realizado com a ferramenta BLAST (*basic local alignment search tool*) integrada ao Uniprot (www.uniprot.org).

4. Resultados

4.1. Extração de proteínas

Para padronizar a extração de proteínas da forma tripomastigota sanguínea, quatro soluções de lise distintas foram avaliadas (**Tabela 3.1**). Como observado na **figura 4.1**, a solução 4 apresentou menor quantidade de proteína, sendo a diferença estatisticamente significativa em relação a todas as condições testadas. A solução 2 obteve o melhor resultado, detendo rendimento superior em pelo menos 25%.

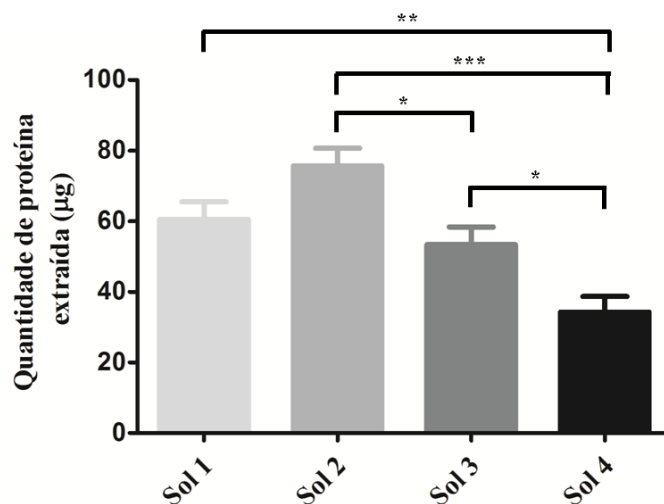


Figura 4.1. Quantidade de proteínas extraídas de 5×10^7 de formas tripomastigotas sanguíneas pelas 4 soluções de lise ($n = 10$). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Os resultados de significância estatística foram gerados pela combinação dos testes *one-way* ANOVA e comparação múltipla de Turkey (*post-hoc*).

A fim de verificar diferenças no conteúdo proteico extraído pelas quatro soluções de lise, as amostras foram inicialmente analisadas por eletroforese. O primeiro ensaio consistiu em géis unidimensionais, nos quais foram aplicadas três amostras biológicas independentes, representadas por A, B e C (**Figura 4.2**). Ao comparar o perfil eletroforético dos extratos adquiridos com as 4 soluções de lise a partir de um mesmo conjunto de formas tripomastigotas sanguíneas, foi observada a presença de bandas correspondentes em todas as extrações, de modo que não foi possível associar um padrão de migração único de acordo com a solução de lise utilizada na extração. A análise do perfil das amostras extraídas com as mesmas soluções de lise demonstrou uma variação entre as replicatas biológicas. No entanto, determinadas bandas foram detectadas em todos os extratos. Interessantemente, as extrações com a solução 4 apresentaram um perfil de banda mais intenso, inclusive na porção inferior do gel. Devido à baixa resolução dessa técnica na separação proteica de amostras complexas, em seguida foram feitos géis bidimensionais com ampla faixa de pH (3 a 10) (**Figura 4.3**).

Esses apresentaram cadeias polipeptídicas ao longo de toda a extensão de massa molecular e intervalo de pH, de forma que foram detectadas manchas em comum aos quatro extratos.

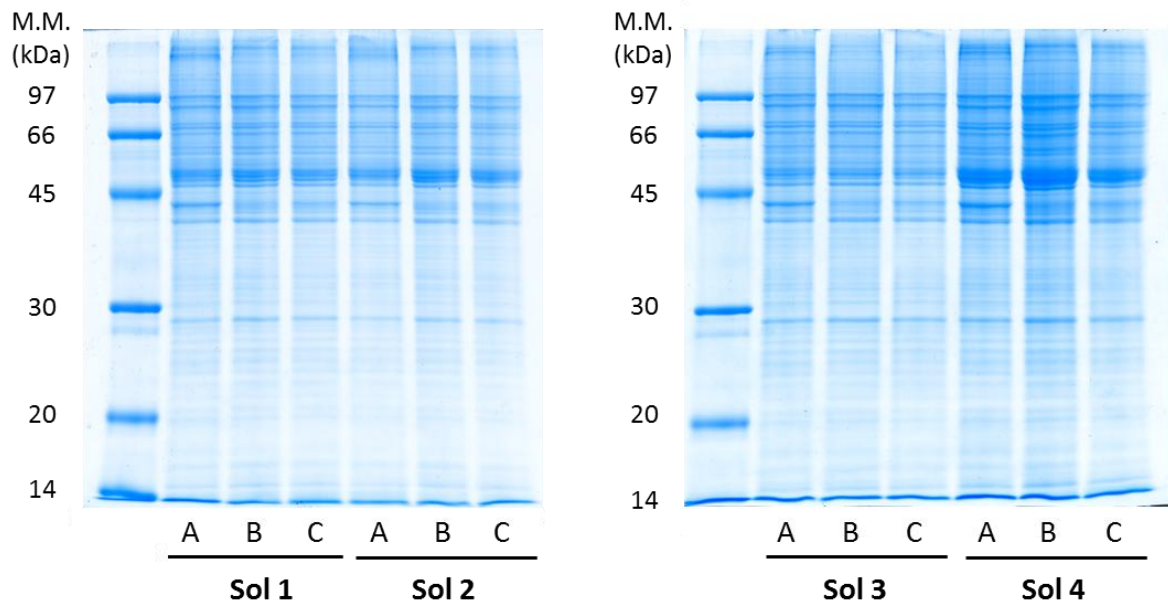


Figura 4.2. Padrão de bandas das amostras biológicas independentes (A, B e C) extraídas com as 4 soluções de lise. Cinco microgramas de proteína de cada extração foram submetidos a SDS-PAGE corado por Coomassie coloidal. M.M.: massa molecular.

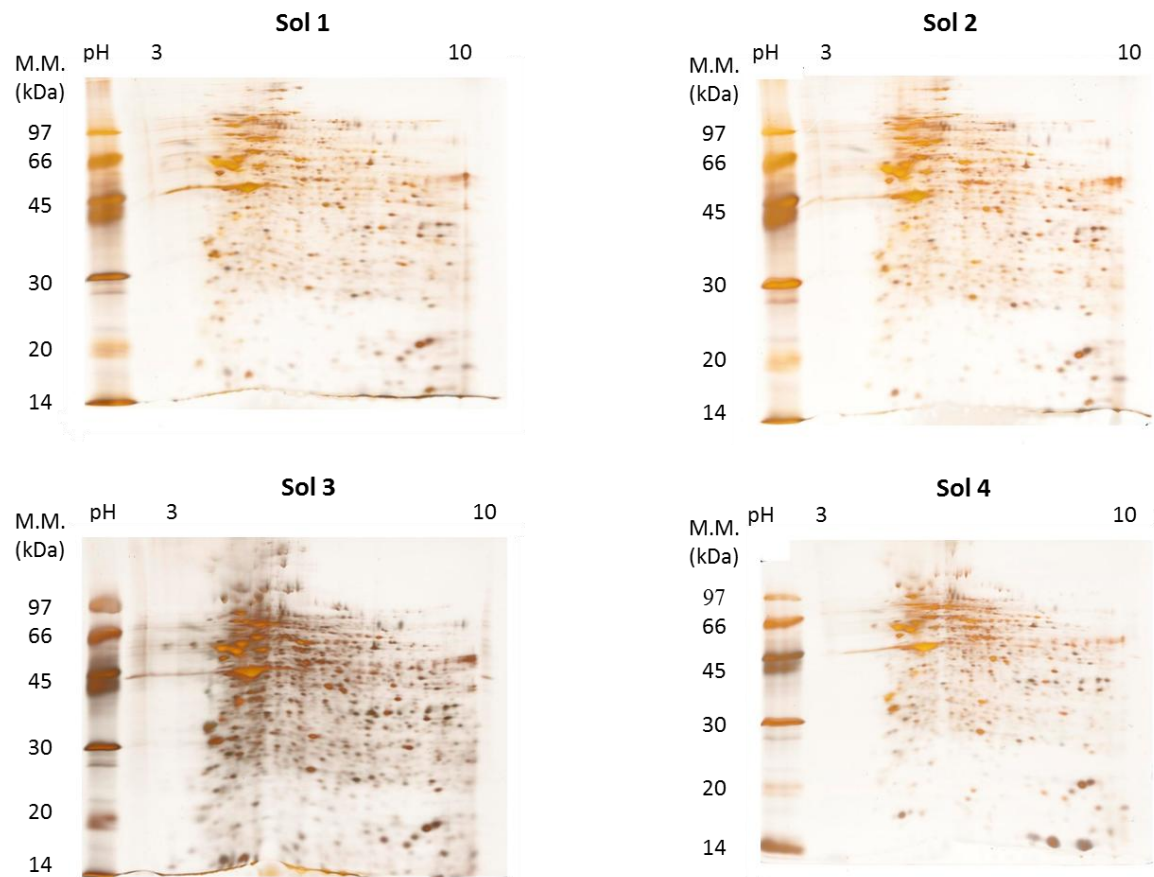


Figura 4.3. Perfil proteico dos extratos de cada solução de lise obtidos a partir de uma mesma replicata biológica. Géis bidimensionais corados por impregnação por prata (20 μ g de proteína). M.M.: massa molecular.

Dessa forma, para determinar a composição proteica e melhor avaliar o nível de semelhança entre as amostras, extrações de quatro replicatas biológicas (A, B, C e D) foram analisadas por LC-MS/MS. A partir da ferramenta *Búzios* integrada ao *Patternlab*, as amostras foram comparadas e agrupadas mediante a correspondência entre os peptídeos identificados (**Figura 4.4**). As extrações de cada amostra biológica, especialmente as soluções 1 e 2, mantiveram-se próximas, caracterizando um grupo por replicata. Isso sugere relação entre os extratos proteicos das diferentes soluções de lise e, paralelamente, corrobora a heterogeneidade das replicatas biológicas observada anteriormente por eletroforese. Frente à distribuição discrepante das extrações da amostra B (**Figura 4.4**), esta não foi incluída nas análises posteriores.

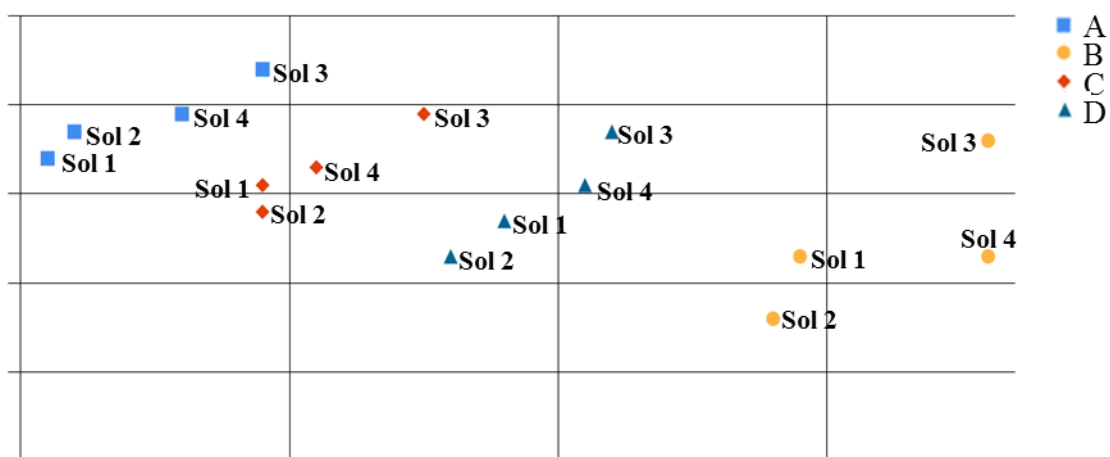


Figura 4.4. Agrupamento, utilizando a ferramenta Buzios do software PatternLab (Aquino *et al.*, 2012), dos resultados da análise por espectrometria de massas das extrações com as quatro soluções de lise. Quatro replicatas biológicas independentes (A, B, C e D) foram submetidas à extração proteica com as diferentes soluções de lise (Sol. 1 a 4), digeridas com tripsina, dessalinizadas e analisadas por nanoLC acoplado a nanoESI-LTQ/Orbitrap XL. Cada replicata biológica foi analisada em triplicata técnica seguida de identificação das proteínas e quantificação por contagem espectral. A análise por Buzios se baseou em uma abordagem de *metric multidimensional scaling* (utilizando um algoritmo ainda não publicado) para visualizar, em um plano bidimensional, o nível de similaridade entre resultados de amostras individuais constantes do nosso conjunto amostral.

As replicatas A e D apresentaram maior variabilidade na quantidade de proteínas identificadas em cada solução de lise; entretanto, não foi observado um padrão entre as soluções (**Figura 4.5a**). Em todos os extratos foram identificadas mais proteínas de *Trypanosoma* sp., sendo as demais identificações provenientes de *Mus musculus* e *Homo sapiens* (**Figura 4.5b**). Mediante essa diferença, e sendo o nosso foco no estudo das proteínas do parasito, apenas estas foram consideradas para a realização das análises seguintes. Destas, 40,4% foram extraídas por todas as soluções de lise e cerca de 55,3% estão presentes em pelo menos três condições de extração (**Figura 4.6**). Os extratos da solução 4 apresentaram a maior quantidade de proteínas exclusivas identificadas (104), ao passo que as soluções 1, 2 e 3 obtiveram valores próximos.

Por último, os perfis proteicos das replicatas A, C e D foram avaliados em conjunto, de acordo com a solução de lise utilizada na extração. Houve pouca diferença no nível de similaridade entre as amostras de cada solução, sendo o menor grau de reprodutibilidade observado nos extratos da solução 4 (**Figura 4.7**). A heterogeneidade proteica das soluções 1,

2, 3 e 4 variou em torno de 33, 30, 32 e 34%, respectivamente (**Figura 4.7**). A replicata D resultou em amostras com maiores valores de proteínas exclusivas, sendo a principal diferença observada na comparação contra os extratos da solução 1.

Além das soluções não diferirem quanto à quantidade de proteínas de *Trypanosoma* sp. identificadas (**Figura 4.5b**), proporcionalmente, o máximo de proteínas presentes em somente um extrato foi de 9,6%, o que demonstra uma baixa diversidade entre as populações extraídas por cada solução de lise (**Figura 4.6**). Sendo assim, a escolha da solução a ser utilizada nos experimentos seguintes teve como principal critério a dosagem de proteínas, pela qual foi constatado o maior rendimento de extração pela solução 2. Outras características também favoreceram a seleção dessa solução, como a maior reprodutibilidade em relação às populações proteicas extraídas a partir de amostras independentes (**Figura 4.7**), o seu pH, que não confere um fator de desnaturação proteica, e a ausência de sacarose associada à presença de sais. Essa combinação pode evitar a interação inespecífica, principalmente de glicoproteínas, com a matriz das *beads* magnéticas usadas nos ensaios posteriores. Estas são constituídas por agarose, à qual pode se ligar de maneira indiscriminada oligossacarídeos.

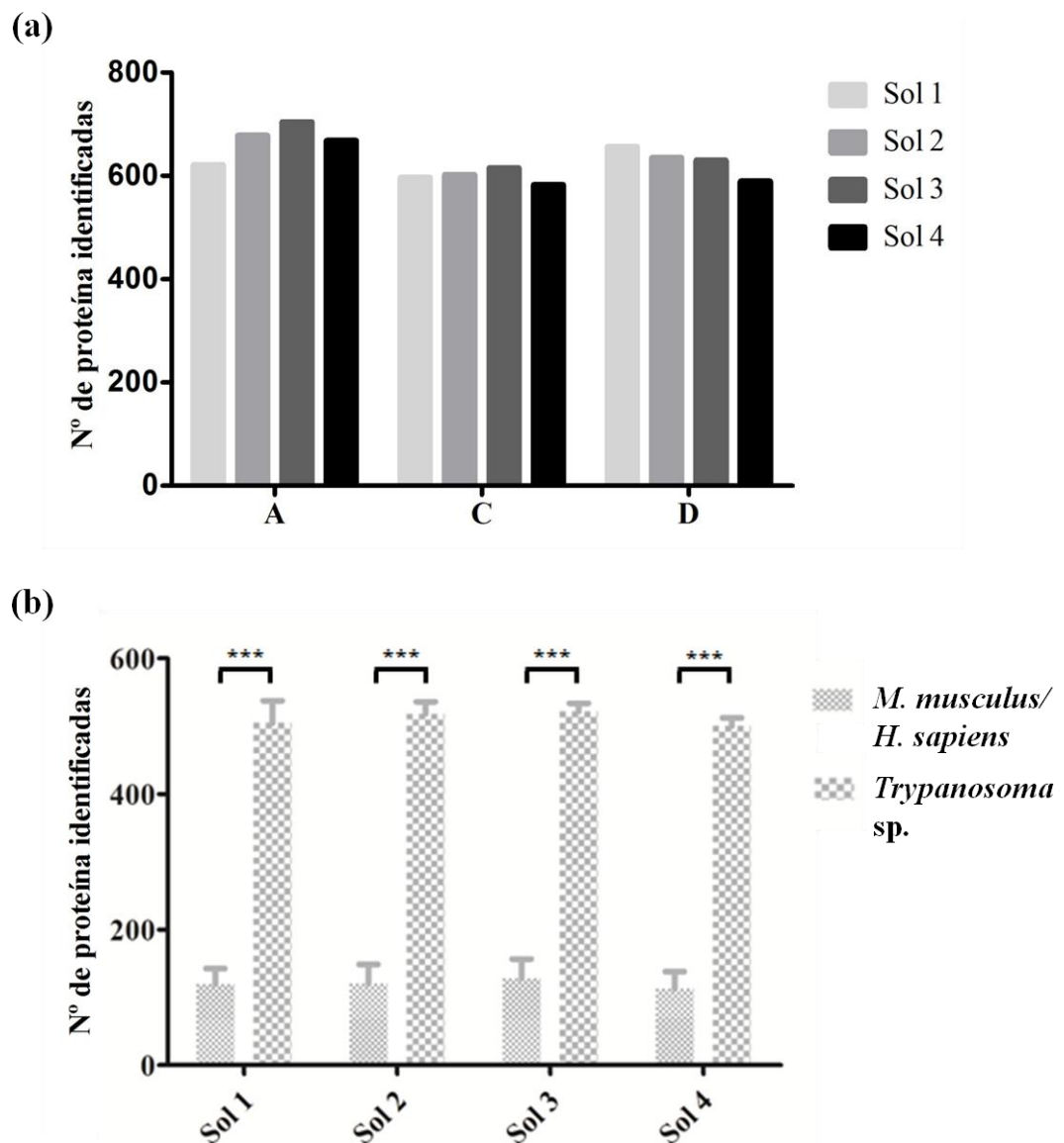


Figura 4.5. (a) Quantidade total de proteínas identificadas nas extrações das replicatas biológicas A, C e D. (b) Discriminação do número de identificações correspondentes a *Trypanosoma* sp., *Mus musculus* e *Homo sapiens* em cada solução de lise (n=3). *** $p < 0,001$. Os dados foram analisados estatisticamente pelo teste *two-way* ANOVA seguido do Bonferroni (*post-hoc*).

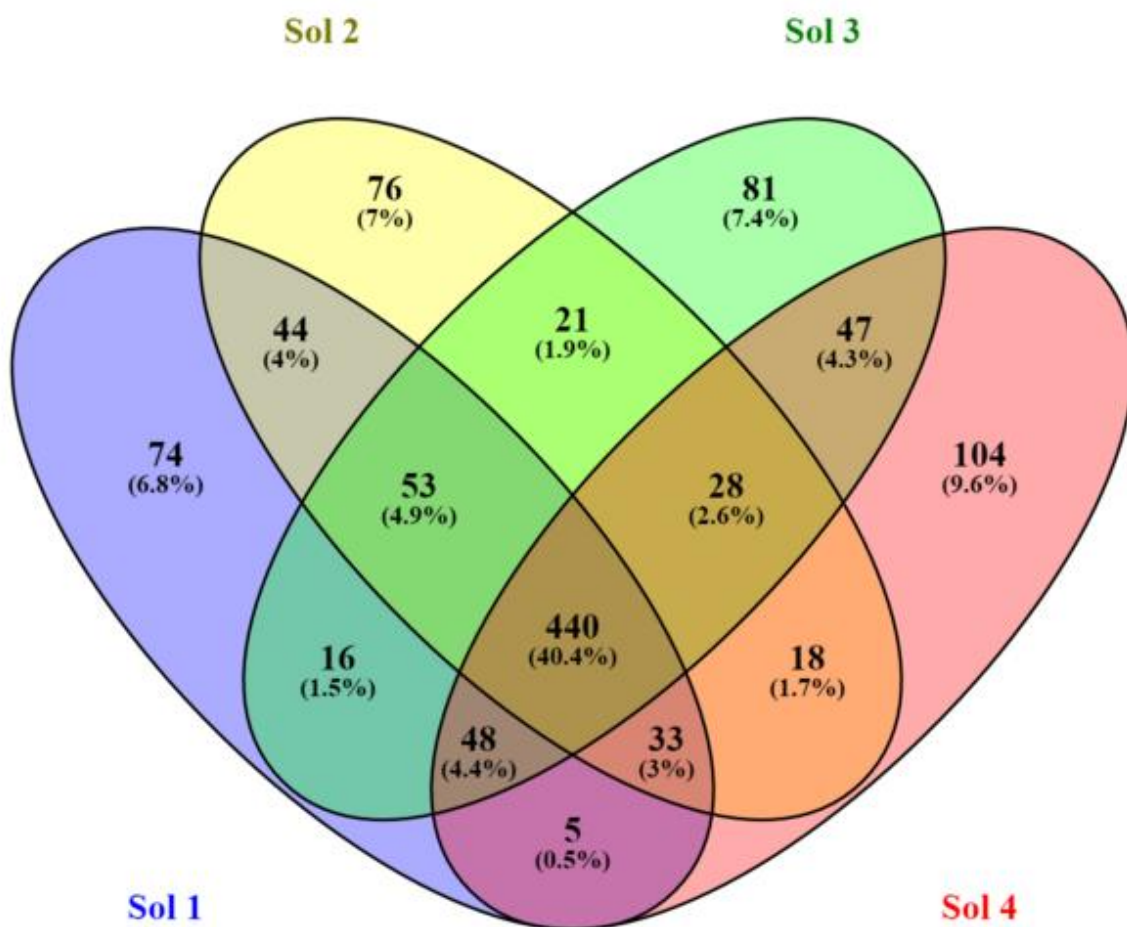


Figura 4.6. Nível de similaridade entre as populações proteicas extraídas com cada solução de lise. Diagrama de Venn construído a partir das proteínas de *Trypanosoma* sp. identificadas (n = 3; amostras biológicas A, C e D).

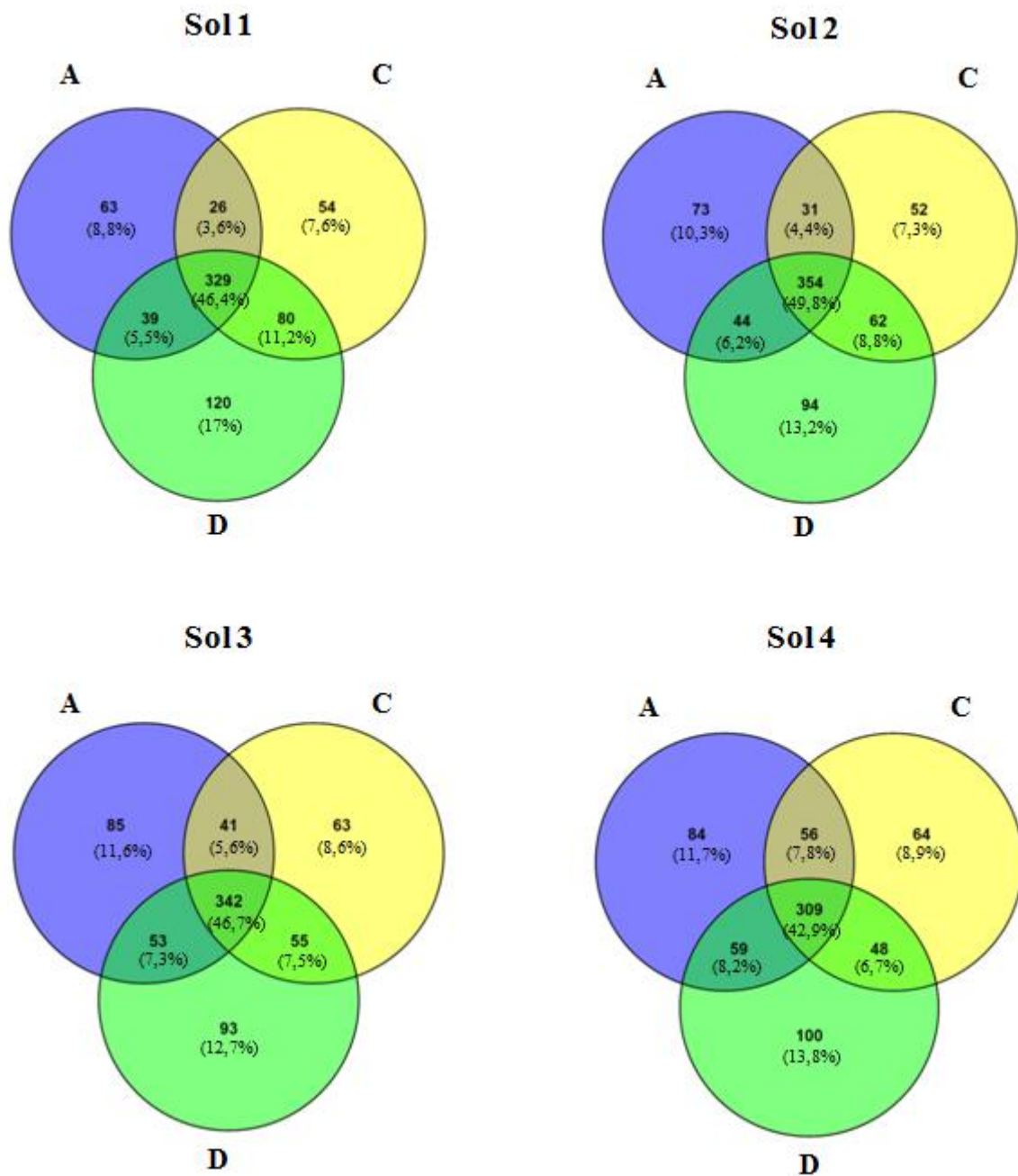


Figura 4.7. Variação da diversidade proteica gerada pela extração com cada solução de lise a partir de amostras biológicas distintas (A, C e D).

4.2. Purificação de IgG humana por cromatografia

Com a amostra de um doador saudável foram realizados testes de saturação da coluna aplicando de 2,8 a 7,1 mg de proteína total do soro. Inicialmente, foram seguidas as condições de cromatografia de afinidade recomendadas pelo fabricante, de maneira que a coluna foi equilibrada com 20 mM de fosfato de sódio pH 7 e as proteínas retidas foram eluídas com 0,1 M de glicina pH 2,7 (**Figura 4.8a e b**). Neste caso, independente da quantidade de proteína

inserida no sistema, os picos correspondentes às frações adsorvidas apresentaram um arraste, sugerindo uma diferença de afinidade entre a população de proteínas ligadas à proteína G. Desta forma, foi adicionado 300 mM de NaCl ao tampão de equilíbrio a fim de eliminar interações inespecíficas com a coluna. No entanto, esta modificação gerou um pico mais arrastado (**Figura 4.8c e d**). Por último, foi feita uma corrida cromatográfica mantendo a condição de equilíbrio inicial da coluna, mas reduzindo o pH do tampão de eluição para 2,1. Este foi capaz de dessorver o analito com maior eficiência, resultando em um pico simétrico e estreito (**Figura 4.8e**).

Apesar das mudanças dos picos eluídos em cada condição (**Figura 4.8**), não houve diferença expressiva no rendimento do analito em relação à quantidade de proteína total aplicada, variando de 10,40 a 14,32%, de forma que, em todas as corridas, menos de 1% da capacidade de ligação nominal da coluna foi atingida. As frações retidas nas diferentes condições cromatográficas apresentaram o mesmo padrão de bandas em SDS-PAGE (**Figura 4.8f**), pelo qual foi possível inferir um enriquecimento de imunoglobulinas mediante a maior intensidade das bandas com mobilidades eletroforéticas compatíveis com as cadeias leve (23 kDa) e pesada (50-60 kDa) (**Figura 4.8f**). Devido à semelhança das frações coletadas, a condição de eluição com pH mais ácido foi definida como padrão para a purificação de IgG das demais amostras por cromatografia de afinidade com coluna de proteína G.

