

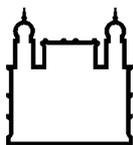
MINISTÉRIO DA SAÚDE  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Doutorado em Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical

OBTENÇÃO DE UMA NOVA PROTEÍNA QUIMÉRICA PARA O USO  
EM TESTE DE DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO DA INFECÇÃO PELO  
*TRYPANOSOMA CRUZI*

ANDRESSA DA MATTA DURANS

Rio de Janeiro  
Abril de 2018



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical**

*ANDRESSA DA MATTA DURANS*

Título da Tese      **OBTENÇÃO DE UMA NOVA PROTEÍNA QUIMÉRICA PARA O  
USO EM TESTE DE DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO DA INFECÇÃO PELO  
*TRYPANOSOMA CRUZI***

Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como  
parte dos requisitos para obtenção do título de  
Doutor em Ciências

**Orientador (es):** Prof<sup>a</sup>. Dra. Angela Cristina Verissimo Junqueira  
Prof. Dr. David William Provance Junior

**RIO DE JANEIRO**

Abril de 2018

Durans, Andressa da Matta.

Obtenção de uma Nova Proteína Quimérica para o Uso em Teste de Diagnóstico Sorológico da Infecção pelo *Trypanosoma cruzi* / *Andressa da Matta Durans*. - Rio de Janeiro, 2018.

xxiv, 162f. f.; il.

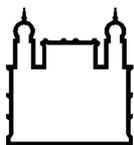
Tese (Doutorado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Medicina Tropical, 2018.

Orientadora: Angela Cristina Verissimo Junqueira.

Co-orientador: David William Provance Junior.

Bibliografia: f. 124-153

1. Doença de Chagas Crônica. 2. Diagnóstico Sorológico. 3. Proteína Quimérica. I. Título.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical**

**AUTOR: ANDRESSA DA MATTA DURANS**

**OBTENÇÃO DE UMA NOVA PROTEÍNA QUIMÉRICA PARA O USO EM TESTE  
DE DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO DA INFECÇÃO PELO *TRYPANOSOMA CRUZI***

**ORIENTADORES: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Angela Cristina Verissimo Junqueira  
Prof. Dr. David William Provance Junior**

**Aprovada em: 16/04/2018**

**EXAMINADORES:**

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Carolina Ramos Guimarães – Presidente (IOC – FIOCRUZ/RJ)**  
**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Silvia Amaral Gonçalves da Silva (UERJ/RJ)**  
**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Giorgia Atella (Instituto de Bioquímica – UFRJ/RJ)**  
**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Patricia Maria Lourenço Dutra (UERJ/RJ)**  
**Prof. Dr. Robson de Queiroz Monteiro (Instituto de Bioquímica – UFRJ/RJ)**

**SUPLENTE:**

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Flávia Raquel Gonçalves Carneiro (CDTS – FIOCRUZ/RJ)**  
**Prof<sup>a</sup>. Dr. Adéilton Alves Brandão (IOC – FIOCRUZ/RJ)**

Rio de Janeiro, 16 de abril de 2018.

Dedico esta tese à minha família, aos meus orientadores, amigos, ao anjo de luz chamado Cauã e a todas as pessoas portadoras da infecção por *T. cruzi*.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus pela graça da vida e a todos os amigos de luz, por todo apoio, incentivos, inspirações em minha trajetória científica.

Aos meus pais por todos ensinamentos, exemplos, investimentos, incentivos e pela bela oportunidade de estar em mais essa existência de aprendizados.

À minha querida irmã, pelo carinho, compreensão e apoio de sempre.

Ao meu amigo, companheiro, minha alma gêmea e por sorte também meu marido, por todo apoio, paciência, compreensão, carinhos, incentivos, investimentos que foram fundamentais para a conclusão desta etapa.

À família campineira: sogros, cunhados e sobrinhos queridos e amados. Gratidão por tanto amor e por tantas vibrações.

Aos meus orientadores: Dra Angela Cristina Verissimo Junqueira e Dr. David William Provance Junior por acreditarem em mim, por tanto aprendizado, por não medirem esforços em meu auxílio para o meu aperfeiçoamento profissional. Obrigada por me mostrarem que a ciência é acima de tudo humana.

À Dra. Martha Mutis por ter me recebido de forma amorosa, ter tornado possível a minha participação na seleção de doutorado na Pós-Graduação em Medicina Tropical e por todo apoio dado a mim e a todos alunos desta querida Pós-Graduação, que já deixa muitas saudades.

À Pós-Graduação em Medicina Tropical, a incansável Livia Agualuza Mangeon e a todos da CPG, por transformar a nossa vivência científica, valorizando a forma humana de se fazer ciência, através de um olhar voltado aos que realmente interessam os resultados gerados e a popularização da ciência.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES pelo auxílio financeiro.

Ao Plano Brasil Sem Miséria pelo auxílio financeiro e por abrir portas para a pesquisas de inovações científicas das doenças negligenciadas.

À Dra. Alda Maria da Cruz e a todos do Laboratório Interdisciplinar de Pesquisas Médicas (IOC), por terem me acolhido durante os 4 anos de doutorado, viabilizando que todos os experimentos desta tese fossem concluídos, além de muito carinho e troca de experiências com todos deste laboratório.

Aos Laboratórios Centrais de Saúde Pública dos Estados do Ceará, Maranhão, Paraíba e Sergipe por terem cedido as amostras sorológicas e algumas informações sobre a procedência das amostras enviadas.

Ao Dr. Pedro Albajar Viñas por acreditar no projeto, toda ajuda, colaboração que foram fundamentais a realização desta pesquisa.

À Organização Mundial da Saúde por nos cedido os Padrões Internacionais de Referências Biológicas.

Ao mestrando Evandro da Rocha Dias por ter cedido uma parte das amostras sorológicas de Barcelos, que fazem parte do seu projeto de dissertação.

Ao Dr. Amadeo Sáez-Alquezar pelos seus conselhos e disponibilidade em nos ajudar.

A todos do Laboratório de Doenças Parasitárias do IOC.

Ao Dr. Salvatore Giovanni De Simone por ter cedido alíquotas de algumas amostras sorológicas e por permitir a realização de alguns experimentos no Laboratório de Bioquímica de Proteínas e Peptídeos (CDTS).

À Plataforma de Sequenciamento de DNA (RPT01A), Aline, Renata, Bia e Alessandra, pela atenção, carinho, dedicação e competência. Parabéns ao belo trabalho e competência que vocês prestam a todos os usuários.

À Paloma Pêgo, Patrícia Ferreira, Isis Prado, Hilton Nascimento, Luciana Machado, por toda ajuda e por compartilhar um pouco de seus conhecimentos metodológicos.

À Flavia Reis, Talita Bernardo, Erica Miranda, Juliana Ramos, Izabel Rodrigues, Raquel Peralva, Luana Rodrigues. Gratidão por tanto aprendizado, por tanta ajuda, pelas conversas, por trabalhar ao lado de mulheres tão competentes.

À turma da sala 21, Clebio, Luiz, Luzinei, Maria, Luciana, Joanna, Samyra, Andrea, Phelipe, Rosa, Adriano, Flávia, Tayany, Milla, Lohaine e a tantas pessoas que já passaram por esta sala. Gratidão as boas conversas, confraternizações, cafezinhos e ajuda no dia a dia.

A todos os colegas dessa querida Pós-Graduação em Medicina Tropical, por tanta troca de conhecimento, amizade, celebrações. Muito orgulho de todos vocês. Profissionais com olhar voltado ao ser humano.

Aos meus queridos amigos: Marcelo Nogueira, Lívia Campos, Bruno Penedo, Fernanda Perez, Raquel da Hora, Luciana Abrão, Vanessa Sinatti, Claudia Dantas, Thiago Pinheiro, Aline Dantas, Cristiano Ponte, Patricia Arruda, Ana Paula Ribeiro, Weber Pessoa, Josiane Muller, Tiara Casacais, Carla Letri, Talita Pagani, Valéria Cabral, Maria Luiza Lobato, Michelly Sacramento, Bárbara Araújo, Val, Angélica Zumpichiatti, Erika Barbosa, Marcos Salgado e Wendy Turatti por serem como estrelas em minha vida, sempre iluminando e norteando os meus horizontes.

À minha querida amiga de luz, Frida. Por me ajudar a serenar as emoções e manter o equilíbrio, principalmente nessa reta final.

À toda família Ramatis, DIJ e Caravana Benedita Fernandes por todo apoio, carinho, orações, vibrações, luz e aprendizado.

Aos membros da banca e a revisora por todas as contribuições, sugestões, disponibilidade e por tanta troca de conhecimento que levarei comigo em minha trajetória científica. Gratidão por tanto aprendizado.

A todos que passaram pela minha trajetória científica desde o início, todos deixaram suas marcas e contribuições para a minha formação.

E por fim a todos aqueles que possam não ter tido os seus nomes mencionados, mas que se fizeram presentes em diversos momentos, o meu reconhecimento e um carinhoso muito obrigado!

“Sempre que você se encontrar do lado da maioria, é hora de parar e refletir.”  
Mark Twain.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

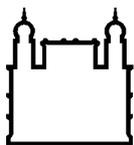
### OBTENÇÃO DE UMA NOVA PROTEÍNA QUIMÉRICA PARA O USO EM TESTE DE DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO DA INFECÇÃO PELO *TRYPANOSOMA CRUZI* RESUMO

#### TESE DE DOUTORADO EM MEDICINA TROPICAL

Andressa da Matta Durans

Doença de Chagas é uma doença negligenciada que ainda carece de um diagnóstico de alta eficácia, capaz de ser realizado em curto espaço de tempo, fácil manuseio e de baixo custo, para as regiões endêmicas. O desempenho dos testes sorológicos varia de acordo com a atividade e a qualidade da preparação de antígenos utilizados para a detecção de anticorpos anti-*T. cruzi*. Neste estudo foi apresentada uma abordagem inovadora em forma de uma proteína quimérica carregando epítomos de várias proteínas de *T. cruzi* que sirva de alvo em testes sorológicos, denominada de Plataforma Cruzii (PlatCruzii). Os epítomos B lineares inseridos na poliproteína foram selecionados de um conjunto de estruturas previamente identificadas experimentalmente, tanto em nosso laboratório quanto da literatura. A proteína quimérica foi construída contendo um cerne estrutural que permite a inserção de dez epítomos. Um gene foi gerado sinteticamente com oito epítomos inseridos, os outros dois epítomos foram inseridos por pareamento de oligonucleotídeos. O DNA sintetizado foi transferido para um vetor de expressão (pET-28a). A proteína quimérica resultante foi expressa em *E. coli* a elevados níveis em corpos de inclusão e purificadas até próximo da homogeneidade. PlatCruzii mostrou alta reatividade contra soros de pacientes com doença de Chagas crônica (DChc) utilizados nas análises e sem reatividade na proteína sem inserção de epítomos. Os soros usados de pacientes infectados por *Leishmania spp.* não foram reativos com a PlatCruzii. Análises do desempenho individual dos epítomos de *T. cruzi*, inseridos na primeira plataforma, indicaram quatro epítomos que não apresentaram a reatividade esperada ao *pool* de soros de DChc, além disso, foi necessária modificação da posição de um epítomo, para o melhor reconhecimento do anticorpo IgG anti-*T. cruzi*. Esses resultados levaram a geração da variante PlatCruzii  $\Delta 5$ , retirada do epítomo CRA (TcEp9) através do uso de enzimas de restrição, como também a criação da segunda versão da proteína quimérica, denominada de PlatCruzii V2, com mudanças estruturais e substituições de alguns epítomos. Tanto a variante PlatCruzii  $\Delta 5$  quanto os resultados iniciais de PlatCruzii V2 não tiveram um melhor desempenho daquele apresentado por PlatCruzii, apontando a primeira versão da proteína quimérica com 100% de sensibilidade e especificidade nos ensaios imunoenzimáticos de ELISA. Em suma, os resultados sugerem que a engenharia da proteína quimérica poderá representar *T. cruzi* com sucesso em formatos de testes de diagnóstico rápidos e de ELISA que devem proporcionar uma elevada sensibilidade e especificidade para detectar indivíduos realmente infectados por *T. cruzi*.

Palavras-chaves: Doença de Chagas Crônica, Diagnóstico Sorológico, Proteína Quimérica.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

### OBTAINING A NEW CHIMERIC PROTEIN FOR USE IN A QUICK SEROLOGICAL DIAGNOSIS TEST OF *TRYPANOSOMA CRUZI* INFECTION IN THE HUMAN POPULATION IN ENDEMIC AREAS ABSTRACT

#### PHD THESIS IN MEDICINA TROPICAL

**Andressa da Matta Durans**

Chagas disease is a neglected disease and there is still a need for diagnostics with a high efficacy, in a space of time, easy to handle and low cost, for the endogenous regions. The performance of serological tests varies according to the activity and quality of the antigen preparation for the detection of anti-*T. cruzi* antibodies. An innovative approach is presented in the form of a chimeric protein carrying epitopes of several *T. cruzi* proteins and serving as a target in serological tests, called the Platform with Cruzi (PlatCruzi). The linear B epitopes inserted into the polyprotein were selected from a set of structures previously identified experimentally, both in our laboratory and in the literature. The chimeric protein was constructed in conjunction with a nuclear structure that allows for the insertion of ten epitopes. One gene was generated synthetically with eight inserted epitopes, the other two epitopes were inserted by oligonucleotide pairing. The synthesized DNA was transferred to an expression vector (pET-28a). The resulting chimeric protein was expressed in *E. coli* at high levels in inclusion bodies and purified to near homogeneity. PlatCruzi showed high reactivity against sera from patients with chronic Chagas' disease (DChc), used in the analyses of performance, which showed no reactivity against the protein nucleus without insertion of epitopes (control platform). Sera from individuals with *Leishmania spp.* was not reactive to PlatCruzi. Analysis of the individual performance of the *T. cruzi* epitopes, inserted in the first platform, indicated four epitopes that did not present the expected reactivity to the pool of DChc sera. In addition, it was observed that the insertion of epitopes at some positions influenced its recognition by anti-*T. cruzi* IgG antibodies. These results led to the generation of the PlatCruzi  $\Delta 5$  variant, which removed the CRA epitope (TcEp9) using restriction enzymes. In addition, a second version of the chimeric protein, named PlatCruzi V2, was designed for structural changes and substitutions of some epitopes. Both the PlatCruzi  $\Delta 5$  variant and the initial PlatCruzi V2 results did not perform better than the original PlatCruzi, pointing to a first version of the chimeric protein with 100% sensitivity and specificity in ELISA enzyme-linked immunosorbent assays. In summary, the results suggest that a chimeric protein was successfully engineered to represent *T. cruzi* for use in rapid diagnostic tests and ELISAs, that delivers elevated sensitivity and specificity to detect person truly infected by *T. cruzi*.

Keywords: Chronic Chagas' Disease; Serological Diagnosis, Chimeric Protein.

# ÍNDICE

<b>RESUMO</b>	<b>X</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>XI</b>
<b>1 MARCO TEÓRICO</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Brasil Sem Miséria, as “Doenças da Pobreza” e as Doenças Negligenciadas</b> .....	<b>1</b>
<b>1.2 Epidemiologia da Doença de Chagas</b> .....	<b>7</b>
1.2.1 Mundial .....	7
1.2.2 Brasil .....	8
<b>1.3 O Parasito</b> .....	<b>21</b>
<b>1.4 Evolução da infecção no hospedeiro mamífero</b> .....	<b>14</b>
<b>1.5 Transmissão</b> .....	<b>16</b>
<b>1.6 O Genoma</b> .....	<b>24</b>
<b>1.7 Diagnóstico Laboratorial da doença de Chagas</b> .....	<b>25</b>
1.7.1 Fase Aguda .....	25
1.7.2 Fase Crônica .....	26
<b>1.8 Outros ensaios para o diagnóstico da infecção de <i>T. cruzi</i></b> .....	<b>34</b>
<b>1.9 Emprego de proteínas em testes sorológicos</b> .....	<b>37</b>
<b>1.10 Avaliações de alguns testes sorológicos da Doença de Chagas crônica</b> .....	<b>47</b>
<b>1.11 Justificativa</b> .....	<b>50</b>
<b>1.12 Hipótese do estudo</b> .....	<b>51</b>
<b>2 OBJETIVOS</b>	<b>52</b>
<b>2.1 Objetivo Geral</b> .....	<b>52</b>
<b>2.2 Objetivos Específicos</b> .....	<b>52</b>
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>53</b>
<b>3.1 Delineamento do estudo</b> .....	<b>53</b>
<b>3.2 Criação da Plataforma Cruzei (PlatCruzei)</b> .....	<b>54</b>
3.2.1 Estrutura da Plataforma .....	54
3.2.2 Obtenção dos epítomos.....	54
3.2.3 Plataforma Cruzei (PlatCruzei) .....	56
<b>3.3 Caracterização das proteínas recombinantes</b> .....	<b>59</b>

3.3.1	Clonagem, PCR de colônia e sequenciamento .....	59
3.3.2	Expressão e purificação.....	61
3.3.3	Western blotting.....	64
3.3.4	Ensaio imuno-enzimático indireto (ELISA indireto).....	65
<b>3.4</b>	<b>Obtenção das amostras sorológicas.....</b>	<b>66</b>
<b>3.5</b>	<b>Considerações éticas.....</b>	<b>70</b>
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>71</b>
<b>4.1</b>	<b>Criação da Plataforma Cruzei (PlatCruzei).....</b>	<b>71</b>
<b>4.2</b>	<b>Caracterização das proteínas recombinantes .....</b>	<b>72</b>
4.2.1	Clonagem, PCR de colônia e sequenciamento .....	72
4.2.2	Avaliação da proteína quimérica inicial (PlatCruzei $\Delta 1$ $\Delta 10$ ) e suas variantes.....	74
4.2.3	Análise de PlatCruzei e suas variantes .....	79
4.2.4	Desempenho das proteínas quiméricas: PlatCruzei e PlatCruzei $\Delta 5$ .....	83
<b>4.3</b>	<b>Caracterização das amostras sorológicas.....</b>	<b>91</b>
<b>4.4</b>	<b>PlatCruzei V2 .....</b>	<b>93</b>
<b>4.5</b>	<b>Detecção das proteínas quiméricas nas diferentes titulações dos soros.....</b>	<b>97</b>
<b>4.6</b>	<b>Desempenho das proteínas quiméricas nas diferentes regiões .....</b>	<b>100</b>
<b>4.7</b>	<b>Análise estatística .....</b>	<b>101</b>
<b>4.8</b>	<b>Padrões Internacionais de Referências Biológicas da OMS ...</b>	<b>102</b>
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO</b>	<b>105</b>
<b>5.1</b>	<b>Amostras sorológicas.....</b>	<b>105</b>
<b>5.2</b>	<b>Diagnóstico sorológico.....</b>	<b>111</b>
<b>5.3</b>	<b>Proteínas quiméricas .....</b>	<b>114</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES</b>	<b>122</b>
<b>7</b>	<b>PERSPECTIVAS</b>	<b>123</b>
<b>8</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>124</b>
<b>9</b>	<b>ANEXOS</b>	<b>154</b>
<b>9.1</b>	<b>ANEXO A - APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA.....</b>	<b>154</b>

<b>9.2</b>	<b>ANEXO B - MODELO DE TCLE (BARCELOS – AM).....</b>	<b>155</b>
<b>9.3</b>	<b>ANEXO C – PROTOCOLO DOS PADRÕES INTERNACIONAIS DE REFERÊNCIAS BIOLÓGICAS DA OMS.....</b>	<b>158</b>
<b>9.4</b>	<b>ANEXO D – PARECER TÉCNICO DE OGM.....</b>	<b>161</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Distribuição global das "doenças tropicais negligenciadas".....	3
Figura 2 - Número de casos estimados de infecção por <i>T. cruzi</i> em países não endêmicos.....	8
Figura 3 - Principais formas de transmissão da DCha no Brasil entre 2000 a 2014.....	10
Figura 4 - Número de triatomíneos capturados no Brasil.....	11
Figura 5 - Número de surtos notificados no Brasil entre 2005 e 2013.....	13
Figura 6 - As três formas evolutivas de <i>T. cruzi</i> .....	23
Figura 7 - Evolução clínica da doença de Chagas.....	14
Figura 8 - Edema palpebral também denominado de sinal de Romaña (A) e chagoma de inoculação (B).....	15
Figura 9 - Formas crônicas sintomáticas da doença de Chagas.....	16
Figura 10 - Vetores da infecção de <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	17
Figura 11 - Ciclo de vida do <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	18
Figura 12 - Fluxograma das etapas do diagnóstico laboratorial da infecção por <i>T. cruzi</i> na fase crônica, em casos suspeitos de doença de Chagas crônica (DChc).....	29
Figura 13 - Ilustração da Hemaglutinação Indireta (HAI).....	31
Figura 14 - Ensaio de Imunofluorescência Indireta (IFI).....	32
Figura 15 - Esquema de ELISA indireto para uma amostra reagente.....	34
Figura 16 - Esquema da placa de ELISA com as proteínas recombinantes.....	46
Figura 17- Fluxograma da estratégia para a criação da Plataforma Cruzi.....	53
Figura 18 - Mapa do vetor e do gene de PlatCruzi (8 epítomos) produzido sinteticamente.....	57
Figura 19 - Ilustração representativa da estrutura da proteína núcleo com destaque para os 10 epítomos de <i>T. cruzi</i> .....	58
Figura 20 - Mapa do vetor de clonagem pET- 28a.....	59
Figura 21 - Mapas do Brasil destacando as regiões provenientes das amostras sorológicas.....	67
Figura 22 - DTUs circulantes nas áreas endêmicas dos ciclos doméstico e silvestre.....	70
Figura 23 - Modelagem computacional da estrutura da Plataforma Rx-UBCP (A) e da proteína quimérica PlatCruzi (B).....	71

Figura 24 - Esquema representativo de clonagem de PlatCruzi no vetor pET-28a(+)	73
Figura 25 - Gel de poliacrilamida 10% de PCR de colônia	74
Figura 26 - Análise das diferentes condições de expressão das proteínas recombinantes por SDS-PAGE 11%	75
Figura 27 - Análise de solubilidade da proteína recombinante PlatCruzi $\Delta 1 \Delta 5 \Delta 10$ por SDS-PAGE 11%	76
Figura 28 - Análise da purificação da proteína de fusão contendo poli-histidina purificada por coluna de níquel por SDS-PAGE	77
Figura 29 - Reatividade por <i>western blotting</i> das proteínas recombinantes com soros de pacientes com DChc e com leishmaniose	77
Figura 30 - Reconhecimento da proteína $\Delta 1 \Delta 10$ frente a soros de indivíduos com diferentes infecções	79
Figura 31 - SDS-PAGE 11% das expressões das proteínas recombinantes	80
Figura 32 - Análise de solubilidade das proteínas recombinantes	80
Figura 33 - Gráfico gerado de normalização de sinal do <i>western blotting</i>	81
Figura 34 - Avaliação dos peptídeos de PlatCruzi através do <i>SPOT-Synthesis Epitope Analysis</i>	83
Figura 35 - Proteínas quiméricas detectadas pelo <i>pool</i> de soros de pacientes com infecção crônica por <i>T. cruzi</i>	84
Figura 36 - Purificação de PlatCruzi por cromatografia de afinidade	85
Figura 37 - ELISA mostrando a detecção de diferentes concentrações da PlatCruzi pelos Padrões Internacionais das Referências Biológicas da OMS	86
Figura 38 - Titulação dos soros de pacientes com doença de Chagas crônica dos LACENs	87
Figura 39 - Reatividade dos soros de AM (Barcelos), CE, MA, PB, SE contra PlatCruzi	88
Figura 40 - Purificação de PlatCruzi	89
Figura 41 - Purificação de PlatCruzi $\Delta 5$	89
Figura 42 - Detecção de IgG anti- <i>T. cruzi</i> contra PlatCruzi	90
Figura 43 - Avaliação da reatividade dos soros dos LACENs e de Barcelos com a PlatCruzi $\Delta 5$	90
Figura 44 - Modelos das estruturas tridimensionais de PlatCruzi (A) e PlatCruzi V2 (B)	95

<b>Figura 45 - Análise por SDS-PAGE 11% das etapas de expressão e purificação de PlatCruzi V2.....</b>	<b>96</b>
<b>Figura 46 - Reatividade de soros de DChc frente a PlatCruzi V2.....</b>	<b>97</b>
<b>Figura 47 - Detecção de anticorpos da classe IgG em diferentes titulações de soros de DChc e leishmaniose contra as proteínas quiméricas.....</b>	<b>99</b>
<b>Figura 48 - Desempenho de cada proteína quimérica frente ao painel de soros de pacientes obtidos de diferentes Estados brasileiros.....</b>	<b>100</b>
<b>Figura 49 - Detecção de IgG anti-<i>T. cruzi</i> nas amostras controles.....</b>	<b>102</b>
<b>Figura 50 - Reatividade perante os <i>pools</i> dos Padrões Internacionais de Referências Biológicas da OMS. Tci: IS 09/188.....</b>	<b>103</b>
<b>Figura 51 - Distribuição das DTUs circulantes de <i>T. cruzi</i> na América do Sul.....</b>	<b>108</b>

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Projeções das estimativas de prevalência de infecção por <i>T. cruzi</i> e da doença de Chagas crônica com as formas cardíaca e digestiva no Brasil, no período de 2000 a 2055.....	9
Tabela 2 - Triatomíneos encontrados na região Amazônica. ....	10
Tabela 3 - Notificação do número de casos em diferentes formas de transmissão da doença de Chagas de 2000 a 2013. ....	13
Tabela 4 - Recomendações da OMS sobre o diagnóstico laboratorial da doença de Chagas. ....	30
Tabela 5 - Lista de alguns antígenos ou peptídeos sintéticos utilizados no diagnóstico por infecção por <i>T. cruzi</i> .....	44
Tabela 6 Lista de alguns <i>kits</i> de diagnóstico sorológico de DChc comercializados. ....	48
Tabela 7 - Descrição dos epítomos selecionados para criar a Plataforma Cruzi. ....	55
Tabela 8 - Desenho dos oligonucleotídeos dos epítomos KMP11 (Pos 1) e CRA (Pos 10). ....	58
Tabela 9 - Volume dos reagentes para preparo de gel de concentração 4% e para o gel de separação 11%. ....	64
Tabela 10 - Informações dos pacientes com doença de Chagas.....	69
Tabela 11 Análises de peptídeo sinal, ponto isoelétrico e peso molecular de PlatCruzi.....	72
Tabela 12 - Análises de peptídeo sinal, ponto isoelétrico e peso molecular de PlatCruzi $\Delta 5$ . ....	84
Tabela 13 - Dosagem de PlatCruzi após purificação por coluna de afinidade...	86
Tabela 14 - Resultados divergentes entre os testes sorológicos e as proteínas quiméricas. ....	91
Tabela 15 - Resultados inconclusivos das amostras sorológicas do estudo....	93
Tabela 16 - Caracterização e posicionamento dos epítomos de <i>T. cruzi</i> na PlatCruzi V2. ....	94
Tabela 17 - Análises de peptídeo sinal, ponto isoelétrico e peso molecular de PlatCruzi V2 .....	95
Tabela 18 - Análises estatísticas realizadas pelo <i>GraphPad Prism v. 7.0</i> . ....	101

<b>Tabela 19 - Comportamento dos testes sorológicos (ELISA e CLIA) e das proteínas quiméricas frente aos Padrões Internacionais de Referências Biológicas da OMS.....</b>	<b>104</b>
<b>Tabela 20 Presença de IgG anti-<i>T. cruzi</i> nas amostras com outras infecções em pelo menos um dos testes sorológicos. ....</b>	<b>106</b>
<b>Tabela 21 - Pessoas que relataram terem desenvolvido mais de uma doença tropical. ....</b>	<b>109</b>

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

%:	Porcentagem
°C:	Grau Celsius
µg:	Micrograma
µL:	Microlitro
1F8:	Proteína flagelar ligante de cálcio
1U/µL:	1 Unidade por microlitro
A13:	Antígeno recombinante de <i>T. cruzi</i>
ACHR:	<i>Advisory Committee on Health Research</i>
Ag:	Antígeno
AM:	Amazonas
ampR:	Gene de resistência a ampicilina
B13:	Antígeno imunodominante de 140-116 KDa encontrado na superfície de forma tripomastigota de <i>T. cruzi</i> (cepa Y)
BL21 (DE3):	Cepa de <i>E. coli</i> . Célula <i>E. coli</i> BL21 (DE3) utilizada como hospedeira para plasmídeos.
C	Sigla usada nas amostras sorológicas da doença de Chagas
CDTS:	Centro de Desenvolvimento Tecnológico em Saúde
CE:	Ceará
CRA:	Antígeno citoplasmático repetitivo
CYTED:	Programa Ibero Americano de Ciência e Tecnologia para o Desenvolvimento
D:	Sigla usada nas amostras sorológicas de dengue
Δ	Letra grega utilizada para representar as deleções de epítomos em PlatCruzi
DCh:	doença de Chagas
DCha:	doença de Chagas aguda
DChc:	doença de Chagas crônica
DNA:	<i>Deoxyribonucleic acid</i> (Ácido desoxirribonucleico)
dNTP:	Desoxinucleosídeos trifosfato
DNDi:	<i>Drugs for neglected diseases initiative</i>
DO:	Densidade óptica
DTU:	<i>Discrete typing units</i>
<i>E. coli</i> :	<i>Escherichia coli</i>

EDTA:	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EIE:	Ensaio imunoenzimático
ELISA:	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
EPCs:	Equipamentos de proteção coletiva
EPIs:	Equipamentos de proteção individual
EUA:	Estados Unidos da América
FIOCRUZ:	Fundação Oswaldo Cruz
FRA:	Antígeno flagelar repetitivo
g:	aceleração da gravidade
GAL:	Gerenciador de Ambiente Laboratorial
GFHR:	<i>Global Forum for Health Research</i>
GPI:	Glicosilfosfatidilinositol
H <sub>2</sub> O:	Molécula da água
HAI:	Hemaglutinação indireta
HBV:	<i>Hepatitis B virus</i> (Vírus da hepatite B)
HCl:	Ácido clorídrico
HCV:	<i>Hepatitis C virus</i> (Vírus da hepatite C)
His-tag:	Caudas (tag) de resíduos de histidinas consecutivas (normalmente 6)
HIV:	<i>Human Immunodeficiency Virus</i> (Vírus da imunodeficiência humana)
IBGE:	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IC:	Intervalo de confiança
IFI:	Imunofluorescência indireta
IgG:	Imunoglobulina G
IgM:	Imunoglobulina M
INCQS:	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
IOC:	Instituto Oswaldo Cruz
IPTG:	Isopropil- β-D-1-tioglicosídeo
IR:	Índice de reatividade
K12:	Cepa de <i>E. coli</i>
Kb:	Quilobase
kDa:	Quilodalton – 1.000 unidades de massa atômica (1 dalton = 1 u.m.a. = 1,660 x 10 <sup>24</sup> )
kDNA:	<i>Kinetoplast DNA</i> (DNA do cinetoplasto)
KI:	Índice de kappa
L:	Litro

L:	Sigla usada nas amostras sorológicas de leishmaniose
Lab.:	Laboratório
LACEN:	Laboratório Central de Saúde Pública
LB:	<i>Luria-Bertani</i>
LDP:	Laboratório de Doenças Parasitárias (IOC/FIOCRUZ)
LIPMED:	Laboratório Interdisciplinar de Pesquisas Médicas (IOC/FIOCRUZ)
LIT:	Infusão de fígado e triptose ( <i>liver infusion tryptose</i> )
M:	Molar
mA:	Miliamperes
MA:	Maranhão
MAP:	Proteína associada a microtúbulo
Mb:	Megabases
mL:	Mililitro
mM:	Milimolar
MS:	Ministério da Saúde
MSC:	Múltiplo Sítio de Clonagens
MSF:	Médicos Sem Fronteiras
nm:	Nanômetro
NaCl:	Cloreto de sódio
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> :	Fosfato dissódico
Na <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> :	Fosfato de sódio
NB1:	Nível de biossegurança da classe de risco 1
NCBI:	<i>National Center for Biotechnology Information</i> (Centro Nacional de Informações em Biotecnologia)
OMS:	Organização Mundial de Saúde
ONU:	Organização das Nações Unidas
OPAS:	Organização Pan-Americana de Saúde
PAHO:	<i>Pan American Health Organization</i>
pb:	Pares de base
PB:	Paraíba
PBS-T:	<i>Phosphate Buffered Saline-Tween 20</i> (Tampão fosfato-Tween 20)
PCR:	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reação em cadeia da polimerase)
PCDCh:	Programa de Controle de doença de Chagas
<i>P. falciparum</i> :	<i>Plasmodium falciparum</i>
pH:	Potencial hidrogeniônico

PlatCruzi:	Plataforma Cruzei
PM:	Peso molecular
PNPP:	<i>p-Nitrophenyl Phosphate</i> (para-nitrofenil fosfato)
PVDF:	<i>Polyvinylidene fluoride</i> (Fluoreto de polivinilideno)
<i>P. lignarius</i> :	<i>Panstrongylus lignarius</i>
PNUD:	Programa das Nações Unidas para o Desenvolvimento
<i>P. rufotuberculatus</i> :	<i>Panstrongylus rufotuberculatus</i>
<i>P. vivax</i> :	<i>Plasmodium vivax</i>
Rec.:	Recombinante
RIPA:	<i>Radioimmunoprecipitation Assay</i> (Radioimunoprecipitação)
ROC:	<i>Receiver Operating Characteristic</i> (Característica de operação do receptor)
RP:	Proteína recombinante
rpm:	Rotações por minuto
<i>R. robustus</i> :	<i>Rhodnius robustus</i>
Rx-UBCP:	Nome dado a plataforma criada a partir da proteína núcleo
SAPA:	<i>Shed Acute Phase Antigen</i>
SDS:	<i>Sodium Dodecyl Sulphate</i> (Dodecil Sulfato de Sódio)
SDS-PAGE:	<i>Sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis</i> (Gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio)
SE:	Sergipe
SES:	Secretaria de Estado da Saúde
SESPA:	Secretaria de Estado de Saúde Pública do Estado do Pará
SINAN:	Sistema de Informação de Agravos de Notificação
SVS:	Secretaria de Vigilância em Saúde
Taq:	<i>Thermus aquaticus</i>
TBS:	Solução salina tamponada com Tris
TcE:	Proteína ribossomal
TcLo1.2:	Um dos Antígenos da Família das trans-sialidasas
TCNA:	Um dos Antígenos da Família das trans-sialidasas
<i>T. cruzi</i> :	<i>Trypanosoma cruzi</i>
TDRs:	Testes de diagnóstico rápidos
TEMED:	N, N, N', N' tetrametiletilenodiamina
TESA:	Antígeno excretado e secretado de tripomastigota
Tris:	Trisaminometano – (HOCH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> CNH <sub>2</sub>

TSSA:	<i>Trypomastigote Small Surface Antigen</i>
<i>Tween 20</i> :	Monolaurato de polixietilenosorbitana
U:	Unidades
UNICEF:	Fundo das Nações Unidas para a Infância
UV:	Ultravioleta
V:	Volt
v/v:	Volume por volume

# 1 MARCO TEÓRICO

## 1.1 Brasil Sem Miséria, as “Doenças da Pobreza” e as Doenças Negligenciadas

O Plano Brasil Sem Miséria (PBSM) foi criado em 2011, com enfoque na assistência a população de extrema pobreza, que possuíam uma renda familiar inferior a R\$ 70,00 mensais por pessoa (Brasil, 2011). O PBSM consistiu em três pilares: (1) garantia de renda (em 2014 a renda mensal às famílias passou de R\$ 70,00 para R\$ 77,00 mensais *per capita* e o benefício médio mensal repassado chegou a R\$ 170,00); (2) acesso aos serviços públicos (as metas foram de melhorar as condições de educação, saúde e cidadania); e (3) inclusão produtiva (com aumento de oportunidades de trabalho, qualificação profissional e consequente elevação da renda per capita familiar - Brasil, 2015a). No intuito de aperfeiçoar as condições de saúde, o Programa Nacional de Qualificação da Assistência Farmacêutica, no âmbito do Sistema Único de Saúde (SUS), apoiou 1.582 municípios constantes do Plano Brasil Sem Miséria de até 100 mil habitantes (Brasil, 2015a). Gerando uma cobertura de mais de 26 milhões de pessoas, com prioridade para a estruturação dos serviços farmacêuticos na atenção básica, com investimento de mais de R\$ 17 milhões (Brasil, 2015a).

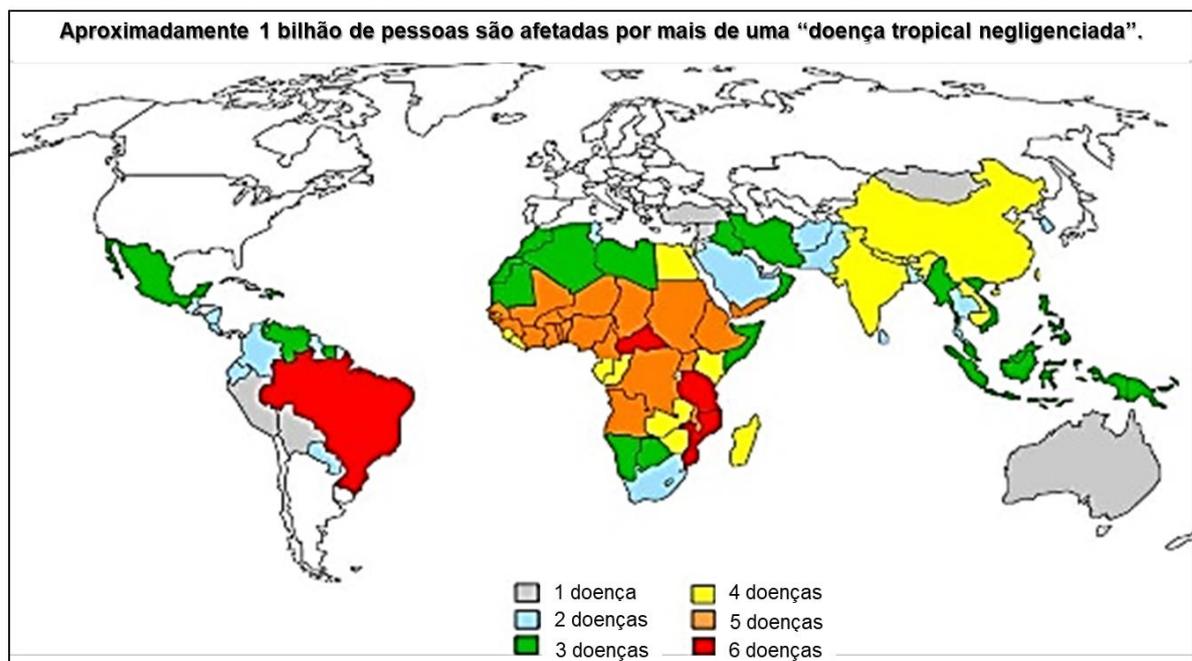
Desde 2012, a Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) integra ao PBSM, convênio consolidado junto à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Ministério do Desenvolvimento Social. A FIOCRUZ contou com 175 participantes de programas de Pós-Graduações (doutorandos e pós-doutorandos), além de grupos de pesquisa de várias unidades da instituição (Lobato, 2017).

A presença das “doenças da pobreza” tem relação direta com os índices de subnutrição, com a falta de saneamento básico, ausência de saúde básica eficiente que atenda toda a população, a negligência do poder público e também de órgãos não-governamentais, como as empresas farmacêuticas. Estas características coincidem com o mapa dos países em desenvolvimento (Brasil, 2014). Dentro desse grande grupo “doenças da pobreza”, encontram-se outras terminologias que podem delimitar áreas, doenças, climas, pobreza, circunstâncias específicas, ou haver até mesmo interseção entre si, originando vários subgrupos.

“Doenças tropicais” são um grupo de doenças normalmente de origem infecciosa, que ocorrem unicamente nos trópicos (em torno da linha do Equador, entre os trópicos de Câncer e Capricórnio). O clima, a pobreza, as péssimas condições de saneamento básico e degradação ambiental são aspectos que contribuem para a propagação destas doenças (OMS, 2009).

Entende-se por “doenças infecciosas relacionadas à pobreza”, ou simplesmente “doenças infecciosas da pobreza”, um conjunto de enfermidades prevalentes em populações em situação de pobreza, como AIDS e tuberculose, e que provocam maior taxa de mortalidade (Brasil, 2013).

Já o termo “doenças negligenciadas”, passou a ser usado na década de 2000 e foi proposto pela Organização Mundial da Saúde (OMS) e pela organização Médicos Sem Fronteiras (MSF, 2012a). Está relacionada às enfermidades que são tratáveis e curáveis e atingem populações de baixa e média renda. São também conhecidas como “doenças infecciosas negligenciadas” e “doenças tropicais negligenciadas” (Figura 1). Por conta disso, não atrai investimentos na pesquisa e no desenvolvimento de diagnósticos, tratamentos e vacinas, onde os métodos vigentes, ainda são muito antigos e inadequados (Brasil, 2013; MSF, 2012b; OMS, 2017); originando a denominação “extremamente negligenciadas”, específicas de países periféricos (Morel, 2006; OMS/TDR, 2012; MSF, 2012a; Andrade, 2015). A Organização Mundial de Saúde (2017) listou como “doenças tropicais negligenciadas”: úlcera de Buruli; doença de Chagas; arboviroses: (dengue e chikungunya); dracunculíase; equinococose; trematódeos alimentar; tripanossomíase humana africana (doença do sono); leishmaniose; hanseníase, filariose linfática; micoses (cromoblastomicose, micetoma e outras micoses profundas); oncocercose; raiva; esquistossomose; ectoparasitas como a sarna; helmintíases transmitidas pelo solo; envenenamento por cobra; teníase; cisticercose; tracoma ebejel, pinta ou boubá (treponematoses endêmicas). Na América Latina e no Caribe, estima-se que 46 milhões de crianças vivem em áreas de alto risco de infecção ou reinfecção com helmintos transmitidos pelo solo, enquanto cerca de 11 milhões de pessoas estão em risco de tracoma e 70,2 milhões estão em risco de doença de Chagas; mais de 33 mil novos casos de hanseníase e mais de 51 mil casos de leishmaniose cutânea são relatados nas Américas a cada ano. Além disso, 25 milhões sofrem de esquistossomose e 12,6 milhões sofrem de filariose linfática (OMS, 2017).



**Figura 1 - Distribuição global das "doenças tropicais negligenciadas".** Fonte: Molyneux et al., 2005.

No Brasil, “as doenças da pobreza” mais prevalentes são: (1) as geohelmintoses, que infectam cerca de 93 milhões de pessoas (*Ascaris* - 41,7 milhões, ancilóstomo - 32,3 milhões, *Trichuris* - 18,9 milhões); (2) as anemias carenciais, que afetam 3 milhões de crianças menores de cinco anos, 10 milhões de crianças em idade escolar e 15 milhões de mulheres entre 15 e 49 anos; (3) as parasitoses intestinais com prevalência média de 30%, infectando cerca de 15,4 milhões de crianças em idade escolar; (4) a doença de Chagas, com aproximadamente 3 milhões de portadores crônicos; (5) a esquistossomose, com 2 milhões de portadores crônicos e 13.636 de casos registrados em 2014 (Brasil, 2015a); o tracoma, com prevalência média de 5,2% no país (Brasil, 2015b); (6) a malária, com registros de 144.100 casos em 2014 (Brasil, 2015b); (7) a leishmaniose, com cerca de 500 mil novos casos (leishmaniose visceral – 5 mil novos casos por ano); (8) a dengue, com cerca de 156 mil casos confirmados em 2017 (SVS/MS, 2017); (9) a hanseníase, com 47 mil novos casos por ano; (10) a filariose, com estimativa de 60 mil infectados, restrita atualmente, a 4 municípios da região metropolitana de Recife (Brasil, 2015b); (11) a febre reumática, com prevalência de 30 mil pessoas por ano; (12) oncocercose, apenas 12.000 casos na área indígena Yanomami, entre os estados de Roraima e Amazonas (Brasil, 2015b).

Desde a sua fundação em 1948, a OMS já relatava sobre o desenvolvimento desigual em diferentes países com relação à promoção de saúde e combate às doenças, especialmente contagiosas (OMS, 2009). Mas foi a Fundação Rockefeller

que abriu para a discussão sobre as doenças mundialmente negligenciadas, através do programa “Grandes Doenças Negligenciadas da Humanidade” - 1977/2000 (Carvalho, 2011). Em seguida surgiu em 1978, durante a “Conferência Internacional sobre Cuidados Primários de Saúde”, a Declaração da Alma-Ata, que consistiu na descrição da alarmante desigualdade de saúde pública, política, social e econômica entre os países desenvolvidos e em desenvolvimento (Maciocco, 2008). No século XX, surgiram iniciativas para discutir, buscar soluções e implementar estratégias para superar o problema de inequidade entre os países em matéria de saúde. Nos anos 90, a Comissão para Pesquisa e Desenvolvimento em Saúde e o Comitê *ad hoc* de Pesquisa em Saúde da Organização Mundial da Saúde, expuseram que somente 10% dos recursos financeiros mundiais para pesquisa em saúde são direcionados para estudos em doenças e agravos que afetam 90% da população. Foram aconselhadas aplicações de recursos a partir da definição de prioridades de pesquisa e criações de mecanismos para monitorar os fluxos de recursos financeiros aplicados em pesquisa em saúde (OMS/ ACHR, 1996; GFHR, 2001).

Nesse contexto, a Organização das Nações Unidas lançou os “Objetivos de Desenvolvimento do Milênio da ONU para 2015”, que representaram um imenso desafio para os países em desenvolvimento. Esses países teriam de organizar sistemas de pesquisa em saúde baseados em prioridades sanitárias e assegurar a incorporação dos resultados às políticas e ações de saúde. Avanços na área biomédica, em particular em genômica, abririam novas oportunidades, mas impuseram desafios adicionais. O Brasil, possuidor de um forte parque industrial e uma vigorosa comunidade científica, teria capacidade para desenvolver um sistema de pesquisas em saúde capaz de contribuir efetivamente para o cumprimento das metas da ONU (Nações Unidas, 2002; Morel, 2004).

Apesar do perfil epidemiológico geral ter melhorado nos últimos 50 anos e o impacto da mortalidade das doenças infecciosas decair de quase 50% na década de 30 para menos de 5% em 2011, o impacto de morbidade e de incapacitação para o trabalho continua alto e muitas delas não têm uma atualização precisa do quadro. A grande parte dessas infecções são muito antigas e vêm alarmando a humanidade. Com certa melhoria das condições de vida e sanitárias, algumas doenças foram desaparecendo gradualmente (Araújo-Jorge, 2011).

O relatório produzido pelos Médicos Sem Fronteiras (MSF) em 2012, chamado “Combatendo a Negligência”, faz uma análise do passado, presente e futuro do manejo dessas doenças e conclui que o acesso a tratamento de qualidade requer

mais esforços políticos por parte dos principais doadores internacionais e dos países afetados (MSF, 2012b).

Visando a obtenção de melhores resultados, foi criada uma organização sem fins lucrativos de Pesquisa e desenvolvimento (P&D), denominada “Iniciativa de Drogas para Doenças Negligenciadas” (DNDi), que surgiu a partir do Prêmio Nobel da Paz (1999) da Organização Médicos Sem Fronteiras, onde os fundos recebidos foram para a finalidade da formação desse grupo de trabalho, com enfoque de desenvolvimento de um modelo alternativo para a pesquisa e de novos medicamentos acessíveis para as populações negligenciadas, em particular: doença de Chagas, as leishmanioses, a doença do sono, o HIV pediátrico, a Hepatite C, as filariose e Micetoma (DNDi, 2017). A DNDi conta como parceiros o Instituto Pasteur (França); a FIOCRUZ; Ministério da Saúde da Malásia; institutos de pesquisa clínica da Índia e do Quênia; Médicos Sem Fronteiras (MSF); uma organização internacional de pesquisa; o Programa para Pesquisa e Treinamento em Doenças Tropicais (TDR) da OMS; UNICEF / PNUD / Banco Mundial (Assad, 2010; DNDi, 2017).

Mesmo ainda não sendo o ideal, a partir de 2003 a situação no Brasil apresentou melhoras e se destacou no cenário internacional como sendo o sexto no mundo em investimentos em pesquisa de doenças negligenciadas e o primeiro dentre os países em desenvolvimento. Estima-se que em 2008, os países e blocos que mais investiram em pesquisas de “doenças negligenciadas” foram os EUA, com US\$ 1,2 bilhão (70%) seguidos pela União Europeia como um todo, e Inglaterra, Holanda, Irlanda, respectivamente; e o Brasil, em sexto lugar, investiu US\$ 21,9 milhões (1,24%), (Assad, 2010).

Nas Américas foram relatados progressos, como por exemplo na Colômbia, Equador, México e Guatemala, que em 2009, foram os primeiros países do mundo a receber a certificação da OMS pela eliminação da oncocercose humana e o número de pessoas que necessitam de tratamento para a doença decaiu de aproximadamente 336 mil (2009) para cerca de 25 mil (2015). Já no caso da doença de Chagas, 17 países das Américas Central e do Sul estão envolvidos em uma iniciativa sub-regional apoiada e orientada pela OMS e OPAS para a interrupção da transmissão vetorial em todo ou parte de seu território nacional (OMS, 2017). Com relação a hanseníase, quase todos os países das Américas eliminaram a doença como um problema nacional de saúde pública. Sobre a malária, 14 países foram considerados livres da transmissão local (OMS, 2017). Quanto a filariose linfática, 3 países eliminaram a doença e não relataram qualquer transmissão local, enquanto outros três estão perto

da eliminação. O ano de 2013 foi marcado pela progressão do tratamento em crianças com infecções por helmintos transmitidos pelo solo, onde cerca de 20 milhões foram tratadas (OMS, 2017). A esquistossomose pode ter sido eliminada em 6 países e territórios do Caribe, embora ainda tenha algumas áreas com transmissão em focos limitados (OMS, 2017).

Em 2015 foram lançados os novos 17 “Objetivos de Desenvolvimento Sustentável” (ODS), que se baseiam nos 8 Objetivos de Desenvolvimento do Milênio (ODM), que tem como enfoque a determinação do curso global de ação para o enfrentamento e eliminação da pobreza, com o objetivo de promover a prosperidade e o bem-estar para todos, proteger o ambiente e enfrentar as mudanças climáticas (Nações Unidas, 2015).

Alguns pesquisadores brasileiros se reuniram no 53 ° Congresso da Sociedade Brasileira em Medicina Tropical em 2017, e formaram o “Fórum de Enfrentamento das Doenças Infecciosas e Negligenciadas” que lançou uma carta em defesa do SUS e dos direitos humanos e sociais contando com alguns pontos principais, tais como: o reforço do papel do Fórum na defesa do Sistema Único de Saúde (SUS); a integração dos núcleos de vigilância em saúde com o objetivo de fortalecer o enfrentamento conjunto às doenças negligenciadas; a articulação entre os Ministérios da Saúde e Educação para o desenvolvimento de competências curriculares mais sensíveis às necessidades das pessoas acometidas pelas doenças negligenciadas; a qualificação apropriada dos profissionais de saúde; destinar recursos para pesquisa e inovação; educação, comunicação, empoderamento e desenvolvimento inclusivo das pessoas atingidas pelas doenças infecciosas e negligenciadas; o apoio à Ação Direta de Inconstitucionalidade 5658 para reversão do congelamento de recursos imposto pela Emenda Constitucional 95/2016 e a exigência da notificação compulsória da Doença de Chagas na sua fase crônica como estratégia para atenção integral à saúde (SBMT, 2017).

Existe uma necessidade de inovação de ferramentas diagnósticas para o progresso de vigilância epidemiológica, tanto na área de pesquisa, quanto na parte de desenvolvimento, já que a baixa quantidade de produtos de diagnóstico dificulta a vigilância das doenças tropicais negligenciadas (*Medicine Foundation*, 2014).

Desde 2015, grande parte dos novos potenciais testes, estão em fase inicial de desenvolvimento e ainda levará algum tempo para inserção de novos *kits* de diagnóstico no mercado (OMS, 2017).

Por exemplo, a atual necessidade diagnóstica das doenças tripanossomíase africana e leishmaniose visceral (LV), seria a aquisição de testes rápidos sensíveis que reconheçam casos assintomáticos ou com infecção precoce; identifiquem a resistência a medicamentos; necessidade de dispositivos no monitoramento da resposta dos pacientes ao tratamento; ser um dispositivo portátil de simples manuseio, com aplicação no campo, robusto para suportar o calor e umidade, e usar métodos de amostragem minimamente invasivos (Reimer et al., 2015).

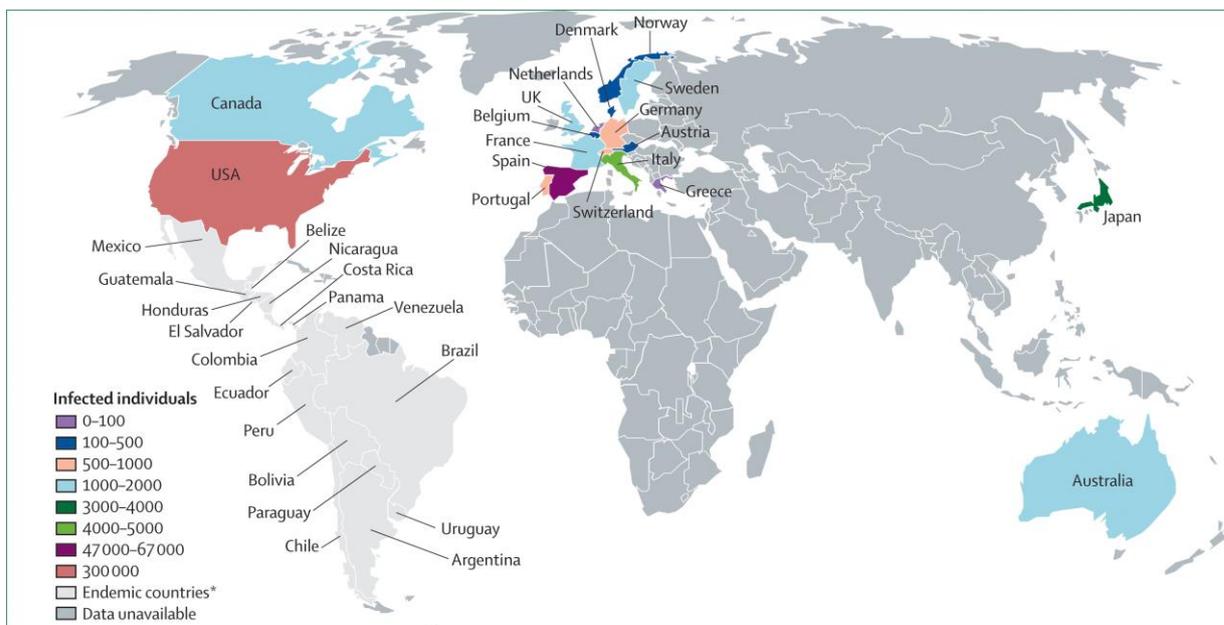
São necessárias cada vez mais parcerias entre governos, instituições não governamentais e empresas privadas multinacionais, com maiores investimentos em pesquisas e produção de novos fármacos, vacinas e *kits* de diagnóstico, para combater de forma eficaz essas doenças, tirando milhões de pessoas do esquecimento, dando a elas a devida atenção, com conseqüente melhoria da condição de saúde.

## **1.2 Epidemiologia da Doença de Chagas**

### **1.2.1 Mundial**

A doença de Chagas é considerada a mais importante doença parasitária das Américas (Hotez et al., 2007; Hotez et al., 2012; OPAS, 2014, OMS, 2017) e estima-se que de 6 a 8 milhões de pessoas estejam infectadas no mundo, a maioria concentrada na América Latina, com 5,7 milhões de indivíduos com a doença (OMS, 2015).

A distribuição mundial envolve, além dos 21 países endêmicos da América Latina (Figura 2), países não-endêmicos como: os Estados Unidos da América (EUA); Canadá; alguns países na Europa, principalmente na Bélgica, Espanha, França, Itália, Reino Unido, Suíça; e em menor proporção a Alemanha, Áustria, Croácia, Dinamarca, Holanda, Luxemburgo, Noruega, Portugal, Romênia, Suécia; Japão e Austrália, (Schmuñis, 2007; Schmuñis, 2007a; Schmuñis & Yadon, 2010; Coura & Dias, 2009; Coura & Viñas, 2010; OMS, 2009; Rassi Jr et al., 2010). Estima-se que mais de 300 mil pessoas estejam infectadas pelo parasito nos EUA, mais de 5.500 no Canadá (Schmuñis, 2007; Schmuñis, 2007a; Schmuñis & Yadon, 2010) e na região do Pacífico ocidental, mais de 80 mil na Europa, mais de 3.000 no Japão e mais de 1.500 na Austrália (Schmuñis, 2007a; Schmuñis, 2007b; Schmuñis & Yadon, 2010; Rassi Jr, 2010), (Figura 2).



**Figura 2 - Número de casos estimados de infecção por *T. cruzi* em países não endêmicos.** Dados: Canadá, Austrália, e Japão de 2006; EUA de 2005; Espanha de 2008; e outros países da Europa entre 2004–2006. Fonte: Rassi Jr. et al., 2010.

Mais de 70 milhões estão expostas ao risco de contrair a infecção devido ao elevado número de pessoas que ainda continuam sem diagnóstico ou não tratadas e que estão em processo infectivo, combinadas com as formas de transmissão oral e vetorial (OMS, 2017). Por ano, são aproximadamente 28.000 novos casos e cerca de 12.000 a 14.000 mortes, onde destas 7.000 são estimadas para as áreas endêmicas. (Hotez et al., 2012; OPAS, 2014; Brasil, 2015b, DNDi, 2016).

Com a melhoria da qualidade de vida em áreas rurais, com os programas de combate ao vetor e com a regulamentação em alguns países da triagem sorológica em bancos de sangue, percebe-se uma diminuição do quantitativo de pessoas com a doença de Chagas crônica (DChc). Em 2002, previa-se 15 milhões com DChc (OMS, 2002); em 2014, esse número reduziu para 8 milhões (OPAS, 2014) e em 2015, chegou a 5,7 milhões (OMS, 2015).

A globalização da doença de Chagas está relacionada com a propagação da doença através das migrações populacionais das regiões endêmicas para áreas sem infecção prévia, esses movimentos geraram novos desafios epidemiológicos, econômicos, sociais e políticos (Coura & Viñas, 2010).

### 1.2.2 Brasil

No Brasil, o número de casos da doença de Chagas foi reduzido nos últimos anos, devido, principalmente, à redução da transmissão vetorial intradomiciliar e

controle transfusional (Coura & Viñas, 2010). No entanto, ainda há muitas pessoas que vivem com a infecção crônica (Tabela 1). Estima-se que cerca de 3 milhões de pessoas estejam com a forma crônica da doença no Brasil (Brasil, 2012), onde mais de 30% das pessoas infectadas desenvolvem alterações cardíacas e mais de 10% desenvolvem as formas digestivas, neurológicas ou mistas, (Brasil, 2015b). Baseado nas projeções populacionais do Brasil (sexo e idade) para o período 2000/2060 e nos dados das unidades da federação para o período 2000/2030, do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2013), foram estabelecidas estimativas com relação ao quantitativo de pessoas infectadas por *T. cruzi* e dos números de casos de doença de Chagas (DCh) na fase crônica (digestiva e cardíaca), no período entre 2000 a 2015, onde no ano de 2015 foi estimado que cerca de 1.426.994 a 3.357.633 brasileiros poderiam estar infectados pelo parasito, desse quantitativo 142.699 a 335.763 com a forma digestiva e 428.098 a 1.007.290 com a forma cardíaca (Tabela 1), (Brasil, 2015b; Dias et al., 2016).

**Tabela 1 - Projeções das estimativas de prevalência de infecção por *T. cruzi* e da doença de Chagas crônica com as formas cardíaca e digestiva no Brasil, no período de 2000 a 2055.**

Ano	Estimativa da população brasileira	Faixa etária de referência			Estimativa do número de pessoas infectadas		Estimativa de casos com a forma digestiva		Estimativa de casos com a forma cardíaca	
		Faixa etária	População	%	Infecção 1,02% <sup>a</sup>	Infecção 2,4% <sup>b</sup>	Infecção 1,02% <sup>a</sup>	Infecção 2,4% <sup>b</sup>	Infecção 1,02% <sup>a</sup>	Infecção 2,4% <sup>b</sup>
2000	173.448.346	≥5	156.133.836	90,0	1.592.565	3.747.212	159.257	374.721	477.770	1.124.164
2005	185.150.806	≥10	150.944.641	81,5	1.539.635	3.622.671	153.964	362.267	461.891	1.086.801
2010	195.497.797	≥15	145.563.676	74,5	1.484.749	3.493.528	148.475	349.353	445.425	1.048.058
2015	204.450.649	≥20	139.901.357	68,4	1.426.994	3.357.633	142.699	335.763	428.098	1.007.290
2020	212.077.375	≥25	133.880.929	63,1	1.365.585	3.213.142	136.559	321.314	409.676	963.943
2025	218.330.014	≥30	127.334.466	58,3	1.298.812	3.056.027	129.881	305.603	389.644	916.808
2030	223.126.917	≥35	120.096.221	53,8	1.224.981	2.882.309	122.498	288.231	367.494	864.693
2035	226.438.916	≥40	112.013.898	49,5	1.142.542	2.688.334	114.254	268.833	342.763	806.500
2040	228.153.204	≥45	102.983.115	45,1	1.050.428	2.471.595	105.043	247.160	315.128	741.479
2045	228.116.279	≥50	92.984.144	40,8	948.438	2.231.619	94.844	223.162	284.531	669.486
2050	226.347.688	≥55	82.097.220	36,3	837.392	1.970.333	83.739	197.033	251.218	591.100
2055	222.975.532	≥60	70.485.475	31,6	718.952	1.691.651	71.895	169.165	215.686	507.495

Fonte: Dias et al., 2016.

Segundo o Ministério da Saúde, os novos casos anuais da doença de Chagas aduda, notificados através da ficha SINAN, entre 2000 – 2014, são atribuídos principalmente a transmissão oral (68%), seguido da transmissão vetorial (7%), (Brasil, 2015b), (Figura 3). Foram relatados 123 surtos no Brasil, entre 2005 e 2014, todos envolvendo 38 municípios da região amazônica (Brasil, 2015b). A principal fonte

de infecção foi a contaminação de alimentos com o parasito através de urina, secreções ou partes do vetor manipulado, através de produtos naturais não pasteurizados, tais como: açaí, bacaba, jaci (*Syagrus*), suco de cana-de-açúcar e da palmeira babaçu (Brasil, 2015b; Brasil, 2015c). Além disso, foram relatados outros riscos como, 33 espécies de animais silvestres infectados servindo de reservatório para *T. cruzi*; das 27 espécies de triatomíneos na região Pan Amazônica (Abad-Franch & Monteiro, 2007); onde pelo menos 16 espécies são descritas na região amazônica, 10 foram encontrados com infecção por *T. cruzi* (Tabela 2), (Coura et al., 2018). A devastação da região amazônica que altera o habitat dos animais silvestres e do triatomíneo; crescente migração de pessoas e de animais domésticos para as áreas endêmicas; a deficiência de vigilância e controle de casos autóctones (Coura & Junqueira, 2012).

