

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA  
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA GERAL  
MESTRADO EM CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

**CLEYSON MATHIAS MORAIS DELVOSS**

**OTIMIZAÇÃO DOS ENSAIOS DE TRIAGEM DE COMPOSTOS TRIPANOCIDAS**

**PONTA GROSSA  
2019**

**CLEYSON MATHIAS MORAIS DELVOSS**

**OTIMIZAÇÃO DOS ENSAIOS DE TRIAGEM DE COMPOSTOS TRIPANOCIDAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biomédicas da Universidade Estadual de Ponta Grossa, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biomédicas.

Orientadora: Profa. Dra. Iriane Eger

**PONTA GROSSA  
2019**

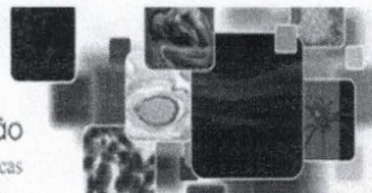
D367 Delvoss, Cleyson Mathias Morais  
Otimização dos ensaios de triagem de compostos tripanocidas / Cleyson  
Mathias Morais Delvoss. Ponta Grossa, 2019.  
71 f.

Dissertação (Mestrado em Ciências Biomédicas - Área de Concentração:  
Biologia Celular e Molecular), Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Orientadora: Profa. Dra. Iriane Eger.

1. Trypanosoma cruzi. 2. Atividade tripanocida. 3. GFP. 4. Otimização. I.  
Eger, Iriane. II. Universidade Estadual de Ponta Grossa. Biologia Celular e  
Molecular. III.T.

CDD: 610.28



**ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NÍVEL DE MESTRADO EM CIÊNCIAS BIOMÉDICAS – ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR, NÚMERO DA ATA 02/2019, DO MESTRANDO CLEYSON MATHIAS MORAIS DELVOSS REALIZADO NO DIA 22 DE FEVEREIRO DE 2019, NA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA.**


Aos vinte e dois dias de fevereiro de dois mil e dezenove, às 09h00min no Auditório do Programa da Pós-graduação em Odontologia, Bloco M, da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG) em seção pública sob a presidência da **Professora Dra. Iriane Eger** reuniu-se a Banca Examinadora de defesa da Dissertação de Mestrado em Ciências Biomédicas do mestrando **Cleyson Mathias Morais Delvoss** na linha de pesquisa; Bioquímica dos processos celulares, constituída pelos demais Doutores (membros titulares): **Professora Dra. Michele Dietrich Moura Costa (UEPG/PR)** e **Professor Dr. Wander Rogério Pavanelli (UEL/PR)**. Iniciados os trabalhos, a presidência deu conhecimento aos membros da banca e o candidato das normas que regem a defesa da dissertação de Mestrado e definiu-se a ordem a ser seguida pelos examinadores para arguição. O título da dissertação avaliada foi: **“Otimização dos Ensaios de Triagem de Compostos Tripanocidas”** Encerrado a defesa, e após reunião, a banca comunicou o resultado final da avaliação da dissertação como APROVADO considerado requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biomédicas. O aluno deverá entregar, no prazo estipulado no item 8 da IN 01/2015, referente a defesa de dissertação do programa com as modificações sugeridas pelos membros da banca examinadora. Para a obtenção do título de mestre, o aluno terá até 6 meses, após a data da defesa da sua dissertação, para apresentar ao colegiado a carta de submissão do seu artigo em revista indexada no estrato mínimo B3 dentre os periódicos indicados pela área de Ciências Biológicas II vigente. Nada mais havendo a ser tratado, lavrou-se a presente ata que vai assinada pelos membros da Banca Examinadora.


Observações (se necessário): \_\_\_\_\_

Alteração de título: sim  não

Novo título: \_\_\_\_\_

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dra. Iriane Eger 1- (DEBIO - UEPG) - Presidente

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dra. Michele Dietrich Moura Costa 2- (DEBIOGEM - UEPG) - Titular

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Wander Rogério Pavanelli 3- (UEL-PR) - Titular

Ponta Grossa, 22 de fevereiro de 2019.

***A todas as pessoas que  
acreditam que seus sonhos  
podem se tornar realidade***

## **AGRADECIMENTOS**

À minha maravilhosa orientadora, professora Iriane, por todas as trocas de experiência e por me proporcionar crescimento pessoal e profissional. Agradeço também por ser um espelho, a pessoa que quero ser “quando crescer”!

Aos professores e colegas do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biomédicas e à Capes, pelo auxílio financeiro.

Às professoras e aos colegas do Laboratório de Biologia Celular e Protozoologia que ao longo desse processo dividiram suas experiências, enriquecendo a formação como um todo.

Aos colegas da disciplina de Biologia Celular, pelas conversas consoladoras e pelas pizzas na casa da Elisandra.

À Maiara e à Maria, que pelo período em que estiveram como técnicas no laboratório, ajudaram muito para a execução dos experimentos.

À Camila e à Carol, porque a vida sem amizades seria uma vida que não valeria à pena.

Às famílias da Camila e do Rubens, por me acolherem nos momentos mais difíceis pelos quais passei.

À minha mãe, que mesmo de longe, nunca deixa o suporte afetivo de lado. Seu incentivo ao estudo me leva a querer estudar mais e mais.

Ao Ezequiel, pelo apoio incondicional sem o qual não teria chegado até aqui. Também agradeço pelos vários chopps de menta, que não seriam os mesmos sem sua companhia.

À todas as pessoas não mencionadas que fazem parte da minha vida, meus mais sinceros agradecimentos.

*“Se você parar para pensar poderá desistir  
Vá em frente, enfrente tudo o que vier e lute como puder  
Pois só você tem o poder de mudar o seu destino e fazer  
Com que a luz do dia volte a brilhar”*

Brave Heart – Digimon Adventure

## RESUMO

Atualmente poucos fármacos estão disponíveis para o tratamento da doença de Chagas, causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*. Destes fármacos, a maioria causa severos efeitos colaterais e nenhum deles apresenta 100% de cura parasitológica. A triagem de novos compostos anti-*T. cruzi* são iniciados com testes *in vitro* contra epimastigotas e amastigotas intracelulares. Para as formas amastigotas, clinicamente relevantes por apresentarem-se no hospedeiro mamífero, o efeito tripanocida é principalmente avaliado pela contagem microscópica de parasitos residuais. Apesar de reprodutível, esta técnica é morosa e depende da experiência do microscopista. Este trabalho objetiva a padronização de um método de triagem de compostos tripanocidas através da detecção de fluorescência emitida por TcGFP. Epimastigotas da cepa Y ( $10^8$  parasitos/ml) cultivados em meio LIT+10%SFB foram transfectados com o plasmídeo pROCKGFPNeo e selecionados por diluição seriada e pelo antibiótico de resistência G418. Após seleção, os epimastigotas mostraram expressão de GFP homogênea e estável. A expressão da GFP também se manteve estável em tripomastigotas e amastigotas intracelulares. A transfecção não afetou os padrões de replicação *in vitro* dos epimastigotas, nem sua suscetibilidade ao benzonidazol e também não alterou a capacidade da cepa de infectar e de se replicar em células Vero E6. Através de fluorimetria foi verificado que há correlação direta entre intensidade de fluorescência e concentração de epimastigotas ( $R^2=0,9986$ ) e amastigotas intracelulares ( $R^2=0,9559$ ) de TcGFP. Para validar a técnica fluorimétrica para triagens de compostos tripanocidas, epimastigotas e células contendo amastigotas intracelulares de TcGFP foram incubados com diferentes concentrações de benzonidazol por 48 e 24 horas, respectivamente. Os resultados mostraram que para epimastigotas o método proposto restringe-se a teste de compostos que causem a lise dos parasitos, devido a possibilidade de detecção da fluorescência emitida pela GFP retida em parasitos inviáveis não lisados. Para as formas amastigotas intracelulares, o método fluorimétrico proposto pode ser aplicado, substituindo a morosa contagem microscópica.