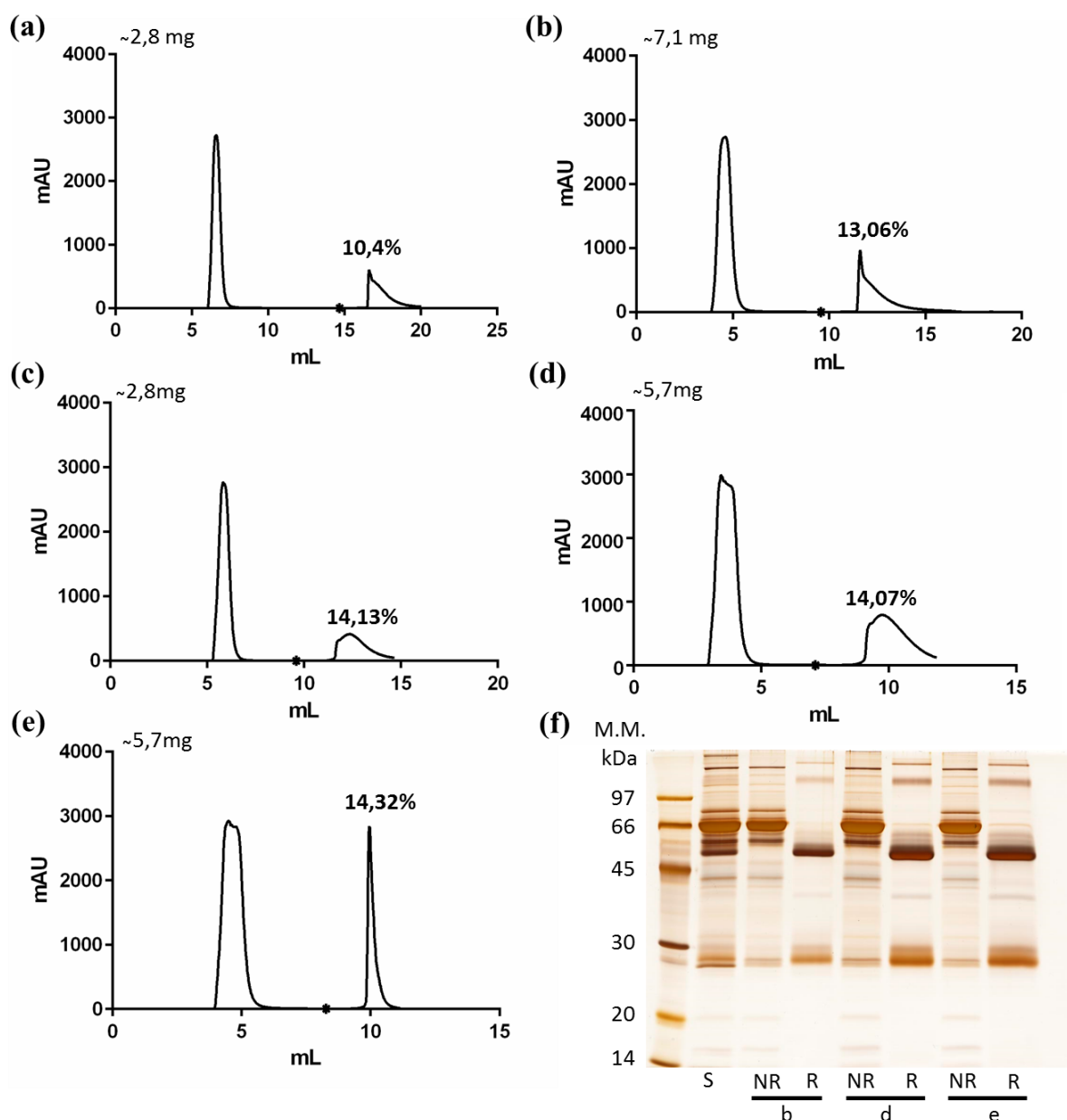


Figura 4.8. Purificação de IgG de soro humano (S) por cromatografia de afinidade com coluna de proteína G. Foram aplicadas diferentes quantidades de proteína total em três condições de corrida distintas. **(a) (b)** A coluna foi equilibrada com 20 mM de fosfato de sódio pH 7 e a eluição da fração retida (R) foi realizada com 0,1 M de glicina pH 2,7; **(c) (d)** Cromatogramas obtidos a partir da adição de 300 mM de NaCl no tampão de entrada do sistema. **(e)** Perfil cromatográfico da eluição com tampão 0,1 M de glicina pH 2,1 e tampão de entrada como em **(a)**. **(f)** SDS-PAGE corado por impregnação por prata das frações coletadas nas cromatografias representadas em **(b)**, **(d)** e **(e)**. A entrada do tampão B com 100% de concentração no sistema está indicado pelo asterisco (*) no eixo x. M.M.: massa molecular; NR: fração não-retida na coluna.

Como foram observadas bandas fora das faixas de massas moleculares esperadas, a fração enriquecida com IgG obtida a partir da eluição com pH 2,1 foi aplicada em uma coluna de exclusão molecular para verificar a ocorrência de agregação proteica e a presença de contaminantes. O pico principal observado no cromatograma foi detectado com um volume de eluição de 12,66 mL, o que nesta coluna é compatível com o volume de eluição esperado para moléculas de IgG monoméricas. Além disso, as seis frações referentes à eluição deste analito foram coletadas. A análise por SDS-PAGE destas frações resultou em um padrão de bandas similar à amostra de origem (**Figura 4.9a e b**), descartando a utilidade da cromatografia de exclusão molecular para aumentar o grau de homogeneidade de nosso preparado de IgG.

Para identificar os possíveis contaminantes, a fração dessorvida com pH 2,1 foi aplicada em SDS-PAGE, sendo as cadeias polipeptídicas detectadas excisadas para posterior análise por MALDI-TOF/TOF (**Figura 4.10**). Esta resultou na identificação de 12 *clusters* de proteínas distintos (**Tabela 4.1**), dentre as quais as cadeias pesadas e leves de IgG nas bandas mais intensas nas faixas entre 66-45 kDa e 30-20 kDa, respectivamente. Os dois subtipos de cadeia leve, λ e κ , foram identificados. Com exceção da albumina e da queratina, contaminações inerentes à amostra e à manipulação, respectivamente, todas as proteínas apresentam domínios de imunoglobulina-símile. Adicionalmente, IgG de um paciente cardiopata em estágio C foram purificadas e analisadas no espectrômetro de massas *Q Exactive* seguindo a abordagem *shotgun*. Cerca de 22% do número de proteínas identificadas não corresponderam à IgG. Entre essas populações, estão proteínas do sistema complemento, haptoglobina, apolipoproteína; assim como na análise anterior, também foram detectadas queratina e albumina. Com base na contagem de espectros, cada uma dessas proteínas apresentou abundância relativa menor que 0,005 (NSAF), de modo que, no total, a quantidade de contaminantes presentes na fração enriquecida representou aproximadamente 3%. Portanto, estes dados sugerem que a cromatografia de afinidade com coluna de proteína G possibilita atingir um rendimento de purificação de IgG de aproximadamente 97 %.

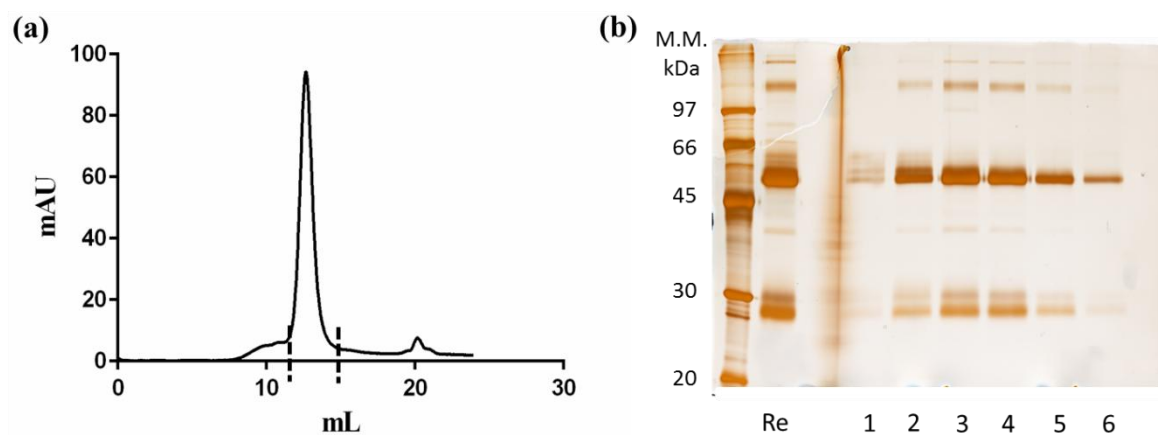


Figura 4.9. (a) Cromatografia de exclusão molecular de 200 μ g de proteína obtidos na cromatografia de afinidade a partir da dessorção das moléculas retidas na coluna de proteína G com 0,1 M de glicina pH 2,1 (R_e). (b) SDS-PAGE corado por impregnação por prata das frações coletadas sequencialmente na área delimitada pelas linhas tracejadas no cromatograma. MM: massa molecular.

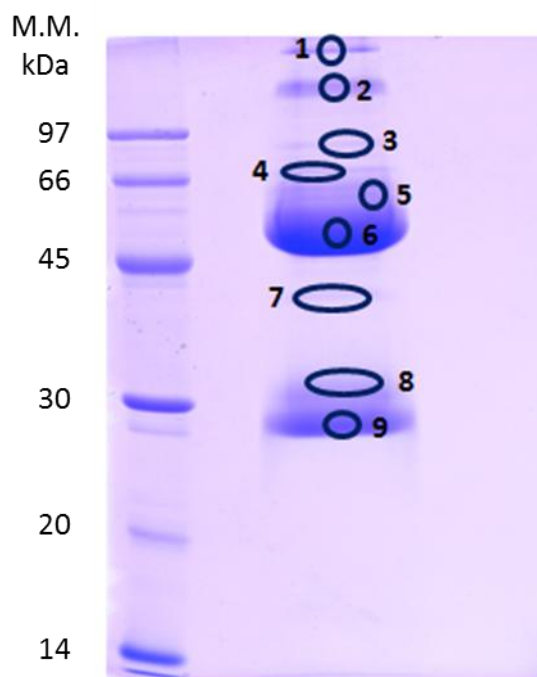


Figura 4.10. SDS-PAGE corado por azul de Coomassie R da fração ligada coletada a partir da dessorção com pH 2,1 (30 μ g). Estão destacadas em azul as bandas que foram excisadas e tripsinizadas para posterior análise por MALDI-TOF/TOF. M.M.: massa molecular.

Tabela 4.1. *Clusters* de proteínas identificadas por MALDI-TOF/TOF a partir da fração enriquecida em IgG obtida por cromatografia de afinidade. Prob: probabilidade; Cob: cobertura de sequência.

Banda	Proteína	Entrada Uniprot	Prob (%)	Nº de peptídeos únicos	Cob (%)	M.M. (kDa)
1	<i>Myosin-reactive immunoglobulin heavy chain variable region (Fragment) (IPI00384392)</i>	Q9UL72	100	1	16,10	12,87
1	<i>Cluster of cDNA FLJ78387 (IPI00876888)</i>	A8K008	100	1	4,87	51,59
2	<i>Cluster of FLJ00385 protein (Fragment) (IPI00168728)</i>	Q8NF17	100	1	2,16	56,11
2	<i>Cluster of IGL@ protein (IPI00154742)</i>	Q8N355	100	1	6,41	24,79
2	<i>Cluster of cDNA FLJ78387 (IPI00876888)</i>	A8K008	100	3	10,20	51,59
3	<i>Cluster of Full-length cDNA clone CSODD006YL02 of Neuroblastoma of Homo sapiens (IPI00479708)</i>	Q86TT1	100	8	21,10	41,27
3	<i>Cluster of Myosin-reactive immunoglobulin heavy chain variable region (Fragment) (IPI00384392)</i>	Q9UL72	100	1	16,10	56,11
4	<i>Cluster of FLJ00385 protein (Fragment) (IPI00168728)</i>	Q8NF17	100	1	3,73	56,11
4	<i>Cluster of Uncharacterized protein (IPI00022434)</i>	P02768	100	6	12,30	71,70
5	<i>Cluster of FLJ00385 protein (Fragment) (IPI00168728)</i>	Q8NF17	100	5	13,60	56,11
6	<i>Cluster of FLJ00385 protein (Fragment) (IPI00168728)</i>	Q8NF17	100	1	3,14	56,11

6	<i>Cluster of Myosin-reactive immunoglobulin heavy chain variable region (Fragment) (IPI00384392)</i>	Q9UL72	100	1	9,32	12,87
6	<i>Cluster of cDNA FLJ78387 (IPI00876888)</i>	A8K008	100	5	20,80	51,59
7	<i>Cluster of FLJ00385 protein (Fragment) (IPI00168728)</i>	Q8NF17	100	2	3,14	56,11
7	<i>Cluster of Keratin, type II cytoskeletal 1 (IPI00220327)</i>	P04264	100	2	3,42	66,04
7	<i>Cluster of cDNA FLJ78387 (IPI00876888)</i>	A8K008	100	6	20,80	51,59
8	<i>Cluster of Ig kappa chain V-IV region Len (IPI00387120)</i>	P01625	100	2	23,70	12,64
8	<i>Cluster of Ig lambda chain V-IV region Hil (IPI00382440)</i>	P01717	100	1	17,80	11,51
8	<i>Cluster of IGK@ protein (IPI00784985)</i>	Q6PJF2	100	2	14,90	25,52
8	<i>Cluster of IGL@ protein (IPI00154742)</i>	Q8N355	100	3	20,90	24,79
9	<i>Cluster of Ig kappa chain V-IV region Len (IPI00387120)</i>	P01625	100	2	23,70	12,64
9	<i>Cluster of Rheumatoid factor D5 light chain (Fragment) (IPI00816799)</i>	A0N5G5	99,4	1	15,30	12,76
9	<i>Cluster of IGK@ protein (IPI00784985)</i>	P04206	100	5	31,20	25,52

Ao término da padronização, as IgG presentes nos soros de indivíduos saudáveis e pacientes selecionados foram purificadas a partir de 4 mg de proteínas totais aplicadas no sistema. Todas as frações enriquecidas em anticorpos apresentaram padrão de migração em SDS-PAGE semelhantes. Entretanto, pode ser observada uma diferença de intensidade e proporção de bandas correspondentes (**Figura 4.11a**). Com exceção de duas amostras, os soros resultaram em rendimentos de IgG próximos em cada condição. Os controles e

pacientes cardiopatas em estágio B1 apresentaram quantidades próximas de anticorpos purificados, porém com uma pequena redução em relação às demais classificações clínicas (**Figura 4.11b**).

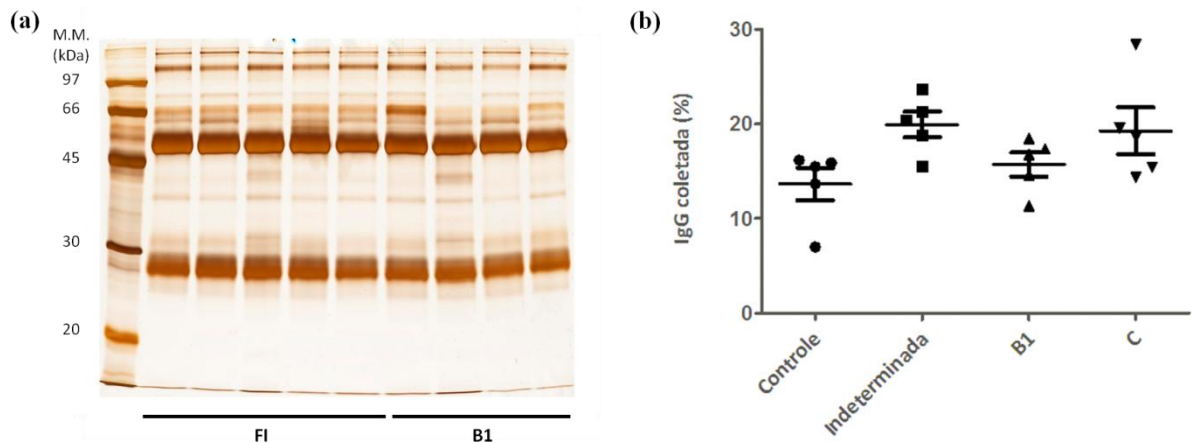


Figura 4.11. Frações enriquecidas em IgG obtidas por cromatografia de afinidade. **(a)** Gel representativo do perfil eletroforético (2 μ g de proteína) das amostras purificadas a partir do soro de pacientes classificados em diferentes estágios da doença. SDS-PAGE corado por impregnação por prata. **(b)** Rendimento da purificação de IgG. Os resultados foram analisados pelo teste Kruskal-Wallis em associação com o teste de comparação múltipla de Dunn (*post-hoc*). FI: forma indeterminada; B1 e C: pacientes com lesão cardíaca nos estágios B1 e C, respectivamente.

4.3. Caracterização do perfil imunorreativo por *western blot*

A reatividade dos anticorpos purificados contra proteínas de formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Y foi verificada por *western blot*. Já na titulação houve uma diferença de marcação entre as amostras controle e cardiopata estágio C (**Figura 4.12**); apenas esta apresentou reatividade (**Figura 4.12b**), de forma que a concentração de anticorpo primário a ser utilizada nos demais ensaios foi determinada a partir da amostra oriunda deste paciente, sendo de 1 μ g/mL. Na diluição de anticorpo secundário utilizada nos experimentos (1:25.000), não foi observada interação inespecífica com proteínas do parasito (**Figura 4.12**).

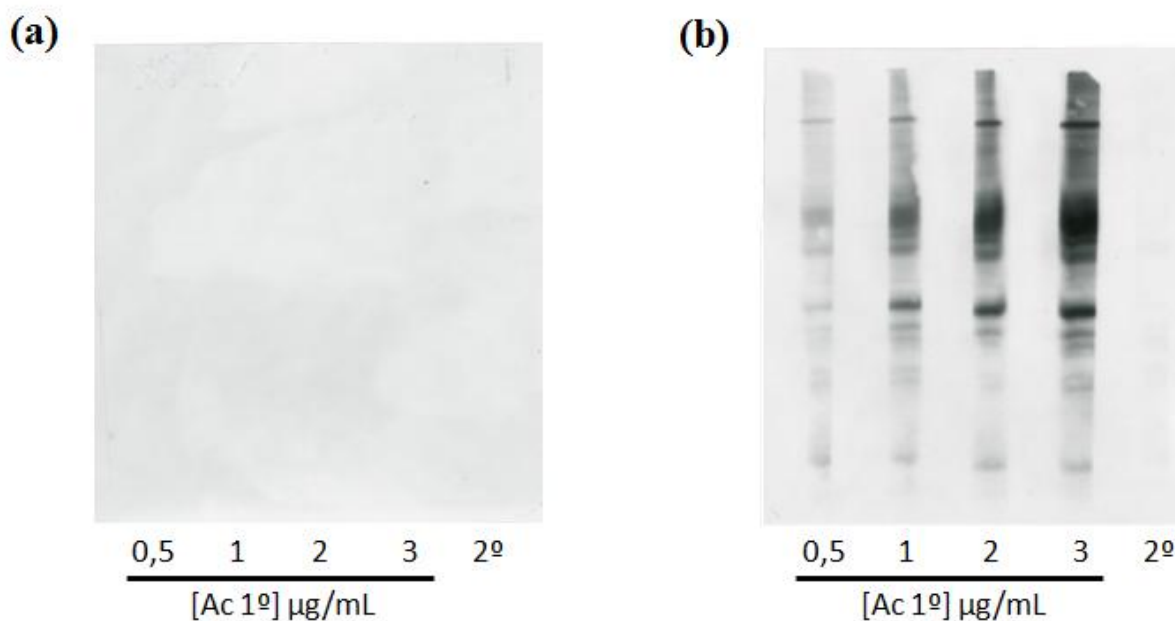


Figura 4.12. Titulação da concentração de anticorpo purificado por cromatografia de afinidade a partir de soro de um **(a)** doador saudável e de um **(b)** paciente com cardiopatia em estágio C. Ac 1º: anticorpo primário; 2º: anticorpo secundário (1:25.000). Para a realização destes ensaios, 10 µg de proteínas do parasito extraídas com a solução de lise 2 foram aplicados, por raia, em SDS-PAGE. O mesmo tempo de exposição e revelação foi seguido para os dois filmes.

Após a purificação das IgG presentes nos soros selecionados, esses anticorpos foram separados em grupos (G1 a G5) compostos por um controle e uma amostra de cada estágio da infecção (indeterminada, B1 e C). Os experimentos foram feitos seguindo esta organização, de maneira que em todos os filmes houvesse um representante das três condições clínicas e um controle, permitindo uma melhor comparação do padrão de reconhecimento proteico. Como durante a padronização da extração de proteínas foi verificada uma variabilidade em torno de 30% entre as amostras biológicas independentes, em todos os géis foram aplicadas proteínas oriundas do mesmo extrato proteico do parasito.

Os controles apresentaram reatividade inespecífica, porém com intensidade mais baixa em relação às demais condições (**Figura 4.13**). Em todos os grupos, as amostras purificadas de pacientes cardiopatas em estágio B1 e C foram reativas às proteínas de formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Y. O mesmo foi observado para IgG oriundas de indivíduos do período indeterminado, porém em menor escala pela amostra contida no grupo 2 (G2). Houve variação quanto ao perfil de marcação, não sendo possível estabelecer um padrão de acordo com a classificação da amostra aplicada. Entretanto, bandas em torno de 97,

45 e 30 kDa foram reconhecidas com maior frequência, geralmente apresentando alta intensidade. Com exceção do G2, as amostras reativas dos demais grupos foram capazes de reconhecer cadeias polipeptídicas ao longo de praticamente toda a extensão de massa molecular (**Figura 4.13**).

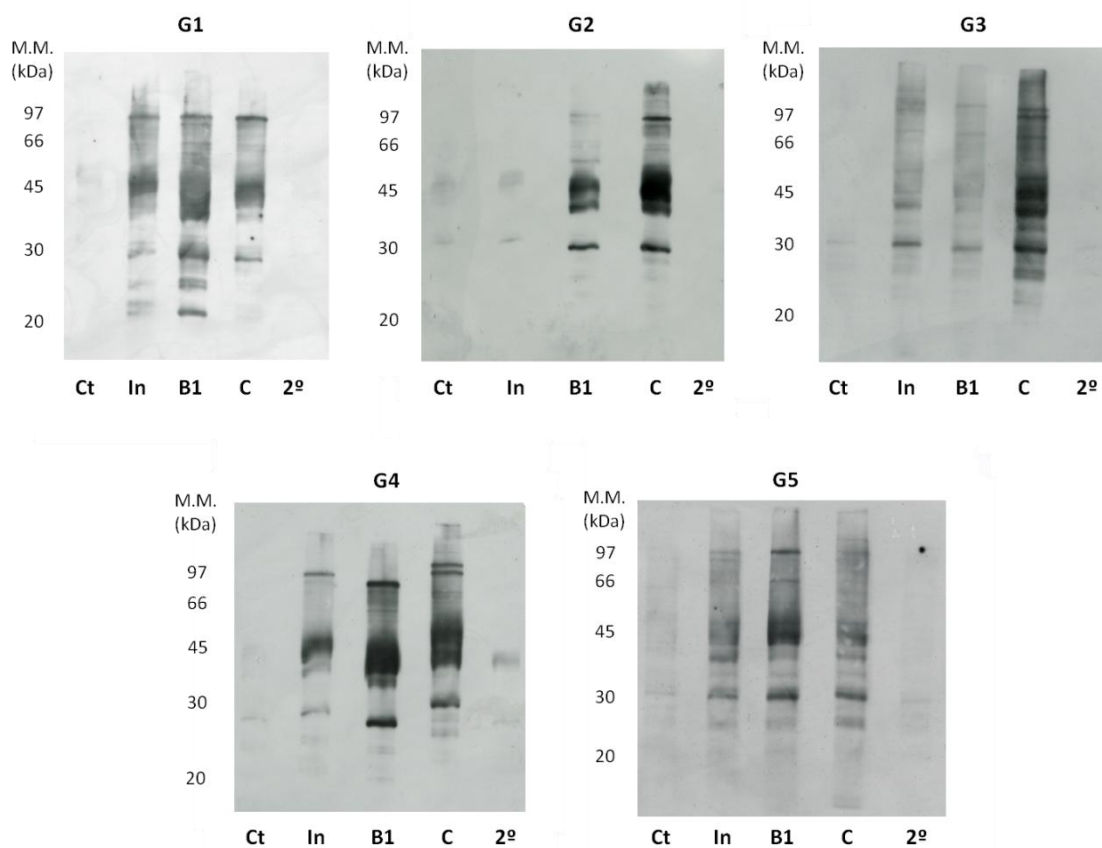


Figura 4.13. Imunorreatividade dos anticorpos purificados às proteínas de formas tripomastigotas sanguíneas. G: grupo; Ct: controle; In: período indeterminado; 2º: anticorpo secundário; M.M.: massa molecular. Assim como no ensaio de titulação, 10 µg de proteínas do parasito extraídas com a solução de lise 2 foram aplicados (por raia) em SDS-PAGE para posterior transferência para membrana de nitrocelulose.

4.4. Padronização da imunoprecipitação por *bead* magnética

Ao longo deste processo, foram avaliadas três abordagens experimentais para a imobilização dos anticorpos nas *beads* magnéticas (**Figura 4.14**). Em todos os ensaios, a quantidade de IgG aplicada foi determinada com base na capacidade de ligação do volume de *bead* (13 µg/µL) utilizado (**Figura 4.14**). No entanto, para otimizar o reconhecimento e detecção de proteínas imunorreativas do *T. cruzi*, para cada abordagem foram avaliadas diferentes relações de IgG e proteínas totais do parasito, representadas pela proporção

anticorpo:extrato proteico (m/m) (**Figura 4.14**). Assim, os resultados das imunoprecipitações foram expostos identificando as respectivas condições experimentais de quantidade de IgG e proporção de proteínas do *T. cruzi* de forma similar ao exemplificado em destaque na **figura 4.14**.

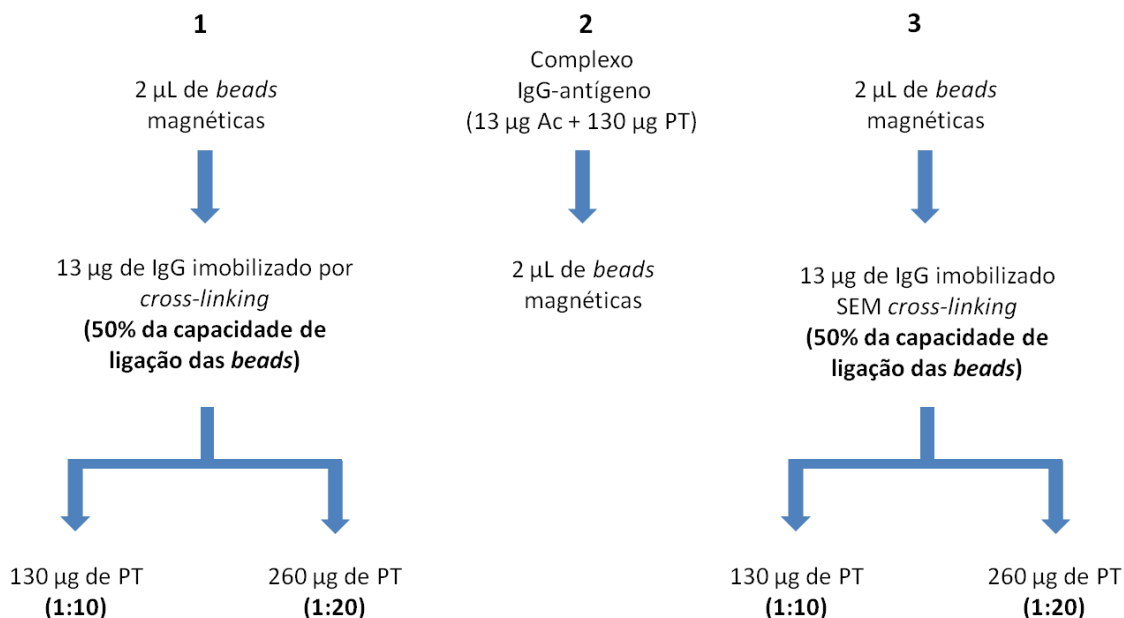


Figura 4.14. Esquema experimental detalhando as quantidades de anticorpo (Ac) e proteínas totais do *T. cruzi* (PT) aplicadas aos ensaios de imunoprecipitação realizados a partir de diferentes abordagens de imobilização de IgG.

A primeira etapa no processo de padronização consistiu em determinar o tempo de incubação necessário para permitir a interação entre os anticorpos purificados e as proteínas G ligadas às *beads* magnéticas. Esse experimento foi realizado com 2 µL de *bead*, trabalhando com 50% da sua capacidade de ligação. Desta forma, 13 µg de IgG purificadas foram adicionados e incubados à temperatura ambiente por 1, 2 e 4 h. O sucesso da interação foi avaliado a partir da detecção de cadeias polipeptídicas presentes nas frações de anticorpos não-retidos submetidas à eletroforese e, posteriormente, à densitometria; neste caso específico, apenas 1 µg da amostra de IgG original foi aplicado no mesmo gel. Com base nos resultados de densitometria (**Figura 4.15**), foi calculada a quantidade relativa de IgG não-retida, correspondendo a 0,1, 0,05 e 0,01 µg nos intervalos de 1, 2 e 4 h, respectivamente. Como o menor tempo de incubação já apresentou rendimento acima de 99%, este foi escolhido para dar continuidade aos demais ensaios.