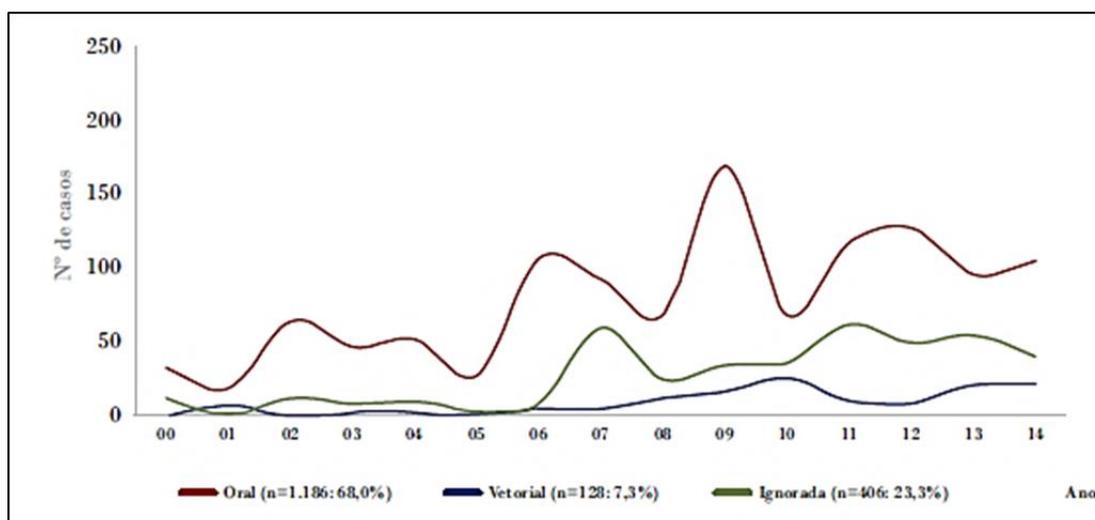


Figura 3 - Principais formas de transmissão da DCha no Brasil entre 2000 a 2014. Fonte: Brasil, 2015b.

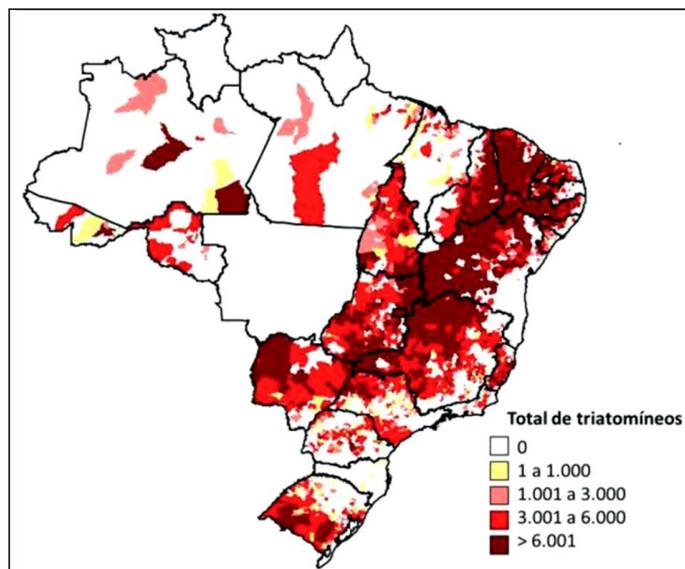
Tabela 2 - Triatomíneos encontrados na região Amazônica.

<i>Belminus herreri</i>	<i>Rhodnius brethesi</i> (+)
<i>Cavernicola lenti</i>	<i>Rhodnius nasutus</i>
<i>Cavernicola pilosa</i>	<i>Rhodnius neglectus</i> (+)
<i>Eratyrus mucronatus</i> (+)	<i>Rhodnius paraensis</i> (+)
<i>Microtriatoma trinidadensis</i> (+)	<i>Rhodnius pictipes</i> (+)
<i>Panstrongylus geniculatus</i> (+)	<i>Rhodnius robustus</i> (+)
<i>Panstrongylus lignarius</i> (+)	<i>Triatoma maculata</i>
<i>Panstrongylus rufotuberculatus</i> (+)	<i>Triatoma rubrofasciata</i>

(+) Triatomíneos encontrados com positividade para a infecção por *T. cruzi*. Fonte: Coura et al., 2018.

Foram capturados entre os anos de 2007 e 2011 mais de 770.000 triatomíneos (Figura 4) através da vigilância entomológica passiva ou ativa dos Estados, onde

foram identificadas 62 espécies; destas 76,8% foram examinados para a infecção por *T. cruzi*, nas quais as espécies que apresentaram taxas elevadas de infecção foram respectivamente: *T. vitticeps*, *R. robustus* e *P. lutzi* (Brasil, 2015c).



**Figura 4 - Número de triatomíneos capturados no Brasil.** Fonte: Brasil, 2015c.

*Triatoma vitticeps* tem maior incidência nos Estados de Minas Gerais e Espírito Santo; a espécie *Rodhnius robustus* é distribuída na região norte, nos Estados de Tocantins, Amazonas, Acre e Rondônia; e *P. lutzi* nos Estados da região nordeste: Piauí, Bahia, Sergipe, Alagoas, Paraíba, Rio Grande do Norte, Ceará e Pernambuco (Brasil, 2015c). Ainda foram encontrados focos remanescentes de *T. infestans* em 4 municípios da Bahia: Itaguaçu da Bahia, Ibipeba, Novo Horizonte e Tremedal; e em 12 municípios do Rio Grande do Sul: Ajuricaba, Alegria, Coronel Barros, Doutor Maurício Cardoso, Giruá, Humaitá, Ijuí, Independência, Porto Mauá, Salvador das Missões, Santo Cristo e São José do Inhacorá (Brasil, 2015c).

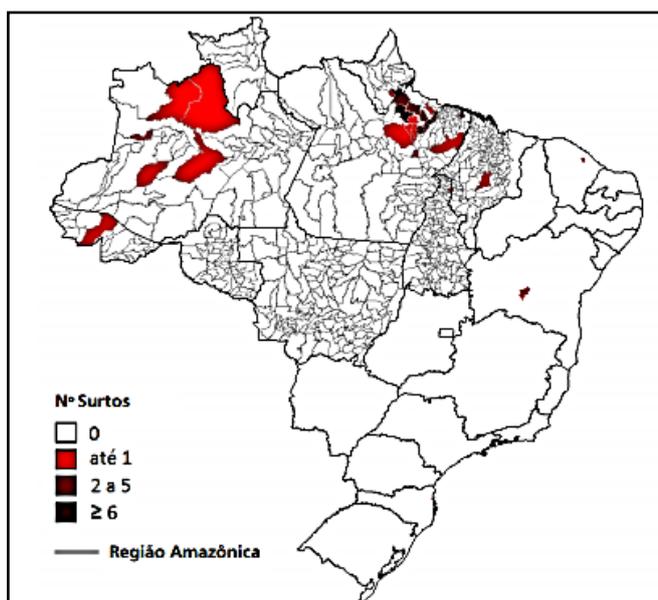
A transmissão vetorial no Rio Negro (AM) é quase sempre atribuída a atividades de extrativismo vegetal, como a piaçava, na região amazônica. Uma alta frequência de casos crônicos da doença (Coura et al., 2002; Viñas et al., 2003; Xavier et al., 2006; Brum-Soares et al., 2010) ou casos acidentais podem ocorrer em locais onde os seres humanos estejam em contato com florestas e também onde vetores e animais selvagens (marsupiais) possam invadir as suas casas em busca de comida (Coura et al., 2014).

Os registros anuais de transmissão oral da doença de Chagas no Brasil começaram a surgir no final da década de 60, onde o registro do primeiro caso humano autóctone foi em 1969, na cidade de Belém, Estado do Pará (Shaw et

al.,1969). O número de casos aumentou significativamente no decorrer dos anos, principalmente no final da década de 90, e destacaram-se os percentuais de casos de transmissão oral nos anos 2007 (24,12%), 2009 (16,85%) e 2012 (11,82%), que foram os períodos em que mais houveram registros de casos isolados de transmissão oral mostrando uma tendência de aumento de surtos em períodos alternados. Vale ressaltar a importância da vigilância epidemiológica através do SINAN na notificação de novos casos, desde a sua implementação em 1993 (Brasil 2007; Santos, 2014). As regiões brasileiras com maior registro de casos de surto da doença por transmissão oral, entre os anos de 2000 e 2013, são predominantemente o norte (91,1%) e nordeste (4,6%), (Figura 5, Tabela 3). Os Estados mais prevalentes da região norte são: Pará (74,4%); Amapá (9,3%) e Amazonas (5%). Os da região nordeste são, respectivamente: Maranhão (1,5%); Bahia (0,9%), Pernambuco (1,1%) e Ceará (0,6%), (Figura 5, Tabela 3), (Brasil, 2015c). Já nas regiões centro-oeste, sudeste e sul tiveram respectivamente os percentuais de notificações: 1,7%, 0,8%, 1,8% (Brasil, 2015c). Só no ano de 2015 foram notificados 235 casos de DCha no Estado do Pará (SESPA, 2017).

Entre os Estados nordestinos destaca-se o Maranhão, que teve os primeiros casos autóctones de DCha relatados em 1975: quatro casos; onde três eram provenientes da Ilha de São Luís e um caso oriundo do interior, povoado de Bacurituba, pertencente ao município de Cajapió, região da baixada maranhense (Silva et al., 1985). Em 1994 teve um caso notificado na cidade de São Luís pela Fundação Nacional de Saúde (Cutrim et al., 2010) e em 2011 foi relatado um surto por transmissão oral com 23 casos (SES/MA, 2011).

Até o presente momento, ainda é um desafio a compreensão da dimensão de DCh na região amazônica, devido a falta de dados da real extensão da problemática e de informação sistematizada, o que limita possíveis decisões e ações preventivas do Programa de Controle de Doença de Chagas – PCDCh (Santos, 2013). As principais razões que dificultam o controle da doença nessa região são: (1) a ocupação desordenada; (2) o desmatamento descontrolado; (3) risco de desertificação; (4) a cobiça internacional, por possuir fronteiras com a Bolívia, Peru, Colômbia, Venezuela, Guiana, Suriname e Guiana Francesa, com uma extensão total de mais de 16.886 km, onde as pessoas atravessam acompanhadas por animais domésticos; (5) além de uma elevada quantidade de reservatórios silvestres e vetores infectados pelo agente da doença (Coura & Junqueira 2015a; Coura & Junqueira 2015b).



**Figura 5 - Número de surtos notificados no Brasil entre 2005 e 2013.** Fonte: Brasil, 2015c. Baseado nos dados do SINAN e CGDT/DEVIT/SVS/MS. Atualizado em maio/2014.

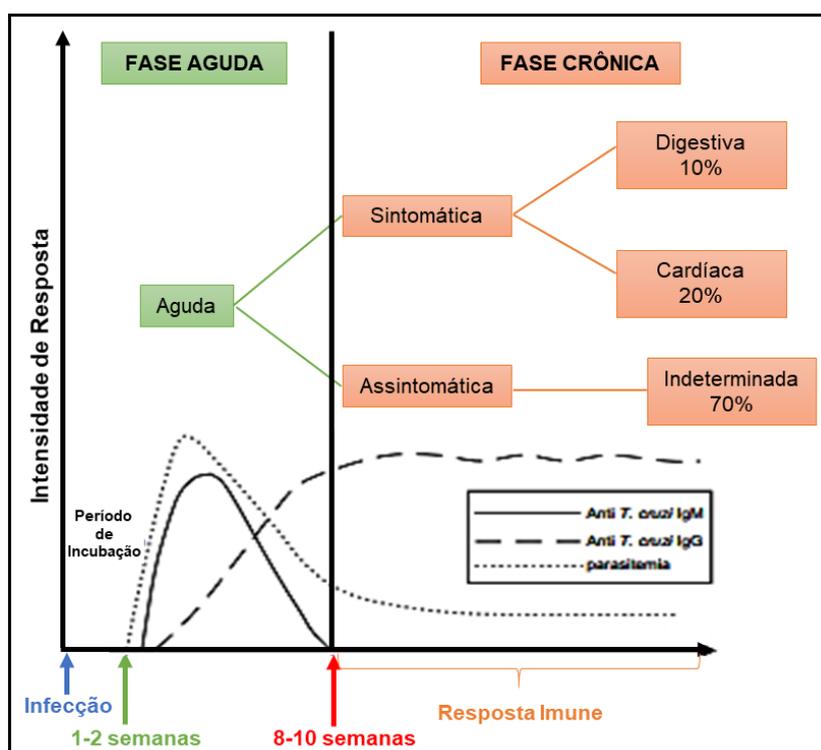
**Tabela 3 - Notificação do número de casos em diferentes formas de transmissão da doença de Chagas de 2000 a 2013.**

Região/Unidade da Federação	Forma de transmissão					Total%	
	Oral	Vetorial	Vertical	Ignorada*	Outras**		
Norte	1.023	70	1	329	7	1.430	91,1
Rondônia	0	2	0	0	0	2	0,1
Acre	5	2	0	0	0	7	0,4
Amazonas	56	14	0	7	1	78	5,0
Roraima	0	0	0	1	0	1	0,1
Pará	812	49	1	306	5	1.173	74,7
Amapá	131	1	0	13	1	146	9,3
Tocantins	19	2	0	2	0	23	1,5
Nordeste	33	14	1	23	2	73	4,6
Maranhão	11	7	0	5	1	24	1,5
Piauí	0	3	0	1	0	4	0,3
Ceará	8	1	0	0	0	9	0,6
Rio Grande do Norte	1	0	1	0	0	2	0,1
Paraíba	0	0	0	1	0	1	0,1
Pernambuco	0	2	0	15	0	17	1,1
Sergipe	0	1	0	1	0	2	0,1
Bahia	13	0	0	0	1	14	0,9
Sudeste	0	2	1	8	1	12	0,8
Minas Gerais	0	0	0	6	0	6	0,4
Espírito Santo	0	0	0	0	1	1	0,1
Rio de Janeiro	0	1	0	0	0	1	0,1
São Paulo	0	1	1	2	0	4	0,3
Sul	25	0	3	0	0	28	1,8
Santa Catarina	24	0	0	0	0	24	1,5
Rio Grande do Sul	1	0	3	0	0	4	0,3
Centro-Oeste	0	14	0	12	1	27	1,7
Mato Grosso	0	4	0	0	0	4	0,3
Goiás	0	10	0	12	1	23	1,5
Brasil	1.081	100	6	372	11	1.570	100,0

Fonte: Brasil, 2015c.

### 1.3 Evolução da infecção no hospedeiro mamífero

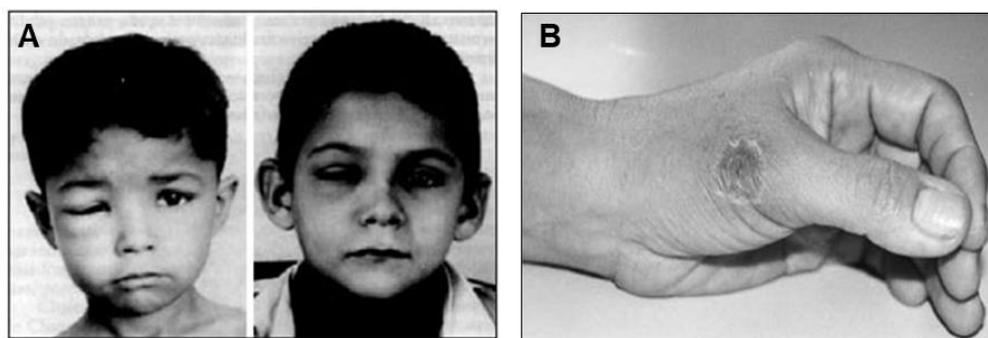
A patogenia da doença é bastante complexa, sendo caracterizada por duas fases: a fase aguda e a fase crônica. A fase aguda começa quando o *T. cruzi* penetra no corpo e a infecção se instala. A sua duração varia de 6 a 8 semanas, conforme a forma de transmissão e o inóculo (Rassi Jr. & Rassi, 2012), (Figura 6).



**Figura 6 - Evolução clínica da doença de Chagas.** Fonte: Modificada de Dutra et al., 2009 e de Rassi Jr & Rassi, 2012.

A fase aguda pode ser assintomática, sintomática ou oligossintomática, sendo a última mais comum em crianças. Em adultos, a fase aguda é predominantemente assintomática ou pode ser evidenciada por sintomas inespecíficos comumente apresentados em outras doenças, como dor de cabeça e cansaço. Na forma vetorial clássica, as manifestações clínicas se caracterizam pelo surgimento de um conjunto de sintomas com intensidade variável, e que estão relacionadas fortemente à fase aguda, como a febre prolongada, cefaleia, palidez, mialgias, esplenomegalia, miocardite e reação inflamatória local na região onde o parasita foi inoculado (OPAS, 2009; Brasil, 2014; Dias et al., 2016). Se a região de inoculação for cutânea pode ocorrer e persistir por até oito semanas um edema comumente chamado de chagoma de inoculação (Figura 7B), se a penetração do parasito for ocular (Figura 7A), observa-se em 10 a 20% dos casos, o sinal de Romana (Romana, 1935; Dias, 1997; Rey, 2001). Quando

esses sinais sugestivos de porta de entrada ocorrem, viabilizam o diagnóstico diferenciado entre as duas formas de transmissão (vetorial e oral), por serem característicos da transmissão vetorial (Rassi et al., 2000; Pinto et al. 2008; Dias 2006). Os sinais e sintomas específicos de insuficiência cardíaca incluem taquicardia sem febre, palpitações, dispneia e dor torácica, na fase aguda da doença. O período de incubação, nesta fase inicial, pode variar de 3 a 22 dias (Shikanai-Yasuda et al., 1991; Shikanai-Yasuda & Carvalho, 2012; Brasil, 2017); onde nessas primeiras semanas de infecção, podem ser observadas alterações radiológicas e/ou eletrocardiográficas, de maior ou menor significado. Portanto, nos casos com evidências de sinais e sintomas de miocardite é indicado o estudo da área e função cardíaca por meio do ecocardiograma (Rassi et al., 2000; Ferreira & Miziara 1985).



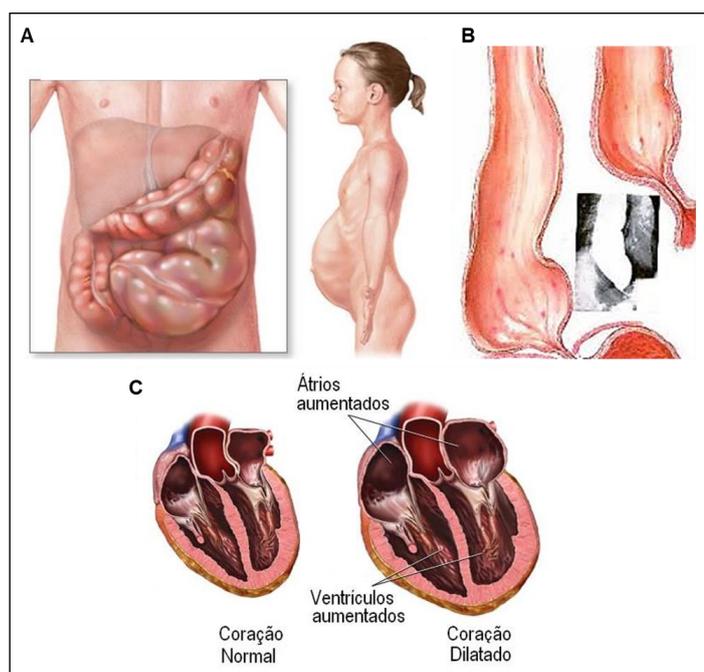
**Figura 7 - Edema palpebral também denominado de sinal de Romaña (A) e chagoma de inoculação (B).** Fonte: Melo et al., 2009; Kinoshita-Yanaga et al., 2009.

Na fase crônica é apresentada três principais formas de manifestação: a forma indeterminada, a forma digestiva e a forma cardíaca (Figura 6 e Figura 8), (OMS, 2002; Brasil, 2004). A forma indeterminada ocorre logo após a fase aguda e é caracterizada pela ausência de sintomas e pela falta de alterações notáveis no eletrocardiograma e na radiografia, embora os pacientes sejam sorologicamente positivos para o *T. cruzi* (Prata, 2001). Cerca de 60 a 70% dos pacientes que apresentam a forma indeterminada permanecem assim pelo resto de suas vidas, enquanto que o restante dos pacientes desenvolve as formas crônicas sintomáticas (cardíacas, digestivas ou cardiodigestivas), normalmente 10 a 30 anos após a infecção inicial (Dias, 1995). Na forma digestiva alterações morfológicas e funcionais podem ser observadas principalmente nas regiões do cólon e do esôfago, podendo originar a formação do megacólon (Figura 8 A) e do megaesôfago (Figura 8 B), respectivamente (OMS, 2002).

Entre aqueles afetados atualmente pela doença de Chagas em todo o mundo, 20% a 30% (de 2 a 5,4 milhões de pessoas), estão sofrendo de miocardiopatia

chagásica ou irão desenvolver esta sequela clínica (OPAS/OMS, 2007; Marin-Neto et al., 2007; Rassi et al., 2010). Milhões de pessoas cronicamente infectadas estão em risco de acometimento cardiovascular e / ou de patologia digestiva, tornando a doença de Chagas uma das principais causas de morbidade cardiovascular e morte prematura na América Latina (OMS/TDR, 2012).

A miocardiopatia chagásica é uma condição altamente debilitante caracterizada por arritmias cardíacas, insuficiência cardíaca e risco de morte súbita por fibrilação ventricular ou taquicardia ou eventos tromboembólicos (Rassi et al., 2010). O acometimento do trato gastrointestinal pode resultar nos debilitantes como megaesôfago e megacólon (Oliveira et al., 1998; Rassi et al., 2010; Brasil, 2015c). Na fase crônica sintomática, há uma diminuição gradual da qualidade de vida e da capacidade de trabalho dos doentes, que passam a precisar de constantes cuidados médicos (Oliveira et al., 1998; Xavier et al., 2005).



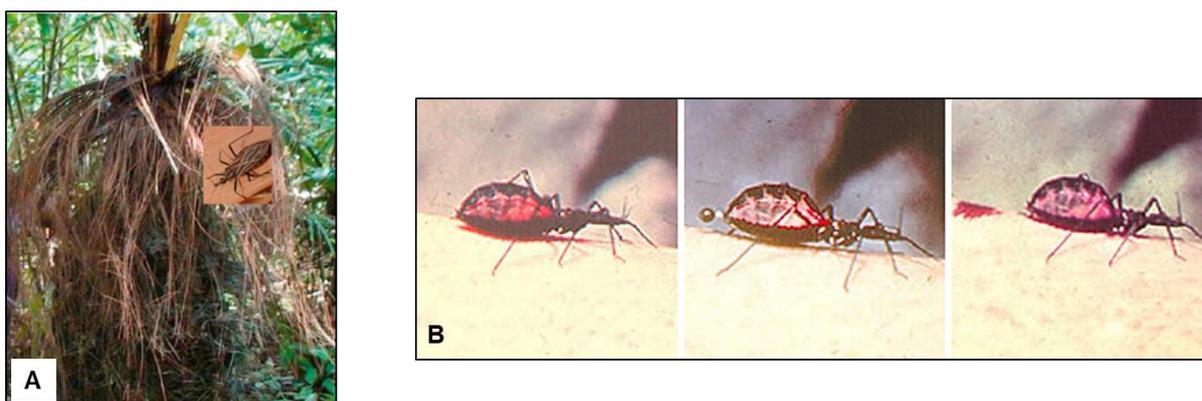
**Figura 8 - Formas crônicas sintomáticas da doença de Chagas. (A) Megacólon; (B) Megaesôfago; (C) Cardiopatia chagásica.**

Fonte: <<http://proctologiaypisopelvico.com/megacolon/>>;  
<<http://www.gastroriopreto.com.br/aparelho-detahes-71-Acal%C3%A1sia-e-Megaes%C3%B4fago#.WqXHxCjwblU>>;  
<<http://www.medicinageriatrica.com.br/tag/aumento-do-coracao/>>.

#### 1.4 Transmissão

O *T. cruzi* pode ser transmitido aos seres humanos e a diversas espécies de mamíferos domésticos e silvestres, podendo estes últimos, atuarem como

reservatórios potenciais da infecção. As vias de transmissão da doença de Chagas são a vetorial, transfusões de sangue e transplantes de órgãos contaminados, congênita (via placenta), oral e contaminação ocasionada por acidentes laboratoriais (OMS, 2002). A transmissão vetorial se destaca por ser responsável pela maior parte do contingente de infectados em todo o mundo, ainda que sua importância venha declinando paulatinamente em decorrência do controle vetorial e da melhoria das condições de habitação em áreas de ocorrência da doença (Montoya et al., 2003). É considerada a forma clássica de transmissão, que ocorre por meio das fezes infectadas de insetos hemípteros hematófagos da subfamília Triatominae, popularmente conhecidos como barbeiros, procootós, chupanças, bicudos ou chupões. (Figura 9). Dentro desta subfamília se destacam as cinco espécies de vetores mais importantes para a transmissão da doença: *Triatoma infestans*, *Rhodnius prolixus*, *Triatoma dimidiata*, *Panstrongylus megistus* e *Triatoma brasiliensis* (Figura 9).



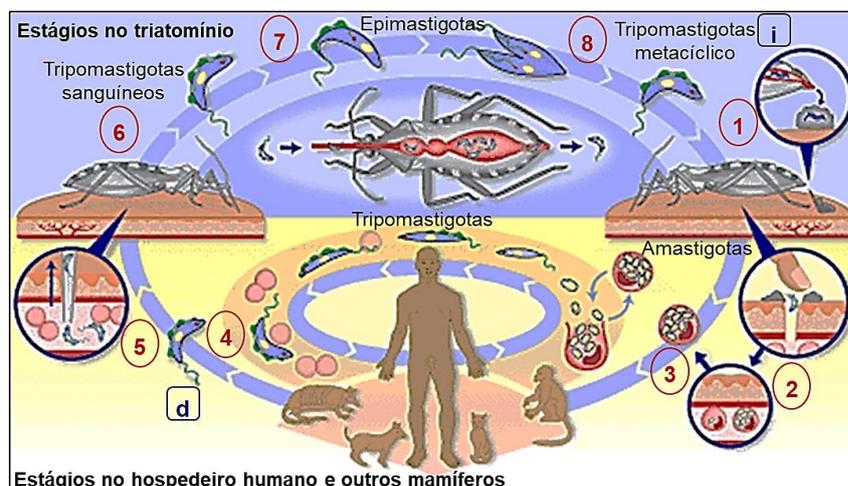
**Figura 9 - Vetores da infecção de *Trypanosoma cruzi*.** (A) Nicho do triatomíneo *Rhodnius brethesi*, fibras de *Leopoldina piassaba*; (B) Imagem do vetor defecando na local da picada. Fonte: (A) Coura & Junqueira, 2015a; (B) <<https://www.cdc.gov/dpdx/trypanosomiasisAmerican/index.html>>.

O conjunto de características heterogêneas das populações de *T. cruzi*, juntamente com os hábitos alimentares dos insetos vetores e o conjunto de hospedeiros vertebrados presentes em um determinado ambiente, define dois ciclos de transmissão vetorial do *T. cruzi*: o ciclo silvestre, que envolve principalmente marsupiais e pequenos roedores silvestres, e o ciclo doméstico que acomete o homem e alguns outros mamíferos do ambiente peridomiciliar (OMS, 2002).

A transmissão da doença de Chagas para o hospedeiro vertebrado ocorre quando (1) um barbeiro infectado, logo após picar e sugar o sangue de um indivíduo, e eliminar as fezes sobre a região da picada com as formas tripomastigotas metacíclicas infectantes do *T. cruzi*. Por meio da mucosa ou por lesões na pele, (2) as

formas infectantes invadem o corpo do hospedeiro vertebrado, penetram em suas células (principalmente células cardíacas e dos músculos lisos e esqueléticos) e se diferenciam nas formas amastigotas (De Souza et al., 2010). As formas metacíclicas, ao penetrarem nas células do hospedeiro, irão induzir a formação de uma vesícula denominada vacúolo parasitóforo e se localizarão nesta (De Souza et al., 2010). Esse vacúolo é um produto não só da entrada do tripomastigota metacíclico, mas também da fusão de lisossomas que são recrutados pela célula. Essas fusões tornarão o pH do vacúolo acidificado o que será fundamental para o início da diferenciação do *T. cruzi* de tripomastigota para amastigota e para a produção de enzimas e perforinas (Tc-TOX) pelo *T. cruzi* que levarão à ruptura do vacúolo, e, conseqüente, escape para o citoplasma (De Souza et al., 2010).

Os amastigotas no citoplasma se multiplicam por divisão binária (3) até a célula ficar repleta destas formas. Depois, (4) esses amastigotas se diferenciam em tripomastigotas sanguíneos, rompendo a célula e alcançando a corrente sanguínea. Essas formas tripomastigotas podem invadir novas células ou (5) serem ingeridas pelos insetos triatomíneos durante o repasto sanguíneo (De Souza et al., 2010). No intestino médio do inseto, (6) os tripomastigotas se diferenciam na forma epimastigota (Figura 10), e da forma epimastigota que os antígenos de superfície são tradicionalmente utilizados nas provas sorológicas de diagnóstico e como antígeno nas reações de imunofluorescência indireta. Essas formas epimastigotas se multiplicam (7) e migram para a parte mais posterior atingindo o reto, onde se diferenciam em tripomastigotas metacíclicos (8), fechando o ciclo (De Souza et al., 2010), (Figura 10).



**Figura 10 - Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*.** Fonte: Modificada de OMS/TDR. Disponível em: <<http://www.who.int/tdr/diseases-topics/chagas/en/>>. Números 1 a 8: etapas do ciclo de vida do parasito, destacados no texto. (d) Estágio diagnóstico. (i) Estágio infeccioso.

Desde 1990, diversos países da América Latina, entre eles o Brasil, vêm realizando medidas de controle da doença de Chagas (Mott *et al.*, 1990). A transmissão pelo vetor domiciliar *T. infestans* foi dada como interrompida (Dias *et al.*, 2002; Moncayo *et al.*, 2003; Silveira *et al.*, 2002) no Uruguai (OMS, 1994), em 1997; Chile (OMS, 1995), em 1999; Brasil, em 2006 (Dias, 2007). Os demais países endêmicos, a interrupção do *T. infestans* ainda está em curso. O sucesso da Iniciativa Cone Sul estimulou países da América Central a combater a principal espécie de vetor da região, o *R. prolixus*, que gerou resultados promissores pelos países El Salvador e Guatemala (Schmuñis, 2007). Mesmo com essas iniciativas a transmissão vetorial continua ocorrendo.

Apesar da certificação pela interrupção da transmissão do vetor domiciliar, em alguns casos, o controle vetorial não será suficiente para controlar esse tipo de transmissão, devido ao grande número de reservatórios de *T. cruzi* em animais selvagens, acarretando na não erradicação do parasito. Assim, o processo de controle da doença está no investimento da diminuição da transmissão vetorial, que garante a detecção precoce de casos e o gerenciamento da população infectada (OMS, 2017).

A contaminação via transfusão sanguínea é uma das formas mais comuns de transmissão, depois da transmissão vetorial, consistindo nas principais causas de contaminação em países não endêmicos devido à migração de pessoas (Schmuñis, 2007). Na América Latina, essa forma de transmissão teve um decaimento significativo após a implementação da triagem sorológica para a infecção de *T. cruzi* em bancos de sangue, contribuindo para a diminuição da doença na maioria dos países da América Latina, com exceção da Bolívia, onde a triagem não foi implementada (Schmuñis, 1991). Em contrapartida, se torna necessária a regulamentação da triagem sorológica para a doença de Chagas nos bancos de sangue em áreas endêmicas, por conta do fluxo migratório de indivíduos infectados de áreas endêmicas (Coura & Viñas, 2010).

A forma de transmissão congênita passou a ter mais destaque após as reduções de casos de transmissões vetoriais e por transfusão sanguínea, gerando a mudança no panorama epidemiológico da doença. Estima-se que o risco deste tipo de transmissão ocorrer é de 0,1% a 12%, que pode sofrer influências do nível de parasitemia materna, da cepa do parasita, da existência de lesões placentárias e da região geográfica avaliada (Brasil, 2005; Dias *et al.*, 2011; Nisida *et al.*, 1999). Com a realização dos exames do pré-natal é possível controlar e diminuir os riscos por esta

via de transmissão, através da identificação prévia de mães infectadas com posterior tratamento e acompanhamento dos recém-nascidos (Russomando et al., 2005).

A transmissão oral é considerada um mecanismo primário, principalmente no ciclo silvestre da tripanossomíase e está relacionada com várias formas de contaminação como em leite materno, sangue de mamífero infectado, carne mal cozida de mamíferos infectados (especialmente de reservatórios silvestres), alimentos e bebidas contendo fezes, urina ou pedaços triturados de triatomíneos infectados e alimentos ou bebidas contaminadas com urina ou secreção para-anal de marsupiais infectados pelo *T. cruzi* (Dias et al., 2011; Toso et al., 2011; Coura et al., 2013). Os novos casos da doença de Chagas no nosso país são principalmente atribuídos a esta via de transmissão, conforme já descrito na parte de epidemiologia do Brasil. Essa via de transmissão, que é predominante na região amazônica (Shikanai-Yasuda & Carvalho, 2012; Dias, 2006).

Com relação a transmissão por transplante de órgãos, já foram descritos como via de aquisição da infecção, principalmente, os transplantes renais, hepáticos, cardíacos, de medula óssea e de pâncreas. (Dias et al., 2011; Kransdorf et al., 2014). É fundamental uma rigorosa avaliação sorológica prévia de doadores e receptores, devido a toda uma suscetibilidade clínica envolvida no transplante de órgãos, como a histocompatibilidade e a própria disponibilidade do órgão. Com relação aos receptores, são indispensáveis ações baseadas na atenção médico-laboratorial no pós-operatório, averiguando a possibilidade de qualquer detecção de reativação por conta da imunossupressão. Em caso de reativação, o tratamento antiparasitário deve ser iniciado de imediato reduzindo as possibilidades de cardite aguda e/ou meningoencefalite (Dias et al., 2011).

São poucos os casos relatados da transmissão acidental, foram descritos pouco mais de 50 casos até o final da década de 1980 (Herwaldt & Juranek, 1993; Hofflin et al., 1987). Os possíveis fatores de acidentes em laboratórios seriam através da captura dos insetos vetores em áreas endêmicas, de trabalhos experimentais com mamíferos infectados, de culturas do parasito ou de aerossóis de materiais contaminados (Dias et al., 2011). A prevenção da contaminação por acidentes laboratoriais é de suma importância e passa pelas instâncias primária e secundária, que seriam respectivamente evitar o acidente e minimizar as consequências do acidente. Para evitar possíveis acidentes, se faz necessário o treinamento dos profissionais e o uso adequado de equipamentos de proteção individual (EPIs) e

equipamentos de proteção coletiva (EPCs), onde estes últimos possuem elementos também para a diminuir as possíveis decorrências acidentais.

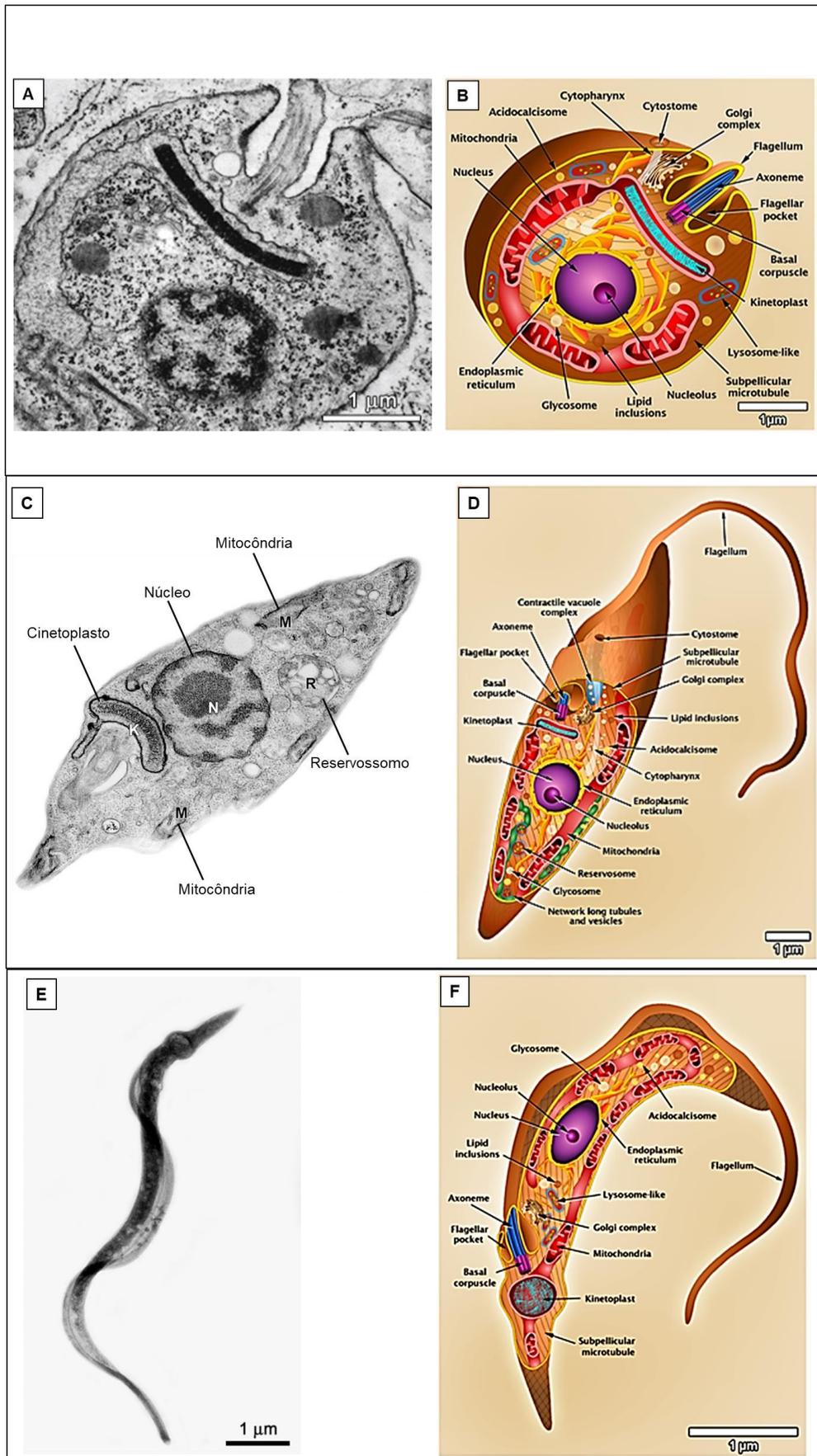
## 1.5 O Parasito

*Trypanosoma cruzi*, agente etiológico da doença de Chagas, é um protozoário hemoflagelado do super-reino Metakayota, reino Protozoa, filo Euglenozoa, classe Kinetoplastea, ordem Kinetoplastida e pertencente à família Trypanosomatidae (Cavalier-Smith, 1993; Cavalier-Smith, 2010; Honigberg, 1963; Rey, 2001; Coura et al., 2002). Esta ordem tem como características a presença de um ou dois flagelos que se originam a partir de uma bolsa flagelar e uma mitocôndria única e alongada. No interior da mitocôndria única, se encontra uma estrutura, denominada de cinetoplasto, que compreende DNAs mitocondriais (mtDNAs) circulares (Maslov et al., 2001; Brusca & Brusca, 2007). O cinetoplasto está situado na base do flagelo, onde é encontrado de 5 a 33% do DNA total dos tripanossomas, denominado de *kinetoplast DNA* ou *kDNA* (Silveira, 2000; Junqueira et al., 2005).

A estrutura do parasito possui tanto características semelhantes como distintas de outros eucariotos. A sua célula é composta por um núcleo oval, com várias organelas, característico de eucarioto, e um flagelo em sua extremidade anterior, em uma das formas evolutivas (Figura 11), (Soares et al., 1989; Souza, 2008). Além disso, o núcleo contém alternância morfológica entre as fases replicativas e infectivas. Nas fases replicativas possui um formato esférico com escassa heterocromatina e nucléolo perceptível. Já nas formas infectivas é alongado, abundante em heterocromatina e com ausência de nucléolo. Essas variações se devem a taxa transcricional específicas de cada fase, onde nas formas epimastigotas e amastigotas a transcrição ocorre de maneira acentuada, e nas formas tripomastigotas metacíclica e sanguícola a transcrição diminui a níveis basais (Elias et al., 2001). A maioria de suas organelas são idênticas a de outros eucariotos e outras que são próprias do parasito, como os glicossomos, acidocalcissomos e reservossomos, que são respectivamente estruturas esféricas e vesiculares relacionadas a vias metabólicas (Oppendoes & Borst, 1977; Souza, 2008), ao armazenamento (Docampo et al., 1995; Docampo & Moreno, 2008) e a degradação proteica (De Souza & Rodrigues, 2009; Soares et al., 1989). A membrana plasmática possui na face interna uma camada de microtúbulos dispostos paralelamente entre si e interconectados através de filamentos especializados, o que atribui resistência mecânica e rigidez ao parasita (Kohl & Gull, 1998). Já na face

externa, depara-se com uma camada de glicoconjugados ligada a ela por meio de âncoras de glicosilfosfatidilinositol (GPI), muitas destas relacionadas à interação parasito-hospedeiro (Heise et al., 1996). O seu único flagelo é fundamental para locomoção, divisão celular e morfogênese. A sua estrutura é composta por uma haste paraflagelar constituída de um arranjo complexo de filamentos paralelos ao seu eixo, a qual ancora o flagelo ao axonema e à zona de ligação (De Souza & Souto-Padrón, 1980; Saborio et al., 1989), que por sua vez, é formada por uma rede de filamentos e conexões de membrana que conectam o flagelo ao longo do corpo celular do parasita (Rocha et al., 2006).

As três formas evolutivas do parasito são morfologicamente diferenciadas em seu ciclo de vida, onde há a variação da posição do cinetoplasto, sendo um dos critérios das suas diferenciações (Brener, 1997). A forma tripomastigota é extracelular, não replicativa e infectiva, localizada tanto no intestino posterior do triatomíneo como no final do desenvolvimento de *T. cruzi* no interior da célula do hospedeiro mamífero e também na corrente sanguínea. O cinetoplasto está localizado na região posterior do parasita, com uma forma mais arredondada devido à redução do nível de condensação do kDNA (Figura 11). A amastigota é a forma intracelular replicativa do protozoário, encontrada no interior das células dos hospedeiros mamíferos. Apresenta o cinetoplasto de maneira idêntica aos epimastigotas e morfologicamente possui característica esférica ou oval, com flagelo curto sem visibilidade ao microscópio óptico, oriundo da bolsa flagelar (Figura 11). Já a forma extracelular epimastigota é replicativa presente no tubo digestivo do inseto vetor e em cultivos axênicos. Esta forma contém cinetoplasto em forma de bastão em posição anterior ao núcleo, constituído por um material filamentoso organizado em feixes de fibras fortemente empacotados e perpendicularmente orientados ao eixo longitudinal do parasita (Figura 11).



**Figura 11 - As três formas evolutivas de *T. cruzi*.** (A) microscopia eletrônica da forma amastigota; (B) desenho de um amastigota; (C) microscopia eletrônica de um epimastigota; (D) desenho de um epimastigota; (E) microscopia eletrônica de um tripomastigota; (F) desenho de um tripomastigota. Fontes: Fernandes et al., 2011; Teixeira et al., 2012; <<http://chagas.fiocruz.br/organizacao-estrutural/>>.

## 1.6 O Genoma

*Trypanosoma cruzi* possui o genoma diploide e é o mais complexo dentre os tripanossomatídeos que infectam o homem. Com base na cepa CL Brener, possui o tamanho de aproximadamente 110 milhões de pares de bases, que potencialmente codificam 22.570 proteínas (Zingales et al., 1997; El-Sayed et al., 2005).

O kDNA encontra-se disposto em uma rede complexa de moléculas circulares concatenadas, compostas por 10 a 20 mil cópias de minicírculos, de 1,4 Kb e entre 20 a 50 cópias de maxicírculos com tamanho de aproximadamente 40 Kb (Silveira, 2000; Junqueira et al., 2005).

Aproximadamente, 50% do genoma nuclear do parasito é composto por sequências repetitivas como retrotransposons, repetições subteloméricas e genes das famílias de moléculas de superfície. Estes genes incluem os que codificam transsialidases, mucinas, proteínas associadas à mucina (MASP) e a glicoproteína de superfície gp63. Aproximadamente 18% dos 12.000 genes codificadores de proteínas são responsáveis por sintetizar proteínas de superfície, que compreendem a maior parte das famílias gênicas, envolvidas na interação parasito/hospedeiro (El-Sayed et al., 2005). Esses agrupamentos podem estar distribuídos em diferentes cromossomos, e o número de cópias da repetição pode variar de um grupo para outro.

Por causa da complexidade genética e antigênica, 50% dos genes do parasito codificam proteínas hipotéticas, não tendo similaridade com proteínas de outros organismos (Martins et al., 2011). Devido ao alto grau de polimorfismo intraespecífico desse parasito, foram atribuídas sete linhagens distintas denominadas unidades de tipagem discretas (DTU – *Discrete Typing Units*), TcI a TcVI e Tcbat (Brisse et al., 2000a; Marcili et al., 2009a; Zingales et al., 2009; Pinto et al., 2012; Zingales et al., 2012; Ramírez et al., 2013; Lima et al., 2015; Brenière et al., 2016), as quais, são subdivididas em cepas caracterizadas para marcadores moleculares específicos. Por esta razão, as cepas de cada DTU, são consideradas como famílias de clones estritamente próximas, mas não como um único clone (Zingales et al., 2009). Dessa forma, foi usado o termo *clonet* para se referir ao conjunto de características presentes dentro de cada subgrupo de cepas (Tibayrenc & Ayala, 1991). O ancestral comum mais recente de um determinado *clonet* pode variar de algumas semanas ou até mesmo centenas de anos, dependendo do poder de resolução do marcador e da taxa

de mudança evolutiva (relógio molecular), podendo ter uma considerável relevância clínica, epidemiológica e diagnóstica (Zingales et al., 2009).

Cabe destacar, que várias proteínas do parasito estão sujeitas a modificações pós-traducionais acarretando em variantes de uma única proteína, que podem ter sido causadas pela introdução de resíduos de açúcar (Muiá et al., 2010), ácidos graxos, grupos isoprenílicos, âncoras de GPI às proteínas recém-sintetizadas, colaborando para o alto grau de diversidade antigênica do parasito (Cordero et al., 2009; Emmer et al., 2009; Muiá et al., 2010). Onde, essa elevada variabilidade antigênica limita o uso de proteínas íntegras nos testes diagnósticos utilizados nos laboratórios clínicos, afetando o desempenho.

## **1.7 Diagnóstico Laboratorial da doença de Chagas**

### **1.7.1 Fase Aguda**

O diagnóstico recomendado na fase inicial da infecção por *T. cruzi* são os métodos parasitológicos diretos baseados no reconhecimento das formas tripomastigotas sanguíneas circulantes no sangue, para leitura imediata e repetida, com a finalidade de esclarecimento diagnóstico, cuja sensibilidade do teste depende do nível de parasitemia e da experiência do leitor (Junqueira et al., 2011). As técnicas de pesquisa de esfregaços de sangue fresco e de sangue corados são utilizados nesta fase da doença, de rápidas e simples execuções, resultando na diferenciação do tripanossomatídeo circulante, com maior sensibilidade no método de observação microscópica a fresco. O melhor período para a realização da coleta para os testes seria dentro de 30 dias do início de sintomas e com o indivíduo apresentando quadro febril (OMS, 2002; Luquetti & Schmuñis 2010; Dias et al. 2016). Em caso de baixos níveis de parasitos circulantes no sangue periférico, se torna necessária a utilização dos métodos de concentração de parasitas, tais como o método de *Strout* (centrifugação do soro depois da retirada do coágulo) e o micro-hematócrito (centrifugação e exame do creme leucocitário, por exemplo), (Junqueira et al., 2011).

Além do diagnóstico parasitológico existem técnicas sorológicas indiretas, mas a sensibilidade apresentada é baixa em indivíduos com infecção recente, por conta do tempo mínimo necessário para a produção de IgG anti-*T. cruzi*. O melhor seria a pesquisa de anticorpos da classe IgM anti-*T. cruzi*, mas atualmente seu emprego só é viável em uma única metodologia, que seria a imunofluorescência indireta (IFI - De

Souza & Camargo, 1966). O resultado negativo nos exames sorológicos na fase inicial da doença é comum devido ao período de latência da resposta imune, após a entrada do agente causal, onde a detecção de anticorpos requer um período de semanas para ser produzida a níveis detectáveis. Essas razões restringem a utilização de ensaios sorológicos como forma de diagnóstico na fase aguda, sendo empregados somente em laboratórios de referência e de pesquisa (Ostermayer & De Castro, 1997; Luquetti, Schmuñis, 2010; OPAS/OMS Brasil, 2010).

### **1.7.2 Fase Crônica**

Com o progresso das manifestações clínicas, dá-se início a fase crônica da doença de Chagas (DChc) com sensível redução do parasito na corrente sanguínea do indivíduo infectado e aumento da produção de IgG anti-*T. cruzi*, os quais passam a ser detectados principalmente por ensaios imunológicos (Schattschneider et al., 1992). Além dos métodos parasitológicos e sorológicos, mais recentemente também vem sendo utilizado os métodos moleculares.

#### **1.7.2.1 Testes parasitológicos indiretos**

Como já descrito, nesta fase da doença o uso de métodos parasitológicos diretos não é recomendado devido a baixa sensibilidade, consequência da redução de parasitos na corrente sanguínea. Os métodos parasitológicos indiretos podem ser empregados na DChc, como o xenodiagnóstico e a hemocultura para a averiguação da presença ou ausência de parasitos.

O xenodiagnóstico é um método antigo (Brumpt, 1914) e que consiste na pesquisa de parasitos nas fezes e/ou no conteúdo intestinal dos insetos vetores, criados em laboratórios, e que se alimentam de sangue de indivíduos com suspeita clínica, apresentando resultados positivos variando entre 9% a 87,5% (Maekelt et al. 1964; Mardsen et al., 1969; Barreto et al., 1978; Camargo et al., 1979; Barbosa et al., 1983; Borges-Pereira et al., 1989; Brener et al., 1992; Junqueira et al., 1996). Pode ser empregado tanto para o diagnóstico em humanos, quanto em animais. Pode ser aplicado *in vivo* e *in vitro*, gerando resultados similares em ambas as técnicas, com positivities registradas por Piñeda & Luquetti (1998) de 28% *in vivo* e 32% *in vitro*. Resumidamente, a metodologia *in vivo* consiste na utilização de 10 triatomíneos vivos em cada caixa dispostos em 4 caixas, com um dos seus lados fechada por uma rede fina, a qual é colocada na face ventral do antebraço do paciente e permanece por aproximadamente 30 minutos. Para que seja possível a realização deste exame, é

necessária uma preparação prévia, onde os triatomíneos são mantidos em jejum por duas semanas. Após os triatomíneos se alimentarem com sangue do paciente, os insetos passam a ser mantidos a temperatura ambiente, cerca de 85% de umidade relativa e na ausência de luz. O exame do conteúdo fecal ou do intestino é efetuado depois de 30-60 dias em pacientes da fase crônica e 10 – 30 dias em pacientes da fase aguda (Brumpt, 1914; Dias, 1934; Dias, 1940; Almeida, 1976).

A hemocultura baseia-se na multiplicação abundante do parasito em meios de cultura enriquecidos, como meios difásicos com base de ágar sangue (NNN), meios líquidos como o LIT (*liver infusion tryptose*), BHI (*brain heart infusion*) e o meio Waren's, a partir da amostra clínica coletada (sangue, líquido, etc.). O meio LIT é o mais utilizado. Esta técnica pode gerar resultados positivos de 0% a 94% (Chiari & Brener, 1966; Barbosa et al., 1983; Chiari et al., 1989; Brener et al., 1992; Luz et al., 1994; Gomes et al., 1999), apresentando sensibilidade variável e nem sempre reprodutível de cerca de 30% até 79% (Junqueira et al., 2011). Modificações nesta técnica, como a coleta de maiores quantidades de sangue, enriquecimento do “creme” leucocitário, prolongamento do tempo de cultivo e realização de hemocultura seriada, podem ocasionar em um aumento na sensibilidade para cerca de 94% (Luz et al., 1994). Esta metodologia é recomendada no isolamento de *T. cruzi* para estudos bioquímicos e biológicos (Junqueira et al., 2011).

### **1.7.2.2 Diagnóstico por técnicas moleculares**

Com o advento das técnicas de biologia molecular, muitos grupos de pesquisa começaram a desenvolver ensaios mais sensíveis usando ferramentas moleculares, com o objetivo de analisar amostras sanguíneas de pacientes infectadas com *T. cruzi*, como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) (Moser et al., 1989; Sturm et al., 1989; Avila et al., 1991; Avila et al., 1993; Britto et al., 1993; Wincker et al., 1994; Junqueira et al., 1996; Kirchhoff et al., 1996; Gomes et al., 1998; Castro et al., 2002; Portela-Lindoso & Shikanai-Yasuda, 2003). Este método baseia-se na amplificação de sequências de DNA alvo, que para o *T. cruzi*, até o momento, não existe um consenso com relação ao melhor alvo a ser empregado para a utilização da PCR como diagnóstico de DChc. Entretanto, duas sequências se mostraram promissoras para o diagnóstico: a região variável do DNA cinetoplasto minicírculo e uma sequência de 195 pb de DNA reiterado do parasita (Russomando et al., 1992; Requena et al., 1996; Russomando et al., 1998; Schijman et al., 2011). Em 2005, o grupo de Russomando descreveu a vigência de um sistema de diagnóstico pré-natal com a utilização da

técnica de PCR com alvo no DNA-Sat, para a detecção do parasito em casos congênitos nas áreas endêmicas do Paraguai.

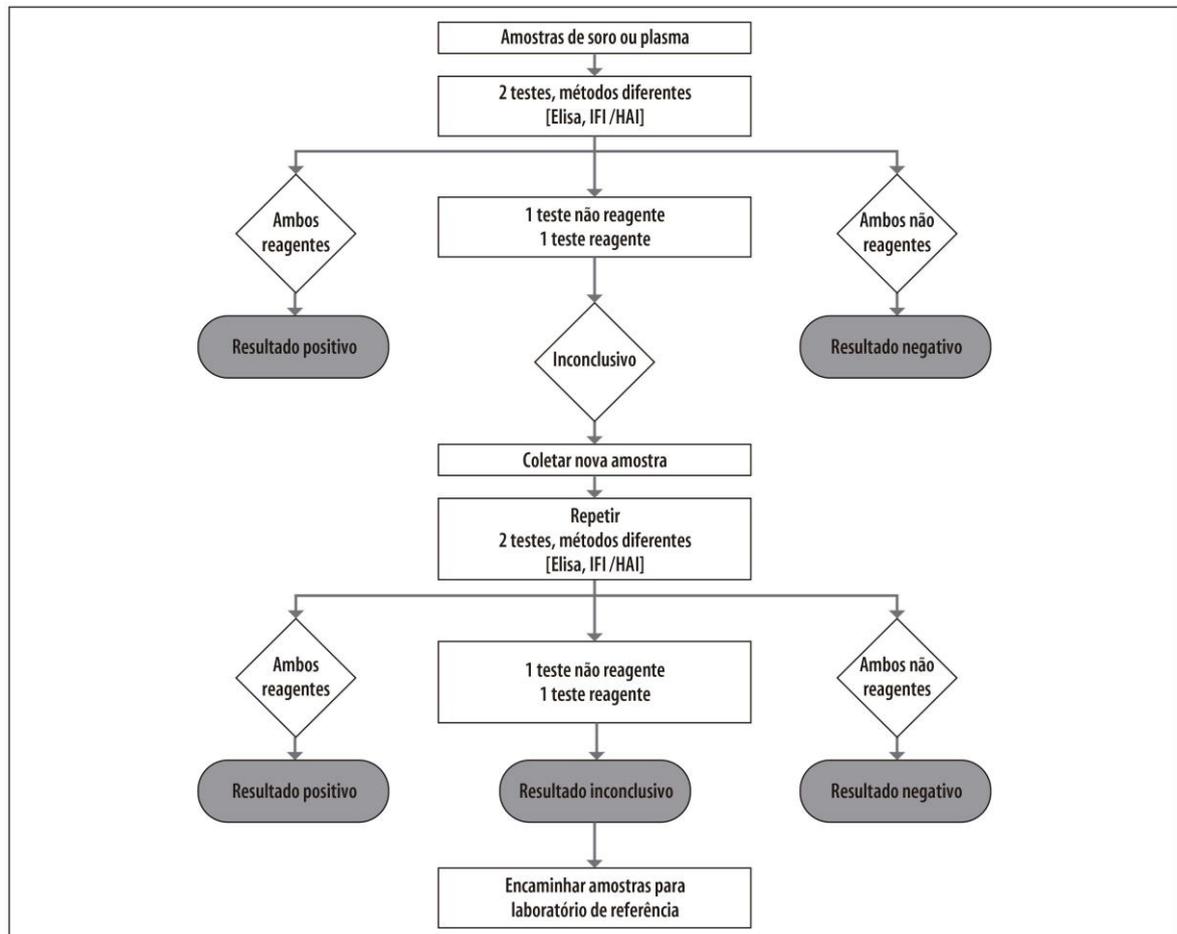
Essa técnica apresenta as seguintes vantagens: o curto espaço de tempo para a obtenção de resultados, em comparação com os métodos parasitológicos indiretos, onde os resultados são alcançados apenas depois de semanas ou meses; além de melhor flexibilidade com materiais em teste e a possibilidade de repetir o ensaio em caso de resultados duvidosos, devido à utilização de volumes pequenos do material clínico. Também é indicada para a detecção de parasitos nos tecidos de indivíduos e pode ser utilizada a técnica de PCR em tempo real para realizar a quantificação das sequências de DNA satélites amplificadas (Duffy et al., 2009; Duffy et al., 2013; Moreira et al., 2013; Ramírez et al., 2015).

Entre os fatores que restringem a utilização da PCR como ferramenta diagnóstica, têm-se: custos elevados com reagentes e equipamentos; a indispensabilidade de um treinamento especializado, risco de contaminação das amostras (Picka et al., 2007) e principalmente a oscilação da sensibilidade, relatada entre 3,8% - 100%, que pode ser explicada em parte pela presença e quantidade intermitente de parasitas circulantes no momento da coleta de sangue (Brasil et al., 2010; Brenière et al., 1992; Britto et al., 1995; Britto, 2009; Silber et al., 1997; Vera-Cruz et al., 2003; Zingales et al., 1998; Portela-Lindoso & Shikanay-Yasuda, 2003). Além disso, polimorfismos de sequência dentro de fragmentos amplificados entre cepas de diferentes DTUs também podem influenciar a eficiência da amplificação (Telleria et al., 2006; lenne et al., 2010); resultando em falso-negativos por interferência de substâncias usadas durante a lise e extração de DNA de amostras de sangue e especialmente devido à contaminação do DNA (Ehrlich & Greenberg, 1994; Duffy et al., 2009; Britto, 2009).

Apesar de sua limitação, a PCR é preconizada como método confirmatório em caso de resultado em ensaios sorológicos indeterminados (Avila et al., 1991; Avila et al., 1993; Wincker et al., 1994; Junqueira et al., 1996; Gomes et al., 1999; Brasil, 2005; Britto, 2009); também na avaliação do nível de parasitemia dos pacientes em fase crônica submetidos ao tratamento com medicamentos; em estudos comparativos com novas técnicas sorológicas ou parasitológicas e na detecção do nível de parasitemia em imunodeprimidos por técnica quantitativa visando intervenção terapêutica ou profilática precoce (Ehrlich & Greenberg, 1994; Britto, 2009; Galvão et al., 2003; Britto et al., 2001; Zulantay et al., 2004; Duffy et al., 2009, Duffy et al., 2013; Moreira et al., 2013).

### 1.7.2.3 Testes Sorológicos Convencionais

A OMS em 2002 e o Ministério da Saúde em 2005 direcionaram o diagnóstico laboratorial na fase crônica da doença de Chagas para a triagem sorológica e para os centros de saúde, conforme o esquema ilustrativo na Figura 12 (Brasil, 2005).



**Figura 12 - Fluxograma das etapas do diagnóstico laboratorial da infecção por *T. cruzi* na fase crônica, em casos suspeitos de doença de Chagas crônica (DChc).** Fonte: Dias et al., 2016. Baseado no fluxograma da referência: Brasil, 2005.

A Tabela 4 evidencia as recomendações sugeridas pela OMS (2002), demarcando os melhores procedimentos a serem adotados para cada possível situação de diagnóstico. Na triagem sorológica a recomendação é apenas de um teste, e a escolha do método de ELISA é devido a sua alta sensibilidade. No Brasil, desde de 2003 são usados o ELISA ou a quimioluminescência em bancos de sangue (Furuchó, 2006). Em laboratório clínico, quando há casos suspeitos da doença, recomenda-se a realização de dois testes convencionais, caso obtenha-se resultados discordantes, torna-se indispensável a realização de um terceiro teste (convencional ou não convencional).

Para o diagnóstico em casos suspeitos de transmissão congênita, torna-se necessária a confirmação em dois testes sorológicos convencionais, caso o primeiro tenha sido positivo. Caso as mães sejam soro positivas, deve ser realizado um teste sorológico de IgG aos 8 meses de vida de seu filho. Testes parasitológicos são desejáveis, sempre que estes possam ser realizadas. Em inquéritos soro-epidemiológicos, recomenda-se um único teste convencional. A adição de amostras de soros, plasma ou sangue em papel de filtro pode ser usado para esta finalidade. No acompanhamento de tratamento, dois testes sorológicos são recomendados. Em centros especializados, os ensaios de PCR podem ser realizados para verificar a parasitemia (OMS, 2002).