**Palavras-chave:** Atividade tripanocida. *Trypanosoma cruzi*. GFP. Otimização.



## ABSTRACT

Few drugs are available against Chagas disease, caused by protozoa *Trypanosoma cruzi*. Most of these drugs cause severe side effects and there is no data on a drug with a 100% cure rate. Screening of new anti-*T. cruzi* compounds is initiated with *in vitro* tests against epimastigotes and intracellular amastigotes. Against amastigote forms, clinically relevant because are present in mammalian host, trypanocidal effect is mainly evaluated by microscopic count of residual parasites. Although reproducible, this technique is time-consuming and depends on experience of the microscopist. This work aims to develop a screening method for trypanocidal compounds through detection of fluorescence emitted by TcGFP. Epimastigotes of Y strain ( $10^8$  parasites/ml) grown in LIT+10% FBS medium were transfected with plasmid pROCKGFPNeo and selected by serial dilution and G418 resistance antibiotic. After selection, epimastigotes showed homogeneous and stable GFP expression. GFP expression also remained stable in both trypomastigotes and intracellular amastigotes. Transfection did not affect the *in vitro* replication profile of epimastigotes, nor their susceptibility to benznidazole. Furthermore, the strain was able to infect and replicate in Vero E6 cells. Through fluorimetry, there was a direct correlation between fluorescence intensity and concentration of epimastigote ( $R^2=0.9986$ ) and intracellular amastigotes ( $R^2=0.9559$ ) of TcGFP parasites. Aiming to validate the fluorimetric technique for trypanocidal compound screening, epimastigotes and cells containing intracellular TcGFP amastigotes were incubated with different concentrations of benznidazole for 48 and 24 hours, respectively. The results showed that anti-epimastigotes tests were viable just to the compounds that cause lysis of the parasites, due to the fluorescence detecting of GFP retained in non-lysed unviable parasites. For intracellular amastigote forms, the proposed fluorimetric method can be applied, replacing the time-consuming microscopic count.

**Keywords:** Trypanocidal activity. *Trypanosoma cruzi*. GFP. Optimization.

## LISTA DE FIGURAS

|   |    |
|---|----|
| Figura 1 - Controle da transmissão vetorial da doença de Chagas pela América Latina .....   | 16 |
| Figura 2 - Ciclo de vida de <i>Trypanosoma cruzi</i> .....  | 20 |
| Figura 3 - Esquema da estrutura celular de epimastigota de <i>T. cruzi</i> .....  | 21 |
| Figura 4 - Esquema de um mRNA de <i>T. cruzi</i> maduro.....  | 24 |
| Figura 5 - Construção do plasmídeo pROCKGFPNeo .....  | 30 |
| Figura 6 - Expressão de GFP em epimastigotas de <i>T. cruzi</i> antes e após a seleção das subculturas .....  | 39 |
| Figura 7 - Expressão de GFP em epimastigotas confirmada por imunofluorescência indireta .....   | 40 |
| Figura 8 - Expressão de GFP em tripomastigotas.....   | 41 |
| Figura 9 - Expressão de GFP em amastigotas intracelulares confirmada por imunofluorescência indireta .....  | 41 |
| Figura 10 - Epimastigotas das cepas TcWT e TcWT apresentam o mesmo perfil de crescimento <i>in vitro</i> .....  | 42 |
| Figura 11 - Epimastigotas TcWT e TcGFP apresentam o mesmo perfil de suscetibilidade ao Bz .....   | 43 |
| Figura 12 - Semelhanças na sensibilidade dos métodos e nos dados de correlação entre número total de parasitos e detecção parasitária obtidos por fluorimetria e MTT..... | 44 |
| Figura 13 - Autofluorescência dos meios de cultivo .....  | 45 |
| Figura 14 - Viabilidade de epimastigotas em PSG+10%SBF por 48 horas.....  | 46 |
| Figura 15 - Determinação do inóculo inicial de epimastigotas para os ensaios tripanocidas em PSG+10%SBF, avaliados por e MTT e contagem.....                              | 47 |
| Figura 16 - Cinética da fluorescência residual após 2 horas de lise de epimastigotas..  | 50 |
| Figura 17 - Detecção de fluorescência residual antes e depois da centrifugação da placa .....   | 48 |
| Figura 18 - Curva de concentração de inibição do Bz para parasitos transfectados antes e depois da centrifugação da placa .....   | 49 |
| Figura 19 - Parasitos inviáveis emitindo fluorescência através da GFP.....  | 50 |
| Figura 20 - Correlação entre fluorescência ou contagem microscópica e carga parasitária intracelular.....   | 51 |
| Figura 21 - Curva de concentração-resposta após 24 horas de incubação com Bz frente a amastigotas de TcGFP .....  | 52 |

## LISTA DE ABREVIATURAS

BSA - Albumina Sérica Bovina, do inglês "*Bovine Serum Albumin*"  
Bz - Benzonidazol  
CI<sub>50</sub> - Concentração que inibe 50% do crescimento celular  
CRP - Proteína Regulatória do Complemento, do inglês "*Complement Regulatory Protein*"  
DAPI - 4',6'-diamino-2-fenil-indol  
DMEM - *Dulbecco's Modified Eagle Medium*  
DMSO - Dimetilsulfóxido  
DNA - Ácido Desoxirribonucleico  
DTU - *Discrete Typing Unit*  
GFP - Proteína Fluorescente Verde, do inglês "*Green Fluorescent Protein*"  
gGAPDH - Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase glicosomal  
gRNA - RNA guia, do inglês "*guide RNA*"  
ICC - Instituto Carlos Chagas  
kDNA - DNA do cinetoplasto, do inglês "*Kinetoplastic DNA*"  
LIT - *Liver Infusion Tryptose*  
mRNA - RNA mensageiro  
MTT - 3-(4,5-dimetil tiazole-2-il)-2-5-difenil brometo de tetrazólio  
Nfx - Nifurtimox  
OMS - Organização Mundial da Saúde  
pb - Pares de Bases  
PBS - Tampão Salina Fosfato  
PCR - Reação em Cadeia da Polimerase  
PSG - Tampão Salina Fosfato + Glicose 5,4%  
RNA - Ácido Ribonucleico  
rRNAs - RNAs ribossômicos  
SBF - Soro Bovino Fetal  
SL - Sequência Líder  
TcGFP - *Trypanosoma cruzi* transfectado com GFP  
TcWT - *Trypanosoma cruzi* selvagem, do inglês "*Wild Type*"  
UTR - Região não traduzida, do inglês "*Untranslated Region*"