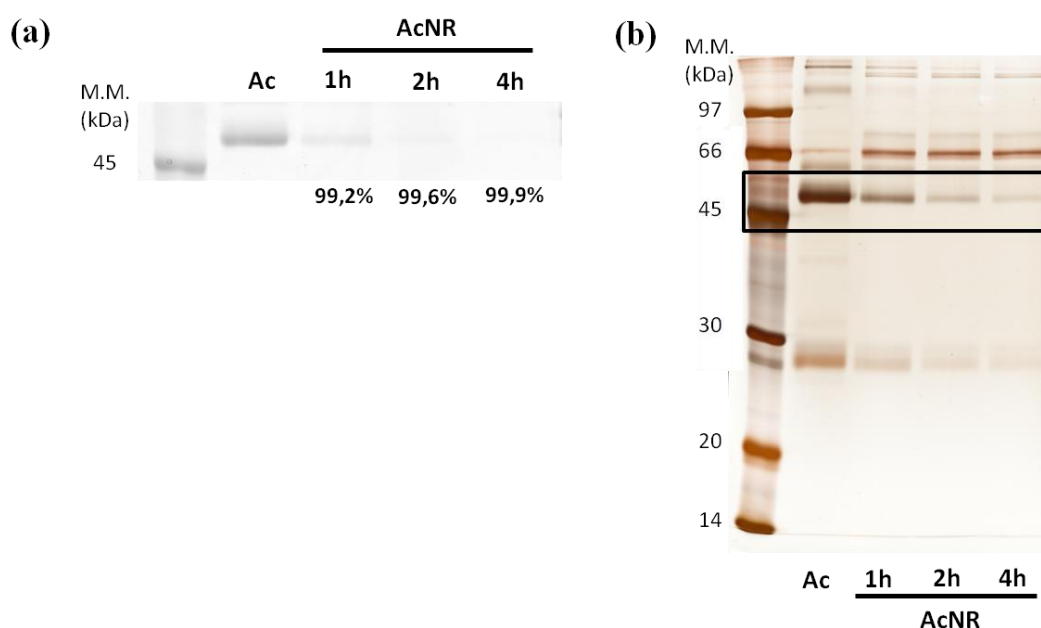


Figura 4.15. (a) Intensidade das bandas de cadeias pesadas presentes no gel submetido à análise de densitometria. Abaixo das respectivas amostras, estão indicados os percentuais de IgG retidos nas *beads* magnéticas. (b) De forma complementar, o mesmo gel foi corado por impregnação por prata devido à baixa intensidade da detecção. As bandas em destaque correspondem às cadeias pesadas das IgG, selecionadas para a realização da densitometria. M. M.: massa molecular; Ac: anticorpo presente na amostra purificada; AcNR: fração de anticorpo não-retido coletado no ensaio de imunoprecipitação.

Mediante a possibilidade de interação inespecífica das proteínas do *T. cruzi* com a matriz das *beads* foram realizados ensaios na ausência de anticorpos, a fim de verificar a necessidade de adicionar uma etapa de *pre-clearing* nas diferentes abordagens empregadas. Esta foi descartada, uma vez que não foram detectadas bandas nas frações eluídas, independente da quantidade de proteína total de *T. cruzi* aplicada ou da metodologia seguida (Figuras 4.16a, 4.17a, 4.18a e c).

Com o objetivo de diminuir a complexidade do conteúdo proteico eluído, no início da padronização, os ensaios foram realizados a partir da imobilização covalente dos anticorpos às proteínas G por meio de *cross-linking* (Figura 4.14). Utilizando IgG purificadas de paciente cardiopata em estágio C e 2 μ L de *bead*, foram testadas as quantidades de IgG referentes a 10, 50 e 100 % da capacidade de ligação das *beads*. A proporção de massa proteica total do parasito a ser adicionada correspondeu a 10 (1:10) ou 20 (1:20) vezes a quantidade de anticorpo. Na análise por SDS-PAGE das frações não-retidas geradas nesses experimentos, não foi possível observar nenhuma banda. Este resultado indica uma imobilização eficiente

dos anticorpos, uma vez que esta etapa reduziu expressivamente a concentração de IgG no sobrenadante, a ponto de não serem detectadas cadeias polipeptídicas nos volumes de amostras aplicados nos géis. Apesar disso, as frações coletadas no passo de eluição não apresentaram bandas (**Figura 4.16 c e d**) detectáveis. Para verificar se a solução de extração atuou como um interferente no processo de reconhecimento de epitopos, antes de iniciar a imunoprecipitação, o tampão de extração (solução de lise 2) do *pool* de proteínas do parasito foi trocado por TBS; foram analisadas as relações de 1:10 e 1:50 de massa de anticorpos para massa de extrato proteico. Estes ensaios não apresentaram diferença no perfil eletroforético em comparação aos demais experimentos (**Figura 4.17b e c**). Diante do insucesso obtido nas imunoprecipitações com *cross-linking* e da falta de tempo para avaliar condições mais apropriadas para esta reação, esta abordagem foi descontinuada.

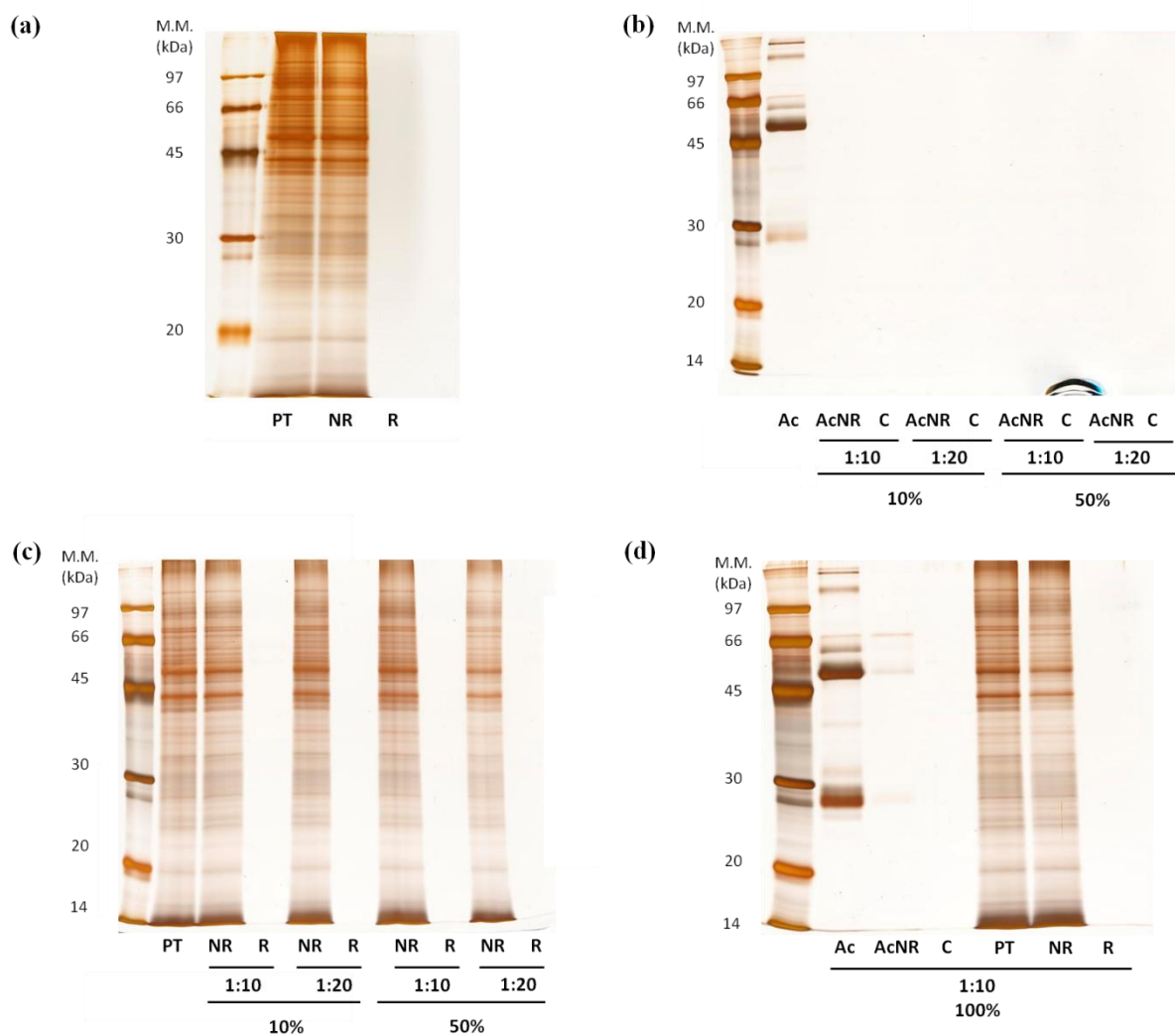


Figura 4.16. Perfil eletroforético das frações coletadas nas imunoprecipitações realizadas com *cross-linking*. (a) Ensaio de ligação inespecífica realizado na ausência de IgG; foram ensaiados 260 μ g de proteínas totais (PT) do parasito na imunoprecipitação. (b) Em todos os

experimentos, a eficiência de imobilização das IgG foi monitorada pela análise por SDS-PAGE das frações contendo anticorpos eventualmente não-retidos às *beads* magnéticas. **(c)** Ensaio realizado com 10 e 50% da capacidade de ligação das *beads* magnéticas, adicionando uma massa de proteínas totais (PT) 10 (1:10) e 20 (1:20) vezes superior à massa de IgG retidas nas *beads*. **(d)** Imunoprecipitação feita com 100% da capacidade de ligação, mantendo a proporção de 1 para 10 (m/m) de extrato proteico do parasito para IgGs imobilizadas. SDS-PAGE corado por impregnação por prata. M.M.: massa molecular. Ac: anticorpo da amostra purificada utilizada no experimento; AcNR: fração de anticorpo não-retido; C: fração eluída imediatamente após a reação de *cross-linking*; NR: fração representando as proteínas não-retidas pelos anticorpos; R: fração eventualmente retida de proteínas do parasito após imunoprecipitação.

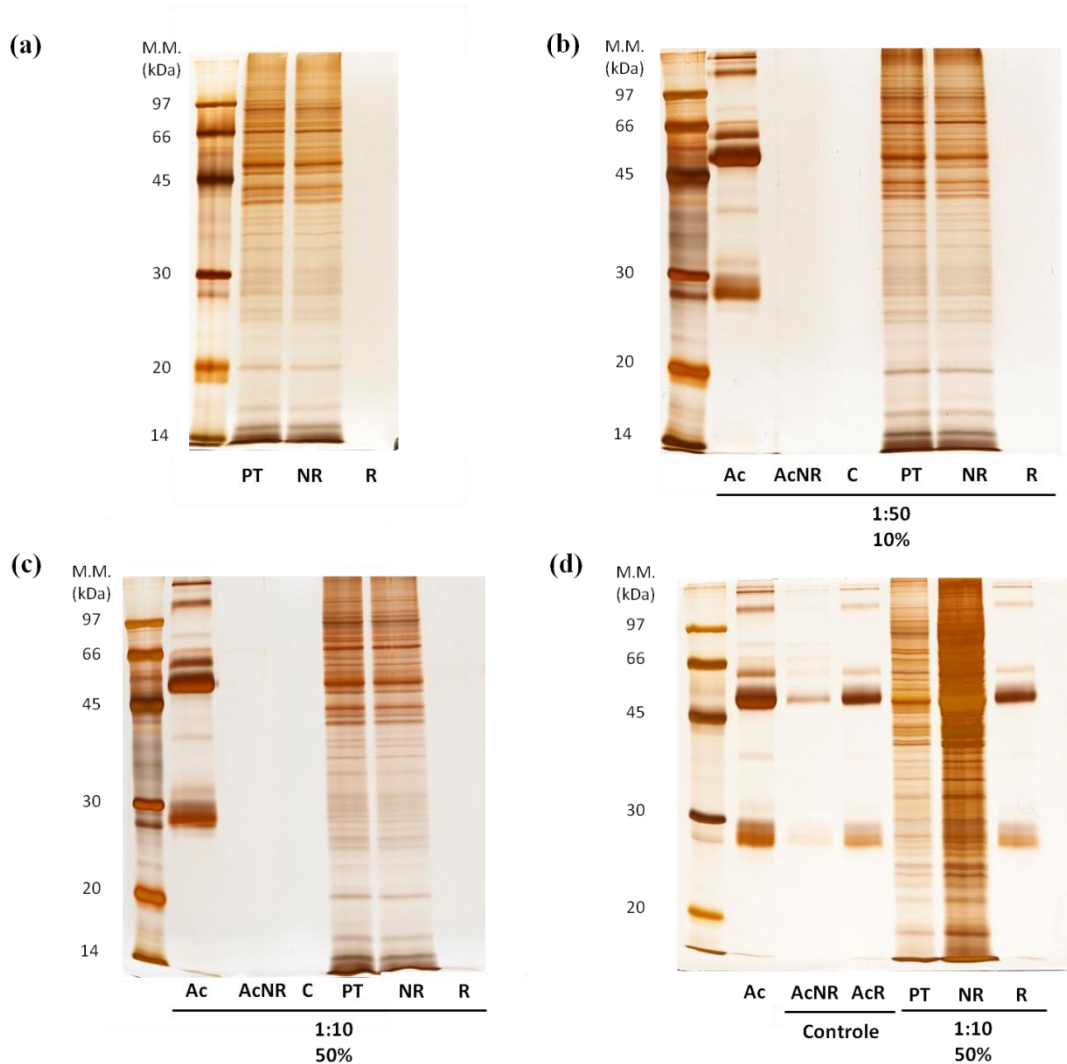


Figura 4.17. Imunoprecipitação com *cross-linking* realizada após a troca de tampão do *pool* de proteínas de formas tripomastigotas sanguíneas para TBS. **(a)** Ensaio de ligação

inespecífica realizado com 130 µg de proteínas totais do parasito (PT) na reação de imunoprecipitação. **(b)** Imunoprecipitação feita com 10% da capacidade de ligação das *beads*, adicionando ao sistema uma massa de extrato proteico 50 vezes (1:50) superior àquela de IgG. **(c)** Imunoprecipitação realizada com 50% da capacidade de ligação das *beads*, aplicando 1:10 de proteína total do parasito (PT). **(d)** Teste de imobilização de complexos antígeno-anticorpo formados anteriormente ao passo de imunoprecipitação; o controle consistiu no ensaio feito com IgG diluída em solução de lise 2. SDS-PAGE corado por impregnação por prata. AcNR: fração de anticorpo não-retida; AcR: fração de anticorpo retida; C: fração eluída imediatamente após a reação de *cross-linking*; NR: proteínas do parasito não-retidas; R: proteínas eventualmente retidas; M.M.: massa molecular.

A abordagem seguinte consistiu na formação de complexos antígeno-anticorpo anteriormente ao passo de imobilização. Entretanto, para assegurar que a solução de lise 2 não inviabilizaria a ligação do anticorpo à *bead*, primeiro foi feito um ensaio na ausência de proteínas do parasito, sendo adicionadas somente IgG diluídas no tampão de extração. Apesar de terem sido detectadas cadeias polipeptídicas na fração não-retida deste ensaio, a fração retida apresentou bandas significativamente mais intensas, sugerindo que a solução de lise 2 não ou pouco interfere nessa interação (**Figura 4.17d**). Desta forma, as IgG foram então incubadas com o extrato proteico do *T. cruzi* para posterior imobilização dos complexos. Porém, a fração eluída neste experimento apresentou perfil semelhante à fração eluída no ensaio de anticorpo imobilizado na ausência de antígenos (**Figura 4.17d**). Portanto, na condição avaliada, não foi possível detectar proteínas imunorreativas desse protozoário, o que pode ter ocorrido devido à proporção inadequada de IgG e extrato proteico do parasito ou pela não adsorção de complexos, caso estes tenham sido formados.

Uma vez que decidimos abandonar a estratégia de imobilizar covalentemente os anticorpos nas *beads* utilizando *cross-linking*, partimos para a avaliação/otimização do protocolo convencional de imunoprecipitação com estas *beads*. Inicialmente, ensaiamos o *pool* de IgG purificadas com o mesmo volume de *bead* magnética (2 µL) utilizado em ensaios anteriores, aplicando a quantidade de anticorpos referentes a 10 e 50 % da capacidade de ligação, e uma quantidade (em massa) 10 vezes (1:10) superior de proteínas do parasito, nas duas condições. No entanto, as frações retidas eluídas nestes experimentos apresentaram majoritariamente bandas correspondentes ao perfil eletroforético das cadeias polipeptídicas de IgG (**Figura 4.18b**). Ao considerar o caráter policlonal e a possibilidade das IgG reativas às proteínas do parasito apresentarem uma baixa frequência entre as populações de anticorpos

purificados neste estudo, optamos por aumentar, proporcionalmente, em 5 vezes a quantidade de IgG adicionada ao sistema de *bead* magnética, com a finalidade de ampliar o rendimento de obtenção de proteínas imunorreativas do *T. cruzi*. Para isto, foi necessário alterar o volume de *bead* para 10 µL, de forma que as condições de 50 e 100 % da capacidade de ligação corresponderam à adição de 65 e 130 µg de IgG, respectivamente. Entretanto, devido à dificuldade na obtenção de uma grande quantidade de formas tripomastigotas sanguíneas, preservar uma elevada relação de extrato proteico ante ao aumento da oferta de anticorpo seria inviável. Assim, a proporção de proteínas totais do parasito foi reduzida para aproximadamente metade (1:0,5) da quantidade (em massa) de IgG. Para potencializar a formação de complexos, a etapa de incubação foi realizada a 37 °C por 2 h. As frações retidas eluídas nestes ensaios apresentaram padrões de migração proteicos semelhantes, os quais diferiram do perfil da amostra purificada, enriquecida em IgG, pela maior quantidade de bandas em torno de 66 e 30 kDa e pela detecção de cadeias polipeptídicas na região de menor massa molecular (**Figura 4.18d**), o que apontou para a presença de diferentes populações proteicas, além dos anticorpos. Como não foi observada a ocorrência de interação inespecífica (**Figura 4.18c**), essas proteínas provavelmente foram retidas devido ao reconhecimento de epitopos, de modo a serem co-eluídas com as IgG.

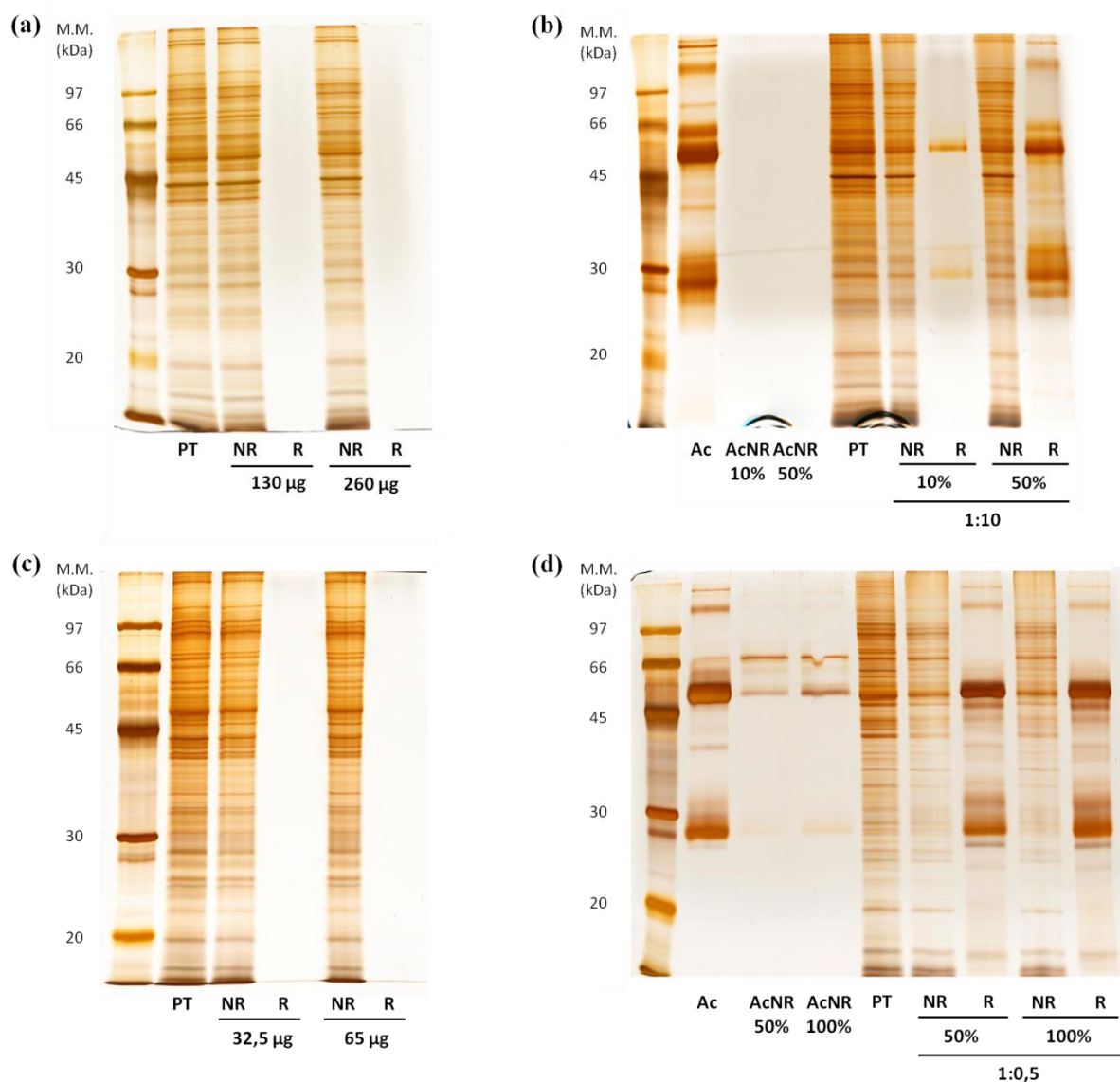


Figura 4.18. Experimentos de imunoprecipitação realizados na ausência da reação de *cross-linking*. **(a)** Ensaio de interação inespecífica feito com 2 μL de *bead* magnética, aplicando 130 e 260 μg de proteína total do *T. cruzi* (PT). **(b)** A partir de 2 μL de *beads*, foram feitos experimentos com 10 e 50 % da capacidade de ligação, seguido de adição de uma massa de extrato proteico do parasito 10 vezes (1:10) superior àquela de IgG. **(c)** Ensaio de ligação inespecífica realizados com 10 μL de *beads*; após a adição de 32,5 e 65 μg de proteínas do parasito, a etapa de incubação para a eventual interação com a matriz foi realizada a 37° C por 2 h. **(d)** Imunoprecipitações realizadas com 50 e 100% da capacidade de ligação de 10 μL de *beads*, seguido de adição de uma massa de extrato proteico do parasito equivalente à metade (1:0,5) daquela de IgG. SDS-PAGE corado por impregnação por prata. AcNR: fração de anticorpo não-retido; NR: proteínas do parasito não-retidas; R: proteínas eventualmente retidas; M.M.: massa molecular.

Para confirmar que a quantidade de anticorpo consiste no fator com maior influência sobre o rendimento de proteínas imunorreativas do *T. cruzi*, seguindo o protocolo descrito acima, 13, 65 e 130 µg de IgG foram incubados com a mesma quantidade de proteínas do *pool* do parasito (32,5 µg), de modo a acarretar em diferentes proporções de IgG para proteínas do parasito (1:2,5, 1:0,5 e 1:0,25, respectivamente). O ensaio realizado com 10% da capacidade de ligação (13 µg de IgG) apresentou a maior quantidade de anticorpo imobilizado (**Figura 4.19a**). Entretanto, mesmo diante da maior proporção de proteínas de formas tripomastigotas sanguíneas (1:2,5), na fração retida eluída foram detectadas principalmente bandas correspondentes às cadeias polipeptídicas de IgG (**Figura 4.19b**). No experimento realizado com 50% (65 µg de IgG), a eficiência de adsorção do anticorpo se manteve alta (**Figura 4.19a**) e embora a quantidade de proteínas do parasito tenha sido reduzida proporcionalmente para 1:0,5, esta relação foi suficiente para levar à detecção de cadeias polipeptídicas derivadas de proteínas imunorreativas (**Figura 4.19b**). Estas também foram observadas no volume eluído na condição de 100% (130 µg de IgG), em que a proporção do extrato proteico foi diminuída para 1:0,25 (**Figura 4.19b**). Esses resultados demonstram que, para as amostras de *T. cruzi* obtidas neste trabalho, o rendimento e, conseqüentemente, a capacidade de detecção de proteínas imunorreativas por SDS-PAGE depende primariamente da quantidade de anticorpo utilizada na imunoprecipitação. Entretanto, quanto mais próximo da capacidade nominal de ligação do volume de *beads*, maior é a chance de ocorrer impedimento estérico do reconhecimento de epitopos pelas IgG. Sendo assim, a condição de 50% da capacidade de ligação foi estabelecida como padrão nos ensaios realizados com 10 µL de *beads* magnéticas. Vale ressaltar que as frações eluídas nos ensaios feitos com 50 e 100% da capacidade de ligação apresentaram perfis de migração semelhantes entre si e ao ensaio anterior (**Figuras 4.19b e 4.18d**, respectivamente), indicando reprodutibilidade no método.

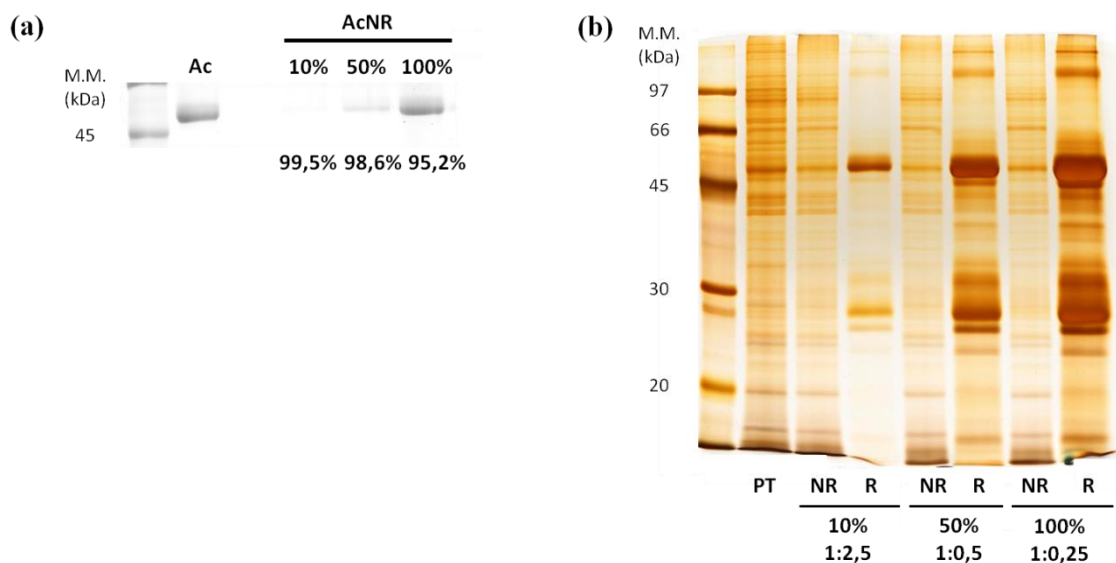


Figura 4.19. Influência da quantidade de anticorpo na capacidade de detecção das proteínas imunorreativas de formas tripomastigotas sanguíneas. **(a)** Intensidade das bandas de cadeias pesadas presentes nas frações de anticorpo não retido (AcNR) analisadas por densitometria; os valores percentuais calculados para a quantidade relativa de IgG imobilizada nas *beads* estão descritos abaixo das raias das respectivas condições avaliadas. **(b)** Perfil de migração eletroforética das proteínas não-retidas (NR) e retidas (R) nos ensaios realizados de acordo com as condições descritas abaixo do gel. SDS-PAGE corado por impregnação por prata. M.M.: massa molecular; PT: proteínas totais do parasito.

Após determinar a quantidade de anticorpo a ser utilizada nos ensaios, a etapa seguinte consistiu em avaliar se a proporção de proteínas totais do *T. cruzi* aplicada para a condição de 50% nos experimentos anteriores (1:0,5) é capaz de saturar os sítios de interação das IgG reativas que foram imobilizadas. Assim, foram feitas duas imunoprecipitações com 65 µg de anticorpo cada, de modo que apenas a quantidade do extrato proteico foi variada, correspondendo às proporções de 1:0,5 e 1:1. A partir das análises de densitometria (**Figura 4.20a**), foi estimado que 64,77 e 64,45 µg de IgG foram imobilizados nestes ensaios, respectivamente, caracterizando uma eficiência de ligação superior a 99%. Entretanto, as dosagens das frações eluídas nas duas imunoprecipitações resultaram em 61 e 60 µg de proteína, respectivamente. Como estas frações deveriam ser compostas por proteínas do parasito e pelas IgG, a recuperação de um conteúdo proteico inferior ao valor de anticorpo retido no sistema indicou que uma fração das proteínas permaneceu adsorvida nas *beads* magnéticas. Estas foram então submetidas a um terceiro passo de eluição e os eluatos foram analisados por SDS-PAGE. Neste gel foram detectadas principalmente bandas referentes às

cadeias polipeptídicas de IgG (**Figura 4.20c**). A densitometria das bandas de cadeias pesadas deste gel foi realizada sem considerar a amostra purificada como referência, apenas efetuando a normalização de acordo com as bandas selecionadas, resultando em volumes próximos (1,44 e 1,32, respectivamente), o que sugere que não houve diferença expressiva quanto à parcela de proteína que se manteve ligada às *beads*. Sendo assim, a eluição realizada inicialmente nas duas condições resultou na dessorção de proteínas em quantidades similares nas duas condições avaliadas (**Figura 4.20**). A ausência de bandas correspondentes às proteínas imunorreativas demonstra que estas são dissociadas majoritariamente com apenas dois passos de eluição (**Figura 4.20c**). Mediante os dados obtidos, concluímos que a proporção de 1:0,5 de proteínas de formas tripomastigotas sanguíneas é suficiente para atingir a saturação dos paratopos das IgG reativas.