**Tabela 4 - Recomendações da OMS sobre o diagnóstico laboratorial da doença de Chagas.**

OBJETIVOS	TESTES CONVENCIONAIS			TESTES NÃO CONVENCIONAIS	
	ELISA	IFI	HAI	Proteínas recombinantes	PCR
Evidência sorológica (recomendados 2 testes)	X	X	X	X	
Triagem do banco de sangue (recomendado 1 teste)	X				
Transmissão Transplacentar e perinatal (recomendado 2 testes)	X	X		X	X
Levantamentos epidemiológicos (recomendado 1 teste)	X	X			
Acompanhamento do tratamento (recomendado 2 testes)	X	X	X		X

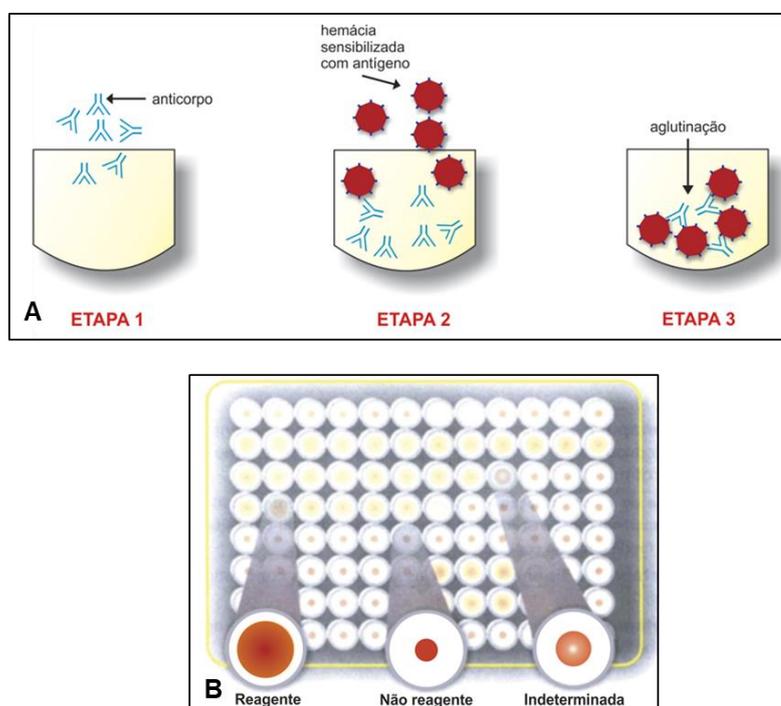
Fonte: Modificado da OMS, 2002.

É fundamental seguir rigorosamente os procedimentos de Controle de Qualidade Externo e Interno para produção e comercialização de diagnósticos, sendo a única maneira de garantir os resultados dos diagnósticos sorológicos.

A reação de fixação do complemento foi o primeiro teste sorológico empregado no diagnóstico da doença de Chagas crônica, por Guerreiro e Machado em 1913, onde os primeiros ensaios foram realizados com o emprego do antígeno preparado com vísceras de cães jovens, com elevada infecção por *T. cruzi*. Esta reação apresentou alguns problemas como reações cruzadas, dificuldade de estabelecer pontos de corte, ausência de reprodutibilidade e baixa sensibilidade (Ferreira & Ávila, 2001).

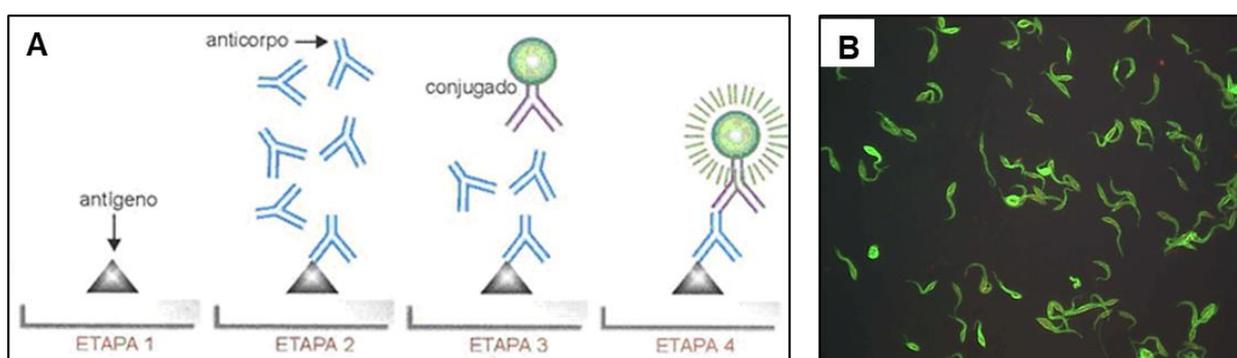
Os testes mais frequentes na rotina do diagnóstico sorológico laboratorial são a Hemaglutinação Indireta (HAI), Imunofluorescência Indireta (IFI), *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA), que tem como base a detecção de anticorpos específicos anti-*T. cruzi* (Brasil, 2005; OMS, 2002).

A HAI baseia-se em uma reação trivial de detecção de anticorpos anti-*T. cruzi* em amostras sorológicas de indivíduos infectados, com obtenção de resultados em cerca de 2 horas. Resumidamente, consiste na aglutinação de hemácias de carneiro, recobertas com antígenos citoplasmáticos de *T. cruzi* na presença de soro com anticorpos contra o parasito (Fuchs et al., 1980). Existindo anticorpos anti-antígenos de *T. cruzi*, os mesmos formam ligações entre as hemácias, interagindo com os antígenos na sua superfície. O que visualmente acarreta na formação de um manto nas placas de microtitulação (Figura 13). Devido ao seu baixo custo, a nitidez dos resultados e a facilidade de execução, este teste tem sido vastamente utilizado em triagem sorológica e em diagnóstico laboratorial. Todavia, apesar de apresentar alta positividade, reações cruzadas com outras parasitoses, principalmente leishmaniose são notadas. Em casos de infecções muito recentes (30 a 45 dias), a hemaglutinação pode gerar resultados negativos, além de problema na reprodutibilidade (Gadelha et al., 2003).



**Figura 13 - Ilustração da Hemaglutinação Indireta (HAI).** (A) Etapas da reação de HAI; (B) Resultados visualizados pelo HAI. Fonte: Brasil, 1998.

O ensaio de IFI (Figura 14) para a pesquisa de anticorpos IgG anti-*T. cruzi* tem sido considerado como teste de referência na sorologia da doença de Chagas e para a detecção de anticorpos Ig-M anti-*T. cruzi*, possui valor significativo no diagnóstico da doença aguda. Em 1974 utilizaram pela primeira vez anticorpos específicos anti-IgM humano, para a detecção da fase aguda e da transmissão congênita da infecção (Camargo & Amato-Neto, 1974). Hodiernamente, o emprego do conjugado anticorpo anti-Ig humano é marcado com fluoresceína (Figura 14), uma vez que os fluorocromos podem ser conjugados às regiões Fc de uma molécula de anticorpo, sem alterar sua especificidade, conservando a sua capacidade de detectar tanto IgM quanto IgG (Ferreira & Ávila, 2001). Esse teste já foi descrito ter uma sensibilidade de 99%, mas possui muitos inconvenientes como a subjetividade da leitura; execução por um técnico especializado; a necessidade de um microscópio de luz UV especial, o equipamento de leitura deve estar com um bom ajuste, para minimizar a ocorrência de erros técnicos. O amplo uso de IFI é pelo fato de ter relativa facilidade de se obter reagentes padronizados, elevada sensibilidade associada a altos títulos de anticorpos em soros de população infectada e facilidade de processamento de muitas amostras. Entretanto, possui como principal desvantagem a baixa especificidade da técnica, podendo gerar reações cruzadas com amostras de indivíduos com outras parasitoses, principalmente os parasitos *Leishmania spp.* e *Trypanosoma rangeli* (Luquetti & Rassi, 2000).



**Figura 14 - Ensaio de Imunofluorescência Indireta (IFI).** (A) Etapas da reação do teste IFI. (B) Formas epimastigotas de *T. cruzi* por IFI.

Fonte: <[http://www.liacentralsorologica.com.br/noticias\\_chagas.html](http://www.liacentralsorologica.com.br/noticias_chagas.html)>; <<http://www.saude.sp.gov.br/sucen-superintendenciadecontrolededeendemias/centrosnucleos-e-laboratorios/laboratoriodeimunoepidemiologia>>.

O termo em inglês *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ELISA) ou em português Ensaio Imunoenzimático (EIE) foi utilizado e a técnica desenvolvida por Engvall e Perlmann em 1971. Esse teste foi gerado como uma alternativa ao radioensaio, para a detecção de antígenos ou anticorpos e consistia em um

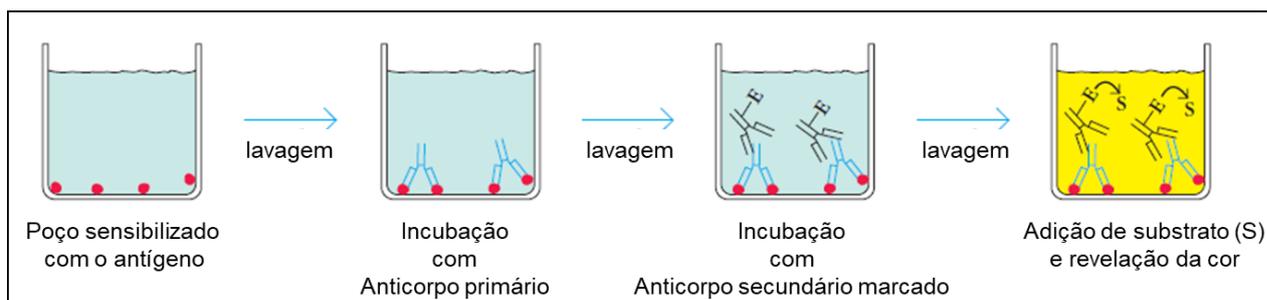
ensaio heterogêneo, diferente dos métodos enzimáticos até então utilizados que envolviam colorações imuno-histoquímicas pela técnica de imunoperoxidase. (Sanchez, 2001).

Em 1975, Voller e colaboradores descreveram o ELISA para o diagnóstico sorológico da doença de Chagas. Esse teste imunoenzimático se baseia na interação antígeno-anticorpo revelada por um cromógeno ativado pela reação específica entre enzima e substrato. Nesta técnica utilizam-se placas de microtitulação sensibilizadas com componentes antigênicos solúveis de formas epimastigotas de *T. cruzi* previamente adsorvidos. Os anticorpos presentes na amostra se ligarão aos antígenos da placa e são revelados pela adição de anticorpos anti-imunoglobulinas conjugados a uma enzima que, em contato com seu substrato, doa elétrons fazendo com que o cromógeno adicionado mude de cor (Figura 15). O desempenho dos diferentes conjuntos de ELISA para o diagnóstico da doença de Chagas existentes no mercado foi avaliado observando-se valores de sensibilidade de 97,7% a 100% e de especificidade entre 93,3% e 100%, sendo os níveis de sensibilidade constantes nos diferentes conjuntos, porém com especificidade variável (Oelemann et al., 1998). Além disso, o ELISA utiliza baixas quantidades de soro, permite o processamento simultâneo de várias amostras e facilita o uso em trabalhos realizados em campo com a utilização de espectrofotômetros portáteis, com leitura objetiva e possibilidade de automação, sendo também utilizada pelos bancos de sangue. Mas a especificidade está longe do ideal quando são utilizados antígenos brutos ou semipurificados, resultando em reações falso-positivas, onde o valor da densidade óptica lida no espectrofotômetro fica muito próximo à linha de corte entre a amostra positiva e negativa (Gadelha et al., 2003). O uso de frações ou antígenos purificados de *T. cruzi* fornece resultados promissores para minimizar a reatividade cruzada e aumentar a especificidade para soros chagásicos (Gomes, 1996).

Tradicionalmente os testes de ELISA convencionais utilizam extratos brutos ou antígenos semipurificados de cepas de epimastigota de *T. cruzi* (formas não infecciosas do parasita). Uma considerável diferença na reprodutibilidade e confiabilidade destes testes foi relatada por laboratórios distintos, principalmente em relação à reatividade cruzada com outros agentes patogênicos e a necessidade de padronização dos reagentes (Camargo et al., 1986). Os testes de diagnóstico empregando extrato antigênico de epimastigota têm uma especificidade limitada, associada ao fato de que eles não possuem epítomos altamente reativos para IgG / IgM presentes em pacientes com doença de Chagas aguda ou congênita (Umezawa

et al., 1996 a-c). Em virtude de sua complexidade antigênica, resultam em problemas de padronização, baixa confiabilidade e possibilidade de reatividade cruzada com outros microrganismos, principalmente com espécies do gênero *Leishmania* e *T. rangeli*. (Chiller et al., 1990; Araujo, 1986; Pan et al., 1992; Santos et al., 2012). A heterogeneidade antigênica dificulta o diagnóstico diferencial e específico para a doença de Chagas.

A falta de antígenos específicos e de antígenos bem caracterizados produziu variabilidade no reagente final, gerando resultados contraditórios (Camargo et al., 1986). Antígenos recombinantes de *T. cruzi* podem proporcionar uma ferramenta prática para melhorar os métodos atuais de diagnóstico sorológico da doença de Chagas (Moncayo & Luquetti 1990, Levin et al., 1991; Krieger et al., 1992; Silveira, 1992; Paranhos et al., 1994; Pastini et al., 1994). Peptídeos que carregam epítomos bem definidos podem ser produzidos em grande escala e com um grau aceitável de pureza (Umezawa et al., 1999).



**Figura 15 - Esquema de ELISA indireto para uma amostra reagente.** Fonte: Adaptado de <<http://www.ageracaociencia.com/2017/09/21/ensaio-imunoenzimatico-elisa/>>.

## 1.8 Outros ensaios para o diagnóstico da infecção de *T. cruzi*

Existem inúmeros métodos descritos e que podem ser aplicados para o diagnóstico ou como teste confirmatório da doença de Chagas, com emprego voltado para a pesquisa. Neste item serão descritos, de forma breve, algumas metodologias não convencionais e as que podem ter uso complementar às tradicionais, com melhores desempenhos apresentados para o diagnóstico sorológico da infecção pelo parasito e também seus fatores limitantes.

O *Western blotting* é empregado como teste confirmatório, que se fundamenta primeiramente na separação eletroforética de antígenos brutos ou purificados sobre um gel de poliácridamida, de acordo com peso molecular, seguida da transferência dos antígenos para uma membrana de nitrocelulose ou PVDF (fluoreto de polivinilidene) e

uma reação imunoenzimática com detecção de bandas proteicas específicas do parasito. Essa técnica é comumente empregada em bancos de sangue para a triagem de doenças virais (HIV, HTLV e HCV), como ensaio confirmatório. Porém, quando utilizada na detecção de anticorpos específicos da infecção por *T. cruzi*, revelou-se em média de 15 a 20 bandas com diversos pesos moleculares (10 a 300 kDa), quando empregados extratos brutos do parasito. Neste reconhecimento de bandas por anticorpos *anti-T. cruzi*, já foi descrita na literatura a detecção de antígenos entre 35 a 65 kDa, que são os mesmos encontrados em soros de pacientes com leishmaniose, acarretando em reatividade cruzada (Lanar & Manning, 1984; Rosfjord et al., 1990; Malchiodi et al., 1994; Reed et al., 1987, além disso apresenta variação na sensibilidade entre 44,3% a 100% (Nakazawa et al., 2001; Peralta et al., 1994; Reiche et al., 1998; Zarate-Blades et al., 2007). Já os antígenos purificados, naturais (Nakazawa et al., 2001; Umezawa et al., 1996a), recombinantes (Costa et al., 1997), ou peptídeos sintéticos dispostos isolada ou combinadamente sobre linhas únicas ou múltiplas (Oelemann et al., 1999; Sabino et al., 1997), possuem desempenho melhor. A fração antigênica de 150-160 kDa, purificada do antígeno TESA (Kesper et al., 2000; Silveira-Lacerda et al., 2004; Umezawa et al., 1996a), tem sido utilizada até hoje.

O ensaio de radioimunoprecipitação (RIPA) consiste em cultivo de epimastigotas, com a incorporação de um radioisótopo ( $^{125}\text{I}$  ou  $^{35}\text{S}$ ), que após a lise do parasito, a cultura é posta em contato com o soro a ser analisado, induzindo a formação de imunocomplexos. Quando em presença das glicoproteínas gp72 e gp90, a reatividade fica mais destacada (Kirchhoff et al., 1987). Nos EUA, essa técnica foi vastamente aproveitada no ano 2000 (Leilby et al., 2000) e considerada como *gold standard*, com alta sensibilidade e especificidade, e tem sido recomendada como um teste confirmatório (Kirchhoff et al., 1987; Otani et al., 2009). Todavia, a sua complexidade, tempo relativamente extenso de resposta, e manuseio de material radioativo são fatores que evitam a expansão do seu uso (Shah et al., 2010).

A citometria de fluxo como um método de diagnóstico para DChc tem apresentado bons resultados, onde é possível obter resultados que distinguem indivíduos com leishmaniose visceral, cutânea e doença de Chagas por meio de marcação diferencial (Teixeira-Carvalho et al., 2015). Entretanto, não é reconhecida como teste diagnóstico, por requerer um equipamento de custo elevado, profissional especializado, tendo seu uso voltado apenas para a pesquisa, podendo também ser utilizado como critério sorológico para avaliar a cura, na fase aguda da doença, em pacientes tratados (Vitelli-Avelar et al., 2007).

A quimioluminescência tem como princípio a detecção de anticorpos anti-Gal reativos contra glicoconjugados específicos de tripomastigotas e epimastigotas tratados com fosfolipases e purificados sob a forma de oligossacarídeos (Almeida et al., 1994). Estes anticorpos em pessoas com a infecção crônica, divergem dos anticorpos anti-Gal presentes em indivíduos saudáveis. É uma metodologia altamente sensível e específica. Seu emprego tem sido como um terceiro teste, quando os outros dois derem resultados inconclusivos ou falso-positivos, e vem sendo utilizada em triagem de sorológica de doadores (Izquierdo et al., 2013; Murcia et al., 2013; Praast et al., 2011). Por conta de seu alto custo é muitas vezes inacessível, sendo mais encontrada em laboratórios e em bancos de sangue.

Os testes de diagnóstico rápidos (TDRs) podem ser qualitativos ou semiquantitativos e são caracterizados pela obtenção rápida de resultados sem a necessidade de equipamentos elétricos. Em geral, existem diferentes princípios para esses testes: imunocromatografia, aglutinação de partículas, imunofiltração ou *imunodot*.

Os ensaios de microarranjo líquido, descritos inicialmente em 1977 (Horan & Wheelless, 1977), permitem análises quantitativas e qualitativas de múltiplos alvos numa única reação, usando volumes de amostra relativamente pequenos com potencial de alto rendimento. Essa estratégia vem sendo aplicada na área de imunodiagnóstico e pesquisa básica e é possível analisar aproximadamente 500 reações diferentes na mesma solução e em pouco tempo (Miller & Tang, 2009; Christopher-Hennings et al., 2013; Hoare et al., 2016). Para a doença de Chagas, já foram descritos em ensaios contendo lisado do parasito e experimentos multiteste usando uma única proteína do parasito, o melhor desempenho foi apresentado para o último (Foti et al., 2009). Essa é uma metodologia cara e depende de profissionais especializados para a sua execução.

Os biossensores são dispositivos analíticos relativamente novos, que são cada vez mais empregados como um sistema de plataforma tecnológica para diagnóstico de doenças humanas (*point-of-care*), que podem ser aplicados para o diagnóstico de DCh. Esses dispositivos podem auxiliar na detecção da presença de compostos específicos e agentes patogênicos em ambientes líquidos e misturas complexas tais como: água e soro sanguíneo (Sin et al., 2014). O desenvolvimento de biossensores requer que um componente biologicamente ativo seja imobilizado na superfície de um transdutor. A camada de reconhecimento seletivo em relação aos antígenos específicos de *T. cruzi* presentes no soro sanguíneo dos pacientes pode detectar

seletivamente o analito alvo, gerando uma resposta de sinal no sensor. Dependendo do tipo de transdutor que é empregado, os biossensores podem ser eletroquímicos, acústicos ou ópticos. Entretanto, os biossensores apresentam como principais desvantagens, o fato de atualmente não estarem disponíveis comercialmente para a doença de Chagas e necessita de mais pesquisas e desenvolvimento de sistemas portáteis. Como principais vantagens teriam o seu limite de detecção de aproximadamente 3 ng/mL, não é necessária uma área de trabalho asséptica, resultado rápido, com medições em tempo real, detecção quantitativa, fácil execução, não precisa de pessoal treinado, preparação simples *in situ*, alta especificidade analítica, redução do consumo de reagente, alta sensibilidade e confiabilidade, integração de múltiplos processos em um único dispositivo, possibilidade de automação, baixo custo de fabricação, capacidade de recuperação do sensor para múltiplas análises (Ferreira et al., 2005; Ferreira et al., 2006; Belluzo et al., 2011; Pereira et al., 2011; Sin et al., 2014; Luz et al., 2015; Luz et al., 2016; Janissen et al., 2017).

### **1.9 Emprego de proteínas em testes sorológicos**

No início dos anos 80, foram identificados vários antígenos purificados através da combinação das metodologias de imun química e clonagem gênica (Bayer-Santos et al., 2013; Bayona et al., 2011; Paba et al., 2004; Parodi-Talice et al., 2004; Wen et al., 2012), com a expectativa de melhorar o desempenho dos testes sorológicos, com o aumento da sensibilidade e da especificidade. Como exemplo pode-se citar alguns dos antígenos purificados que foram usados em pesquisa com bons resultados e elevaram a especificidade das reações, como a proteína GP90, presente na superfície de todos os estágios evolutivos do *T. cruzi* (Scott & Snary, 1982); GP 57/51, presente na superfície de formas epimastigotas e tripomastigotas sanguíneos (Scharfstein et al., 1986) e GP97-83, presente nos estágios amastigota e epimastigota (Pan & Pratt, 1989). Por razões econômicas e técnicas, estes antígenos não foram incluídos em *kits* de diagnóstico, já que os processos de purificação e produção de antígenos do parasito por meio da bioquímica clássica não são simples e a obtenção dos componentes antigênicos são em escassa quantidade.

Com o achado de vários antígenos secretados da forma tripomastigota cepa Y de *T. cruzi*, liberados espontaneamente no sobrenadante de cultura de células LLC-MK2 infectadas em meio RPMI 1640, no final dos anos 80, caracterizados e

denominados de TESA (*tripomastigote excreted and secreted antigen*), tornou-se viável a sua utilização como alvo para métodos de diagnóstico sorológico. (Affranchino *et al.*, 1989; Kesper *et al.*, 2000; Silveira-Lacerda *et al.*, 2004; Umezawa *et al.*, 1996a). O uso deste antígeno em reação de *immunoblotting* (TESAblot) com amostras de sangue de pacientes com doença de Chagas de diferentes quadros clínicos, congênita, aguda e crônica e também com indivíduos que não tinham a doença, usados como amostras controle do ensaio (Umezawa *et al.*, 1996c), resultou numa alta especificidade e sensibilidade. Detectou bandas de 130-200 kDa perante os soros de pacientes das formas aguda e congênita da infecção, com o reconhecimento dos anticorpos das classes IgM e IgG, enquanto que os soros de indivíduos de fase crônica reconheceram bandas de 150-160 kDa, através dos anticorpos da classe IgG (Umezawa *et al.*, 1996a). Um outro estudo realizado em 2001 pelo grupo de Nakazawa com este antígeno, testando em diferentes cepas de *T. cruzi* (WSL, Colombiana e 12SF), mostrou o reconhecimento de um polipeptídeo de 150-170kDa, em todos os pacientes com doença de Chagas crônica analisados (formas cardíacas, assintomáticas, digestivas e mistas). Contudo, apresentaram reatividade cruzada com leishmaniose visceral e cutânea contra os polipeptídeos inferiores a 150 kDa (Nakazawa *et al.*, 2001). Um outro limitante apresentado, seria que este ensaio não viabiliza o monitoramento de cura, uma vez que não permite a avaliação da decadência do título sorológico (Matsumoto *et al.*, 2002); também apresentou restrições quando a avaliação foi feita em grande número amostral; além de não ser uma metodologia econômica, exigir um treinamento profissional especializado e de um laboratório adequadamente equipado.

Na tentativa de resolver os limitantes da técnica de *immunoblotting*, o antígeno TESA foi aplicado a plataforma de ELISA (TESAELISA), que permite a análise de um maior número de amostras, de execução simples e fácil e acessível à automação. O ensaio apresentou 100% de sensibilidade em soros de pacientes tanto na forma crônica e 96% de especificidade. Devido à ocorrência de reatividade cruzada com antígenos de baixo peso molecular em amostras de indivíduos com leishmaniose, mesmo resultado apresentado no TESAblot, houve a necessidade de aumentar a especificidade do ensaio, realizando a purificação do polipeptídeo de 150-170 kDa através de eletroforese preparativa de banda usando a cepa Y. A fração obtida foi usada em um novo ensaio (TESAELISA) com os soros de pacientes crônicos da doença de Chagas (Umezawa *et al.*, 2003; Nakazawa *et al.*, 2001; Abath *et al.*, 2000) e, desta vez, os dados obtidos para a sensibilidade e especificidade foram de 100%

(Nakazwa et al., 2001), demonstrando que esta fração da proteína TESA é de relevância para o diagnóstico da doença de Chagas crônica e vem sendo continuamente utilizada em alguns estudos como uma ferramenta diagnóstica.

O advento da tecnologia de DNA recombinante na década de 1990 aprimorou as técnicas de purificação de proteínas pela bioquímica clássica (Berrizbeitia et al., 2006), sendo possível a expressão e produção de proteínas heterólogas em bactérias, ou em outros microrganismos (Scherf et al., 1990).

Com o propósito de obter clones bacterianos com antígenos parasitários expressos a serem usados no diagnóstico da DChc, técnicas imunológicas foram aplicadas com a utilização de soros de indivíduos com infecção por *T. cruzi*, que resultou na obtenção de diversos clones bacterianos com proteínas de *T. cruzi* reconhecidas pelos soros dos pacientes com a doença (Lafaille et al., 1989).

A partir disso, foram feitas avaliações individuais destes clones frente a reatividade com soros negativos e positivos para a doença de Chagas, nos quais dois clones isolados expressaram proteínas de *T. cruzi*, com acentuado valor de diagnóstico. Posteriormente, um estudo mais detalhado destes genes demonstrou que ambos apresentavam uma estrutura onde havia a repetição de um mesmo motivo ou epítopo reconhecido por anticorpo. Observou-se que um dos dois antígenos obtidos exibiu uma localização difusa no citoplasma enquanto o outro era flagelar. Conforme as suas estruturas em epítomos repetitivos e as suas localizações, esses antígenos foram designados de antígeno citoplasmático repetitivo ou *cytoplasmic repetitive antigen* (CRA), presente nas formas epimastigotas e amastigotas; e antígeno flagelar repetitivo ou *flagelar repetitive antigen* (FRA), encontrado nas formas epimastigotas e tripomastigotas do parasito (Lafaille et al., 1989).

Para analisar o potencial de 17 antígenos recombinantes, foi realizado um estudo multicêntrico, duplamente cego, coordenado pela Organização Mundial de Saúde, com um número pequeno de soros. Cada laboratório participante do estudo realizou ensaios imunoenzimáticos padronizados. Os resultados gerados apontaram 10 dos 17 antígenos testados com bons resultados, especificidade de 0,86 - 1,0 e sensibilidade 0,95 - 1,0, e um coeficiente kappa (KI)  $\geq 0,80$ , indicando excelente concordância. O coeficiente kappa (KI) mede a concordância de todos os resultados obtidos de um determinado antígeno com as amostras de referência, então os antígenos que tiveram resultados idênticos aos de referência receberam KI = 1,0. Nesta avaliação, o antígeno CRA foi considerado o melhor antígeno para diagnóstico

(KI = 1,0), seguido dos antígenos B13 (KI = 0,96) e H49 (KI = 0,92), (Moncayo & Luquetti, 1990).

Um outro estudo envolvendo diversos institutos de pesquisa internacionais, coordenado pelo Projeto de Biotecnologia da Ciência e o Programa Ibero Americano de Ciência e Tecnologia para o Desenvolvimento (CYTED), examinou dez antígenos recombinantes (Ag2, Ag13, SAPA, H49, A13, JL5, JL7, JL8, JL9 e RAI) em um laboratório de referência, usando o imunoensaio *dot blot* com soros de indivíduos infectados por *T. cruzi* de diferentes áreas endêmicas e de indivíduos sem a infecção. Os antígenos que tiveram melhores desempenhos foram: JL7, H49, Ag2 e A13, com valores de KI de 0,82 – 0,93. Entretanto, quando estes antígenos foram avaliados, não foram individualmente detectados em quatro amostras sorológicas de pacientes com doença de Chagas de fase crônica, concluiu-se que a utilização de um único antígeno recombinante não é eficaz para o diagnóstico de todos os indivíduos com a infecção (Levin et al., 1991).

Os genes CRA e FRA foram avaliados em uma outra pesquisa, mostrando que são altamente polimórficos (Krieger et al., 1990) e mesmo possuindo polimorfismos em diferentes cepas, as duas proteínas foram reconhecidas por mais de 95% dos soros de indivíduos com infecção por *T. cruzi* em radioimunoensaio, o que indicou a conservação dos determinantes antigênicos (Goldenberg et al., 1991). Quando estes antígenos foram testados juntos através da técnica de ELISA, revelaram-se importantes no diagnóstico da infecção pelo *T. cruzi*, apresentando sensibilidade e especificidade de 100% (Krieger et al., 1992). A partir destes resultados, a combinação destes antígenos (CRA + FRA) foi utilizada em um protótipo de *Kit* de diagnóstico através do método de ELISA, que foi proposto e desenvolvido por Biomanguinhos, na Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), chamado de *Kit* EIE-Recombinante-Chagas-Biomanguinhos® (EIE-Rec). O seu primeiro registro foi em 1999 e era baseado no ELISA direto. O *Kit* foi avaliado tanto para o diagnóstico de infecção por *T. cruzi* (Gomes et al., 2001), quanto como um teste para monitoramento de quimioterapia (Silva et al., 2002), em ambos os casos haviam apresentado resultados satisfatórios, com especificidade de 100% e sensibilidade de 98,2 - 100% (Silva, 2003). O EIE-Rec apresentou algumas vantagens como evitar reações falso-positivas e aumento da sensibilidade (Silva, 2003). Todavia, no período de renovação do registro para comercialização do produto, o *kit* EIE-Rec foi avaliado pelo Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS), FIOCRUZ, onde o reativo não alcançou os níveis de sensibilidade satisfatórios. Como consequência, o seu registro

não foi renovado e a sua produção foi paralisada (Silva, 2003). Uma possibilidade para este ocorrido deve-se ao fato de que o antígeno FRA não possui determinantes antigênicos exclusivos para a infecção com *T. cruzi*, apresentando homologia com os de *Leishmania spp* (Bottino et al., 2013).

Avaliações dos antígenos recombinantes continuaram a serem realizadas com o objetivo de obter potenciais alvos para o diagnóstico sorológico, com elevado desempenho em ensaios sorológicos. Ensaios realizados por algumas instituições de diferentes localidades, examinaram a eficiência de seis antígenos (H49, JL7, JL8, A13, B13 e 1F8) usando ELISA para um painel de 541 amostras de soros (304 indivíduos infectados e 237 indivíduos não infectados) de nove países da América do Sul e Central (Argentina, Brasil, Bolívia, Chile, Colômbia, Venezuela, El Salvador, Guatemala e Honduras). Quatro dos seis antígenos (1F8, H49, JL7 e B13) apresentaram alta sensibilidade (93,4 – 99%), com a identificação dos anticorpos *anti-T. cruzi* da classe IgG tanto nos antígenos repetitivos (H49, JL7, B13), quanto nos antígenos não repetitivos (1F8), onde a proteína 1F8 apresentou sensibilidade (99%) e especificidade (99,6%). Desta forma, evidenciando o reconhecimento de pelo menos um dos antígenos recombinantes pelas amostras sorológicas, sugerindo a possibilidade de que uma mistura de antígenos recombinantes poderia detectar anticorpos anti-*T. cruzi* nas amostras analisadas do estudo. Seguindo essa lógica, a positividade antigênica entre os peptídeos de H49 ou JL7, 1F8 e B13, poderia ser de 100%; além disso, apontou uma possibilidade hipotética de que o emprego do ELISA recombinante teria como principal vantagem a ausência de reatividade cruzada com outras doenças parasitárias (Umezawa et al., 1999).

No intuito de avaliar o desempenho de diferentes misturas antigênicas recombinantes obtidas por diversos grupos de pesquisa, foram utilizados quatro imunoenaios distintos: 1. INNO-LIA®Chagas Ab que tem em sua composição uma mistura de sete antígenos recombinantes Tc-24, SAPA, MAP (*microtubule-associated protein*), TcD, Ag39, inclusive CRA e FRA; 2. o *Immunodot* (Dia Kit Bio-Chagas assay ®), com a mistura de cinco proteínas recombinantes Ag1, Ag2, Ag13, Ag30 e SAPA (*Shed acute phase antigen*); 3. O teste imunoenzimático *Mix-ELISA* que utiliza as proteínas B13, 1F8 e H49 e 4. o ensaio quimioluminescente *PRISMChagas* que utiliza quatro proteínas recombinantes quiméricas. Todos apresentaram sensibilidade mínima de 99,6% e especificidade mínima de 99,1% (Silveira et al., 2001; Umezawa et al., 2003; Chang et al., 2006). A vantagem do uso da combinação de antígenos

também pôde ser notada na obtenção de valores superiores de densidade óptica (DO), (Umezawa et al., 2003; Umezawa et al., 2004).

Entre as vantagens da utilização das proteínas recombinantes no diagnóstico sorológico tem-se: os antígenos são bem caracterizados e podem ser utilizados distintamente para determinar anticorpos anti-*T. cruzi* em diferentes condições clínicas; possuem padronização quanto a produção e a avaliação, que é fundamental para uma boa reprodutibilidade dos testes, com coeficiente de variação inferior a 20% (Jacobson, 1998; Saez-Alquezar, 2007); dispensa o cultivo do parasito; há uma redução de custos por conta da produção de proteínas recombinantes em expressiva quantidade (Chen, 2012; Waegeman & Soetaert, 2011) e os constructos, que são plasmídeos contendo o DNA exógeno, possuem uma longa estabilidade.

Com o sequenciamento do genoma de *T. cruzi* (El-Sayed et al., 2005) e a utilização das ferramentas de bioinformática (Cooley et al., 2008; Goto et al., 2008; Hernández et al., 2010), viabilizaram novos antígenos descritos a partir da predição de proteínas putativas e da análise de antigenicidade. O que vislumbrou a possibilidade de escolher os melhores antígenos, comparativamente, com baixo grau de homologia com as proteínas de outros organismos que são relacionados ao *T. cruzi*, possibilitando a realização de modificações nas sequências de DNA, com a finalidade de produzir proteínas específicas de *T. cruzi* e consequente diminuição significativa, com a produção do DNA sintético (Aguirre et al., 2006; Silveira et al., 2001; Gomes et al., 2009; Hernández et al., 2010; Thomas et al., 2001; Verissimo Da Costa et al., 2013).

Muitos estudos utilizam várias combinações de antígenos recombinantes e peptídeos sintéticos com diversas formas e plataformas distintas (Caballero et al., 2007; Camussone et al., 2009; Gadelha et al., 2003; Krieger et al., 1990; Pirard et al., 2005; Remesar et al., 2009), onde foram observadas que as misturas antigênicas precisam ser avaliadas numa ampla e diversa amostragem sorológica para averiguar o seu potencial diagnóstico, já que apresentam resultados divergentes quanto a sensibilidade e especificidade, devido à heterogeneidade antigênica das diversas cepas de *T. cruzi*. Deve-se considerar a sua padronização, tendo uma atenção especial com as características individuais de cada uma das proteínas em relação às etapas de purificação e da estabilização do número de determinantes antigênicos disponíveis em fase sólida após a sua sensibilização em placas de microtitulação (Anandarao et al., 2005; Silveira et al., 2001; Dipti et al., 2006). Com relação aos peptídeos sintéticos há um aumento de especificidade e diminuição de sensibilidade,

e sua utilização para o diagnóstico é mais eficaz em combinação com outros antígenos (Luquetti & Rassi, 2000).

A Tabela 5 ilustra alguns antígenos, proteínas recombinantes ou peptídeos sintéticos de *T. cruzi* com potenciais usos em diagnóstico, monitoramento de cura e/ou verificação do estágio da doença cardíaca. Como pode ser observado na tabela, muitas proteínas aparecem agrupadas, isso se deve ao fato de terem sequências similares ou idênticas e que historicamente tiveram diferentes nomenclaturas.

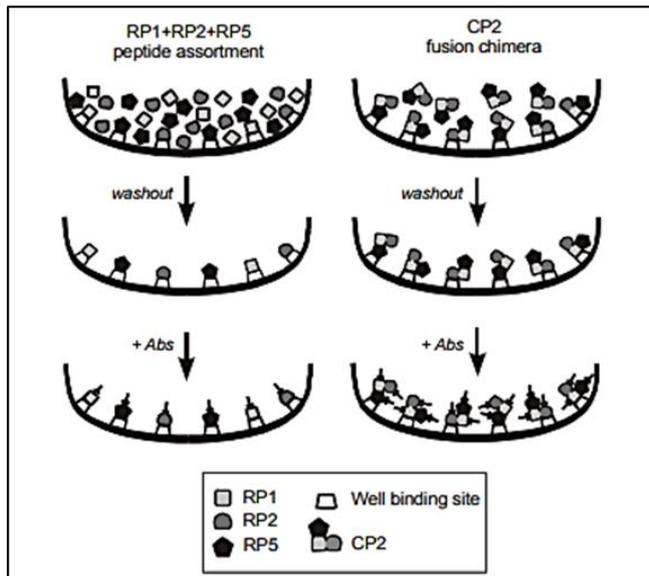
**Tabela 5 - Lista de alguns antígenos ou peptídeos sintéticos utilizados no diagnóstico por infecção por *T. cruzi*.**

Antígeno	Rep. (aa)	Proteína Nativa (kDa)	Características	Diagnóstico/ utilização	Refs.
CRA JL8	14	225 >170	Antígeno citoplasmático	Infecções crônicas	A
FRA JL7 H49	68	>300 >170 >300	Proteína associada ao citoesqueleto	Infecções crônicas	B
Ag2		85			
B13	12	116–140	Proteína de superfície de tripomastigota	Infecções crônicas	C
PEP-2		22			
Ag-36 JL9 MAP	38	85 110 110	Proteína associada ao microtúbulo	Infecções agudas e crônicas	D
TcE	7	35	Proteína Ribossomal	Infecções crônicas	E
KMP11	NR	11	Proteína associada ao citoesqueleto	Infecções crônicas	F
1F8	NR	24	Proteína flagelar ligante de Ca <sup>2+</sup>	Infecções crônicas – monitoramento de cura	G
TcLo1.2	NR	NR	Família TS	Infecções crônicas	H
SAPA TCNA	12	105-205	Trans-sialidades (Família TS)	Infecções agudas e congênitas	I
Ag13 TcD	5	85 260	Família TS	Infecções agudas Infecções crônicas	J
TESA		150-160	Antígeno excretado e secretado por tripomastigota	Infecções crônicas	K

Fonte: (A) Lafaille et al., 1989; Levin et al., 1989. (B) Lafaille et al., 1989; Frasch et al., 1991; Cotrim et al., 1995. (C) Ibañez et al., 1988; Levin et al., 1989; Gruber et al., 1993. (D) Ibañez et al., 1988; Levin et al., 1989. (E) Houghton et al., 1999. (F) Thomas et al., 2000. (G) Frasch et al., 1991. (H) Houghton et al., 1999. (I) Frasch et al., 1991. (J) Frasch et al., 1991; Burns et al., 1992. (K) Umezawa et al., 1996a. Abreviaturas: aa (aminoácidos); Ag (antígeno); CRA (antígeno citoplasmático repetitivo); FRA (antígeno flagelar repetitivo); NR (não reportado); PEP (peptídeo com epítomos repetitivos); Rep (Repetições); SAPA (antígeno de fase aguda).

As proteínas quiméricas são uma excelente ferramenta para os testes de diagnóstico, uma vez que são proteínas sintéticas, originadas de uma modificação, a partir da fusão de sequências lineares de DNA que codificam regiões específicas selecionadas de proteínas antigênicas (Aguirre et al., 2006). Estas são formadas por epítopos conservados e repetitivos de diferentes proteínas numa única molécula recombinante formando um poliantígeno ou proteína multiepítipo, gerando resultados com melhor desempenho em ensaios sorológicos, com redução de falso-negativos e de reatividade cruzada, além da sua possível detecção em diferentes cepas de *T. cruzi*, provenientes de diversas áreas endêmicas (Camussone et al., 2009).

O desempenho de múltiplos epítopos é mais robusto quando incorporado em uma proteína recombinante quimérica do que como uma mistura de peptídeos (Figura 16), (Camussone et al., 2009). Com relação à mistura de peptídeos existem duas hipóteses para o seu desempenho inferior às quimeras. Uma delas seria que o bloqueio das cadeias essenciais poderia levar a uma diminuição da antigenicidade de cada peptídeo (Hernandez et al., 2000a; Hernandez et al., 2000b; Hernandez et al., 2001a; Hernandez et al., 2001b; Shah et al., 1996); além da possível redução da sensibilidade durante a adsorção dos peptídeos antigênicos no poço, por conta de competição por locais de ligação de cada proteína existente nas misturas (Camussone et al., 2009). O que não ocorre com as construções quimeras ao serem sensibilizadas em microplacas de ELISA (fase sólida), já que a maior parte proteica não fica comprometida nesta ligação, havendo uma boa disponibilidade da molécula a ser detectada por anticorpos específicos, não existindo limitações estereoquímicas (Camussone et al., 2009). Além disso, as interações com a fase sólida acontecem de formas diferenciadas acarretando uma sensibilização homogênea e reprodutível, onde as proteínas quiméricas podem fornecer uma maior proporção de sítios ativos livres, consequentemente aumentando a sensibilidade do teste (Belluzo et al., 2011; Camussone et al., 2009; Gonzalez et al., 2010).



**Figura 16 – Esquema da placa de ELISA com as proteínas recombinantes.** Representação do processo de sensibilização em placa de ELISA com mistura de três proteínas recombinantes (RP1+RP2+RP5) e com uma proteína quimérica. Fonte: Camussone et al., 2009.

Normalmente, as quimeras presentes nos *kits* de diagnóstico, possuem em sua composição três a quatro aminoácidos, que se localizam entre os epítomos inseridos, servindo como um espaçador, proporcionando flexibilidade a proteína quimérica, acarretando em um distanciamento dos determinantes antigênicos, o que leva a um desempenho individual. No entanto, ainda não tinham sido avaliados com relação aos aspectos estruturais da quimera como uma proteína em solução. Uma vez que os epítomos estão normalmente localizados na superfície do seu receptáculo, o que facilita a sua ligação com os anticorpos, sua simples combinação em uma sequência codificante pode resultar em uma proteína com uma estrutura desconhecida e que provavelmente dificultará o desempenho dos epítomos (Vega et al., 2013). Isso explica a tendência das proteínas quiméricas, empregadas em testes comercializados, não terem mais de 4 epítomos inseridos. Conseqüentemente, tornam-se necessárias proteínas quiméricas múltiplas para representar uma gama de biomarcadores contra um único agente patogênico. No entanto, cada proteína recombinante adicional complica a produção dos componentes críticos de um teste de diagnóstico. A uma escala industrial, a complexidade se traduz em uma despesa adicional e uma menor probabilidade de implantação.

## 1.10 Avaliações de alguns testes sorológicos da Doença de Chagas crônica

A ausência de um teste sorológico padrão-ouro que possa ser utilizado em todas as áreas endêmicas, com 100% de sensibilidade e especificidade, dificulta a reprodutibilidade diagnóstica. Entre outras problemáticas apresentadas nos testes atualmente comercializados, encontra-se o alto custo dos *kits* e equipamentos, e de uma boa estrutura laboratorial para a realização das análises.

O grupo de Caballero em 2007 avaliou 5 testes de diagnóstico com o emprego da metodologia de ELISA: Test ELISA Chagas III; ELISAcruzi; Chagatek; Chagatest ELISA Rec. v.3.0 e Pathozyme Chagas (Tabela 6), com o objetivo de comparar as suas sensibilidades e especificidades diante da detecção de IgG anti-*T. cruzi* em dois estudos separados.

O primeiro estudo submeteu os 5 testes a avaliações de sensibilidade e especificidade com a utilização de 53 amostras com doença de Chagas de bancos de soros do Brasil e 134 amostras sem DCh, respectivamente. Destas últimas, 45 eram de pessoas saudáveis (brasileiros e panamenhos), 21 com infecção por *Leishmania spp.* (brasileiros e venezuelanos), 23 panamenhos com infecção por *T. rangeli* e 45 com outras doenças (lúpus, malária, toxoplasmose, febre reumática, esquistossomose, teníase, infecções estreptocócicas, toxocaríase). A sensibilidade obtida nessas avaliações foi de 100%, mas os resultados de especificidade variaram de acordo com a presença ou ausência das amostras sorológicas de leishmaniose na análise. Com a inclusão dos casos de leishmaniose, a especificidade variou de 82,84% a 100%, sem os soros de leishmaniose variou de 95,57% a 100% (Caballero et al., 2007).

Já o segundo estudo teve o intuito de validar esses ensaios através de um estudo retrospectivo com 120 amostras de indivíduos entre 18 e 60 anos da região endêmica de Mendoza no Panamá e mostraram uma sensibilidade variando de 75% a 100% (Pathozyme, 75%; Chagatest Rec v.3.0, 81,25%; Test ELISA Chagas III e ELISAcruzi, 93,75% e Chagatek, 100%) e especificidade de 97,12% a 100% (ELISAcruzi, 97,12%; Chagatek, 98%; Test ELISA Chagas III, 99,04%; Chagatest Rec v. 3.0 e Pathozyme, 100%), (Caballero et al., 2007).

**Tabela 6 Lista de alguns kits de diagnóstico sorológico de DChc comercializados.**

<b>KITS COMERCIAIS</b>	<b>ANTÍGENOS</b>	<b>MÉTODO</b>
<b>Test ELISA Chagas III (BIOSChile)</b>	Antígenos de epimastigota (cepas Mn e Tulahuen)	ELISA
<b>ELISAcruzi (bioMérieux Brasil)</b>	Antígenos de epimastigota	ELISA
<b>Chagatek (bioMérieux Brasil)</b>	Antígenos de epimastigota	ELISA
<b>Chagastest ELISA (H ELISA)</b>	Antígenos de epimastigota	ELISA
<b>Chagatest ELISA Rec. v. 3.0 (Wiener Lab)</b>	Antígenos recombinants (1,2,13,30,36 e SAPA)	ELISA
<b>Pathozyme Chagas (Omega Diagnostics)</b>	Antígenos recombinants	ELISA
<b>IFI Chagas (Bio-Manguinhos)</b>	Antígenos de epimastigota	IFI
<b>Abbott ARCHITECT</b>	Proteínas recombinantes quiméricas (TcF, FP3, FP6 e FP10)	CLIA

IFI – Imunofluorescência Indireta. ELISA – Ensaio imunoenzimático. CLIA – Quimioluminescência. HAI – Hemaglutinação Indireta. FP3 - TcR27 (proteína citoplasmática) e FCaBP (proteína flagelar ligante de Ca<sup>2+</sup>). FP6 - TcR39 (proteína de membrana do citoesqueleto) e FRA (Ag1/JL7/H49). FP10 - SAPA e MAP (proteína associada a microtúbulo). TcF - PEP-2, TcD, TcE e TcLo1.2. Descrições dos kits baseadas nas informações dos respectivos manuais.

Os dados obtidos dessas avaliações mostraram que o uso de antígenos recombinantes ou peptídeos sintéticos nos testes sorológicos são mais específicos do que quando utilizado os extratos brutos da forma epimastigota de *Trypanosoma cruzi*, porém as sensibilidades ainda são variáveis, como já foi descrito previamente por outros grupos de pesquisa (Umezawa et al., 1996a; Leilby et al., 2000; Umezawa et al., 2003; Kirchhoff et al. 2006; Zarate-Blades et al., 2007; Caballero et al., 2007). Cabe destacar que os resultados obtidos de sensibilidade e especificidade dos testes avaliados foram inferiores aos preditos pelos seus fabricantes.

Já os testes sorológicos que empregam a quimioluminescência (CLIA), são descritos por estudos prévios com melhores resultados de sensibilidade e especificidade do que os gerados com a metodologia tradicional de ELISA, agilizando o tempo de obtenção dos resultados. Porém, ainda é uma técnica dependente de

equipamentos, laboratórios mais estruturados, profissionais com domínio sobre a técnica, além do alto custo. Os testes baseados em CLIA, empregados em HAI e TDRs, não dependem de uma infraestrutura laboratorial moderna e bem equipada. Como exemplo de teste com emprego de CLIA, tem-se o *kit* Abbott ARCHITECT (Tabela 6), que foi descrito apresentando uma sensibilidade em torno de 99,36% a 100% e uma especificidade de 99,73% - 99,96% (Praast et al., 2011).

Com a promessa de diminuir o tempo da obtenção de resultados, barateamento dos custos de produção, maior praticidade de manuseio, estabilidade a temperatura ambiente, podendo ser realizado em localidades de difícil acesso, além da tentativa de aumentar a sensibilidade e especificidade, testes de diagnóstico rápidos (TDRs) com detecção de anticorpos contra antígenos de *T. cruzi* foram inseridos no mercado. Os TDRs podem ser baseados no emprego de proteínas recombinantes, combinação de epítomos (multi-epítomos) e proteínas quiméricas.

O desempenho e a precisão de 11 testes rápidos foram avaliados em 2014 para anti-*T. cruzi* (Sánchez-Camargo, 2014). Para isso, foram utilizadas amostras de soros e plasmas em 10 Laboratórios de Referência Nacional de 9 países, endêmicos (Japão, França, Espanha, USA) e não-endêmicos (Argentina, Brasil, Colômbia, Costa Rica, México). Cada Laboratório de Referência Nacional (LRN) recebeu 50 soros (25 positivos e 25 negativos para anti-*T. cruzi*) previamente caracterizadas, além de um painel cego de 4 amostras sorológicas liofilizadas para serem processadas juntamente com as amostras da avaliação.

De acordo com os resultados obtidos pelo grupo de Sánchez-Camargo (2014), a sensibilidade dos 11 TDRs comercializados variou entre 76,6% a 97,2% e a especificidade de 94% a 97%. Além disso, a sensibilidade e a especificidade desses testes foram menores das que indicadas pelos respectivos fabricantes e também por outros estudos que avaliaram seus desempenhos. Uma das possíveis explicações para a diferença obtida entre os resultados, seria a origem das amostras nessas avaliações (Sánchez-Camargo et al., 2014).

Esse estudo apontou 6 dos 11 testes avaliados como muito eficazes e de fácil manuseio, podendo ser recomendados para triagem e vigilância em áreas endêmicas e não endêmicas, embora a performance dos TDRs nas áreas endêmicas tenha variado >90%. Dos 6 testes, 4 deles foram considerados mais eficazes em áreas endêmicas e 2 tiveram melhor performance nos EUA e na França (Sánchez-Camargo et al., 2014).

Outros dois testes disponíveis comercialmente, Stat-Pack® e Imbios, também apresentaram variação quanto a sensibilidade e a especificidade de acordo com a área geográfica, como a América Central, Bolívia e na Região Amazônica, e o emprego destes testes devem estar vinculados por um segundo teste confirmatório (Médecins sans Frontières, 2008; Sánchez-Camargo et al., 2014).

O Teste Abbott ESA Chagas por imunocromatografia, com 4 faixas contendo proteínas recombinantes quiméricas: FP3 (TcR27 e FCaBP); FP6 (TcR39 e FRA); FP10 (SAPA e MAP); TcF (PEP-2, TcD, TcE e TcLo1.2), representando nove antígenos recombinantes de *T. cruzi*, ainda apresentam reatividade cruzada com *Leishmania spp.* (Cheng et al., 2007; Abbott Diagnosis, 2011).

Apesar da potencialidade desses métodos, ainda são necessárias novas avaliações em laboratório e no campo para confirmação desses dados, em especial a reprodutibilidade dos testes em contextos de recursos limitados ou no emprego de sangue total nos parâmetros reais das localidades isoladas (Sánchez-Camargo et al., 2014). Além disso, por conta das variações qualitativas e quantitativas das respostas imunes específicas de *T. cruzi* observadas em diferentes regiões geográficas, a validação de novos testes de diagnóstico deve incluir soros de todas as áreas endêmicas do parasito (Zingales, 2017).

Deve-se notar que, embora a maioria dos testes não convencionais tenham alta especificidade, a sensibilidade pode ser menor do que aquela apresentada na sorologia convencional (Brasil, 2005). O que corrobora com os achados de inúmeros estudos que tiveram o intuito de avaliar o desempenho de muitos *kits* comercializados.

### **1.11 Justificativa**

Este trabalho visa suprir a necessidade do desenvolvimento de um teste a ser utilizado em campo, de alta sensibilidade / especificidade e fácil execução, que possibilite a cobertura do diagnóstico a uma maior parcela da população de áreas endêmicas para DChc. Isso permitirá maior visibilidade do agravo, com o demonstrativo dos casos positivos, que fortalecerá a necessidade de um programa eficiente no controle da doença, e, conseqüente, diminuição do impacto social de DCh, além de ressaltar a importância da notificação dos casos crônicos, com um retrato mais fiel da realidade da doença de Chagas para que o combate seja mais eficaz.

Atualmente alguns *kits* sorológicos comercializados para o diagnóstico laboratorial da infecção causada pelo parasito utilizam em sua matriz extratos totais

ou antígenos brutos, o que pode resultar em reatividade cruzada com outros tripanossomatídeos. Este projeto foi concebido para tentar melhorar o desempenho em testes sorológicos através da utilização da proteína quimérica, que teve como intenção reduzir a sequência de codificação dos antígenos recombinantes, a regiões que são reconhecidas apenas pelos anticorpos dos pacientes com doença de Chagas, permitindo que maior número de epítomos possam ser representados em uma proteína recombinante. Além disso, foi utilizada uma proteína como núcleo proteico, na qual os epítomos foram inseridos e encontram-se expostos em sua superfície, gerando a proteína quimérica chamada de Plataforma Cruzei (PlatCruzei). A sua utilização também proporciona um método uniforme de expressão e purificação que simplifica a sua inclusão num ensaio de diagnóstico.

Criando dessa forma, a bioengenharia de *Immunomimics* através da combinação de epítomos com um núcleo proteico que visa ser utilizada em testes sorológicos, apresentando excelente desempenho para todas as áreas endêmicas e de ser produzida em nosso país.

Cabe ressaltar que por se tratar de uma inovação tecnológica esse projeto encontra-se em processo de registro de patente.

### **1.12 Hipótese do estudo**

O uso da proteína quimérica denominada de Plataforma Cruzei (PlatCruzei), que contém epítomos específicos de *T. cruzi* inseridos no cerne de uma proteína, apresenta um melhor desempenho nos ensaios imunoenzimáticos para a doença de Chagas crônica.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

Criar uma proteína quimérica com vários epítomos em uma plataforma com núcleo proteico a ser utilizada em teste de diagnóstico sorológico específico para a doença de Chagas.

### **2.2 Objetivos Específicos**

1) Criar uma biblioteca de peptídeos sintéticos através de busca de sequências antigênicas em banco de dados e pela triagem com soros de pacientes com a doença de Chagas crônica.

2) Projetar, sintetizar, expressar e purificar uma proteína quimérica recombinante, que inclui as sequências codificadas dos epítomos revelados pelo objetivo 1.

3) Avaliar a reatividade da proteína quimérica usando um painel de soros de pacientes com doença de Chagas crônica oriundos das principais regiões endêmicas do país (norte e nordeste) e do *pool* de soros liofilizados, Padrões Internacionais de Referências Biológicas enviados pelo programa de Chagas da Organização Mundial de Saúde (Otani et al, 2011).

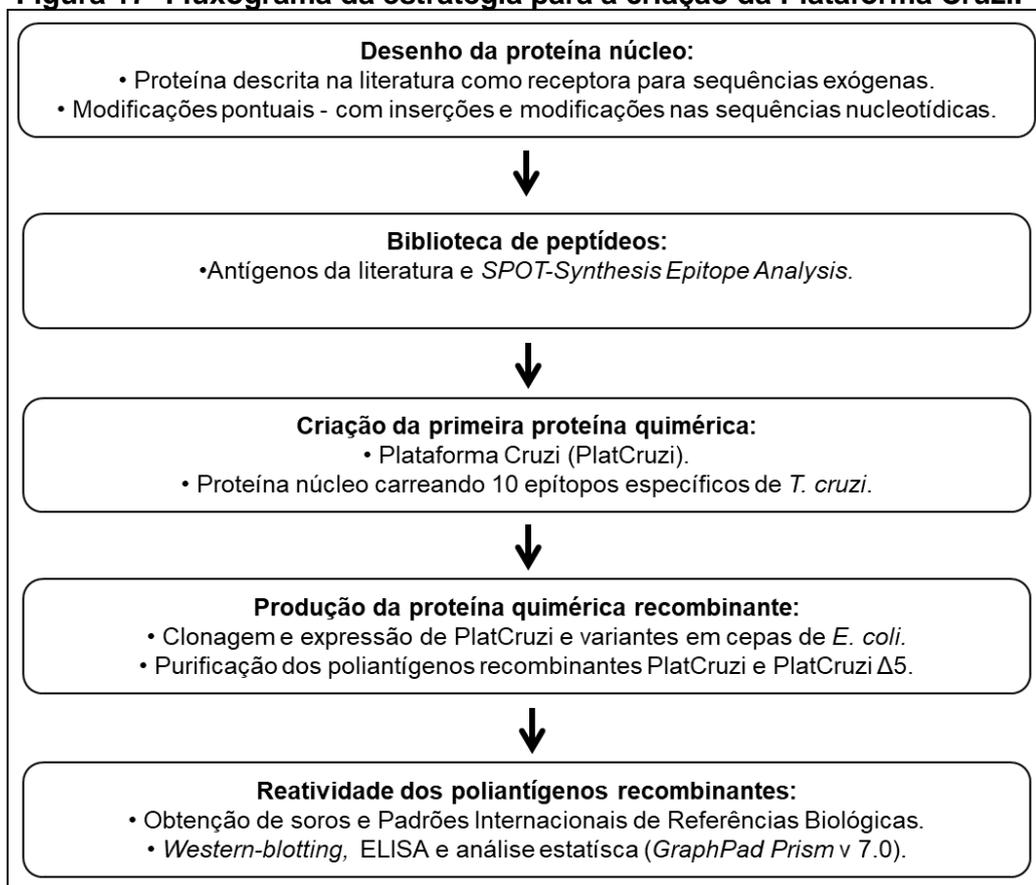
### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Delineamento do estudo

A estratégia utilizada foi da inserção de epítomos específicos da doença de Chagas em uma proteína descrita na literatura, utilizada com o núcleo carreador das sequências exógenas, sendo a plataforma receptora Rx-UBCP, que possibilitou a apresentação destes epítomos em sua superfície proteica. A proteína escolhida é utilizada em vários ramos da pesquisa sendo conhecida por sua estabilidade, por apresentar variantes muito estáveis, além de aceitar a inserção de sequências exógenas. Dessa forma, viabilizou a criação da proteína quimérica multiepítomos denominada de Plataforma Cruzei (PlatCruzei) com a inserção de 10 epítomos no cerne proteico. Foram realizadas deleções individuais de cada epítomo para avaliação de desempenho, que resultou na geração das variantes de PlatCruzei simbolizadas pela letra grega delta ( $\Delta$ ).

O esquema representativo a seguir (Figura 17), mostra de forma abrangente a metodologia empregada nesse estudo.

**Figura 17- Fluxograma da estratégia para a criação da Plataforma Cruzei.**



## 3.2 Criação da Plataforma Cruzei (PlatCruzei)

### 3.2.1 Estrutura da Plataforma

A sequência de aminoácidos da proteína núcleo (Plataforma Rx-UBCP) foi convertida na sequência de códons de ácido nucleico por tradução reversa ([http://www.bioinformatics.org/sms2/rev\\_trans.html](http://www.bioinformatics.org/sms2/rev_trans.html)). A partir da sequência de nucleotídeos, foram feitas alterações na proteína núcleo para criar algumas posições para novas inserções com enzimas de restrição da seguinte forma: Posição 2 – *HindIII*; Posição 6 - *SacII*; Posição 7 - *BamHI*; e Posição 8 - *RsrII*, sem afetar a sequência de aminoácidos. Outros sítios foram criados pela inclusão de um novo aminoácido: Posição 3 - *AatII* (D102\_D103insV); Posição 4 - *KpnI* (G116\_D117insT); Posição 5 - *AflII* (L137\_G138insK); Posição 8 - *RsrII* (D191\_P192insG) e Posição 9 - *SacI* (E213\_K214insL). A parte inicial da Plataforma Rx-UCBP (terminal amino, 5') incluiu a sequência CAT.ATG.GTG.GCT.AGC, que adicionou sítios *NdeI* e *NheI* (Figura 21). A extremidade terminal (carboxi 3') incluiu a sequência GAA.TTC.TAA.TGA.CTC.GAG após o último aminoácido da plataforma, para adicionar um sítio *EcoRI*, dois códons de parada e um sítio *XhoI*. Os sítios *NdeI* e *XhoI* permitiram a transferência de fragmentos de DNA sintetizados, projetados para codificar proteínas que mimetizam as propriedades imunológicas de interesse de agentes patogênicos no sistema de expressão bacteriana pET-28a(+).

Foram realizadas análises computacionais para a obtenção de algumas informações bioquímicas e físicas, como peptídeo sinal através do algoritmo SignalP v4.1 (<<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>>; Nielsen et al., 2017), peso molecular e ponto isoelétrico pelo ProtParam (<<https://web.expasy.org/protparam/>>, Gasteiger et al., 2005). Além de predições de estruturas terciárias das proteínas através do I-TASSER (<<https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>>; Zhang, 2008; Roy & Zhang, 2010; Yang et al., 2015).

### 3.2.2 Obtenção dos epítomos

Os epítomos para compor a PlatCruzei foram obtidos de várias fontes e proteínas antigênicas descritas (Tabela 5). Alguns foram obtidos através de estudos publicados, outros através da análise das sequências das proteínas recombinantes por ferramentas de bioinformática. Vale destacar que os dois determinantes antigênicos utilizados do antígeno CRA foram adquiridos através de análises prévias realizadas pelo nosso grupo, por meio da metodologia de *SPOT-Synthesis Epitope Analysis*

(Bottino et al., 2013), (Tabela 7). A técnica de *SPOT-Synthesis Epitope Analysis* foi usada posteriormente para analisar a reatividade de cada epítipo perante a um *pool* de soros de pacientes com doença de Chagas crônica, das regiões de Ceará, Paraíba, Amazonas (Barcelos) e Maranhão. A escolha dos antígenos foi baseada nos agrupamentos distintos, abrangendo as diversas características antigênicas (Tabelas 5 e 7).

**Tabela 7 - Descrição dos epítipos selecionados para criar a Plataforma Cruzei.**

Posições na Plataforma	Sequências dos Epítipos	Antígenos ou Epítipos	Características
1	KFAELLEQQKNAQFPGK	KMP11	Proteína associada ao citoesqueleto
2	KAAAAPA	TcE	Proteína ribossomal
3	KAAIAPA	TcE	Proteína ribossomal
4	GDKPSPFGQAAAADK	PEP-2	Peptídeo sintético - sequência corresponde a domínios repetidos de antígenos de <i>T. cruzi</i>
5	KQKAAEATK	CRA	Antígeno citoplasmático
6	AEPKPAEPKS	TcD-2	Proteína de tripomastigota
7	AEPKSAEPPK	TcD-1	Proteína de tripomastigota
8	GTSEEGSRGGSSMPS	TcLo1.2	Multiepítipo
9	SPFGQAAAGDK	B13	Proteína de superfície de tripomastigota
10	KQRAAEATK	CRA	Antígeno citoplasmático

A técnica de *SPOT-Synthesis Epitope Analysis* constitui de duas etapas principais:

1. Síntese de peptídeos em membrana

Uma biblioteca de peptídeos de 14 aminoácidos de extensão com sobreposição de 9 aminoácidos, cobrindo toda a extensão das proteínas, foi sintetizada em membranas de celulose preparada de acordo com procedimento padrão (Frank, 2002) usando sintetizador *Auto Spot-ASP-222 (Intavis, Koeln, Alemanha)* disponível no Laboratório de Bioquímica de Proteínas e Peptídeos (CDTS, FIOCRUZ).