## SUMÁRIO

|         |  |    |
|---------|--|----|
| 1       | <b>INTRODUÇÃO</b> .....  | 12 |
| 2       | <b>OBJETIVOS</b> .....   | 14 |
| 2.1     | <b>Objetivo geral</b> .....  | 14 |
| 2.2     | <b>Objetivos específicos</b> .....   | 14 |
| 3       | <b>REVISÃO DA LITERATURA</b> .....   | 15 |
| 3.1     | <b>Doença de Chagas</b> .....  | 15 |
| 3.2     | <b><i>Trypanosoma cruzi</i></b> .....  | 18 |
| 3.2.1   | <b>Ciclo de vida</b> .....   | 18 |
| 3.2.2   | <b>O parasito</b> .....  | 20 |
| 3.3     | <b>Triagem de compostos tripanocidas</b> .....   | 26 |
| 4       | <b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....   | 29 |
| 4.1     | <b>Parasitas</b> .....   | 29 |
| 4.2     | <b>Transfecção de <i>T. cruzi</i></b> .....  | 29 |
| 4.2.1   | <b>Seleção de parasitos com expressão homogênea</b> .....  | 30 |
| 4.3     | <b>Confirmação da expressão de GFP em todos os estágios evolutivos após seleção</b> .....                                    | 31 |
| 4.3.1   | <b>Imunofluorescência indireta (IFI) de epimastigotas</b> .....  | 31 |
| 4.3.2   | <b>Imunofluorescência indireta (IFI) de amastigotas intracelulares</b> .....   | 32 |
| 4.4     | <b>Comparações biológicas entre as cepas selvagem (TcWT) e transfectada (TcGFP)</b> .....                                    | 32 |
| 4.4.1   | <b>Curva de crescimento de formas epimastigotas</b> .....  | 32 |
| 4.4.2   | <b>Suscetibilidade de epimastigotas ao benzonidazol (Bz)</b> .....   | 33 |
| 4.4.2.1 | <b>Análise de viabilidade por MTT</b> .....  | 33 |
| 4.5     | <b>Padronização dos ensaios fluorimétricos para as formas epimastigotas</b> 34   |    |
| 4.5.1   | <b>Concordância entre fluorimetria e MTT</b> .....   | 34 |
| 4.5.2   | <b>Padronização do meio para os testes fluorimétricos</b> .....  | 34 |
| 4.5.2.1 | <b>Viabilidade de epimastigotas em PSG</b> .....   | 35 |
| 4.5.3   | <b>Análise e remoção de fluorescência residual</b> .....   | 35 |
| 4.5.4   | <b>Validação dos ensaios fluorimétricos para teste de compostos anti-epimastigotas de <i>T. cruzi</i></b> .....              | 36 |
| 4.6     | <b>Padronização dos ensaios fluorimétricos para as formas amastigotas intracelulares</b> .....                               | 36 |
| 4.6.1   | <b>Concordância entre fluorimetria e contagem</b> .....  | 36 |
| 4.6.1.1 | <b>Método de coloração May-Grünwald</b> .....  | 37 |
| 4.6.2   | <b>Validação dos ensaios fluorimétricos para teste de compostos anti-amastigotas intracelulares de <i>T. cruzi</i></b> ..... | 37 |
| 4.7     | <b>Análise estatística</b> .....   | 38 |

|          |   |           |
|----------|---|-----------|
| <b>5</b> | <b>RESULTADOS</b>   | <b>39</b> |
| 5.1      | <b>Transfecção e seleção de epimastigotas com expressão homogênea de GFP</b>                    | <b>39</b> |
| 5.2      | <b>Avaliação da expressão de GFP em todos os estágios evolutivos após a seleção</b>             | <b>40</b> |
| 5.3      | <b>Comparações biológicas entre TcWT e TcGFP</b>  | <b>42</b> |
| 5.3.1    | <i>Curva de crescimento in vitro de epimastigotas TcWT e TcGFP</i>                              | 42        |
| 5.3.2    | <i>Suscetibilidade de epimastigotas ao benzonidazol (Bz)</i>                                    | 43        |
| 5.4      | <b>Padronização de ensaios fluorimétricos para as formas epimastigotas..</b>                    | <b>43</b> |
| 5.4.1    | <i>Concordância entre fluorimetria, MTT e densidade de parasitos</i>                            | 43        |
| 5.4.2    | <i>Padronização de meio para ensaios anti-epimastigotas</i>                                     | 44        |
| 5.4.3    | <i>Deteção e remoção de fluorescência residual</i>  | 47        |
| 5.4.4    | <i>Validação da fluorimetria para teste de compostos anti-epimastigotas de T. cruzi</i>         | 49        |
| 5.5      | <b>Padronização de ensaios fluorimétricos para deteção de formas amastigotas intracelulares</b> | <b>50</b> |
| 5.5.1    | <i>Concordância entre contagem microscópica e fluorimetria</i>                                  | 50        |
| 5.5.2    | <i>Validação da fluorimetria para teste de compostos anti-epimastigotas de T. cruzi</i>         | 51        |
| <b>6</b> | <b>DISCUSSÃO</b>  | <b>53</b> |
| <b>7</b> | <b>CONCLUSÕES</b>   | <b>61</b> |
|          | <b>REFERÊNCIAS</b>  | <b>62</b> |

## 1 INTRODUÇÃO

A tripanossomíase americana ou doença de Chagas, causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi* (CHAGAS, 1909), ocorre em uma grande extensão territorial, sobretudo na América Latina (APT et al, 2013). Atinge cerca de 8 milhões de pessoas, prevalece sobre populações pobres, consta na lista das doenças negligenciadas (DIAS et al, 2016) e leva aproximadamente 10.000 casos a óbito todos os anos (COURA, 2015). Sem um medicamento eficaz na fase crônica e distantes dos olhos da indústria farmacêutica, os chagásicos que anseiam pela sua cura dependem de instituições públicas de pesquisa (DIAS et al, 2016). Buscas incessantes por novos compostos ativos contra *T. cruzi* são realizadas todos os dias, porém esta é uma tarefa árdua e morosa devido à falta de consenso e praticidade das técnicas, que se baseiam principalmente na análise e contagem microscópica dos parasitos (FONSECA-BERZAL, 2018). A falta de uma metodologia alternativa de baixo custo impede que a triagem de compostos seja realizada em larga escala, retardando a descoberta de novos compostos ativos e o desenvolvimento de medicamentos mais efetivos (DIAS et al, 2016). Partindo disso, o objetivo do presente trabalho é padronizar um método semi-automatizado para teste de novos compostos utilizando a cepa Y de *T. cruzi* transfectada com GFP (Proteína Fluorescente Verde, do inglês “*Green Fluorescent Protein*”).

Tanto as formas evolutivas epimastigotas quanto as amastigotas são utilizadas para testes *in vitro* de novos compostos. Apesar de não ser clinicamente relevante pela sua ausência no hospedeiro vertebrado, epimastigotas são utilizados na triagem inicial de compostos ativos devido ao seu fácil cultivo em laboratório, não requerendo co-cultura com células de mamífero (FONSECA-BERZAL, 2018). Embora o método de MTT seja aplicável para esta forma evolutiva, ele possui características desfavoráveis como seu tempo prolongado de incubação e sua toxicidade (RISS et al, 2004). Além disso, a técnica de viabilidade do MTT não é aplicável aos testes com amastigotas intracelulares devido à reação com as células hospedeiras, subestimando a atividade tripanocida de compostos seletivos e, conseqüentemente, a análise depende de contagem microscópica.

Aqui é proposto um método alternativo, semi-automatizado, para os testes com epimastigotas e amastigotas intracelulares, com resultados imediatos e isento de toxicidade, sendo realizado através da detecção da fluorescência emitida pela GFP expressa por parasitos transfectados.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Padronizar um método semi-automatizado para triagem de compostos tripanocidas através da utilização de parasitos transfectados.

### 2.2 Objetivos específicos

- Produzir a cepa Y de *Trypanosoma cruzi* transfectada com GFP;
- Avaliar a expressão de GFP em todos os estágios evolutivos do parasito;
- Comparar a curva de crescimento e o padrão de resposta ao benzonidazol entre epimastigotas transfectados (TcGFP) e selvagens (TcWT)
- Padronizar os ensaios fluorimétricos para a avaliação de atividade tripanocida *in vitro*.