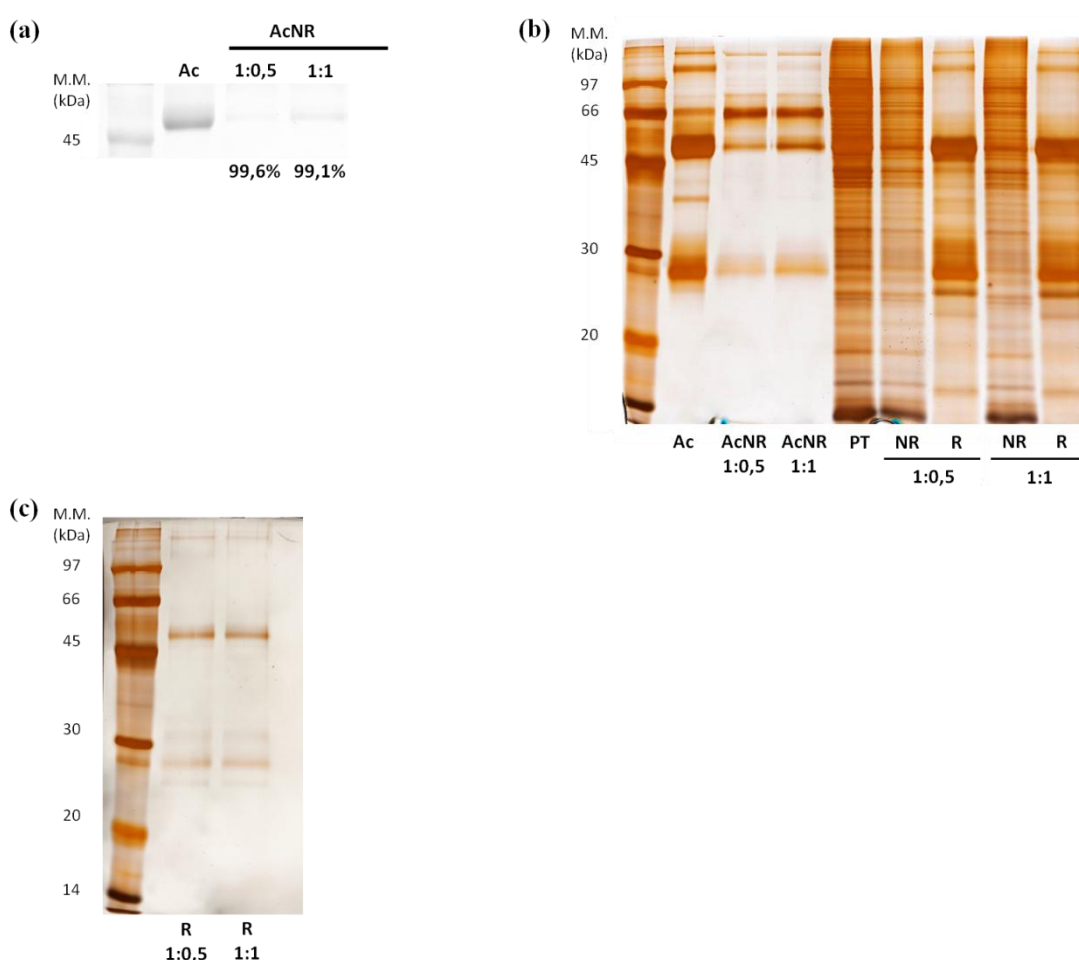


Figura 4.20. Ensaios realizados com 50% da capacidade de ligação com 1:0,5 (m/m) e 1:1 (m/m) de IgG para extrato proteico do parasito, para avaliar a saturação da interação antígeno-anticorpo. **(a)** Densitometria dos volumes de anticorpo não-retido (AcNR) aplicadas em SDS-

PAGE corado por Coomassie R. As porcentagens relativas ao rendimento de ligação dos anticorpos estão expostas abaixo das respectivas amostras. **(b)** Perfis eletroforéticos das proteínas não-retidas (NR) e retidas (R) obtidas em cada condição. **(c)** Padrão de migração das proteínas dessorvidas no terceiro passo de eluição. SDS-PAGE corado por impregnação por prata. M. M.: massa molecular; PT: proteínas totais.

Finalmente, a fim de confirmar que a imobilização covalente dos anticorpos interferiu na capacidade de reconhecimento de epítopos nos experimentos realizados no início da padronização, foi feito um ensaio seguindo as condições estabelecidas acima, porém acrescido dos passos de *cross-linking*. O volume eluído neste ensaio apresentou apenas uma banda de baixa intensidade com massa molecular referente à cadeia pesada (**Figura 4.21**).

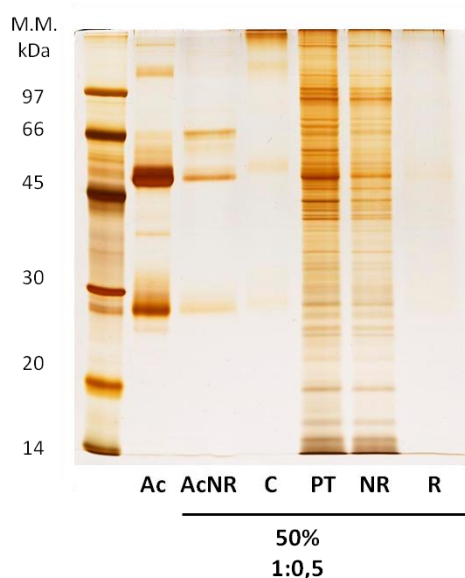


Figura 4.21. Imunoprecipitação com *cross-linking* seguindo as condições do protocolo definido na ausência de imobilização covalente de IgG. SDS-PAGE corado por impregnação por prata. Fração de anticorpo não-retido antes (AcN) e depois (C) do *cross-link*; PT: proteínas totais do parasito; NR: proteínas não-retidas pelas IgG imobilizadas; R: proteínas eventualmente retidas pelas IgG imobilizadas. M.M.: massa molecular.

Assim, dentre as três abordagens avaliadas neste estudo, a imobilização não covalente dos anticorpos às *beads* magnéticas seguida pelo processo de reconhecimento de epítopos compreendeu a melhor metodologia para a detecção de proteínas imunorreativas do *T. cruzi*. Portanto, para os demais ensaios de imunoprecipitação, foi definido como protocolo padrão (1) o uso de 10 μ L de *beads* magnéticas acopladas a proteínas G, (2) a imobilização não covalente de 65 μ g de IgG purificada e a (3) adsorção de proteínas imunorreativas do parasito

presentes em 32,5 µg de proteínas totais (extraídas com a solução de lise 2) a partir da formação de complexos à temperatura de 37 °C por 2h.

4.5. Proteínas imunorreativas obtidas por imunoprecipitação e identificadas por espectrometria de massas

As imunoprecipitações foram realizadas mantendo o mesmo agrupamento feito anteriormente para os experimentos de *western blot*. Dessa forma, cada ensaio conteve um representante das amostras controle, indeterminada, B1 e C. Em todas as imunoprecipitações foram aplicadas proteínas derivadas do mesmo extrato proteico do parasito.

Ao fim das imunoprecipitações, todas as frações eluídas foram coletadas e analisadas por SDS-PAGE, sendo a eficiência de imobilização de IgG determinada como descrito na padronização. Nesse aspecto, não houve diferença significativa entre as amostras purificadas, de maneira que o rendimento mínimo observado foi de 98,58% (**Tabela 4.2**), correspondendo a uma perda máxima de 0,52 µg. As frações eluídas apresentaram perfis de migração proteica similares, independente de o indivíduo ser portador da doença de Chagas ou da sua classificação clínica. Entretanto, as bandas em torno de 30 kDa e abaixo de 20 kDa foram detectadas com maior intensidade nos ensaios em que foram utilizadas amostras com origem de lesão cardíaca diagnosticada (**Figura 4.22b**).

Tabela 4.2. Quantidade de IgG adsorvida às proteínas G ligadas nas *beads* magnéticas.

Amostra	Ac imobilizado (%)				
	G1	G2	G3	G4	G5
Controle	99,83	99,49	99,55	99,48	99,14
Indeterminado	99,63	99,63	99,20	98,80	99,37
B1	99,52	99,49	99,31	99,54	98,58
C	99,80	98,71	99,28	99,62	99,52

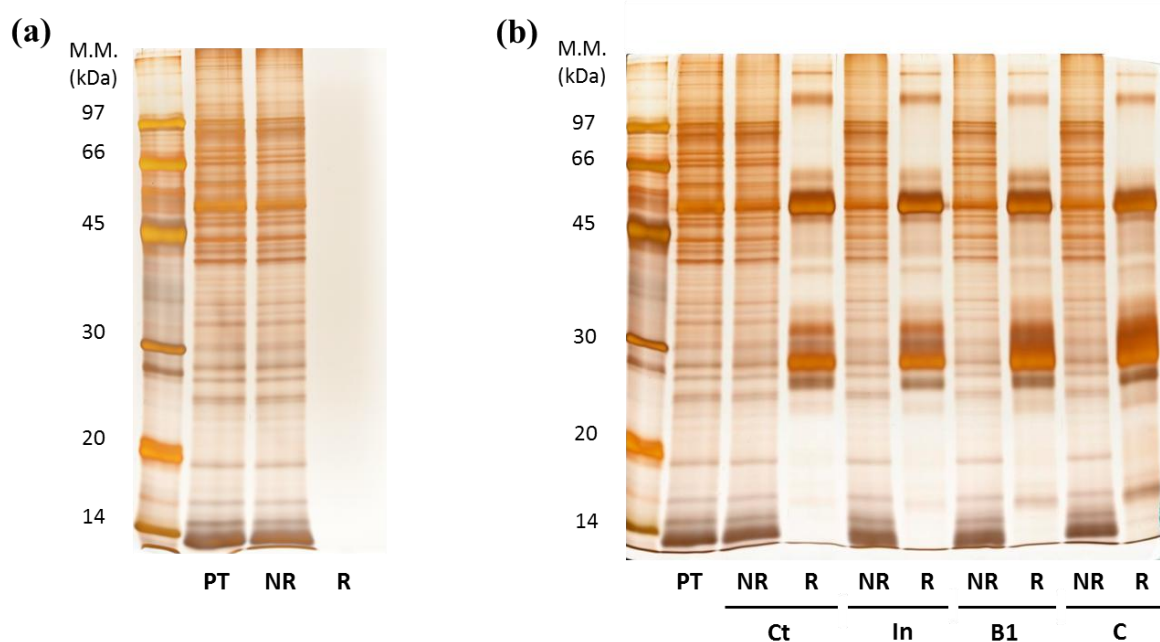


Figura 4.22. (a) Ensaio de interação inespecífica (37,5 μ g de proteínas totais). (b) Gel representativo do perfil eletroforético das frações eluídas de um experimento de imunoprecipitação realizado com amostras purificadas do grupo G2. SDS-PAGE corado por impregnação por prata. PT: proteínas totais do parasito; NR: proteínas não-retidas à coluna contendo IgG adsorvidas; R: proteínas retidas que interagiram com as IgGs; Ct: controle; In: indeterminada; B1e C: Lesão cardíaca estágios B1 e C, respectivamente; M.M.: massa molecular.

As proteínas imunorreativas foram identificadas a partir da análise das frações eluídas no espectrômetro de massas *Q Exactive* de acordo com a abordagem *shotgun*. Foram definidas como confiáveis, as identificações contidas no intervalo de até 1% de TFD e com pelo menos 1 peptídeo único; adicionalmente, foi seguido o critério da máxima parcimônia. No ensaio de interação inespecífica foram identificadas apenas proteínas humanas (7), sendo as mais abundantes consideradas contaminantes comuns ao processo de tripsinização, como a queratina. Em média, os demais ensaios resultaram em uma pequena diferença no número de espectros que geraram identificações, entretanto as frações oriundas de uma amostra indeterminada e duas de B1 apresentaram perfil discrepante (**Figura 4.23a**), ocasionando em uma maior variação na quantidade de proteínas identificadas nessas condições (**Figura 4.23b**). As frações analisadas também são compostas por IgG, de modo que o alto polimorfismo dos genes que codificam essas proteínas influencia no número total de proteínas identificadas. Sendo assim, foi avaliado quanto das identificações é representado por proteínas de *Trypanosoma*; em média, essas corresponderam a 29,0, 47,0, 52,6 e 52,4 % nos ensaios

realizados com amostras controle, indeterminada, B1 e C, respectivamente. Logo, proporcionalmente, os anticorpos provenientes de indivíduos diagnosticados com cardiopatia (B1 e C) resultaram na identificação de uma maior quantidade de proteínas imunorreativas, principalmente em comparação ao controle (**Figura 4.24a**). Para comparar o nível de similaridade das proteínas imunoprecipitadas nas quatro condições, foram consideradas as proteínas detectadas em pelo menos duas amostras pertencentes à mesma classificação. No total, 49% das proteínas que formam complexos com IgG são exclusivas de alguma condição, ao passo que somente 14,4% foram reconhecidas por anticorpos provenientes de indivíduos sem ou com infecção (**Figura 4.24b**).

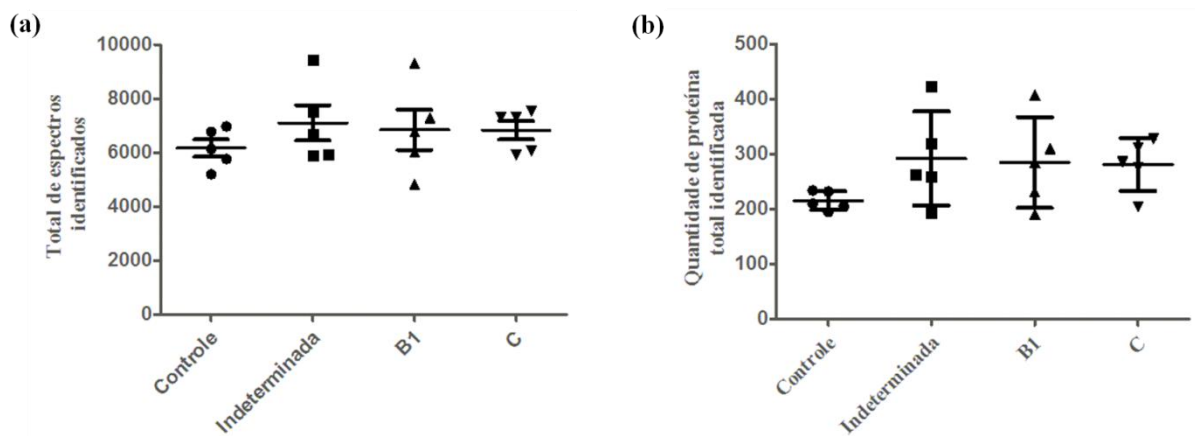


Figura 4.23. Análise por LC-MS/MS das frações imunorreativas eluídas nos experimentos de imunoprecipitação. **(a)** Total de espectros que resultaram em identificações. **(b)** Quantidade total de proteínas identificadas nos controle e em cada condição clínica. Os resultados foram analisados pelo teste Kruskal-Wallis em associação com o teste de comparação múltipla de Dunn (*post-hoc*).

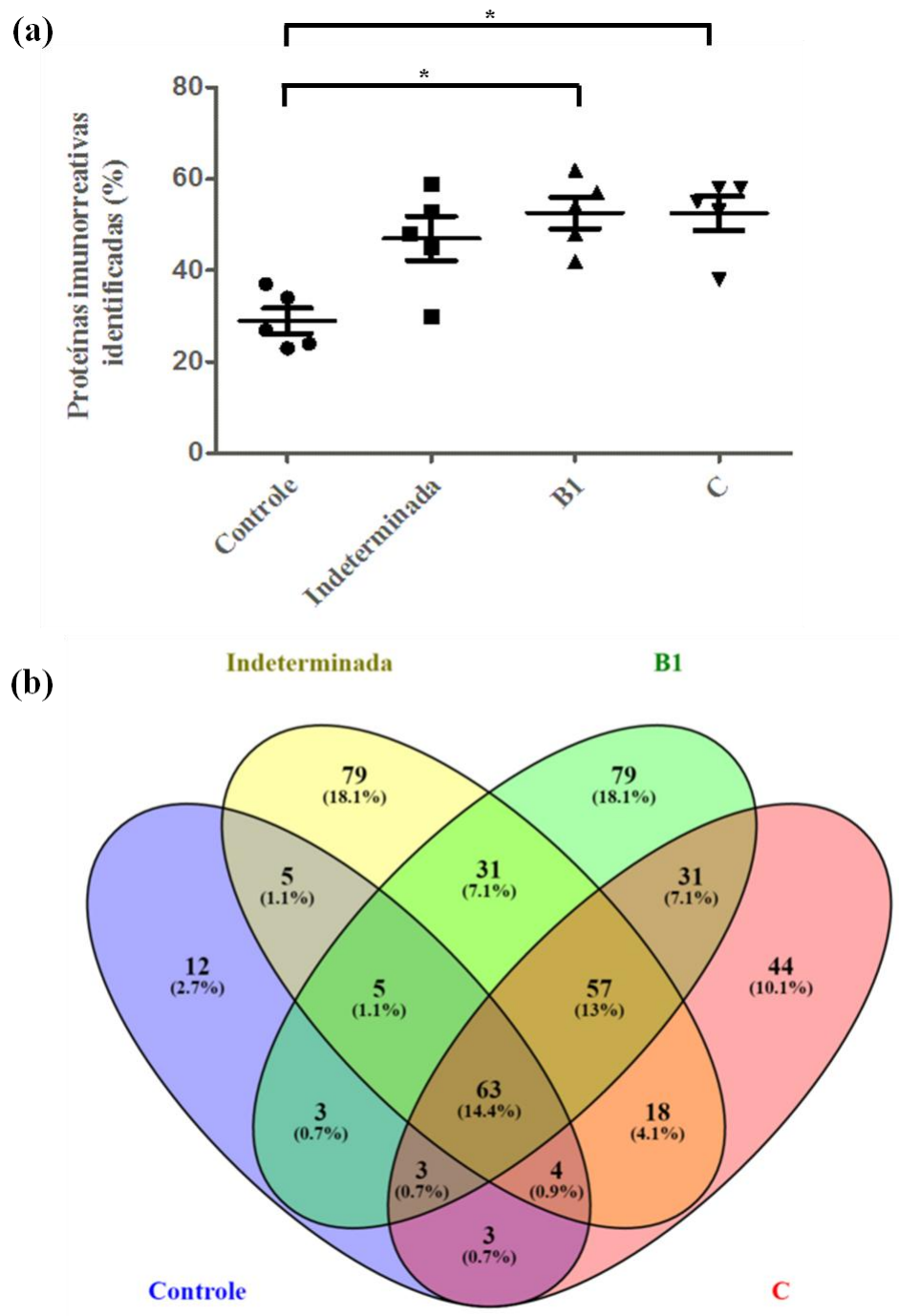


Figura 4.24. (a) Quantidade de proteínas imunorreativas de *T. cruzi* identificadas nas frações eluídas nas imunoprecipitações. Os resultados foram analisados pelo teste Kruskal-Wallis em associação com o teste de comparação múltipla de Dunn (*post-hoc*). (b) Similaridade entre as populações proteicas imunorreativas obtidas a partir de cada condição clínica (n = 5).

Uma vez que a quantidade de anticorpo reativo a uma determinada proteína do parasito reflete diretamente sobre o rendimento desta na fração analisada, as proteínas imunorreativas identificadas foram quantificadas por XIC com o objetivo de avaliar possíveis

alterações na frequência e no perfil do reconhecimento proteico de formas tripomastigotas sanguíneas ao longo da infecção. Desta forma, a diferença de abundância das proteínas de *Trypanosoma* sp. obtidas a partir de cada condição clínica foi determinada pela ferramenta *TFold* integrada ao *PatternLab*; as análises foram feitas comparando dois grupos por vez (**Figura 4.25**). Nos *volcano plot* gerados, as proteínas representadas em azul apresentaram diferença quantitativa estatisticamente significativa entre as condições avaliadas. Estas proteínas estão dispostas na região do gráfico correspondente à condição em que foram detectadas com maior abundância. Por exemplo, se a proteína X tivesse sido encontrada em maior quantidade na condição indeterminada em relação ao controle, esta proteína estaria localizada na porção inferior do gráfico da **figura 25a**. Como as proteínas de interesse se limitam às azuis, as considerações seguintes foram feitas com base na distribuição desses pontos.

Nas comparações dos três estágios clínicos com o controle, este resultou em mais proteínas diferencialmente abundantes, ao passo que as frações obtidas com IgG de indeterminados, B1 e C apresentaram proteínas com maior diferença de variação (**Figura 4.25a-c e tabelas 4.3-4.4**). Estas compreenderam principalmente glicoproteínas de caráter patogênico nas três condições (**Tabelas 4.3**), enquanto no controle foi mais frequente o reconhecimento de proteínas envolvidas nos processos de biossíntese proteica e no metabolismo energético (**Tabelas 4.4**).

Em relação ao controle, as frações imunorreativas para IgG de pacientes no período indeterminado apresentaram 8 proteínas detectadas com abundância superior a 2 vezes: hipotética (gi|70873209), proteína de choque térmico 70 (gi|205278868), proteína ribossomal S4-símile (gi|205278880), glicoproteína de superfície 85 kDa (gi|46949059), glicoproteína de superfície Tc-85/32 (gi|37778163), glicoproteína de superfície parcial (gi|508815), glicoproteína de superfície Tc-85/35 (gi|37778138) e diidropoliâmida acetiltransferase (gi|71665855) (**Tabela 4.3**). Todas essas proteínas permaneceram em maior quantidade nas frações geradas a partir do reconhecimento por IgG de indivíduos com cardiomiopatia em comparação ao controle (**Tabela 4.3**). O *volcano plot* formado por indeterminada *versus* B1 demonstra claramente uma predominância de proteínas diferencialmente abundantes neste estágio (**Figura 4.25d**), das quais se destacaram a trans-sialidade parcial (gi|71667091), hipotética (gi|71407149) e duas variações da proteína CAP5.5 associada ao citoesqueleto (gi|71415498 e gi|71401694) (**Tabela 4.5**). Por outro lado, a comparação da condição indeterminado *versus* C resultou em um perfil mais homogêneo, sendo as proteínas

antioxidantes as mais abundantes nas amostras referentes a cardiopatas. Estas consistiram em três variações da triparedoxina peroxidase (gi|17224953, gi|3776134 e gi|70873019). Da mesma forma, essas proteínas se mantiveram mais abundantes no estágio C em relação à B1. No entanto, as proteínas hipotética (gi|71401264), de superfície TolT (gi|71402301) foram detectadas com maior variação na condição C. Nesta análise, as duas variações da proteína CAP5.5 associada ao citoesqueleto foram observadas novamente como sendo mais abundantes em B1 (**Tabela 4.5**). De acordo com o BLAST (*basic local alignment search tool*) realizado, a proteína hipotética com gi|71401264 possui 92,8% de identidade sequencial com a proteína de superfície TolT de *T. cruzi*, enquanto as proteínas hipotéticas com gi|71407149 e gi|70873209 apresentaram similaridade principalmente com outras proteínas não caracterizadas, inclusive de outras espécies.

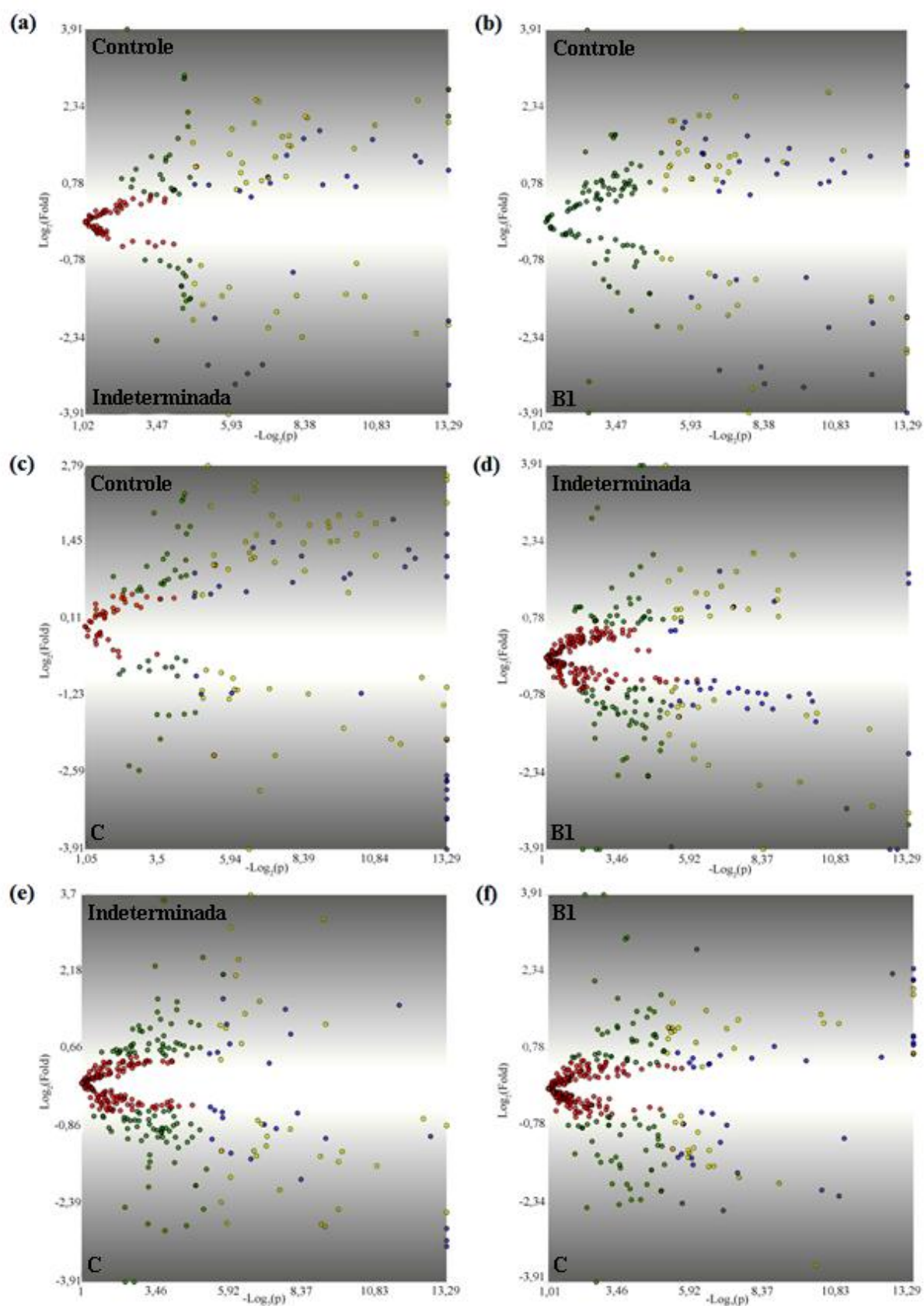


Figura 4.25. Análise em pares (*TFold*) realizada a partir da quantificação por *XIC* das populações proteicas de *Trypanosoma* sp. identificadas em cada condição biológica. **(a) (b)**

(c) Controle *versus* indeterminada, B1 e C, respectivamente. (d) (e) Indeterminada *versus* B1 e C, respectivamente. (f) B1 *versus* C. Cada ponto representa uma proteína, a qual foi classificada por cores de acordo com os seguintes critérios: azul, apresentou q e p-valores $\leq 0,05$ e *foldchange* acima de 1,3, parâmetros estabelecidos como *cut-off*; amarela, apesar de estatisticamente significativa, não resultou em *foldchange* satisfatório; verde, está dentro do intervalo de *foldchange*, mas possivelmente ocorre ao acaso; vermelha, não passou em nenhum *cut-off*. O teste-t de Student foi empregado para a média do *XIC* de cada proteína individualmente.