As reações de acoplamento foram seguidas por acetilação com anidrido acético (4%, v/v) com N, N-dimetilformamida e remoção dos grupos protetores F-moc com piperidina. Os aminoácidos seguintes foram adicionados por este mesmo processo de acoplamento, seguido de bloqueio e desproteção até a síntese do peptídeo desejado ser finalizada. Após a adição do último aminoácido do peptídeo, as cadeias laterais dos aminoácidos foram desprotegidas com solução de diclorometano-ácido trifluoroacético-triisobutilsilane - (1:1:0,05; v/v/v) seguido de uma lavagem com etanol.

As membranas contendo os peptídeos sintéticos foram imediatamente usados ou armazenados a -20°C, até quando necessárias. Em cada síntese, um controle negativo (131- MDKEIKKGPR-140 - proteína do *Paramyxovírus aviário*) e positivo (1210-GYPKDGNAFN-1219 - *Clostridium tetani*) foram incluídos (De-Simone et al., 2013).

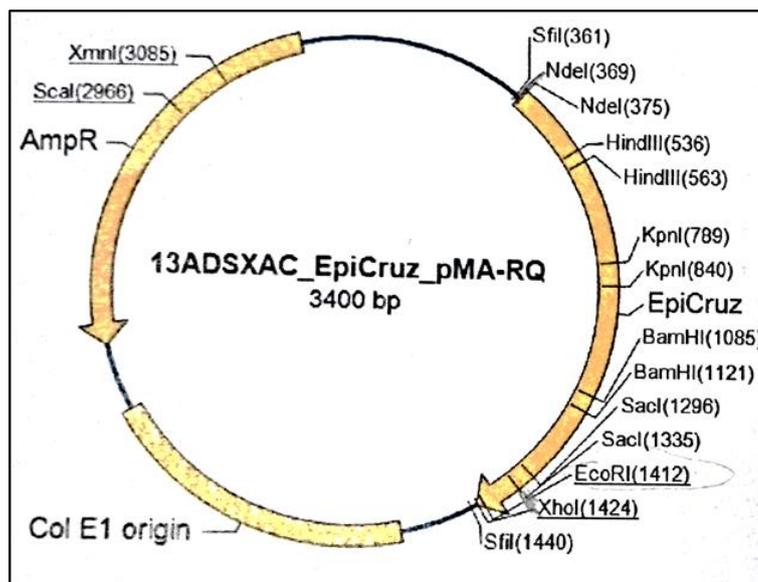
## 2. Ensaio imunológico

As membranas foram previamente lavadas com etanol (2 min), quatro vezes em tampão Tris-HCl 150 mM (10 min) e bloqueadas por 12 horas em solução TBS -T (Tris 10mM, NaCl 150mM, Tween – 20 0,05%, pH 7,2) contendo 3% de leite desnatado. Posteriormente, incubadas com soros de pacientes diluído 1:250 em tampão TBS-T contendo 1% de leite desnatado (~40 µl de soro/triagem). Após quatro ciclos de lavagens com TBS-T, foram incubadas (1h) com anticorpo secundário contra IgG ou IgM de humano conjugado à fosfatase alcalina, diluído 1:14.000 em TBS-T contendo 3% de caseína. Após quatro novos ciclos de lavagens (10 min) em TBS-T, as membranas foram incubadas com substrato quimioluminescente (CPD star, Applied Biosystems, USA) e a fluorescência medida.

A avaliação da reatividade ou intensidade dos sinais quimioluminescentes foi determinada num fotodocumentador MF-ChemiBis 3.2 (DNR Bio-Imaging Systems, Israel). Um arquivo de imagem digital foi gerado com uma resolução de 5 megapixels, com associação do Software TotalLab (Nonlinear Dynamics, EUA). As intensidades dos sinais foram quantificadas com o auxílio do Software TotalLab. A escolha das diluições de soro e anticorpos secundários garantem a detecção de epítomos.

### 3.2.3 Plataforma Cruzei (PlatCruzi)

Inicialmente PlatCruzi, contendo oito epítomos, foi sintetizado no vetor pMA-RQ (ampR), usando os sítios de clonagem Sfil e Sfil (*Life Technologies, ThermoFischer, EUA*). O DNA plasmidial foi purificado a partir da transformação bacteriana (*E. coli* K12). A Figura 18 mostra a representação da produção do DNA sintético de PlatCruzi com 1059 pares de base (pb) obtida a partir de oito epítomos diferentes de *T. cruzi*, por análises de bioinformática, por dados prévios na literatura e/ou por SPOT-Synthesis Epitope Analysis.



**Figura 18 - Mapa do vetor e do gene de PlatCruzi (8 epítomos) produzido sinteticamente.**

Posteriormente os últimos dois epítomos (KMP11 e CRA – TcEp9) foram inseridos através do pareamento de oligonucleotídeos nas posições 1 e 10 da plataforma, totalizando 10 epítomos específicos de *T. cruzi*.

Na posição 1 foram utilizados 4 iniciadores (Tabela 8), onde dois deles precisaram passar pela etapa de fosforilação, que consistiu em adição de T4 *Polynucleotide Kinase* (Promega); incubação de 37°C por uma hora e de 65°C por 20 minutos, para desativação da enzima.

Em seguida, foram adicionados os oligonucleotídeos não fosforilados e o processo de pareamento prosseguiu da seguinte forma:

1. Incubação de 95°C em um termobloco por 10 minutos;
2. Rápida centrifugação (30 segundos, 16000 g);
3. Resfriamento das amostras no termobloco previamente desligado até atingirem a temperatura de 25°C.

Para a posição 10 foram utilizados dois iniciadores, Pos 10 B senso e Pos 10 B anti-senso (Tabela 8) e passou pelas mesmas etapas de pareamento descritos acima.

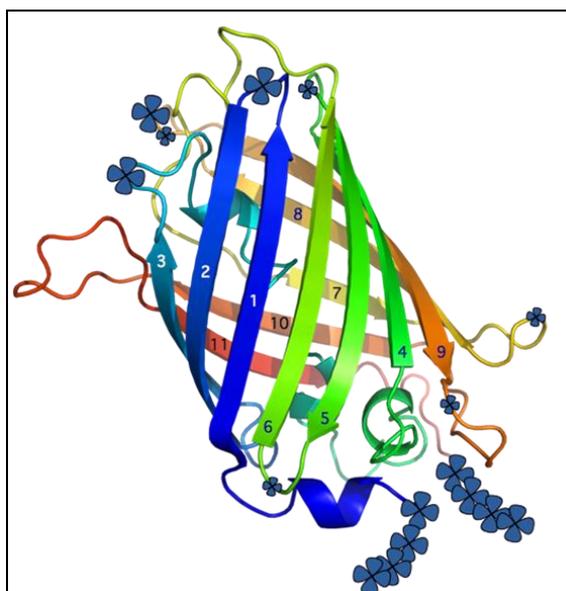
Em seguida, as duas extremidades (3' e 5') da plataforma com os oito epítomos inseridos, foram digeridas com enzimas de restrição específicas para a inserção das sequências desejadas. Para a posição 1 foram usadas as enzimas NdeI e NheI; já para a posição 10 foram usadas as enzimas EcoRI e XhoI. Na Figura 18 é possível visualizar a razão da utilização destas enzimas de restrição, que já foram descritas na seção 4.1.1.

Após a digestão foi realizada uma etapa de purificação a partir de gel de agarose (0,8%), com o auxílio do *GENECLEAN® Turbo Kit* (*MP Biomedicals*) e logo em seguida, foi feita a ligação dos insertos ao vetor com PlatCruzi através da T4 DNA Ligase (1U/μL), da *Thermo Fisher Scientific Inc.*, EUA, de acordo com o protocolo do fabricante.

**Tabela 8 - Desenho dos oligonucleotídeos dos epítomos KMP11 (Pos 1) e CRA (Pos 10).**

OLIGONUCLEOTÍDEOS	SEQUÊNCIAS
Pos 1 A Senso	TAA.ATT.CGC.GGA.ACT.GCT.GAA.CAG
Pos 1 A Anti-senso	TTT.CTG.CTG.TTC.CAG.CAG.TTC.CGC.GAA.TT
Pos 1 B Senso	CAG.AAA.ACG.CGC.AGT.TCC.CGG.TAA.AG
Pos 1 B Anti-senso	CTA.GCT.TTA.CCC.GGG.AAC.TGC.GCG.TT
Pos 10 B Senso	AAT.TCA.AAC.AGC.GTG.CGG.CGG.AAG.CGA.CCA.AAT.GAC
Pos 10 B Anti-senso	TCG.AGT.CAT.TTG.GTC.GCT.TCC.GCC.GCA.CGC.TGT.TG

A figura a seguir seria uma ilustração esquemática de PlatCruzi, em destaque para os 10 epítomos de *T. cruzi* inseridos no receptáculo proteico Rx-UBCP (Figura 19).

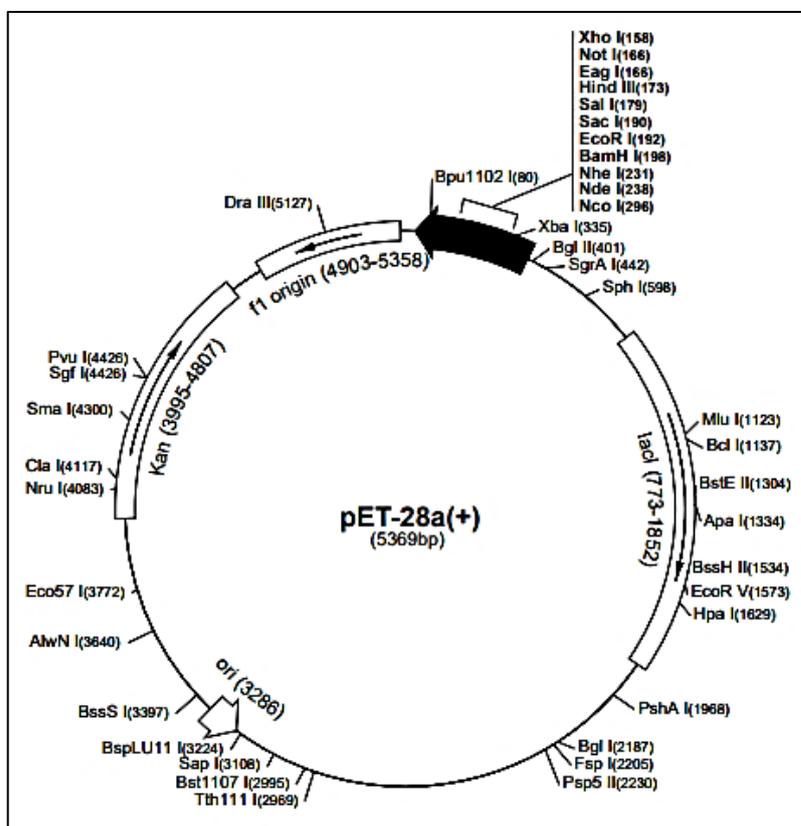


**Figura 19 –Ilustração representativa da estrutura da proteína núcleo com destaque para os 10 epítomos de *T. cruzi*.** Os números de 1 a 11 indicam as folhas β. Desenho em destaque na estrutura da proteína núcleo indica as regiões onde os epítomos foram inseridos.

### 3.3 Caracterização das proteínas recombinantes

#### 3.3.1 Clonagem, PCR de colônia e sequenciamento

A clonagem do gene de interesse foi realizada em vetor de expressão pET-28a(+) da série pET (Novagen, Darmstadt, Alemanha), com 5369 pb (Figura 20). Os vetores de expressão do sistema pET permitem rápida produção em grande quantidade da proteína de interesse e contém elementos importantes, como o gene *lac1* que codifica a proteína repressora *lac*; o promotor T7 que é altamente específico para T7 RNA polimerase e não aparece no genoma dos procaríotos; um operador *lac* que serve para bloquear a transcrição; um sítio de policlonação, onde ocorre a clonagem do gene de interesse; uma origem f1 de replicação; uma sequência de DNA que permite que o vetor seja replicado na célula hospedeira (*E. coli*); um sítio denominado de Múltiplo Sítio de Clonagem (MSC) para a inserção de fragmentos codantes através de diferentes enzimas de restrição, e que codifica também, como fusão proteica; seis histidinas denominada de *His-Tag* para facilitar a futura purificação da proteína expressa; e um gene de resistência a um antibiótico, no caso de pET-28a(+), a canamicina (Novagen, 2011).



**Figura 20 - Mapa do vetor de clonagem pET- 28a.** A figura mostra o gene *lacI*, o promotor T7, o operador *lac* e o sítio múltiplo de clonagem. O vetor apresenta o tamanho de 5369pb. Fonte: <<https://www.staff.ncl.ac.uk/p.dean/pET28.pdf>>.

Com a presença da T7 RNA polimerase e a ausência da repressão do operador *lac*, o promotor viral T7 transcreve de forma rápida, que é uma das principais características do sistema de expressão pET. Usualmente, a célula hospedeira para este sistema de expressão é uma bactéria que tenha sido geneticamente modificada para incorporar o gene T7 RNA polimerase, o promotor *lac* e o operador *lac* em seu genoma (Novagen, 2011).

Quando a lactose ou uma molécula similar à lactose, como IPTG (Isopropil- $\beta$ -D-1-tioglicosídeo), está presente dentro da célula, a proteína repressora muda sua conformação, se desliga do operador *lac* e a transcrição de T7 RNA polimerase passa a ser ativada iniciando a transcrição do gene clonado no vetor pET (Campbell, 2003). Tipicamente, a célula utilizada como hospedeira para plasmídeos do tipo pET é a *Escherichia coli* (*E. coli*) BL21 (DE3).

A transformação química foi realizada da seguinte forma:

1. As células *E. coli* competentes, cepa DH5- $\alpha$  ou TOP10 foram misturadas com o produto de ligação e mantidas no gelo por 30 minutos. A cada 50  $\mu$ L de células competentes, foram adicionados 2  $\mu$ L das reações de ligação.
2. Passados os 30 minutos no gelo, as amostras foram incubadas a 42°C por 30 segundos e posteriormente realizou-se o choque térmico, dois minutos no gelo.
3. Em seguida, adicionou-se 950  $\mu$ L de meio de cultura *Luria-Bertani* (LB - Triptona 1%, extrato de levedura 0,5% e NaCl 1%, peso/volume), sem antibiótico nos tubos e o material foi incubado a 37°C por 1 h, sob a agitação de 200 rpm, visando o estabelecimento da resistência nas células transformadas (Sambrook & Russel, 2001).
4. Finalizando com o plaqueamento de 200  $\mu$ L das células transformadas em placa enriquecida com LB, ágar e canamicina (30  $\mu$ g/mL), estocado em uma estufa seca à 37°C por aproximadamente 12 horas.

A técnica de PCR de colônia, foi utilizada para verificar a presença de plasmídeos com DNA exógeno inserido, contendo 8 ou 10 epítomos. Além disso, o sequenciamento de DNA também foi empregado acarretando em sequências do material genético (DNA plasmidial) oriundos da clonagem de PlatCruzi  $\Delta$ 1  $\Delta$ 10 (oito epítomos) e de PlatCruzi, com a correta inserção dos epítomos KMP11 e CRA (TcEp9) nas posições 1 e 10 da plataforma, com a utilização dos oligonucleotídeos do plasmídeo pET-28a(+), T7 *Promoter* e T7 *Terminator*, e também internos a sequência do PlatCruzi. A extração de DNA plasmidial dos clones portadores do inserto, foi

realizada através do *PureLink™ 96 HQ Mini Plasmid DNA Purification Kit* (*ThermoFischer SCIENTIFIC*). A reação de sequenciamento, precipitação do DNA, desnaturação da dupla fita e a leitura da sequência nucleotídica foi realizada no sequenciador automático ABI 3730XL (*ThermoFischer SCIENTIFIC*), metodologia Sanger (Sanger, 1977), pela Plataforma de Sequenciamento de DNA do PDTIS/CDTS - FIOCRUZ (Otto et al. 2007) e as análises das sequências obtidas foram feitas com o auxílio do programa gratuito *4Peaks* (*Nucleobytes; Mac OS X, 2004*).

### **3.3.2 Expressão e purificação**

Primeiramente é realizada a clonagem no vetor de expressão pET-28a(+) com o objetivo de expressar e purificar as proteínas correspondentes. Posteriormente é feita a transformação em bactéria *E. coli* TOP10 ou DH5- $\alpha$  com os plasmídeos recombinantes. Os clones obtidos são triados através de PCR de colônia, para posterior extração do DNA plasmidial dos clones tidos como positivos. Sendo também realizado o sequenciamento de DNA para confirmação.

Com a obtenção da *Miniprep* é feita a transformação em bactéria *E. coli* BL21 (DE3) com os plasmídeos recombinantes pET-28a(+).

A indução da expressão da proteína é feita através de colônias isoladas de *E. coli*, cepa BL21 (DE3) contendo cada uma das construções. Estas colônias foram inoculadas, individualmente, em 5 mL de LB líquido contendo canamicina (30  $\mu$ g/mL) e crescidas por 12 horas sob a agitação de 200 rpm.

As culturas são então diluídas 1:20 com LB líquido contendo canamicina e crescidas, novamente, a 37 °C até alcançar a DO 600nm (densidade óptica) entre 0,6 e 0,8 (Novagen, 2011). Nesse ponto é adicionado o indutor IPTG (Isopropil- $\beta$ -D-galactosídeo) na concentração final de 1 mM e a cultura mantida foi incubada por mais 3h sob agitação (200 rpm). Além disso, foi separada uma alíquota para controle negativo sem adição do indutor IPTG. Após a indução, é feita a análise de expressão da proteína recombinante através de gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (*SDS-PAGE*).

Foram realizadas induções em cultura bacteriana em pequena escala (< 50 mL) para a obtenção dos resultados iniciais da proteína expressa (PlatCruzi) e posteriormente foram realizados ensaios para a obtenção proteica em escala de 50 mL e 200 mL de cultura. O extrato proteico adquirido em escala de até 50 mL de cultura, a lise de célula bacteriana foi executada através de lise química com reagente *CellLytic B 10X* (*Merck, Alemanha*).

Resumidamente este processo de lise celular, consistiu:

1. O reagente foi diluído para 0,5x em tampão Tris 40 mM (pH8) com adição de lisozima (0,2 mg/mL), para aumentar a eficiência da lise celular e benzonase (50 U/mL), para diminuir a viscosidade da solução por DNA liberada durante a lise.
2. O sedimento de bactérias obtido após centrifugação da cultura foi ressuspenso com esta solução no mesmo volume da cultura bacteriana e incubado sob agitação em temperatura ambiente em torno de 15 minutos para a completa extração de proteínas solúveis. Posteriormente, o extrato foi submetido a centrifugação de 16.000 x g por 10 minutos.
3. O sobrenadante contendo a fração solúvel foi retirado cuidadosamente e o sedimento foi novamente ressuspenso com a solução de *CellLytic B* 0,5X com a metade do volume inicial, repetindo os passos anteriores.

PlatCruzi foi expressa sob a forma de corpos de inclusão, que foram solubilizados em tampão de ureia (100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM Tris-base, 8 M ureia, pH 8,0) e mantidas sob agitação, à temperatura ambiente. O material solúvel foi recuperado por centrifugação à 16000 g por 20 min e a proteína recombinante foi purificada em coluna com poli-histidina usando *Nickel - Affinity Gel®* (Merck., Alemanha). A coluna foi previamente equilibrada com a solução tampão composta por 0,1 M de fosfato de sódio; 8 M de ureia; pH 8,0; 25 mM imidazol). Foram realizadas cinco lavagens com o tampão composto por 0,1M de fosfato de sódio, ureia 8M, pH 6,3 e duas eluições com o tampão 0,1 M de fosfato de sódio, 0,3 M de cloreto de sódio, 250 mM de imidazol, pH 6,3.

As proteínas recombinantes (PlatCruzi) obtidas a partir de 200 mL de cultura foram purificadas por cromatografia de afinidade a níquel em coluna *Hitrap HP 1mL* (GE *Healthcare Life Sci*, EUA), em cromatógrafo *Äktapurifier 10* com duas metodologias de purificação.

A primeira metodologia procedeu-se de acordo com as seguintes etapas:

1. O extrato bacteriano obtido após a expressão em *E. coli*, foi lisado diretamente com ureia 8 M, pH 8,0, como descrito anteriormente.
2. O sobrenadante obtido foi aplicado em uma coluna de afinidade a níquel (*HisTrap™*, 1 mL, GE *Healthcare Life Sciences*) e foram usados como eluentes as soluções tampão: (A) 20 mM de fosfato (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · H<sub>2</sub>O); 0,5 M de cloreto de sódio (NaCl); 20 mM de imidazol; pH 7,4, e (B) tampão de eluição (20 mM de fosfato; 0,5 M de NaCl; 0,5 M de imidazol; pH 7,4).

3. A eluição do material adsorvido a matriz cromatográfica foi realizada através da substituição do eluente (A) pelo eluente (B). O fluxo de eluição empregado foi de 1 mL/min e a detecção foi realizada pela leitura da absorvância à 280 nm.

A segunda abordagem da purificação por cromatografia de afinidade foi empregada para as proteínas quiméricas PlatCruzi e PlatCruzi  $\Delta 5$ , consistiu:

1. As células foram ressuspensas diretamente em tampão contendo ureia (100 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 10 mM Tris-base, 8 M ureia, pH 8,0).
2. O sobrenadante foi aplicado em coluna de afinidade a níquel (HisTrap™, 1 mL, GE *Healthcare Life Sciences*) com o fluxo de 0,5 mL por minuto, previamente equilibrado em tampão A (50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 100 mM NaCl e 5 mM imidazol).
3. Após ligação, a resina foi lavada com 10 mL do tampão A. A proteína foi eluída em gradiente de 100% do tampão B (50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 100 mM NaCl e 500 mM imidazol) com fluxo de 0,7 mL/min por 45 minutos.

Vale destacar que em ambas as purificações foram usados tampões de eluição sem ureia, onde o reenovelamento proteico foi feito diretamente na coluna.

A concentração proteica final foi estimada através dos métodos de Bradford, com o uso da albumina de soro bovino como padrão (Bradford, 1976), ou por fluorimetria utilizando o equipamento *Qubit 2.0 (Life Technologies/Thermo Fisher Scientific Inc., EUA)*. Esta última metodologia utiliza corante fluorescente que emite sinais somente quando ligado às proteínas, ainda que na presença de contaminantes de outra natureza. As amostras de interesse foram misturadas à solução fornecida pelo fabricante, incubadas por 15 minutos e a fluorescência emitida determinada pelo equipamento (*Thermo Fisher Scientific, 2015*).

Alíquotas das proteínas recombinantes (1  $\mu\text{g}$ /poço) foram submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS (*SDS-PAGE*, Tabela 9), (Laemmli, 1970). Os géis de concentração (*stacking gel*) e de separação (*running gel*) foram preparados a uma concentração de acrilamida de 4% e 11%, respectivamente (Tabela 9). As amostras foram preparadas em condições desnaturantes em tampão 62.5 mM Tris-HCl, pH 6.8, 2% SDS, 5%  $\beta$ -mercaptoetanol, 10% glicerol e fervidas a 95 °C durante 5 min (Hames, 1998). Após a eletroforese, as proteínas foram avaliadas submetendo o gel à coloração pelo *Coomassie Blue R250* (Bio-Rad, EUA). Como marcador de peso molecular foi utilizado o *Kaleidoscope™ Prestained Standards* (Bio-Rad, EUA).

**Tabela 9 - Volume dos reagentes para preparo de gel de concentração 4% e para o gel de separação 11%.**

Gel de concentração 4%		Gel de separação 11%	
Reagentes	Volume (mL)	Reagentes	Volume (mL)
H <sub>2</sub> O	1,63	H <sub>2</sub> O	1,44
0,5M Tris-HCl, pH 6,8	0,833	1,5M Tris-HCl, pH 8,8	1,4
30% Acrilamida / 0,8% Bisacrilamida	0,5	30% Acrilamida / 0,8% Bisacrilamida	2
10% SDS (duodecil sulfato de sódio)	0,0333	10% SDS (duodecil sulfato de sódio)	0,055
10% Persulfato de Amônio	0,013	10% Persulfato de Amônio	0,015
80% Glicerol	0,333	80% Glicerol	0,55
TEMED	0,0067	TEMED	0,0075

### 3.3.3 Western blotting

Após a expressão foram realizados os ensaios de *western blotting* (Towbin et al., 1979; Sambrook & Russel, 2001; Kurien & Scofield, 2006) com as proteínas quiméricas recombinantes contendo de 7 a 9 epítomos.

O primeiro, teve como objetivo avaliar a reatividade das proteínas perante os soros chagásicos. Foram usados soros de pacientes com doença de Chagas crônica, em frente as frações solúveis e insolúveis de três proteínas quiméricas (uma com oito epítomos e duas com sete epítomos, com remoção na posição 2 ou na posição 3 da quimera inicial). O segundo, visou analisar a reatividade de PlatCruzi  $\Delta 1\Delta 10$  perante os soros de pacientes com doença de Chagas crônica e de leishmaniose. Além disso, também foi utilizada uma plataforma controle (sem inserção de epítomos).

As amostras sorológicas utilizadas neste experimento foram obtidas pelo Laboratório de Bioquímica de Proteínas e Peptídeos/CDTS-FIOCRUZ.

Para a realização de *western blotting* por peroxidase, foram realizados:

1. SDS-PAGE a 11%, conforme descrito na seção 4.2.2 (Tabela 9).
2. Transferência para membrana de nitrocelulose: as proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose através do *Trans-Blot Cell* (Bio-Rad, EUA), com o tampão de transferência (Tris base 25 mM, glicina 192 mM e metanol 20%) por uma hora a 100V. Em seguida, a membrana foi corada com *Ponceau S* (*Ponceau S* 0,1%, ácido acético 5%), para a confirmação da presença das proteínas recombinantes. As membranas

foram descoradas em água destilada e deixadas em TBS (0,1%) entre 12 a 18 horas (*overnight*).

3. Incubação com solução de bloqueio: no dia seguinte, as membranas foram incubadas em solução de bloqueio: 25 mM Tris-HCl, 125 mM NaCl pH 7.4 (TBS) contendo 0,05% (v/v) de *Tween* 20 (TBS-T) e 5% (p/v) de leite desnatado (Molico), por uma hora. Após, foram feitas três lavagens com TBS-T por 5 minutos cada e mais três lavagens de 5 minutos com TBS.
4. Incubação com soro: as membranas foram depois incubadas por uma hora, sob agitação, com soros humanos em solução de bloqueio. No primeiro ensaio, foi preparado um *pool* de 4 soros chagásicos com cardiopatia grave, na diluição 1:250. Já no segundo experimento foi utilizado um *pool* dos mesmos soros chagásicos e um *pool* de 3 soros de *L. braziliensis* em diferentes diluições (1:250, 1:500 e 1:1000). Em seguida, foram feitas novamente três lavagens de 5 minutos com TBS-T e três lavagens de 5 minutos com TBS.
5. Incubação do anticorpo secundário: posteriormente, as membranas foram incubadas, por uma hora, com os anticorpos secundários: *anti-human* [Sigma (A8400) *Anti-Human Polyvalent* (IgG, IgA & IgM) Peroxidase], 1:10.000. Após a incubação com o anticorpo secundário, foram feitas três lavagens com TBS-T por 5 minutos e três lavagens com TBS por 5 minutos.
6. Revelação: as revelações foram feitas com *SigmaFast™ DAB Peroxidase Substrate Tablet*.

Também foram realizados ensaios de *western blotting* por quimioluminescência (*Odyssey*, LI-COR, EUA) para avaliar a contribuição de cada epítipo inserido na plataforma, nas medidas de afinidade antígeno-anticorpo. Para esta análise foram utilizadas a plataforma com dez epítopos e as dez proteínas variantes de PlatCruzi obtidas através da remoção de epítopos por digestão com enzimas de restrição. Como anticorpo primário foi utilizado um *pool* de soros de pacientes com DChc, diluição 1:250, e anticorpo secundário *IRDye® 800CW Goat anti-Human IgG* (H + L), diluição: 1:5.000.

### **3.3.4 Ensaio imuno-enzimático indireto (ELISA indireto)**

Para os ensaios imunoenzimáticos, foram empregadas microplacas de poliestireno de 96 cavidades de fundo chato (Nunc MaxiSorp®, EUA). Cinquenta microlitros da solução tampão carbonato/bicarbonato (50 mM pH 9,6) contendo 1 µg a

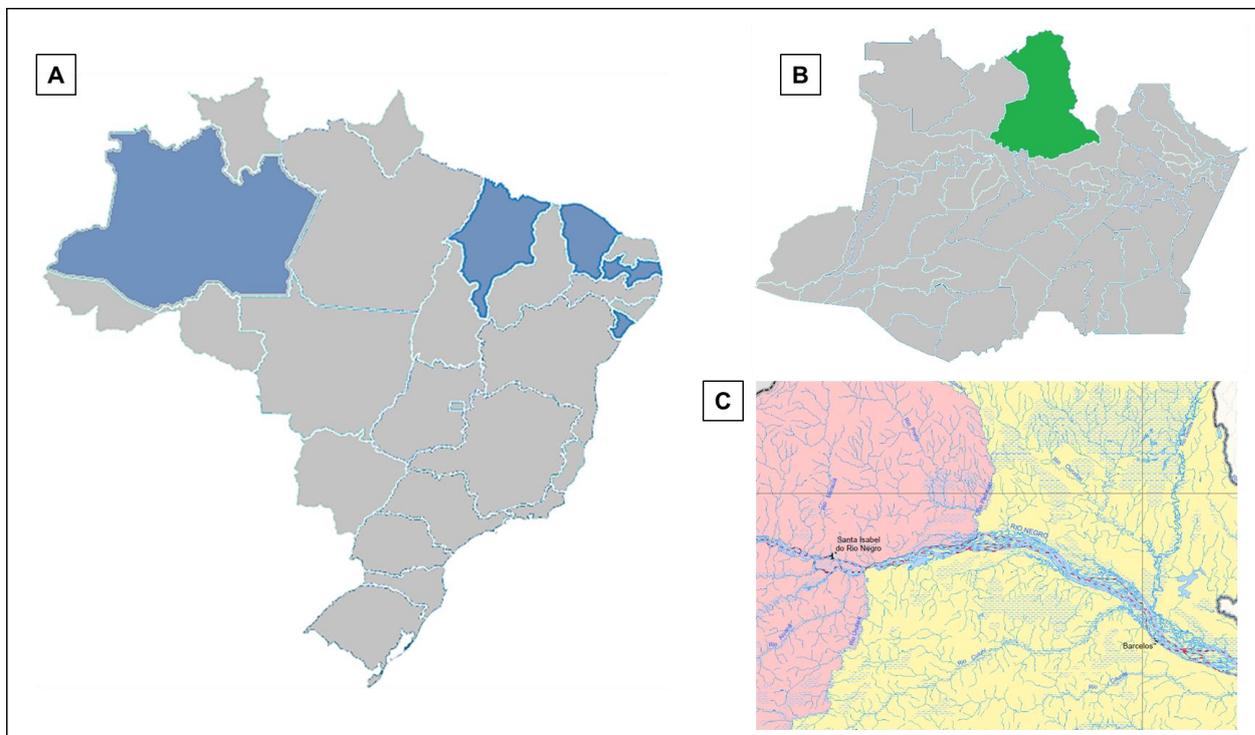
100 ng de antígenos recombinantes foram distribuídos e duas cavidades não sofreram a adição das proteínas, sendo utilizadas como “branco”. Cada quimera foi utilizada separadamente como antígeno de captura. Após adição dos antígenos, a sensibilização ocorreu durante um período de incubação de *overnight* à 4°C, as microplacas foram esvaziadas por inversão.

As amostras séricas de todos os indivíduos do estudo foram utilizadas em duplicata, já para os Padrões Internacionais de Referências Biológicas da OMS foram realizadas triplicatas conforme sugeridas (Otani et al., 2011). As diluições dos soros variaram de 50, 100, 250, 500 e 1000 vezes, na fase de padronização, a diluição escolhida foi de 250 vezes, utilizando o tampão PBS-T (fosfato de sódio 10 mM - Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, cloreto de sódio 150 mM - NaCl e *Tween-20* 0,05%, pH 7,2) e 50 µl das amostras séricas diluídas foram adicionadas a cada cavidade. As placas foram seladas e incubadas em estufa a 37°C por 60 min. Ao final deste período as placas foram lavadas três vezes com tampão PBS-T para retirada do material não adsorvido. Em seguida, foram adicionados 50 µl do anticorpo secundário conjugado à fosfatase alcalina (*Anti-Human IgG*, KPL) diluído em PBS-T (1:5000) em cada cavidade, as microplacas foram seladas novamente e o período de incubação foi de 60 min em estufa a 37°C. Foram realizadas as etapas de lavagem, após o período de incubação, conforme descrito anteriormente. A cada cavidade foram adicionados 50 µl do substrato (para-nitrophenylphosphate - PNPP, *ThermoFischer SCIENTIFIC* ou *1-Step™ PNPP Substrate Solution - ThermoFisher SCIENTIFIC*) e, após 30 minutos e sob abrigo da luz, as quais foram quantificadas em um leitor de placa de ELISA com filtro de 405 nm. Para a interpretação dos dados, os valores de densidade óptica (DO) obtidos das cavidades denominadas branco foram subtraídos das DO das amostras. Em seguida as médias aritméticas dos valores das DO das amostras positivas e negativas foram calculadas, bem como os seus respectivos desvios padrão, curva ROC, percentuais de sensibilidade e especificidade utilizando os programas *Microsoft Excel 2010* e *GraphPad Prism v 7.0 (MacOX)*.

### **3.4 Obtenção das amostras sorológicas**

O Estudo contou com 96 soros de pacientes com doença de Chagas (fase crônica e aguda, Tabela 10), indivíduos com leishmaniose (76), dengue (20), provenientes do Laboratório Central de Saúde Pública (LACEN) dos Estados de Ceará e Paraíba; da Fundação de Saúde Parreiras Horta de Sergipe; Fundação Oswaldo

Cruz do Maranhão e do Estado do Amazonas do município de Barcelos (Figura 21, Tabela 10). Os soros da região amazônica, foram coletados pela Dra. Angela Cristina Verissimo Junqueira e pelo mestrando Evandro da Rocha Dias, Laboratório de Doenças Parasitárias (LDP - IOC/FIOCRUZ-RJ).



**Figura 21 - Mapas do Brasil destacando as regiões provenientes das amostras sorológicas.** (A) Mapa do Brasil com destaque para os Estados: Amazonas; Ceará; Maranhão; Paraíba e Sergipe. (B) Destaque do município de Barcelos (AM). (C) Recorte do mapa político do Estado do Amazonas, mostrando os municípios de Santa Izabel do Rio Negro (oeste) e Barcelos (sudeste), na beira do Rio Negro. Fonte: Modificado de IBGE, 2015. <<https://www.ibge.gov.br/geociencias-novoportal/cartas-e-mapas/mapas-estaduais/15978-mapas-politicos-dos-estados.html?&t=downloads>>.

Além disso, contou-se com 13 amostras de pacientes com cardiopatia chagásica, oriundas de um de nossos colaboradores, Dr. Salvatore Giovanni De Simone, Laboratório de Bioquímica de Proteínas e Peptídeos (IOC/FIOCRUZ -RJ), onde duas delas foram utilizadas como controles positivos para a infecção crônica de *T. cruzi* (código das amostras: 9817 e 13228), e alguns soros de leishmaniose (10), febre amarela (7) e dengue (9) utilizados em ensaios iniciais, antes da obtenção das amostras sorológicas dos LACENs, Barcelos (AM) e dos Padrões Internacionais de Referências Biológicas da OMS.

Foram obtidos, também, dois *pools* de soros liofilizados derivados de áreas endêmicas da América Latina da Organização Mundial de Saúde, denominados Padrões Internacionais de Referências Biológicas IS 09/188 (Tcl) e IS 09/186 (Tcll).

O *pool* de amostras liofilizadas IS 09/188 é proveniente do México, região de maior incidência da cepa TcI, e o IS 09/186 são de soros oriundos do Brasil e do Chile, regiões onde predominam a circulação da cepa TcII. Não foi viável a identificação precisa dos genótipos de *T. cruzi* presentes nas amostras dos Padrões Internacionais de Referências Biológicas, por conta da parasitemia baixa ou ausente de soros de pacientes com Chagas crônicos, não sendo possível o isolamento do parasito pelo sangue (Otani et al., 2011). A maior prevalência (TcI e TcII) descrita é baseada na classificação em dois genótipos: TcI e TcII, onde a TcII é subdividida em: TcII a-e (Souto et al., 1996; Fernandes et al., 1998; Brisse et al., 2000b; Brisse et al., 2001).

É importante o uso dos Padrões Internacionais de Referências Biológicas, porque estes servem como modelos de referência global para o controle de qualidade dos testes de diagnóstico da doença de Chagas, sendo uma importante ferramenta para comparação de resultados entre diferentes ensaios e para facilitar o desenvolvimento de produtos diagnósticos. Os *pools* IS 09/188 e IS 09/186 foram utilizados nos ensaios imunoenzimáticos desta investigação, através de diluições seriadas, recomendadas pelo protocolo estabelecido pela Organização Mundial de Saúde: 2x, 4x, 8x, 16x, 32x e 64x (Otani et al., 2011; Anexo D).

Ademais, foram usados nos ensaios de ELISA, mais outros soros como controles negativos, possivelmente sem presença de qualquer infecção (24) e soros com leishmaniose visceral ativa (14), respectivamente provenientes da UFRJ e do Laboratório Interdisciplinar de Pesquisas Médicas (LIPMED – IOC/FIOCRUZ – RJ).

Os LACENs forneceram alguns dados dos pacientes crônicos contidos no Sistema GAL (Gerenciador de Ambiente Laboratorial) e pacientes agudos na ficha SINAN, como a metodologia empregada nos testes sorológicos, sexo, idade, anamnese, diagnóstico e tratamento, sendo preservada a identidade de cada paciente.

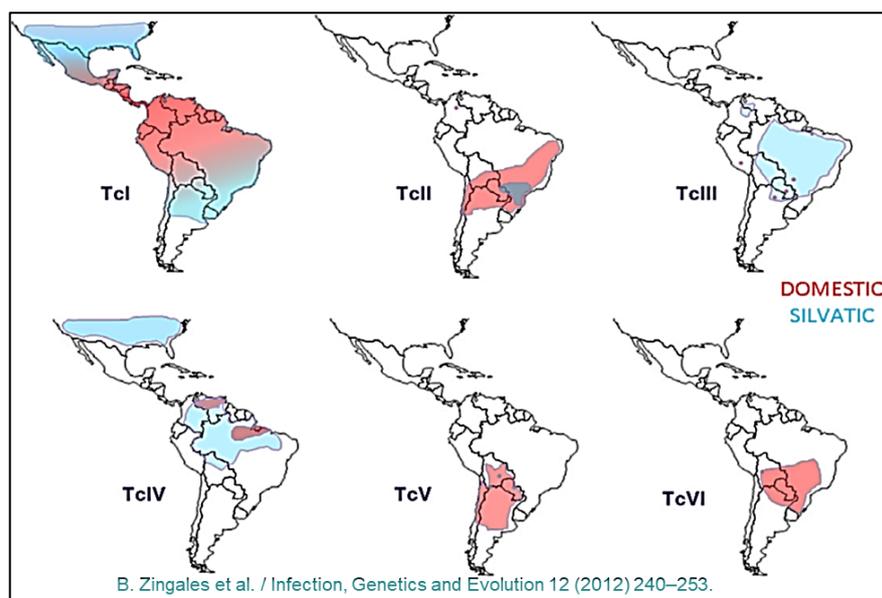
A Tabela 10 contém as informações agrupadas dos pacientes com infecção por *T. cruzi*, estado; município; faixa etária; diagnóstico utilizado; sexo, cujas amostras sorológicas foram utilizadas no estudo.

**Tabela 10 - Informações dos pacientes com doença de Chagas.**

<b>DOENÇA DE CHAGAS</b>					
<b>ESTADOS</b>	<b>MUNICÍPIOS</b>	<b>NÚMERO DE PACIENTES</b>	<b>FAIXA ETÁRIA</b>	<b>SEXO</b>	<b>DIAGNÓSTICO</b>
Amazonas	Barcelos	20	11 a 78 anos	Feminino (7) Masculino (13)	ELISA e IFI
Ceará	Solonopole, Fortaleza, Russas, Tauá, Quixeré, Crato, Forquilha, Iguatu, Icó, Juazeiro do Norte, Orós, Palhano	20	22 a 82 anos	Feminino (10) Masculino (10)	NI
Maranhão	Santa Rita, São José de Ribamar, Turilândia, Balsas, São Luís, Humberto de Campos	17 (5 DChc) (12 DCha)	6 a 76 anos	Feminino (3) Masculino (14)	ELISA e IFI
Paraíba	São Bento, Catolé do Rocha, Coremas, Brejo dos Santos, Santa Cruz, Patos, Camalau, Prata, Ouro Velho, Areia, Paulista, João Pessoa, Monteiro, Jerico, Princesa Isabel, Juru	21	42 a 80 anos	Feminino (4) Masculino (17)	ELISA, IFI, HAI
Sergipe	Aracajú, Cristinápolis, Nossa Senhora do Socorro, Estância, Indiaroba, Umbaúba, Pedrinhas, Boquim	18	28 a 93 anos	Feminino (10) Masculino (8)	ELISA e IFI

DChc: Doença de Chagas crônica. DCha: Doença de Chagas aguda. NI: Não informado, sem informação.

A obtenção das amostras sorológicas das regiões norte e nordeste e o *pool* dos Padrões Internacionais de Referências Biológicas da OMS para o estudo, culmina com as áreas de endemicidade e emergentes do país e da América Latina, abrangendo uma maior variedade das cepas circulantes, tanto do ciclo doméstico, quanto do ciclo silvestre (Otani et al., 2011; Zingales et al., 2012), (Figura 22).



**Figura 22 - DTUs circulantes nas áreas endêmicas dos ciclos doméstico e silvestre.**  
 Fonte: modificada de Zingales et al., 2012.

### 3.5 Considerações éticas

Esta investigação foi aprovada pelo Comitê de Ética do Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro - RJ (CAEE: 52892216.8.0000.5248), (Anexo A).

Para preservar a identidade do paciente no estudo, todas as amostras sorológicas obtidas foram apresentadas por códigos. Foram utilizadas informações sobre diagnósticos sorológicos, sexo, idade, localização para questões de confirmação diagnóstica e sobre doença de Chagas endêmica neste estudo. À medida que as amostras sorológicas do LACEN vieram como uma doação, onde as instituições participantes são colaboradoras do estudo, não havia necessidade do termo de consentimento livre e esclarecido. Amostras sorológicas obtidas de Barcelos (AM) tiveram autorização prévia para a participação no estudo por meio do consentimento por escrito (Anexo B) e teve aprovação no Comitê de Ética (CAEE: 79922017.8.0000.5248; CEP/IOC - Parecer de Aprovação: 2.453.495). Os soros provenientes do Laboratório de Bioquímica de Proteínas e Peptídeos (IOC/FIOCRUZ -RJ), também supriu com todas as normas éticas e foi aprovado pelo parecer CONEP 235/2009 e CEP/IOC - CAEE: 52892216.8.0000.5248.

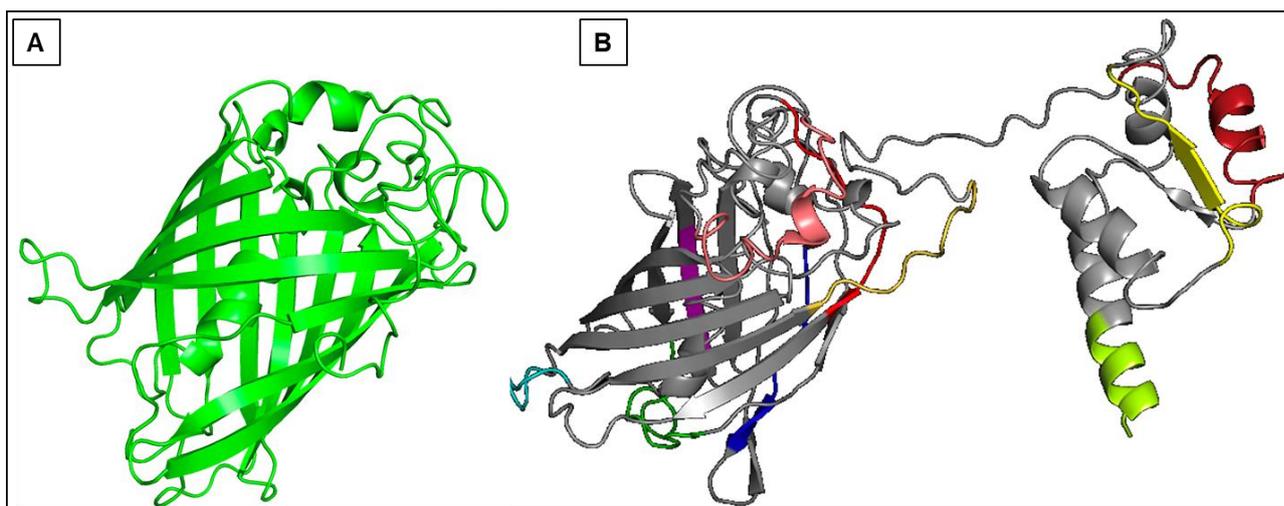
Para a manipulação de organismos geneticamente modificados, a investigação contou com o Certificado de Qualidade em Biossegurança para áreas de nível de biossegurança NB1, conforme pode ser visto no Anexo D. Os experimentos foram realizados no LIPMED.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Criação da Plataforma Cruzei (PlatCruzi)

A proteína quimérica foi inicialmente sintetizada com 8 epítomos, com a ausência dos epítomos nas posições 1 (KMP11) e 10 (CRA – TcEp9) da plataforma ( $\Delta 1 \Delta 10$ ), através da síntese nucleotídica pela *Life Technologies* (Figura 18) e seguiu para análises *in situ* e *in silico*. Posteriormente foram inseridos mais dois epítomos através de pareamento de oligonucleotídeos, passando a ser denominada de Plataforma Cruzei (PlatCruzi).

Foram obtidas modelagens tridimensionais comparativas da proteína núcleo, que foi designada de Rx-UBCP (Figura 23 A) e de PlatCruzi (Figura 23 B) através do I-TASSER (Zhang, 2008; Roy et al., 2010; Yang et al., 2015).



**Figura 23 - Modelagem computacional da estrutura da Plataforma Rx-UBCP (A) e da proteína quimérica PlatCruzi (B).** As cores destacam os 10 epítomos inseridos em PlatCruzi. As seqüências de aminoácidos de Rx-UBCP e PlatCruzi foram submetidas ao portal I-TASSER para análise <<http://zhanglab.ccmh.med.umich.edu/I-TASSER/>>.

Diversas ferramentas computacionais foram usadas para a predição de características bioquímicas e físicas de PlatCruzi. O resultado obtido das análises da possível presença de um peptídeo sinal (programas *SignalP*) e a predição de ponto isoelétrico e peso molecular (programas *ProtParam*) pode ser observado na Tabela 11.

**Tabela 11 Análises de peptídeo sinal, ponto isoelétrico e peso molecular de PlatCruzi.**

	Peso Molecular (ProtParam)	Ponto Isoelétrico (ProtParam)	Peptídeo Sinal (SignalP)
PlatCruzi	42,4 kDa	6,77	Não

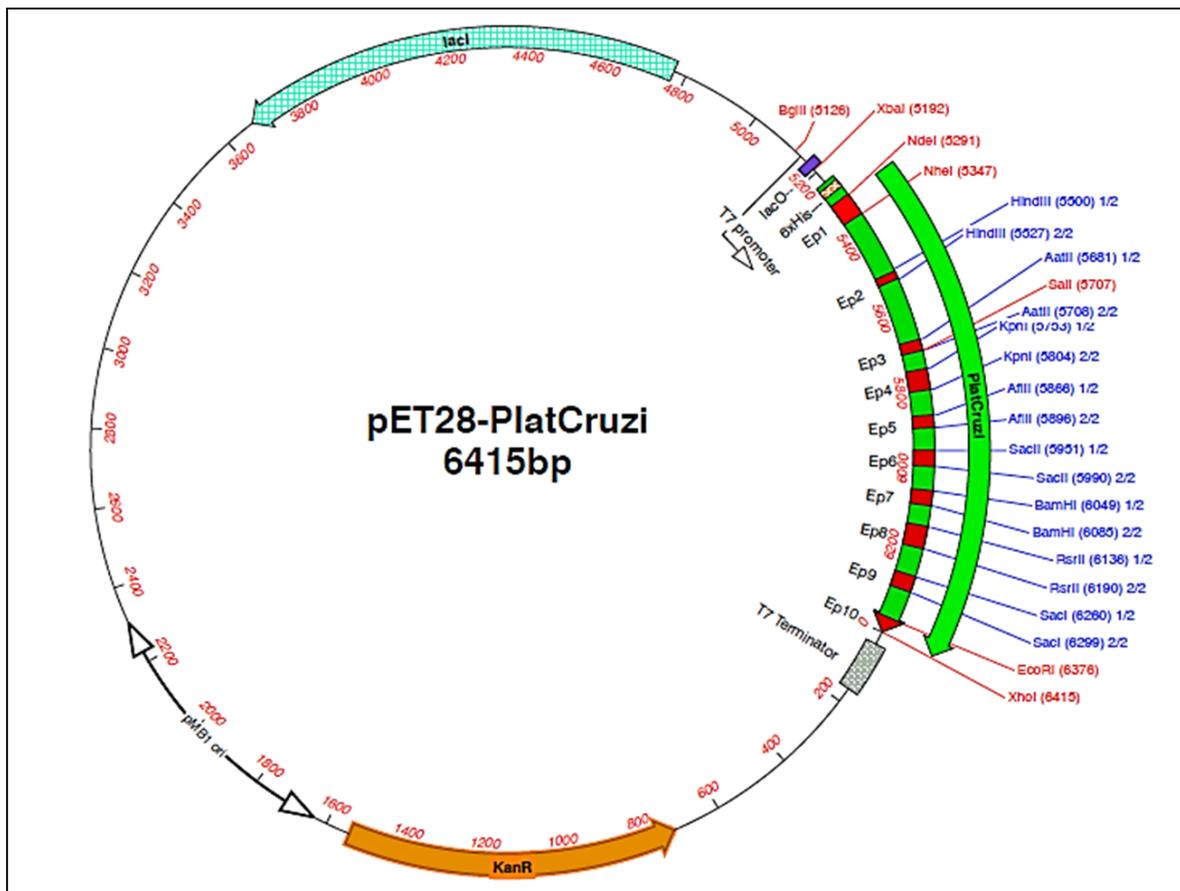
## 4.2 Caracterização das proteínas recombinantes

Com objetivo de conhecer de como funciona o arquétipo da plataforma *in vitro*, foram realizados ensaios de clonagem, expressão proteica, purificação e imunoenaios, através das técnicas de *Western blotting* e ELISA.

Este subitem aborda os resultados obtidos da clonagem dos poliantígenos recombinantes e das análises de expressão proteica, purificação e desempenho de cada proteína quimérica.

### 4.2.1 Clonagem, PCR de colônia e sequenciamento

A Figura 24 esquematiza o gene de PlatCruzi com os 10 epítomos clonado no vetor de expressão pET-28a, mostrando as regiões dos epítomos inseridos na Plataforma Rx-UBCP.

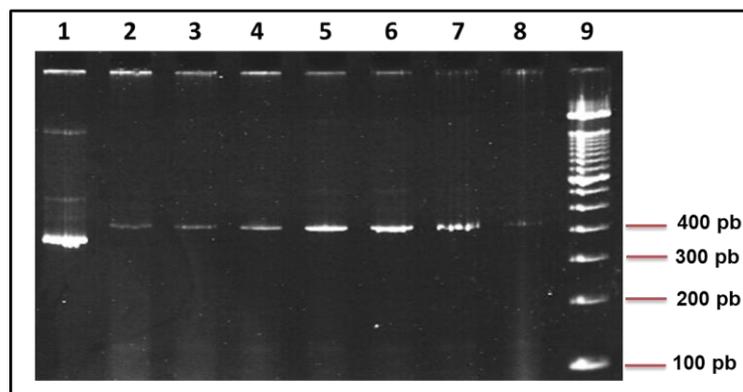


**Figura 24 - Esquema representativo de clonagem de PlatCruzi no vetor pET-28a(+).** Realizado pelo programa *MacVector* V16.0.03.

Como descrito em material e métodos, o gene sintético foi produzido através do vetor de clonagem pMA-RQ pela *Life Technologies*, para a posterior clonagem no vetor de expressão pET-28a.

A clonagem foi realizada em cepa comercial DH5- $\alpha$  ou em cepa TOP10, para a obtenção do DNA plasmidial. Após, foram adicionados mais dois epítomos nas regiões C' e N' na sequência nucleotídica da plataforma inicial com 8 epítomos, através da digestão com endonucleases de restrição (posição 1: NdeI e NheI e posição 10: ECoRI e XhoI) e posterior pareamento de oligonucleotídeos (Tabela 8), gerando PlatCruzi com os 10 epítomos previamente selecionados. A confirmação da obtenção do DNA plasmidial contendo a plataforma inicial, da inserção dos dois epítomos (KPM11 e CRA – TcEp9) e das proteínas variantes resultantes das deleções de cada epítopo na plataforma, foi através da técnica de sequenciamento de DNA, pela Plataforma Sequenciamento de DNA da FIOCRUZ (RPT01-A). Além disso, foram realizados PCR de colônia para checagem da correta inserção dos epítomos KPM11 e CRA – TcEp9.

A Figura 25 mostra a imagem do gel de agarose 10% do resultado obtido do PCR de colônia, para a checagem da inserção de KMP11, onde todos os clones estavam com inserto, confirmado depois por sequenciamento de DNA.



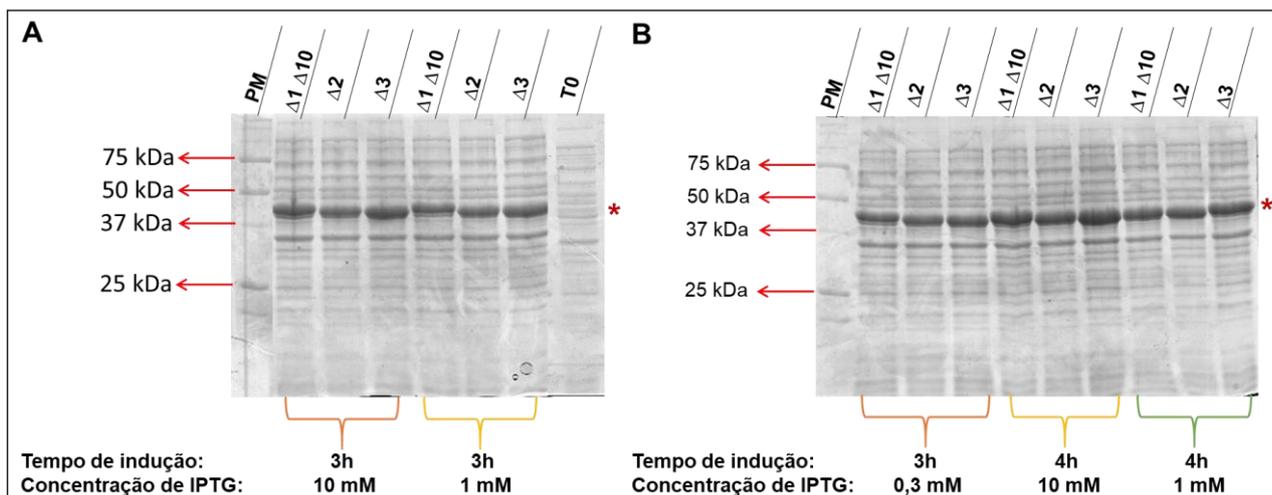
**Figura 25 - Gel de poliácridamida 10% de PCR de colônia.** (1) amostra controle (miniprep da proteína quimérica com 8 epítomos). (2-8) produto amplificado dos clones. (9) Marcador de separação de fragmentos: 100pb – *DNA ladder Thermo Fisher Scientific*. A voltagem aplicada na separação foi de 80 V por aproximadamente 30 minutos. Visualização dos fragmentos dos produtos de PCR em transiluminador UV 365 nm.

#### **4.2.2 Avaliação da proteína quimérica inicial (*PlatCruzi* $\Delta 1$ $\Delta 10$ ) e suas variantes**

Para a padronização da expressão proteica em *E. coli* BL21 (DE3), foram realizadas induções em diferentes concentrações, variando também o tempo e temperatura de cada indução.

A Figura 26 mostra as imagens obtidas do *SDS-PAGE* (11%) das expressões proteicas das proteínas quiméricas com 8 epítomos: sem a inserção dos epítomos nas posições 1 e 10 da plataforma; com 7 epítomos: sem os epítomos nas posições 1, 2 e 10 e sem os epítomos nas posições 1, 3 e 10. Mostrando que não houve diferença significativa entre as diferentes induções.

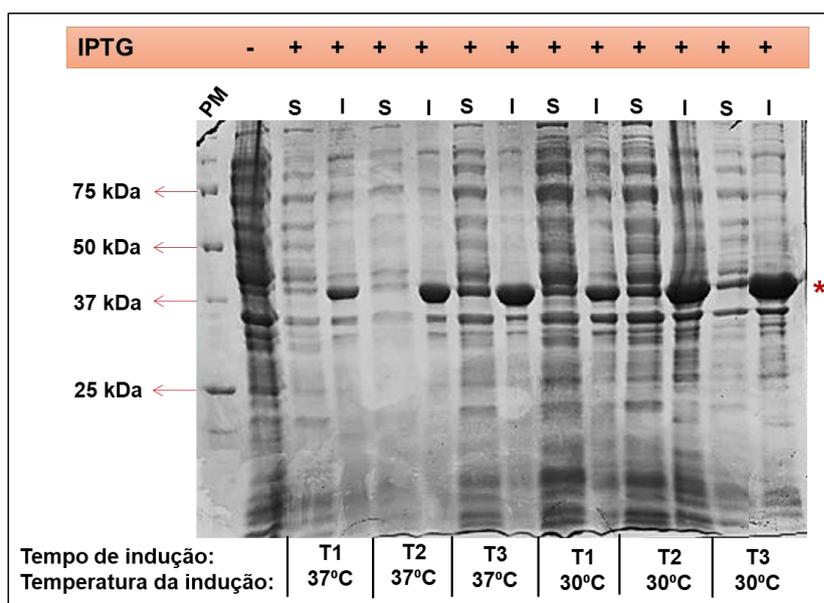
Os epítomos 2 e 3 foram retirados da proteína quimérica inicial (8 epítomos), através de enzimas de restrição respectivamente: *HindIII* e *AatII*.



**Figura 26 - Análise das diferentes condições de expressão das proteínas recombinantes por SDS-PAGE 11%.** (PM) Marcador de peso molecular *Precision Plus Protein Unstained Standard* (Bio-Rad). ( $\Delta 1 \Delta 10$ ) Proteína quimérica com 8 epítopos, sem os epítopos das posições 1 (KMP11) e 10 (CRA-TcEp9). ( $\Delta 2$ ) Proteína quimérica com 7 epítopos, retirado da posição 2 (TcE – TcEp5) a partir da proteína com 8 epítopos. ( $\Delta 3$ ) Proteína quimérica com 7 epítopos, retirado da posição 3 (TcE -TcEp4) a partir da proteína com 8 epítopos. (T0) Amostra não induzida. (\*) Tamanho esperado de aproximadamente 40 kDa. A voltagem aplicada na separação foi de 150 v por aproximadamente 1 hora.

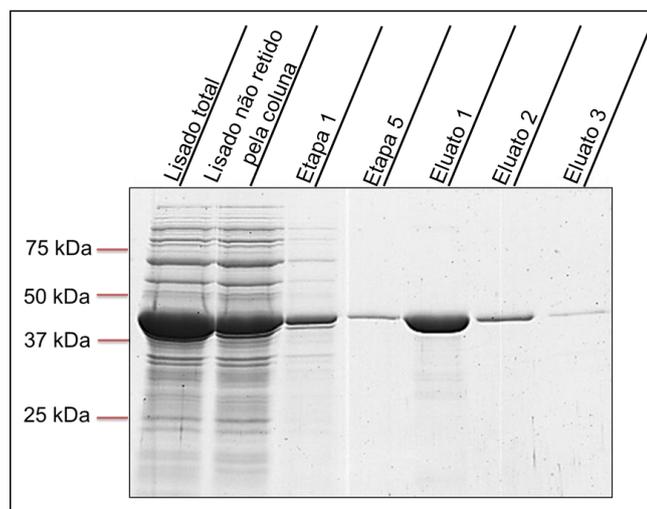
A Figura 27 mostra a análise de solubilidade proteica, neste caso, exemplificado com proteína quimérica contendo 7 epítopos (PlatCruzi  $\Delta 1 \Delta 5 \Delta 10$ ), com a exclusão do determinante antigênico da posição 5 (CRA – TcEp8) de PlatCruzi  $\Delta 1 \Delta 10$ . As induções foram realizadas com duas temperaturas: 37°C e 30°C e o tempo variou de uma a quatro horas, mantendo a mesma concentração de IPTG (1 mM). Essas expressões de proteínas recombinantes em células de *E. coli*, não apresentaram diferenças significativas entre as diferentes temperaturas e tempo de indução.

Para a obtenção do fracionamento proteico, foi realizado a lise da membrana bacteriana através de sonicação, pelo sonicador *Branson Digital Sonifier*. As amostras foram ressuspensas com tampão de lise (20 mM Tris-HCl, pH 7,5, 100 mM NaCl e 0,1% triton X-100) e sonicadas com ciclo de 30 pulsos, *on/off* (1/3 segundos) no gelo pulso, amplitude de 20%. Depois foram centrifugadas a 16000 g a 4°C por 10 minutos. Em seguida, as frações solúveis e insolúveis das proteínas recombinantes, obtidas por sonicação, foram avaliadas por SDS-PAGE 11% (Figura 27). Pode-se notar que a proteína é expressa predominantemente na fração insolúvel, independente de tempo, temperatura da indução e da concentração do indutor (Figura 27).



**Figura 27 - Análise de solubilidade da proteína recombinante PlatCruzi  $\Delta 1 \Delta 5 \Delta 10$  por SDS-PAGE 11%.**  $\Delta 1 \Delta 10$  - proteína sem os epítomos nas posições: 1 (KMP11), 5 (CRA – TcEp8) e 10 (CRA – TcEp9). (PM) Marcadores de peso molecular *Precision Plus Protein Unstained Standard* (Bio-Rad). (S) Fração solúvel. (I) Fração insolúvel. (\*) Tamanho esperado de aproximadamente 40 kDa. A voltagem aplicada na separação foi de 150 v por aproximadamente 1 hora.