### 3 REVISÃO DE LITERATURA

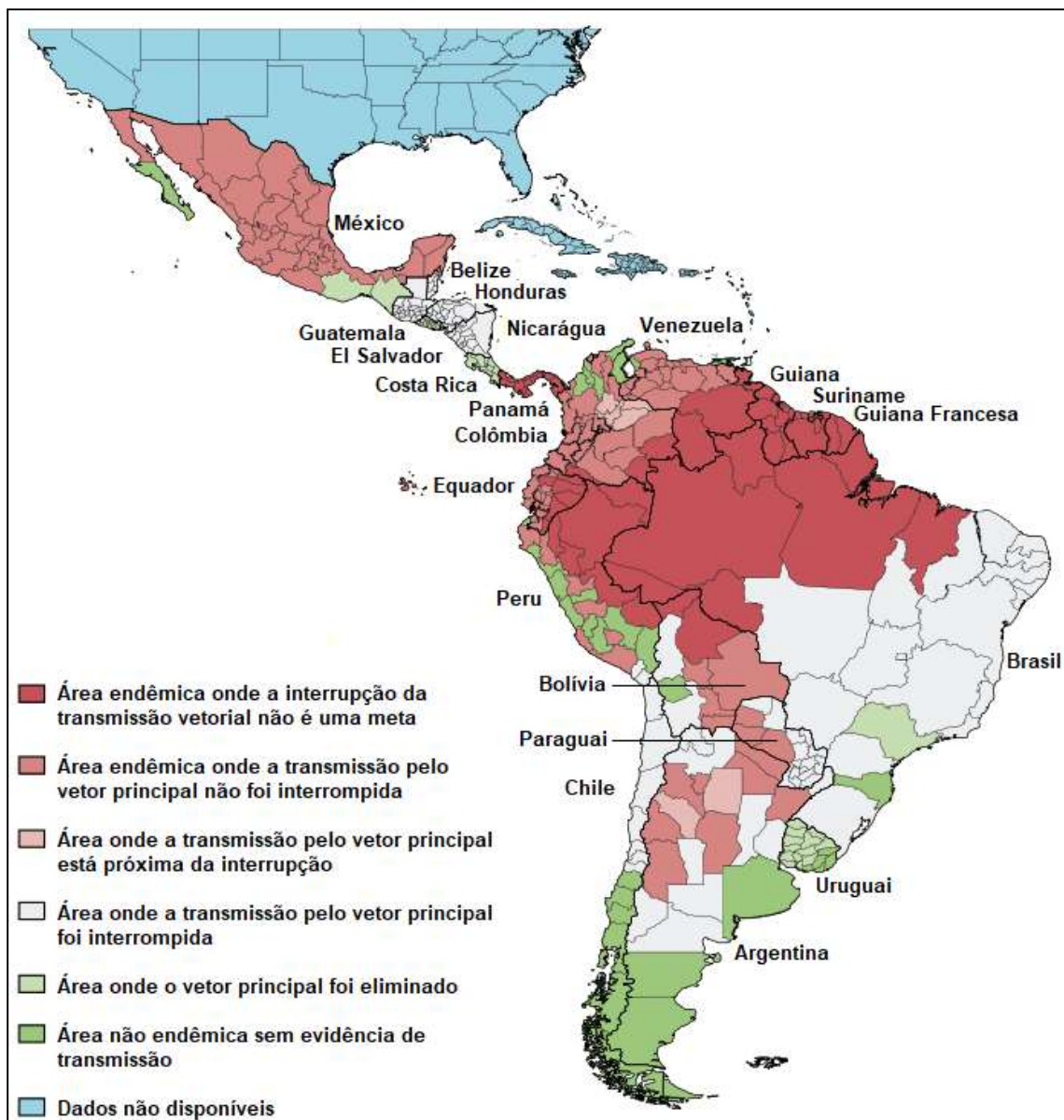
#### 3.1 Doença de Chagas

A tripanossomíase americana, também conhecida como doença de Chagas é uma zoonose causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*. Endêmica nas Américas e marginalizada pela sociedade por atingir populações pobres devido ao seu perfil epidemiológico, a parasitose consta na lista de doenças negligenciadas pela Organização Mundial da Saúde (OMS) (DIAS et al, 2016).

O principal mecanismo de transmissão de *T. cruzi* é a via vetorial, mas pode ocorrer também por vias alternativas, como transfusão sanguínea, transplante de órgãos, acidentes laboratoriais ou pelas vias congênitas e oral. A via de transmissão oral tem ganhado destaque no cenário médico da doença, tanto pelo seu caráter de surto quanto pela gravidade clínica devido ao maior inóculo de parasitos em comparação à clássica transmissão vetorial (COURA, 2015). Esta via pode causar sintomas mais severos na fase aguda inicial da doença, podendo levar a óbito cerca de 33% dos casos (FILIGHEDDU et al, 2017). Vários relatos mostram surtos ocorridos no Brasil, decorrentes da ingestão de caldo de cana (PINTO et al, 1990; STEINDEL et al, 2008; VARGAS et al, 2018) e açaí (FERREIRA et al, 2014; MENDONÇA et al, 2014; NÓBREGA et al, 2009), contaminados pela moagem ou pelas fezes do vetor, respectivamente.

A fim de minimizar a transmissão da doença, campanhas de controle de doadores nos bancos de sangue e combate ao vetor foram realizadas no Brasil, reduzindo o número de casos da doença em humanos, porém incapazes de erradicar a doença (COURA, 2015), visto que esta apresenta um ciclo silvestre (DIAS et al, 2016). Apesar do sucesso para o combate aos vetores domiciliados em algumas regiões do Brasil, essa realidade não se faz presente em todos os países endêmicos da doença de Chagas (Figura 1), como na Bolívia, onde apesar das tentativas de controle vetorial (SAMUELS et al, 2013), a transmissão de *T. cruzi* pelo vetor principal continua sendo um grande problema para a população (COURA, 2015).

Figura 1. Controle da transmissão vetorial da doença de Chagas pela América Latina.



Várias regiões da América Latina apresentam transmissão vetorial de *T. cruzi*. Fonte: adaptado de Pérez-Molina e Molina (2018). Nota: Sem escala, cores fantasia.

Depois de um breve período de incubação após a infecção por *T. cruzi*, inicia-se a fase aguda da doença de Chagas. Esta caracteriza-se pela detecção de parasitemia por exames diretos e pode apresentar sintomas inespecíficos, como febre, cefaleia, edema subcutâneo, disfunção cardíaca, hepatomegalia e esplenomegalia (COURA, 2007). Cerca de 2 a 8% dos casos vão a óbito ainda na fase aguda da doença, no entanto esses números se elevam em casos de infecção oral, por proporcionar um inóculo maior de parasitos (FILIGHEDDU et al, 2017).

Os parasitos que resistem ao sistema imunológico do hospedeiro vertebrado se alojam em alguns órgãos, propiciando a cronificação da doença. Indivíduos cronicamente infectados podem permanecer na forma indeterminada (também chamada de fase crônica assintomática), apresentando apenas lesões inflamatórias mínimas e servindo como reservatório para o protozoário (MADY et al, 1982). Embora a parasitemia não seja detectável por técnicas de microscopia direta, o diagnóstico pode ser realizado por hemocultura, sorologia ou PCR (Reação em Cadeia da Polimerase). Dois terços dos pacientes infectados por *T. cruzi* permanecem nesta fase (ANDRADE, 1999). Cerca de um terço dos casos indeterminados podem evoluir para formas sintomáticas, como a forma cardíaca (apresentando cardiomegalia), digestiva (apresentando megaesôfago e megacólon) ou cardiodigestiva (ambas complicações). Menos de 5% dos casos desenvolvem a forma neurológica da doença (MANDAL, 2014).

Atualmente o tratamento desta doença é realizado através de dois medicamentos, o Benzonidazol (Bz) e o Nifurtimox (Nfx), sendo apenas o primeiro comercializado no Brasil (COURA; CASTRO, 2012). Outros medicamentos, como Posaconazol (CLAYTON, 2010) e Ravuconazol (URBINA et al, 2003) foram amplamente testados, inclusive em testes clínicos, porém sem resultados significativos (SACCOLITI et al, 2018). A eficácia do Bz e do Nfx é elevada na fase aguda da doença de Chagas, tendo o Bz um percentual de cura de até 76%. No entanto, após a cronificação da doença, seu percentual de cura reduz a 8% (CANÇADO, 2002). O Bz ainda apresenta severos efeitos colaterais, tais como manifestações de hipersensibilidade (dermatites com erupção cutânea), edema, febre, linfadenopatia, dores musculares e articulares, além de depressão na medula óssea e polineuropatia periférica (LUEHRING, 2012).

Aos pacientes chagásicos crônicos (que apresentem cardiomegalia) resta a possibilidade de um transplante cardíaco. No entanto, além dos problemas frequentemente encontrados para qualquer transplante, como a falta de doadores e rejeição pelo indivíduo, para os chagásicos ainda há outros entraves, como a possibilidade de reativação da doença ou surgimento de neoplasias. Soma-se a isso o fato desses pacientes não poderem fazer uso de Bz devido à imunossupressão preparatória para o transplante (DINARDI et al, 2012).