Tabela 4.3. Proteínas imunorreativas detectadas com maior abundância nas frações eluídas nos ensaios realizados com amostras purificadas de pacientes em relação aos de doadores saudáveis. Todas as proteínas apresentaram p-valor < 0,05.

gi	Proteína	Indeterminada	B1	C
70873209	<i>hypothetical protein, conserved</i> [<i>Trypanosoma cruzi</i>]	↑ (2,02 x)	↑ (2,2 x)	↑ (2,27 x)
205278868	<i>heat shock protein 70</i> [<i>Trypanosoma cruzi</i>]	↑ (3,88 x)	↑ (3,1 x)	↑ (2,26 x)
205278880	<i>ribosomal protein S4-like protein</i> [<i>Trypanosoma cruzi</i>]	↑ (4,02 x)	↑ (4,22 x)	↑ (3,99 x)
46949059	<i>85 kDa surface glycoprotein, partial</i> [<i>Trypanosoma cruzi</i>]	↑ (7,44 x)	↑ (8,72 x)	↑ (6,60 x)
37778163	<i>surface glycoprotein Tc-85/32, partial</i> [<i>Trypanosoma cruzi</i>]	↑ (7,48 x)	↑ (7,85 x)	↑ (6,14 x)
508815	<i>surface glycoprotein, partial</i> [<i>Trypanosoma cruzi</i>]	↑ (8,44 x)	↑ (9,95 x)	↑ (6,51 x)
37778138	<i>surface glycoprotein Tc-85/35, partial</i> [<i>Trypanosoma cruzi</i>]	↑ (9,8 x)	↑ (10,43 x)	↑ (7,29 x)
71665855	<i>dihydrolipoamide acetyltransferase precursor</i> [<i>Trypanosoma cruzi</i> strain CL Brener]	↑ (9,9 x)	↑ (16,11 x)	↑ (17,40 x)
71652789	<i>60S ribosomal protein L18a</i> [<i>Trypanosoma cruzi</i> strain CL Brener]	-	↑ (2,17 x)	-
788017082	<i>60S ribosomal protein L18a, putative</i> [<i>Trypanosoma brucei gambiense</i> DAL972]	-	↑ (2,28 x)	↑ (1,84 x)
407398664	<i>40S ribosomal protein S2, putative</i> [<i>Trypanosoma cruzi marinkellei</i>]	-	↑ (2,92 x)	-
70886533	<i>trans-sialidase, putative</i> [<i>Trypanosoma cruzi</i>]	-	↑ (4 x)	-
407847309	<i>trans-sialidase, putative, partial</i> [<i>Trypanosoma cruzi</i>]	-	↑ (3,88 x)	-
71656920	<i>flagellar calcium-binding protein, partial</i> [<i>Trypanosoma cruzi</i> strain CL Brener]	-	↑ (4,48 x)	-
71404593	<i>calpain cysteine peptidase, partial</i> [<i>Trypanosoma cruzi</i> strain CL Brener]	-	↑ (8,21 x)	-
71415505	<i>glucose-regulated protein 78</i> [<i>Trypanosoma cruzi</i> strain CL Brener]	-	-	↑ (2,29 x)
17224953	<i>tryparedoxin peroxidase</i> [<i>Trypanosoma cruzi</i>]	-	-	↑ (8,17 x)
3776134	<i>tryparedoxin peroxidase homologue</i> [<i>Trypanosoma cruzi</i>]	-	-	↑ (10,27 x)
70873019	<i>tryparedoxin peroxidase, putative</i> [<i>Trypanosoma cruzi</i>]	-	-	↑ (10,43 x)

Tabela 4.4. Proteínas imunorreativas de formas tripomastigotas sanguíneas menos abundantes nas frações resultantes dos ensaios feitos com IgG de indivíduos infectados em comparação aos de doadores saudáveis. Todas as proteínas apresentaram p-valor < 0,05.

gi	Proteína	Indeterminada	B1	C
557866029	<i>phosphatase 2C [Trypanosoma cruzi Dm28c]</i>	↓ (3,6 x)	↓ (3,35 x)	-
71658983	<i>60S ribosomal protein L28 [Trypanosoma cruzi strain CL Brener]</i>	↓ (3,22 x)	-	-
71420615	<i>heat shock 70 kDa protein, partial [Trypanosoma cruzi strain CL Brener]</i>	↓ (3,18 x)	↓ (2,81 x)	-
71405320	<i>ubiquinol-cytochrome-C-reductase [Trypanosoma cruzi strain CL Brener]</i>	↓ (2,55 x)	-	-
70866571	<i>GTP-binding nuclear protein rtb2, putative [Trypanosoma cruzi]</i>	↓ (2,53 x)	↓ (2,40 x)	↓(1,68 x)
71411043	<i>aspartate aminotransferase [Trypanosoma cruzi strain CL Brener]</i>	↓ (2,32 x)	-	-
71658999	<i>pyruvate phosphate dikinase [Trypanosoma cruzi strain CL Brener]</i>	↓ (2,06 x)	↓ (2,23 x)	-
53849777	<i>glycosomal glyceraldehyde phosphate dehydrogenase, partial [Trypanosoma boissoni]</i>	↓ (1,9 x)	↓ (1,99 x)	-
70878028	<i>I/6 autoantigen, putative [Trypanosoma cruzi]</i>	↓ (1,88 x)	-	-
70886982	<i>isocitrate dehydrogenase, putative [Trypanosoma cruzi]</i>	↓ (1,72 x)	↓ (2,55 x)	-
342185771	<i>unnamed protein product [Trypanosoma congolense IL3000]</i>	↓ (1,69 x)	↓ (2,38 x)	-
71655600	<i>mitochondrial processing peptidase, beta subunit [Trypanosoma cruzi strain CL Brener]</i>	↓ (1,68 x)	↓ (1,53 x)	-
70873741	<i>fructose-bisphosphate aldolase, glycosomal, putative [Trypanosoma cruzi]</i>	↓ (1,68 x)	↓ (3,21 x)	↓(2,56 x)
71422451	<i>glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase [Trypanosoma cruzi strain CL Brener]</i>	↓ (1,64 x)	↓ (1,7 x)	-
70884377	<i>heat shock 70 kDa protein, mitochondrial precursor, putative [Trypanosoma cruzi]</i>	↓ (1,54 x)	↓ (2,27 x)	-
70870856	<i>elongation factor 1-gamma (EF-1-gamma), putative [Trypanosoma cruzi]</i>	↓ (1,42 x)	↓ (1,45 x)	↓(1,86 x)
557865295	<i>chaperonin alpha subunit [Trypanosoma cruzi Dm28c]</i>	-	↓ (6,80 x)	-
70875641	<i>threonyl-tRNA synthetase, putative [Trypanosoma cruzi]</i>	-	↓ (4,08 x)	-
70881486	<i>threonyl-tRNA synthetase, putative [Trypanosoma cruzi]</i>	-	↓ (3,75 x)	-
407835084	<i>elongation factor 2, putative [Trypanosoma cruzi]</i>	-	↓ (2,67 x)	↓(2,5 x)

71649278	<i>isocitrate dehydrogenase [Trypanosoma cruzi strain CL Brener</i>	-	↓ (2,63 x)	-
407394855	<i>isocitrate dehydrogenase [NADP], mitochondrial precursor, putative [Trypanosoma cruzi marinkellei]</i>	-	↓ (2,62 x)	-
407831423	<i>isocitrate dehydrogenase [NADP], mitochondrial precursor, putative [Trypanosoma cruzi</i>	-	↓ (2,59 x)	-
686641247	<i>beta-tubulin [Trypanosoma grayi]</i>	-	↓ (2,51 x)	↓(1,5 x)
70875294	<i>glycosomal membrane protein, putative [Trypanosoma cruzi]</i>	-	↓ (2,33 x)	-
70877628	<i>asparagine synthetase A, putative [Trypanosoma cruzi]</i>	-	↓ (1,95 x)	↓(1,46 x)
18568136	<i>alpha tubulin [Trypanosoma cruzi]</i>	-	↓ (1,76 x)	↓(1,41 x)
554931738	<i>pyruvate phosphate dikinase [Trypanosoma rangeli SC58]</i>	-	↓ (1,74 x)	↓(2,34 x)
71420615	<i>heat shock 70 kDa protein, partial [Trypanosoma cruzi strain CL Brener]</i>	-	-	↓ (3,6 x)
70884377	<i>heat shock 70 kDa protein, mitochondrial precursor, putative [Trypanosoma cruzi]</i>	-	-	↓ (3,02 x)
342185771	<i>unnamed protein product [Trypanosoma congolense IL3000]</i>	-	-	↓ (2,73 x)
70886982	<i>isocitrate dehydrogenase, putative [Trypanosoma cruzi]</i>	-	-	↓ (2,3 x)
53849777	<i>glycosomal glyceraldehyde phosphate dehydrogenase, partial [Trypanosoma boissoni]</i>	-	-	↓ (2,25 x)
71658999	<i>pyruvate phosphate dikinase [Trypanosoma cruzi strain CL Brener]</i>	-	-	↓ (2,03 x)
71661567	<i>hypothetical protein [Trypanosoma cruzi strain CL Brener]</i>	-	-	↓ (1,88 x)
71422451	<i>glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase [Trypanosoma cruzi strain CL Brener]</i>	-	-	↓ (1,8 x)
71411043	<i>aspartate aminotransferase [Trypanosoma cruzi strain CL Brener]</i>	-	-	↓ (1,6 x)

Tabela 4.5. Proteínas imunorreativas de formas tripomastigotas sanguíneas diferencialmente abundantes nas frações adquiridas a partir das diferentes condições clínicas da doença de Chagas. Todas as proteínas apresentaram p-valor < 0,05.

gi	Proteína	Indeterminada x B1	Indeterminada x C	B1 x C
407835084	<i>elongation factor 2, putative</i> [Trypanosoma cruzi]	↑ Ind (3,37 x)	↑ Ind (3,16 x)	-
70884738	<i>mitochondrial processing peptidase</i> <i>alpha subunit, putative</i> [Trypanosoma cruzi]	↑ Ind (3,25 x)	-	-
557863387	<i>mitochondrial processing peptidase</i> <i>alpha subunit</i> [Trypanosoma cruzi Dm28c]	↑ Ind (2,84 x)	-	-
686641247	<i>beta-tubulin</i> [Trypanosoma grayi]	↑ Ind (2,2 x)	-	↑ C (1,67 x)
340059366	<i>putative heat shock protein 70</i> [Trypanosoma vivax Y486] RecName: Full=Heat shock 70 kDa protein :	↑ Ind (2,04 x)	↑ Ind (2,73 x)	-
123603	gi 10622 emb CAA30115.1 <i>unnamed protein product</i> [Trypanosoma cruzi]	↑ Ind (2,04 x)	↑ Ind (2,23 x)	-
70885364	<i>40S ribosomal protein S18, putative</i> [Trypanosoma cruzi]	↑ Ind (1,65 x)	↑ Ind (1,31 x)	-
70884377	<i>heat shock 70 kDa protein,</i> <i>mitochondrial precursor, putative</i> [Trypanosoma cruzi]	↑ Ind (1,46 x)	↑ Ind (1,95 x)	-
70875294	<i>glycosomal membrane protein,</i> <i>putative</i> [Trypanosoma cruzi]	↑ Ind (1,45 x)	↑ C (1,38 x)	↑ C (2,01 x)
71418672	<i>trans-sialidase</i> [Trypanosoma cruzi strain CL Brener]	↑ B1 (1,38 x)	-	↑ B1 (1,61 x)
70866998	<i>trans-sialidase, putative</i> [Trypanosoma cruzi]	↑ B1 (1,41 x)	-	↑ B1 (2,08 x)
70876193	<i>trans-sialidase, putative</i> [Trypanosoma cruzi]	↑ B1 (1,43 x)	-	↑ B1 (1,54 x)
71652789	<i>60S ribosomal protein L18a</i> [Trypanosoma cruzi strain CL Brener]	↑ B1 (1,54 x)	-	-
70869458	<i>trans-sialidase, putative</i> [Trypanosoma cruzi]	↑ B1 (1,54 x)	-	-
71653101	<i>trans-sialidase</i> [Trypanosoma cruzi strain CL Brener]	↑ B1 (1,57 x)	-	-
71665855	<i>dihydrolipoamide acetyltransferase</i> <i>precursor</i> [Trypanosoma cruzi strain CL Brener]	↑ B1 (1,62 x)	↑ C (1,75 x)	-
407862142	<i>trans-sialidase, putative, partial</i> [Trypanosoma cruzi]	↑ B1 (1,64 x)	-	-

71409133	<i>trans-sialidase [Trypanosoma cruzi strain CL Brener]</i>	↑ B1 (1,64 x)	↑ C (1,6 x)	-
788017082	<i>60S ribosomal protein L18a, putative [Trypanosoma brucei gambiense DAL972]</i>	↑ B1 (1,67 x)	-	-
557851571	<i>putative trans-sialidase [Trypanosoma cruzi Dm28c]</i>	↑ B1 (1,67 x)	-	-
71655621	<i>trans-sialidase [Trypanosoma cruzi strain CL Brener]</i>	↑ B1 (1,73 x)	↑ C (1,48 x)	↑ B1 (1,39 x)
61207158	<i>actin [Trypanosoma cruzi]</i>	↑ B1 (1,85 x)	-	↑ B1 (1,89 x)
70860702	<i>trans-sialidase, putative [Trypanosoma cruzi]</i>	↑ B1 (1,85 x)	-	↑ B1 (1,64 x)
71405490	<i>trans-sialidase [Trypanosoma cruzi strain CL Brener]</i>	↑ B1 (1,91 x)	-	↑ B1 (1,8 x)
70879740	<i>40S ribosomal protein S17, putative [Trypanosoma cruzi]</i>	↑ B1 (1,96 x)	-	↑ B1 (5,33 x)
71424303	<i>ribosomal protein L21E (60S) [Trypanosoma cruzi strain CL Brener]</i>	↑ B1 (1,97 x)	-	-
71658983	<i>60S ribosomal protein L28 [Trypanosoma cruzi strain CL Brener]</i>	↑ B1 (2,05 x)	-	-
71404593	<i>calpain cysteine peptidase, partial [Trypanosoma cruzi strain CL Brener]</i>	↑ B1 (2,07 x)	↑ C (1,85 x)	-
70878028	<i>I/6 autoantigen, putative [Trypanosoma cruzi]</i>	↑ B1 (2,47 x)	↑ C (2,06 x)	-
70887200	<i>ribosomal protein L35A, putative [Trypanosoma cruzi]</i>	↑ B1 (3,88 x)	-	-
71667091	<i>trans-sialidase, partial [Trypanosoma cruzi strain CL Brener]</i>	↑ B1 (8,45 x)	-	-
71407149	<i>hypothetical protein [Trypanosoma cruzi strain CL Brener]</i>	↑ B1 (14,51 x)	-	↑ B1 (4,97 x)
71415498	<i>cytoskeleton-associated protein CAP5.5 [Trypanosoma cruzi strain CL Brener]</i>	↑ B1 (30,98 x)	-	↑ B1 (4,54 x)
71401694	<i>cytoskeleton-associated protein CAP5.5, partial [Trypanosoma cruzi strain CL Brener]</i>	↑ B1 (32,24 x)	-	↑ B1 (4,57 x)
557864512	<i>hypothetical protein TCDM_03483 [Trypanosoma cruzi Dm28c]</i>	-	↑ Ind (2,89 x)	-
554931738	<i>pyruvate phosphate dikinase [Trypanosoma rangeli SC58]</i>	-	↑ Ind (1,70 x)	-
70873741	<i>fructose-bisphosphate aldolase, glycosomal, putative [Trypanosoma cruzi]</i>	-	↑ Ind (1,52 x)	-
407847309	<i>trans-sialidase, putative, partial [Trypanosoma cruzi]</i>	-	↑ Ind (1,49 x)	↑ B1 (2,05 x)
71411043	<i>aspartate aminotransferase [Trypanosoma cruzi strain CL Brener]</i>	-	↑ C (1,44 x)	-

70866571	GTP-binding nuclear protein rtb2, putative [Trypanosoma cruzi]	-	↑ C (1,5 x)	↑ C (1,42 x)
70863794	hypothetical protein, conserved [Trypanosoma cruzi]	-	↑ C (2,12 x)	-
70860135	trans-sialidase, putative [Trypanosoma cruzi]	-	↑ C (2,14 x)	↑ C (2,64 x)
71401264	hypothetical protein [Trypanosoma cruzi strain CL Brener]	-	↑ C (2,59 x)	↑ C (5,52 x)
71404821	trans-sialidase [Trypanosoma cruzi strain CL Brener]	-	↑ C (2,8 x)	↑ C (2,62 x)
71402301	surface protein ToIT [Trypanosoma cruzi strain CL Brener]	-	↑ C (3,7 x)	↑ C (4,99 x)
17224953	tryparedoxin peroxidase [Trypanosoma cruzi]	-	↑ C (7,24 x)	↑ C (3,25 x)
3776134	tryparedoxin peroxidase homologue [Trypanosoma cruzi]	-	↑ C (8,53 x)	↑ C (4,51 x)
70873019	tryparedoxin peroxidase, putative [Trypanosoma cruzi]	-	↑ C (9,32 x)	↑ C (4,15 x)
71659632	proteasome alpha 1 subunit [Trypanosoma cruzi strain CL Brener]	-	-	↑ B1 (7 x)
71412832	trans-sialidase [Trypanosoma cruzi strain CL Brener]	-	-	↑ B1 (1,83 x)
554931396	ATP synthase alpha chain, mitochondrial precursor [Trypanosoma rangeli SC58]	-	-	↑ B1 (1,58 x)
70876805	trans-sialidase, putative [Trypanosoma cruzi]	-	-	↑ B1 (1,52 x)
508815	surface glycoprotein, partial [Trypanosoma cruzi]	-	-	↑ B1 (1,52 x)
70886533	trans-sialidase, putative [Trypanosoma cruzi]	-	-	↑ B1 (1,47 x)
37778138	surface glycoprotein Tc-85/35, partial [Trypanosoma cruzi]	-	-	↑ B1 (1,43 x)
70869479	trans-sialidase, putative [Trypanosoma cruzi]	-	-	↑ B1 (1,41 x)
70867966	trans-sialidase, putative [Trypanosoma cruzi]	-	-	↑ B1 (1,34 x)
70875275	60S ribosomal protein L30, putative [Trypanosoma cruzi]	-	-	↑ C (1,39 x)
70867094	surface protease GP63, putative [Trypanosoma cruzi]	-	-	↑ C (1,64 x)
71415505	glucose-regulated protein 78 [Trypanosoma cruzi strain CL Brener]	-	-	↑ C (2,12 x)
449802217	Chain Q, High-resolution Cryo-electron Microscopy Structure Of The Trypanosoma Brucei Ribosome	-	-	↑ C (2,5 x)
71393086	trans-sialidase, partial [Trypanosoma cruzi strain CL Brener]	-	-	↑ C (2,91 x)

5. Discussão

No hospedeiro vertebrado, a forma tripomastigota sanguínea consiste na forma extracelular do *T. cruzi* essencialmente responsável pela disseminação da infecção mediante a invasão de células nucleadas, inclusive fagócitos. Dessa forma, corresponde ao estágio evolutivo mais exposto e provavelmente com maior contribuição para a ativação da resposta imune do hospedeiro a partir do reconhecimento de moléculas de superfície e secretadas (Camargo *et al.*, 1997; revisto em Krettli & Brener, 1982; Brener & Gazzinelli, 1997; Almeida & Gazzinelli, 2001), sendo, portanto, escolhido como objeto do presente estudo.

O *T. cruzi* utiliza o mecanismo de secreção/excreção de moléculas associadas ou não a vesículas com diferentes finalidades, dentre as quais se destacam (1) a influência sobre as células do hospedeiro, que podem se tornar mais suscetíveis à invasão, aumentando assim o parasitismo tecidual e a resposta inflamatória local, (2) a atuação na evasão do sistema imune e a (3) modulação do perfil de citocinas ao longo da infecção (Torrecilhas *et al.*, 2009; Cestari *et al.*, 2012; revisto em Torrecilhas *et al.*, 2012). Essas vesículas podem conter ácidos nucleicos, lipídeos, glicoconjugados e proteínas envolvidas em diversos processos metabólicos, as quais podem apresentar características antigênicas (Umezawa *et al.*, 1996; Bayer-Santos *et al.*, 2013; Garcia-Silva *et al.*, 2014). Glicoproteínas presentes na membrana plasmática têm sido associadas à virulência do parasito; no entanto, estas proteínas também podem ser liberadas para o meio extracelular pela clivagem da ligação com âncoras de GPI ou via secreção por vesículas (Gonçalves *et al.*, 1991; Frevert *et al.*, 1992; Abuin *et al.*, 1996; recepto em Colli & Alves, 1999). A distribuição das moléculas do *T. cruzi* no hospedeiro pode estender a sua atuação patogênica, como no caso das trans-sialidases. Estas enzimas transferem moléculas de ácido siálico de glicoconjugados do hospedeiro para mucinas presentes na superfície do protozoário, porém quando solúveis no meio, podem promover depleção de timócitos, trombocitopenia e eritropenia, sendo a sua atividade interrompida por meio da interação com anticorpos (de Titto & Araujo, 1988; Leguizamón *et al.*, 1994; Leguizamón *et al.*, 1999; Tribulatti *et al.*, 2005). Adicionalmente, Rodríguez-Angulo e colaboradores (2015) demonstraram que proteínas imunorreativas liberadas por tripomastigotas são capazes de gerar alterações no funcionamento cardíaco de ratos, como arritmia e bloqueio atrioventricular completo, sendo esses quadros revertidos mediante a neutralização dessas por IgG presentes no soro de pacientes com cardiopatia chagásica. Como a permanência da resposta inflamatória nessa infecção está relacionada à persistência do parasito, e ao longo do seu desenvolvimento ocorre uma mudança no padrão de proteínas reconhecidas por IgG (Umezawa *et al.*, 1996), neste trabalho hipotetizamos que este evento

pode estar associado à progressão de lesões, mais especificamente no miocárdio, incitando a busca de candidatos a biomarcadores.

Os anticorpos podem reconhecer epitopos determinados por regiões contínuas ou descontínuas, sendo estas as mais frequentes em proteínas (Barlow *et al.*, 1986; revisto em Sela-Culang *et al.*, 2013). Portanto, para minimizar a perda de epitopos descontínuos sem comprometer a solubilidade do conteúdo proteico, foram testadas quatro soluções de lise com capacidade desnaturante moderada para a extração de proteínas do parasito. Devido à presença de microtúbulos subpeliculares no *T. cruzi*, ciclos de congelamento e descongelamento foram adicionados ao processo para auxiliar na ruptura celular, como previamente descrito pelo nosso grupo (Menna-Barreto *et al.*, 2010; Brunoro *et al.*, 2015).

Além dos inibidores de proteases, todas as soluções foram compostas por Tris e 1% de NP-40. O primeiro é um sal que pode ser empregado tanto para estabilizar o pH da solução quanto para ajudar na solubilização de proteínas ao prevenir interações proteicas, mesma função exercida pelo detergente NP-40. A solução de lise 2, selecionada para dar continuidade aos experimentos, difere da solução 1 apenas pela presença de sacarose nesta; no entanto, a diferença no rendimento foi de 25%. A sacarose atua como um criopreservante diminuindo a desnaturação proteica nos ciclos de congelamento e descongelamento, sendo também capaz de manter a integridade das membranas (Strauss & Hauser, 1986; Anchordoquy *et al.*, 2001). Adicionalmente, a concentração de 250 mM de sacarose estabiliza os lisossomos através do balanço osmótico do meio, evitando a liberação do seu conteúdo. Na solução 1, a concentração de sacarose utilizada (200 mM) pode ter influenciado na redução da quantidade de proteína extraída (Lloyd & Mason, 1996). Interessantemente, a solução de lise 3, constituída pela mesma concentração de sacarose, apresentou um rendimento médio próximo à solução 1 (53,4 e 60,5 µg, respectivamente). Entretanto, a solução 3 foi capaz de extrair mais proteínas em comparação à solução 4, a qual obteve o pior resultado dentre todas testadas. Esta solução não foi acrescida de nenhum composto, sendo, portanto, constituída apenas pelos reagentes em comum, mantendo o seu pH básico. Nos géis unidimensionais, os perfis das amostras extraídas com as soluções 1, 2 e 3 apresentaram o mesmo padrão de intensidade de coloração, enquanto os extratos da solução 4 resultaram em bandas mais intensas, inclusive na região de menor massa molecular. Este resultado sugere que a dosagem de proteínas dos extratos das soluções 4 pode estar subestimada em relação às demais, embora os dados de padronização da quantificação de proteína não tenham demonstrado graus de interferência evidentemente distintos entre as soluções de lise (dados não mostrados). Os

perfis de eletroforese uni e bidimensional apontaram para semelhanças nos conteúdos proteicos extraídos pelas quatro soluções de lise, principalmente entre 1 e 2 (**Figura 4.2**). Nos quatro géis bidimensionais (**Figura 4.3**), foi possível perceber que não houve, de maneira geral, extração preferencial de proteínas de acordo com massa molecular ou pontos isoelétricos específicos. Essas observações foram validadas posteriormente pelas identificações proteicas obtidas a partir das análises por LC-MS/MS.

Em todos os extratos avaliados, a quantidade de proteínas de *Trypanosoma* sp. foi reprodutível, representando em média 81% das identificações. Considerando essas populações proteicas, em torno de 69,2% foram extraídas por pelo menos duas soluções de lise. Todas as soluções resultaram na identificação de glicoproteínas importantes na patogênese do *T. cruzi*, como mucinas (TcMUCII, MASP), trans-sialidades e a protease gp63. Estas proteínas geralmente se encontram ancoradas à membrana plasmática do parasito por meio de moléculas de GPI e participam dos processos de invasão da célula hospedeira e/ou resistência ao sistema imune (revisto em DosReis, 2011). Por outro lado, também foram identificadas proteínas envolvidas em diferentes vias metabólicas e compartimentos celulares. Esta heterogeneidade apresentada pelos extratos das quatro soluções de lise amplia a possibilidade de detecção de proteínas imunorreativas nos ensaios posteriores, visto que tanto proteínas secretadas quanto encontradas na superfície do parasito podem possuir caráter antigênico. As identificações de proteínas exclusivas às soluções 1 a 4 corresponderam a 6,8, 7,0, 7,4 e 9,6%, respectivamente. Proteínas hipotéticas representaram quase 50% dessas identificações nas soluções 1 e 2 e cerca de 33% nas soluções 3 e 4.

Além de proteínas de *Trypanosoma* sp., também foram obtidas identificações correspondentes a proteínas de *M. musculus* e *H. sapiens*. A identificação de proteínas humanas correspondeu principalmente a variações de queratina. Esta contaminação é inerente à manipulação da amostra, em especial durante a tripsinização. A maior abundância de proteínas de camundongos decorre do processo de obtenção do parasito. Em adição à interação parasito-célula hospedeira, o *T. cruzi* adere moléculas solúveis e plaquetas, que podem não ser dissociadas durante a centrifugação diferencial. Por exemplo, estão presentes nos extratos as proteínas C3, C4b e C1q do sistema complemento. Para inibir a ativação desta via, essas moléculas são adsorvidas à superfície do parasito por meio da interação com as proteínas CRP (*complement regulatory protein*) e calreticulina (Joiner *et al.*, 1986; Norris *et al.*, 1991; Ferreira *et al.*, 2004), também identificada neste estudo. A presença de proteínas anti-oxidantes do hospedeiro e demais moléculas envolvidas na modulação do sistema imune

(TGF- β , CTLA2- α , CD47), sugere a ocorrência de uma resposta inflamatória no tecido cardíaco, intensamente infectado pela cepa Y do *T. cruzi* em camundongos suíços (Nunes *et al.*, 1992). Mediante o contato com os mecanismos de defesa do hospedeiro, as formas tripomastigotas sanguíneas podem alterar o perfil de expressão proteica, mantendo a sua viabilidade. Nós realizamos a extração de proteínas nos parasitos isolados no pico de parasitemia, pois assumimos que neste momento haveria uma maior frequência de protozoários que já teriam sofrido essa modulação e, desta forma, aumentaríamos nossas chances de detectar proteínas que de fato são expostas à interação com moléculas do hospedeiro, inclusive anticorpos.

Por se tratar de uma infecção que majoritariamente evolui para a fase crônica, foram feitos ensaios com diferentes condições para a purificação de IgG de soro humano por cromatografia de afinidade. Pacientes nos períodos indeterminado e cardíaco podem apresentar todas as subclasses de IgG, sendo a IgG4 menos reativa aos antígenos do *T. cruzi* (Hernandez-Bercerril *et al.*, 2001; Romeiro *et al.*, 1984). As moléculas do parasito podem ser reconhecidas por mais de uma subclasse ou apresentar restrição a apenas uma (Spinella *et al.*, 1992; Pereira *et al.*, 2003; Flechas *et al.*, 2009). Dessa forma, neste trabalho, foram utilizadas colunas de proteína G, um receptor Fc tipo III capaz de adsorver todas as subclasses de IgG humana ao interagir preferencialmente com a porção Fc destas proteínas (Björck & Kronvall, 1984; Villens & Toomik, 1993; Lund *et al.*, 2011). Neste processo, os domínios C1, C2 e C3 das proteínas G se ligam na região entre os domínios de imunoglobulina da cadeia pesada C_H2 e C_H3 (Stone *et al.*, 1989; Sauer-Eriksson *et al.*, 1995). A ligação da proteína G à porção Fab (*fragment antigen binding*) de IgG humana também pode ocorrer e provavelmente decorre da interação entre os domínios C3 e C_H1, como observado para o mesmo isotipo de camundongos (Derrick & Wigley, 1994; Enrtell *et al.*, 1988). Uma vez que o fabricante da coluna não informa os domínios presentes na proteína G imobilizada, é importante ressaltar que já foi descrita uma isoforma dessa proteína, a qual contém dois domínios de ligação para IgG, B1 e B2 (Fahnestock *et al.*, 1986; Gornenborn & Clore, 1993). Estes possuem estruturas primárias idênticas aos domínios C1 e C3, respectivamente (Sauer-Eriksson *et al.*, 1995). A proteína G se liga com maior afinidade à porção Fc em comparação à Fab, o que pode ter ocasionado os arrastes observados nos picos eluídos com 0,1 M de glicina pH 2,7 (**Figura 4.8**). Por outro lado, assim como ocorre no reconhecimento de IgG por receptores humanos Fc γ III (Fc γ RIII), a glicosilação influencia na afinidade da proteína G ao anticorpo (Radaev & Sun, 2001). Na ausência desta modificação pós-traducional, a capacidade de ligação da proteína G

à IgG pode ser reduzida em duas vezes (Radaev & Sun, 2001). Em Fc γ RIII, a interação é dependente da glicosilação do domínio C_H2, de modo que variações na composição de carboidratos podem modular esse processo (Ferrara *et al.*, 2011; Nimmerjahn *et al.*, 2007; Krapp *et al.*, 2003; Radaev & Sun, 2001; revisto em Jefferis & Lund, 2002). Assim como a Fc, a porção Fab também possui sítios de glicosilação, no entanto as glicofornas adicionadas às duas porções geralmente diferem e podem ser alteradas de acordo com circunstâncias fisiológicas e/ou patológicas (revisto em Vidarsson *et al.*, 2014). Dessa forma, a variabilidade dos complexos glicídicos e a diversidade de populações de IgG presentes no soro podem ter influenciado a afinidade entre a proteína G e os seus ligantes, contribuindo para gerar o arraste. Dentre as condições avaliadas, a maior eficiência na dessorção do analito foi alcançada com 0,1 M de glicina pH 2,1 (**Figura 4.8**), sendo este escolhido como tampão padrão para a etapa de eluição.