Com a solubilização dos poliantígenos recombinantes em corpúsculo de inclusão, PlatCruzi  $\Delta 1 \Delta 10$  foi purificada em condições desnaturantes através da coluna de afinidade com 250 mM de imidazol em seu tampão de eluição final e ureia 8 M (pH 6,3), (Figura 27). As frações obtidas da proteína inicial, após a etapa de purificação, foram quantificadas pelo método de *Bradford* (eluato 1: 435,9  $\mu\text{g/mL}$ ; eluato 2: 74,2  $\mu\text{g/mL}$ ; eluato 3: 53,2  $\mu\text{g/mL}$ ) e submetidas a corrida eletroforética em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 11%, Figura 28). Em seguida, o eluato 1 obtido na purificação foi utilizado no ensaio de *western blotting* e pôde-se avaliar o desempenho inicial do polipeptídeo do estudo perante os *pools* sorológicos de pessoas com DChc e leishmaniose (Figura 29).



**Figura 28 - Análise da purificação da proteína de fusão contendo poli-histidina purificada por coluna de níquel por SDS-PAGE.** Purificação realizada através de *Nickel - Affinity Gel* (SIGMA-ALDRICH®). PlatCruzi  $\Delta 1 \Delta 10$  - Proteína quimérica sem os epítomos nas posições 1 (KMP11) e 10 (CRA – TcEp9). Polipeptídeo com aproximadamente 40 kDa foi adicionado no seu N-terminal 6 histidinas. Lisado total: lisado com tampão 100 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 10 mM Tris-base, 8 M ureia, pH 8,0. Etapa 1 e Etapa 5: etapas 1 e 5 de lavagem. Eluato 1: 435,9  $\mu\text{g/mL}$ . Eluato 2: 74,2  $\mu\text{g/mL}$ . Eluato 3: 53,2  $\mu\text{g/mL}$ .



**Figura 29 – Reatividade por western blotting das proteínas recombinantes com soros de pacientes com DChc e com leishmaniose.** DChc – doença de Chagas crônica. PlatCruzi  $\Delta 1 \Delta 10$  – Proteína quimérica sem os epítomos nas posições 1 (KMP11) e 10 (CRA – TcEp9). Foi usado o eluato 1 da purificação por gel de afinidade a níquel (435,9  $\mu\text{g/mL}$ ). Foram aplicados 2  $\mu\text{g}$  por poço das proteínas recombinantes com 8 epítomos e sem adição de epítomos. Tamanho esperado da Proteína inicial é de aproximadamente 40 kDa e da Plataforma vazia cerca de 30 kDa. Amostras sorológicas obtidas do Laboratório de Bioquímica de Proteínas e Peptídeos (CDTS – FIOCRUZ).

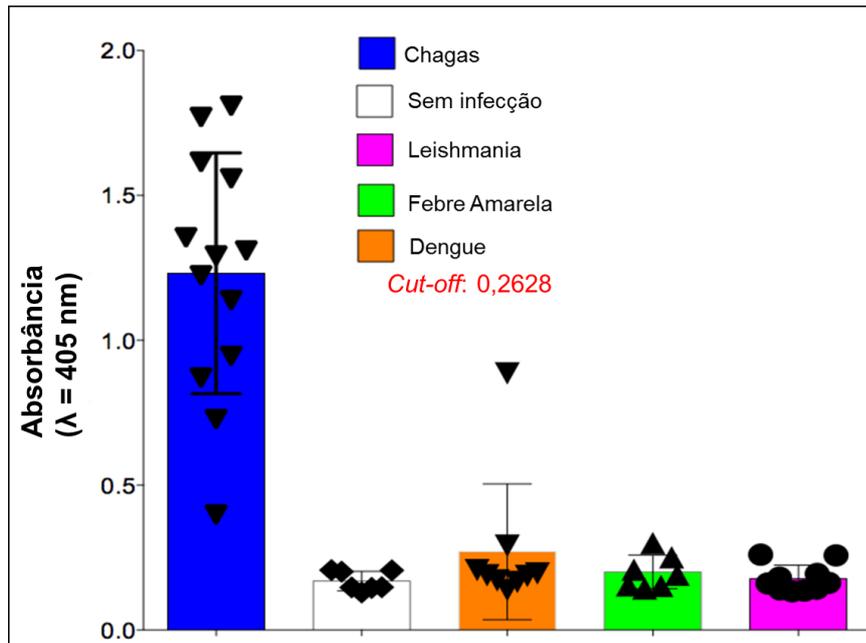
O ensaio de *western blotting* teve como enfoque averiguar a detecção das proteínas recombinantes, plataforma inicial com 8 epítomos e plataforma vazia, diante das diferentes concentrações (1:250, 1:500, 1:1000) dos *pools* de 4 soros de

indivíduos com DChc com cardiopatia grave e com *pool* de 3 soros da infecção por leishmaniose (*L. braziliensis*), provenientes do Laboratório de Bioquímica de Proteínas e Peptídeos (CDTS – FIOCRUZ).

Pôde-se observar, diferenças nas detecções de IgG anti-*T. cruzi* perante a PlatCruzi  $\Delta 1 \Delta 10$  e a Plataforma Controle (plataforma sem epítomos carregados). Na presença da proteína quimérica específica para a infecção por *T. cruzi*, teve a reatividade esperada; já com relação a plataforma vazia, não apresentou reatividade perante ao *pool* de soros de DChc, onde a banda reconhecida nesta fita sugeriu ser referente a resíduos de polipeptídeos de *E. coli*. (Figura 29).

Notou-se uma baixa reatividade aos anticorpos anti-*T. cruzi* da classe IgG contra a proteína recombinante frente ao *pool* de soros de leishmaniose. Essa reatividade poderia ser por PlatCruzi  $\Delta 1 \Delta 10$  ou devido aos resíduos de proteínas recombinantes bacterianas ainda presentes após a purificação por gel de afinidade a níquel, conforme ilustrado na Figura 28.

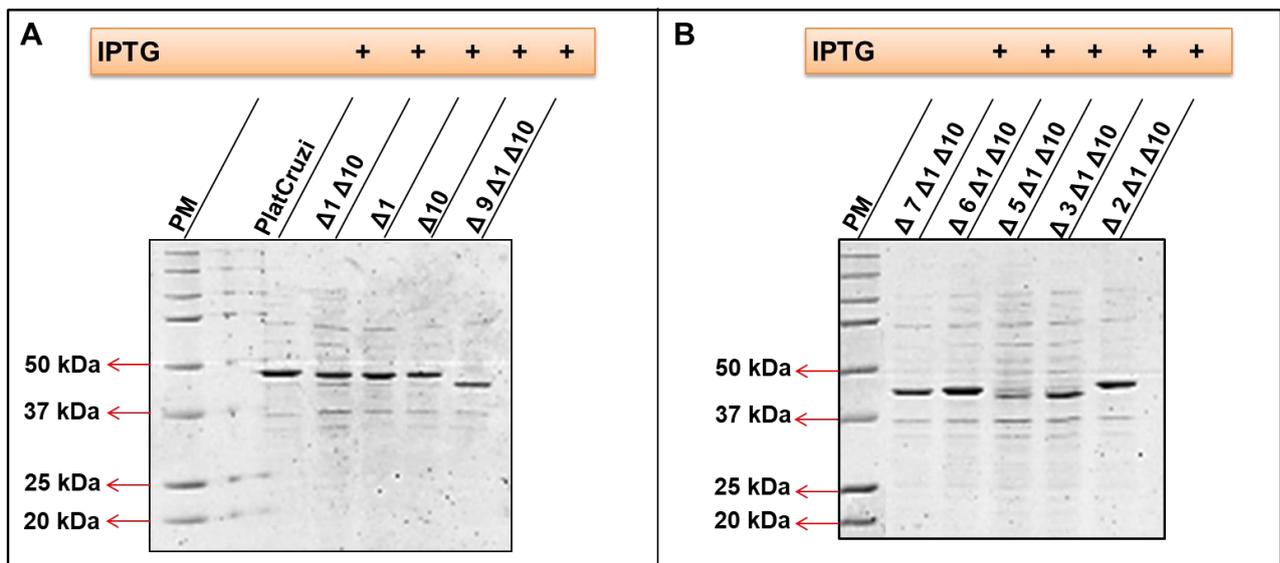
O próximo passo foi averiguar o desempenho da proteína recombinante inicial em ensaio de ELISA perante aos soros de indivíduos com infecção por *T. cruzi*, dengue, febre amarela, leishmaniose e indivíduos sem alguma infecção (Figura 30). Os soros são provenientes do Laboratório de Bioquímica de Proteínas e Peptídeos (CDTS – FIOCRUZ) e foram usados apenas em ensaios iniciais até a obtenção dos soros dos Laboratórios Centrais de Saúde Pública (LACENs), Barcelos (AM) e dos Padrões Internacionais de Referências Biológicas da OMS. Os resultados apontaram a detecção de IgG anti-*T. cruzi* contra PlatCruzi  $\Delta 1 \Delta 10$  (Figura 30). A única amostra sorológica de dengue que apresentou alto valor de DO, pode ser devida a reatividade de IgG anti-humano contra os resíduos de proteínas bacterianas ainda existentes após a etapa de purificação.



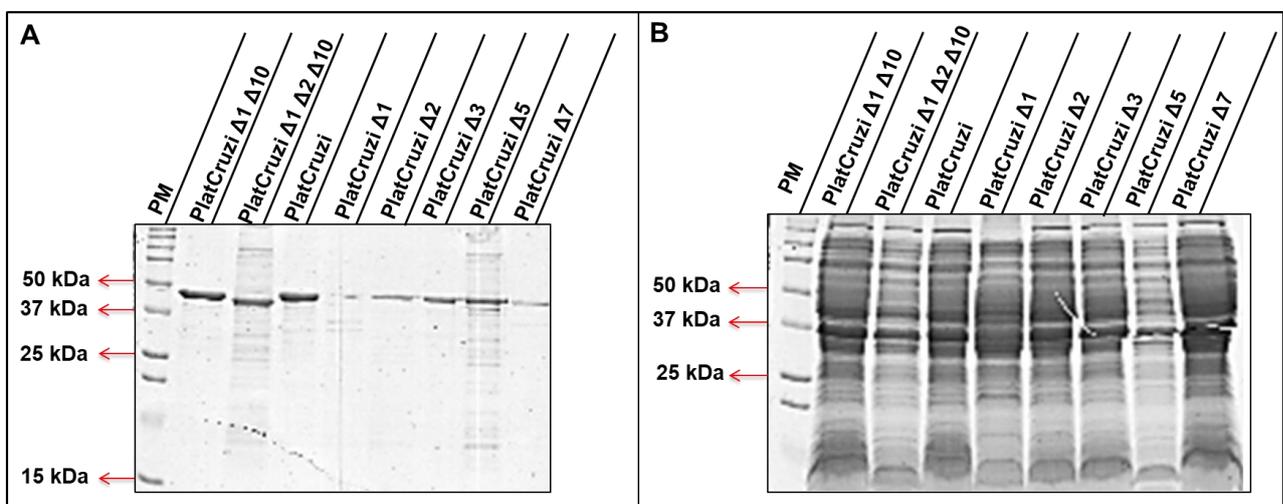
**Figura 30 - Reconhecimento da proteína  $\Delta 1 \Delta 10$  frente a soros de indivíduos com diferentes infecções.** PlatCruzi  $\Delta 1 \Delta 10$  – sem os epítomos nas posições 1 (KMP11) e 10 (CRA – TcEp9). Foi aplicado 1 $\mu$ g da proteína por poço. A diluição dos anticorpos primários foram de 1:250. *Cutoff*: 0,2628 (obtido pelo programa *GraphPad Prism 5*, versão para Mac). Anticorpo secundário: *anti-human IgG* conjugado a fosfatase alcalina. Soros: 13 de Dchc, 7 de indivíduos sem infecção, 9 de dengue, 7 de febre amarela, 10 de leishmaniose, oriundos dos Laboratório de Bioquímica de Proteínas e Peptídeos (CDTS – FIOCRUZ).

#### 4.2.3 Análise de PlatCruzi e suas variantes

Após a inserção dos determinantes antigênicos KMP11 e CRA –TcEp9, foram realizados novos ensaios para analisar o desempenho de PlatCruzi e a real contribuição de cada epítopo dentro da plataforma. Para essas avaliações, foram realizadas clonagem, expressão proteica (Figura 31), fracionamento das proteínas (Figura 32), *western blotting* por quimioluminescência através do *Odyssey*, Li-Cor (Figura 33) e *SPOT-Synthesis Epitope Analysis* de PlatCruzi e das 11 proteínas recombinantes variantes da plataforma completa.

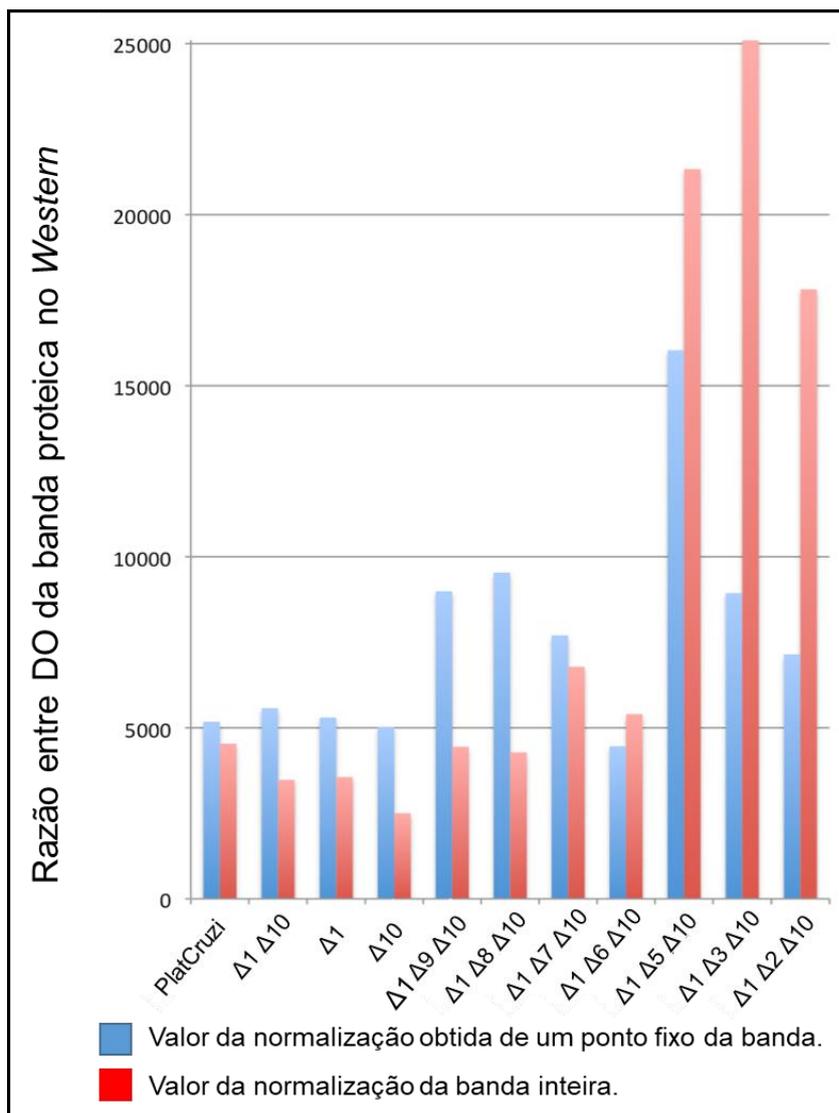


**Figura 31 - SDS-PAGE 11% das expressões das proteínas recombinantes.** (PM) Marcador de peso molecular *Precision Plus Proteins™ Unstained Standards* (Bio-Rad). Tamanho esperado de PlatCruzi é de 42,4 kDa. PlatCruzi – Proteína quimérica carreando os 10 epítomos. ( $\Delta 1 \Delta 10$ ) sem os epítomos na posição 1 (KMP11) e na posição 10 (CRA – TcEp9) em PlatCruzi. ( $\Delta 1$ ) sem o epítomo na posição 1 em PlatCruzi. ( $\Delta 10$ ) sem o epítomo na posição 10 em PlatCruzi. ( $\Delta 9 \Delta 1 \Delta 10$ ) sem os epítomos nas posições 1, 9 (B13), 10. ( $\Delta 1 \Delta 7 \Delta 10$ ) sem epítomos nas posições 1, 7 (TcD-1) e 10. ( $\Delta 1 \Delta 6 \Delta 10$ ) sem epítomos nas posições 1, 6 (TcD-2) e 10. ( $\Delta 1 \Delta 5 \Delta 10$ ) sem epítomos nas posições 1, 5 (CRA – TcEp8) e 10. ( $\Delta 1 \Delta 3 \Delta 10$ ) sem epítomos nas posições 1, 3 (TcE – TcEp4) e 10. ( $\Delta 1 \Delta 2 \Delta 10$ ) sem epítomos nas posições 1, 2 (TcE -TcEp5) e 10.



**Figura 32 - Análise de solubilidade das proteínas recombinantes.** (A) SDS-PAGE 11% da fração insolúvel das proteínas. As amostras aplicadas foram diluídas 100 x. (B) SDS-PAGE da fração solúvel das proteínas obtidas após tratamento com *CellLytic* 0,5x. (PM) *Precision Plus Protein™ Kaleidoscope™ Prestained Protein Standards* (Bio-Rad). Tamanho esperado de PlatCruzi é de 42,4 kDa. ( $\Delta 1 \Delta 10$ ) sem os epítomos na posição 1 (KMP11) e na posição 10 (CRA – TcEp9) em PlatCruzi. ( $\Delta 1 \Delta 2 \Delta 10$ ) sem epítomos nas posições 1, 2 (TcE -TcEp5) e 10. PlatCruzi – Proteína quimérica carreando os 10 epítomos. ( $\Delta 1$ ) sem o epítomo na posição 1 em PlatCruzi. ( $\Delta 2$ ) sem o epítomo na posição 2. ( $\Delta 3$ ) sem epítomo nas posições 3 (TcE – TcEp4). ( $\Delta 5$ ) sem epítomos na posição 5 (CRA – TcEp8). ( $\Delta 7$ ) sem epítomo na posição 7 (TcD-1).

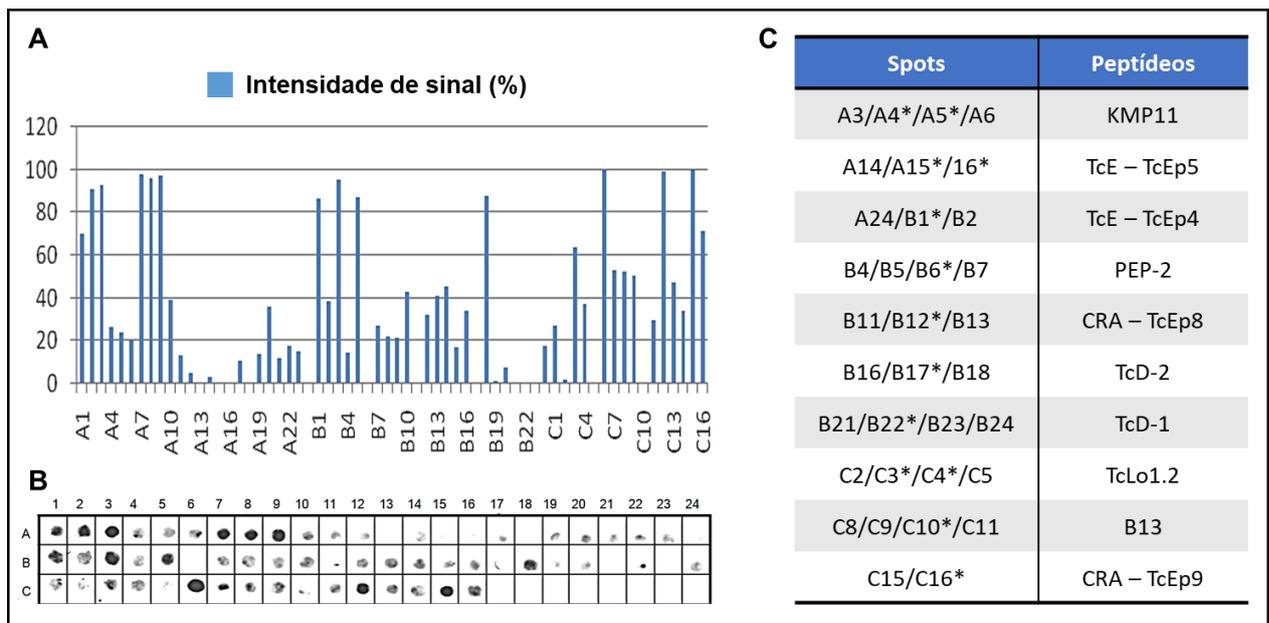
As proteínas recombinantes foram extraídas através da lise química pelo reagente *CellLytic* 0,5x, como descrito em material e métodos. A fração insolúvel foi diluída e aplicada no gel de poliacrilamida para a corrida por eletroforese (Figura 32 A). O resultado obtido foi o mesmo observado com relação a proteína com 8 epítomos, com mais de 80% das proteínas presentes em corpúsculos de inclusão. O passo posterior foi solubilizar em tampão de ureia 8 M, pH 8,0 para depois ser realizado o ensaio de *western blotting* de cada quimera (Figura 33).



**Figura 33 - Gráfico gerado de normalização de sinal do *western blotting*.** *Western blotting* por quimioluminescência – Odyssey (Li-Cor), com a quantidade de proteína determinada a partir da DO das bandas de proteínas obtidas pelo SDS-PAGE (11%). Proteínas lisadas com tampão de ureia 8 M, pH 8,0. PlatCruzi – Proteína quimérica carregando os 10 epítomos. (Δ1 Δ10) sem os epítomos na posição 1 (KMP11) e na posição 10 (CRA – TcEp9) em PlatCruzi. (Δ1) sem o epítomo na posição 1 em PlatCruzi. (Δ10) sem o epítomo na posição 10 em PlatCruzi. (Δ1 Δ9 Δ10) sem os epítomos nas posições 1, 9 (B13), 10. (Δ1 Δ8 Δ10) sem epítomos nas posições 1, 8 (TcLo1.2) e 10. (Δ1 Δ7 Δ10) sem epítomos nas posições 1, 7 (TcD-1) e 10. (Δ1 Δ6 Δ10) sem epítomos nas posições 1, 6 (TcD-2) e 10. (Δ1 Δ5 Δ10) sem epítomos nas posições 1, 5 (CRA – TcEp8) e 10. (Δ1 Δ3 Δ10) sem epítomos nas posições 1, 3 (TcE – Ep4) e 10. (Δ1 Δ2 Δ10) sem epítomos nas posições 1, 2 (TcE -TcEp5) e 10.

Durante a construção de PlatCruzi, a proteína inicial não possuía os epítomos KMP11 e CRA (TcEp9), posições 1 e 10 da plataforma, esta foi utilizada para gerar as 11 variações proteicas através de deleções dos epítomos nas posições 2, 3, 5 a 9. As deleções individuais dos epítomos KMP11 e CRA (TcEp9), posições 1 e 10 da plataforma, ocorreu durante a geração da PlatCruzi completa (10 epítomos inseridos), designadas respectivamente PlatCruzi  $\Delta$ 1, PlatCruzi  $\Delta$ 10. Cada epítopo deletado de PlatCruzi foi simbolizado pela letra grega " $\Delta$ ". Cada proteína com as deleções foi expressa em *E. coli* e foi obtido o extrato total para posterior análise por *SDS-PAGE* (Figura 32) e *western blotting* (Figura 33). Para a realização da técnica de *western blotting*, foi utilizado um *pool* de soros provenientes das amostras sorológicas de pacientes com DChc, que apresentaram titulação mais alta em ELISA prévio. O sinal obtido por quimioluminescência foi normalizado para a carga do alvo através do cálculo da divisão da medida da densidade óptica (DO) pela banda obtida por coloração de *coomasie* do *SDS-PAGE* e plotada em forma de gráfico. As barras azuis representam as medianas dos sinais revelados por e as barras vermelhas são a intensidade total. Os resultados sugerem que a maior influência no desempenho foi estrutural. A ocupação simultânea dos sítios 2, 3 e 5 afetou negativamente o reconhecimento de PlatCruzi pelos anticorpos anti-*T. cruzi* em até cinco vezes (Figura 33). Além disso, o epítopo 1 parece não estar contribuindo significativamente para a produção de sinal. O próximo passo foi verificar o desempenho de cada epítopo dentro da plataforma, através da geração de uma biblioteca de peptídeos de PlatCruzi, para averiguar a interação dos anticorpos perante a estrutura da proteína núcleo e de cada epítopo nela inserido (Figura 34).

Importante enfatizar que as proteínas utilizadas nos ensaios de *western blotting* não haviam sido previamente purificadas antes da realização do ensaio, podendo ter interferências das proteínas bacterianas nas intensidades apresentadas com cada poliantígeno recombinante.



**Figura 34 - Avaliação dos peptídeos de PlatCruzi através do SPOT-Synthesis Epitope Analysis.** (A) Intensidade de sinal obtido do reconhecimento de cada peptídeo pelo pool de soros de pacientes com DChC, diluição – 1:250. A1 – C16: peptídeos gerados de 14 aminoácidos, com sobreposição de 8 resíduos. (B) Membrana celulósica mostrando os Spots com peptídeos reconhecidos pelos soros. (C) Localização dos 10 epitopos analisados. (\*) Epítotos inteiros ou em maior parte.

A análise de *SPOT-Synthesis Epitope Analysis* foi realizada com a formação de biblioteca de peptídeos de PlatCruzi, peptídeos da proteína núcleo e de *T. cruzi*, que foram inseridos em spots em uma membrana, contendo 14 peptídeos com sobreposição de 8 resíduos de aminoácidos por spot. Foram utilizados um pool de soros de indivíduos com DChc e outro com leishmaniose (controle negativo) e anticorpo secundário *Phosphatase labeled Goat anti-human IgG (H+L)* – marca KPL. O resultado obtido nesta análise mostrou que os epítotos 1, 2, 4, 5 e 7 apresentaram menor intensidade de sinal com a ligação dos anticorpos.

Com os resultados obtidos nesta fase inicial, permitiu a identificação de epítotos com pouca contribuição dentro dos ensaios imunológicos. O próximo passo foi avaliar o desempenho de uma das variantes de PlatCruzi, PlatCruzi  $\Delta 5$  (9 epítotos), em frente ao painel de soros obtidos neste estudo.

#### 4.2.4 Desempenho das proteínas quiméricas: PlatCruzi e PlatCruzi $\Delta 5$

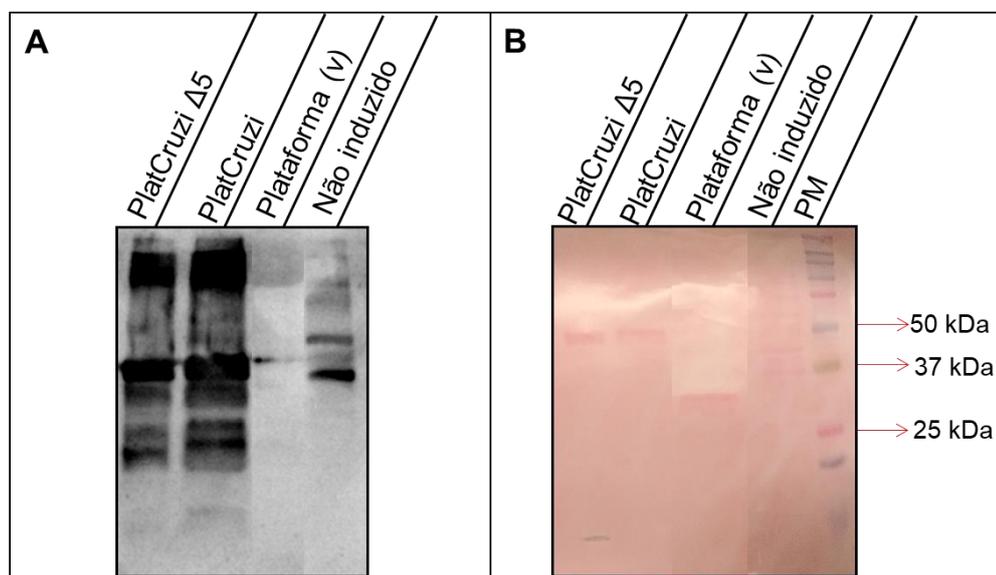
Para conhecer algumas informações bioquímicas e físicas: peso molecular, ponto isoelétrico e peptídeo sinal de PlatCruzi  $\Delta 5$ , (Tabela 12).

**Tabela 12 - Análises de peptídeo sinal, ponto isoelétrico e peso molecular de PlatCruzi Δ5.**

	Peso Molecular (ProtParam)	Ponto Isoelétrico (ProtParam)	Peptídeo Sinal (SignalP)
PlatCruzi Δ5	41,5 kDa	6,47	Não

Comparando as duas predições das estruturas secundárias das proteínas quiméricas PlatCruzi e PlatCruzi Δ5 (quimera com remoção do epítipo CRA - TcEp8) é possível que a deleção do epítipo 5 acarrete em uma mudança na conformação da estrutura proteica.

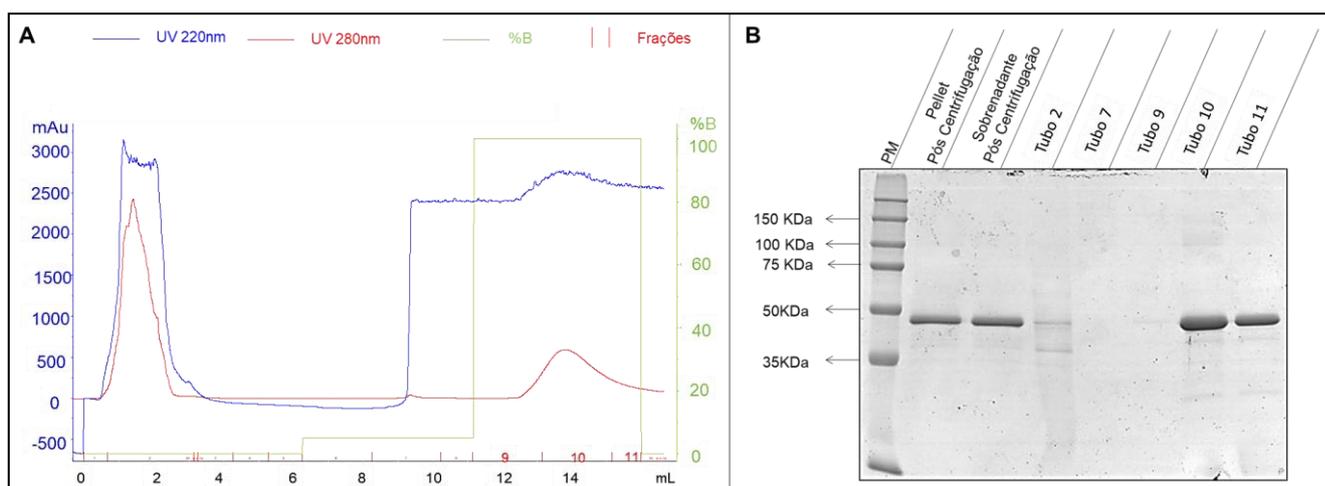
Com o intuito de averiguar a detecção das proteínas solubilizadas em tampão contendo ureia 8 M, pH 8,0: PlatCruzi, PlatCruzi Δ5, da plataforma vazia e de proteínas bacterianas através do extrato bacteriano sem indução de IPTG, foram realizados novos ensaios de *western blotting* em frente a um *pool* soros de pacientes com doença de Chagas crônica (Figura 35).



**Figura 35 - Proteínas quiméricas detectadas pelo *pool* de soros de pacientes com infecção crônica por *T. cruzi*.** (A) *western blotting* dos poliantígenos recombinantes. (B) Membrana de nitrocelulose corada com *Ponceau S*. Proteínas quiméricas: PlatCruzi Δ5 – remoção do epítipo CRA (TcEp8), tamanho esperado de 41,5 kDa. PlatCruzi – com os 10 epítipos inseridos, tamanho esperado de 42,4 kDa. Plataforma (v) – Plataforma Rx-UCBP sem inserção de epítipos (vazia), tamanho esperado de 29,72 kDa. PM – Marcador de peso molecular *Precision Plus Protein™ Kaleidoscope™ Prestained Protein Standards* (Bio-Rad).

O resultado na Figura 35 (A) mostra a detecção das proteínas recombinantes PlatCruzi (10 epítomos) e PlatCruzi  $\Delta 5$  (sem o epítipo CRA, TcEp8) perante os *pools* de soros de pacientes com doença de Chagas crônica, provenientes dos LACENs e não apresentou reatividade perante a Plataforma vazia. A Figura 35 (B) mostra a imagem da membrana de nitrocelulose após transferência, corada com *Pounceau S.*, onde pode-se notar as diferenças no peso molecular da Plataforma (v) e das duas quimeras com os determinantes antigênicos específicos de *T. cruzi* inseridos.

Para a obtenção dos resultados das três quiméricas em frente ao painel de amostras sorológicas em ELISA, as proteínas foram previamente purificadas em coluna de afinidade a níquel pelo sistema *Äktapurifier*. PlatCruzi foi purificada com dois protocolos distintos tendo em vista a pureza proteica, conforme descrito em material e métodos (subitem 3.2.2), observado na Figura 36 e posteriormente na Figura 40.



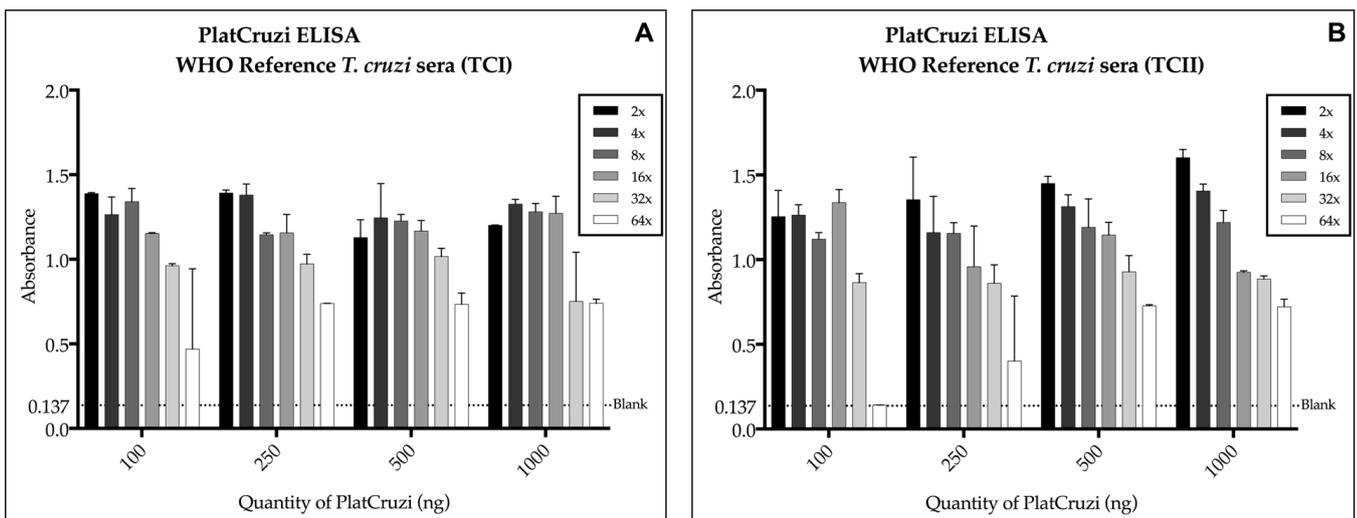
**Figura 36 - Purificação de PlatCruzi por cromatografia de afinidade.** (A) Gráfico gerado pelo *Äktapurifier* da purificação por coluna de afinidade. Os eluatos foram eluídos em tampão com 500 mM de imidazol, sem presença de ureia. (B) Gel *SDS-PAGE* 11% das etapas de purificação. PM - Marcador de peso molecular Marcador de peso molecular *Precision Plus Proteins™ Unstained Standards* (Bio-Rad). *Pellet* e Sobrenadante pós centrifugação – PlatCruzi solubilizada em ureia 8M, pH 8,0. As amostras aplicadas no gel foram diluídas da seguinte forma: *Pellet* e sobrenadante – diluição de 50x; Tubos 10 e 11 – diluição de 5x, as outras amostras não foram diluídas. Tamanho esperado de PlatCruzi: 42,4 kDa.

Após a purificação, as frações da proteína 9, 10 e 11 foram quantificadas (Tabela 13) pelo método de quantificação fluorimétrica através do *Qubit (Thermo Fischer Scientific)*. A partir desses resultados, a fração 11 foi escolhida para os imunoenaios, por possuir menos resíduos bacterianos que diminuem a possibilidade de sua interferência nos testes.

**Tabela 13 - Dosagem de PlatCruzi após purificação por coluna de afinidade.**

	Fração 9	Fração 10	Fração 11
PlatCruzi µg/mL	40,2	394	400

Os resultados obtidos frente aos dois *pools* de soros dos Padrões Internacionais de Referências Biológicas da OMS para DChc, apontaram um ótimo desempenho de PlatCruzi em todas as concentrações proteicas e nas diferentes diluições dos soros liofilizados (Figura 37). Mostrando que essa proteína quimérica, purificada por cromatografia de afinidade, através do primeiro protocolo estabelecido, respondeu de forma eficaz nas regiões endêmicas originárias desses *pools*.

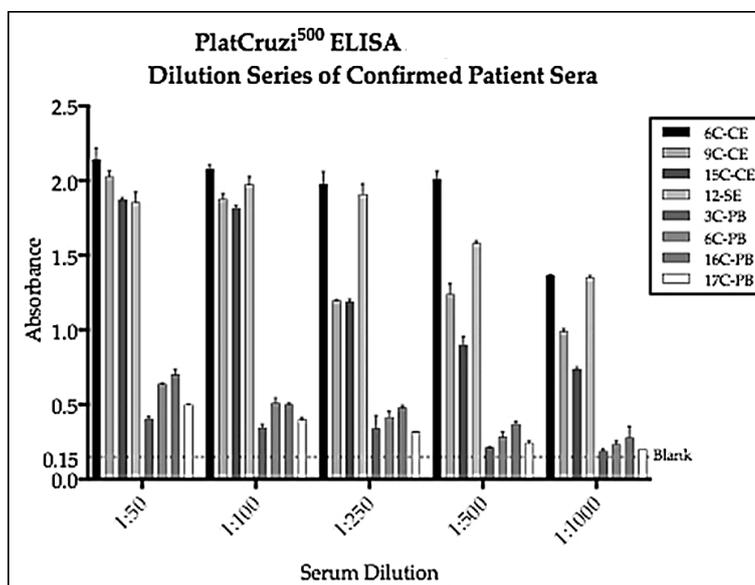


**Figura 37 - ELISA mostrando a detecção de diferentes concentrações da PlatCruzi pelos Padrões Internacionais das Referências Biológicas da OMS. (A) Pool de soros de pacientes reconhecendo as cepas TcI, denominado de IS 09/188. (B) Pool de soros de pacientes reconhecendo as cepas TcII, denominado de IS 09/186.**

Foi realizado o ensaio de padronização da titulação dos soros de DChc para serem usados em todos os imunoenaios (Figura 37). Baseado no resultado anterior, foi fixado a quantidade proteica de 500 ng por poço, para a sensibilização em microplacas de ELISA. Os soros utilizados foram provenientes dos LACENs do Ceará, Paraíba e Sergipe, totalizando 8 soros, com baixas e altas reatividades apresentadas em ensaios anteriores.

Os resultados mostraram um bom desempenho de PlatCruzi em frente as diferentes diluições de soros das áreas endêmicas analisadas no estudo, em destaque

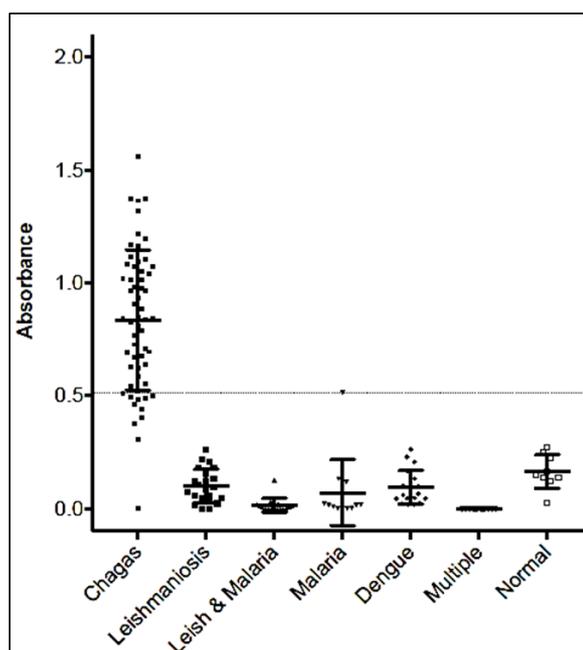
para as titulações 1:50, 1:100 e 1:250 que apresentaram melhores intensidades de DO, tanto nos soros de alta e baixas reatividade (Figura 38). Diante do resultado exposto a titulação 1:250 passou a ser utilizada em todos os testes imunoenzimáticos.



**Figura 38 - Titulação dos soros de pacientes com doença de Chagas crônica dos LACENS.** A concentração de PlatCruzi foi de 500 ng/poço e a diluição de soros 1:50 – 1:1000.

A técnica de ELISA foi empregada com amostras sorológicas de DChc e controles objetivando a detecção da proteína quimérica neste painel de soros de DChc (Figura 39). Os soros descritos na Figura 39 como leishmaniose e malária (“Leish & Malaria”), malária e múltiplos são todos provenientes de Barcelos (AM). As pessoas participantes do estudo relataram terem apresentado, no passado, uma ou mais infecções como malária, leishmaniose, dengue e tuberculose (infecções não ativas). Foram denominados por múltiplos os soros de pacientes que apresentaram mais de uma infecção. Já as 58 amostras de DChc, leishmaniose e dengue são oriundos de LACENs (CE, SE, PB), também do município de Barcelos. Além disso, contou com as amostras sorológicas de pessoas sem alguma infecção, no momento da coleta do sangue (normal), essas amostras são provenientes da UFRJ. As amostras sorológicas retestadas em laboratório que tiveram resultados inconclusivos (Tabela 15) ou duplo negativos (IFI *in-house* e *kit* de ELISA), foram retirados das análises.

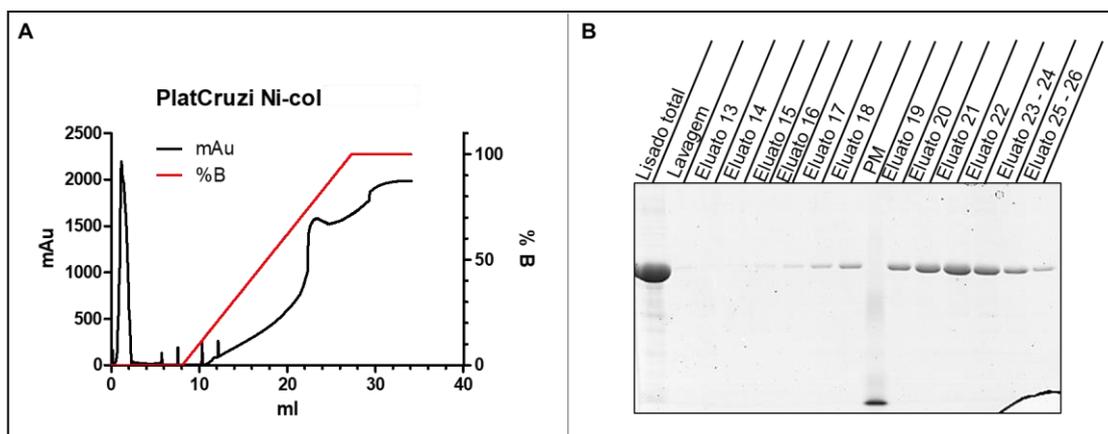
Esse ensaio resultou em uma sensibilidade baixa (81,36%) devido ao alto valor obtido no *cutoff* (0,5138), gerando resultados falso-negativos. Contudo, essa proteína quimérica resultou em uma alta especificidade (98,91%), mostrando ser específica para a infecção por *T. cruzi*.



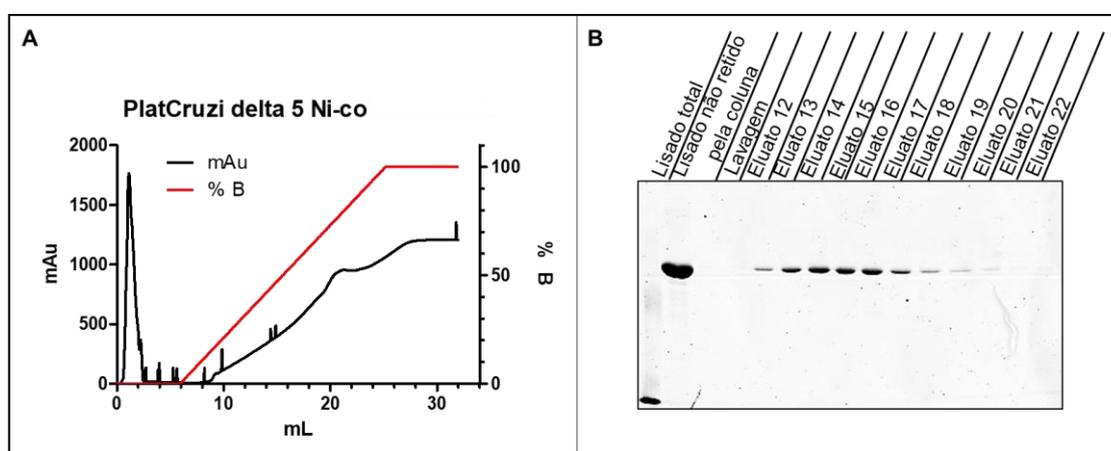
**Figura 39 - Reatividade dos soros de AM (Barcelos), CE, MA, PB, SE contra PlatCruzi.** Gráfico gerado pelo programa *GraphPad Prism v. 7.0*, para *MacOX*. Leish & Malaria – soros de indivíduos que tiveram infecções por leishmaniose e malária. Multiple – soros de indivíduos que tiveram mais de uma infecção. Normal – amostras de indivíduos que não apresentavam alguma infecção no momento da coleta do sangue, provenientes da UFRJ.

Após obtidas as primeiras frações da purificação de PlatCruzi e do emprego de ELISA com os eluatos resultantes, foram realizadas novas etapas de purificação por coluna de afinidade visando a obtenção do melhor grau de pureza proteica e o melhor renovelamento das proteínas após lise com tampão de ureia. Neste processo foram purificadas tanto PlatCruzi quanto PlatCruzi  $\Delta 5$ .

Como descrito no capítulo de material e métodos, cada sobrenadante proteico foi aplicado em coluna de afinidade ao níquel (HisTrap™, 1 mL, GE *Healthcare Life Sciences*) com o fluxo de 0,5 mL por minuto, previamente equilibrado em tampão A (50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 100 mM NaCl, 5 mM imidazol). Após ligação, a resina foi lavada com 10 mL do tampão A. A proteína foi eluída em gradiente até 100% do tampão B (50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 100 mM NaCl, 500 mM imidazol) com fluxo de 0,7 mL/min por 45 minutos. Os resultados obtidos desta metodologia de purificação podem ser observados na Figura 40 e Figura 41.



**Figura 40- Purificação de PlatCruzi.** (A) Perfil de eluição da proteína recombinante numa coluna de níquel usando um sistema de cromatografia líquida *Äktapurifier*. (B) Análise por *SDS-PAGE* 11% das frações coletadas. PM – Marcador de peso molecular. Eluatos 13-26: eluições com tampão B em sistema gradiente em ordem crescente.



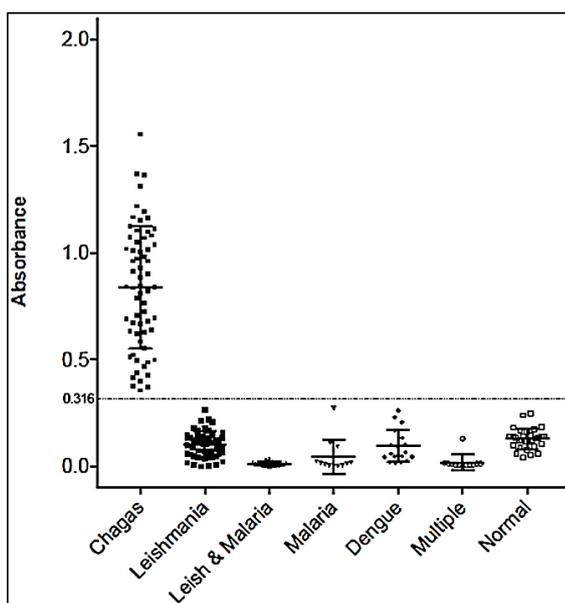
**Figura 41 – Purificação de PlatCruzi  $\Delta 5$ .** (A) Perfil de eluição da proteína recombinante numa coluna de níquel usando um sistema de cromatografia líquida *Äktapurifier*. (B) Análise por *SDS-PAGE* 11% das frações coletadas. PM – Marcador de peso molecular. Eluatos 12 – 22: eluições com tampão B em sistema gradiente em ordem crescente.

Comparando os dois resultados obtidos das purificações de PlatCruzi (Figura 40 e Figura 41), nota-se que a segunda metodologia permitiu ter frações proteicas com diferentes concentrações do tampão B, principalmente com relação ao imidazol presente em cada eluato. A Figura 41 (A) pode-se observar que a concentração deste solvente foi única em todas as frações (500 mM), já na Figura 40 (A) destaca-se por terem frações com diferentes concentrações de imidazol, o mesmo ocorre para a PlatCruzi  $\Delta 5$  (Figura 41 A).

Após a purificação proteica as duas quimeras seguiram para imunoenaios (ELISA) para avaliar as suas reatividades perante os soros provenientes de alguns estados das regiões norte e nordeste do Brasil (Figura 42 e Figura 43).

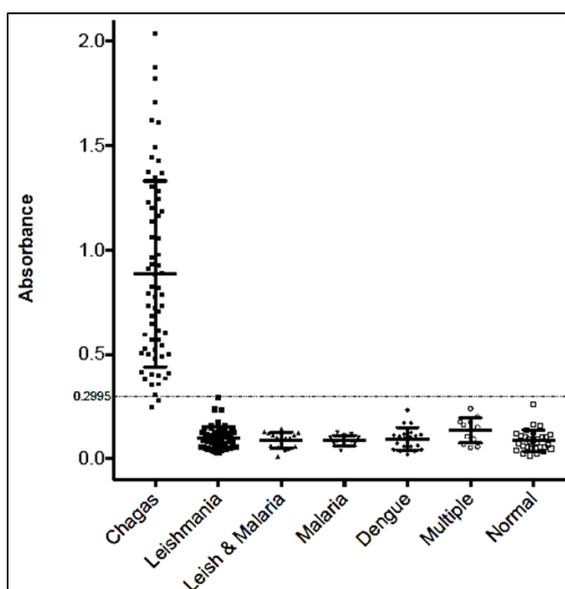
A Figura 42 ilustra que a nova purificação de PlatCruzi apresentou um desempenho satisfatório, sensibilidade e especificidade de 100%, perante as 65

amostras sorológicas de DChc e 141 amostras controles (outras infecções ou sem alguma infecção).



**Figura 42 – Detecção de IgG anti-*T. cruzi* contra PlatCruzi.** Fração 18: 330 µg/mL. Microplacas sensibilizadas com 500 ng da proteína por poço. Amostras sorológicas: MA, CE, SE, PB (LACENS) e do município de Barcelos (AM). Gráfico gerado pelo *GraphPad Prism v 7.0*, para *MacOx*.

As mesmas amostras sorológicas foram usadas nos ensaios com a variante PlatCruzi Δ5 (Figura 43), que também apresentou uma especificidade de 100%, mas diferente de PlatCruzi, a sensibilidade foi de 96,88, que pode ser devido a mudança na conformação da estrutura proteica após a retirada desse epítipo.



**Figura 43 – Avaliação da reatividade dos soros dos LACENS e de Barcelos com a PlatCruzi Δ5.** A fração 16 (268 µg/mL) da proteína purificada foi utilizada no ELISA. Microplacas sensibilizadas com 500 ng da proteína por poço. Amostras sorológicas: MA, CE, SE, PB (LACENS) e do município de Barcelos (AM). Gráfico gerado pelo *GraphPad Prism v 7.0*, para *MacOx*.

### 4.3 Caracterização das amostras sorológicas

Como descrito em material e métodos, os soros obtidos dos LACENs (CE, MA, PB, SE) e de Barcelos (AM), foram previamente retestados e no caso de Barcelos testados para infecção crônica por *T. cruzi* através das metodologias de IFI (*In-house*) e ELISA (Chagatest ELISA recombinante v. 3.0, Wiener Lab., Argentina).

Foram obtidos alguns resultados discordantes entre os testes sorológicos (IFI e *Kit* comercial de ELISA) e os gerados por PlatCruzi, PlatCruzi Δ5, PlatCruzi V2 (Tabela 14).

Além disso, os ensaios sorológicos apresentaram resultados inconclusivos, ou seja, que não tiveram concordância entre os dois testes, que podem ser visualizados na Tabela 15, a qual também apresenta os dados obtidos das três quiméricas do estudo perante aos mesmos soros. Alguns resultados de IFI foram denominados de *borderline*, por estarem no ponto de corte (*cutoff*).

Cabe destacar que as amostras sorológicas que tiveram resultados inconclusivos ou tiveram dois resultados negativos nos testes confirmatórios (IFI e ELISA) foram retirados das análises estatísticas e dos cálculos de sensibilidade e especificidade.

**Tabela 14 - Resultados divergentes entre os testes sorológicos e as proteínas quiméricas.**

SOROS	IFI	ELISA	PLATCRUZI	PLATCRUZI Δ5	PLATCRUZI V2
BAR 42	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO	X
6L-MA	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	X
5C-PB	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO

BAR – Barcelos, L – Leishmaniose, C – Doença de Chagas.

Nenhuma das amostras sorológicas do estudo apresentaram coinfeções ativas no momento da coleta, porém no caso dos soros de Barcelos, algumas pessoas apresentaram outras infecções além de DChc, de acordo com os dados dos formulários previamente preenchidos de cada participante. Resultando em amostras sorológicas com anticorpos IgG para mais de uma infecção.

A amostra sorológica proveniente do LACEN do estado do Ceará, previamente diagnosticado com leishmaniose visceral (1L-CE), teve resultado duplo positivo para

doença de Chagas nos testes sorológicos, porém foi removido das análises por ser co-infectado com HIV. Já duas amostras diagnosticadas com infecção crônica para *T. cruzi* também pelo LACEN do Ceará (1C-CE e 2C-CE), não tiveram seus resultados confirmados pelas ambas técnicas de diagnóstico sorológico empregadas (IFI e ELISA), e foram retiradas das análises.

Baseado nos resultados confirmatórios dos testes sorológicos, as amostras sorológicas utilizadas nos ensaios imunoenzimáticos no estudo foram no total de 76 de DChc e 140 como controles, incluindo amostras com outras infecções (leishmaniose, dengue). Além disso, também foram utilizados como controles soros de indivíduos sem presença de infecção (24 amostras).

No total de 17 amostras sorológicas da doença de Chagas enviadas pelo LACEN do Maranhão, 12 foram de DCha e 5 de DChc. Foi empregado o método de ELISA para a detecção de anticorpos anti- *T. cruzi* dos isotipos IgM e IgG contra as proteínas quiméricas (PlatCruzi e PlatCruzi  $\Delta$ 5), porém não tiveram o desempenho esperado. Apresentou ausência de detecção de IgM nos 12 soros e apenas 4 amostras foi possível a detecção de anticorpo IgG específico da infecção. Por essa razão os soros de DCha não constam nas análises de ELISA desta investigação, indicando que essas proteínas quiméricas são específicas para o diagnóstico da doença de Chagas crônica.

**Tabela 15 - Resultados inconclusivos das amostras sorológicas do estudo.**

SOROS	IFI	ELISA	PLATCRUZI	PLATCRUZI Δ5	PLATCRUZI V2
BAR 62	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
BAR 72	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
BAR 261	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	X
BAR 273	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
BAR 274	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
3L-PB	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	X
4L-PB	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	X
5L-PB	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	X
9L-PB	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	X
2L-SE	<i>BORDERLINE</i>	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	X
7L-SE	<i>BORDERLINE</i>	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	X
9L-SE	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	X
10L-SE	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	X
1L-MA	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	X
3L-MA	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	X
4L-MA	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	X
5L-MA	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	X
7L-MA	<i>BORDERLINE</i>	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	X
8L-MA	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	X
11L-MA	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	X
14L-MA	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	X
1D-CE	<i>BORDERLINE</i>	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	X
4C-PB	<i>BORDERLINE</i>	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
7C-PB	<i>BORDERLINE</i>	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
5C-CE	<i>BORDERLINE</i>	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
8C-CE	<i>BORDERLINE</i>	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	X
16C-CE	<i>BORDERLINE</i>	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	X
3C-MA	<i>BORDERLINE</i>	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
4C-MA	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
6C-MA	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	X

*Borderline* – resultado na faixa do *cutoff*. (X) Análise não realizada. *Cutoff*: IFI – 1:40; ELISA (KIT comercial) – 0,342 (DO); ELISA (PlatCruzi) – 0,2635 (DO); ELISA (PlatCruzi Δ5) – 0,2915 (DO); ELISA (PlatCruzi V2) – 0,2598 (DO). BAR – Barcelos, L – leishmaniose, C – Chagas. Amostras de casos suspeitos para DChc de Barcelos: BAR 72, 273 e 274. Amostras preditas com outras infecções de Barcelos: BAR 62 e 261.

#### 4.4 PlatCruzi V2

No intuito de obter melhores desempenhos em ensaios imunológicos, foi criada a segunda versão da proteína quimérica, denominada de PlatCruzi V2, também apresentando 10 epítopos específicos de *T. cruzi*, com modificações na parte estrutural, com inserção de *linkers*, substituições de 3 epítopos e redirecionamento do

epítipo TcE – Ep4 para a parte final da proteína, conforme detalhado nas Figuras 49, 50 e 52. A sua sequência nucleotídica foi sintetizada utilizando o *gBlocks Gene Fragments* (IDT, *Integrated DNA Technologies*, EUA).

A Tabela 16 descreve os 10 epítipos inseridos na segunda versão da plataforma, onde foram inseridos os epítipos dos antígenos TSSA (posição 7), SAPA (posição 2) e o peptídeo 3973 presente na proteína TcCA-2 (posição 5). O epítipo de TcE (TcEp4) teve sua posição alterada, foi removido da posição 3 e realocado na posição 10 (10.1) da nova plataforma. O epítipo CRA foi mantido na posição final da PlatCruzi V2 (10.2). A explicação para essa alteração se deve principalmente ao seu posicionamento estar localizado no centro da estrutura de barril- $\beta$  de plataforma, o que poderia estar dificultando o seu reconhecimento pelos anticorpos.

**Tabela 16 - Caracterização e posicionamento dos epítipos de *T. cruzi* na PlatCruzi V2.**

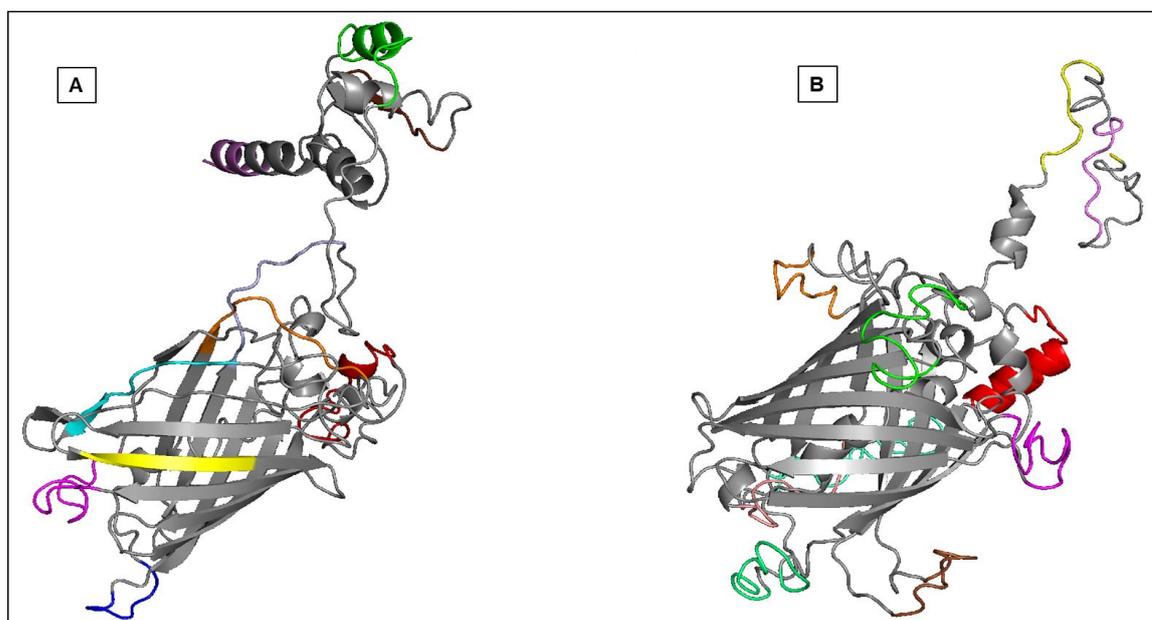
Posições na Plataforma	Sequências dos Epítipos	Antígenos ou Peptídeos	Características
1	KFAELLEQQKNAQFPGK	KMP11	Proteína associada ao citoesqueleto
2	DSSAHSTPSTPA	SAPA	Trans-sialidades
4	GDKPSPFGQAAAADK	PEP-2	Peptídeo sintético - sequência corresponde a domínios repetidos de antígenos de <i>T. cruzi</i>
5	FGQAAAGDKPS	3973 (TcCA-2)	Proteína de superfície de tripomastigota
6	AEPKPAEPKS	TcD – 2	Proteína de tripomastigota
7	PPSGTENKPATGGSGTSWK	TSSA	Mucina de tripomastigota da família TS-símile
8	GTSEEGSRGGSSMPS	TcLo 1.2	Multiepítipo
9	SPFGQAAAGDK	B13	Proteína de superfície de tripomastigota
10.1	KAAIAPA	TcE	Proteína ribossomal
10.2	KQRAAEATK	CRA	Antígeno citoplasmático

Como realizado em PlatCruzi, também foram realizadas modelagem tridimensional *Threading* (Figura 44), peptídeo sinal (Tabela 17), peso molecular (Tabela 17) e ponto isoelétrico (Tabela 17).