Visto que apenas medidas de controle da transmissão de *T. cruzi* não são suficientes para combater a doença e que os medicamentos atuais não são

eficazes em todas as fases clínicas, busca-se por um tratamento farmacológico com maior percentual de cura em ambas as fases da doença. Por serem “invisíveis” à sociedade e aos olhos dos interesses farmacêuticos, os pacientes chagásicos ficam à espera de um tratamento eficaz, cuja busca acontece majoritariamente por instituições públicas de pesquisa, que buscam por compostos que atuem diretamente sobre alguma das formas evolutivas presentes no ciclo biológico do parasito (DIAS et al, 2016).

### 3.2 *Trypanosoma cruzi*

#### 3.2.1 *Ciclo de vida*

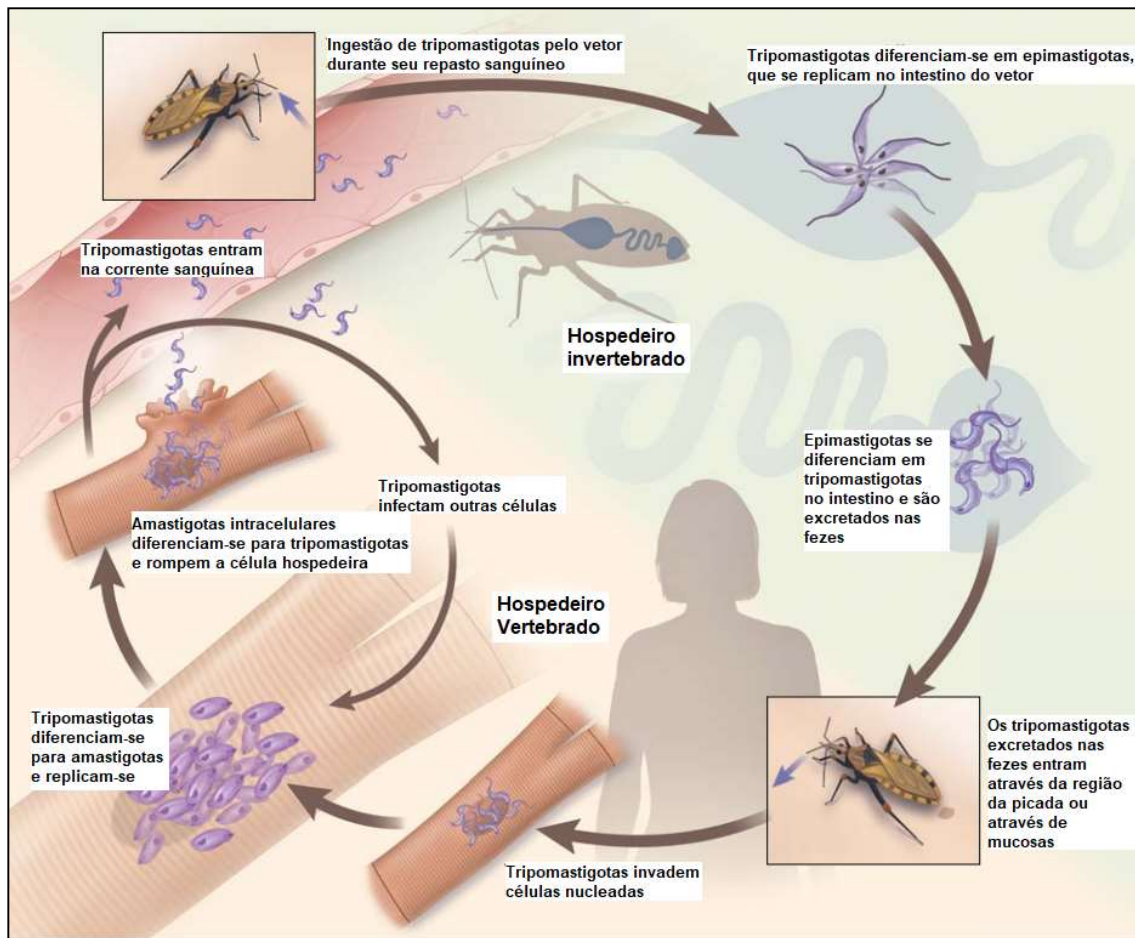
*Trypanosoma cruzi* possui um ciclo natural de vida heteroxênico, passando por um hospedeiro intermediário e um hospedeiro definitivo (MANDAL, 2014). Diante dessa situação o parasito passa por diferentes estágios evolutivos, sofrendo alterações bioquímicas e/ou morfológicas visando adaptação ao interior do hospedeiro. Três formas são facilmente distinguíveis através de microscopia óptica, sendo elas: tripomastigota, amastigota e epimastigota (MARTINS et al, 2012). Os hospedeiros intermediários restringem-se aos insetos popularmente conhecidos como “barbeiros”, enquanto os hospedeiros definitivos são animais da classe Mammalia, incluindo o homem (MANDAL, 2014).

Os hospedeiros invertebrados são os triatomíneos, insetos hematófagos da família Reduviidae, subfamília Triatominae, tendo três principais gêneros: *Triatoma*, *Panstrongylus* e *Rhodnius*. Tanto machos quanto fêmeas de triatomíneos, bem como todas as formas ninfais do inseto, alimentam-se de sangue, o que potencializa sua capacidade de transmissão de *T. cruzi* para os hospedeiros vertebrados (COURA, 2015).

O ciclo (Figura 2) se inicia com a ingestão de formas tripomastigotas sanguíneas de *T. cruzi* pelo inseto vetor, as quais migram para o intestino do invertebrado, onde irão se diferenciar para a forma epimastigota, passando por uma forma intermediária denominada esferomastigota. Os epimastigotas permanecem aderidos à superfície do epitélio intestinal do triatomíneo e ali se multiplicam por divisão binária. Em seguida, diferenciam-se para tripomastigotas metacíclicas e dirigem-se à ampola retal do triatomíneo. Estas formas serão

liberadas nas fezes e urina do inseto durante um novo repasto sanguíneo e poderão adentrar ao hospedeiro vertebrado pela região da picada do triatomíneo ou por penetração via mucosas. Uma vez no tecido sanguíneo do vertebrado, o protozoário se internaliza em células nucleadas, seja por fagocitose ou penetração ativa, sendo que em ambos os casos há formação do vacúolo parasitóforo, uma membrana que abriga o parasito temporariamente. Algumas horas após a internalização, *T. cruzi* passa por mais uma alteração morfológica e bioquímica, adquirindo a forma amastigota. Paralelo a isso, ocorre a degradação do vacúolo parasitóforo. Após o rompimento do vacúolo, o parasito se multiplica sucessivas vezes no citoplasma da célula hospedeira e diferencia-se para a forma tripomastigota sanguínea. Essa forma evolutiva apresenta grande motilidade (TYLER; ENGMAN, 2001) e pode secretar algumas proteínas semelhantes às proteínas do sistema complemento (ANDREWS et al, 1990), que, em conjunto, causam o rompimento da membrana celular da célula hospedeira, liberando os parasitos contidos no citoplasma para o meio extracelular. Duas possibilidades podem ocorrer neste momento: invadir células vizinhas ou cair na corrente sanguínea, podendo ser ingurgitado pelo vetor (TYLER; ENGMAN, 2001).

Figura 2. Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*.



Fonte: adaptado de Bern (2015), tradução nossa. Nota: Sem escala, cores fantasia.