Na separação por SDS-PAGE das proteínas presentes nas frações coletadas na coluna de proteína G e na cromatografia de exclusão molecular, foram detectadas cadeias polipeptídicas na faixa de massa molecular superior ao esperado. Além das cadeias pesada e leve de IgG, a análise por MALDI-TOF/TOF dessas bandas resultou na identificação de proteínas com motivos imunoglobulina-símile, especialmente C1, característico do domínio constante de anticorpo. O domínio imunoglobulina é mais frequente em proteínas envolvidas na resposta imune e está associado principalmente ao reconhecimento de moléculas na superfície celular (revisto em Williams & Barclay, 1988). Apesar de se encontrarem na região do gel acima de 66 kDa, nenhuma dessas proteínas possui massa molecular maior que 56,5 kDa (**Tabela 4.1**). A presença das cadeias leve e pesada de IgG nessas bandas pode ser devido à variação na sua porção glicídica, que pode representar de 4 a 18% da glicoproteína (Mimura *et al.*, 2007; revisto em Vidarsson *et al.*, 2014). Além de contribuir para aumentar a massa molecular, os carboidratos podem interferir na interação de moléculas de SDS com os aminoácidos, modificando o padrão de migração da proteína (Righetti *et al.*, 2001; Hames, 1998). Possivelmente, o mesmo efeito ocorreu com os contaminantes, visto que diferentes proteínas apresentam essa modificação pós-traducional nos seus domínios de imunoglobulina, que podem possuir até seis sítios de glicosilação (revisto em Barclay, 2003). O MALDI-TOF/TOF possui alta sensibilidade, no entanto, a cocristalização da amostra com a matriz geralmente resulta em uma distribuição heterogênea das cadeias polipeptídicas ou na supressão de sinal destas, o que pode interferir na detecção e, principalmente, na quantificação dessas moléculas (revisto em Duncan *et al.*, 2008). Desta forma, para conseguir

determinar o máximo de possíveis contaminantes e o grau de homogeneidade após a cromatografia de afinidade, uma amostra purificada de paciente em estágio C foi analisada no espectrômetro de massas *Q Exactive Plus Orbitrap* seguindo a abordagem *shotgun*. Este equipamento possui alta acurácia e resolução, sendo capaz de detectar cadeias polipeptídicas em um amplo intervalo dinâmico (Michalski *et al.*, 2011; Eliuk & Marakov, 2015). Assim, foram identificadas proteínas fora do espectro de interesse, como albumina, haptoglobina, C3, C1q, apolipoproteína; estas são comumente encontradas em altas concentrações no plasma humano (revisto em Anderson & Anderson, 2002), o que dificulta a sua eliminação no processo de purificação, entretanto, menos de 3% de identificações corresponderam a contaminantes, o que demonstra uma alta eficiência na purificação de IgG pela coluna de proteína G utilizada. Nessa análise, a maioria dos contaminantes possuía massa molecular menor que 66 kDa.

Os soros de indivíduos saudáveis e infectados resultaram em baixa variação na quantidade de amostra purificada e perfis eletroforéticos. Porém, foi observada uma diferença na intensidade e tamanho das bandas correspondentes, provavelmente causadas pela interferência da porção glicídica das IgGs, que podem variar entre os indivíduos e sofrer influência de outros fatores, como mencionado anteriormente. A reatividade das amostras purificadas a proteínas de formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Y do *T. cruzi* foram primeiramente avaliadas por *western blot*. Neste ensaio, ficou evidente a diferença da capacidade de reconhecimento de proteínas do parasito pelas IgGs de indivíduos saudáveis ou infectados. Assim, a etapa seguinte consistiu na captação das proteínas imunorreativas por imunoprecipitação realizada com *beads* magnéticas. Dado que estas partículas são recobertas por proteínas G e que a proporção de antígenos e IgG reativas presentes nos extratos proteicos e amostras purificadas, respectivamente, são desconhecidos, diferentes relações de concentração de anticorpo e quantidade de proteínas totais aplicadas no ensaio foram avaliadas para a otimização do reconhecimento e detecção das proteínas imunorreativas presentes nas amostras.

As frações teoricamente contendo proteínas retidas dos experimentos de imunoprecipitação feitos com *cross-linking* não apresentaram cadeias polipeptídicas detectadas em SDS-PAGE, independente da quantidade de anticorpo e proteínas do parasito adicionadas e das condições de incubação. A imobilização covalente das IgGs foi realizada pelo agente de *cross-linking* DMP, como recomendado pelo fabricante das *beads* magnéticas. Cada extremidade dessa molécula possui um grupamento imidoéster que reage com grupos

amina, formando ligações estáveis de amidina (Hermanson, 1996). No pH 8,9, utilizado nos experimentos, o DMP reage preferencialmente com ϵ -amina de lisina (Hunter & Ludwig, 1962). Embora este reagente seja extensivamente utilizado nos ensaios de imunoprecipitação, os nossos resultados sugerem uma possível interferência da realização de *cross-linking* no reconhecimento de antígenos pelos anticorpos, o que suporta a redução de atividade dos anticorpos observada por Bergström e Mandenius (2011). Possivelmente, essa reação pode ter alterado a conformação da IgG, reduzindo a sua afinidade ao epitopo. O aumento da oferta de antígenos poderia ter viabilizado um melhor rendimento na imunoprecipitação; entretanto, frente ao nosso desenho experimental, um maior volume de amostra por ensaio seria inviável devido ao método de obtenção do parasito. Alternativamente, não podemos excluir a possibilidade de reações de *cross-linking* terem ocorrido intraproteína, inclusive nas CDR (*complementarity determining region*). Apesar da ocorrência de lisina ser menos abundante nessas sequências, foi demonstrado que na CDR3 da cadeia pesada de humanos, associada à especificidade e afinidade da interação antígeno-anticorpo, esse aminoácido possui maior frequência em relação às de camundongo (Shi *et al.*, 2014). O monitoramento por SDS-PAGE das frações eluídas acusou a formação de complexos na ausência de *cross-linking*, reforçando a hipótese de esta reação alterar o processo de reconhecimento.

Nos ensaios realizados com o protocolo sem *cross-linking*, a concentração de anticorpo apresentou maior influência sobre a capacidade de detecção das proteínas imunorreativas no passo seguinte, modulando o resultado de maneira independente à proporção de proteínas do parasito aplicada. Como a padronização da imunoprecipitação foi realizada com amostra purificada de paciente cardiopata em estágio C, concluiu-se que a quantidade de anticorpo reativa às proteínas do *T. cruzi* representava uma fração muito pequena da população total de IgG. Desta forma, para este estudo, foi necessário aumentar o volume de *beads* magnéticas para 10 μ L. Paralelamente, para potencializar a formação de complexos, a incubação de IgG com o extrato proteico do parasito foi realizada a 37 °C. Sob essas condições, as proteínas extraídas com a solução de lise 2 não foram capazes de interagir inespecificamente com as *beads* magnéticas, sendo as proteínas identificadas na fração retida deste experimento correspondentes à contaminação, especialmente por queratina.

Assim como observado nos ensaios de *western blot*, na imunoprecipitação foi detectado o reconhecimento inespecífico de proteínas da forma tripomastigota sanguínea por IgG provenientes de soros controle. Outros estudos também já descreveram reações cruzadas de anticorpos de doadores saudáveis, inclusive de áreas não endêmicas, com proteínas do *T.*

cruzi, como HSP (*heat shock protein*) 70 e um peptídeo sintetizado a partir de sequências repetidas da proteína ribossomal 60S L19 (Requena *et al.*, 1993; Saba *et al.*, 2013). De acordo com os nossos resultados, as amostras purificadas de controles levaram à maior identificação de proteínas envolvidas em vias da biossíntese proteica, além de proteínas do metabolismo energético. Porém mais estudos são necessários para entender a base dessa reatividade, incluindo saber se o reconhecimento ocorre em regiões conservadas entre patógenos. Apesar desse evento, as IgG de pacientes, especialmente nos casos de lesão cardíaca diagnosticada, foram capazes de resultar em maiores quantidades de proteínas imunorreativas identificadas. A amostra purificada do paciente que obteve baixa marcação no ensaio de *western blot*, restrita a apenas uma banda, resultou na formação de complexos na imunoprecipitação, porém foi observado um menor rendimento de proteínas de *Trypanosoma* sp. em relação às demais amostras purificadas de indivíduos com a mesma classificação clínica. A diferença nos resultados de reatividade entre as duas técnicas está associada às condições distintas de desnaturação empregadas nos experimentos. No *western blot*, o reconhecimento das cadeias polipeptídicas se limita aos epítopos contínuos, o que pode não ser reproduzido na ausência da desnaturação proteica (Forsström *et al.*, 2015; Zhou *et al.*, 2007). Entretanto, estes dados demonstram que o *western blot* atuou como um bom indicador da capacidade de reatividade das amostras. Nesse experimento, proteínas com cerca de 97, 45 e 30 kDa apresentaram marcações mais frequentes e com maior intensidade. Porém o extrato do parasito possui uma grande quantidade de glicoproteínas, o que dificulta fazer um paralelo com as identificações de LC-MS/MS.

Imunoglobulinas G de camundongos foram identificadas em todas as frações retidas, com exceção das adquiridas nos ensaios de ligação inespecífica; diante da ausência de interação com a matriz, a presença destas proteínas nas frações retidas indica uma diferença de especificidade de epítopo em relação aos anticorpos de origem humana. É importante frisar que contaminações interamostras durante as análises no espectrômetro de massas foram eliminadas a partir de dois passos de lavagens com 80% de tampão B (0,1% de ácido fórmico em acetonitrila), os quais foram suficientes para remover proteínas ainda presentes na coluna cromatográfica.

Dentre as proteínas que foram detectadas reprodutivelmente com maior abundância nas frações retidas com IgG de pacientes, cinco são reconhecidas apenas mediante a presença de infecção. Estas correspondem à HSP70 (*heat shock protein*) e quatro glicoproteínas de superfície (parcial, 85 kDa, Tc-85/32 e Tc-85/35). Interessantemente, outras variações da

HSP70 se mostraram diferencialmente abundantes nas frações obtidas nos ensaios feitos com amostras purificadas de doadores saudáveis, sugerindo que a reação cruzada de epitopos conformacionais pode ser restrita a algumas populações proteicas dessa família. As glicoproteínas 85 kDa, Tc-85/32 e Tc-85/35 pertencem à família de gp85/trans-sialidases, que são expressas somente na forma infectante do parasito, estando envolvidas no processo de invasão da célula hospedeira (revisto em Alves & Colli, 2008). Este evento pode ser facilitado a partir da interação da sequência FLY, conservada nessas glicoproteínas, com filamentos intermediários, os quais são reorganizados frente à consequente sinalização de desfosforilação (Magdesian *et al.*, 2007; revisto em Alves & Mortara, 2009). Além disso, o domínio FLY pode promover adesão ao se ligar a moléculas da matriz extracelular. Esses fatores provavelmente estão relacionados à capacidade desse motivo em influenciar a distribuição e tropismo dos parasitos, sendo observada uma maior ligação ao endotélio do tecido cardíaco (Tonelli *et al.*, 2010; Mattos *et al.*, 2014). A glicoproteína parcial provavelmente também corresponde a um fator de virulência devido a sua atividade de sialidase. Diante desses dados, as glicoproteínas se mostraram bons candidatos a marcadores da doença de Chagas. Entretanto, devido ao alto polimorfismo desses genes, mais estudos são necessários para testar esta hipótese.

Como o objetivo principal deste trabalho consiste na identificação de potenciais biomarcadores de progressão de lesão cardíaca, as diferenças quantitativas das proteínas identificadas pelas formas clínicas também foram avaliadas. Na comparação entre amostras de origem indeterminada e B1, oito proteínas foram detectadas com abundância relativa acima de duas vezes neste estágio da infecção. Entretanto, duas destas proteínas chamaram atenção por superarem a diferença quantitativa em mais de trinta vezes. Tais proteínas correspondem a variações da CAP5.5 associada ao citoesqueleto, caracterizadas como calpaína-símile por apresentarem homologia com o domínio II responsável pela atividade cisteíno-protease das calpaínas (Hertz-Fowler *et al.*, 2001; Ersfeld *et al.*, 2005). Nos tripanossomatídeos, a similaridade dessas sequências costuma ser em torno de 45%, de modo que as calpaína-símiles nesses protozoários geralmente não apresentam os resíduos-chave do domínio II. Sendo assim, ainda não se sabe ao certo quais funções moleculares essas proteínas podem desempenhar (Ersfeld *et al.*, 2005). A CAP5.5 foi descrita pela primeira vez em *T. brucei*, onde foi verificada a sua ligação com microtúbulos subpeliculares; a observação de modificações pós-traducionais, como miristoilação, palmitoilação e acilação, indicam que essa proteína também se associa à membrana plasmática, promovendo a organização

adequada do citoesqueleto, inclusive durante a citocinese (Portman & Gull, 2014; Hertz-Fowler *et al.*, 2001). Mediante a sua expressão estágio-específica, os autores têm sugerido que essa proteína pode possuir outras funções além da estrutural (Hertz-Fowler *et al.*, 2001). A detecção de variações da CAP5.5 em formas do *T. cruzi* com propriedades proliferativas distintas suporta essa hipótese (Cordero *et al.*, 2009; Brunoro *et al.*, 2015). Adicionalmente, para outras calpaína-símiles deste parasito, foi descrita uma variação de expressão estimulada por condições de estresse (Giese *et al.*, 2008).

Em comparação às amostras de pacientes no período indeterminado, nove proteínas são pelo menos duas vezes mais abundantes nas frações imunogênicas aos anticorpos de pacientes cardiopatas em estágio C. Entre essas proteínas, três variações da proteína triparedoxina peroxidase e a proteína de superfície TolT se destacaram. A triparedoxina peroxidase é uma enzima anti-oxidante, envolvida na destoxificação de H₂O₂ e ONOO⁻ (Piñeyro *et al.*, 2011), apresentando variações localizadas no citoplasma e na mitocôndria (revisto em Peloso *et al.*, 2016). Como mencionado anteriormente, a cardiomiopatia chagásica é marcada por uma resposta pró-inflamatória intensa. Frente à maior produção de ROS e NO para a eliminação do parasito, entre outras funções, o *T. cruzi* aumenta a sua expressão citosólica e mitocondrial de triparedoxina peroxidase com a finalidade de neutralizar a resposta citotóxica de macrófagos (Gadelha *et al.*, 2013; Alvarez *et al.*, 2011). Em *Leishmania*, a proteína mitocondrial também pode assumir um papel de chaperona (Castro *et al.*, 2011; revisto em Peloso *et al.*, 2016). Durante o estresse oxidativo, somente a proteína presente no citosol é secretada (Gadelha *et al.*, 2013). A proteína de superfície de TolT possui identidade de sequência (32-37%) com a proteína TolA de bactérias Gram-negativas, de modo que também se caracteriza por ser uma molécula imunogênica, capaz de ativar uma resposta pró-inflamatória com envolvimento de células T CD4⁺ (Quanquin *et al.*, 1999).

Ao analisar as frações originárias do reconhecimento de amostras purificadas de B1 *versus* C, as proteínas CAP5.5 associadas ao microtúbulo se mantiveram mais abundantes (> 4,5 vezes) na infecção com menor grau de comprometimento cardíaco, ao passo que as triparedoxinas peroxidases e a proteína de superfície TolT foram detectadas em maior quantidade (> 4,1 vezes) na condição de maior dano no miocárdio. Nessa comparação, mais quatro proteínas apresentaram diferença de expressão reprodutíveis. Assim como em relação às frações imunorreativas às IgG de pacientes do estágio indeterminado, as proteínas hipotética (gi|714001264) (5,5 vezes) e duas variações de trans-sialidase (gi|70860135 e gi|71404821) (2,6 vezes) se mostraram mais abundantes nas frações obtidas a partir da

interação com IgG de pacientes em estágio C, ao passo que a proteína hipotética (gi|71407149) (~5 vezes) foi detectada em maior quantidade nas frações provenientes de ensaios realizados com amostras purificadas de B1. Dessa forma, neste projeto foram identificadas dez proteínas com potencial para serem validadas como biomarcadores de progressão de lesão cardíaca, as quais, em princípio, se mostraram capazes de inclusive diferenciar as classificações do estágio clínico da forma cardíaca da doença de Chagas.

Além de proteínas envolvidas no mecanismo de patogênese, proteínas relacionadas a outras vias, essencialmente à biossíntese proteica, também apresentaram alta frequência de reconhecimento por IgG de pacientes infectados (**Tabelas 4.4 e 4.5**). Em adição às glicoproteínas da família gp85/TS e à HSP70, proteínas ribossomais e a diidropoliamicida acetiltransferase foram detectadas como diferencialmente abundantes em todos os estágios da doença em comparação à condição controle, indicando um efeito de imunodominância destas proteínas em relação às células B. Em *T. cruzi*, o fenômeno de imunodominância é discutido principalmente quanto à resposta de linfócitos T CD8⁺. Esse efeito pode influenciar no estabelecimento de uma resposta adaptativa forte e focada, que resulta na eliminação significativa do parasito. Por outro lado, tem sido proposta a hipótese de que o parasito utiliza a imunodominância como um mecanismo de evadir ao sistema imune; ao limitar a resposta de TCR (*T cell receptor*) a uma pequena fração de proteínas, geralmente trans-sialidases que possuem alto polimorfismo genético (Tzelepis *et al.*, 2008; Rosenberg *et al.*, 2016; revisto em Tarleton, 2007), a expressão de diferentes variações proteicas pode promover a seleção de populações distintas do protozoário, viabilizando a sua persistência no organismo (Tzelepis *et al.*, 2008; Rodrigues *et al.*, 2009). Da mesma forma, a imunodominância de epitopos reconhecidos por BCR (*B cell receptor*) também pode ser um meio desenvolvido pelo parasito para direcionar a resposta humoral para moléculas que tenham menor capacidade de gerar danos celulares (Wrightsmann *et al.*, 1994). Este fundamento torna-se mais interessante mediante a ocorrência de vesículas enriquecidas em subunidades ribossomais, por exemplo (Bayer-Santos *et al.*, 2013). Apesar de terem sido observadas interações inespecíficas com amostras purificadas de doadores saudáveis, mais variações de proteínas ribossomais apresentaram reatividade com anticorpos derivados de indivíduos portadores da doença de Chagas com lesão cardíaca em comparação aos classificados na forma indeterminada. Estas proteínas possuem epitopos contínuos e descontínuos (Carmona *et al.*, 2015), que podem apresentar mimetismo com proteínas próprias do hospedeiro, como a miosina (Kaplan *et al.*, 1997; revisto em Gironès *et al.*, 2005). Desta forma, além de direcionar a resposta humoral

para moléculas solúveis, ao viabilizar a possibilidade de interações cruzadas a proteínas abundantes do hospedeiro, a ação dos anticorpos sobre o parasito é reduzida.

Por fim, este estudo reafirma que ocorre uma alteração do perfil imunogênico ao longo do desenvolvimento da doença de Chagas. Este efeito provavelmente está relacionado à influência mútua do microambiente e da interação parasito-célula hospedeira na modulação proteica dos dois tipos celulares. Assim, embora os principais fatores responsáveis por estimular o perfil pró-inflamatório na fase crônica sintomática da doença ainda sejam desconhecidos, a progressão da lesão tecidual também reflete sobre a resposta humoral à forma tripomastigota sanguínea do *T. cruzi*.

6. Conclusões

- ✓ Uma solução de lise composta por 1% de NP-40, 20 mM de tris, 300 mM de NaCl, 50 mM de KCl, pH 7,5, foi selecionada como solução padrão por apresentar maior capacidade de rendimento e reprodutibilidade na extração proteica de formas tripomastigotas sanguíneas de *T. cruzi*;
- ✓ Para a purificação de IgG humana por cromatografia de afinidade com coluna de proteína G, as etapas de equilíbrio e eluição realizadas com as soluções de 20 mM de fosfato de sódio pH 7 e 0,1 M de glicina pH 2,1, respectivamente, resultaram no melhor perfil de separação proteica, com nível de homogeneidade em torno de 97%;
- ✓ Na imunoprecipitação com *beads* magnéticas de proteína G, as proteínas imunorreativas do parasito foram retidas pelas IgG imobilizadas apenas na ausência da reação de *cross-linking* com DMP. Entre as condições experimentais avaliadas, foi determinada a utilização do volume fixo de 10 µL de *beads* para a adsorção de 65,0 µg de *pool* de IgG purificadas. As proteínas imunorreativas foram retidas a partir da adição 32,5 µg do extrato proteico seguido de incubação a 37 °C por 2 h;
- ✓ Implementou-se com sucesso uma estratégia de identificação e quantificação de proteínas de formas tripomastigotas sanguíneas imunorreativas à IgG de doadores saudáveis e indivíduos infectados em diferentes estágios da doença, utilizando-se espectrometria de massas de alta resolução;
- ✓ Foi observada uma alteração no perfil de reconhecimento de proteínas imunorreativas da forma tripomastigota sanguínea ao longo do desenvolvimento da doença;
- ✓ Dez proteínas identificadas foram encontradas com maior abundância nas frações imunorreativas para IgG oriundas de indivíduos com lesão cardíaca, sendo quatro candidatas a biomarcadores do estágio B1 e seis, do estágio C.

7. Perspectivas

- ✓ Analisar por PCA (*principal components analysis*) as populações proteicas mais abundantes nas extrações obtidas com as diferentes soluções de lise em colaboração com o Dr. Marcelo Ribeiro-Alves;
- ✓ Avaliar o perfil de proteínas reconhecidas somente por IgG derivadas de um determinado estágio da infecção;
- ✓ Verificar e validar por ELISA o emprego das dez proteínas imunorreativas selecionadas como biomarcadores de progressão de lesão cardíaca em colaboração com o grupo da Dra. Yara Gomes e Biomanguinhos.

8. Referências

ABEL, L. C. et al. Chronic Chagas' disease cardiomyopathy patients display an increased IFN-gamma response to *Trypanosoma cruzi* infection. *J Autoimmun*, v. 17, n. 1, p. 99–107, ago. 2001.

ABEL, L. C.; KALIL, J.; CUNHA NETO, E. Molecular mimicry between cardiac myosin and *Trypanosoma cruzi* antigen B13: identification of a B13-driven human T cell clone that recognizes cardiac myosin. *Braz J Med Biol Res*, v. 30, n. 11, p. 1305–8, nov. 1997.

ABUHAB, A. et al. Chagas' cardiomyopathy: the economic burden of an expensive and neglected disease. *Int J Cardiol*, v. 168, n. 3, p. 2375–80, 3 out. 2013.

ABUIN, G.; COLLI, W.; ALVES, M. J. Turnover and shedding of the Tc-85 surface glycoprotein of *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes. *Braz J Med Biol Res*, v. 29, n. 3, p. 335–41, mar. 1996.

ACQUATELLA, H. Echocardiography in Chagas heart disease. *Circulation*, v. 115, n. 9, p. 1124–31, 6 mar. 2007.

ADAD, S. J. et al. Neuron count reevaluation in the myenteric plexus of chagasic megacolon after morphometric neuron analysis. *Virchows Arch Int J Pathol*, v. 438, n. 3, p. 254–8, mar. 2001.

AIELLO, V. D.; DE CAMPOS, F. P. Chronic Chagas cardiomyopathy. *Autops Case Rep*, v. 5, n. 3, p. 7-9, 2015 Jul-Sep 2015.

ALMEIDA, I. C.; GAZZINELLI, R. T. Proinflammatory activity of glycosylphosphatidylinositol anchors derived from *Trypanosoma cruzi*: structural and functional analyses. *J Leuko Biol*, v. 70, n. 4, p. 467–77, out. 2001.

ALVAREZ, M. N. et al. Intraphagosomal peroxynitrite as a macrophage-derived cytotoxin against internalized *Trypanosoma cruzi*: consequences for oxidative killing and role of microbial peroxiredoxins in infectivity. *J Biol Chem*, v. 286, n. 8, p. 6627–40, 25 fev. 2011.

ALVES, C. R. et al. *Trypanosoma cruzi*: attachment to perimicrovillar membrane glycoproteins of *Rhodnius prolixus*. *Exp Parasitol*, v. 116, n. 1, p. 44-52, May 2007.

ALVES, M. J. M.; COLLI, W. Role of the gp85/trans-sialidase superfamily of glycoproteins in the interaction of *Trypanosoma cruzi* with host structures. *Sub-Cell Biochem*, v. 47, p. 58–69, 2008.

ALVES, M. J. M.; MORTARA, R. A. A century of research: what have we learned about the interaction of *Trypanosoma cruzi* with host cells? *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 104, n. Suppl 1, p. 76–88, jul. 2009. AMATO-NETO, V. Etiological treatment for infection by *Trypanosoma cruzi*. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, v. 41, n. 4, p. 211-3, Jul-Aug 1999.

ANCHORDOQUY, T. J. et al. Maintenance of quaternary structure in the frozen state stabilizes lactate dehydrogenase during freeze-drying. *Arch Biochem Biophys*, v. 390, n. 1, p. 35–41, 1 jun. 2001.

ANDERSON, N. L.; ANDERSON, N. G. The human plasma proteome: history, character, and diagnostic prospects. *Mol Cell Proteomics*, v. 1, n. 11, p. 845–67, nov. 2002.

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

ANDRADE, L. O. et al. Differential tissue distribution of diverse clones of *Trypanosoma cruzi* in infected mice. *Mol Biochem Parasitol*, v. 100, n. 2, p. 163-72, May 1999.

ANDRADE, L. O. et al.. *Trypanosoma cruzi*: role of host genetic background in the differential tissue distribution of parasite clonal populations. *Exp Parasitol*, v. 100, n. 4, p. 269-75, Apr 2002.

ANDRADE, J. P. DE et al. [I Latin American guidelines for the diagnosis and treatment of Chagas cardiomyopathy]. *Arq Bras Cardiol*, v. 97, n. 2 Suppl 3, p. 1–48, 2011.

ARAÚJO-JORGE, T. C. et al. Implication of transforming growth factor-beta1 in Chagas disease myocardiopathy. *J Infec Dis*, v. 186, p. 1823-8, 2002.

ARAÚJO-JORGE, T. C. et al. The TGF- β as an emerging target for Chagas disease therapy. *Clin Pharmacol Ther*, v. 92, n. 5, p. 613-21, 2012.

AQUINO, P. F. et al. Are gastric cancer resection margin proteomic profiles more similar to those from controls or tumors?. *J Proteome Res*, v. 11, n. 12, p. 5836-42, 2012.

BARCLAY, A. N. Membrane proteins with immunoglobulin-like domains--a master superfamily of interaction molecules. *Semin Immunol*, v. 15, n. 4, p. 215–23, ago. 2003.

BARLOW, D. J.; EDWARDS, M. S.; THORNTON, J. M. Continuous and discontinuous protein antigenic determinants. *Nature*, v. 322, n. 6081, p. 747–748, 21 ago. 1986.

BARRETTO, A. C. et al. Indeterminate form of Chagas' disease. A polymorphic disease. *Arq Bras Cardiol*, v. 55, n. 6, p. 347–53, dez. 1990.

BASTOS, C. J. et al. Clinical outcomes of thirteen patients with acute chagas disease acquired through oral transmission from two urban outbreaks in northeastern Brazil. *PLoS Negl Trop Dis*, v. 4, n. 6, p. e711, 2010.

BAYER-SANTOS, E. et al. Proteomic analysis of *Trypanosoma cruzi* secretome: characterization of two populations of extracellular vesicles and soluble proteins. *J Proteome Res*, v. 12, n. 2, p. 883–97, 1 fev. 2013.