**Tabela 17 - Análises de peptídeo sinal, ponto isoelétrico e peso molecular de PlatCruzi V2**

	Peso Molecular (ProtParam)	Ponto Isoelétrico (ProtParam)	Peptídeo Sinal (SignalP)
PlatCruzi V2	45,07 kDa	6,77	Não

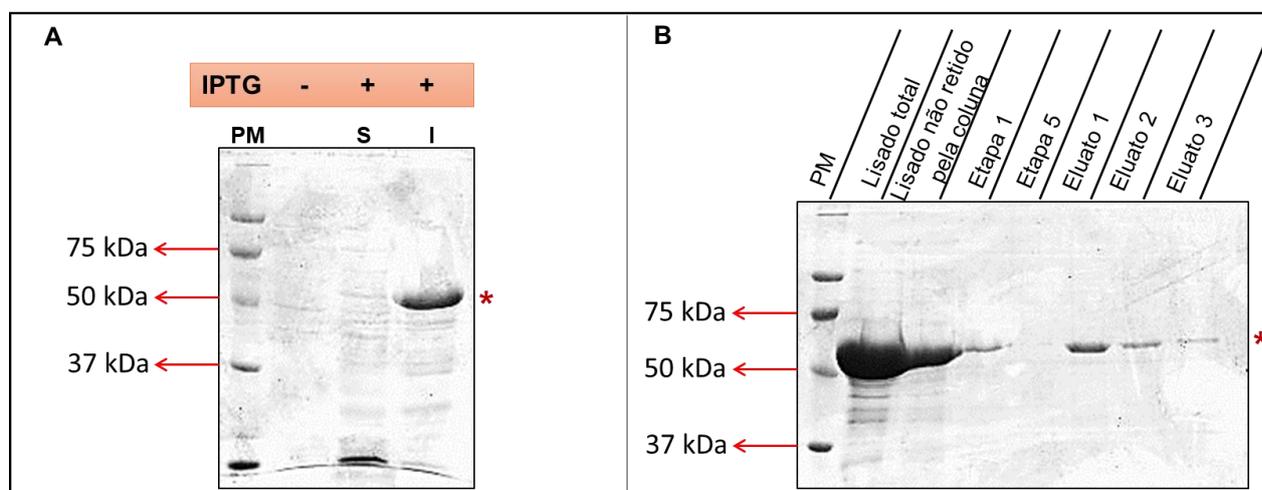
Observando as análises de modelagem das estruturas terciárias de PlatCruzi e PlatCruzi V2 (Figura 44 A e Figura 44 B) da proteína, torna-se nítida as possíveis diferenças conformacionais entre as duas plataformas, onde a nova versão, de acordo com a modelagem, apresenta todos os epítomos na superfície da proteína núcleo, além disso foram adicionados *linkers* que viabilizam o isolamento de cada determinante antigênico inserido, facilitando a detecção pelos anticorpos. O que pode acarretar no aumento da sensibilidade nos ensaios enzimáticos.



**Figura 44 – Modelos das estruturas tridimensionais de PlatCruzi (A) e PlatCruzi V2 (B).** As cores em destaque representam os epítomos inseridos nas duas plataformas. Vermelho: KMP11; azul escuro: TcE (posição 2); amarelo: TcE (posição 3 e posição 10.1); magenta: PEP-2; azul claro: CRA (posição 5); laranja: TcD-2; lilás: TcD-1; verde: TcLo1.2; marrom: B13; violeta: CRA (posição 10); verde ciano: TSSA; azul turquesa: SAPA; salmão: 3973 (TcCA-2). Modelo gerado pelo algoritmo I-TASSER.

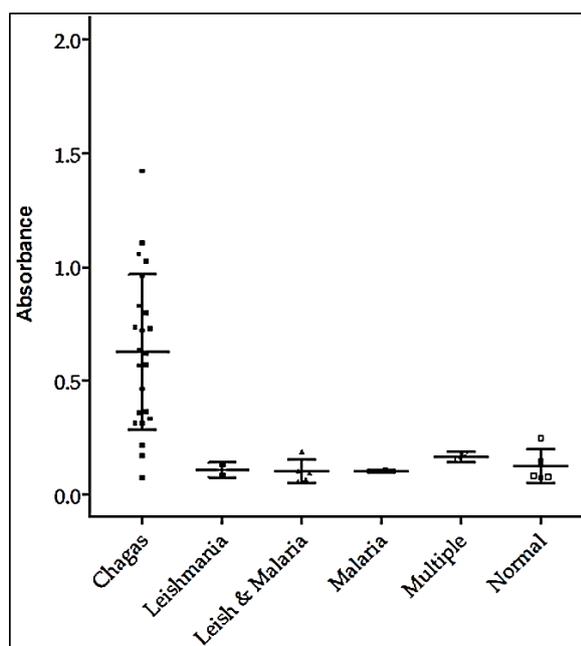
A nova quimera após ter as suas sequências nucleotídicas sintetizadas pela IDT, seguiu para a clonagem em *E. coli* (DH5- $\alpha$ ) usando o vetor de expressão pET-28a, expressão proteica em 50 mL de cultura, lise celular através do reagente *CellLytic*

B 0,5X (Figura 45 A) e purificação em coluna com poli-histidina, *Nickel - Affinity Gel*® (SIGMA-ALDRICH), (Figura 45 B).



**Figura 45 - Análise por SDS-PAGE 11% das etapas de expressão e purificação de PlatCruzi V2.** (A) Imagem do gel de poliacrilamida da expressão proteica. PM - Marcador de peso molecular *Precision Plus Protein Unstained Standard* (Bio-Rad). S - Fração solúvel. I - Fração insolúvel. (B) Imagem obtida da purificação por *Nickel - Affinity Gel* (SIGMA-ALDRICH®). PM - Marcador de peso molecular *Precision Plus Protein Unstained Standard* (Bio-Rad). Lisado total - Antes de passar pela resina e solubilizado em tampão com ureia 8M, pH 8,0. (\*) Tamanho esperado de PlatCruzi V2 de 45,07 kDa. Etapas 1 e 5 - etapas de lavagem. Eluato 1 - 302 µg/mL. Eluato 2 - 298 µg/mL. Eluato 3 - 284 µg/mL.

Foram realizados ensaios iniciais da detecção da segunda versão da proteína quimérica (PlatCruzi V2) perante a alguns dos soros obtidos no estudo (Figura 46). Os resultados indicaram que a segunda versão da plataforma é específica para a infecção por *T. cruzi*, porém não teve alta reatividade em alguns soros analisados de doença de Chagas crônica. Como o número soros analisados foi muito inferior aos das outras quimeras, optou-se por não realizar a análise de curva ROC e consequentemente não foram obtidos os valores de ponto de corte (*cutoff*).



**Figura 46 - Reatividade de soros de DChc frente a PlatCruzi V2.** O eluato 1 (302 µg/mL) da proteína purificada foi utilizada no ELISA. Amostras sorológicas: MA (6), CE (4), PB (11) e do município de Barcelos - AM (24). Gráfico gerado pelo *GraphPad Prism v 7.0*, para *MacOx*.

#### 4.5 Detecção das proteínas quiméricas nas diferentes titulações dos soros

Foi realizado um segundo ensaio testando as diferentes titulações (1:20, 1:50 e 1:100) de algumas amostras sorológicas, essas titulações são normalmente utilizadas pelos testes sorológicos de ELISA comercializados, para averiguar as possíveis diferenças de reatividades nas diferentes concentrações dos anticorpos primários, entre as infecções de *T. cruzi* e *Leishmania spp.* (leishmaniose visceral e cutânea). As amostras de DChc usadas foram: 9817 (controle positivo utilizado em todos os ensaios), 15C-PB, 3C-MA, 2C-SE, 12C-SE, 16C-SE, BAR 82, e os soros de leishmaniose foram: BAR 207, 4L-MA, 9L-MA, 10L-SE, 5L-PB, 22LV, os poços da microplaca de ELISA foram sensibilizados em duplicada com proteínas quiméricas (PlatCruzi, PlatCruzi Δ5 e PlatCruzi V2) e também simultaneamente com as duas plataformas, PlatCruzi e PlatCruzi V2 (Figura 47).

Os resultados gerados mostram a reatividade esperada nas amostras sorológicas de DChc e leishmaniose, com exceção de 9L-MA quando avaliados com PlatCruzi e PlatCruzi Δ5, onde a reatividade variou de acordo com as titulações, se considerado o resultado da titulação 1:20, acarretaria em falso positivo. Tendo em vista a diminuição de resultados falso-positivos e falso-egativos, a titulação 1:100 apresentou as melhores reatividades (Figura 47).

Além disso, pode-se notar nos soros de DChc que apresentam baixa positividade (PB, MA) uma variação na detecção de anticorpo IgG de acordo com as diferentes titulações, padrão encontrado tanto nas três proteínas como em PlatCruzi & PlatCruzi V2.

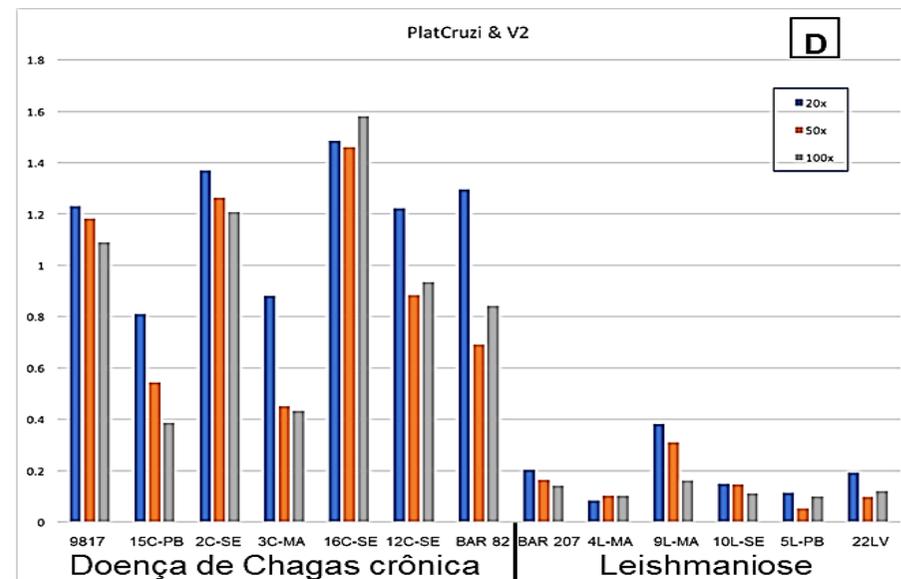
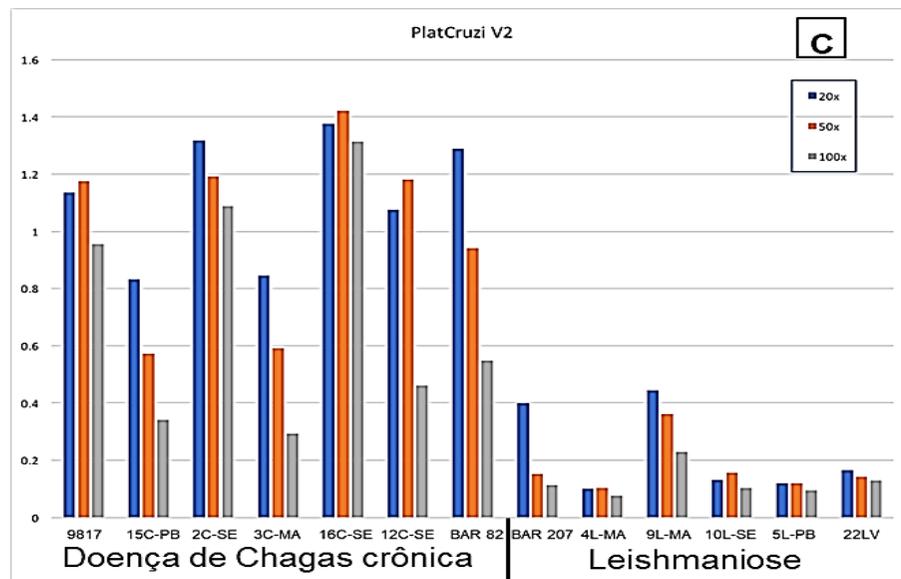
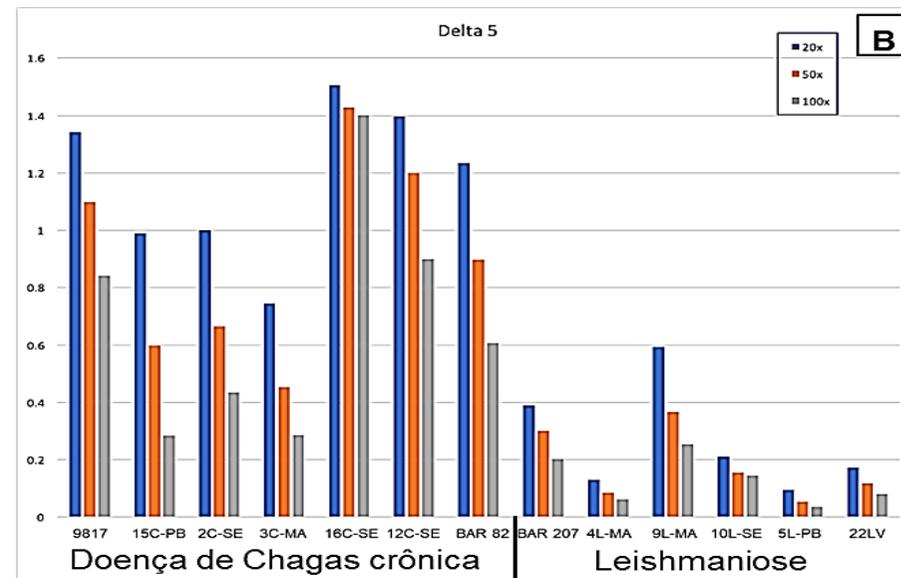
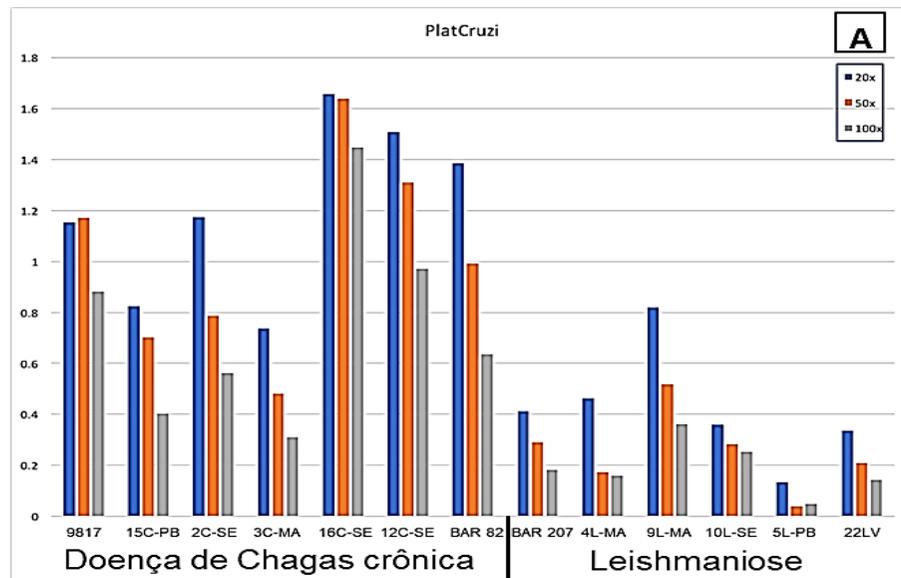


Figura 47 - Detecção de anticorpos da classe IgG em diferentes titulações de soros de DChc e leishmaniose contra as proteínas quiméricas.

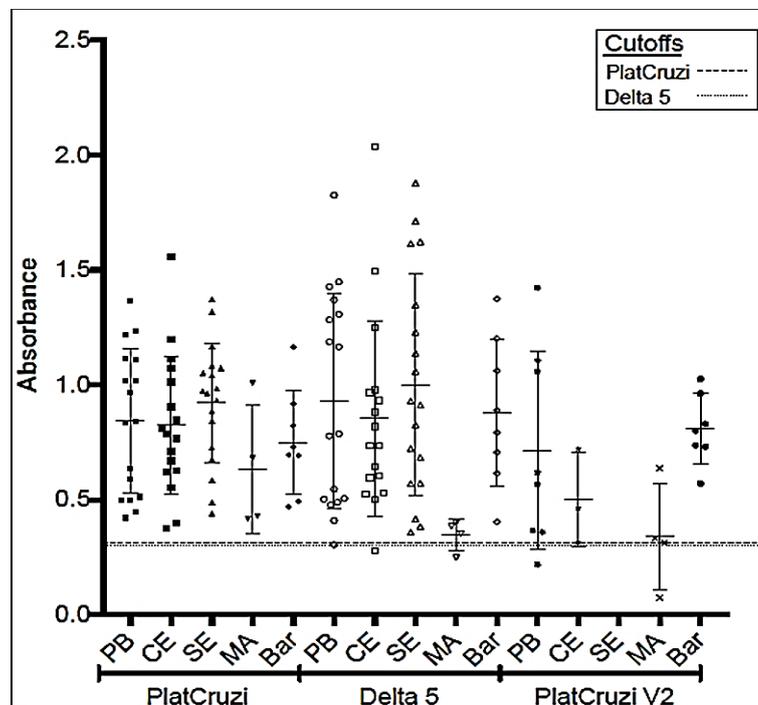
#### 4.6 Desempenho das proteínas quiméricas nas diferentes regiões

Foi realizada uma comparação da reatividade dos soros de cada estado do estudo frente a cada proteína quimérica para avaliar as diferenças de desempenho. As amostras sorológicas utilizadas foram as mesmas dos outros ensaios de ELISA.

No resultado global, observou-se a alta detecção de anticorpos anti-*Trypanosoma cruzi* da classe IgG contra PlatCruzi, em todas as regiões das amostras sorológicas da análise (Figura 48).

PlatCruzi  $\Delta 5$  também apresentou boa detecção de anticorpos nas diferentes regiões. Em um olhar mais direcionado, nota-se que a reatividade de algumas amostras sorológicas foi maior com o emprego desta quimera variante de PlatCruzi (Figura 48).

A segunda versão da Plataforma Cruzi foi avaliada diante poucas amostras sorológicas do estudo e até a finalização dessa tese, não apresentou o mesmo desempenho de PlatCruzi. Pôde-se notar uma melhor performance desta quimera para o município de Barcelos (AM), em relação aos resultados apresentados com as outras duas proteínas, exceto para uma amostra sorológica desta região (Figura 48).



**Figura 48 - Desempenho de cada proteína quimérica frente ao painel de soros de pacientes obtidos de diferentes Estados brasileiros.** Quantitativo de amostras sorológicas analisadas: PlatCruzi e PlatCruzi  $\Delta 5$  – PB: 17, CE:17; SE: 17, MA: 4, BAR: 8; PlatCruzi V2: PB: 8, CE: 3, SE: 0, MA: 4, BAR: 7.

#### 4.7 Análise estatística

A partir dos resultados das leituras de ELISA determinados em densidade óptica (DO) foram realizadas as construções dos gráficos, conforme descrito anteriormente, subitem 3.2.4. A partir desses resultados, foram realizadas análises estatísticas através do programa *GraphPad Prism v.7.0*, para *MacOx* (*GraphPad Software Inc.*, EUA).

Todos os experimentos com o emprego de ELISA tiveram as amostras analisadas em duplicata e o ponto de corte (*cutoff*) foi determinado através da curva ROC (Greiner et al., 2000), que avalia a acurácia do teste. Além de serem avaliados os valores de sensibilidade, especificidade, área, erro padrão, intervalo de confiança de 95% (IC 95%) e valor de p (Tabela 18). Para a realização dos testes estatísticos foram retiradas as amostras que apresentaram resultados do reteste inconclusivos ou duplo negativos.

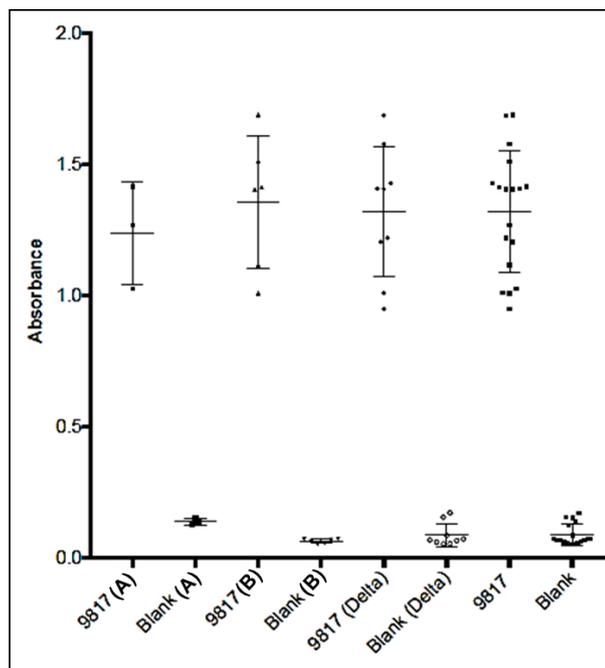
**Tabela 18 - Análises estatísticas realizadas pelo *GraphPad Prism v. 7.0*.  
Com Exclusões**

	<b>PlatCruzi (A)</b>	<b>PlatCruzi (B)</b>	<b>PlatCruzi Δ5 (B)</b>
<b>Especificidade</b>	98,91	100	100
<b>Sensibilidade</b>	81,36	100	96,88
<b>Cutoff</b>	0,5138	0,316	0,2995
<b>Área</b>	0,9857	1	0,9997
<b>Erro Padrão</b>	0,01251	0	0,0003975
<b>IC 95%</b>	0,9612 a 1,01	1 a 1	0,9989 a 1
<b>Valor de p</b>	<0.0001	<0.0001	<0.0001
<b>DChc</b>	58	64	64
<b>Controles</b>	90	140	140

(A) PlatCruzi purificada através do primeiro protocolo por cromatografia de afinidade. (B) Emprego do segundo protocolo de purificação por coluna de afinidade. Com exclusões: exclusões dos soros com resultados negativos ou indeterminados nos testes confirmatórios.

Uma análise com os controles, positivo para infecção crônica por *T. cruzi* (9817 – soro de paciente com cardiopatia chagásica) e controle do anticorpo secundário (*Blank*), usados em todas as reações de ELISA com as proteínas quiméricas, foi realizada e ilustrada na Figura 49. Os resultados dos valores dos desvios padrões de PlatCruzi (A): 9817 – 0,196 e *Blank* – 0,01351; PlatCruzi (B): 9817 – 0,2525 e *Blank* – 0,008772; PlatCruzi Δ5 (Delta): 9817 – 0,2462 e *Blank* – 0,04425, mostrando a homogeneidade das amostras usadas como controles dos ensaios. A Figura 49 mostra uma sutil diferença entre os controles, na detecção de IgG anti-*T. cruzi*, perante

a PlatCruzi (A) e PlatCruzi (B) e PlatCruzi  $\Delta 5$ . Onde a diferença entre (A) e (B) estaria na forma de purificação realizada através do sistema *Äktapurifier*.

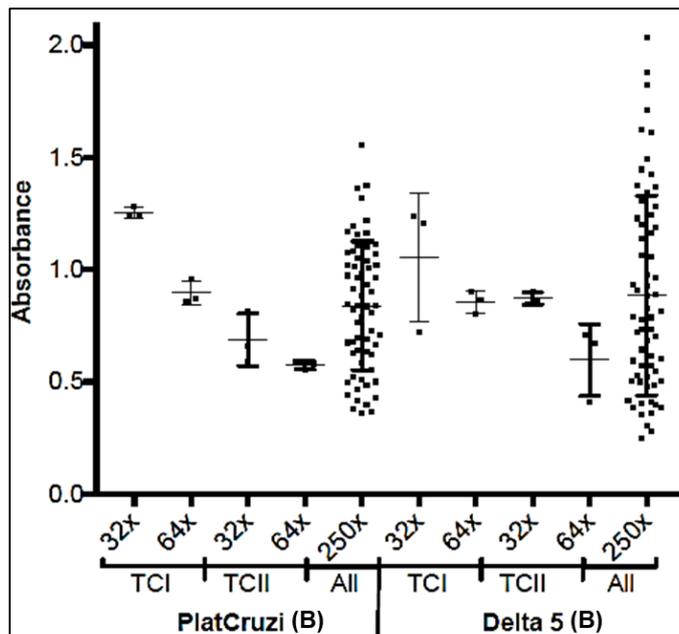


**Figura 49 - Detecção de IgG anti-*T. cruzi* nas amostras controles.** (A) PlatCruzi purificada através do primeiro protocolo por cromatografia de afinidade. (B) Emprego do segundo protocolo de purificação por coluna de afinidade. *Blank*: Branco, controle de detecção do anticorpo secundário. 9817 e *Blank* – desvios padrões de todas as amostras de cada controle.

#### 4.8 Padrões Internacionais de Referências Biológicas da OMS

A análise dos *pools* de soros liofilizados provenientes da OMS, serve como uma ferramenta de controle de qualidade dos ensaios, através da comparação de resultados, além de ser possível avaliar o desempenho das proteínas quiméricas perante aos soros de diferentes regiões endêmicas, como descrito em material e métodos, abrangendo uma maior diversidade das cepas de *T. cruzi* circulantes.

A Figura 50 mostra os valores obtidos das médias das densidades óticas (DO) de cada *pool*, diante de duas diluições (32x e 64x) com as duas proteínas recombinantes (PlatCruzi e PlatCruzi  $\Delta 5$ ). As amostras foram aplicadas em triplicata na microplaca de ELISA em triplicata e o gráfico foi gerado pelo programa *GraphPad Prism v.7.0* (MacOX).



**Figura 50 - Reatividade perante os *pools* dos Padrões Internacionais de Referências Biológicas da OMS.** Tci: IS 09/188. Tcii: 09/186. All: Todas as amostras positivas para infecção por *T. cruzi* do estudo. Delta 5: PlatCruzi  $\Delta$ 5. PlatCruzi e PlatCruzi  $\Delta$ 5 foram purificadas através da segunda metodologia descrita por coluna de afinidade, sistema Äktapurifier.

Além disso, foi realizada a normalização dos dados através do cálculo do índice de reatividade (IR), (Goubau et al., 1997), com a finalidade de comparar e unificar os resultados de alguns testes de diagnóstico sorológico comercializados, metodologia de ELISA e CLIA, com as proteínas quiméricas do estudo, perante os Padrões Internacionais de Referências Biológicas da OMS (Otani et al., 2011), (Tabela 19).

O IR baseia-se no cálculo: densidade óptica da amostra/*Cutoff*, onde são consideradas positivas amostras com valores superiores a um (Goubau et al., 1997).

Os resultados obtidos apontaram reatividade positiva ( $IR > 1$ ) frente aos dois *pools* de soros da OMS, nas diluições de 32x e 64x, com relação as proteínas quiméricas: PlatCruzi (A), PlatCruzi (B) e PlatCruzi  $\Delta$ 5 (B), (Tabela 19). Em contraste, os resultados dos *kits* analisados pelo grupo da OMS, apresentaram poucas reatividades positivas,  $IR < 1$ , perante as mesmas diluições (Tabela 19).

**Tabela 19 - Comportamento dos testes sorológicos (ELISA e CLIA) e das proteínas quiméricas frente aos Padrões Internacionais de Referências Biológicas da OMS.**

Amostras	Diluições	Gold	Bioschile	Biokit	D-MED	Bio-Mérieux	Wiener 4.0	Abbott (CLIA)	PlatCruzi (A)	PlatCruzi (B)	PlatCruzi $\Delta 5$ (B)
TCI IS 09/188	32x	1,64	1,0	0,2	1,0	0,2	0,9	2,1	1,7	3,8	3,2
	64x	0,68	0,8	0,2	0,5	0,1	0,3	0,8	1,2	2,7	2,6
TCII IS 09/186	32x	0,5	0,4	0,2	0,4	0,1	0,7	1,1	1,5	2	2,6
	64x	0,4	0,4	0,2	0,4	0	0,3	0,5	1,1	1,6	1,7

Valores na tabela do índice de reatividade (DO/CO). Positivos > 1,0. Não reagentes < 1,0. Os IRs obtidos dos testes comercializados foram retirados de Sáez-Alquezar, 2015. Doença de Chagas: diagnóstico, epidemiologia e CQ. 42º Congresso Brasileiro de Análises Clínicas. Destaque em verde para os valores positivos de IR.

## 5 DISCUSSÃO

As regiões norte e nordeste do Brasil têm apresentado maior número de casos confirmados de DCha do país, respectivamente, 91,1% e 4,6%, sendo a transmissão, oral foi a mais frequente, com percentual de 68,9% entre os anos de 2000 a 2013, demonstrando que mesmo após a interrupção da transmissão vetorial intradomiciliar, a doença continua se difundindo pelo país (Brasil, 2015c). Além disso, a infecção por *T. cruzi* se expandiu devido as migrações, das áreas endêmicas para não endêmicas, que acarretam no aumento do número de casos, principalmente através da transmissão por transfusão de sangue e através da transmissão sexual (Coura & Viñas, 2010). Nesse cenário, é necessário o diagnóstico precoce da doença visando o início do tratamento para a cura ou o melhor prognóstico da pessoa afetada. Isso se deve ao fato de que o tratamento da doença na fase crônica ainda não é muito eficaz, e a maior eficiência no tratamento estaria associada a fase inicial ou fase aguda da doença (Bern et al., 2007). É importante enfatizar que as pessoas que vivem em áreas endêmicas são as mais afetadas pela doença e são aquelas que estão em condições precárias de saúde pública (Bergquist & Whittaker, 2012).

### 5.1 Amostras sorológicas

Neste estudo foram avaliadas 64 amostras sorológicas de DChc e 140 amostras controles. Para a realização das análises da curva ROC, sensibilidade, especificidade, IC 95%, área, erro padrão e valor de p das proteínas quiméricas (Figura 42, Figura 43, Figura 51, Tabela 17), esta investigação usou como critério de exclusão, todas as amostras sorológicas (LACENs e Barcelos - AM) com ausência de anticorpos *anti-T. cruzi* ou aquelas que apresentaram resultados inconclusivos nos testes sorológicos: 1. IFI *in-house*, com a utilização da cepa Y e anticorpo IgG fabricado por Bio-Manguinhos e 2. EIE através do Chagatest ELISA recombinante v. 3.0 (Wiener Lab., Argentina). Cabe destacar que os soros provenientes do Laboratório de Bioquímica de Proteínas e Peptídeos (CDTS/FIOCRUZ, 13 de DChc, 10 de leishmaniose, 7 de febre amarela, 9 de dengue), amostras com infecção ativa de leishmaniose visceral oriundas do LIPMED (14) e as amostras de pessoas sem infecção da UFRJ (24), não foram retestadas pelos dois métodos sorológicos.

Nos soros provenientes do município de Barcelos, 20 amostras eram de pessoas com suspeita de DChc, baseado em relatos e sintomas clínicos, e 46 pessoas relataram ter desenvolvido outras infecções ao longo da vida, como leishmaniose, malária, dengue, tuberculose ou até mesmo mais de uma destas infecções. Os dados de sintomas e de outras possíveis infecções desenvolvidas, foram obtidos através de uma ficha previamente preenchida por cada participante. Como não havia sido realizado um diagnóstico sorológico prévio para a doença de Chagas nesse grupo do estudo, que são trabalhadores rurais de extrativismo da piaçaba e seus familiares, todas as amostras foram avaliadas, através dos dois métodos de diagnóstico sorológicos empregados, IFI *in-house* e Chagatest ELISA Rec. v. 3.0 (Laboratório Wiener, Argentina), para posterior utilização nas análises deste estudo.

No total de 85 amostras reavaliadas dos LACENs e casos suspeitos (Barcelos -AM) de infecção por *T. cruzi*, 12 (14,1%) apresentaram resultados inconclusivos (Tabela 15) e 6 (7,1%) foram negativos nos dois ensaios. Destas seis amostras que resultaram em duplo negativo nos testes sorológicos, duas apresentaram resultados divergentes aos obtidos com as proteínas quiméricas (Tabela 14). Já das 99 amostras sorológicas de outras infecções (LACENs e Barcelos - AM), 14 (14,1%) foram positivas para pelo menos um dos ensaios e 3 (3,03%) tiveram positividade para DChc em ambos os testes (Tabela 20).

**Tabela 20 Presença de IgG anti-*T. cruzi* nas amostras com outras infecções em pelo menos um dos testes sorológicos.**

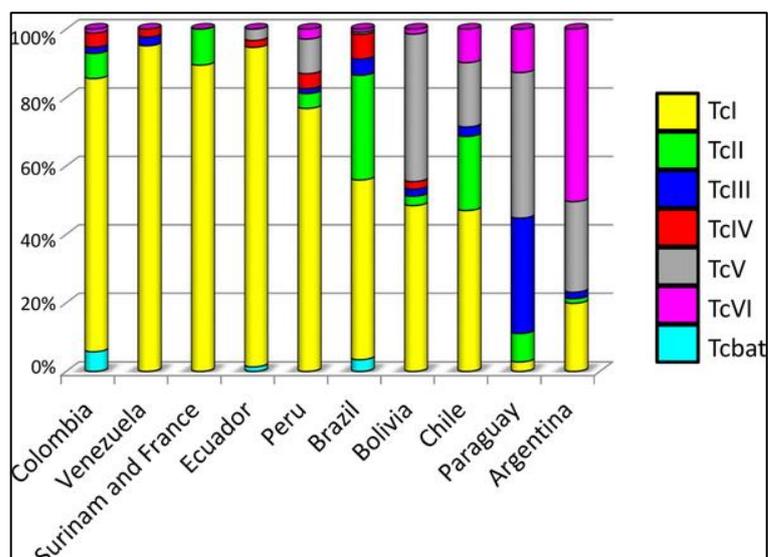
AMOSTRAS SOROLÓGICAS COM OUTRAS INFECÇÕES		
CÓDIGOS	IFI - <i>in-house</i>	Chagatest ELISA Recombinante v.3.0
1L-PB	REAGENTE	POSITIVO
3L-PB	REAGENTE	NEGATIVO
4L-PB	REAGENTE	NEGATIVO
5L-PB	REAGENTE	NEGATIVO
9L-PB	REAGENTE	NEGATIVO
4L-SE	REAGENTE	POSITIVO
9L-SE	REAGENTE	NEGATIVO
10L-SE	REAGENTE	NEGATIVO
1L-MA	REAGENTE	NEGATIVO
3L-MA	REAGENTE	NEGATIVO
4L-MA	REAGENTE	NEGATIVO
5L-MA	REAGENTE	NEGATIVO
6L-MA	REAGENTE	POSITIVO
8L-MA	REAGENTE	NEGATIVO
11L-MA	REAGENTE	NEGATIVO
14L-MA	NÃO REAGENTE	POSITIVO
BAR 62	REAGENTE	NEGATIVO

(L) soros de pacientes diagnosticados pelos LACENs com infecção por leishmaniose. Destaque em vermelho: positividade para infecção por *T. cruzi* encontrados em um dos ensaios ou ambos. BAR 62: considerado como inconclusivo.

Com relação aos resultados sorológicos obtidos para a infecção por *T. cruzi*, pôde-se observar que o indivíduo referente a amostra BAR 62, preconizada como controle negativo (outras infecções), apresentou reatividade para o anticorpo da classe IgG anti- *T. cruzi* no ensaio de IFI *in-house*, gerando resultado conflitante ou inconclusivo (Tabela 15). Sabe-se que esta pessoa além de ter apresentado positividade para DChc em um dos testes, também já teve malária e dengue (infecções não ativas), baseadas nas informações do formulário previamente preenchido.

Sabe-se que as DTUs circulantes da região amazônica brasileira são a TcI, TcII e TcIII (Marcili et al., 2009b; Zingales et al., 2012; Monteiro et al., 2010; Monteiro et al., 2012, Monteiro et al., 2013; Brenière et al., 2016). Já no nordeste do país são encontradas as DTUs TcI, TcII, TcIII ou TcIV em *Triatoma brasiliensis* (Brenière et al., 2016) e o Estado de Sergipe foi descrito com a predominância de TcII em humanos (Carranza et al., 2009; Zingales et al., 1998). Nos demais Estados brasileiros predominam a circulação das cepas da DTU TcII (Zingales et al., 2012; Messenger et al., 2015; Brenière et al., 2016).

Com relação as prováveis cepas encontradas nas regiões provenientes dos Padrões Internacionais de Referências Biológicas (IS 09/188 e IS 09/186), foi relatada maior incidência DTU TcI no México e no Chile, foram detectadas cepas das DTUs TcI, TcII, TcIII, TcV e TcVI (Figura 51), (Zingales et al., 2012; Messenger et al., 2015; Brenière et al., 2016). Além disso, a circulação da recente DTU descrita, Tcbat, que foi subestimada devido à proximidade genética com TcI, foi observada em 12 diferentes espécies de morcegos no Brasil e em uma espécie de triatomíneo (*Triatoma sordida*) no Mato Grosso do Sul (Cavazzana et al., 2010; Cominetti et al., 2014; Ramírez et al., 2014; Lima et al., 2015; Pinto et al., 2015; Brenière et al., 2016). Como não foi possível a identificação das linhagens de *T. cruzi* nos pools sorológicos dos Padrões Internacionais de Referências Biológicas da OMS, sabendo que são abrangentes as regiões do México (IS 09/188), Brasil (IS 09/186) e Chile (IS 09/186), as DTUs circulantes descritas na literatura para essas regiões, também podem estar relacionadas a essas amostras.



**Figura 51** Distribuição das DTUs circulantes de *T. cruzi* na América do Sul. Fonte: Brenière et al., 2016.

Com relação a resposta imunológica, as cepas da DTU TcI pertencentes ao ciclo silvestre de *T. cruzi* são descritas com baixo poder imunológico e conseqüentemente apresentam baixa virulência e patogenicidade em humanos, podendo acarretar em complicações cardíacas, além de maior mortalidade na fase crônica (Viñas et al., 2003; Araujo et al., 2010; Zingales et al., 2012; Monteiro et al., 2013; Santana et al., 2014; Messenger et al., 2015) e as linhagens pertencentes a DTU TcIV foram relatadas apresentando maior virulência comparadas as da DTU TcI, com alto valor de parasitemia, com grande incidência de mortalidade na fase aguda da doença (Monteiro et al., 2013). Além disso, verificou-se que a infecção causada pelas cepas agrupadas na DTU TcI induz a uma alta ativação de monócitos e produção de IL-10, em contrapartida, as da DTU TcII produzem uma menor ativação de monócitos, porém com um maior perfil inflamatório. Esses dados destacam a importância das linhagens de *T. cruzi* no desenvolvimento da resposta imunológica inicial do hospedeiro a infecção, podendo influenciar na progressão clínica da DCh (Magalhães et al., 2015).

A diversidade de parasitos circulantes na bacia amazônica brasileira, está relacionada a presença de muitas doenças endêmicas, onde as mais proeminentes são malária, leishmaniose tegumentar americana, algumas arboviroses, tuberculose, hanseníase, diarreia infecciosa, parasitoses intestinais e outras doenças são encontradas com frequência em outras regiões brasileiras (Coura & Junqueira, 2012).

A variabilidade de infecções presentes na região norte e também no nordeste do país, com picos de endemicidades, pode dificultar a obtenção de um diagnóstico preciso para a doença de Chagas. Com relação as amostras sorológicas provenientes

da localidade de Barcelos (AM), muitas pessoas relataram terem desenvolvido pelo menos uma das doenças endêmicas da região, onde na Tabela 21, constata-se que a população do estudo desenvolveu uma ou mais infecções, o que pode gerar resultados falso-positivos e indeterminados em testes de diagnóstico sorológicos para infecção por *T. cruzi*.

**Tabela 21 - Pessoas que relataram terem desenvolvido mais de uma doença tropical.**

SOROS	LEISHMANIOSE	MALÁRIA	DENGUE	TUBERCULOSE
BAR 21	X	X	X	
BAR 28	X	X	X	
BAR 87	X	X	X	
BAR 100	X	X	X	
BAR 149	X	X	X	
BAR 174		X	X	
BAR 180	X	X	X	
BAR 228		X		X
BAR 230		X		X
BAR 235	X	X	X	

BAR – código para as amostras provenientes de Barcelos.

Em 2017 foram 193.590 casos notificados de malária no Estado do Amazonas (Brasil, 2017). Além disso, em relação as arboviroses, foram relatadas 556 notificações de chikungunya, 692 de zika e 8.190 de dengue. Dados recentes do sistema DATASUS, no mesmo Estado, mostraram que no primeiro mês do ano de 2018, foram relatados 3875 casos de malária causados pelo *Plasmodium vivax* e 417 por *P. falciparum*, onde no município de Manaus foram 838 casos de *P. vivax* e 220 por *P. falciparum*; em Barcelos, 54 por *P. falciparum* e 166 por *P. vivax*; e no município de Santa Isabel do Rio Negro foram 19 casos por *P. falciparum*, 120 por *P. vivax* e 3 casos de infecção com ambos os parasitos (Brasil, 2018); em 2017 foram 193.590 casos notificados de malária (Brasil, 2017). Com relação as arboviroses, em 2017 foram relatadas 556 notificações de chikungunya, 692 de zika e 8.190 de dengue no Estado do Amazonas (Brasil, 2017). Já com relação a leishmaniose tegumentar americana, até início de março de 2018, foram notificados 1049 casos nesse Estado (Brasil, 2018).

Considerando as amostras dos LACENs, foram processados 10 soros por infecção por leishmaniose visceral do estado de Ceará, 10 de Sergipe, 9 da Paraíba

e 14 do Maranhão, dos quais 16 (37,2%) foram reagentes para *T. cruzi* IgG. Das 16 amostras positivas 5 são da Paraíba, 3 de Sergipe, 8 do Maranhão. Uma das possíveis razões para as positivities apresentadas nos ensaios de IFI *in-house* e Chagatest ELISA Rec. v. 3.0, pode ser a circulação de outras doenças parasitárias endêmicas em cada estado, resultando em falso-positivos. Foi relatada a prevalência de casos confirmados de leishmaniose visceral em 2015 nos Estados do Ceará (531), Maranhão (571), Paraíba (40) e Sergipe (51), (SINAN, 2015).

Cabe ressaltar que as amostras de leishmaniose visceral, oriundas dos LACENs, que foram reagentes, em pelo menos um dos testes de diagnóstico, para a DChc (IFI e ELISA, Tabela 20) foram mantidas como controles negativos nos ensaios de ELISA com as proteínas quiméricas, levando em consideração os resultados realizados pelos institutos de cada Estado, as quais tiveram o diagnóstico de leishmaniose visceral. Além disso, essas amostras quando analisadas contra as proteínas quiméricas não apresentaram reatividade aos anticorpos anti-*T. cruzi* (Figura 42, Figura 43 e Figura 46).

No ano de 2014, foram notificados 5 casos de DCha no Estado do Amazonas (SINAN, 2014). Já entre o período de 2017 a janeiro de 2018, dados preliminares da Secretaria de Vigilância apontaram 14 notificações de DCha no Estado do Amazonas, onde 3 foram na cidade de Manaus; 7 do município de Lábrea, e total de 4 casos compreendendo os municípios de Atalaia do Norte, Atuazes, Coari e Maraã (Brasil, 2018). Em dezembro de 2017 foi relatado um surto de doença de Chagas, por provável transmissão oral em Manaus e Lábrea. Possíveis casos de transmissão vetorial foram descritos em Atalaia do Norte, Atuazes, Coari e Maraã (Brasil, 2018).

Com relação aos últimos dados de notificação na região nordeste, em 2014 houve apenas um caso notificado e confirmado de DCha; um caso em Sergipe e 6 casos na Paraíba (SINAN, 2014). Em 2015, o Estado da Paraíba apresentou 40 casos notificados de DCha em 2015 (SINAN, 2015). Não há informações disponíveis de registros de casos de DCha pelo SINAN, no Estado do Ceará.

As amostras sorológicas desta investigação oriundas do Estado do Maranhão são de casos de doença de Chagas aguda e crônica dos municípios de Balsas, Humberto de Campos, Santa Rita, São José de Ribamar, São Luís e Turilândia (Tabela 8), sendo esses municípios pertencentes a região da Amazônia Legal do país (IBGE, 2014). Ainda na Tabela 8, pôde-se notar que a faixa etária dos participantes do estudo variou entre 6 a 93 anos, sendo os casos de DCh na infância encontrados nos Estados de Amazonas e Maranhão, por possível transmissão vetorial. As

amostras sorológicas de Barcelos (AM) foram obtidas no ano de 2016, e os anos dos primeiros sintomas obtidos pelos dos LACENs de cada Estado, através da ficha SINAN ou do Sistema GAL, foram: 2012, 2015 e 2017 (Maranhão) e 2015, 2016 (Paraíba e Sergipe). Não há informações do Estado do Ceará.

Os resultados conflitantes obtidos nos ensaios sorológicos também foram relatados em vários testes sorológicos comercializados para DChc, através de alguns estudos multicêntricos, como será descrito no subitem a seguir.

## 5.2 Diagnóstico sorológico

Com a falta de um teste sorológico padrão-ouro a ser utilizado em todas as áreas endêmicas, com 100% de sensibilidade e especificidade, torna-se necessários estudos que avaliem quanto a eficácia dos testes sorológicos comercializados da doença de Chagas, averiguando também quanto a abrangência geográfica.

Como apresentado na introdução, subitem 1.10, com avaliação de alguns testes sorológicos comercializados, onde os resultados de sensibilidade e especificidade apresentados foram inferiores aos preditos pelos fabricantes dos *kits* de diagnóstico para DChc. Este fato também pode ser notado nos resultados sorológicos obtidos nesta investigação com o Chagatest ELISA Rec. v. 3.0 e IFI *in-house*, que utilizou o conjugado IgG humano de Bio-Manguinhos, onde alguns apresentaram divergências com os resultados previamente obtidos pelos LACENs.

Com relação aos soros referentes aos LACENs, todos foram previamente diagnosticados para doença de Chagas, leishmaniose e dengue. Apesar de não ter sido possível obter dados dos resultados sorológicos e nem informações sobre os *kits* de diagnóstico utilizados dessas instituições. Sabe-se que todos esses soros foram reagentes para os anticorpos específicos de cada infecção avaliada. A única informação sobre os testes de diagnóstico realizados foi enviada pelo LACEN do Estado da Paraíba, para a doença de Chagas foram utilizados os testes de IFI de Bio-Manguinhos e *kit* de ELISA da BIOSChile (Test ELISA Chagas III), que utiliza antígenos de epimastigota das cepas Mn e Tulahuen. Os testes de IFI foram descritos por apresentarem variações quanto a especificidade, podendo gerar reatividade cruzada com outros patógenos, principalmente com *Leishmania spp.* e *T. rangeli*. Por esta razão não são recomendados para a triagem sorológica nos bancos de sangue (Otani et al, 2009). O Test ELISA Chagas III foi descrito por Caballero e colaboradores (2007), com alta sensibilidade e especificidade diante do painel sorológico analisado.

Porém, devido a variabilidade gênica encontrada nas diferentes linhagens de *T. cruzi*, o uso de antígenos de extrato do parasito pode acarretar em reatividade cruzada (Umezawa et al., 1996a; Leilby et al., 2000; Umezawa et al., 2003; Kirchhoff et al. 2006; Zarate-Blades et al., 2007; Caballero et al., 2007).

Comparando com os resultados obtidos pelos ensaios confirmatórios realizados com as amostras sorológicas dos LACENs e do município de Barcelos, IFI-*in house* (cepa Y e conjugado IgG de Bio-Manguinhos) e o Chagatest ELISA Recombinante v. 3.0 (Wiener, Argentina), foram encontradas diferenças de reatividades com relação aos dois métodos utilizados (IFI e ELISA), como também entre cada região analisada. Corroborando com outros estudos, foram demonstrados que os testes comercializados nem sempre são capazes de detectar a infecção em indivíduos com baixos níveis de imunoglobulinas (Caballero et al., 2007; Furuchó et al., 2008; Otani et al., 2009; Santos et al., 2012), onde as falhas apresentadas podem ser aperfeiçoadas com a utilização de antígenos específicos identificados e purificados através de técnicas de biotecnologia.

Com relação aos dados sorológicos dos Laboratórios Centrais de Saúde Pública (LACENs), não foi possível a obtenção de informações sobre os *kits* utilizados no diagnóstico pela maioria desses institutos. Sabe-se que no Estado da Paraíba foram utilizados os testes de IFI CHAGAS (Bio-Manguinhos) e o Test ELISA Chagas III (Grupo Bios, Chile), que utiliza antígenos de epimastigota, nos quais podem acarretar em reatividade cruzada com outros parasitos, como relatada pelos estudos de Caballero e colaboradores em 2007 e pelo grupo de Otani em 2009.

Além disso, as diferenças de reatividade encontradas nos *kits* de ELISA comercializados podem ser em virtude das distintas composições e misturas antigênicas de *T. cruzi*. Para confirmar esta hipótese, seriam necessárias informações precisas de cada proteína recombinante e determinante antigênico empregados em cada *kit*, mas estas não se encontram presentes nas bulas fornecidas pelos fabricantes, dificultando este tipo de avaliação. Contudo, sabe-se que os antígenos presentes no Chagatest ELISA Rec. v. 3.0 são: ag1, ag2, ag13, ag30, ag36 e SAPA. O Ag1 teria 97% de similaridade com o antígeno FRA (Camussone et al., 2009). Comparando com os resultados obtidos da análise com o emprego da metodologia de *SPOT-Synthesis Epitope Analysis*, foi possível averiguar que uma das possíveis razões para a reatividade cruzada, encontrada neste teste, seria por conta deste antígeno não conter nenhum determinante antigênico específico para a infecção por

*T. cruzi* (Bottino et al., 2013), apresentando, dessa forma, alta similaridade com o gênero *Leishmania*.

Como o Chagatest ELISA Rec. v. 3.0 foi utilizado como teste confirmatório para as amostras deste estudo, essa pode ser uma das explicações para a ocorrência das positivities encontradas em alguns soros preliminarmente diagnosticados pelos LACENs como leishmaniose visceral e para algumas amostras de Barcelos (AM) com infecções não ativas para outras patologias (Tabela 20), acarretando em reatividade cruzada.

Os resultados dos testes sorológicos apontaram que das 20 amostras de casos suspeitos para infecção pelo parasito de Barcelos (AM), 8 (40%) foram comprovadamente positivos nos dois ensaios, 4 (20%) apresentaram resultados inconclusivos (Tabela 16). Com relação as amostras que eram apenas controles negativos, com presença de outras infecções, 3 (6,5%) apresentaram reatividade ao IgG anti-*T. cruzi* nos dois ensaios e 17 (37%) apenas em um deles, gerando inconclusividade nos resultados (Tabela 20). As amostras que foram identificadas como positivas pelo Chagatest ELISA Rec. v. 3.0, apresentaram valores de DO entre 0,87 a 2,52 e valores de ponto de corte (*Cutoff*) de 0,342 e 0,353.

O estudo publicado por Coura e colaboradores revelou através de questionário aplicado a 482 piaçabeiros e suas famílias entre 2015 e 2016, que 100% dos trabalhadores rurais do município de Barcelos (AM) identificaram o triatomíneo *Rhodnius brethesi* nas fibras de piaçava, 81% dos piçabeiros reconheceram esta espécie em seus domicílios e 79% teriam sido picados pelo vetor até 10 vezes (Coura et al., 2018). Quando analisados os soros dos piçabeiros pelos ensaios sorológicos IFI *in-house* e Chagatest ELISA Rec. v. 3.0, os mesmos testes usados nas amostras sorológicas da nossa investigação, foram detectados apenas 25 (5,2%) de pessoas com anticorpos IgG anti-*T. cruzi*. Além disso, 273 pessoas foram submetidas ao exame de eletrocardiograma, das quais 22% apresentaram complicações cardiovasculares que poderiam ser atribuídas tanto a doença de Chagas quanto a outras doenças cardiovasculares (Coura et al., 2018).

A baixa detecção de IgG anti- *T. cruzi* nas amostras de Barcelos (AM) pelos dois métodos de diagnóstico sorológicos, encontrados nesta investigação e por Coura e colaboradores (2018), pode gerar questionamentos quanto aos resultados positivos da infecção pelo parasito obtidos por esses testes (IFI *in-house* e *kit* de ELISA), principalmente no que tange aos possíveis falso-negativos e aos resultados inconclusivos. Dessa forma, o número de casos positivos pode estar sendo

subestimado, mostrando a fragilidade de se obter um diagnóstico correto e reprodutível, sem um teste padrão-ouro para a DChc. O caso descrito pelo grupo do Coura é um exemplo em que a cardiopatia encontrada em alguns piaçabeiros não era específica para a infecção por *T. cruzi*, o que não coopera para a obtenção de um diagnóstico conclusivo.

Além disso, o emprego de IFI *in-house* também detectou IgG anti-*T. cruzi*, em algumas amostras controles (Tabela 20), como também apresentou resultados indeterminados, cujos valores de DO encontram-se na zona cinza ou *borderline* (Tabela 12), onde não se pode ter certeza do resultado. Essas variações podem ser explicadas, em parte, pelo alto grau de polimorfismo intraespecífico exibido pelo parasito. O que conduz para uma limitação diagnóstica quanto a confiabilidade dos resultados obtidos pelos testes sorológicos atuais devido a ausência de um padrão-ouro para DCh (Furuchó et al., 2008).

Cabe ressaltar que as amostras sorológicas que apresentaram baixa detecção de anticorpos da classe IgG e geraram resultados inconclusivos pelos vários métodos de confirmação não são, em geral, incluídos nos painéis analisados nos ensaios devido ao seu estado final duvidoso. Entretanto, estas amostras sorológicas desafiadoras são cruciais na avaliação das sensibilidades (Otani et al., 2009).

De fato, como pôde ser constatado, o diagnóstico da fase crônica da doença de Chagas não é facilmente alcançado, uma vez que muitas variáveis dificultam a precisão, da real identificação de pessoas infectadas pelo parasito. Nesta fase, a maioria das pessoas infectadas apresentam como característica o fato de serem assintomáticas ao longo da vida e, portanto, ocasionando mais um fator restritivo ao diagnóstico, onde a informação clínica não convém como caráter informativo para a identificação de indivíduos infectados.

### **5.3 Proteínas quiméricas**

Diante a todo panorama do diagnóstico de DChc, torna-se indispensável o investimento e pesquisas de novos alvos, além de novas formas e de metodologias mais rápidas e eficazes, com a fabricação de um teste sorológico que abranja as diversidades genômicas e imunológicas encontradas nas áreas de circulação do parasito, com baixo custo, acessibilidade a qualquer localidade e específicos para a infecção de *T. cruzi*.

Neste âmbito, o atual estudo foi elaborado com o principal objetivo de criar um alvo (*immunomimic*) capaz de ser detectado unicamente pelos anticorpos anti-*T. cruzi*, gerando a Plataforma Cruzi (PlatCruzi). Esta Plataforma é de fácil manuseio e padronização; possui uma proteína núcleo receptora de determinantes antigênicos exógenos e é conhecida pela sua estabilidade proteica. Vislumbra-se o seu emprego tanto em *kits* de diagnóstico de ELISA, quanto em TDRs, com baixos custos produtivos. Dessa forma, o desempenho das proteínas quiméricas foi avaliado frente a um painel sorológico que compreendeu as possíveis DTUs circulantes de algumas áreas endêmicas e emergentes do Brasil (Figura 51).

A primeira proteína quimérica, PlatCruzi, foi produzida sinteticamente (Figura 18), com algumas modificações na estrutura da proteína núcleo, com a adição da cauda de poli-histidina na região C'- terminal e de alguns sítios de restrição para a adição dos epítomos de *T. cruzi* (Figura 18 e Figura 24). Os determinantes antigênicos foram obtidos através de antígenos descritos na literatura e triados pelas metodologias de *SPOT-Synthesis Epitope Analysis* (Figura 34), *western blotting* (Figura 33) e análises de bioinformática. Foram detectadas menores intensidades de sinais com ligação dos anticorpos da classe IgG em cinco epítomos (TcE - TcEp5, PEP-2, CRA – TcEp8, TcD-1 e B 13), através do *SPOT-Synthesis Epitope Analysis* (Figura 34). Apesar disso, PlatCruzi apresentou 100% de sensibilidade e especificidade nos testes de ELISA com os de soros obtidos de alguns Estados das regiões norte e nordeste do Brasil.

Para a realização do ensaio de *western blotting*, a proteína com 8 epítomos (PlatCruzi  $\Delta 1 \Delta 10$ ) foi previamente expressa em células de *E. coli* (Figura 29), seguida de lise da membrana bacteriana por sonicação, solubilização proteica em corpúsculo de inclusão através de tampão contendo ureia 8M, pH 8,0 e purificada em coluna de afinidade a níquel, ainda apresentando resíduos de proteínas bacterianas nos eluatos resultantes (Figura 28). Em seguida esse poliantígeno recombinante foi avaliado frente ao *pool* de soros de pacientes com cardiopatia chagásica e leishmaniose. Além disso foi usada a proteína núcleo (sem adição dos epítomos) frente ao mesmo *pool* de soros de DChc (Figura 29). Os resultados apontaram uma baixa reatividade para a proteína recombinante frente ao *pool* de soros de leishmaniose. Essa reatividade poderia ser por PlatCruzi  $\Delta 1 \Delta 10$  ou devido aos resíduos de proteínas recombinantes bacterianas ainda presentes após a purificação por gel de afinidade a níquel, conforme ilustrado na Figura 28. Posteriormente, foi demonstrado em outra análise de *western blotting* com extrato proteico (Figura 35), a intensidade do sinal foi gerada pela

detecção de anticorpos humanos da classe IgG contra os resíduos de proteína de *E. coli*.

Já o resultado imunoenzimático da proteína com 8 epítomos (PlatCruzi  $\Delta 1 \Delta 10$ ) frente aos soros de pacientes com cardiopatia chagásica, leishmaniose visceral, dengue, febre amarela e amostras sem presença de infecção, provenientes do painel sorológico do Laboratório de Bioquímica de Proteínas e Peptídeos (CDTS/FIOCRUZ), (Figura 30), apontaram reatividade ao IgG anti-*T. cruzi* em uma amostra sorológica de dengue que pode ter sido por conta da presença de resíduos da proteína bacteriana na fração da proteína recombinante utilizada, ou o indivíduo dessa amostra pode também estar com a infecção pelo *Trypanosoma cruzi*.

A próxima etapa foi aperfeiçoar a estrutura de Rx-UCBP e foram realizadas substituições de três determinantes antigênicos, que tiveram baixa ou nenhuma detecção de IgG anti-*T. cruzi*: TcE (inserido na posição 2 de PlatCruzi); CRA (inserido na posição 5 de PlatCruzi) e TcD-1 (inserido na posição 7 de PlatCruzi). Além disso, foi feita alteração de posicionamento do epítopo TcE na plataforma, retirado da posição 3 e incorporado na posição 10. Por conta da localização referente a posição 3 ser na parte interna da estrutura Barril- $\beta$ , disposta em  $\alpha$ -hélice (Figura 23, Figura 44), o que poderia estar dificultando a identificação deste epítopo pelos anticorpos do isotipo IgG anti-*T. cruzi*. Essas alterações resultaram na criação de um novo *immunomimic* identificado como PlatCruzi V2, que também contou com a adição de *linkers* e mudança da cauda de poli-histidina da região C' terminal para a N' terminal da proteína (Tabela 17 e Figura 44). Os novos epítomos adicionados a plataforma foram o TSSA (*Trypomastigote Small Surface Antigen*), que é um epítopo comum as DTUs TcII, TcV e TcVI, e é reconhecido por soros de pacientes crônicos do Brasil, Bolívia e Argentina (Di Noia et al., 2002; Bhattacharyya et al., 2010; Bhattacharyya et al., 2014; Cimino et al., 2011; De Marchi et al., 2011; Risso et al., 2011); o SAPA (*Shed Acute Phase Antigen*) que é descrito como um antígeno de fase aguda (Afranchino et al., 1989), e que foi relatado com alta eficiência de detecção da infecção por *T. cruzi* em recém-nascidos (Volta et al., 2015), e em infecções crônicas (Vega et al., 2013); e o peptídeo 3973 da proteína TcCA-2, que é uma proteína de membrana do parasito, reconhecido com alta sensibilidade (> 90%) e especificidade de 98% pelos soros de DChc (Fernandez-Villegas et al., 2016).

O ensaio inicial de PlatCruzi V2 indicia seu melhor desempenho através da detecção dos anticorpos IgG anti-*T. cruzi* humano frente aos soros de Barcelos (100% das amostras analisadas). Nos estados de Maranhão e Paraíba uma amostra não

apresentou positividade com relação aos valores de *cutoff* estabelecidos para as outras duas quiméricas (Figura 48). Pela baixa representatividade das amostras sorológicas utilizadas na análise, não foram determinados os valores estatísticos da curva ROC, *cutoff*, sensibilidade, especificidade desta proteína, sendo prematuro qualquer conclusão em relação a seu desempenho em frente ao painel de soros do estudo, como também com relação a primeira versão da proteína quimérica.

Com relação as etapas de purificação de PlatCruzi por cromatografia de afinidade, foram empregadas duas metodologias visando a obtenção de frações proteicas com melhor grau de pureza. No primeiro método, as frações proteicas foram obtidas através da eluição do tampão B sem presença de ureia e com 500 mM de imidazol, para o seu completo desligamento da coluna. As frações 9, 10 e 11 apresentaram o tamanho de fragmento correspondente a PlatCruzi, mas ainda contendo poucos resíduos de proteínas de *E. coli*. Destaca-se a fração 11 com a melhor pureza obtida entre os três eluatos (Figura 36 A e B). Já na segunda metodologia, a etapa de eluição consistiu em gradiente de concentração do tampão B (com 500 mM de imidazol e sem ureia) e os eluatos correspondentes as quimeras tiveram concentrações distintas de imidazol, variando de 250 até a 500 mM (50% a 100% de tampão B). As frações adquiridas por este método de eluição por gradiente tiveram melhor grau de pureza (Figura 40 A e B), quando comparados as obtidas pela primeira forma de purificação. A fração escolhida para a utilização nos ensaios imunoenzimáticos (tubo 18) possuía a concentração de 350 mM de imidazol. PlatCruzi  $\Delta$ 5 também foi purificada através deste segundo método de eluição, com o emprego da fração proteica, em ELISA, com a mesma concentração de imidazol (350 mM) do que o eluato de PlatCruzi e com alto grau de pureza (Figura 41 A e B).

Nos experimentos realizados de ELISA, com as duas frações de PlatCruzi obtidas após a purificação pelos dois métodos, nota-se um ligeiro aumento nos valores de DO e de *cutoff* obtidos com o emprego da proteína purificada pela primeira metodologia, que pode ser pertinente a reatividade apresentada contra proteínas bacterianas ainda presentes na fração eluída e a alta de concentração de imidazol (500 mM). Já quando analisados o controle positivo (9817) e negativo (branco), através do gráfico gerado pelo *GraphPad Prism*, nota-se uma diferença entre os valores de DO obtidos entre os “brancos” das reações, quando utilizadas as proteínas quiméricas com o emprego de metodologias diferentes de purificação. PlatCruzi (A) apresentou um valor de DO mais elevado do que as outras duas proteínas, sendo possível que algum tipo de contaminação no tampão de lavagem PBS-T, o uso de

diferentes soluções reveladoras de fosfatase alcalina, como também a alta concentração de imidazol possam ter contribuído para esse resultado.