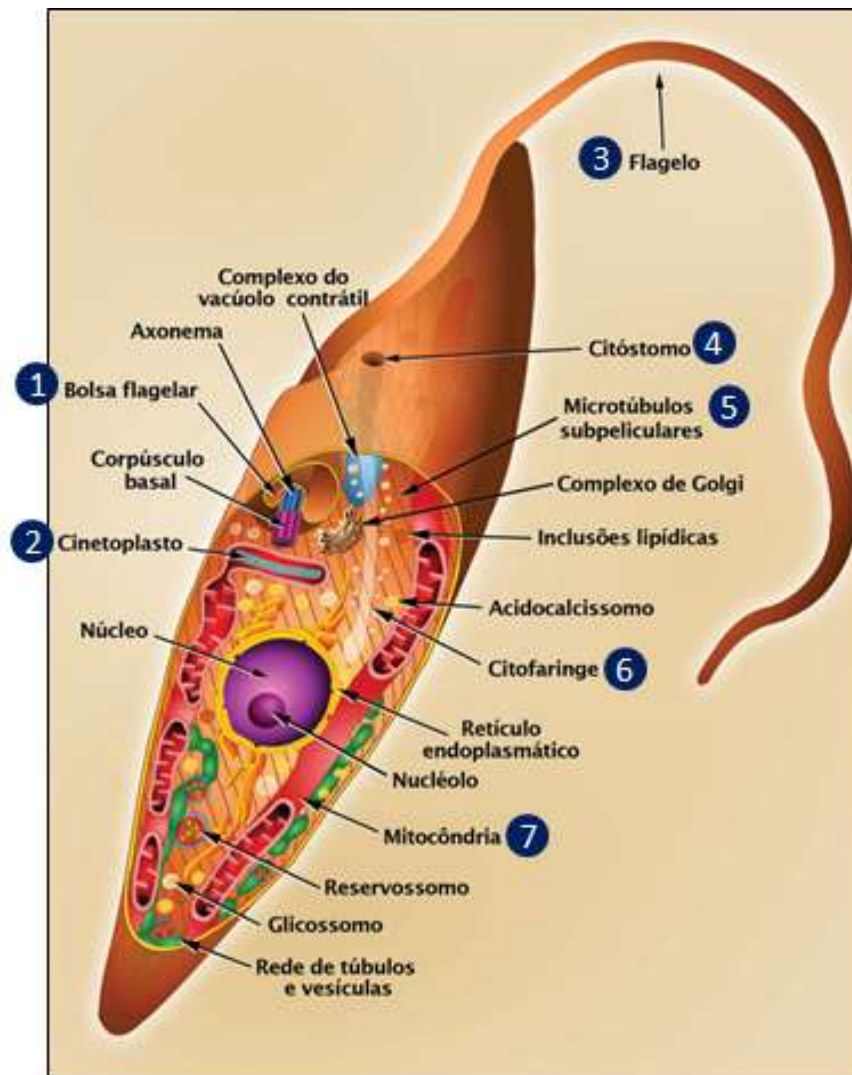
### 3.2.2 O parasito

O *Trypanosoma cruzi* é um protozoário flagelado pertencente ao reino Protista, filo Euglenozoa, classe Kinetoplastea, ordem Trypanosomatida, família Trypanosomatidae (CAVALIER-SMITH, 2016).

Os membros desse táxon possuem diversas características distintas em relação aos demais eucariotos. A estrutura celular de *T. cruzi* (Figura 3) contém uma série de particularidades, como as tubulinas que se apresentam como principal componente do citoesqueleto deste parasito, arranjadas em uma rede de microtúbulos subpeliculares que se localiza logo sob a membrana celular. As tubulinas também compõe o flagelo, estrutura que permite locomoção e adesão às superfícies celulares dos hospedeiros (DE SOUZA, 1999). Embora presente em todos os estágios evolutivos deste protozoário e em quantidades

semelhantes aos demais eucariotos, a actina não tem papel estrutural, sendo ainda descrita apenas sua função na endocitose. Este mecanismo é restrito à região do complexo citóstoma/citofaringe e da bolsa flagelar, e é impossibilitado de ocorrer por toda a membrana plasmática devido à barreira física formada pelos microtúbulos subpeliculares (SOUZA et al, 2013).

**Figura 3. Esquema da estrutura celular de epimastigota de *T. cruzi*.**



Em (5) encontram-se os microtúbulos subpeliculares, principal composição do citoesqueleto do parasito. Outras estruturas particulares podem ser encontradas nesta representação esquemática, como o cinetoplasto (2), a única e alongada mitocôndria (7), a bolsa flagelar (1), o flagelo (3) e o complexo citóstoma/citofaringe (4, 6). Fonte: adaptado de Teixeira et al, 2012. Nota: Sem escala, cores fantasia.

Os organismos da classe Kinetoplastea apresentam uma única mitocôndria alongada e ramificada, que contém em seu interior uma região

concentrada de DNA, denominada de cinetoplasto (DE SOUZA, 1999). O DNA do cinetoplasto, também chamado de kDNA (do inglês "*Kinetoplasmic DNA*") pode albergar de 16 a 30% do DNA total do organismo (MARTINS et al, 2012). O cinetoplasto geralmente se localiza numa região fixa da matriz mitocondrial, sempre próximo ao corpo basal do flagelo e consiste em uma rede de minicírculos e maxicírculos de kDNA concatenados (LUKEŠ et al, 2002).

Em *T. cruzi*, o cinetoplasto é composto por uma rede de aproximadamente 20.000 a 30.000 minicírculos contendo ~1.400 pares de bases (pb) cada e cerca de 20 a 50 maxicírculos, com ~40.000 pb (DE SOUZA, 1999). Os minicírculos são altamente variáveis de acordo com a cepa do parasito e seus genes codificam principalmente uma classe especial de RNAs denominada de gRNA (RNA guia, do inglês "*guide RNA*"), responsável pelo processamento dos mRNAs de enzimas mitocondriais (BLUM et al, 1990). Além dos genes que serão transcritos em gRNAs, algumas sequências que causam torção no DNA e sequências conservadas que são usadas como origem de replicação são encontradas nos minicírculos. Os maxicírculos podem ser comparados ao DNA mitocondrial das demais células eucariontes, contendo a informação gênica para diversas proteínas e RNAs ribossômicos (rRNAs) mitocondriais. Tanto minicírculos quanto maxicírculos são concatenados entre si e com ao menos três vizinhos para formar uma rede planar, permanecendo ligados covalentemente até o momento da replicação (LUKEŠ et al, 2002).

Para a replicação do kDNA, uma complexa maquinaria composta por múltiplas proteínas localizadas periféricamente aos círculos se faz necessária. Embora esse sistema de replicação não seja tão preciso quanto o sistema nuclear, permitindo uma pequena variação na derivação das sequências e números de círculos, ainda mantém as células-filhas viáveis. A replicação dos minicírculos é a mais bem estudada e sabe-se que inicia perto da fase S nuclear, com a liberação dos minicírculos concatenados catalisada por topoisomerases. Uma vez liberados, proteínas específicas reconhecem as origens de replicação dos minicírculos, fazendo com que as primases e DNA polimerases iniciem os processos de replicação. Após a duplicação, todos os minicírculos (parentais e filhos) permanecem covalentemente unidos até posterior separação através de topoisomerases e, em seguida, são segregados por suas conexões físicas com os corpos basais flagelares (LUKEŠ et al, 2002).



A dinâmica nuclear dos cinetoplastídeos também detém características distintas, como a falta da dissolução da carioteca durante a divisão celular (endomitose) (SOLARI, 1995) e a incapacidade de condensação cromossômica (HECKER et al, 1994). A endomitose em *T. cruzi* inicia com a formação do fuso mitótico no interior do núcleo, que consiste na ligação dos microtúbulos polares às placas densas dos cromossomos. Essas placas são equivalentes aos centrômeros dos demais eucariotos e são encontradas 10 (dez) ao todo no genoma de *T. cruzi*. Este protozoário conta com um número total de 64 (sessenta e quatro) cromossomos, fazendo com que as poucas placas densas sejam insuficientes para realizar toda a segregação cromossômica. Sendo assim, a segregação deve ocorrer também por outras vias, como pela ligação física dos cromossomos à membrana nuclear, de forma análoga ao que ocorre com o kDNA (AKIYOSHI; GULL, 2013).

A supracitada deficiência na condensação cromossômica de *T. cruzi* tem por principal motivo a presença de uma histona H1 atípica (TORO; GALANTY, 1988). Apesar de apresentar todas as principais histonas de eucariotos, esse protozoário possui uma forma truncada da histona H1, com ausência da porção globular da proteína. Esse domínio confere à histona seu potencial de empacotamento do DNA em fibra de 30 nm, sendo sua ausência a razão da descondensação perene dos cromossomos deste microrganismo (GUTUYAMA et al, 2008).