BELTRÃO, H. E. B. et al. Investigation of two outbreaks of suspected oral transmission of acute Chagas disease in the Amazon region, Para State, Brazil, in 2007. *Trop Doct*, v. 39, n. 4, p. 231-2, Oct 2009.

BENTO CA et al. Glycoinositolphospholipids purified from *Trypanosoma cruzi* stimulate Ig production *in vitro*. *J Immunol*, 157, p. 4996-5001, 1996.

BERGSTRÖM, G.; MANDENIUS, C. F. Orientation and capturing of antibody affinity ligands: Applications to surface plasmon resonance biochips. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, v. 158, n. 1, p. 265–270, 2011.

BERN, C. Chagas' disease. *N Engl J Med*, v. 373, n. 19, p. 1882, 2015.

BESTETTI, R. B.; MUCCILLO, G. Clinical course of Chagas' heart disease: a comparison with dilated cardiomyopathy. *Int J Cardiol*, v. 60, n. 2, p. 187–93, 25 jul. 1997.

BJORCK, L.; KROVALL, G. Purification and some properties of streptococcal protein G, a novel IgG binding reagent. *J Immunol*, v. 133, n. 2, p.969-74, 1984.

BOMBEIRO, A. L. et al. IL-12p40 deficiency leads to uncontrolled *Trypanosoma cruzi* dissemination in the spinal cord resulting in neuronal death and motor dysfunction. *PLoS One*, v. 7, n. 11, p. e49022, 2012.

BOCCHI, E. A. et al. III Brazilian Guidelines on Chronic Heart Failure. *Arq Bras Cardiol*, v. 93, n. 1 Suppl 1, p. 3–70, 2009.

BONNEY, K. M.; ENGMAN, D. M. Chagas heart disease pathogenesis: one mechanism or many? *Curr Mol Med*, v. 8, n. 6, p. 510–8, set. 2008.

BORDA, E. S. et al. *Trypanosoma cruzi* attachment to lymphocyte muscarinic cholinergic and beta adrenergic receptors modulates intracellular signal transduction. *Mol and Biochem*, v. 47, n. 1, p. 91–100, jul. 1991.

BRANDÀN, C. P. et al. *Trypanosoma cruzi*: infectivity modulation of one clone after passages through different hosts. *Exp Parasitol*, v. 114, n. 2, p. 89-93, 2006.

BRENER, Z.; GAZZINELLI, R. T. Immunological control of *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas' disease. *Int Arch Allergy Immunol*, v. 114, n. 2, p. 103–10, out. 1997.

BRUNORO, G. V. F. et al. Reevaluating the *Trypanosoma cruzi* proteomic map: The shotgun description of bloodstream trypomastigotes. *J proteomics*, v. 115, p. 58–65, 6 fev. 2015.

CAETANO, L. C. et al. Exp Parasitol *Trypanosoma cruzi*: Do different sylvatic strains trigger distinct immune responses? *Exp Parasitol*, v. 124, n. 2, p. 219–224, 2010.

CAFORIO, A. L. P. et al. Circulating cardiac autoantibodies in dilated cardiomyopathy and myocarditis: pathogenetic and clinical significance. *Eur J Heart Fail*, v. 4, n. 4, p. 411–7, ago. 2002.

CALZADA, J. E. et al. Chemokine receptor CCR5 polymorphisms and Chagas' disease cardiomyopathy. *Tissue antigens*, v. 58, n. 3, p. 154–8, set. 2001.

CAMARGO, M. M. et al. Glycosylphosphatidylinositol-anchored mucin-like glycoproteins isolated from *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes initiate the synthesis of proinflammatory cytokines by macrophages. *J Immunol*, v. 158, n. 12, p. 5890–901, 15 jun. 1997.

CAMPOS, M. A.; GAZZINELLI, R. T. *Trypanosoma cruzi* and its components as exogenous Mediators Inflamm recognized through Toll-like receptors. *Mediators Inflamm*, v. 13, n. 3, p. 139–43, jun. 2004.

CARDILLO, F. et al. Regulation of *Trypanosoma cruzi* infection in mice by gamma interferon and interleukin 10: role of NK cells. *Infect Immun*, v. 64, n. 1, p. 128–34, jan. 1996.

CARDILLO, F. et al. B cells modulate T cells so as to favour T helper type 1 and CD8+ T-cell responses in the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection. *Immunol*, v. 122, n. 4, p. 584–95, dez. 2007.

CARDILLO, F. et al. Immunity and immune modulation in *Trypanosoma cruzi* infection. *Pathog Dis*, v. 73, n. 9, p. ftv082, dez. 2015.

CARMONA, S. J. et al. Towards High-throughput Immunomics for Infectious Diseases: Use of Next-generation Peptide Microarrays for Rapid Discovery and Mapping of Antigenic Determinants. *Mol Cell Proteomics*, v. 14, n. 7, p. 1871–84, jul. 2015.

CARRASCO, H. A. et al. Prognostic implications of clinical, electrocardiographic and hemodynamic findings in chronic Chagas' disease. *Int J Cardiol*, v. 43, n. 1, p. 27–38, jan. 1994.

CARVALHO, P. C. et al. Search engine processor: Filtering and organizing peptide spectrum matches. *Proteomics*, v. 12, n. 7, p. 944–9, abr. 2012a.

CARVALHO, P. C. et al. PatternLab: from mass spectra to label-free differential shotgun proteomics. *Curr Protocol Bioinf*, v. Chapter 13, p. Unit13.19, dez. 2012b.

CARVALHO, P. C. et al. Integrated analysis of shotgun proteomic data with PatternLab for proteomics 4.0. *Nature protocols*, v. 11, n. 1, p. 102–17, jan. 2016.

CARVALHO, P. C.; YATES, J. R.; BARBOSA, V. C. Improving the TFC test for differential shotgun proteomics. *Bioinformatics*, v. 28, n. 12, p. 1652–4, 15 jun. 2012c.

CASTRO, H. et al. Leishmania mitochondrial peroxiredoxin plays a crucial peroxidase-unrelated role during infection: insight into its novel chaperone activity. *PLoS pathogens*, v. 7, n. 10, p. e1002325, out. 2011.

CESTARI, I. et al. Trypanosoma cruzi immune evasion mediated by host cell-derived microvesicles. *J Immunol*, v. 188, n. 4, p. 1942–52, 15 fev. 2012.

CHAGAS, C. Nova tripanozomíase humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do Schizotrypanum cruzi n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 1, n. 2, p. 159–218, 1909.

CHIALE, P. A. et al. High prevalence of antibodies against beta 1- and beta 2-adrenoceptors in patients with primary electrical cardiac abnormalities. *J Am Coll Cardiol*, v. 26, n. 4, p. 864-9, 1995.

CHUENKOVA, M. V; PEREIRAPERRIN, M. Neurodegeneration and neuroregeneration in Chagas disease. *Adv Parasitol*, v. 76, p. 195–233, 2011.

CLIFFE, L. J. et al. JBP1 and JBP2 Proteins Are Fe²⁺/2-Oxoglutarate-dependent Dioxygenases Regulating Hydroxylation of Thymidine Residues in Trypanosome DNA. *J Biol Chem*, v. 287, n. 24, p. 19886–19895, 2012.

COLLI, W.; ALVES, M. J. Relevant glycoconjugates on the surface of Trypanosoma cruzi. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 94 Suppl 1, p. 37–49, 1999.

CORDEIRO, F. D. et al. Anti-Trypanosoma cruzi immunoglobulin G1 can be a useful tool for diagnosis and prognosis of human Chagas' disease. *Clin Diag Lab Immunol*, v. 8, n. 1, p. 112–8, jan. 2001.

CORDERO, E. M. et al. Proteomic analysis of detergent-solubilized membrane proteins from insect-developmental forms of Trypanosoma cruzi. *J Proteome Res*, v. 8, n. 7, p. 3642–52, jul. 2009.

COSTA, G. C. et al. Functional IL-10 gene polymorphism is associated with Chagas disease cardiomyopathy. *J Infect Dis*, v. 199, n. 3, p. 451–4, 1 fev. 2009.

COURA, J. R. Chagas disease: what is known and what is needed--a background article. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 102 Suppl , n. August, p. 113–122, 2007.

COURA, J. R.; BORGES-PEREIRA, J. Chronic phase of Chagas disease: why should it be treated? A comprehensive review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 106, n. 6, p. 641–5, set. 2011.

COURA, J. R.; DE CASTRO, S. L. A critical review on Chagas disease chemotherapy. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 97, n. 1, p. 3-24, Jan 2002.

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

CREMA, E. et al. Evaluation of cytokines (MIG, IFN-gamma, TNF-alpha, IL-4, IL-5, and IL-10) during the different evolutive phases of chagasic esophagopathy. *Clin Immunol*, v. 119, n. 2, p. 213–8, maio 2006.

CUERVO, P.; DOMONT, G. B.; DE JESUS, J. B. Proteomics of trypanosomatids of human medical importance. *J Proteomics*, v. 73, n. 5, p. 845-67, Mar 2010.

CUNHA-NETO, E. et al. Cardiac gene expression profiling provides evidence for cytokinopathy as a molecular mechanism in Chagas' disease cardiomyopathy. *Am J Pathol*, v. 167, n. 2, p. 305–13, ago. 2005.

DALIRY, A. et al. Levels of circulating anti-muscarinic and anti-adrenergic antibodies and their effect on cardiac arrhythmias and dysautonomia in murine of Chagas disease. *Parasitology*, v. 141, n. 13, p. 1769-78, 2014.

DA MATA, J. R. et al. Trypanosoma cruzi infection and the rat central nervous system: proliferation of parasites in astrocytes and the brain reaction to parasitism. *Brain Res Bull*, v. 53, n. 2, p. 153-62, Sep 2000.

DE ALMEIDA-LEITE, C. M. et al. Sympathetic glial cells and macrophages develop different responses to Trypanosoma cruzi infection or lipopolysaccharide stimulation. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 109, n. 4, p. 459-65, Jul 2014

DE ARAÚJO, F. F. et al. Regulatory T cells phenotype in different clinical forms of Chagas' disease. *PLoS Negl Trop Dis*, v. 5, n. 5, p. e992, 2011.

DE CARVALHO, T. M.; DE SOUZA, W. Early events related with the behaviour of Trypanosoma cruzi within an endocytic vacuole in mouse peritoneal macrophages. *Cell Struct Funct*, v. 14, n. 4, p. 383-92, Aug 1989.

DE SOUZA, W.; DE CARVALHO, T. M. U.; BARRIAS, E. S. Review on Trypanosoma cruzi: Host Cell Interaction. *Int J Cell Biol*, v. 2010, 2010.

DE TITTO, E. H.; ARAUJO, F. G. Serum neuraminidase activity and hematological alterations in acute human Chagas' disease. *Clin Immunol Immunopathol*, v. 46, n. 1, p. 157–61, jan. 1988.

DEGHAIDE, N. H.; DANTAS, R. O.; DONADI, E. A. HLA class I and II profiles of patients presenting with Chagas' disease. *Dig Dis Sci*, v. 43, n. 2, p. 246–52, fev. 1998.

DERRICK, J. P.; WIGLEY, D. B. The third IgG-binding domain from streptococcal protein G. An analysis by X-ray crystallography of the structure alone and in a complex with Fab. *J Mol Biol*, v. 243, n. 5, p. 906–18, 11 nov. 1994.

DHIMAN, M.; GARG, N. J. NADPH oxidase inhibition ameliorates Trypanosoma cruzi-induced myocarditis during Chagas disease. *J Pathol*, v. 225, n. 4, p. 583–96, dez. 2011.

DIAS, J. C. Chagas disease: successes and challenges. *Cad Saude Publica*, v. 22, n. 10, p. 2020-1, Out 2006.

DIAS, J. C. Evolution of Chagas disease screening programs and control programs: historical perspective. *Glob Heart*, v. 10, n. 3, p. 193-202, Sep 2015.

DIAS, J. C.; AMATO NETO, V. Prevention concerning the different alternative routes for transmission of Trypanosoma cruzi in Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*, v. 44 Suppl 2, p. 68-72, 2011.

DIAS, J. C. P.; BRENER, S. Chagas' disease and blood transfusion. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Suppl v. 79, p. 139-47, 1984.

DIAS, W. B. et al. Endothelial cells signalling induced by trans-sialidase from Trypanosoma cruzi. *Cell Microbiol*, v. 10, n. 1, p. 88-99, 2008.

DOSREIS, G. A. Evasion of immune responses by Trypanosoma cruzi, the etiological agent of Chagas disease Evasion of immune responses by Trypanosoma cruzi , the etiological agent of Chagas disease. *Braz J Med Biol Res*, v. 44, n. 2, p. 84–90, 2011.

DUJARDIN, J.-P. et al. The rising importance of Triatoma rubrofasciata. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 110, n. 3, p. 319–323, 2015.

DUNCAN, M. W.; RODER, H.; HUNSUCKER, S. W. Quantitative matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Brif Funct Genomics Proteomics*, v. 7, n. 5, p. 355–70, set. 2008.

DUTRA, W. O. et al. Cellular and genetic mechanisms involved in the generation of protective and pathogenic immune responses in human Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 104 , n. Suppl 1, p. 208–18, jul. 2009.

DUTRA, W. O.; GOLLOB, K. J. Current concepts in immunoregulation and pathology of human Chagas disease. *Curr Opin Infect Dis*, v. 21, n. 3, p. 287–92, jun. 2008.

EKANAYAKE, D.; SABATINI, R. Epigenetic regulation of polymerase ii transcription initiation in trypanosoma cruzi: Modulation of nucleosome abundance, histone modification, and polymerase occupancy by o-linked thymine DNA glucosylation. *Eukaryot Cell*, v. 10, n. 11, p. 1465–1472, 2011.

EKANAYAKE, D. K. et al. Epigenetic regulation of transcription and virulence in Trypanosoma cruzi by O-linked thymine glucosylation of DNA. *Mol Cell Biol*, v. 31, n. 8, p. 1690–1700, 2011.

ELIES, R. et al. Structural and functional analysis of the B cell epitopes recognized by anti-receptor autoantibodies in patients with Chagas' disease. *J Immunol*, v. 157, n. 9, p. 4203–11, 1 nov. 1996.

ELIUK, S.; MAKAROV, A. Evolution of Orbitrap Mass Spectrometry Instrumentation. *Annu Rev Anal Chem*, v. 8, p. 61–80, 2015.

ERNTELL, M. et al. Streptococcal protein G has affinity for both Fab- and Fc-fragments of human IgG. *Mol Immunol*, v. 25, n. 2, p. 121–6, fev. 1988.

ERSFELD, K.; BARRACLOUGH, H.; GULL, K. Evolutionary relationships and protein domain architecture in an expanded calpain superfamily in kinetoplastid parasites. *J Mol Evol*, v. 61, n. 6, p. 742–57, dez. 2005.

ESPINOSA, R. et al. Life expectancy analysis in patients with Chagas' disease: prognosis after one decade (1973-1983). *Int J Cardiol*, v. 8, n. 1, p. 45–56, maio 1985.

FAÇA, V. M. et al. The secretome analysis by high-throughput proteomics and multiple reaction monitoring (MRM). *Methods Mol Biol*, v. 1156, p. 323–35, 2014a.

FAHNESTOCK, S. R. et al. Gene for an immunoglobulin-binding protein from a group G streptococcus. *J Bacteriol*, v. 167, n. 3, p. 870–80, set. 1986.

FELDMAN, S. et al. Evidence that antisulfatide autoantibodies from rats experimentally infected with Trypanosoma cruzi bind to homologous neural tissue. *Parasitol Res*, v. 85, n. 6, p. 446-51, Jun 1999.

FERRARA, C. et al. Unique carbohydrate-carbohydrate interactions are required for high affinity binding between FcγRIII and antibodies lacking core fucose. *Proc Natl Sci U S A*, v. 108, n. 31, p. 12669–74, 2 ago. 2011.

FERREIRA, R. C. et al. Increased plasma levels of tumor necrosis factor-alpha in asymptomatic/“indeterminate” and Chagas disease cardiomyopathy patients. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 98, n. 3, p. 407–11, abr. 2003.

FERREIRA, R. R. et al. Proteins involved in the TGF- β pathway are up-regulated during the acute phase of experimental Chagas disease. *Immunobiology*, v. 221, n. 5, p. 587-94, 2016.

FERREIRA, V. et al. The classical activation pathway of the human complement system is specifically inhibited by calreticulin from *Trypanosoma cruzi*. *J Immunol*, v. 172, n. 5, p. 3042–50, 1 mar. 2004.

FLECHAS, I. D. et al. Characterising the KMP-11 and HSP-70 recombinant antigens’ humoral immune response profile in chagasic patients. *BMC Infect Dis*, v. 9, p. 186, 2009.

FORSSTRÖM, B. et al. Dissecting antibodies with regards to linear and conformational epitopes. *PloS one*, v. 10, n. 3, p. e0121673, 2015.

FRADE, A. F. et al. Genetic susceptibility to Chagas disease cardiomyopathy: involvement of several genes of the innate immunity and chemokine-dependent migration pathways. *BMC Infect Dis*, v. 13, p. 587, 2013.

FREVERT, U.; SCHENKMAN, S.; NUSSENZWEIG, V. Stage-specific expression and intracellular shedding of the cell surface trans-sialidase of *Trypanosoma cruzi*. *Infect Immun*, v. 60, n. 6, p. 2349–60, jun. 1992.

GADELHA, F. R. et al. Release of the cytosolic tryparedoxin peroxidase into the incubation medium and a different profile of cytosolic and mitochondrial peroxiredoxin expression in H₂O₂-treated *Trypanosoma cruzi* tissue culture-derived trypomastigotes. *Exp Parasitol*, v. 133, n. 3, p. 287–93, mar. 2013.

GARCIA-SILVA, M. R. et al. Gene expression changes induced by *Trypanosoma cruzi* shed microvesicles in mammalian host cells: relevance of tRNA-derived halves. *BioMed Res Int*, v. 2014, p. 305239, 2014.

GEA, S. et al. Chagas' disease cardioneuropathy: association of anti-*Trypanosoma cruzi* and anti-sciatic nerve antibodies. *Am J Trop Med Hyg*, v. 49, n. 5, p. 581-8, Nov 1993.

GIESE, V. et al. *Trypanosoma cruzi*: a stage-specific calpain-like protein is induced after various kinds of stress. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 103, n. 6, p. 598–601, set. 2008.

GIORDANENGO, L. et al. Anti-galectin-1 autoantibodies in human *Trypanosoma cruzi* infection: differential expression of this beta-galactoside-binding protein in cardiac Chagas’ disease. *Clin Exp Immunol*, v. 124, n. 2, p. 266–73, maio 2001.

GIRONÈS, N.; CUERVO, H.; FRESNO, M. Trypanosoma cruzi-induced molecular mimicry and Chagas' disease. *Curr Top Microbiol Immunol*, v. 296, p. 89–123, 2005.

GIRONÈS, N.; FRESNO, M. Etiology of Chagas disease myocarditis: autoimmunity, parasite persistence, or both? *Trends in Parasitol*, v. 19, n. 1, p. 19–22, jan. 2003.

GOIN, J. C. et al. Cardiac M(2) muscarinic cholinceptor activation by human chagasic autoantibodies: association with bradycardia. *Heart (British Cardiac Society)*, v. 82, n. 3, p. 273–8, set. 1999.

GOMES, J. A. S. et al. Evidence that development of severe cardiomyopathy in human Chagas' disease is due to a Th1-specific immune response. *Infect Immun*, v. 71, n. 3, p. 1185–93, mar. 2003.

GOLGHER, D.; GAZZINELLI, R. T. Innate and acquired immunity in the pathogenesis of Chagas disease. *Autoimmunity*, v. 37, n. 5, p. 399-405, 2004.

GONÇALVES, M. F. et al. Trypanosoma cruzi: shedding of surface antigens as membrane vesicles. *Exp Parasitol*, v. 72, n. 1, p. 43–53, jan. 1991.

GONÇALVES, R. L. S. et al. A comparative assessment of mitochondrial function in epimastigotes and bloodstream trypomastigotes of Trypanosoma cruzi. *J Bioenerg Biomembr*, v. 43, n. 6, p. 651–61, dez. 2011.

GÖRG, A. et al. The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis*, v. 21, n. 6, p. 1037–53, abr. 2000.

GRONENBORN, A. M.; CLORE, G. M. Identification of the contact surface of a streptococcal protein G domain complexed with a human Fc fragment. *J Mol Biol*, v. 233, n. 3, p. 331–5, 5 out. 1993.

GUEDES, P. M. M. et al. IL-17 produced during Trypanosoma cruzi infection plays a central role in regulating parasite-induced myocarditis. *Plos Negl Trop Dis*, v. 4, n. 2, p. e604, 2010.

GUPTA, S.; WEN, J.-J.; GARG, N. J. Oxidative stress in Chagas disease. *Interdiscip Perspect Infect Dis*, v. 2009, p. 190354, 2009.

GUTIERREZ, F. R. S. et al. The effects of nitric oxide on the immune system during Trypanosoma cruzi infection. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 104, n. Suppl 1, p. 236–45, jul. 2009a.

GUTIERREZ, F. R. et al. The role of parasite persistence in the pathogenesis of Chagas disease. *Parasite Immunol*, v. 31, n. 11, p. 673-85, 2009b.

HABIB, F. M. et al. Tumour necrosis factor and inducible nitric oxide synthase in dilated cardiomyopathy. *Lancet*, v. 347, n. 9009, p. 1151–5, 27 abr. 1996.

HAGGER, R. et al. A deficiency of interstitial cells of Cajal in Chagasic megacolon. *J Auton Nerv Syst*, v. 80, n. 1-2, p. 108–11, 12 abr. 2000.

HAMES, B. D. Gel Electrophoresis of proteins: a practical approach. 3rd Ed. New York: Oxford University Press, 1998.

HENRIQUES-PONS, A. et al. Evidence for a perforin-mediated mechanism controlling cardiac inflammation in *Trypanosoma cruzi* infection. *Int J Exp Path*, v. 83, p. 67–79, 2002.

HENRIQUES-PONS, A.; GOMES M. P. V. F. Targeting T Cells to Treat *Trypanosoma cruzi*-Induced Myocarditis, Diagnosis and Treatment of Myocarditis, Prof. Jose Milei (Ed.), InTech, 2013.

HERMANSON, G. T. Bioconjugate techniques. San Diego: Elsevier, 1996.

HERNÁNDEZ-BECERRIL, N. et al. IgG subclass reactivity to *Trypanosoma cruzi* in chronic chagasic patients. *Archivos de cardiología de México*, v. 71, n. 3, p. 199–205, 2001.

HERTZ-FOWLER, C.; ERSFELD, K.; GULL, K. CAP5.5, a life-cycle-regulated, cytoskeleton-associated protein is a member of a novel family of calpain-related proteins in *Trypanosoma brucei*. *Mol and Biochem*, v. 116, n. 1, p. 25–34, ago. 2001.

HIGUCHI, M. DE L. et al. Immunohistochemical characterization of infiltrating cells in human chronic chagasic myocarditis: comparison with myocardial rejection process. *Virchows Arch. A Pathol anat histopathol*, v. 423, n. 3, p. 157–60, 1993.

HIGUCHI, M. DE L. et al. Pathophysiology of the heart in Chagas' disease: current status and new developments. *Cardiovas res*, v. 60, n. 1, p. 96–107, 15 out. 2003.

HÖLSCHER, C. et al. Defective nitric oxide effector functions lead to extreme susceptibility of *Trypanosoma cruzi*-infected mice deficient in gamma interferon receptor or inducible nitric oxide synthase. *Infect immun*, v. 66, n. 3, p. 1208–15, mar. 1998.

HÖLSCHER, C. et al. Tumor necrosis factor alpha-mediated toxic shock in *Trypanosoma cruzi*-infected interleukin 10-deficient mice. *Infect immun*, v. 68, n. 7, p. 4075–83, jul. 2000.

HUNTER, M. J.; LUDWIG, M. L. The Reaction of Imidoesters with Proteins and Related Small Molecules. *J. Am. Chem. Soc.*, v. 84, n. 18, p. 3491–3504, 1962.

JAMES, S. L. Role of nitric oxide in parasitic infections. *Microbiol rev*, v. 59, n. 4, p. 533–47, dez. 1995.

JEFFERIS, R.; LUND, J. Interaction sites on human IgG-Fc for Fcγ₂R: current models. *Immunol letters*, v. 82, n. 1-2, p. 57–65, 3 jun. 2002.

JOINER, K. et al. Evasion of alternative complement pathway by *Trypanosoma cruzi* results from inefficient binding of factor B. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 83, n. 17, p. 6593–7, set. 1986.

JURBERG, J.; GALVÃO, C. Biology, ecology, and systematics of Triatominae (Heteroptera, Reduviidae), vectors of Chagas disease, and the implications for humans. Festschrift zum 70. Geburtstag von Ernst Heiss. Denisia 19, zugleich Kataloge der OÖ. Landesmuseen Neue Serie 50. Linz: v. 19, p. 1095-1116.

KAPLAN, D. et al. Antibodies to ribosomal P proteins of *Trypanosoma cruzi* in Chagas disease possess functional autoreactivity with heart tissue and differ from anti-P autoantibodies in lupus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 94, n. 19, p. 10301–6, 16 set. 1997.

KIERSZENBAUM, F. et al. Trypanosomal immunosuppressive factor: a secretion product(s) of *Trypanosoma cruzi* that inhibits proliferation and IL-2 receptor expression by activated human peripheral blood mononuclear cells. *J immunol*, v. 144, n. 10, p. 4000–4, 15 maio 1990.

KIERSZENBAUM, F.; FRESNO, M.; SZTEIN, M. B. The *Trypanosoma cruzi* membrane glycoprotein AGC10 inhibits human lymphocyte activation by a mechanism preceding translation of both, interleukin-2 and its high affinity receptor subunits. *Mol Biochem Parasitol*, v. 125, n. 1-2, p. 91-101, 2002.

KÖBERLE, F.. The Causation and Importance of Nervous Lesions in American Trypanosomiasis. *Bull World Health Organ*, n. 1947, p. 739–743, 1970.

KOEBERLE, F. ENTEROMEGALY AND CARDIOMEGALY IN CHAGAS DISEASE. *Gut*, v. 4, p. 399–405, dez. 1963.

KRAPP, S. et al. Structural analysis of human IgG-Fc glycoforms reveals a correlation between glycosylation and structural integrity. *J mol biol*, v. 325, n. 5, p. 979–89, 31 jan. 2003.

KRETTLI, A. U.; BRENER, Z. Resistance against *Trypanosoma cruzi* associated to anti-living trypomastigote antibodies. *J immunol*, v. 128, n. 5, p. 2009–12, maio 1982.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, v. 227, n. 5259, p. 680–5, 1970.

LAGUENS, R. P. et al. Presence of antiheart and antiskeletal muscle glycolipid autoantibodies in the sera of patients with chagasic cardiopathy. *Can j cardiol*, v. 10, n. 7, p. 769–76, set. 1994.

LAUCELLA, S. A.; DE TITTO, E. H.; SEGURA, E. L. Epitopes common to *Trypanosoma cruzi* and mammalian tissues are recognized by sera from Chagas' disease patients: prognosis value in Chagas disease. *Acta Trop*, v. 62, n. 3, p. 151-62, Dec 1996.

LEE, B. Y. et al. Global economic burden of Chagas disease: a computational simulation model. *Lancet Infect dis*, v. 13, n. 4, p. 342–8, abr. 2013.

LEGUIZAMÓN, M. S. et al. Antibodies inhibiting *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase activity in sera from human infections. *J infect dis*, v. 170, n. 6, p. 1570–4, dez. 1994.

LEGUIZAMÓN, M. S. et al. Trans-sialidase from *Trypanosoma cruzi* induces apoptosis in cells from the immune system in vivo. *J infect dis*, v. 180, n. 4, p. 1398–402, out. 1999.

LEIROS, C. P. et al. Desensitization and sequestration of human m2 muscarinic acetylcholine receptors by autoantibodies from patients with Chagas' disease. *J biol chem*, v. 272, n. 20, p. 12989–93, 16 maio 1997.

LESCURE, F. X. et al. Chagas disease: Changes in knowledge and management. *Lancet Infect dis*, v. 10, n. 8, p. 556–570, 2010.

LLOYD, J. B.; MASON, R. W. *Subcellular Biochemistry: Biology of lysosome*. New York: Plenum, 1996. V. 27.

LULA, J. F. et al. Plasma concentrations of tumour necrosis factor-alpha, tumour necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand, and FasLigand/CD95L in patients with Chagas cardiomyopathy correlate with left ventricular dysfunction. *Eur j heart fail*, v. 11, n. 9, p. 825–31, set. 2009.

LUND, L. N. et al. Exploring variation in binding of Protein A and Protein G to immunoglobulin type G by isothermal titration calorimetry. *J mol recognit*, v. 24, n. 6, p. 945–52, 2011.

MACHADO, F. S. et al. *Trypanosoma cruzi*-infected cardiomyocytes produce chemokines and cytokines that trigger potent nitric oxide-dependent trypanocidal activity. *Circulation*, v. 102, n. 24, p. 3003–8, 12 dez. 2000.

MACHADO, F. S. et al. Current understanding of immunity to *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas disease. *Semin Immunopathol*, v. 34, n. 6, p. 753-70, Nov 2012.