Foram realizadas duas avaliações de padronização da titulação das amostras sorológicas. A primeira análise foi realizada com algumas amostras sorológicas de DChc obtidas pelos LACENs (CE, PB, SE) contra a PlatCruzi (Figura 38). Já a segunda análise, contou com alguns soros de DChc dos LACENs (CE, MA, PB, SE) e de Barcelos, como também de *Leishmania spp.* (leishmaniose visceral - LACENs e leishmaniose tegumentar americana - Barcelos) contra as quimeras PlatCruzi (Figura 47 A), PlatCruzi  $\Delta 5$  (Figura 47 B), PlatCruzi V2 (Figura 47 C) e a combinação dos dois poliantígenos recombinantes PlatCruzi & PlatCruzi V2 (Figura 47 D). As titulações avaliadas no segundo experimento (Figura 47) foram baseadas nas diluições normalmente usadas em *kits* de diagnóstico de ELISA.

No que se refere a padronização da titulação a ser empregada nos ensaios imunoenzimáticos, o primeiro ensaio demonstrou que com os soros utilizados, as melhores titulações para a detecção de IgG anti- *T. cruzi* foram : 1:50, 1:100 e 1:250, como entre as titulações 1:100 e 1:250 não houve diferenças significativas, foi escolhida a titulação 1:250 para a realização dos ensaios imunoenzimáticos desta investigação (Figura 38). Contudo, comparando com o segundo experimento observa-se que as melhores titulações foram 1:50 e 1:100, principalmente nos soros que apresentaram menor reatividade (Figura 47).

Na Figura 47 também pôde-se notar que uma amostra sorológica de leishmaniose visceral do Maranhão, foi reativa para IgG anti-*T. cruzi*, nas titulações 1:20 e 1:50, perante as proteínas quiméricas. Este fato corrobora com a positividade também encontrada nos dois ensaios confirmatórios (IFI e ELISA), onde a titulação preconizada pelo *kit* de ELISA (Chagatest ELISA Rec. v. 3.0) foi de 1:50.

Em contrapartida, quando analisados os soros de leishmaniose nas diferentes titulações, destaca-se a reatividade apresentada para IgG anti- *T. cruzi* em um soro do Maranhão (9L-MA) contra todas as proteínas quiméricas, nas titulações 1:20 e 1:50 (Figura 47 A-D). Foram encontradas positivities em alguns soros controles (4 de leishmaniose e 1 de dengue) quando retestados com o Chagatest ELISA Rec. v. 3.0 (Tabela 16 e Tabela 20), que pode indicar uma provável reatividade cruzada apresentada quando usadas essas duas titulações (1:20 e 1:50).

Ainda quando observado o resultado de reatividade encontrada no soro 9L-MA para os anticorpos de *T. cruzi*, percebe-se que perante a PlatCruzi V2 (Figura 47 C) e a combinação PlatCruzi & PlatCruzi V2 (Figura 47 D) uma diminuição nos valores

de DO nas duas titulações em questão (1:20 e 1:50). O que indica como promissora a combinação das duas plataformas (PlatCruzi & PlatCruzi V2) para a redução de resultados falso-positivos (Figura 47D).

O desempenho de PlatCruzi (eluatos das duas purificações por cromatografia de afinidade) e de PlatCruzi  $\Delta 5$  perante aos dois *pools* de soros liofilizados da OMS foram satisfatórios em todas as diluições, apresentando reatividade para IgG anti-*T. cruzi* contra os poliantígenos recombinantes (Figura 50). Comparando os índices de reatividade (IR) entre as proteínas quiméricas e alguns *kits* de diagnóstico comercializados, também utilizando os Padrões Internacionais de Referências Biológicas, pode-se notar que nas diluições de 32x e 64x, a reatividade apresentada nestes testes foi majoritariamente negativa. Já contra as duas proteínas quiméricas do estudo, foram detectadas IgG anti-*T. cruzi* nas duas diluições (Tabela 19). Apontando os dois poliantígenos recombinantes como potenciais alvos para os ensaios sorológicos nas áreas endêmicas oriundas dos dois *pools*, IS 09/188 (México), IS 09/186 (Chile e Brasil).

Existem outros estudos em andamento com o objetivo de obter potenciais alvos proteicos e criar testes de diagnóstico sorológicos para DChc com 100% de sensibilidade e especificidade. Uma pesquisa com quatro novas proteínas quiméricas, também baseados em epítomos de antígenos de *T. cruzi*, já descritos na literatura, teve um bom desempenho em ensaios de ELISA. Esse grupo notou que duas proteínas se destacaram com relação ao desempenho nos testes sorológicos de Chagas, com sensibilidade de 99,3% e 97,9%, e especificidade de 100% e 99,9%. As 4 proteínas quiméricas foram analisadas frente a um painel de soros de DChc de alguns Estados brasileiros: Bahia, Minas Gerais, Goiás, Pernambuco e Paraná, além de amostras de outros países: EUA, México, Nicarágua, Guatemala, Honduras, Argentina (Santos et al., 2016; Santos et al., 2017). Os resultados obtidos se mostraram promissores para essa população do estudo, porém torna-se necessário avaliar essas proteínas frente as amostras sorológicas de áreas que apresentam baixa detecção de IgG anti-*T. cruzi* e de amostras com padrão internacional de controle de qualidade, como os Padrões Internacionais de Referências Biológicas da OMS.

Um outro estudo usou outro tipo de biomarcador em ensaios imunoenzimáticos, combinação de multiepítomos, com 7 peptídeos altamente conservados entre as diferentes cepas de *T. cruzi*. A seleção dos peptídeos, foi através da técnica de microarranjos de peptídeos (Carmona et al., 2015), onde foram obtidos 30 peptídeos, que passaram por validação sorológica, e resultou em 7 peptídeos utilizados para a

formação do biomarcador. Foi testado em um painel de soros de pacientes com DChc, pessoas saudáveis e poucos soros de pacientes com leishmaniose tegumentar americana. A sensibilidade obtida foi de 96,34% e a especificidade foi de 99,15% (Mucci et al., 2017). Os 7 peptídeos foram: (1) proteína de superfície de tripomastigota (B13, Ag2, CA-2, PEP2); (2) família das trans-sialidades (TcD/Ag13); (3) proteína hipotética (proteína antigênica n 96); (4) proteína hipotética (conservada); (5) família da mucina; (6) família das trans-sialidades; (7) Ribo 19 (Mucci et al., 2017). Vale ressaltar, que três desses peptídeos também foram utilizados em parte nas duas plataformas (PlatCruzi e PlatCruzi V2), o que corrobora com o alto desempenho obtido na análise individual desses epítomos no *SPOT-Synthesis Epitope Analysis* (Figura 34) e nos ensaios de ELISA, inseridos nas duas plataformas (Figura 48).

Dentre as proteínas quiméricas analisadas nesta investigação (Figura 42, Figura 43, Figura 46, Figura 47 e Tabela 18), PlatCruzi se mostrou a mais promissora com 100% de especificidade e sensibilidade (Figura 42, Tabela 18), diante a uma população sorológica das regiões norte e nordeste do país, abrangendo uma diversidade sorológica, com altas e baixas reatividades para IgG anti-*T. cruzi*, com distintas DTUs circulantes.

Esta investigação proporcionou uma inovação tecnológica, através da criação de uma plataforma multiepítomos (Figura 17, Figura 18), usando a proteína núcleo com pequenas adaptações para as inserções dos determinantes antigênicos de *T. cruzi* (Figura 18, Figura 21), que ocasionou em duas versões da plataforma (PlatCruzi e PlatCruzi V2), cada uma com suas particularidades quanto ao seus cernes estruturais e aos epítomos presentes (Tabela 7, Figura 22, Figura 23, Tabela 16, Figura 44). Apesar dos ensaios de *western blotting* (Figura 33) e *SPOT-Synthesis Epitope Analysis* (Figura 34) indicarem baixo reconhecimento pelos anticorpos IgG anti-*T. cruzi* de três epítomos lineares inseridos em PlatCruzi, essa proteína quimérica apresentou alta performance nos ensaios imunoenzimáticos perante ao painel sorológico do estudo (100% de sensibilidade e especificidade). Com o grande diferencial, com relação aos outros testes de diagnóstico sorológicos comercializados, o alto desempenho alcançado com o emprego de uma única proteína multiepítomo, o que a torna uma ferramenta promissora para os testes sorológicos da doença de Chagas crônica.

Os principais resultados obtidos foram:

1. Criação de uma plataforma multiepítomos.
2. Obtenção de epítomos lineares específicos de *T. cruzi*.

3. Três potenciais alvos de diagnóstico: PlatCruzi, PlatCruzi  $\Delta$ 5 e PlatCruzi V2.
4. Possibilidade de combinar as duas versões de PlatCruzi.
5. PlatCruzi com 100% de sensibilidade e especificidade.

Os principais desdobramentos da tese são:

1. Obtenção do número do registro de patente.
2. Avaliar PlatCruzi V2 perante todo painel sorológico.
3. Padronização da purificação proteica.
4. Novas análises bioquímicas das proteínas, com intuito de obter mais resultados de caracterização.
5. Avaliar os custos de produção.
6. Protótipo de teste rápido.

## 6 CONCLUSÕES

Os resultados encontrados nesse estudo apontam para:

1. PlatCruzi e PlatCruzi  $\Delta 5$  apresentaram alta reatividade nas diferentes titulações dos dois *pools* sorológicos, IS 09/188 e IS 09/186, dos Padrões Internacionais de Referências Biológicas (OMS).
2. Os índices de reatividade frente as diluições de 32x e 64x dos Padrões de Referências Biológicas, destacaram PlatCruzi e PlatCruzi  $\Delta 5$  com melhor desempenho do que os testes sorológicos avaliados pela OMS.
3. Um excelente desempenho de PlatCruzi em teste de ELISA, em frente aos diferentes soros dos estados do Amazonas (Barcelos), Ceará, Sergipe, Maranhão, Paraíba, abrangendo alguns dos estados das regiões norte e nordeste, que são de maiores endemicidades do país.
4. A proteína núcleo (Rx – UBCP) é uma plataforma receptora de epítomos eficiente para detecção de anticorpos IgG anti-*T. cruzi* no diagnóstico de DChc.
5. Este estudo gerou uma proteína quimérica, PlatCruzi, que tem potencial para ser produzido em um teste sorológico para a fase crônica da doença de Chagas no Brasil, com alta sensibilidade e especificidade e com alta eficácia na detecção da infecção por *T. cruzi*.

## 7 PERSPECTIVAS

1. Analisar o desempenho de PlatCruzi V2 e a combinação das duas plataformas (PlatCruzi & PlatCruzi V2) frente a todos os soros do estudo em ELISA.
2. Obtenção de proteínas recombinantes solúveis visando a produção industrial.
3. Aperfeiçoar o protocolo de purificação proteica.
4. Avaliar as estruturas proteicas após o renovelamento, quanto ao número de cadeias, ligações (monoméricas, diméricas ou oligoméricas).
5. Avaliar a estabilidade das proteínas quiméricas.
6. Ampliar a diversidade e a quantidade de amostras sorológicas para as demais regiões brasileiras com promissoras parcerias com o INI e bancos de sangue do Rio de Janeiro e São Paulo.
7. Estudo multicêntrico avaliando o desempenho das proteínas perante aos soros de vários institutos internacionais.
8. Criação de protótipos de testes imunocromatográficos a serem avaliados nos municípios em torno do Rio Negro do estado do Amazonas.
9. Testar PlatCruzi e PlatCruzi V2 como ferramentas de diagnóstico em sistema de biossensores.
10. Elaboração da Plataforma Cruzi para a fase aguda da doença de Chagas.
11. Continuar as avaliações da estrutura de Rx-UCBP, no intuito de aperfeiçoar a plataforma e analisar a estabilidade das proteínas quiméricas.
12. Avaliar as proteínas quiméricas: PlatCruzi, PlatCruzi  $\Delta 5$ , PlatCruzi V2 e a combinação de PlatCruzi e PlatCruzi V2, como potenciais *immunomimics* a serem utilizadas em testes sorológicos convencionais e em testes rápidos de diagnóstico para DChc.
13. Avaliar quanto ao potencial uso de PlatCruzi para triagem sorológica, através de amostras provenientes de bancos de sangue, bolsas de sangue que foram descartadas por serem casos suspeitos da infecção por *T. cruzi*.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

A Geração Ciência. Biologia. [homepage na internet]. Ensaio Imunoenzimático: ELISA. 2017. [Acesso em: 30 nov 2017]. Disponível em: <<http://www.ageracaociencia.com/2017/09/21/ensaio-imunoenzimatico-elisa/>>.

Abad-Franch F, Monteiro FA. Biogeography and evolution of Amazonian triatomines (Hemiptera: Reduviidae): implications for Chagas disease surveillance in humid forest ecoregions. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2007. 102 (Suppl.1): S57-S69.

Abath FGC, Nakazawa M, Pereira VRA, Rosa DS, Barros MNDS, Gomes YM. *Trypanosoma cruzi* excretory-secretory antigens are potentially useful for the serodiagnosis of chronic Chagas' disease as shown by preliminary ELISA evaluations. Anais do XXV Meeting of the Brazilian Society of Immunology. 2000.135.

Abbott Diagnosis. *Trypanosoma cruzi* (*E. coli*, Recombinant) Antigen. ABBOTT ESA Chagas. 2011. 8L34. 34-6894/R04.

Affranchino JL, Ibanez CF, Luquetti AO et al. Identification of a *Trypanosoma cruzi* antigen that is shed during the acute phase of chagas' disease. Molec Bioch Paras. 1989. 34, 221–228.

Aguirre S, et al. Design, construction, and evaluation of a specific chimeric antigen to diagnose chagasic infection. J Clin Microbiol. 2006.44, 10, 3768-3774.

Almeida SP, Sherlock IA, Fahel E. Novo procedimento de xenodiagnóstico na forma crônica da doença de Chagas. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1976. 74:285-288.

Anandarao R, et al. A custom-designed recombinant multiepitope protein as a dengue diagnostic reagent. Prot. Exp. and Purif. 2005. 41, 1, 136-147.

Andrade BLA, Rocha DG. Doenças negligenciadas e bioética: diálogo de um velho problema com uma nova área do conhecimento. Rev bioét. 2015. 23 (1): 105-13.

Araujo CAC, Waniek PJ, Xavier SCC, Jansen AM. Genotype variation of *Trypanosoma cruzi* isolates from different Brazilian biomes. Exp Paras. 2010. 127 (1): 308–312.

Araujo FG. Analysis of *Trypanosoma cruzi* antigens bound by specific antibodies and by antibodies to related trypanosomatids. Inf Imm. 1986. 53, 1, 179-185.

Araújo-Jorge TC. Embasamento técnico e sugestões para ações de controle das Doenças da Pobreza no Programa de Erradicação da Pobreza Extrema no Brasil. 2011. (Nota técnica n 1/2011/Instituto Oswaldo cruz/Fiocruz/Diretoria versão 4,2 de setembro de 2011). [Acesso em: 20 nov 2017]. Disponível em: <[http://www.fiocruz.br/ioc/media/NotaTecnica\\_1\\_2011\\_IOCatual.pdf](http://www.fiocruz.br/ioc/media/NotaTecnica_1_2011_IOCatual.pdf)>.

Aslett M et al. TriTrypDB: a functional genomic resource for the Trypanosomatidae. Nucleic Acids Res. 2010. 38 (Database issue): D457-62.

Assad Leonor. Doenças negligenciadas estão nos países pobres e em desenvolvimento. Cienc. Cult. 2010. 62(1): 6-8. [Acesso em: 20 dez 2017]. Disponível

em:<[http://cienciaecultura.bvs.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0009-67252010000100003&lng=en](http://cienciaecultura.bvs.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0009-67252010000100003&lng=en)>.

Avila HA, Sigman DS, Cohen LM, Millikan RC, Simpson L. Polymerase chain reaction amplification of *Trypanosoma cruzi* kinetoplast minicircle DNA isolated from whole blood lysates: Diagnosis of chronic Chagas disease. *Mol Biochem Parasitol*. 1991. 48:211-22.

Avila HA, Pereira JB, Thiemann O, de Paiva E, de Grave W, Morel CM, Simpon L. Detection of *Trypanosoma cruzi* in blood specimens of chronic Chagasic patients by polymerase chain reaction amplification of kinetoplast minicircle DNA: comparison with serology and xenodiagnosis. *J Clin Microbiol*. 1993. 31:2421-6.

Barbosa W, Czerewuta AC, Oliveira RL. Tentativa de isolamento primário de *T. cruzi* de pacientes crônicos de doença de Chagas por hemocultura agentes bloqueadores. *Rev Patol Trop*. 1983. 12:155-63.

Barreto AC, Marsden PD, Cuba CC, Alvarenga NJ. Estudo preliminar sobre o emprego de *Dipetalogaster maximus* (uhler,1894) (*triatominae*) na técnica do xenodiagnóstico em forma crônica da doença de Chagas. *Rev Inst Med Trop*. 1978. 20:183-9.

Bayer-Santos E, et al. Proteomic analysis of *Trypanosoma cruzi* secretome: characterization of two populations of extracellular vesicles and soluble proteins. *J Prot Res* 2013. 12, 2, 883-897.

Bayona JC, et al. SUMOylation pathway in *Trypanosoma cruzi*: functional characterization and proteomic analysis of target proteins. *Mol Cell Prot*. 2011. 10, 12, M110.007369.

Belluzo MS, Ribone ME, Camussone C, Marcipar IS, Lagier CM. Favorably orienting recombinant proteins to develop amperometric biosensors to diagnose Chagas' disease. *Anal. Biochem*. 2011. 408, 86–94.

Bergquist R, Whittaker M. Control of neglected tropical diseases in Asia Pacific: implications for health information priorities. *Infect Dis Poverty*. 2012. 1(1):3.

Bern C, Montgomery SP, Herwaldt BL, Rassi Júnior A, Marin-Neto JA, Dantas RO, et al. Evaluation and treatment of Chagas disease in the United States: a systematic review. *JAMA*. 2007. 298(18):2171-81.

Berrizbeitia M. et al. Field evaluation of four novel enzyme immunoassays for Chagas' disease in Venezuela blood banks: comparison of assays using fixed-epimastigotes, fixed-trypomastigotes or trypomastigote excreted-secreted antigens from two *Trypanosoma cruzi* strains. *Transf Med*. 2006. 16, 6, 419-431.

Bhattacharyya T, Brooks J, Yeo M et al. Analysis of molecular diversity of the *Trypanosoma cruzi* trypomastigote small surface antigen reveals novel epitopes, evidence of positive selection and potential implications for lineage-specific serology. *Intern. Jour Paras*. 2010. 40, 921–928.

Bhattacharyya, T., Falconar, A.K., Luquetti, A.O., et al. Development of peptide-based lineage-specific serology for chronic Chagas disease: geographical and clinical distribution of epitope recognition. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014. 8, e2892.

Borges-Pereira J, Willcox HPF, Marcondes CB, Coura JR. Parasitemia em pacientes chagásicos crônicos avaliada pelo índice de triatomíneos infectados no xenodiagnóstico. Rev Soc Bras Med Trop. 1989. 22:39-44.

Bottino CG, Gomes LP, Pereira JB, Coura JR, Provance DW Jr, De-Simone SG. Chagas disease-specific antigens: characterization of epitopes in CRA/FRA by synthetic peptide mapping and evaluation by ELISA-peptide assay. BMC Infect Dis. 2013. 13: 568.

Bradford, M. A. Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. Anal Biochem. 1976. 72, 248-254.

Brasil. Decreto n. 7.492, de 2 de junho de 2011. Institui o Plano Brasil Sem Miséria. 2011.

Brasil. Ministério da Saúde. Doença de Chagas – Triagem e diagnóstico sorológico em unidades hemoterápicas e laboratórios de saúde público. Coordenação Nacional de Doenças Sexualmente Transmissíveis e Aids. Brasília. 1998. 76.p.

Brasil. Ministério de Desenvolvimento social e combate à fome. [homepage na internet]. Atlas de desenvolvimento social. Brasília: PNUD, IPEA, Fundação João Pinheiro/MG. 2013. [Acesso em: 01 dez 2017]. Disponível em: <<http://atlasbrasil.org.br/2013/>>.

Brasil, Ministério da Saúde. Secretaria Nacional de Vigilância em Saúde. Manual de Doença de Chagas Aguda. Brasília. 2004.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Consenso Brasileiro em Doença de Chagas. Rev Soc Bras Med Trop. 2005. 38 Supl 3: 29p.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. [homepage na internet]. Aspectos epidemiológicos. 2012. [Acesso em: 02 jan 2018]. Disponível em: <[http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/visualizar\\_texto.cfm?idtxt=31454](http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/visualizar_texto.cfm?idtxt=31454)>.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Análise de Situação em Saúde. Saúde Brasil 2013: uma análise da situação de saúde e das doenças transmissíveis relacionadas à pobreza. Brasília: 2014. 384 p.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Sistema de Informação de Agravos de Notificação – Sinan: normas e rotinas. 2007. 2. ed. – Brasília: Editora do Ministério da Saúde, Brasil, 68 p.: il.– (Série A. Normas e Manuais Técnicos).

Brasil. Secretaria de Governo. [homepage na internet]. Notícias: Brasil Sem Miséria. 2015a. [Acesso em: 03 jan 2018]. Disponível em: <<http://www.secretariadegoverno.gov.br/iniciativas/internacional/fsm/eixos/inclusao-social/brasil-sem-miseria/#wrapper>>.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância de Doenças e Agravos Não Transmissíveis e Promoção da Saúde. Saúde

Brasil 2014: uma análise da situação de saúde e das causas externas / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância de Doenças e Agravos Não Transmissíveis e Promoção da Saúde. – Brasília. 2015b. 462 p.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Doença de Chagas aguda no Brasil: série histórica de 2000 a 2013. Bol Epidemiol. 2015c. 46(21): 9p.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS/MS). Tabulações de casos de dengue por Estado e Município. Coordenação-Geral dos Programas Nacionais de Controle e Prevenção da Malária e das Doenças Transmitidas Pelo Aedes – CGPNCMD. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis – DEVIT. 2017.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. (SVS/MS). Tabulações de casos de dengue por Estado e Município. Coordenação-Geral dos Programas Nacionais de Controle e Prevenção da Malária e da Doença de Chagas – CGPNCMD. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis – DEVIT. 2018.

Brasil PEAA, De Castro L, Hasslocher-Moreno AM, Sangenis LHC, Braga JU. ELISA versus PCR for diagnosis of chronic Chagas disease: systematic review and meta-analysis. BioMed Central Infect Dis. 2010. 10, 337.

Brener Z. Diagnostic tests for Chagas disease. In: Wendel SB, Brener Z, Camargo ME, Rassi A, editors. Chagas disease (American Trypanosomiasis): its impact on transfusion and clinical medicine. 1992. ISBT Brazil' 92. p. 153-64.

Brener Z. *Trypanosoma cruzi*: morfologia e ciclo evolutivo. In Clínica e terapêutica da doença de Chagas. Uma abordagem prática para o clínico geral. Fiocruz. 1997. 29-32.

Brener, Z.; Alquezar, A.; Luquetti, A. Normas de segurança para infecções acidentais com *Trypanosoma cruzi*, agente causador da doença de Chagas. Rev Patol Tropical. 1997. 26, 1, 129-130.

Brenière SF et al. Direct identification of *Trypanosoma cruzi* natural clones in vectors and mammalian hosts by polymerase chain reaction amplification. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 1992. 46, 3, 335-341.

Brenière SF, Waleckx E, Barnabé C. Over Six Thousand *Trypanosoma cruzi* Strains Classified into Discrete Typing Units (DTUs): Attempt at an Inventory. PLoS Negl Trop Dis. 2016. 10(8): e0004792.

Brisse S, Barnabé C, Tibayrenc M. Identification of six *Trypanosoma cruzi* phylogenetic lineages by random amplified polymorphic DNA and multilocus enzyme electrophoresis. Int J Parasitol. 2000a. 30: 35-44.

Brisse S, Dujardin JC, Tibayrenc M. Identification of six *Trypanosoma cruzi* phylogenetic lineages by sequence-characterised amplified region markers. Mol Biochem Parasitol. 2000b. 111, 95–105.

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

Britto CC. Usefulness of PCR-based assays to assess drug efficacy in Chagas disease chemotherapy: value and limitations. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2009. 104 Suppl 1:122-35.

Britto C, Cardoso MA, Vanni CM, Hasslocher-Moreno A, Xavier SS, et al. Polymerase chain reaction detection of *Trypanosoma cruzi* in human blood samples as a tool for diagnosis and treatment evaluation. *Parasitology.* 1995. 110(Pt 3): 241–247.

Britto C, Cardoso MA, Wincker P, Morel CM. A simple protocol for the physical cleavage of *Trypanosoma cruzi* kinetoplast DNA present in blood samples and its use in polymerase chain reaction (PCR)-based diagnosis of chronic Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1993. 88(1):171-2.

Britto C, Silveira C, Cardoso MA; Marques P, Luquetti A, Macedo V, Fernandes O. Parasite persistence in treated chagasic patients revealed by xenodiagnosis and polymerase chain reaction. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2001. v. 96, 823-826.

Brum-Soares LM, Xavier SS, Sousa AS, Pereira JB, Ferreira JM, Costa IR, et al. Morbidade da doença de Chagas em pacientes autóctones da microrregião do Rio Negro, Estado do Amazonas. *Rev Soc Med Trop.* 2010. 43(2): 170-7.

Brumpt E. Le xénodiagnostic. Application au diagnostic de quelques infections parasitaires et en particulier à la Trypanosomose de Chagas. *Bull Soc Pathol Exot.* 1994. 7:706-710.

Brusca RC, Brusca GJ. *Invertebrados.* 2007. 2ª ed, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.

Burns JM, et al. Identification and synthesis of a major conserved antigenic epitope of *Trypanosoma cruzi*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992. 89, 4, 1239-1243.

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

Camargo ME, Takeda GKF. Diagnóstico de laboratório. In: Brener Z, Andrade Z. *Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 1979. p. 165-98.

Camargo ME, Segura EL, Kagan, IG, Souza JMP, Carneiro JR, Yanovsky JF, Guimarães MCS. Collaboration on the standardization of Chagas disease in the Americas: an appraisal. *PAHO Bul.* 1986. 20: 233-244.

Camargo MW, Amato Neto V. Anti-*Trypanosoma cruzi* IgM antibodies as serological evidence of recent infection. *Rev Inst Med Trop.* 1974. 16: 200-202.

Campbell, D.A.; Thomas, S.; Sturm, N.R. Transcription in kinetoplastid protozoa: why

be normal? *Microbes Infec.* 2003. 5, 1231–1240.

Camussone C. et al. Comparison of recombinant *Trypanosoma cruzi* peptide mixtures versus multiepitope chimeric proteins as sensitizing antigens for immunodiagnosis. *Clin Vaccine Immunol.* 2009. 16, 6, 899-905.

Carmona SJ, Nielsen M, Schafer-Nielsen C, Mucci J, Altcheh 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.* 2015. 14: 1871-1884.

Carranza J. C., Valadares H. M., D'ávila D. A., Baptista R. P., Moreno M., Galvao L. M. et al. *Trypanosoma cruzi* maxicircle heterogeneity in Chagas disease patients from Brazil. *Int J Parasitol.* 2009. 39, 963–973.

Carvalho FP. Potencialidades do Brasil como Innovative Developing Country para Pesquisa, Desenvolvimento Tecnológico e Produção em Doenças Negligenciadas. Dissertação de Mestrado. UFPJ. 2011. [Acesso em: 13 dez 2017]. Disponível em: <<http://www.ie.ufrj.br/images/posgraduacao/pped/defesas/23>>.

Castro AM, Luquetti AO, Rassi A, Rassi GG, Chiari E, Galvão LMC. Blood culture and polymerase chain reaction for the diagnosis of the chronic phase of human infection with *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol Res.* 2002. 88(10):894-900.

Cavalier-Smith T. Kingdom protozoa and its 18 phyla. *Microbiol Rev.* 1993. 57, 4, 953-994.

Cavalier-Smith T. Kingdoms Protozoa and Chromista and the eozoan root of the eukaryotic tree. *Biol Lett.* 2010. 6, 3, 342-345.

Cavazzana M Jr., Marcili A, Lima L, da Silva FM, Junqueira AC, Veludo HH, et al. Phylogeographical, ecological and biological patterns shown by nuclear (ssrRNA and gGAPDH) and mitochondrial (Cyt b) genes of trypanosomes of the subgenus *Schizotrypanum* parasitic in Brazilian bats. *Int J Parasitol.* 2010. 40(3):345–55. pmid:19766649.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). American Trypanosomiasis. Image Gallery. [Acesso em: 27 nov 2017]. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/dpdx/trypanosomiasisAmerican/index.html>>.

Chang CD, Cheng KY, Jiang LX, Salbilla VA, Haller AS, Yem AW et al. Evaluation of a prototype *Trypanosoma cruzi* antibody assay with recombinant antigen on a fully automated chemiluminescence analyser for blood donor screening. *Transfusion.* 2006. 46: 1737-1744.

Chen R. Bacterial expression systems for recombinant protein production: *E. coli* and beyond. *Biotechnol Adv.* 2012. 30, 5, 1102-1107.

Cheng et al. Immunoblot assay using recombinant antigens as a supplemental test to confirm the presence of antibodies to *Trypanosoma cruzi*. *Clin Vaccine Immunol.* 2007. 14: 355–361.

- Chiari E, Brener Z. Contribuição ao diagnóstico parasitológico da doença de Chagas na sua fase crônica. Rev Inst Med Trop S. Paulo. 1996. 8:134-8.
- Chiari E, Dias JCP, Lana M, Chiari CA. Hemocultures for the parasitological diagnosis of human chronic Chagas disease. Rev Soc Bras Med Trop. 1989. 22:19-23.
- Chiller TM, Samudio M, Zoulek G. IgG reactivity with *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania* antigens in sera of patients with Chagas disease and leishmaniasis. Am J Trop Med Hyg. 1990. 43: 650-656.
- Christopher-Hennings J, Araujo KP, Souza CJ, Fang Y, Lawson S, Nelson EA, Clement T, Dunn M, Lunney JK. Opportunities for bead-based multiplex assays in veterinary diagnostic laboratories. J Vet Diagn Investig. 2013. 25:671-691.
- Cimino RO, Rumi MM, Ragone P et al. Immuno-enzymatic evaluation of the recombinant tssa-ii protein of *Trypanosoma cruzi* in dogs and human sera: a tool for epidemiological studies. Parasitology. 2011. 138, 995–1002.
- Cominetti MC, Csordas BG, Cunha RC, Andreotti R. Geographical distribution of *Trypanosoma cruzi* in triatomine vectors in the State of Mato Grosso do Sul, Brazil. Rev Soc Bras Med Trop. 2014. 47(6):747–55.
- Cooley G. et al. High throughput selection of effective serodiagnostics for *Trypanosoma cruzi* infection. PLoS Neglec. Trop. Dis. 2008. 2, 10, e316.
- Cordero EM et al. Proteomic analysis of detergent-solubilized membrane proteins from insect-developmental forms of *Trypanosoma cruzi*. J Prot Res 2009. 8, 7, 3642-3652.
- Costa G, et al. A recombinant antigen and peptide line immunoassay (LIA) as an alternative diagnostic test for Chagas disease. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1997. 92, (suppl. 1), 399.
- Cotrim PC, et al. Organization and expression of the gene encoding an immunodominant repetitive antigen associated to the cytoskeleton of *Trypanosoma cruzi*. Molec. Biochem. Parasitol. 1995. 71, 1, 89-98.
- Coura JR, Dias JC. Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease: 100 years after its discovery. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2009. 104 Suppl 1:31-40.
- Coura J. R.; Vinas P.A. Chagas disease: a new worldwide challenge. Nature. 2010. 465, S6–S7.
- Coura, J. R. Chagas disease: what is known and what is needed - a background article. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2007. 102 (suppl) 1, 113-122.
- Coura JR, Junqueira ACV, Fernandes O, Valente AS, Miles MA. Emerging Chagas disease in Amazonian Brazil. Trends Parasitol. 2002. 18:171-176.
- Coura JR, Viñas PA, Junqueira ACV. Ecoepidemiology, short history and control of Chagas disease in the endemic countries and the new challenge for non-endemic countries. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2014. 109(7):856-62.
- Coura JR, Junqueira ACV. Risks of endemicity, morbidity and perspectives regarding

- the control of Chagas disease in the Amazon Region. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2012. 107 (Sup. 2): S145-S154.
- Coura JR, Junqueira ACV. Ecological diversity of *Trypanosoma cruzi* transmission in the Amazon Basin. The main scenarios in the Brazilian Amazon. Acta Trop. 2015a. 151:51-57.
- Coura JR, Junqueira ACV. Surveillance, health promotion and control of Chagas disease in the Amazon Region - Medical attention in the Brazilian Amazon Region: a proposal. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2015b. 110(7): 825-830.
- Coura JR, Junqueira ACV, Ferreira JMJB. Surveillance of seroepidemiology and morbidity of Chagas disease in the Negro River, Brazilian Amazon. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2018. 113(1): 17-23.
- Cramer A, Whitehorn EA, Tate E, Stemmer WP. Improved green fluorescent protein by molecular evolution using DNA shuffling. Nat Biotechnol. 1996. 14: 315-319.
- Cutrim FSRF, Almeida IA, Gonçalves EGR, Silva AR. Doença de Chagas no Estado do Maranhão, Brasil: registro de casos agudos no período de 1994 a 2008. Rev Soc Bras Med Trop. 2010. 43 (Suppl. 6): S705-S708.
- De Marchi CR, Di Noia JM, Frasch AC, Amato Neto V, Almeida IC & Buscaglia CA. Evaluation of a recombinant *Trypanosoma cruzi* mucin-like antigen for serodiagnosis of chagas' disease. Clin Vaccine Immunol. 2011. 18, 1850–1855.
- De Simone SG, Napoleao-Pego P, Teixeira-Pinto LA, Santos JD, De-Simone TS, Melgarejo AR, Aguiar AS, Marchi-Salvador DP. Linear B-cell epitopes in BthTX-1, BthTX-II and BthA-1, phospholipase A (2)'s from Bothrops jararacussu snake venom, recognized by therapeutically neutralizing commercial horse antivenom. Toxicon. 2013. 72: 90–101.
- De Souza SL, Camargo ME. The use of filter paper blood smears in a practical fluorescent test for American Trypanosomiasis serodiagnosis. Rev Inst Med Trop São Paulo. 1966. 8, 6, 255-258.
- De Souza W, De Carvalho UMT, Barrias SE. Review on *Trypanosoma cruzi*: Host cell Interaction. Inter J Cell Biol. 2010.
- De Souza W, Rodrigues JC. Sterol biosynthesis pathway as target for anti-trypanosomatid drugs. Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases. 2009. 2009: 19.
- De Souza W, Souto-Padrón T. The paraxial structure of the flagellum of Trypanosomatidae. The J Parasitol. 1980. 66, 2, 229-236.
- Di Noia, J.M., Buscaglia, C.A., De Marchi, C.R., Almeida, I.C., Frasch, A.C. A *Trypanosoma cruzi* small surface molecule provides the first immunological evidence that Chagas' disease is due to a single parasite lineage. J Exp Med. 2002. 195, 401–413.
- Dias E. Xenodiagnostique appliqué à la trypanosomiase americana. Comptes Rendus de Seances de la Société de Biologie et de ses Filiales. 1934. 118:187-189.

- Dias E. Técnica de xenodiagnóstico na moléstica de Chagas. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1940. 35:335-342.
- Dias JCP. Natural history of Chagas disease. Arquivos Brasileiros de Cardiologia. 1995. 65: 359-366.
- Dias J C. Cecílio Romãña, o sinal de Romãña e a doença de Chagas. Ver Soc Bras Med Trop 1997. 30(5): 407-413. [Acesso em: 23 dez 2017]. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0037-86821997000500012&lng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0037-86821997000500012&lng=en)>.
- Dias JCP. Notas sobre o *Trypanosoma cruzi* e suas características bio-ecol3gicas, como agente de enfermidades transmitidas por alimentos. Rev Soc Bras Med Trop. 2006. 39(4):370-5.
- Dias JC. Southern Cone Initiative for the elimination of domestic populations of *Triatoma infestans* and the interruption of transfusional Chagas disease. Historical aspects, present situation, and perspectives. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2007. 102 Suppl 1:11–18.
- Dias JC, Amato Neto V, Luna EJ. Mecanismos alternativos de transmiss3o do *Trypanosoma cruzi* no Brasil e sugest3es para sua preveno. Ver Soc Bras MedTrop 2011. 44, 3, 375-379.
- Dias JCP, Ramos Jr., Alberto N, Gontijo ED, Luquetti A, Shikanai-Yasuda MA, Coura JR et al. II Consenso Brasileiro em Doença de Chagas, 2015. Epidemiol. Serv. Saude. 2016. 25(esp): 7-86. [Acesso em: 04 jan 2018]. Disponível em: <[http://scielo.iec.gov.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1679-49742016000500007&lng=pt](http://scielo.iec.gov.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1679-49742016000500007&lng=pt)>.
- Dipti CA, Jain SK, Navin K. A novel recombinant multiepitope protein as a hepatitis C diagnostic intermediate of high sensitivity and specificity. Prot Exp Purif. 2006. 47, 1, 319-328.
- Docampo R, Scott DA, Vercesi AE, Moreno SN. Intracellular Ca<sup>2+</sup> storage in acidocalcisomes of *Trypanosoma cruzi*. Biochem J. 1995. 310, 3, 1005-1012.
- Docampo R & Moreno S N. The acidocalcisome as a target for chemotherapeutic agents in protozoan parasites. Curr. Pharmac. Design. 2008. v. 14, n. 9, p. 882-888. Drugs for Neglected Diseases initiative. Quem Somos. DNDi Am3rica Latina. 2017. [Acesso em: 03 jan de 2018]. Disponível em: <<http://www.dndial.org/pt/dndi-na-america-latina/quem-somos.html>>.
- Doença de Chagas. O parasito. Organizao estrutural. [homepage na internet]. Estudo por microscopia eletr3nica de transmiss3o. [Acesso em: 11 out 2017]. Disponível em: <<http://chagas.fiocruz.br/organizacao-estrutural/>>.
- Drugs for Neglected Diseases initiative. Chagas Disease. [homepage na internet]. FactSheet. 2016. [Acesso em: 22 dez 2017]. Disponível em: <<https://www.dndi.org/diseases-projects/chagas/>>.

DTU Bioinformatics Department of Bio and Health Informatics. SignalP 4.1 Server [homepage na internet]. [Acesso em: 11 abr 2014]. Disponível em: <<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>>.

Duffy T, Bisio M, Altcheh J, Burgos JM, Diez M, et al. Accurate real-time PCR strategy for monitoring bloodstream parasitic loads in chagas disease patients. *PLoS Negl Trop Dis*. 2009. 3: e419.

Duffy T, Cura CI, Ramirez JC, Abate T, Cayo NM, Parrado R, et al. Analytical performance of a multiplex Real-Time PCR assay using TaqMan probes for quantification of *Trypanosoma cruzi* satellite DNA in blood samples. *PLoS Negl Trop Dis* 2013; 7:e2000.

Dutra WO. et al. Cellular and genetic mechanisms involved in the generation of protective and pathogenic immune responses in human Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009. 104, (supl. 1), 208-218.

Elias MC, Marques-Porto R, Freymüller E, Schenkman S. Transcription rate modulation through the *Trypanosoma cruzi* life cycle occurs in parallel with changes in nuclear organization. *Molec Biochem Parasitol*. 2001. 112, 1, 79-90.

El-Sayed NM, Myler PJ, Bartholomeu DC, Nilsson D, Aggarwal G, Tran AN, et al. The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. *Science*. 2005. 309, 409–415.

Emmer BT et al. Identification of a palmitoyl acyltransferase required for protein sorting to the flagellar membrane. *J Cell Sci*. 2009. 122, 6, 867-874.

Engvall E, Perlmann P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry*. 1971. 8: 871-874.

Ehrlich G, Greenberg S. PCR-Based Diagnostics for Infectious Disease. Blackwell Scientific Publications. 1994. 698 p.

ExpASy. Bioinformatics Resource Portal. ProtParam. [homepage na internet]. [Acesso em: 11 abr 2014]. Disponível em: <<https://web.expasy.org/protparam/>>.

Fernandes MC, Da Silva EM, Pinto AV, Castro S, Menna-Barreto RFS. A novel triazolic naphthofuranquinone induces autophagy in reservosomes and impairment of mitosis in *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology*. 2011.139. 26-36.

Fernandez-Villegas A, Thomas MC, Carrilero B, Lasso P, Egui A, Murcia L, Segovia M, Alonso C, López MC. A 12-mer repetitive antigenic epitope from *Trypanosoma cruzi* is a potential marker of therapeutic efficacy in chronic Chagas' disease. *J Antimicrob Chemother*. 2016. 71 (7).

Ferreira AAP, Colli W, Alves MJM, Oliveira DR., Costa PI, Güell AG, Sanz F, Benedetti AV, Yamanaka H. Investigation of the interaction between Tc85-11 protein and antibody anti-*T. cruzi* by AFM and amperometric measurements. *Electrochim*. 2006. 51, 5046–5052.

- Ferreira AAP, Colli W, Da Costa PI, Yamanaka H. Immunosensor for the diagnosis of Chagas' disease. *Biosens. Bioelectron.* 2005. 21, 175–181.
- Ferreira AW, Ávila SLM. Doença de Chagas. In: *Diagnóstico Laboratorial das Principais Doenças Infecciosas e Auto-Imunes*. 2001. Guanabara Koogan: 241-249.
- Ferreira HO, Miziara JL. Aspectos clínicos da cardiopatia chagásica aguda. In: Cançado JR, Chuster M (editores). *Cardiopatia Chagásica*. Belo Horizonte: Imprensa Oficial do Estado de Minas Gerais. 1985.
- Foti L, Fonseca BP, Nascimento LD, Marques CF, da Silva ED, Duarte CA, Probst CM, Goldenberg S, Pinto AG, Krieger MA. Viability study of a multiplex diagnostic platform for Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2009. 104:136-141.
- Frank, R. The SPOT-synthesis technique. Synthetic peptide arrays on membrane supports--principles and applications. *J Immunol Methods.* 2002. 267:13-26.
- Frasch AC et al. Comparison of genes encoding *Trypanosoma cruzi* antigens. *Parasitol Today.* 1991. 7, 6, 148-151.
- Fuchs A. P., Fioratti V. L., Mello V. A., Boainain E. Diagnóstico sorológico na doença de Chagas. Estudo comparativo de diferentes técnicas. *Rev Inst Med Trop São Paulo.* 1980. 22, 242-245.
- Furuchó CR, et al. Inconclusive results in conventional serological screening for Chagas' disease in blood banks: evaluation of cellular and humoral response. *Trop Med Inter Health.* 2008. 13, 12, 1527-1533.
- Furuchó CR, Shikanai Yasuda MA, Umezawa ES, Guastini MC, Almeida I, Nunes EV, Bezerra R. Doença de Chagas: linfoproliferação, detecção de anticorpos e estudo epidemiológico em indivíduos com provas sorológicas inconclusivas. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2006. 39 144.
- Gadelha AM. et al. Chagas' disease diagnosis: comparative analysis of recombinant ELISA with conventional ELISA and the haemagglutination test. *Vox Sanguinis.* 2003. 85, 3, 165-170.
- Galvão LM, Chiari E, Macedo AM, Luquetti AO, Silva SA, et al. PCR assay for monitoring *Trypanosoma cruzi* parasitemia in childhood after specific chemotherapy. *J Clin Microbiol.* 2003. 41: 5066–5070.
- Gasteiger E, Hoogland C, Gattiker A, Duvaud S, Wilkins MR, Appel RD, Bairoch A. Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. In: Walker JM (ed). *The Proteomics Protocols Handbook*. 571-607. Humana Press. 2005.
- Gastroriopreto. [homepage na internet]. Acalásia e megaesôfago. 2012. [Acesso em: 25 nov 2017]. Disponível em: <<http://www.gastroriopreto.com.br/aparelho-detalhes-71-Acal%C3%A1sia-e-Megaes%C3%B4fago#.WqXHxCjwblU>>.
- Global Forum for Health Research – GFHR. Monitoring financial flows for health research. 2001.

Goldenberg S, Krieger MA, Lafaille JJ, Almeida E, Oelemann W. Use of *Trypanosoma cruzi* antigens in the immunological diagnosis of Chagas` disease. Mem Inst But. 1991. 53: 71-76.

Gomes ML, Macedo AM, Vago R, Pena SDJ, Galvão LMC, Chiari E. *Trypanosoma cruzi*: optimization of polymerase chain reaction for detection in human blood. Exp Parasitol. 1998. 88: 28-33.

Gomes ML, Galvão LMC, Macedo AM, Pena SDJ. Chagas disease diagnosis: Comparative analysis of parasitologic, molecular, and serologic methods. Am J Trop Med Hyg. 1999. 60:205-10.

Gomes YM. Diagnóstico Etiológico. In: Doença de Chagas. MALTA, J. (Organizador), Sarvier. 1996. cap. VII, 119 – 132.

Gomes YM, Pereira VRA, Nakazawa M, Rosa DS, Barros MNDS, Ferreira AGP, Silva ED, Ogatta SF, Krieger MA, Goldenberg S. Serodiagnosis of chronic Chagas Infection by using EIE-Recombinant-Chagas-Biomanguinhos kit. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2001. 96(4):497-501.

Gomes YM, Lorena VM, Luquetti A. O. Diagnosis of Chagas disease: what has been achieved? What remains to be done with regard to diagnosis and follow up studies? Mem. do Inst. Osw. Cruz. 2009. 104, (supl. 1), 115-121.

Gonzalez VD, et al. Immunodiagnosis of Chagas disease: Synthesis of three latex-protein complexes containing different antigens of *Trypanosoma cruzi*. Colloids Surface B Biointerfaces. 2010. 77, 1, 12-17.

Goto Y, Carter D, Reed SG. Immunological dominance of *Trypanosoma cruzi* tandem repeat proteins. Infect. and Immun. 2008. 76, 9, 3967-3974.

Goubau P., et al. Confirmatory strategy of hepatitis C serology based on two screening assays in a diagnostic setting. Acta Clin. 1997. 52, 1, 31-35.

Governo do Estado de São Paulo. Secretaria da Saúde. SUCEN - Superintendência de Controle de Endemias. [homepage na internet]. [Acesso em: 30 nov 2017]. Disponível em: <<http://www.saude.sp.gov.br/sucen-superintendencia-de-controle-de-endemias/centros-nucleos-e-laboratorios/laboratorio-de-imunoepidemiologia>>.

Greiner, M.; Pfeiffer, D.; Smith. R. D. Principles and practical application of the receiver-operating characteristic analysis for diagnostic tests. Prev Veter Medic. 2000. 45, 1/2, 23-41.

Gruber A & Zingales B. *Trypanosoma cruzi*: characterization of two recombinant antigens with potential application in the diagnosis of Chagas' disease. Exp Parasitol. 1993. 76 (1), 1-12.

Hames, BD. Gel electrophoresis of proteins. A pratical approach. Thrid edition. Oxford University Press. 1998. ISBN 0-19-963075-5.

Heise N, Raper J, Buxbaum LU, Peranovich TM, de Almeida ML. Identification of complete precursors for the glycosylphosphatidylinositol protein anchors of

- Trypanosoma cruzi*. J Biol Chem. 1996. 271, 28, 16877-16887.
- Hernandez M, Pozo L, Gomez I, Melchor A. Chimeric synthetic peptide as antigen for immunodiagnosis of HIV-1 infection. Biochem Biophys Res Commun. 2000a. 272:259–262.
- Hernandez M, Selles ME, Pozo PL, Gomez I, Melchor A. Antigenicity of chimeric synthetic peptides based on HTLV-1 antigens and the impact of epitope orientation. Biochem Biophys Res Commun. 2000b. 276: 1085–1088.
- Hernandez MM, Castellanos PP, Marquez BY, Pozo PL, Diaz NJ, Gonzalez Lopez LJ. Chimeric synthetic peptides containing two immunodominant epitopes from the envelope gp46 and the transmembrane gp21 glycoproteins of HTLV-I virus. Biochem Biophys Res Commun. 2001a. 289:1–6.
- Hernandez MM, Castellanos PP, Marquez BY, Pozo PL, Diaz NJ, Gonzalez Lopez LJ. Chimeric synthetic peptides from the envelope (gp46) and the transmembrane (gp21) glycoproteins for the detection of antibodies to human T-cell leukemia virus type II. Biochem Biophys Res Commun. 2001b. 289:7–12.
- Hernández P. et al. Highly effective serodiagnosis for Chagas' disease. Clin Vaccine Immunol. 2010. 17, 10, 1598-1604.
- Herwaldt BL, Juranek DD. Laboratory-acquired malaria, leishmaniasis, trypanosomiasis, and toxoplasmosis. Am J Trop Med Hyg. 1993. 48, 3, 313-323.
- Hoare R, Thompson KD, Herath T, Collet B, Bron JE, Adams A. Development, characterisation and application of monoclonal antibodies for the detection and quantification of infectious salmon anaemia virus in plasma samples using Luminex bead array technology. PLoS One. 2016. 11: e0159155.
- Hofflin JM. et al. Laboratory-acquired Chagas disease. Transact Royal Soc Trop Med Hyg. 1987. 81, 3, 437-440.
- Honigberg BM. Evolutionary and systematic relationships in the flagellate order Trichomonadida Kirby. J Protozool. 1963. 10, 20-63.
- Horan PK, Wheelless LL. Quantitative single cell analysis and sorting. Science. 1977. 198, 4313, 149-157.
- Houghton RL, et al. A multi-epitope synthetic peptide and recombinant protein for the detection of antibodies to *Trypanosoma cruzi* in radioimmunoprecipitation-confirmed and consensus-positive sera. J Infect Dis. 1999. 179, 5, 1226-1234.
- Hotez PJ, Molyneux DH, Fenwick A, Kumaresan J, Sachs SE, Sachs JD, Savioli L. Control of neglected tropical diseases. The new England Journal of Medicine. 2007. 357:1018-1027.
- Hotez, P. J. et al. Chagas Disease: “The New HIV/AIDS of the Americas”. PLoS Neglected Tropical Diseases. 2012. 6, 5, e1498.
- Ibañez CF, et al. Multiple *Trypanosoma cruzi* antigens containing tandemly repeated

amino acid sequence motifs. *Molec Biochem Parasitol.* 1988. 30, 1, 27-33.

lenne S, Pedroso A, Carmona EFR, Briones MR, Zingales B. Network genealogy of 195-bp satellite DNA supports the superimposed hybridization hypothesis of *Trypanosoma cruzi* evolutionary pattern. *Infect Genet Evol.* 2010. 10: 601–606.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Projeção da população do Brasil por sexo e idade para o período 2000/2060 e projeção da população das Unidades da Federação por sexo e idade para o período 2000/2030. Brasília: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. 2013.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). [homepage na internet]. Municípios da Amazônia Legal. Brasília: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. 2014. [Acesso em: 12 fev 2018]. Disponível em: <<https://ww2.ibge.gov.br/home/geociencias/geografia/amazonialegal.shtm?c=2>>.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). [homepage na internet]. Mapas Políticos dos Estados. Brasília: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. 2015. [Acesso em: 30 de jan 2018]. Disponível em: <<https://www.ibge.gov.br/geociencias-novoportal/cartas-e-mapas/mapas-estaduais/15978-mapas-politicos-dos-estados.html?=&t=downloads>>.

Izquierdo L, et al. Evaluation of a chemiluminescent enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of *Trypanosoma cruzi* infection in a nonendemic setting. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2013. 108, 7, 928-931.

Jacobson R. Validation des épreuves sérologiques pour le diagnostic des maladies infectieuses. *Rev Sci Tech.* 1998.17, 2, 487-506.

Janissen R, Sahoo PK, Santos CA., da Silva AM, von Zuben AAG, Souto DEP, Costa ADT, Celedon P, Zanchin NIT, Almeida DB et al. InP Nanowire Biosensor with Tailored Biofunctionalization: Ultrasensitive and Highly Selective Disease Biomarker Detection. *Nano Lett.* 2017. 17, 5938–5949.

Junqueira ACV, Chiari E, Wincker P. Comparison of the polymerase chain reaction with two classical parasitological methods for the diagnosis of Chagas disease in an endemic region of north-eastern Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1996. 90:129-32.

Junqueira ACV, Albajar PV, Coura JR. Enfermedad de Chagas en la Amazonia brasileña. In F Guhl, Primer Taller Internacional sobre control de la Enfermedad de Chagas. Universidad de los Andes. 2005. 277-287pp.

Junqueira ACV et al. Manual de capacitação na detecção de *Trypanosoma cruzi* para microscopistas de malária e laboratoristas da rede pública. 2011. 2ª ed. SCV/ICICT.

Kesper N, et al. Immunoblot analysis of trypomastigote excreted-secreted antigens as a tool for the characterization of *Trypanosoma cruzi* strains and isolates. *J Parasitol.* 2000. 86, 4, 862-867.

Kohl L, Gull K. Molecular architecture of the trypanosome cytoskeleton. *Mol Biochem Parasitol.* 1998. 93, 1, 1-9.

Kransdorf EP, Zakowski PC, Kobashigawa JA. Chagas disease in solid organ and heart transplantation. *Infect Dis.* 2014. v. 27, 5, 418-424.

Kinoshita-Yanaga AT, Toledo MJO, Araújo SM, Vier BP, Gomes ML. Infecção acidental pelo *Trypanosoma cruzi* acompanhada pela reação em cadeia da polimerase: relato de caso. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo.* 2009. 51(5): 295-298. [Acesso em: 20 nov 2017]. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0036-46652009000500011&lng=pt.](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0036-46652009000500011&lng=pt.)>.

Kirchhoff LV, et al. Increased specificity of serodiagnosis of Chagas' disease by detection of antibody to the 72- and 90-kilodalton glycoproteins of *Trypanosoma cruzi*. *J Infect Dis.* 1987. 155, 3, 561-564.

Kirchhoff LV, Paredes P, Lomeli-Guerrero A, Paredes-Espinoza M, Ron-Guerrero CS, Delgado-Mejia M, Pena-Munoz JG. Transfusion-associated Chagas disease (American trypanosomiasis) in Mexico: implications for transfusion medicine in the United States. *Transfusion.* 2006. 46:298–304.

Kirchhoff LV, Votava JR, Ochs DE, Moser DR. Comparison of PCR and microscopic methods for detecting *Trypanosoma cruzi*. *J Clin Microbiol.* 1996. 34:1171-5.

Krieger MA, Almeida E, Oelemann W et al. Use of recombinant antigens for the accurate immunodiagnosis of chagas' disease. *Am Soc Trop Med Hyg.* 1992. 46, 427–434.

Krieger MA, Salles JM, Almeida E, Linss J, Bonaldo MC, Goldenberg S. Expression and polymorphism of a *Trypanosoma cruzi* gene encoding a cytoplasmic repetitive antigen. *Exp Parasitol.* 1990. 70: 247-254.

Kurien BT, Scofield RH. Western blotting. *Methods.* 2006. 38(4): 283-93.

Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970. 227:680-685.

Lanar DE, Manning JE. Major surface proteins and antigens on the different in vivo and in vitro forms of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol.* 1984. 11, 119-131.

Lafaille JJ, Linss J, Krieger MA, Padron TS, Souza W, Goldemberg S. Structure and expression of two *Trypanosoma cruzi* genes encoding antigenic proteins with repetitive epitopes. *Molec Biochem Parasitol.* 1989. 35: 127-136.

Leilby DA, Wendel S, Takaoka DT, Fachini RM, Oliveira LC, Tibbals MA. Serologic testing for *Trypanosoma cruzi*: comparison of radioimmunoprecipitation assay with commercially available indirect immunofluorescence assay, indirect hemagglutination assay, and enzyme-linked immunosorbent assay kits. *J Clin Microbiol.* 2000. 38:639–642.

Levin MJ et al. Identification of major *Trypanosoma cruzi* antigenic determinants in chronic Chagas' heart disease. *Am J Trop Med Hyg.* 1989. 41, 5, 530-538.

- Levin MJ et al. Recombinant antigens and Chagas disease diagnosis: analysis of a workshop. *FEMS Microbiol Immunol*. 1991. 89, 11–20.
- LIAC Central Sorológica. [homepage na internet]. *BioInfo. Doença de Chagas Central de Triagem Laboratorial de Doadores (CTLD)*. [Acesso em: 30 de nov 2017]. Disponível em: <[http://www.liacentralsorologica.com.br/noticias\\_chagas.html](http://www.liacentralsorologica.com.br/noticias_chagas.html)>.
- Lima L, Espinosa-Álvarez O, Ortiz PA, Trejo-Varón JA, Carranza JC, Pinto CM, Serrano MG, Buck GA, Camargo EP, Teixeira MM. Genetic diversity of *Trypanosoma cruzi* in bats, and multilocus phylogenetic and phylogeographical analyses supporting Tcbat as an independent DTU (discrete typing unit). *Acta Trop*. 2015. 151:166-77.
- Lobato, F. Agência Fiocruz de Notícias: saúde para todos. Especialista da Fiocruz comenta avaliação do Plano Brasil Sem Miséria. *Fiocruz*. 2017. [Acesso em: 03 jan 2018]. Disponível em: <<https://agencia.fiocruz.br/especialista-da-fiocruz-comenta-avaliacao-do-plano-brasil-sem-miseria>>.
- Luquetti AO, Rassi A. Diagnosis and treatment of the infection by *Trypanosoma cruzi*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2000. 95: 37-47.
- Luquetti AO, Schmunis G. Diagnosis of *T. cruzi* infection. In: Telleria AJ, Tiabyrenc M. (Org.). *American Trypanosomiasis. Chagas Disease One Hundred Years of Research*. Elsevier. 2010. 743-747.
- Luz ZMP, Coutinho MG, Cançado JR, Krettli AUI. Hemocultura: técnica sensível na detecção de *Trypanosoma cruzi* em pacientes chagásicos na fase crônica da doença de Chagas. *Rev Soc Bras Med Trop*. São Paulo. 1994. 27:134-8.
- Luz JGG, Souto DEP, Machado-Assis GF, de Lana M, Kubota LT, Luz RCS, Damos FS, Martins HR. Development and Evaluation of a SPR-based Immunosensor for Detection of Anti-*Trypanosoma cruzi* Antibodies in Human Serum. *Sens Actuators B Chem*. 2015. 212, 287–296.
- Luz, J.G.G.; Souto, D.E.P.; Machado-Assis, G.F.; de Lana, M.; Luz, R.C.S.; Martins-Filho, O.A.; Damos, F.S.; Martins, H.R. Applicability of a novel immunoassay based on surface plasmon resonance for the diagnosis of Chagas disease. *Clin. Chim. Acta*. 2016. 454, 39–45.
- Magalhães LM, Viana A, Chiari E, Galvão LM, Gollob KJ, Dutra WO. Differential Activation of Human Monocytes and Lymphocytes by Distinct Strains of *Trypanosoma cruzi*. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015. 6; 9 (7): e0003816.
- Malchiodi EL, et al. Cross-reactivity studies and differential serodiagnosis of human infections caused by *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania spp*; use of immunoblotting and ELISA with a purified antigen (Ag163B6). *Clin. Exp. Immunol*. 1994. 97,3, 417-423.
- Marsden PD, Mott KE, Prata A. The prevalence of *Trypanosoma cruzi* parasitemia in 8 families in a endemic area. *Gaz Med*. 1969. 69:65-69.
- Maranhão, Secretaria de Estado da Saúde. [homepage na internet]. Notícias on-line. 2011. [Acesso em: 22 dez 2017]. Disponível em: <<http://www.saude.ma.gov.br/index.php?>>.

Marin-Neto JA, Cunha-Neto E, Maciel BC, Simoes MV. Pathogenesis of chronic Chagas heart disease. *Circulation*. 2007. 115: 1109 - 1123.

Matsumoto TK, Cotrim PC, Franco da Silveira J, Stolf AMS, Umezawa ES. *Trypanosoma cruzi*: isolation of a immunodominant peptide of TESA (trypomastigote excreted-secreted antigens) by gene cloning. *Diag Microbiol Infec Dis*. 2002. 39: 169-176.

Maekelt GA. A modified procedure of xenodiagnoses for Chagas disease. *Am J Trop Med Hyg*. 1964. 13:11-5.

Maciocco G. From Alma Ata to the Global Fund: The History of International Health Policy. *Soc. Med*. 2008. 3(1):36-48. [Acesso em: 13 dez 2017]. Disponível em: <<http://journals.sfu.ca/socialmedicine/index.php/socialmedicine/article/view/186/380>>

Marcili A, Lima L, Cavazzana M, Junqueira AC, Veludo HH, Maia Da Silva F, et al. A new genotype of *Trypanosoma cruzi* associated with bats evidenced by phylogenetic analyses using SSU rDNA, cytochrome b and Histone H2B genes and genotyping based on ITS1 rDNA. *Parasitology*. 2009a. 6:641-655.

Marcili, A., Valente, V.C., Valente, S.A., et al. *Trypanosoma cruzi* in Brazilian Amazonia: Lineages TCI and TCIIa in wild primates, *Rhodnius spp.* And in humans with Chagas disease associated with oral transmission. *Int. J. Parasitol*. 2009b. 39, 615-623.

Marsden PD, Mott KE, Prata A. The prevalence of *Trypanosoma cruzi* parasitemia in 8 families in an endemic area. *Gaz Med Bahia*. 1969. 69:65-9.

Martins C et al. Identification of genes encoding hypothetical proteins in open-reading frame expressed sequence tags from mammalian stages of *Trypanosoma cruzi*. *Gen Mol Res*. 2011. 10, 3, 1589-1630.

Maslov DA, Podlipaev SA, Lukes J. Phylogeny of the kinetoplastida: taxonomic problems and insights into the evolution of parasitism. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2001. 96, 3, 397-402.

Medicina Geriátrica. [homepage na internet]. Insuficiência Cardíaca. 2008. [Acesso em: 25 nov 2017]. Disponível em: <<http://www.medicinageriatrica.com.br/tag/aumento-do-coracao/>>.

Médecins Sans Frontières. [homepage na internet]. Campaign for Access to Essential Medicines. International meeting: new diagnostic tests are urgently needed to treat patients with Chagas disease. *Rev Soc Bras Med. Trop*. 2008. 41:315–319.

Médicos Sem Fronteiras. [homepage na internet]. O assunto é doenças negligenciadas. 2012a. [Acesso em: 11 dez 2017]. Disponível em: <<https://www.msf.org.br/noticias/o-assunto-e-doencas-negligenciadas>>.

Médicos Sem Fronteiras. [homepage na internet]. MSF lança relatório sobre doenças negligenciadas. 2012b. [Acesso em: 11 dez 2017]. Disponível em: <<https://www.msf.org.br/noticias/msf-lanca-relatorio-sobre-doencas-negligenciadas>>.

Médicos Sem Fronteiras. [homepage na internet]. Fighting Neglect. 2012c. [Acesso em: 12 dez 2017]. Disponível em: <<https://www.msf.org.br/content/fighting-neglect>>.

Melo CS, Greco OT. Carlos Chagas, o Imortal. Revista Latino-Americana de Marcapasso e Arritmia (Relampa). 22 (2): 50-51. 2009. [Acesso em: 25 nov 2017]. Disponível em: <[http://relampa.org.br/detalhe\\_artigo.asp?id=666](http://relampa.org.br/detalhe_artigo.asp?id=666)>.