Outras particularidades moleculares são encontradas em *T. cruzi*, como a ausência de promotores reconhecidos pela RNA polimerase II (enzima que na maioria dos eucariotos transcreve genes que serão traduzidos em proteínas), disposição de seus genes em unidades policistrônicas e processamento do transcrito através de trans-*splicing* (CLAYTON, 2002). Apenas dois tipos de promotores transcricionais são encontrados no genoma de *T. cruzi*: o promotor de rRNA e o promotor do gene da sequência líder (SL). Os genes que codificam proteínas são dispostos em unidades policistrônicas (muito próximos entre si, mesmo sem correlação de função) e são transcritos juntos pelas RNA polimerases, sendo sua transcrição iniciada por algum dos dois promotores descritos (DaROCHA et al, 2004; NUNES et al, 1997). Apesar de apresentarem as mesmas RNA polimerases dos eucariotos superiores, a ausência de

sequências promotoras para a RNA polimerase II faz com que não haja controle de expressão gênica em nível pré-transcricional (CLAYTON, 2002).

Alguns eventos que ocorrem logo após a transcrição têm papel fundamental na regulação da expressão gênica em *T. cruzi*. Depois de serem transcritos unidos devido à distribuição policistrônica, os RNAs são clivados nas regiões intergênicas, formando os pré-RNAs mensageiros (pré-mRNAs) de cada gene. Uma reação de *trans-splicing* então ocorre nessas moléculas, substituindo uma porção específica da região 5' do pré-mRNA pela SL, uma sequência provinda de outro gene, contendo 39 nucleotídeos, que pode conferir maior estabilidade à molécula de mRNA. Paralelo a isso, ocorre poliadenilação na porção 3' do transcrito, para maturação completa do mRNA (CLAYTON, 2002).

Na molécula de mRNA maduro (Figura 4) são encontradas regiões 5' UTR (região 5' não traduzida, do inglês, “5' *untranslated region*”) e 3' UTR, situadas entre a região codificante e as extremidades do mRNA (SL e cauda poli-A). Essas regiões estão intimamente relacionadas com a regulação da expressão gênica, inclusive na expressão de proteínas estágio-específicas, embora os mecanismos ainda não estejam totalmente elucidados (DaROCHA et al, 2004). Um exemplo clássico dessa regulação é o comportamento da porção 3' UTR da amastina, que inibe sua expressão em tripomastigotas e epimastigotas. Quando essa porção é inserida na extremidade de um gene que é constitutivamente expresso em todos os estágios, como a gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (gGAPDH), as taxas de expressão são reduzidas nas formas evolutivas em que a amastina não se faz presente (NOZAKI; CROSS, 1995).

**Figura 4. Esquema de um mRNA de *T. cruzi* maduro.**



Em amarelo localiza-se a sequência líder. Em azul, as regiões 5' UTR e 3' UTR, responsáveis pela regulação da expressão da região codificante, em verde. Em vermelho, a cauda poli-A, responsável por dar estabilidade à molécula. Fonte: o autor. Nota: Sem escala, cores fantasia.

Devido a todas as particularidades descritas acerca dos mecanismos de transcrição e regulação da expressão gênica em *T. cruzi*, estratégias convencionais amplamente utilizadas na biologia molecular, como a transfecção, precisaram sofrer adaptações para que o gene de interesse possa ser expresso (DaROCHA et al, 2004).

Em consequência da heterogeneidade biológica de *T. cruzi*, utilizam-se características celulares e moleculares para sua classificação. A sistemática deste táxon é realizada com base em parâmetros de agrupamento, como: DNA nuclear e kDNA, morfologia, virulência, patogenicidade, suscetibilidade a fármacos e outros aspectos. Embora *T. cruzi* se propague por multiplicação clonal, há consenso que duas variantes divergiram entre 88 e 37 milhões de anos, estas foram denominadas de “grupos” e nomeados *T. cruzi* I e *T. cruzi* II. Ambos são encontrados no ciclo silvestre, enquanto apenas *T. cruzi* II se faz presente no ciclo doméstico. Atualmente o parasito é classificado em seis grupos de acordo com semelhanças genéticas que podem ser elucidadas através de mecanismos moleculares ou imunológicos. Esses grupos foram chamados de DTU (do inglês “*discrete typing unit*”). As DTUs *T. cruzi* I e *T. cruzi* II correspondem aos mesmos grupos descritos anteriormente, já as DTUs *T. cruzi* III-VI são organismos híbridos, que surgiram através de raros eventos de recombinação gênica, derivados da DTUs I e II. Todas as DTUs têm potencial para causar a doença de Chagas, diferindo em sua gravidade, manifestação clínica e regionalização, a exemplo das DTUs II e V, que favorecem manifestações cardíacas e digestivas da doença, podendo ser consideradas mais patogênicas que as demais (ZINGALES, 2011). Existe ainda uma sétima DTU, denominada TcBat, que inicialmente foi encontrada apenas em morcegos. No entanto, essa DTU já mostrou sua capacidade de infectar células humanas (RAMÍREZ et al, 2013).

Dentro das DTUs se encaixam as cepas de *T. cruzi*, que consistem em populações multiclonais isoladas de casos distintos, referidas por vezes como subespécies do parasita. As cepas possuem perfis biológicos distintos entre si, que são definidos pelo balanço entre as características dos múltiplos clones que ela contém (ANDRADE; MAGALHÃES, 1997).

### 3.3 Triagem de compostos tripanocidas

Várias cepas são amplamente utilizadas em laboratório para as mais diversas pesquisas, incluindo testes de novos compostos tripanocidas. O cultivo das cepas em condições laboratoriais pode induzir alterações em suas características, fazendo com que deixem de reproduzir com fidelidade o que se apresenta na natureza (DEANE et al, 1984). Entretanto, essas alterações não são substanciais a ponto de modificar todos os comportamentos do parasita, sendo assim, ainda podem ser consideradas uma representação das cepas naturais (ANDRADE; MAGALHÃES, 1997). Várias cepas isoladas há mais de 30 anos continuam sendo utilizadas (DEANE et al, 1984), como a cepa Y (SILVA; NUSSENZWEIG, 1953), cepa clássica isolada de um caso humano, uma das mais bem caracterizadas e estudadas cepas. Por sua média resistência ao fármaco de referência (MURTA et al, 1998), torna-se um modelo apropriado para a avaliação do efeito tripanocida de novos compostos. Cerca de 90 trabalhos publicados utilizando a cepa Y em teste de compostos tripanocidas podem ser encontrados em uma plataforma de busca de artigos (PUBMED). Outras cepas bem conhecidas e estudadas, como as cepas Tulahuén, CL Brener e Colombiana apresentam números reduzidos de trabalhos com este cunho.

Através de técnicas de clonagem pode-se separar os subclones de uma cepa, fazendo com que a cultura como um todo apresente maior homogeneidade em suas características (ANDRADE; MAGALHÃES, 1997). Vários clones de *T. cruzi* são muito utilizados em estudos de aspectos da biologia do parasito, como o clone Dm28c (CONTRERAS et al, 1988), obtido através da clonagem da cepa Dm. Entretanto, apesar de muito estudados, os clones não podem ser considerados como um representativo das cepas que ocorrem na natureza (ANDRADE; MAGALHÃES, 1997), sendo contraindicado seu uso para testes de compostos tripanocidas.