MADALOSSO, G. et al. Chagasic meningoencephalitis: case report of a recently included AIDS-defining illness in Brazil. *Rev Inst Med Trop S P*, v. 46, n. 4, p. 199-202, 2014.

MADY, C.; NACRUTH, R. Natural history of chronic Chagas' heart disease: prognosis factors. *São Paulo Med J*, v. 113, n. 2, p. 791-6, 1995.

MAGALHÃES, J. B.; ANDRADE, S. G.; SHERLOCK, I. Trypanosoma cruzi strains: behavior after passage into autochthonous or foreign species of tritomine (biological and biochemical patterns). *Rev Inst Med Trop São Paulo*, v. 38, n. 1, p. 23-8, 1996.

MAGDESIAN, M. H. et al. A conserved domain of the gp85/trans-sialidase family activates host cell extracellular signal-regulated kinase and facilitates Trypanosoma cruzi infection. *Exp cell res*, v. 313, n. 1, p. 210-8, 1 jan. 2007.

MARTINS, G. A. et al. Fas-FasL interaction modulates nitric oxide production in Trypanosoma cruzi-infected mice. *Immunol*, v. 103, n. 1, p. 122-9, maio 2001.

MASCARO-BLANCO, A. et al. Consequences of unlocking the cardiac myosin molecule in human myocarditis and cardiomyopathies. *Autoimmunity*, v. 41, n. 6, p. 442-53, set. 2008.

MATSUDA, N. M.; MILLER, S. M.; EVORA, P. R. B. The chronic gastrointestinal manifestations of Chagas disease. *Clinics*, v. 64, n. 12, p. 1219-24, 2009.

MATTOS, E. C. et al. The Gp85 surface glycoproteins from Trypanosoma cruzi. *Sub-cell biochem*, v. 74, p. 151-80, 2014.

MENNA-BARRETO, R. F. S. et al. A proteomic analysis of the mechanism of action of naphthoimidazoles in Trypanosoma cruzi epimastigotes in vitro. *J proteomics*, v. 73, n. 12, p. 2306-15, 10 nov. 2010.

MENEZES, C. et al. Clinical aspects of Chagas disease and implications for novel therapies. *Drug Dev Res*, v. 72, n. 6, p. 471-479, Sep 2011.

MICHALSKI, A. et al. Mass spectrometry-based proteomics using Q Exactive, a high-performance benchtop quadrupole Orbitrap mass spectrometer. *Mol Cell proteomics*, v. 10, n. 9, p. M111.011015, set. 2011.

MIMURA, Y. et al. Contrasting glycosylation profiles between Fab and Fc of a human IgG protein studied by electrospray ionization mass spectrometry. *J Immunol Methods*, v. 326, n. 1-2, p. 116-26, 30 set. 2007.

MINOPRIO, P. et al. Most B cells in acute Trypanosoma cruzi infection lack parasite specificity. *Scand J Immunol*, v. 28, n. 5, p. 553-61, 1988.

- MOLINA, R. B. G. et al. Dysautonomia and ventricular dysfunction in the indeterminate form of Chagas disease. *Intern j cardiol*, v. 113, n. 2, p. 188–93, 10 nov. 2006.
- MORILLO, C. A. Randomized trial of beznidazole for chronic Chagas' disease. *N Engl J Med*, v. 373, n. 14, p. 1295-306, 2015.
- MOROCOIMA, A.; SOCORRO, G.; ÁVILA, R. Trypanosoma cruzi : experimental parasitism in the central nervous system of albino mice. *Parasitol Res*, p. 2099–2107, 2012.
- MUÑOZ, J. et al. Prevalence and vertical transmission of Trypanosoma cruzi infection among pregnant Latin American women attending 2 maternity clinics in Barcelona, Spain. *Clin infect dis*, v. 48, n. 12, p. 1736–40, 15 jun. 2009.
- MUÑOZ, S. G. S. et al. Distinct patterns of autoantibodies against G-protein-coupled receptors in Chagas' cardiomyopathy and megacolon: their potential impact for early risk assessment in asymptomatic Chagas' patients. *J Am Coll Cardiol*, v. 56, n. 6, p. 526–7, 3 ago. 2010.
- MUÑOZ-FERNÁNDEZ, M. A.; FERNÁNDEZ, M. A.; FRESNO, M. Activation of human macrophages for the killing of intracellular Trypanosoma cruzi by TNF-alpha and IFN-gamma through a nitric oxide-dependent mechanism. *Immunol letters*, v. 33, n. 1, p. 35–40, jun. 1992.
- NARDY, F. A; FREIRE-DE-LIMA, C. G.; MORROT, A. Immune evasion strategies of Trypanosoma cruzi. *J Immunol Res*, v. 2015, p. 178947, 2015.
- NIMMERJAHN, F.; ANTHONY, R. M.; RAVETCH, J. V. Agalactosylated IgG antibodies depend on cellular Fc receptors for in vivo activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 104, n. 20, p. 8433–8437, 2007.
- NOGUEIRA, L. G. et al. Myocardial chemokine expression and intensity of myocarditis in Chagas cardiomyopathy are controlled by polymorphisms in CXCL9 and CXCL10. *PLoS negl trop dis*, v. 6, n. 10, p. e1867, 2012.
- NOGUEIRA, N. F. et al. Trypanosoma cruzi: involvement of glycoinositolphospholipids in the attachment to the luminal midgut surface of Rhodnius prolixus. *Exp Parasitol*, v. 116, n. 2, p. 120-8, Jun 2007.
- NORRIS, K. A. et al. Characterization of a Trypanosoma cruzi C3 binding protein with functional and genetic similarities to the human complement regulatory protein, decay-accelerating factor. *J immunol*, v. 147, n. 7, p. 2240–7, 1 out. 1991.

NOYA, B. A. et al. Orally-transmitted Chagas disease: Epidemiological, clinical, serological and molecular outcomes of a school microepidemic in Chichiriviche de la Costa, Venezuela. *Parasite Epidemiol Contr*, 2016.

NOYA, B. A. et al. Large urban outbreak of orally acquired acute Chagas disease at a school in Caracas, Venezuela. *J Infect Dis*, v. 201, n. 9, p. 1308-15, May 2010.

NUNES, D. F. et al. Troponin T autoantibodies correlate with chronic cardiomyopathy in human Chagas disease. *Trop Med Int*, v. 18, n. 10, p. 1180–92, out. 2013a.

NUNES, M. C. P. et al. Chagas disease: an overview of clinical and epidemiological aspects. *J Am Coll Cardiol*, v. 62, n. 9, p. 767–76, 27 ago. 2013b.

NUNES, M. P. et al. Inhibitory effects of *Trypanosoma cruzi* sialoglycoproteins on CD4⁺ T cells are associated to increased susceptibility to infection. *PLOS ONE*, v. 8, n. 10, p. e77568, 2013c.

NUNES, M. P.; SOBRAL, A. C.; COUTINHO, S. G. Quantification of *Trypanosoma cruzi* in the heart, lymph nodes and liver of experimentally infected mice, using limiting dilution analysis. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 87, n. 4, p. 503–9, 1992.

NUNES, M. O. C. et al. Functional capacity and right ventricular function in patients with Chagas heart disease. *Eur J Echocardiogr*, v. 11, n. 7, p. 590-5, Aug 2010.

OLIVEROS, J. C. Venny. An interactive tool for comparing lists with Venn's diagrams. 2015. Disponível em: < <http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html> >

OSORIO, L. et al. Virulence factors of *Trypanosoma cruzi*: Who is who? *Microbes Infect*, v. 14, n. 15, p. 1390–1402, 2012.

PARADA, H. et al. Clinical and paraclinical differences between chronic Chagas' cardiomyopathy and primary dilated cardiomyopathies. *Arq bras cardiol*, v. 53, n. 2, p. 99–104, ago. 1989.

PARICIO-TALAYERO, J. M. et al. Epidemiological surveillance of vertically-transmitted Chagas disease at three maternity hospitals in the Valencian Community. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, v. 26, n. 10, p. 609-13, Dec 2008.

PARKER, E. R.; SETHI, A. Chagas disease: coming to a place near you. *Dermatol clin*, v. 29, n. 1, p. 53–62, jan. 2011.

PELOSO, E. DE F. et al. Role of *Trypanosoma cruzi* peroxiredoxins in mitochondrial bioenergetics. *J Bioenerg Biomembr*, v. 43, n. 4, p. 419–24, ago. 2011.

PEREIRA, V. R. A. et al. Antibody isotype responses in Balb/c mice immunized with the cytoplasmic repetitive antigen and flagellar repetitive antigen of *Trypanosoma cruzi*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 98, n. 6, p. 823–5, set. 2003.

PÉREZ-FUENTES, R. et al. Severity of chronic Chagas disease is associated with cytokine/antioxidant imbalance in chronically infected individuals. *Int J Parasitol*, v. 33, n. 3, p. 293–9, mar. 2003.

PÉREZ-FUENTES, R. et al. The anti-oxidant defence response in individuals with the indeterminate form of Chagas disease (American trypanosomiasis). *Ann Trop Med Parasitol*, v. 102, n. 3, p. 189–97, abr. 2008.

PIÑEYRO, M. D. et al. Tryparedoxin peroxidases from *Trypanosoma cruzi*: high efficiency in the catalytic elimination of hydrogen peroxide and peroxynitrite. *Arch Biochem Biophys*, v. 507, n. 2, p. 287–95, 15 mar. 2011.

PISSETTI, C. W. et al. Association between the plasma levels of TNF-alpha, IFN-gamma, IL-10, nitric oxide and specific IgG isotypes in the clinical forms of chronic Chagas disease. *Rev Soc Bras Med Trop*, v. 42, n. 4, p. 425–30, 2009.

PITTELLA, J. E. Central nervous system involvement in experimental *Trypanosomiasis cruzi*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 86, n. 2, p. 141-5, 1991 Apr-Jun 1991.

PITTELLA, J. E. H. Central nervous system involvement in Chagas' disease. An updating. *Mem Ins Oswaldo Cruz*, v. 35, n. 2, p. 111-6, 1993.

PORTMAN, N.; GULL, K. Identification of paralogous life-cycle stage specific cytoskeletal proteins in the parasite *Trypanosoma brucei*. *PloS one*, v. 9, n. 9, p. e106777, 2014.

QUANQUIN, N. M. et al. Immunization of mice with a ToLA-like surface protein of *Trypanosoma cruzi* generates CD4(+) T-cell-dependent parasiticidal activity. *Infect Immun*, v. 67, n. 9, p. 4603–12, set. 1999.

RABILLOUD, T. et al. Silver-staining of proteins in polyacrylamide gels: a general overview. *Cell Mol Biol*, v. 40, n. 1, p. 57–75, fev. 1994.

RABILLOUD, T.; CHARMONT, S. Detection of proteins on Two Dimensional Electrophoresis Gels, in *Proteome Research: Two Dimensional Gel Electrophoresis and identification Methods*, Ed. Th. Rabilloud(ed.); Springer Verlag, berlin & Heidelberg, 2000. p. 107-126.

RADAEV, S.; SUN, P. D. Recognition of IgG by Fcγ receptor. The role of Fc glycosylation and the binding of peptide inhibitors. *J Biol Chem*, v. 276, n. 19, p. 16478–83, 11 maio 2001.

RASSI, A.; RASSI, A.; MARIN-NETO, J. A. Chagas disease. *Lancet*, v. 375, n. 9723, p. 1388–1402, 2010.

RASSI, A.; RASSI, A.; RASSI, S. G. Predictors of mortality in chronic Chagas disease: a systematic review of observational studies. *Circulation*, v. 115, n. 9, p. 1101–8, 6 mar. 2007.

RASSI JR, A.; RASSI, A.; MARIN-NETO, J. A. Chagas heart disease: pathophysiologic mechanisms, prognostic factors and risk stratification. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 104, n. Suppl 1, p. 152–8, jul. 2009.

REINA-SAN-MARTÍN, B. et al. A B cell mitogen from a pathogenic trypanosome is a eukaryotic proline racemase. *Nat Med*, v. 6, n. 8, p. 890–7, 2000.

REIS, D. D. et al. Characterization of inflammatory infiltrates in chronic chagasic myocardial lesions: presence of tumor necrosis factor-α+ cells and dominance of granzyme A+, CD8+ lymphocytes. *Am J Trop Hyg*, v. 48, n. 5, p. 637–44, maio 1993.

REIS, M. M. et al. An in situ quantitative immunohistochemical study of cytokines and IL-2R+ in chronic human chagasic myocarditis: correlation with the presence of myocardial *Trypanosoma cruzi* antigens. *Clin Immunol Immunopathol*, v. 83, n. 2, p. 165–72, maio 1997.

REIS, M. M.; HIGUCHI, M. D. L. Fatores de crescimento presentes no miocárdio de pacientes com cardiopatia chagásica crônica Growth factors in the myocardium of patients with chronic chagasic cardiomyopathy. *Rev Soc Bras Med Trop*, v. 33, n. 1996, p. 509–518, 2000.

REQUENA, J. M. et al. Mapping of antigenic determinants of the *T. cruzi* hsp70 in chagasic and healthy individuals. *Mol Immunol*, v. 30, n. 12, p. 1115–21, ago. 1993.

REQUENA-MÉNDEZ, A. et al. Evaluating Chagas disease progression and cure through blood-derived biomarkers: a systematic review. *Expert Rev Anti Infect Ther*, v. 11, n. 9, p. 957–76, set. 2013.

REQUENA-MÉNDEZ, A. et al. Health policies to control Chagas disease transmission in European countries. *PLoS Negl Trop Dis*, v. 8, n. 10, p. e3245, Oct 2014.

REZENDE-OLIVEIRA, K.; SARMENTO, R. R.; RODRIGUES, V. Production of cytokine and chemokines by human mononuclear cells and whole blood cells after infection with *Trypanosoma cruzi*. *Rev Soc Bras Med Trop*, v. 45, n. 1, p. 45–50, fev. 2012.

RIBEIRO, A. L. et al. Diagnosis and management of Chagas disease and cardiomyopathy. *Nature reviews. Cardiol*, v. 9, n. 10, p. 576–89, out. 2012.

RIBEIRO, A. L. P. et al. Early occurrence of anti-muscarinic autoantibodies and abnormal vagal modulation in Chagas disease. *Int J Cardiol*, v. 117, n. 1, p. 59–63, 12 abr. 2007.

RIBEIRO, A. L. P.; ROCHA, M. O. DA C. Forma indeterminada da doença de Chagas: considerações acerca do diagnóstico e do prognóstico. *Rev Soc Bras Med Trop*, v. 31, n. 3, p. 301–314, jun. 1998.

RIGHETTI, P. G.; STOYANOV, A. V.; ZHUKOV, M. Y. The proteome revisited: theory and practice of all relevant electrophoretic steps. 1st Ed. Amsterdam: Elsevier Science, 2001.

RODRIGUES, B. C. G., DE ALENCAR, C. C., TZELEPIS, F. Immunodominance: a new hypothesis to explain escape and host/parasite equilibrium leading to the chronic phase of Chagas disease. *Braz J Med Biol Res*, v. 42, n. 3, p. 220-3, 2008.

RODRIGUES, M. M.; OLIVEIRA, A. C.; BELLIO, M. The Immune Response to *Trypanosoma cruzi*: Role of Toll-Like Receptors and Perspectives for Vaccine Development. *J Parasitol Res*, v. 2012, p. 507874, 2012.

RODRIGUES, V. et al. Fas/Fas-L expression, apoptosis and low proliferative response are associated with heart failure in patients with chronic Chagas' disease. *Microbes Infect*, v. 10, n. 1, p. 29–37, jan. 2008.

RODRÍGUEZ-ANGULO, H. O. et al. Evidence of reversible bradycardia and arrhythmias caused by immunogenic proteins secreted by *T. cruzi* in isolated rat hearts. *PLoS Negl Trop Dis*, v. 9, n. 2, p. e0003512, fev. 2015.

ROMANO, P. S. et al. Molecular and cellular mechanisms involved in the *Trypanosoma cruzi*/host cell interplay. *IUBMB Life*, v. 64, n. 5, p. 387-96, May 2012.

ROMEIRO, S. A.; TAKEHARA, H. A.; MOTA, I. Isotype of lytic antibodies in serum of Chagas' disease patients. *Clin Exp Immunol*, v. 55, n. 2, p. 413–8, fev. 1984.

ROSENBERG, C. S.; DIANA, L. M.; TARLETON, R. L. CD8⁺ T cell specific for immunodominant trans-sialidases epitopes contribute to control *trypanosoma cruzi* but not required for resistance. *J Immunol*, v. 185, p. 560-8, 2016.

SABA, E. S. et al. Anti-Trypanosoma cruzi cross-reactive antibodies detected at high rate in non-exposed individuals living in non-endemic regions: seroprevalence and association to other viral serologies. *PloS one*, v. 8, n. 9, p. e74493, 2013.

SANCHEZ-LERMEN, R. DE L. P. et al. Upper gastrointestinal symptoms and esophageal motility disorders in indeterminate Chagas disease patients. *Rev Soc Bras Med Trop*, v. 40, n. 2, p. 197–203, jan. 2007.

SAUER-ERIKSSON, A. E. et al. Crystal structure of the C2 fragment of streptococcal protein G in complex with the Fc domain of human IgG. *Structure*, v. 3, n. 3, p. 265–78, 15 mar. 1995.

SCHAUB, G. A. Trypanosoma cruzi: quantitative studies of development of two strains in small intestine and rectum of the vector Triatoma infestans. *Exp Parasitol*, v. 68, n. 3, p. 260-73, Apr 1989.

SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. Consenso brasileiro de doença de Chagas. *Rev Soc Bras Med Trop*, v. 38 (supl. III), 2005.

SELA-CULANG, I.; KUNIK, V.; OFRAN, Y. The structural basis of antibody-antigen recognition. *Front Immunol*, v. 4, p. 302, 2013.

SHERBUK, J. E. et al. Biomarkers and mortality in severe Chagas cardiomyopathy. *Global heart*, v. 10, n. 3, p. 173–80, set. 2015.

SHEVCHENKO, A. et al. Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal Chem*, v. 68, n. 5, p. 850–8, 1 mar. 1996.

SHI, B. et al. Comparative analysis of human and mouse immunoglobulin variable heavy regions from IMGT/LIGM-DB with IMGT/HighV-QUEST. *Theor Biol Med Model*, v. 11, p. 30, 2014.

SHIKANAI-YASUDA, M. A.; CARVALHO, N. B. Oral transmission of Chagas disease. *Clin Infect Dis*, v. 54, n. 6, p. 845–52, mar. 2012.

SILVA, G. K. et al. Cutting edge: nucleotide-binding oligomerization domain 1-dependent responses account for murine resistance against Trypanosoma cruzi infection. *J Immunol*, v. 184, n. 3, p. 1148–52, 1 fev. 2010.

SILVA, J. F. et al. Mechanisms of vascular dysfunction in acute phase of Trypanosoma cruzi infection in mice. *Vascul Pharmacol*, 15 mar. 2016.

SILVA, J. S. et al. Interleukin 10 and interferon gamma regulation of experimental Trypanosoma cruzi infection. *J Exp Med*, v. 175, n. 1, p. 169–74, 1 jan. 1992.

SILVA, J. S. et al. Tumor necrosis factor alpha mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* infection in mice by inducing nitric oxide production in infected gamma interferon-activated macrophages. *Infect Immun*, v. 63, n. 12, p. 4862–7, dez. 1995.

SILVA, J. S. et al. The role of IL-12 in experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *Braz J Med Biol Res*, v. 31, n. 1, p. 111–5, jan. 1998.

SILVA, J. S.; TWARDZIK, D. R.; REED, S. G. Regulation of *Trypanosoma cruzi* infections in vitro and in vivo by transforming growth factor beta (TGF-beta). *J Exp Med*, v. 174, n. 3, p. 539–45, 1 set. 1991.

SILVA, R. R. et al. Interferon-Gamma Promotes Infection of Astrocytes by *Trypanosoma cruzi*. *Plos One*, p. 1–23, 2015.

SKYLLOURIOTIS, P. et al. IgG subclass reactivity to human cardiac myosin in cardiomyopathy patients is indicative of a Th1-like autoimmune disease. *Clin Exp Immunol*, v. 115, n. 2, p. 236–47, fev. 1999.

SORIANO-ARANDES, A. et al. Control and Management of Congenital Chagas Disease in Europe and Other Non-Endemic Countries: Current Policies and Practices. *Trop Med Int Health*, 2 mar. 2016.

SOUZA, M. M. DE et al. *Trypanosoma cruzi* Strains and Autonomic Nervous System Pathology in Experimental Chagas Disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 91, n. December 1995, p. 217–224, 1996.

SOUZA, P. E. A. et al. Monocytes from patients with indeterminate and cardiac forms of Chagas' disease display distinct phenotypic and functional characteristics associated with morbidity. *Infect Immun*, v. 72, n. 9, p. 5283–91, set. 2004.

SOUZA, P. E. A. et al. *Trypanosoma cruzi* infection induces differential modulation of costimulatory molecules and cytokines by monocytes and T cells from patients with indeterminate and cardiac Chagas' disease. *Infect Immun*, v. 75, n. 4, p. 1886–94, abr. 2007.

SPINELLA, S.; LIEGEARD, P.; HONTEBEYRIE-JOSKOWICZ, M. *Trypanosoma cruzi*: predominance of IgG2a in nonspecific humoral response during experimental Chagas' disease. *Exp Parasitol*, v. 74, n. 1, p. 46–56, fev. 1992.

STERIN-BORDA, L.; BORDA, E. Role of neurotransmitter autoantibodies in the pathogenesis of chagasic peripheral dysautonomia. *Ann N Y Acad Sci*, v. 917, p. 273–80, 2000.

STONE, G. C. et al. The Fc binding site for streptococcal protein G is in the C gamma 2-C gamma 3 interface region of IgG and is related to the sites that bind staphylococcal protein A and human rheumatoid factors. *J Immunol*, v. 143, n. 2, p. 565–70, 15 jul. 1989.

STRAUSS, G.; HAUSER, H. Stabilization of lipid bilayer vesicles by sucrose during freezing. *Proc Natl Sci U S A*, v. 83, n. 8, p. 2422–6, abr. 1986.

TALVANI, A. et al. Elevated concentrations of CCL2 and tumor necrosis factor-alpha in chagasic cardiomyopathy. *Clin Infect Dis*, v. 38, n. 7, p. 943–50, 1 abr. 2004.

TARDIEUX, I. et al. Lysosome recruitment and fusion are early events required for trypanosome invasion of mammalian cells. *Cell*, v. 71, n. 7, p. 1117-30, Dec 1992.

TARLETON, R. L. Immune system recognition of *Trypanosoma cruzi*. *Curr Opin Immunol*, v. 19, n. 4, p. 430–4, ago. 2007.

TEIXEIRA, A. R. L.; NASCIMENTO, R. J.; STURM, N. R. Evolution and pathology in Chagas disease - A Review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 101, n. 5, p. 463–491, 2006.

TEIXEIRA, A. R. et al. Pathogenesis of chagas' disease: parasite persistence and autoimmunity. *Clin Microbiol Rev*, v. 24, n. 3, p. 592-630, Jul 2011.

TEIXEIRA, A. R. et al. Acquired cell-mediated immunodepression in acute Chagas' disease. *J Clin Invest*, v. 62, n. 6, p. 1132-41, Dec 1978.

TEKIEL, V. S.; MIRKIN, G. A.; GONZALEZ CAPPAS, S. M. Chagas' disease: reactivity against homologous tissues induced by different strains of *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology*, v. 115 (Pt 5), p. 495-502, Nov 1997.

TZELEPIS, F. et al. Infection with *Trypanosoma cruzi* restricts the repertoire of parasite-specific CD8⁺ T cells leading to immunodominance. *J Immunol*, v. 180, n. 3, p. 1737-48, 2008.

TONELLI, R. R. et al. In vivo infection by *Trypanosoma cruzi*: the conserved FLY domain of the gp85/trans-sialidase family potentiates host infection. *Parasitol*, v. 138, n. 4, p. 481–92, abr. 2011.

TORRECILHAS, A. C. et al. Vesicles as carriers of virulence factors in parasitic protozoan diseases. *Microbes Infect*, v. 14, n. 15, p. 1465–74, dez. 2012.

TORRECILHAS, A. C. et al. *Trypanosoma cruzi*: parasite shed vesicles increase heart parasitism and generate an intense inflammatory response. *Microbes Infect*, v. 11, n. 1, p. 29–39, jan. 2009.

TRIBULATTI, M. V. et al. The trans-sialidase from *Trypanosoma cruzi* induces thrombocytopenia during acute Chagas' disease by reducing the platelet sialic acid contents. *Infect Immun*, v. 73, n. 1, p. 201–7, jan. 2005.

UMEZAWA, E. S. et al. Immunoblot assay using excreted-secreted antigens of *Trypanosoma cruzi* in serodiagnosis of congenital, acute, and chronic Chagas' disease. *J Clin Microbiol*, v. 34, n. 9, p. 2143–7, set. 1996.

UNE, C.; ANDERSSON, J.; ORN, A. Role of IFN-alpha/beta and IL-12 in the activation of natural killer cells and interferon-gamma production during experimental infection with *Trypanosoma cruzi*. *Clin Exp Immunol*, v. 134, n. 2, p. 195–201, nov. 2003.

VAN VOORHIS, W. C.; SCHLEKEWY, L.; TRONG H. L. Molecular mimicry by *Trypanosoma cruzi*: the F1-160 epitope that mimics mammalian nerve can be mapped to a 12-amino acid peptide. *Proc Am Natl U S A*, v. 88, n. 14, p. 5993-7, 1991.

VARGAS-ZAMBRANO, J. C. et al. A human astrocytoma cell line is highly susceptible to infection with *Trypanosoma cruzi*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 108, n. April, p. 212–219, 2013.

VASCONCELOS, R. H. T. et al. Increased levels of IgA antibodies against CRA and FRA recombinant antigens of *Trypanosoma cruzi* differentiate digestive forms of Chagas disease. *Hum Immunol*, v. 71, n. 10, p. 964–7, out. 2010.

VASCONCELOS, R. H. T. et al. Interleukin-10 and tumour necrosis factor-alpha serum levels in chronic Chagas disease patients. *Parasite Immunol*, v. 37, n. 7, p. 376–9, jul. 2015.

VICCO, M. H. et al. Assessment of cross-reactive host-pathogen antibodies in patients with different stages of chronic Chagas disease. *Rev Esp cardiol*, v. 66, n. 10, p. 791–6, out. 2013.

VIDARSSON, G.; DEKKERS, G.; RISPENS, T. IgG subclasses and allotypes: from structure to effector functions. *Front Immunol*, v. 5, p. 520, 2014.

VILLEMS, R.; TOOMIK, P. Techniques of affinity chromatography: overview. In: Toni Kline (Ed). *Handbook of affinity chromatography*. New York: Marcel Dekker, Inc, 1993. P. 3-60.

VITELLI-AVELAR, D. M. et al. Strategy to assess the overall cytokine profile of circulating leukocytes and its association with distinct clinical forms of human Chagas disease. *Scandinavian J Immunol*, v. 68, n. 5, p. 516–25, nov. 2008.

WANG, Z. et al. Clinical significance and pathogenic role of anti-cardiac myosin autoantibody in dilated cardiomyopathy. *Chin Med J*, v. 116, n. 4, p. 499-502, 2003

WEN, J.-J.; VYATKINA, G.; GARG, N. Oxidative damage during chagasic cardiomyopathy development: role of mitochondrial oxidant release and inefficient antioxidant defense. *Free Radic Biol Med*, v. 37, n. 11, p. 1821–33, 1 dez. 2004.

WHO. Investing to overcome the global impact of neglected tropical diseases - Third WHO report on neglected tropical diseases. 2015.

WILLIAMS, A. F.; BARCLAY, A. N. The immunoglobulin superfamily--domains for cell surface recognition. *Annu Rev Immunol*, v. 6, p. 381–405, 1988.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Chagas disease in Latin America: an epidemiological update based on 2010 estimates. *Wkly Epidemiol Rec*, n. 6, p. 33–44, 2015.

WHO; ASSEMBLY, S. W. H. et al. Chagas disease : control and elimination. n. April, 2010.

WRIGHTSMAN, R. A. et al. Identification of immunodominant epitopes in *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes surface antigen-1 protein that mask protective epitopes. *J Immunol*, v. 153, n. 7, p. 3148-54, 1994.

YAMAGATA, Y.; NAKAGAWA, J. Control of Chagas Disease. *Adv Parasitol*, v. 61, n. 05, 2006.

ZHANG, B.; CHAMBERS, M. C.; TABB, D. L. Proteomic parsimony through bipartite graph analysis improves accuracy and transparency. *J Proteome Res*, v. 6, n. 9, p. 3549-57, Sep 2007.

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* infections. *Exp Parasitol*, v. 84, n. 2, p. 203–13, nov. 1996.

ZHANG, L.; TARLETON, R. L. Parasite persistence correlates with disease severity and localization in chronic Chagas' disease. *J Infect Dis*, v. 180, n. 2, p. 480–6, ago. 1999.

ZHOU, Y.-H. et al. Positive reactions on Western blots do not necessarily indicate the epitopes on antigens are continuous. *Immunol Cell Biol*, v. 85, n. 1, p. 73–8, jan. 2007.