Merckmillipore. [homepage na internet]. Humana Press, New York, NY. Novagen. pET System Manual 11th Edition. User Protocol TB055 Rev. C 0611JN. P.1-63. 2011. [Acesso em: 11 abr 2014]. Disponível em: <[http://www.merckmillipore.com/BR/pt/product/pET-Expression-System-28-Novagen,EMD\\_BIO-70777#anchor\\_VMAP](http://www.merckmillipore.com/BR/pt/product/pET-Expression-System-28-Novagen,EMD_BIO-70777#anchor_VMAP)>.

Messenger L.A., Miles M.A., Bern C. Between a bug and a hard place: *Trypanosoma cruzi* genetic diversity and the clinical outcomes of Chagas disease. Expert Rev Anti Infect Ther. 2015. 13, 995-1029.

Miller MB, Tang YW. Basic concepts of microarrays and potential applications in clinical microbiology. Clin Microb Reviews. 2009. 22, 4, 611-633.

Molyneux DH, Hotez PJ, Fenwick A. "Rapid-Impact Interventions": How a Policy of Integrated Control for Africa's Neglected Tropical Diseases Could Benefit the Poor. PLOS Medic. 2005. 2 (11): e336.

Moncayo, A. & Luquetti, A.O. Multicentre double blind study for evaluation of *Trypanosoma cruzi* defined antigens as diagnostic reagents. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 1990. 85, 489-495.

Monteiro WM, Magalhaes LK, de Sa AR, et al. *Trypanosoma cruzi* IV causing outbreaks of acute Chagas disease and infections by different haplotypes in the Western Brazilian Amazonia. PLoS One. 2012. 7, e41284.

Monteiro WM, Magalhaes LK, Santana Filho FS, Borborema M, Silveira H, Barbosa M. *Trypanosoma cruzi* TcIII/Z3 genotype as agent of an outbreak of Chagas disease in the Brazilian Western Amazonia. Trop Med Int Health. 2010. 15, 1049-1051.

Monteiro WM, Margioto Teston AP, Gruending AP, Dos RD, Gomes ML, de Araujo SM, Bahia MT, Magalhães LKC, Guerra JAO, Silveira H, Toledo MJO, Barbosa MG. *Trypanosoma cruzi* I and IV stocks from Brazilian Amazon are divergent in terms of biological and medical properties in mice. PLoS Negl Trop Dis. 2013. 7(2): e2069.

Montoya R, Dias JC, Coura JR. Chagas disease in a community in southeast Brazil. I. A serologic follow-up study on a vector controlled area. Rev Inst Med Trop. 2003. 45, 5, 269-274.

Moreira OC, Ramirez JD, Velaquez E, Melo MFAD, Ferreira CL, Guhl F. et al. Towards the establishment of a consensus real-time qPCR to monitor *Trypanosoma cruzi* parasitemia in patients with chronic Chagas disease cardiomyopathy: A substudy from the BENEFIT trial. Acta Trop. 2013. 125, 23-31.

Morel CM. A pesquisa em saúde e os objetivos do milênio: desafios e oportunidades globais, soluções e políticas nacionais. *Ciênc. Saúde Colet.* 2004. 9 (2): 261-270. [Acesso em: 18 dez 2017]. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S1413-81232004000200002>>.

Morel CM. Inovação em saúde e doenças negligenciadas. *Cad. Saúde Pública.* 2006. 22(8):1522-1523. [Acesso em: 13 dez 2017]. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/csp/v22n8/01.pdf>>.

Moser DR, Kirchhoff LV, Donelson JE. Detection of *Trypanosoma cruzi* by DNA amplification using the polimerase chain reaction. *J Clin Microbiol.* 1989. 27:1477-82.

Mott KE et al. Parasitic diseases and urban development. *Bulletin of the World Health Organization.* 1990. 68:691–698.

Muia RP et al. Identification of glycoproteins targeted by *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase, a virulence factor that disturbs lymphocyte glycosylation. *Glycobiology.* 2010. v. 20, 7, 833-842.

Mucci J, Carmona SJ, Volcovich R, Altcheh J, Bracamonte E, Marco JD, et al. Next-generation ELISA diagnostic assay for Chagas Disease based on the combination of short peptidic epitopes. *PLoS Negl Trop Dis.* 2017. 11(10): e0005972.

Murcia L, et al. Diagnóstico y tratamiento de la enfermedad de Chagas. *Enferm Infecc Microb Clin.* 2013. 31, (suppl. 1), 26-34.

Nações Unidas. [homepage na internet]. The Millennium Development Goals Report 2015. United Nations. New York. 2002. [Acesso em: 05 dez 2018]. Disponível em: <[www.un.org/millenniumgoals](http://www.un.org/millenniumgoals)>.

Nações Unidas. [homepage na internet]. Transformando nosso mundo: a agenda 2030 para o desenvolvimento sustentável. Nações Unidas no Brasil. 2015. [Acesso em: 18 dez 2018]. Disponível em: <<http://nacoesunidas.org/pos2015/agenda2030/>>.

Nakazawa N, Rosa D, Pereira VRA, Moura MO, Furtado VC, Souza WV, Barros MNS, Abath FGC, Gomes YM. Excretory-secretory antigens of *Trypanosoma cruzi* are potentially useful for serodiagnosis of chronic Chagas' disease. *Clinical Diagnostic Laboratory Immunology.* 2001. 8:1024-1027.

National Center for Biotechnology Information (NCBI). Basic Local Alignment Search Tool (Blast). Disponível em: <<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>>.

Nielsen H. Predicting Secretory Proteins with SignalP. In: Kihara D. (eds) Protein Function Prediction. *Meth.in Molec. Biol.* 2017. vol 1611.

Nisida IV. et al. A survey of congenital Chagas' disease, carried out at three health institutions in São Paulo City, Brazil. *Rev Ins Med Trop São Paulo.* 1999. 41, 5, 305-311.

Novagen. pET28a-c(+) vectors. [Acesso em: 11 abr 2014]. Disponível em: <<https://www.staff.ncl.ac.uk/p.dean/pET28.pdf>>.

Oelemann WM, et al. A recombinant peptide antigen line immunoassay optimized for the confirmation of Chagas' disease. *Transfusion*. 1999. v. 39, n. 7, p. 711-717.

Oelemann WMR, Teixeira MGM, Costa GCV, Pereira JB, Castro JAF, Coura JR. Evaluation of Three Commercial Enzyme-Linked Immunosorbent Assays for Diagnosis of Chagas' Disease. *Journ. of Clin. Microb.* 1998. 36(9); p: 2423-2427.

Opperdoes FR, Borst P. Localization of nine glycolytic enzymes in a microbody-like organelle in *Trypanosoma brucei*: the glycosome. *FEBS Lett.* 1977. v. 80, n. 2, p. 360-364.

Organização Mundial de Saúde. Chagas disease. Elimination of transmission, Uruguay. *Weekly Epidemiological Record*. 1994. 59:38-40.

Organização Mundial de Saúde. Chagas disease. Interruption of transmission, Chile. *Weekly Epidemiological Record*. 1995. 70:13-16.

Organização Mundial da Saúde. Ad hoc Committee on Health Research relating to future intervention options: investing in health research and development. 1996.

Organização Mundial da Saúde. Control of Chagas disease. Second report of the WHO Expert Committee. 2002.

Organização Mundial da Saúde. Control and prevention of Chagas disease in Europe. 2009.

Organização Mundial da Saúde. Chagas disease in Latin America: an epidemiological update based on 2010 estimates. *The Weekly Epidemiological Record*, Geneva. 2015. 90, 6, 33-43.

Organização Mundial da Saúde. WHO Library Cataloguing-in-Publication Data. Research priorities for Chagas disease, human African trypanosomiasis and leishmaniasis. Technical Report of the TDR Disease Reference Group on Chagas Disease, Human African Trypanosomiasis and Leishmaniasis. 2012. No. 975.

Organização Mundial da Saúde. Maternal death surveillance and response: information for action to prevent maternal death. Geneva. 2013.

Organização Mundial da Saúde. Integrating neglected tropical diseases into global health and development: fourth WHO report on neglected tropical diseases. World Health Organization. 2017. ISBN 978-92-4-156544-8. 267p.

Organização Mundial da Saúde (OMS). [homepage na internet]. Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases (TDR). Chagas. [Acesso em: 27 nov 2017]. Disponível em: <<http://www.who.int/tdr/diseases-topics/chagas/en/>>.

Organização Pan-americana da Saúde. Guia para vigilância, prevenção, controle e manejo clínico da doença de Chagas aguda transmitida por alimentos. Organização Pan-Americana da Saúde. 2009. (Série de Manuais Técnicos, 12).

Organização Pan-americana de Saúde. [homepage na internet]. Chagas in the Americas for Public Health Workers. Washington. 2014. [Acesso em: 22 dez 2017].

Disponível em: <[http://www.paho.org/hq/index.php?option=com\\_topics&view=article&id=10&Itemid=40743](http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_topics&view=article&id=10&Itemid=40743)>.

Organização Pan-americana de Saúde. Organização Mundial de Saúde. Organization-World Health Organization Health in the Americas 2007; Regional, scientific, and technical publication 622. Pan American Health Organization. 2007.

Organização Pan-Americana de Saúde. Organização Mundial da Saúde. Curso de capacitação para detecção do *Trypanosoma cruzi*. 2010. Módulo I. 46p. [Acesso em: 22 dez 2017]. Disponível em: <[http://www.paho.org/bra/index.php?option=com\\_docman&task=doc\\_download&gid=823&Itemid=423](http://www.paho.org/bra/index.php?option=com_docman&task=doc_download&gid=823&Itemid=423)>.

Ostermayer AL, De Castro AM. Diagnóstico sorológico da doença de Chagas. In Dias JCP, Coura JR. org. Clínica e terapêutica da doença de Chagas: uma abordagem prática para o clínico geral. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ. 1997. 486 p. ISBN 85-85676-31-0. <<http://books.scielo.org>>.

Otani MM, Vinelli E, Kirchhoff LV et al. Who comparative evaluation of serologic assays for chagas disease. Transfusion. 2009. 49, 1076–1082.

Otani MM, Hockley J, Bracho CG, Rijpkema S, Luquetti AO, Duncan R, Rigsby P, Albajar-Viñas P, Padilla A. Evaluation of two International Reference Standards for antibodies to *Trypanosoma cruzi* in a WHO collaborative study. Expert Committee on Biological Standardization. 2011. WHO/BS/2011.2181.

Otto TD, Catanho M, Degrave W, de Miranda AB. The PDTIS bioinformatics platform: from sequence to function. RECIIS: Rev Eletr Com Inf Inov Saúde (Suppl). 2007. 1:286-94.

Paba J, et al. Proteomic analysis of the human pathogen *Trypanosoma cruzi*. Proteomics. 2004. 4, 4, 1052-1059.

Pan AA et al. Clinical evaluation of an EIA for the sensitive and specific detection of serum antibody to *Trypanosoma cruzi* (Chagas' disease). J Infect Dis. 1992. 165, 3, 585-588.

Pan AA, Prat DM. Amastigote and epimastigote stage-specific components of *Trypanosoma cruzi* characterized by using monoclonal antibodies. Purification and molecular characterization of a 83-kilodalton amastigote protein. J Immunol. 1989. 143: 1001-1008.

Paranhos GS, Santos MRM, Cotrim PC, Rassi A, Jolivet M, Camargo ME, Franco da Silveira J. Detection of antibodies in sera from Chagas disease patients using a *Trypanosoma cruzi* immunodominant recombinant antigen. Parasite Immunol. 1994. 16: 165-169.

Parodi-Talice A. et al. Proteome analysis of the causative agent of Chagas disease: *Trypanosoma cruzi*. Intern. J. Parasitol. 2004. 34, 8, 881-886.

Pastini AC, Iglesias SR, Carricarte VC, Guerin ME, Sanchez DO, Frascch AC. Immunoassay with recombinant *Trypanosoma cruzi* antigens potentially useful for screening donated blood and diagnosing Chagas' disease. Clin Chem. 1994. 40: 1893-1897.

Pineda JP, Luquetti A. Comparação entre o xenodiagnóstico clássico e artificial na fase crônica da doença de Chagas. Rev Soc Bras Med Trop. 1998. 31:473-80.

Peralta JM, et al. Serodiagnosis of Chagas' disease by enzyme-linked immunosorbent assay using two synthetic peptides as antigens. J Clin Microbiol. 1994. 32, 4, 971-974.

Pereira, S.V.; Bertolino, F.A; Fernández-Baldo, M.A; Messina, G.A; Salinas, E.; Sanz, M.I; Raba, J. A microfluidic device based on a screen-printed carbon electrode with electrodeposited gold nanoparticles for the detection of IgG anti-*Trypanosoma cruzi* antibodies. Analyst. 2011. 136, 4745–4751.

Picka MCM, Domingos AM, Carvalho TB, Peresi E, Machado-Marcondes J. Definition of a diagnostic routine in individual with inconclusive serology for Chagas' disease. Braz J Infect Dis. 2007. 11(2):226-233.

Pirard M., et al. The validity of serologic tests for *Trypanosoma cruzi* and the effectiveness of transfusional screening strategies in a hyperendemic region. Transfusion. 2005. 45, 4, 554-561.

Pinto AYN, Valente AS, Valente VC, Ferreira Jr AG, Coura JR. Fase aguda da doença de Chagas na Amazônia brasileira: Estudo de 233 casos do Pará, Amapá e Maranhão observados entre 1988 e 2005. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 2008. 41 (6): 602-14.

Pinto CM, Kalko EK, Cottontail I, Wellinghausen N, Cottontail VM. TcBat a bat-exclusive lineage of *Trypanosoma cruzi* in the Panama Canal Zone, with comments on its classification and the use of the 18S rRNA gene for lineage identification. Infect Genet Evol. 2012. 12(6):1328-32.

Pinto CM, Ocana-Mayorga S, Tapia EE, Lobos SE, Zurita AP, Aguirre-Villacis F, et al. Bats, Trypanosomes, and Triatomines in Ecuador: New Insights into the Diversity, Transmission, and Origins of *Trypanosoma cruzi* and Chagas Disease. PLoS One. 2015. 10(10):e0139999. pmid:26465748.

Portela-Lindoso AA, Shikanai-Yasuda MA. Chronic Chagas' disease: from xenodiagnosis and hemoculture to polymerase chain reaction. Rev Saude Publica. 2003. 37(1):107–115.

Praast G, et al. Evaluation of the Abbott ARCHITECT Chagas prototype assay. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease. 2011. v. 69, n. 1, p. 74-81.

Prata A. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. Lancet Infect Dis. 2001.1: 92-100.

Proctologia y Pisopelvico. Megacolon. [Acesso em: 25 nov 2017]. Disponível em: <<http://proctologiaypisopelvico.com/megacolon/>>.

Ramírez JD, Hernández C, Montilla M, Zambrano P, Flórez AC, Parra E, et al. First Report of Human *Trypanosoma cruzi* Infection Attributed to TcBat Genotype. Zoonoses Public Health. 2013. 61:477-479.

Ramírez JD, Tapia-Calle G, Muñoz-Cruz G, Poveda C, Rendon LM, Hincapie E, et al. Trypanosome species in neo-tropical bats: biological, evolutionary and epidemiological implications. *Infect Genet Evol.* 2014. 22:250–6. pmid:23831017.

Ramírez JC, Cura CI, Moreira C, Lages-Silva E, Juiz N, Velázquez E, et al. Analytical Validation of Quantitative Real-Time PCR Methods for Quantification of *Trypanosoma cruzi* DNA in Blood Samples from Chagas Disease Patients. *J Mol Diagn.* 2015. 17:605–15.

Rassi A, Rassi A Jr, Rassi GG. Fase aguda da doença de Chagas. In: Brener Z, Andrade ZA, Barral-Netto M, eds. *Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas. 2000. 2nd edn. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 231–45 (in Portuguese).

Rassi A. Jr., Rassi A, Marin-Neto JA. Chagas disease. *Lancet.* 2010. 375(9723):1388-402.

Rassi A Jr., Rassi A., Marcondes de Rezende J. American trypanosomiasis (Chagas disease). *Infect. Dis. Clin. of North America.* 2012. 26, 2, 275-291.

Reed SG, Badaro R, Lloyd RM. Identification of specific and cross-reactive antigens of *Leishmania donovani* chagasi by human infection sera. *J Immunol.* 1987. 138, 5, 1596-1601.

Reiche EM, et al. Evaluation of the Western blot in the confirmatory serologic diagnosis of Chagas' disease *Am J Trop Med Hyg* 1998. 59, 5, 750-756.

Reimer LJ, Adams ER, Paine MJI, Ranson H, Coleman M, Thomsen EK et al. Fit for purpose: do we have the right tools to sustain NTD elimination? *BMC Proc.* 2015. 9(Suppl 10): S5.

Remesar MC, et al. Estimation of sensitivity and specificity of several *Trypanosoma cruzi* antibody assays in blood donors in Argentina. *Transfusion.* 2009. 49, 11, 2352-2358.

Rey L. *Parasitologia.* 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2001.856 p.

Requena JM, López MC, Alonso C. Genomic repetitive DNA elements of *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol Today* 1996. 12:279-83.

Risso MG, Sartor PA, Burgos JM et al. Immunological identification of *Trypanosoma cruzi* lineages in human infection along the endemic area. *Am Soc Trop Med Hyg.* 84. 2011. 78–84.

Rocha GM, Brandão BA, Mortara RA, Attias M, de Souza W, Carvalho TM. The flagellar attachment zone of *Trypanosoma cruzi* epimastigote forms. *J Struct Biol.* 2006. 154, 1, 89-99.

Romaña C. Acerca de un síntoma inicial de valor para el diagnóstico de la forma aguda de la enfermedad de Chagas: la conjuntivitis schizotripanosómica unilateral: hipótesis sobre la puerta de entrada conjuntival de la enfermedad. *Mision de Estudios de Patología Regional Argentina (MEPRA).* 1935. 22:16-25.

- Rosfjord EC, et al. Analysis of antibody cross-reactivity in experimental American trypanosomiasis. *J Parasitol.* 1990. 76, 5, 698-702.
- Roy A, Kucukural A, Zhang Y. I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nat Protoc.* 2010. 5: 725-738.
- Russomando G, Figueredo A, Almirón M, Sakamoto M, Morita K. Polymerase chain reaction-based detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in serum. *J Clin Microbiol* 1992; 30(11): 2864-8.
- Russomando G, Almirón M, Candia N, Franco L, Sánchez Z, de Guillen I. Implementation and evaluation of a locally sustainable system of prenatal diagnosis to detect cases of congenital Chagas disease in endemic areas of Paraguay. *Rev Soc Bras Med Trop* 2005. 38(2): 49-54.
- Russomando G, de Tomassone MM, de Guillen I, Acosta N, Vera N, et al. Treatment of congenital Chagas' disease diagnosed and followed up by the polymerase chain reaction. *Am J Trop Med Hyg.* 1998. 59: 487–491.
- Sabino E, et al. Evaluation of Chagas INNOLIA assay as a confirmatory test for Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1997. 92, (suppl. 1), 398.
- Saborio JL, Manuel Hernandez J, Narayanswami S, Wrightsman R, Palmer E, Manning J. Isolation and characterization of paraflagellar proteins from *Trypanosoma cruzi*. *J Biol Chem.* 1989. 264, 7, 4071-4075.
- Sáez-Alquezar A. Doença de Chagas: diagnóstico, epidemiologia e CQ. 42º Congresso Brasileiro de Análises Clínicas. 2015. [Acesso em: 30 abr 2018]. Disponível em: <[http://www.pncq.org.br/uploads/2015/workshops\\_aulas/Amadeo%20-%20Chagas%20PNCQ%20Workshop%202015.pdf](http://www.pncq.org.br/uploads/2015/workshops_aulas/Amadeo%20-%20Chagas%20PNCQ%20Workshop%202015.pdf)>.
- Sáez-Alquezar A. Estudo multicêntrico: avaliação do desempenho de conjuntos diagnósticos de hemaglutinação indireta, disponíveis no Brasil para o diagnóstico sorológico da infecção pelo *Trypanosoma cruzi*. *Rev Patol Trop.* 2007. 26, 2, 343-374.
- Sambrook J, Russel D. *Molecular cloning: a laboratory manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2001. New York.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain termination inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 1977. 74, 5463-5467.
- Sanchez MCA. Testes Sorológicos. In: Ferreira AW, Ávila SLM. *Diagnóstico Laboratorial das Principais Doenças Infecciosas e Auto-Imunes.* Guanabara Koogan. 2001. 24-41.
- Sánchez-Camargo, et al. Evaluation of 11 Commercialized Rapid Diagnostic Tests for Detecting *Trypanosoma cruzi* Antibodies in Serum Banks in Areas of Endemicity and Nonendemicity. *J. Clin. Micro.* 2014. 52 (7): 2506–2512.
- Santana RAG, et al. *Trypanosoma cruzi* strain Tc1 is associated with chronic Chagas disease in the Brazilian Amazon. *Parasites & Vectors.* 2014. 7:267.

Santos FLN, Celedon PAF, Zanchin NIT, Brasil TdAC, Foti L, Souza WVd, et al. Performance Assessment of Four Chimeric *Trypanosoma cruzi* Antigens Based on Antigen-Antibody Detection for Diagnosis of Chronic Chagas Disease. PLoS ONE. 2016. 11(8): e0161100.

Santos FLN, Celedon PAF, Zanchin NIT, Souza WVd, da Silva ED, Foti L, et al. Accuracy of chimeric proteins in the serological diagnosis of chronic chagas disease ± a Phase II study. PLoS Negl Trop Dis. 2017. 11(3): e0005433.

Santos, IFM. Transmissão oral da Doença de Chagas: breve revisão. Rev. Ciênc. Méd. Biol. 2014. 13 (2): 226-235.

Santos Lda S, Torres RM, Machado-de-Assis GF, Bahia MT, Martins HR, Teixeira-Carvalho A, Coelho-Dos-Reis JG, Albajar-Viñas P, Martins-Filho OA, Lana Md. *In-house* ELISA method to analyze anti-*Trypanosoma cruzi* IgG reactivity for differential diagnosis and evaluation of Chagas disease morbidity. Rev. Soc Bras Med Trop 2012. 45 (1): 35-44.

Santos, S.O. Eco-Epidemiologia da doença de Chagas aguda na área amazônica. Município de Abaetuba, Estado do Pará, Brasil, 2008-2009. Tese de doutorado. Universidade Federal de ouro Preto. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas. 2013. 179p. [Acesso em: 15 dez 2017]. Disponível em: <[http://www.repositorio.ufop.br/bitstream/123456789/3597/1/TESE\\_Eco-epidemiologiaDoen%C3%A7aChagas.pdf](http://www.repositorio.ufop.br/bitstream/123456789/3597/1/TESE_Eco-epidemiologiaDoen%C3%A7aChagas.pdf)>.

Scharfstein J, Schecheter M, Senna M, Peralta JM, Mendonça-Previato L, Miles MA. *Trypanosoma cruzi* characterization and isolation of a 57/51,000 m.v. surface glycoprotein (GP57/51) expressed by epimastigotes and bloodstream trypomastigotes. J Immun. 1986. 137: 1336-1341.

Schattschneider W. et al. A comparative study of four serological methods for diagnosis of acute and chronic Chagas' disease in Brazilian patients. Trop Geograph Med. 1992. 44 (3): 210-218.

Scherf A, Mattei D, Schreiber M. Parasite antigens expressed in *Escherichia coli*. A refined approach for epidemiological analysis. J Immun. Meth. 1990.128:81-87.

Schijman AG, Bisio M, Orellana L, Sued M, Duffy T, Mejia Jaramillo AM, et al. International study to evaluate PCR methods for detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in blood samples from Chagas disease patients. PLoS Negl Trop Dis 2011; 5(1):e931.

Schmuñis, G. A. Epidemiology of Chagas disease in non-endemic countries: the role of international migration. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2007. 102 (supl. 1): 75-85.

Schmuñis, G. A. The globalization of Chagas disease. 2007a. ISBT Sci. Series 2, 6–11.

Schmuñis, G. A. & Yadon, Z. E. Chagas disease: a Latin American health problem becoming a world health problem. Acta Trop. 2010. 115(1-2):14-21.

Schmuñis, G.A. *Trypanosoma cruzi*, the etiologic agent of Chagas' disease: status in the blood supply in endemic and nonendemic countries. *Transfusion*. 1991. 31: 547-557.

Scott MT, Snary D. American Trypanosomiasis (Chagas' disease). In: Cohen S & Warren K. *Immunology of parasitic infections*. 2ed. Oxford: Blackwell Scientific publications. 1982. 261-298.

Secretaria de Saúde Pública do Estado do Pará (SESPA). Relatório Detalhado Quadrimestral. 3º Quadrimestre/2016 (setembro, outubro, novembro e dezembro). Governo do Pará. 2017.

Sequence Manipulation Suite (SMS): Reverse Translate. [homepage na internet]. [Acesso em: 11 abr 2014]. Disponível em: <[http://www.bioinformatics.org/sms2/rev\\_trans.html](http://www.bioinformatics.org/sms2/rev_trans.html)>.

Shah DO, Chang C-D, Cheng KY, Salbilla VA, Adya N, Marchlewicz BA, Kirchoff LV. Comparison of the analytic sensitivities of a recombinant immunoblot assay and the radioimmune precipitation assay for the detection of antibodies to *Trypanosoma cruzi* in patients with Chagas disease. *Diagnostic Microbiol and Infect Dis*. 2010. 67 402–405.

Shah K, Davis C, Wilson J, Parekh B. Chimeric synthetic peptides as antigens for detection of antibodies to HIV-1 and HIV-2. *East Afr Med. J*. 1996. 73:63–66.

Shaw J, Lainson R, Fraiha H. Considerações sobre a epidemiologia dos primeiros casos autóctones de doença de Chagas registrados em Belém, Pará, Brasil. 1969. *Rev S Pub*. 3(2): 153-7.

Shikanai-Yasuda MA, Carvalho NB. Oral transmission of Chagas disease. *Clin Infect Dis*. 2012. 54(6):845-52.

Silber AM et al. *Trypanosoma cruzi*: specific detection of parasites by PCR in infected humans and vectors using a set of primers (BP1/BP2) targeted to a nuclear DNA sequence. *Experimental Parasitology, New York*. 85 (3): 225-232.

Silva ED. 2003. Padronização da produção do teste para diagnóstico Imunológico da doença de Chagas utilizando as proteínas recombinantes CRA & FRA. Rio de Janeiro. Mestrado em Biologia Molecular – Instituto Oswaldo Cruz. 1997. 60p.

Silva ED, Pereira VA, Gomes JAS, Lorena VMB, Cançado JR, Ferreira AGP, Krieger MA, Goldenberg S, Correa-Oliveira R, Gomes YM. Use of EIE-Recombinant-Chagas-Biomanguinhos kit to Monitor Cure of Human Chagas' Disease. *J Clin Lab Analysis*. 2002. 16:132-136.

Silveira JF. *Trypanosoma cruzi* recombinant antigens for serodiagnosis. In: Wendel S, Brener B, Camargo ME, Rasser A (eds) "Chagas disease (American Trypanosomiasis): its impact on transfusion and clinical medicine". International Society of Blood Transfusion. 1992. 207-217.

Silveira JF. Biologia Molecular do *Trypanosoma cruzi*. Em Brener Z, Andrade ZA e Barral-Netto M. *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. 2ª Edição. Editora Guanabara Koogan. Rio de Janeiro. 2000. 48-74.

Silveira JF, Umezawa ES, Luquetti AO. Chagas' disease recombinant *T. cruzi* antigens for serological diagnosis. Trends in parasitol. 2001.17(6):286-291.

Silveira-Lacerda EP, et al. Chagas' disease: application of TESA-blot in inconclusive sera from a Brazilian blood bank. Vox Sanguinis. 2004. 87(3): 204-207.

Sin MLY, Mach KE, Wong PK, Liao JC. Advances and challenges in biosensor-based diagnosis of infectious diseases. Expert Rev. Mol. Diagn. 2014. 14, 225–244.

Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN). Dados das notificações da doença de Chagas aguda nas regiões brasileiras no ano de 2014. 2014. [Acesso em: 02 fev 2018]. Disponível em: <[www2.datasus.gov.br/DATASUS/index.php?area=0203&id=29878153](http://www2.datasus.gov.br/DATASUS/index.php?area=0203&id=29878153)>.

Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN). Dados das notificações da doença de Chagas aguda nas regiões brasileiras no ano de 2015. 2015. [Acesso em: 02 fev 2018]. Disponível em: <[www2.datasus.gov.br/DATASUS/index.php?area=0203&id=29878153](http://www2.datasus.gov.br/DATASUS/index.php?area=0203&id=29878153)>.

Soares MJ, Souto-Padrón T, Bonaldo MC, Goldenberg S, de Souza W. A stereological study of the differentiation process in *Trypanosoma cruzi*. Parasitol. Research. 1989. 75 (7): 522-527.

Sociedade Brasileira de Medicina Tropical (SBMT). [homepage na internet]. 53º MedTrop: Fórum de Enfrentamento das Doenças Infecciosas e Negligenciadas lança carta em defesa do SUS e dos direitos humanos e sociais. 2017. [Acesso em: 30 nov 2017]. Disponível em: <<http://www.sbmt.org.br/portal/53o-medtrop-forum-de-enfrentamento-das-doencas-infecciosas-e-negligenciadas-lanca-carta-em-defesa-do-sus-e-dos-direitos-humanos-e-sociais/>>.

Souza W de. Electron microscopy of trypanosomes - a historical view. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2008. 103 (4): 313-325.

Sturm NR, Degraeve W, Morel C, Simpson L. Sensitive detection and schizodeme classification of *Trypanosoma cruzi* cells amplification of kinetoplast minicircle DNA sequence: use in diagnosis of Chagas disease. Mol Biochem Parasitol. 1989. 33:205-14.

Teixeira-Carvalho A, et al. FC-TRIPLEX Chagas/Leish IgG1: a multiplexed flow cytometry method for differential serological diagnosis of Chagas disease and leishmaniasis. PLoS One. 2015. 10 (4): e0122938.

Teixeira DE, Benchimol M, Crepaldi PH, de Souza W. Interactive Multimedia to Teach the Life Cycle of *Trypanosoma cruzi*, the Causative Agent of Chagas Disease. PLOS Neglected Tropical Diseases. 2012. 6(8): e1749.

Telleria J, Lafay B, Virreira M, Barnabe C, Tibayrenc M, et al. *Trypanosoma cruzi*: sequence analysis of the variable region of kinetoplast minicircles. *Exp Parasitol*. 2006. 114: 279–288.

Tibayrenc M, Ayala FJ. Towards a population genetics of microorganisms: the clonal theory of parasitic protozoa. *Parasitol. Today*. 1991. 7, 228–232.

The Access to Medicine Index. Haarlem (Netherlands): Access to Medicine Foundation. 2014. [Acesso em: 11 out 2017]. Disponível em: <<http://apps.who.int/medicinedocs/documents/s21637en/s21637en.pdf>>.

Thermo Fisher Scientific. Qubit® Protein Assay Kits. For use with the Qubit® Fluorometer (all models). Catalog nos. Q33211, Q33212. Thermo Fisher Scientific. USA. 2015. [Acesso em: 10 jan 2018]. Disponível em: <[https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/Qubit\\_Protein\\_Assay\\_UG.pdf](https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/Qubit_Protein_Assay_UG.pdf)>.

Thomas MC, García-Pérez JL, Alonso C, López MC. Molecular characterization of KMP11 from *Trypanosoma cruzi*: a cytoskeleton associated protein regulated at the translational level. *DNA Cell Biol*. 2000. 19 (1):47 - 57.

Thomas MC, et al. Mapping of the antigenic determinants of the *T. cruzi* kinetoplastid membrane protein-11. Identification of a linear epitope specifically recognized by human Chagasic sera. *Clinical and Experim Immun*. 2001. 123 (3): 465-471.

Toso MA, Vial UF, Galanti N. Transmisión de la enfermedad de Chagas por vía oral. *Rev Médica de Chile*. 2011. 139 (2): 258-266.

Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1979. 76(9):4350-4.

Umezawa ES., Nascimento MS, Kesper Jr. N, Coura JR, Borges-Pereira J, Junqueira AC, Camargo ME. Immunoblot assay using excreted-secreted antigens of *Trypanosoma cruzi* in serodiagnosis of congenital, acute, and chronic Chagas' disease. *J. Clin. Microbiol*. 1996c. 34:2143–2147.

Umezawa ES, Shikanai-Yasuda MA, Stolf AMS. Changes in isotype composition and antigen of anti-*Trypanosoma cruzi* antibodies from acute to chronic Chagas disease. *J Clin Lab Anal*. 1996a. 10: 407-413.

Umezawa ES, Shikanai-Yasuda MA, Gruber A, Pereira-Chiocolla VL, Zingales B. *Trypanosoma cruzi* defined antigens in the serological evaluation of an outbreak of acute Chagas disease in Brazil (Catolé do Rocha, Paraíba). *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1996b. 91: 87-93.

Umezawa ES et al. Evaluation of recombinant antigens for Chagas disease serodiagnosis in South and Central America. *J of Clinical Microbiol*. 1999. 37:1554–1560.

Umezawa ES, Bastos SF, Coura JR, Levin MJ, Gonzalez A, Rangel-Aldao R, Zingales B, Luquetti AO, Silveira JF. Na improved serodiagnostic test for Chagas' disease employing a mixture of *Trypanosoma cruzi* recombinant antigens. *Transfusion*. 2003. 43:91–97.

Umezawa ES, Luquetti AO, Levitus G, Ponce C, Ponce E, Henriquez D, Revollo S, Espinoza B, Sousa O, Khan B, da Silveira JF. Serodiagnosis of chronic and acute Chagas' disease with *Trypanosoma cruzi* recombinant proteins: results of a collaborative study in six Latin American countries. *J Clin Microbiol*. 2004. 42:449–452.

Vega Benedetti AF, Cimino RO, Cajal PS, Juarez Mdel V, Villalpando CA, Gil JF, Marcipar IS, Krolewiecki AJ, Nasser JR. Performance of different *Trypanosoma cruzi* antigens in the diagnosis of Chagas disease in patients with American cutaneous leishmaniasis from a co-endemic region in Argentina. *Trop Med Int Health*. 2013. 18:1103–1109.

Vera-Cruz JM et al. Molecular diagnosis of Chagas' disease and use of an animal model to study parasite tropism. *Parasitol Research*. 2003. 89 (6): 480-486.

Verissimo da Costa GC, et al. The identification and characterization of epitopes in the 30-34kDa *Trypanosoma cruzi* proteins recognized by antibodies in the serum samples of chagasic patients. *J of Proteomics*. 2013. 80, 34-42.

Viñas PA, Laredo SV, Terrazas MB, Coura JR. Miocardiopatia dilatada em pacientes com infecção chagásica crônica: relato de dois casos fatais autóctones do rio Negro, Estado do Amazonas. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2003. 36(3): 401-7.

Vitelli-Avelar DM, Sather-Avelar R, Wendling APB, Rocha RDR, Carvalho AT, Martins NE, Dias JCP, Rassi A, Luquetti A, Elói-Santos SM, Martins-Filho AO. Non-conventional flow cytometry approaches to detect anti-*Trypanosoma cruzi* immunoglobulin G in the clinical laboratory. *J Immunol Meth*. 2007. 318: 102-112.

Vinicius Foguel, M.; Pilonos Santos, G.; Aparecido Pupim Ferreira, A.; Yamanaka, H.; Vicente Benedetti, A. Amperometric immunosensor for Chagas' disease using gold CD-R Transducer. *Electroanalysis*. 2011. 23, 2555–2561.

Voller A, Draper C, Bidwell DE, Bartlett A. Microplate enzyme-linked immunosorbent assay for Chagas' disease. *Lancet*. 1975. 1, 426-428.

Volta BJ, Russomando G, Bustosa PL, Scollo K, De Rissio AM, Sánchez Z, Cardonia RL, Buac J. Diagnosis of congenital *Trypanosoma cruzi* infection: A serologic test using Shed Acute Phase Antigen (SAPA) in mother–child binomial samples. *Acta Tropica*. 2015. 147, 31-37.

Waegeman H, Soetaert WZ. *J of Industrial Microbiol and Biotech*. 2011. 38 (12): 1891-1910.

Wen JJ, et al. Serum proteomic signature of human chagasic patients for the identification of novel potential protein biomarkers of disease. *Molec and Cell Proteomics*. 2012. 11 (8): 435-452.

Wincker P, Bosseno MF, Britto C, Yaksic N, Cardoso MA, Morel CM, Breniere SF. High correlation between Chagas disease serology and PCR-based detection of *Trypanosoma cruzi* kinetoplast DNA in bolivian children living in an endemic area. FEMS microbiol. 1994. 124:419-24.

Xavier SS, Sousa AS, Hasslocher-Moreno A. Application of the new classification of cardiac insufficiency (ACC/AHA) in chronic Chagas cardiopathy: a critical analysis of the survival curves. Revista SOCERJ. 2005.18 (3): 227-32.

Xavier SS, Sousa AS, Viñas PA, Junqueira ACV, Bóia MN, Coura JR. Cardiopatia chagásica crônica no Rio Negro, estado do Amazonas. Relato de três novos casos autóctones comprovados por exames sorológicos, clínicos, radiográficos do tórax, eletro e ecocardiográficos. Rev Soc Bras Med Trop. 2006. 39(2): 511-6.

Yang J, Yan R, Roy A, Xu D, Poisson J, Zhang Y. The I-TASSER Suite: Protein structure and function prediction. Nat Methods. 2015. 12: 7-8.

Zarate-Blades CR, et al. Diagnostic performance of tests based on *Trypanosoma cruzi* excreted-secreted antigens in an endemic area for Chagas' disease in Bolivia. Diag Microbiol and Infect Dis. 2007. 57 (2): 229-232.

Zhang Y. I-TASSER server for protein 3D structure prediction. BMC Bioinformatics. 2008. 9: 40.

Zingales B. *Trypanosoma cruzi* genetic diversity: Something new for something known about Chagas disease manifestations, serodiagnosis and drug sensitivity. J. Acta Tropica. 2018. 184, 38-52.

Zingales B, Andrade SG, Briones MRS., Campbell DA, Chiari E, Fernandes O, et al. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 2009. 104, 1051–1054.

Zingales B, Miles MA, Campbell DA., et al. The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: rationale, epidemiological relevance and research applications. Infect Gen Evol. 2012. 12, 240-253.

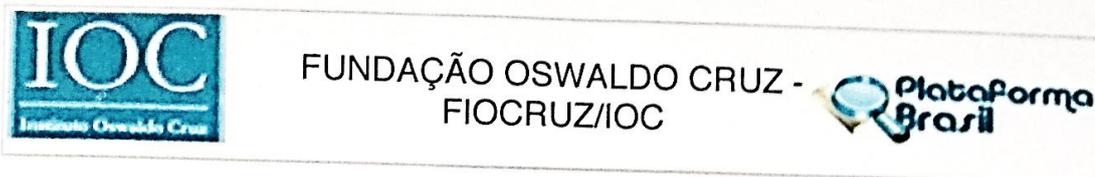
Zingales B, Pereira ME, Oliveira RP, Almeida KA, Umezawa ES, Souto RP. et al. *Trypanosoma cruzi* genome project: biological characteristics and molecular typing of clone CL Brener. Acta Trop. 1997. 68(2): 159-173.

Zingales B, Souto RP, Mangia RH, Lisboa CV, Campbell DA, Coura JR, Jasen A, Fernandes O. Molecular epidemiology of american trypanosomiasis in Brazil based on dimorphism of rRNA and mini-exon gene sequences. International J Parasitol. 1998. 28, 105-112.

Zulantay I, Honores P, Solari A. Apt W, Ortiz S, Osuna A, Rojas A, López B, Sánchez G Use of polymerase chain reaction (PCR) and hybridization assays to detect *Trypanosoma cruzi* in chronic chagasic patients treated with itraconazole or allopurinol. Diag Microbiol Infect Dis. 2004. 48: 253-257.

## 9 ANEXOS

### 9.1 ANEXO A - APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA



#### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

##### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Desenvolvimento de um novo biomarcador multivalente de *T. cruzi* para utilização em testes rápidos serológicos

**Pesquisador:** David William Provance Jr.

**Área Temática:**

**Versão:** 3

**CAAE:** 52892216.8.0000.5248

**Instituição Proponente:** Fundação Oswaldo Cruz

**Patrocinador Principal:** Instituto Oswaldo Cruz-RJ  
MINISTERIO DA CIENCIA, TECNOLOGIA E INOVACAO

##### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 1.896.362

##### Apresentação do Projeto:

O projeto visa o desenvolvimento de um teste rápido para detecção do parasito *Trypanosoma cruzi* causador da Doença de Chagas (DCh) que está entre as doenças, transmissíveis tropicais, mais predominantes na América Latina, a ser utilizado em campo, de alta sensibilidade/ especificidade e fácil execução, que possibilite a cobertura de diagnóstico a uma maior parcela da população exposta ao risco de contrair a infecção que apresenta uma patogenia bastante complexa, sendo caracterizada por duas fases: a fase aguda e a fase crônica. Assim este projeto foi concebido no intuito de reduzir a sequência de codificação dos antígenos recombinantes, pararegiões que serão apenas reconhecidas pelos anticorpos dos pacientes portadores da enfermidade de Chagas, permitindo que mais epítomos possam ser representados em uma proteína recombinante. Com isto, se espera que o desenvolvimento do teste permita maior visibilidade do agravo, com o demonstrativo dos casos positivos, que fortalecerá a necessidade de um programa eficiente no controle da doença nas diferentes regiões e, conseqüentemente, diminuição do impacto social da doença de Chagas.

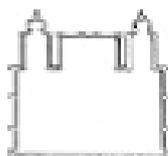
##### Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Principal:

Demonstrar a capacidade de PlatCruzi, que é uma proteína quimérica multi-valente que mimetiza

**Endereço:** Av. Brasil 4036, Sala 705 (Campus Expansão)  
**Bairro:** Manguinhos **CEP:** 21.040-360  
**UF:** RJ **Município:** RIO DE JANEIRO  
**Telefone:** (21)3882-9011 **Fax:** (21)2561-4815 **E-mail:** cepfiocruz@ioc.fiocruz.br

## 9.2 ANEXO B - MODELO DE TCLE (BARCELOS – AM)



Ministério da Saúde  
Fundação Oswaldo Cruz  
Instituto Oswaldo Cruz –  
Laboratório de Doenças Parasitárias  
Tel. (021) 25621278. Telefax: (021)2280-3740

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE) GENÉTICA DA MALÁRIA, DOENÇA DE CHAGAS E LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA NO MÉDIO RIO NEGRO

Estamos convidando-o a participar de um estudo sobre a genética da malária, doença de Chagas e leishmaniose tegumentar americana no médio rio Negro. A Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) está realizando uma pesquisa em Barcelos para avaliar se há pessoas resistentes a ou que são mais susceptíveis à estas doenças e como isso pode impactar no controle das mesmas nesse município. O estudo é coordenado pelo Professor José Rodrigues Coura do Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz, no Rio de Janeiro. Esperamos poder incluir aproximadamente 800 pessoas neste estudo.

A sua participação nesta pesquisa é voluntária. Se você aceitar participar ou permitir que seu filho (menor de 18 anos) faça parte desta pesquisa, vamos lhe fazer algumas perguntas, um exame clínico e depois vamos coletar uma pequena amostra de sangue para estudar os organismos que causam a malária, doença de Chagas e leishmaniose tegumentar americana. Você ou seu filho podem decidir participar ou não do estudo e podem sair dele em qualquer momento sem que haja nenhum problema para você ou seu filho em relação aos serviços médicos prestados pelo sistema de saúde de Barcelos. Se tiver uma das doenças e não quiser participar do estudo, de qualquer forma será medicado seguindo o tratamento oficial do Ministério da Saúde. Você não receberá nenhum pagamento por participar desta pesquisa e também os procedimentos realizados não terão nenhum custo para você. Barcelos é uma cidade muito pequena e não há meios de transporte massivo. Por esse motivo não há necessidade de nenhum tipo de ressarcimento econômico para que os participantes de pesquisa se desloquem até o hospital. De outro lado, a maior parte de pesquisa será baseada na busca ativa nos próprios domicílios dos participantes.

Você ou seu filho podem sentir uma pequena dor no momento de coletar o exame de sangue e as vezes pode ficar um pouco roxo no local da coleta. Os pesquisadores cuidarão para que não existam problemas maiores nestes casos. Se for encontrada alguma doença durante a entrevista, os pesquisadores o encaminharão até o hospital onde será feito o diagnóstico e dados os medicamentos específicos. Às vezes os medicamentos específicos podem causar alguns problemas como mal-estar no estômago, vômito, diarreia, coceira ou manchas na pele; esses problemas, quando acontecem, são geralmente leves e passam sem precisar tomar mais medicamentos. Se o problema continuar ou piorar é preciso que retorne imediatamente ao posto de saúde ou hospital onde será examinado e receberá as orientações necessárias. Esperamos que você ou seu filho não tenham nenhum

tipo de mal-estar como consequência da sua participação no estudo; se tiver alguma consequência negativa, será dada toda a assistência necessária no serviço de saúde até que fique bem. Não está previsto nenhum tipo de indenização por participar da pesquisa.

Os benefícios que você ou seu filho podem ter desta pesquisa tem a ver com receber tratamento sob supervisão de um pesquisador e se você ou seu filho continuarem doentes com malária, doença de Chagas, leishmaniose tegumentar americana ou se outra doença aparecer, saberemos rapidamente e isto poderá ser importante para a sua saúde. Também vamos saber se a população de Barcelos tem alguma susceptibilidade aumentada para ter ou para resistir a uma dessas doenças.

Qualquer informação sobre você ou seu filho será mantida em segredo absoluto por parte dos pesquisadores; nem seu nome ou o de seu filho serão usados em relatórios publicados; em vez disso serão usados códigos para ninguém conhecer as pessoas que fizeram parte da pesquisa. Todos os seus dados ou os dados do seu filho e também o material coletado serão utilizados para esta pesquisa e uma parte do material será armazenado, para se for necessário, utilizarmos em estudos futuros.

Este termo de consentimento está redigido em duas vias de igual teor; uma delas ficará com você ou seu representante legal e a outra será guardada pelos pesquisadores. Se decidir participar do estudo, você ou seu representante legal e o pesquisador deverão dar um visto em todas as páginas deste documento e assinarem a última página.

Qualquer dúvida que você tenha em qualquer etapa do estudo pode ligar e cobrar e entrar em contato com o Dra. Martha Cecília Suarez-Mutis - tel (21) 2562-1278/(21)99682-5379, a Dra. Simone da Silva Santos- tel (21) 2562-1396, a Dra. Ângela Junqueira –Tel (21) 25621492 ou o professor José Rodrigues Coura Tel (21) 25621229.

Qualquer informação que você ou seu filho deseje saber, pode ser perguntada aos pesquisadores do estudo, tanto durante a pesquisa quanto em momentos futuros. Se você tiver também alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa com seres humanos (CEP) da Fundação Oswaldo Cruz/Instituto Oswaldo Cruz, Avenida Brasil 4.036 sala 705 (Expansão) Manguinhos, Rio de Janeiro-RJ - CEP: 21.040-360Tel.: (21) 3882-9011 de segunda a sexta-feira, das 8 às 15 horas, e-mail: [cepfio-cruz@ioc.fiocruz.br](mailto:cepfio-cruz@ioc.fiocruz.br).

### Consentimento

Acredito ter sido bem informado sobre o estudo acima citado que li ou que foram lidos para mim. Eu discuti com os pesquisadores sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação não vai me gerar despesas e que tenho garantia de acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, sem qualquer prejuízo e sem a perda de atendimento nesta Instituição ou de qualquer benefício que eu possa ter adquirido. Além disso, estou

ciente de que eu ou meu representante legal e os pesquisadores responsáveis por esta pesquisa deveremos dar um visto em todas as folhas desse Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE.

Como está previsto que parte do material biológico será armazenado para se for necessário ser utilizado em estudos futuros, eu manifesto expressamente que:

1. (  ) Não concordo em que parte do material biológico coletado seja armazenado para ser utilizado em estudos futuros;

2. (  ) Concordo plenamente em que parte do material biológico coletado seja armazenado para ser utilizado em estudos futuros.

Nesse caso, manifesto que:

2. 1. (  ) A cada nova pesquisa há necessidade de solicitar um novo consentimento de minha parte para utilizar este material biológico;

2. 2 (  ) Dispensar a necessidade de solicitar novo consentimento em caso de uso deste material biológico para outra pesquisa.

\_\_\_\_\_  
Nome

\_\_\_\_\_  
Assinatura

\_\_\_\_\_  
Nome testemunha (digital ou menor idade)

\_\_\_\_\_  
Assinatura

\_\_\_\_\_  
Nome do pesquisador

\_\_\_\_\_  
Assinatura

Data: \_\_\_\_\_

## 9.3 ANEXO C – PROTOCOLO DOS PADRÕES INTERNACIONAIS DE REFERÊNCIAS BIOLÓGICAS DA OMS

WHO/BS/2011.2181

Page 52

### MATERIALS:

Contents:

- sample pack 1: containing 8 coded samples (A, B, C, D, E, F, G\*, H).
  - sample pack 2: containing 8 coded samples (A, B, C, D, E, F, G\*, H).
- \*= Sample G is not present in new packs assembled for the 2<sup>nd</sup> shipment

The preparations for this study are coded as A-H and represent sero-positive and sero-negative samples. All samples have tested negative for antibodies to HIV1, HIV2 and Hepatitis C and do not contain Hepatitis B surface antigen. The Instructions for Use (IFU), which accompany the samples, contain a risk assessment and an instruction for opening the vial. Note that each participant will receive at least 2 vials of each preparation.

Each sample should be tested independently in different days. The freeze-dried (FD) preparation will appear as an off-white cake, which after reconstitution with distilled water may appear as a yellowish fluid. Vials A, C and E contain 0.5 ml of FD serum and vials B, D, F, G and H contain 1.0 ml of FD serum. PLEASE DO NOT test sample G - this sample was exhausted and is not included in sample packs that are sent out as a part of the second round in February 2010. Hence this sample will not be included in the data analysis of the study.

### TESTS AND METHODOLOGY

The EIAs will be the primary tests for the calibration of the candidate standards. In addition, it will be useful to gather data from other assays, in particular IHA and IFA. The Immunoblot and TESA assays will provide an in-depth characterization of the samples. All EIAs, IFAs and IHAs should be licensed for use and preferably commercially available.

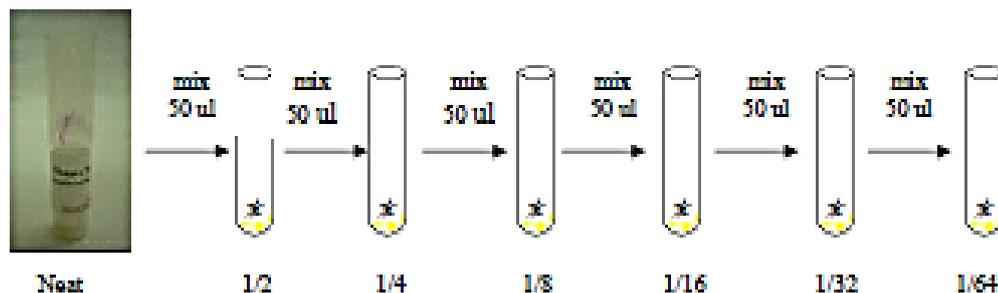
### RECONSTITUTION AND TESTING OF SAMPLES

The samples should be reconstituted either in 0.5 ml or in 1.0 ml sterile distilled water as stated in the instructions for use (IFU) for each sample. Reconstituted samples should be stored at 2-8 °C until further use. Please note that once a sample is reconstituted, all tests on that sample should be carried out within 7 days. An appropriate buffer should be used to prepare dilutions of all materials to give test solutions of the correct antibody concentration range for the assay analytical sensitivity. For all samples, we request that testing is carried out in the following way according to the general principle of the test used:

1. The EIAs: will produce a numerical value such as an absorbance (OD) and cut-off or a fluorescence value (S/CO). The dose-response curve should range from the high OD (in case of positive samples) to the background/negative OD in the most diluted sample. The neat (reconstituted sample) and at least six sequential dilutions 2x, 4x, 8x, 16x, 32x and 64x should be tested on at least 2 different days. Two fresh sets of dilutions from the same sample (e.g. A) should be made on each of the two days so that four data points should be generated for each sample and respective sequential dilutions (four points for each sample from each pack should be obtained).

Example: EIAs Assay

- Reconstitute the ampoule with 0.5 or 1.0 ml of sterile distilled water as stated in the instructions for use.
- Add 50 µl of assay sample diluent into each dilution tube.
- Add 50 µl of sample to the first tube, mix, then transfer 50 µl from the first tube to the second tube, mix and repeat the same procedure with the six tubes. The figure below shows an example for development of dilutions.



Neat: (0.5 or 1.0 ml reconstituted material, non diluted)

- Once sample dilutions are prepared, assay each one as if it were a patient or donor specimen. Manufacturer's procedures should be followed to perform the assay.
  - All duplicates of the sample dilutions (from Neat to 1:64) should be on the same plate. This will avoid plate to plate variation. An example of the location of the duplicates is given in appendix 1a/1b. Tests should be performed following the usual procedures in their laboratories. Information on the distribution of samples in the plates should be provided with the results.
- Titration Methods (IHA and IFA): manufacturer's procedures should be followed to perform the assay. Each sample should be tested four times on at least two separate days (2 assays in day 1 and two assays on day 2), with a total of four points for each sample from each pack. Please report all 4 endpoint titres for each sample in the tables provided in annex.
  - Immunoblot or TESA: please submit data as positive or negative and if possible give further justification of the result by interpretation of essential criteria (i.e. identified antigens, strength of the reaction etc.).

**RESULTS**

Each participant is asked to submit all results to Sjoerd Rijpkema ([Sjoerd.Rijpkema@nibsc.hpa.org.uk](mailto:Sjoerd.Rijpkema@nibsc.hpa.org.uk)) on data sheets by e-mail as attachment. Additional copies of data sheets (see below) should be made as required. Any additional raw data

should also be submitted and given on separate pages; raw EIA data should contain a plate layout and a printout of ODs. In addition, a complete description of the test and test procedures should be sent after completion of tests. This enables all data to be analysed in a consistent and uniform manner.

The assay description should include relevant parameters such as: test format, antigen, buffers, positive and negative controls, plate layout, details of dilutions, composition of sample diluent, incubation temperatures, and if applicable manufacturer's code of the test.

The completed form and the additional information should be e-mailed as attachment (preferred option) or faxed once testing is completed or ultimately before April 23<sup>rd</sup> 2010 to Dr S Rijpkema.

Please submit raw EIA data. Transformed data (e.g. OD/CO ratio) may be submitted in addition to the raw data.

#### REPORT

A preliminary report will be circulated among the participants for comments. It is understood that all data of the collaborative study will remain confidential and that these cannot be disseminated, circulated or published in any form without the prior agreement of the co-authors and NIBSC. The final report will be submitted to the WHO Expert Committee on Biological Standardization for its evaluation and adoption of the candidate materials as WHO International Standards, if so approved.

#### COORDINATING GROUP

<p>Dr Ana Padilla Blood Products and related Biologicals Quality and Safety of Medicines World Health Organization Tel: +41 22 791 3892 E-mail: padillaa@who.int</p>	<p>Professor Alejandro Luquetti Chief, Laboratory for Research on Chagas Disease Hospital das Clínicas, Universidade Federal de Goiás, Goiânia Brasil</p>
<p>Dr Marcia Otazi Jefa Depto. Control de Calidad - Serología Fundação Pro-Sangue Hemocentro de São Paulo São Paulo, Brasil</p>	<p>Dr Sjoerd Rijpkema Principal Scientist Division of Bacteriology National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC) Blanche Lane, South Mimms Potters Bar EN6 3QG United Kingdom Tel: +44 1707 641 430 E-mail: <a href="mailto:Sjoerd.Rijpkema@nibsc.hpa.org.uk">Sjoerd.Rijpkema@nibsc.hpa.org.uk</a></p>
<p>Dr Maria del Carmen Guzman Jefa del Departamento de Parasitología Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos, Secretaría de Salud México D.F., México</p>	

## 9.4 ANEXO D – PARECER TÉCNICO DE OGM



MINISTÉRIO DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA, INOVAÇÕES E COMUNICAÇÕES

### PARECER TÉCNICO Nº 5534/2017

**Processo nº** 01200.708041/2016-20

**Requerente:** Instituto Oswaldo Cruz.

**CQB:** 105/99

**Endereço:** Instituto Oswaldo Cruz. Av. Brasil, 4365 – Pav. Gomes de Farias – Sala 114. Mangunhos. Rio de Janeiro, RJ – CEP 21045-900. Tel. 21-2598-4440 – Fax: 21-2560-7864.

**Assunto:** Solicitação de parecer para extensão de CQB para áreas com nível de biossegurança NB1 para execução de atividades de pesquisa com organismo geneticamente modificado da classe de risco 1.

**Extrato Prévio:** 5411/2016, publicado no DOU em 17 de março de 2017.

**Reunião:** 204ª Reunião Ordinária da CTNBio, realizada em 03 de agosto de 2017.

**Decisão:** DEFERIDO

A CTNBio, após apreciação do pedido de parecer para extensão de CQB para áreas com nível de biossegurança NB1 para execução de atividades de pesquisa com organismo geneticamente modificado da classe de risco 1, concluiu pelo deferimento, nos termos deste Parecer Técnico. No uso das atribuições conferidas pelo art. 12 da Portaria MCT nº 146/ 2006 e tendo em vista os artigos 38 e 41 desta mesma portaria e a Nota Técnica 77/2016, foi concedida a confidencialidade solicitada para o projeto de pesquisa do processo SEI nº 01200.708041/2016-20.

No âmbito das competências dispostas na Lei 11.105/05 e seu decreto 5.591/05, a Comissão concluiu que o presente pedido atende às normas da CTNBio e à legislação pertinente que visam garantir a biossegurança do meio ambiente, agricultura, saúde humana e animal.

### PARECER TÉCNICO

**Resumo:** O presidente da Comissão Interna de Biossegurança do Instituto Oswaldo Cruz, Dr. Ricardo Cunha Machado, solicita à CTNBio parecer técnico para extensão de Certificado de Qualidade em Biossegurança para áreas com nível de biossegurança NB1 para execução de projeto de pesquisa em regime de contenção com organismo geneticamente modificado da classe de risco 1. A área a ser credenciada é denominada sala 10 A do Laboratório Interdisciplinar de Pesquisas Médicas - LIPMED, localizado no Pavilhão Cardoso Fontes do Instituto Oswaldo Cruz (Fiocruz-RJ). O projeto a ser executado denomina-se: "Sistema para expressão otimizada de biomarcadores". Os organismos a serem manipulados são linhagens de *Escherichia coli* contendo genes de *Trypanosoma cruzi* da classe de risco 1. O responsável pela unidade operativa será o Dr. David William Provance e este declara que as condições descritas no processo são apropriadas à realização dos projetos propostos.

**Fundamentação técnica:** A presente solicitação de mudança de local de extensão do Certificado de qualidade em Biossegurança (CQB) para a sala 10 A do Laboratório Interdisciplinar de Pesquisa Médicas (LIPMED) para execução do projeto "Sistema para expressão otimizada de biomarcadores", sob a reponsabilidade do Dr. David William Provance. O referido projeto será desenvolvido nas salas 10 A e 10 B do LIPMED, entretanto essa solicitação é para o credenciamento da sala 10 A somente, pois a sala 10 B já foi credenciada pela CTNBio com nível de biossegurança NB2, através dos pareceres 4265/2014 e 4334/2014. A sala 10 A é designada como Sala de Cultivos de Bactérias e está localizada no Pavilhão Cardoso Fontes, medindo aproximadamente 3 X6 m<sup>2</sup>.

**Descrição do OGM:**

Serão utilizadas cepas comerciais da bactéria *E. coli* (Classe de Risco 1), como organismo receptor, e *T. cruzi* (Classe de Risco 2) como organismo doador, entendemos que o mesmo se classifica como de Classe de Risco 1 devido às pequenas –sequências (originadas sinteticamente) expressas (codificando epítomos) deste parasita não apresentarem toxicidade ou patogenicidade

**Equipamentos proteção coletiva (EPC) existentes no laboratório:** Cabine de segurança biológica e lava-olhos, (dentro); chuveiro de emergência no corredor (10m da sala).

**Equipamentos de proteção individual (EPI) existentes no laboratório:** Jalecos (descartável), luvas, gorro, máscaras.

**Procedimento de limpeza, desinfecção, descontaminação e descarte dos materiais/resíduos gerados no laboratório:**

-Descarte de perfurocortante é feito em recipiente próprio de paredes rígidas, que será autoclavado no laboratório e recolhidos pela Coleta de Lixo Especial (contratada pela Fiocruz).

- Todos os materiais contaminados são autoclavados (120°C/30minutos) no laboratório e recolhidos pela Coleta de Lixo Especial (contratada pela Fiocruz).

**Equipe de pesquisa:**

**Pesquisador principal:** Dr. David William Provance Jr. Possui doutorado em Neuroscience - UNIVERSITY OF TEXAS SOUTHWESTERN MEDICAL CENTER (1998). Tem experiência na área de Morfologia, com ênfase em biologia celular, atuando principalmente no seguinte tema: neurologia molecular e ação de motores moleculares.

**Pesquisadora:** Andressa da Matta Durans. Doutoranda da Pós-graduação de Medicina Tropical pelo IOC (2014) e Mestre em Biociências pela UERJ (2013). Possui Aperfeiçoamento em Treinamento em Pesquisa pelo Instituto Nacional de Câncer (2007) e Graduação em Ciências Biológicas pela Universidade Santa Ursula (2006). Tem experiência na área de Genética, com ênfase em Genética molecular, atuando principalmente nos seguintes temas: HBV, hepatocarcinoma, filogenia, filogeografia, *Trypanosoma cruzi*, diagnóstico da doença de Chagas, antígenos recombinantes.

**Pesquisadora:** Dra. Flavia Coelho Garcia dos Reis. Possui graduação em Farmácia pela Faculdade de Farmácia da UFRJ (1995), mestrado em Ciências Biológicas (Biofísica) pelo Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho com parte da tese desenvolvida na Université François Rabelais (Tours, França) (1999). Seu Doutorado em Ciências Biológicas (Biofísica) foi desenvolvido no Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, na Universidade Federal do Rio de Janeiro, com conclusão em 2005. Foi pesquisadora associada da Universidade Federal do Rio de Janeiro, contratada pelo centro Wellcome Trust de apoio a pesquisa e atualmente é pós-doutoranda do programa PNPD. Tem experiência nas áreas de Biofísica, Bioquímica, Enzimologia e Biologia Molecular de parasitas.

Pela análise dos currículos dos envolvidos no projeto de pesquisa, concluímos que esta equipe é capaz de gerir com segurança as atividades propostas no projeto de pesquisa. Essa Proposta atende aos requisitos legais preconizados pelas Resoluções Normativas da CTNBio.

Atendidas as recomendações e as medidas de biossegurança contidas no processo, essa atividade não é potencialmente causadora de significativa degradação do meio ambiente ou prejudicial à saúde humana.

DR. EDIVALDO DOMINGUES VELINI  
Presidente da CTNBio