A triagem inicial desses novos compostos é geralmente realizada com as formas epimastigotas de *T. cruzi* através de métodos colorimétricos como o MTT ou contagem em microscópio (MUELAS-SERRANO; NOGAL-RUIZ; GÓMEZ-BARRIO, 2000). Embora esse estágio evolutivo do parasito seja de fácil cultivo em laboratório e o método do MTT tenha reprodutibilidade, as formas epimastigotas não são encontradas no hospedeiro vertebrado, gerando

resultados que não poderão ser utilizados no cenário médico. A forma clinicamente relevante para a ação de fármacos em humanos é a amastigota, cuja triagem *in vitro* é comumente baseada na contagem microscópica de parasitos residuais após o tratamento (FONSECA-BERZAL et al, 2018). Esse processo, apesar de reprodutível, é moroso, depende de muito tempo e depende da experiência do microscopista, dificultando sua realização rotineira, reduzindo as chances de um novo composto ser descoberto num breve período de tempo. Dadas estas características que dificultam o trabalho, buscam-se alternativas que otimizem o processo.

Uma das formas utilizadas com esta finalidade é o uso de cepas de *T. cruzi* transfectadas com o gene da  $\beta$ -galactosidase. Essa enzima catalisa uma reação colorimétrica, cuja densidade óptica é determinada em espectrofotometria e é diretamente proporcional ao número de parasitos viáveis presentes na amostra (BUCKNER et al, 1996; ROMANHA et al, 2010). No entanto, esse processo possui algumas limitações, como a irregularidade dos níveis de expressão do gene heterólogo e seu alto custo de manutenção, o que inviabiliza seu uso rotineiro em laboratórios. Uma outra alternativa rápida e prática para esses testes seria a mensuração da fluorescência emitida por *T. cruzi* transfectado com GFP, se esta fluorescência for correlacionada com o número e viabilidade dos parasitos em uma amostra. Ao contrário dos ensaios com  $\beta$ -galactosidase, a detecção da intensidade de fluorescência não requer reagentes de elevado custo e pode ser realizada através da observação em microscópio de fluorescência e/ou fluorímetro.

Extraída de uma água-viva (*Aequorea victoria*), a GFP não é uma proteína luminescente por si só, mas quando excitada por luz na faixa azul (480 nm) do espectro emite fluorescência verde intensa (512 nm). Ela consiste numa cadeia monomérica de 238 aminoácidos em conformação de barril- $\beta$ , tendo seu fluoróforo localizado no centro da cadeia polipeptídica. Por não necessitar de cofatores ou fluoróforos externos, a GFP tem ganhado destaque na biotecnologia nos mais diversos estudos (DE FARIAS, 2009).

Em 2013 a GFP foi utilizada como estratégia de otimização para triagem de compostos tripanocidas, promovendo um método semi-automatizado que diminui o tempo necessário para os testes (KESSLER et al, 2013). Entretanto, nestes ensaios foi utilizado o clone Dm28c de *T. cruzi*, não refletindo a

heterogeneidade de uma cepa natural (ANDRADE; MAGALHÃES, 1997). Dadas as circunstâncias, faz-se necessária a transfecção e realização de testes com uma cepa de referência, como a cepa Y, conhecida por ser medianamente suscetível ao benzonidazol (SILVA; NUSSENZWEIG, 1953) e amplamente utilizada em testes de triagem de compostos tripanocidas. Além disso, o uso da cepa de referência permite a comparação entre resultados obtidos em diferentes estudos.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Parasitos

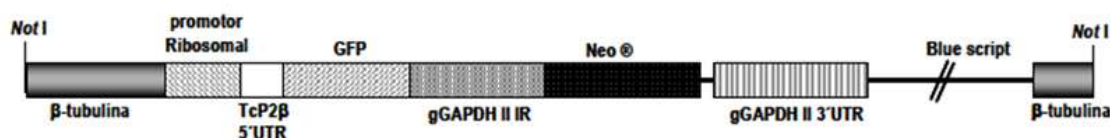
Para a realização dos experimentos foi utilizada a cepa Y de *Trypanosoma cruzi* (SILVA; NUSSENZWEIG, 1953). As formas epimastigotas foram mantidas através de dois repiques semanais em meio LIT (do inglês “*Liver Infusion Tryptose*”) suplementado com 10% SBF (soro bovino fetal) (Gibco) inativado e mantidos a 27°C. Todos os testes com epimastigotas foram realizados com parasitos colhidos no 4º dia de cultivo. Para a obtenção dos tripomastigotas, epimastigotas foram induzidos à diferenciação por estresse nutricional em meio LIT por cerca de três semanas. Os tripomastigotas axênicos foram utilizados para o primeiro ciclo de infecção em células Vero E6 (ATCC® Número: CRL-1586™) cultivadas em meio DMEM (do inglês “*Dulbecco's Modified Eagle Medium*”) (Sigma) suplementado com 10% de SBF e mantidos em incubadora de CO<sub>2</sub> umidificada a 37°C. Após 72 horas os tripomastigotas provenientes do ciclo de multiplicação intracelular foram recolhidos do sobrenadante e utilizados para a infecção de novas células.

### 4.2 Transfecção de *T. cruzi*

A transfecção da cepa Y de *T. cruzi* foi realizada de acordo com o método descrito por Kessler et al (2013), em colaboração com o Dr. Alexandre Haruo Inoue e da Dra. Rosiane Valeriano da Silva, do Instituto Carlos Chagas (ICC/Fiocruz-PR). Brevemente, formas epimastigotas foram cultivadas em meio LIT+10%SBF até densidade de  $2 \times 10^7$  parasitos/ml, lavadas duas vezes em solução salina tamponada de fosfato (PBS), centrifugadas a  $4.000 \times g$  por 5 minutos e ressuspensas em 0,4 ml de tampão de eletroporação pH 7,5 (140 mM NaCl, 25 mM HEPES, 0,74 mM Na<sub>3</sub>HPO<sub>4</sub>) em concentração de  $10^8$  parasitos/ml. A suspensão foi transferida para uma cubeta de 0,2 cm e homogeneizada com 10 µg do plasmídeo pROCKGFPNeo (Figura 5), previamente construído. Após 10 minutos em banho de gelo, a mistura foi submetida a dois pulsos de 450 V e 500 µF no eletroporador Gene Pulser Xcell (Bio-Rad, Hercules, EUA). As células eletroporadas foram mantidas em banho

de gelo por 5 minutos e transferidas para um tubo contendo 10 ml de meio LIT+10%SBF. Após 24 horas, 500 µg/ml do antibiótico G418 foram adicionados para a seleção dos parasitos transfectados e mantidos a 27°C. A adição de 5 µM de G418 foi mantida por todos os repiques destes parasitos. A confirmação da transfecção e expressão de GFP em todos os estágios evolutivos de *T. cruzi* foi realizada através da observação em microscópio de fluorescência.

**Figura 5. Construção do plasmídeo pROCKGFPNeo.**



Com o vetor pBluescript linearizado foram inseridas sequências de β-tubulina, permitindo integração no cromossomo de *T. cruzi* por recombinação homóloga nos *loci* de tubulina. Ao vetor também foi adicionada uma sequência do promotor de RNA ribossômico, sendo a região onde se inicia a transcrição. Também foi adicionada uma sequência 5' UTR de TcP2β (proteína ribossomal), permitindo que ocorra sua editoração através da adição da SL via *trans-splicing*. Foram adicionadas sequências do gene glicosomal gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (gGAPDH), bem como sua sequência 3' UTR, permitindo sua expressão constitutiva e seu processamento via poliadenilação, garantindo a estabilidade do mRNA transcrito. O gene da neomicina fosfotransferase também foi adicionado para a seleção por resistência através do antibiótico gentamicina (G418). Fonte: adaptado de Pires, 2007.

#### 4.2.1 Seleção de parasitos com expressão homogênea

Devido à heterogeneidade na expressão de GFP foi realizada uma seleção de parasitos com expressão homogênea através de diluição seriada. Para tanto,  $5 \times 10^6$  epimastigotas/ml da cepa transfectada + 2,5 mM de G418 foram distribuídos em volume de 300 µl de LIT+10%SBF no primeiro poço de uma placa de 96 poços e a partir deste, diluídos na primeira coluna em proporção 1:2. Utilizando a primeira coluna, os parasitos foram diluídos nas demais também em proporção de 1:2, até a diluição final de 19 parasitos/ml. A cada 48 horas foram adicionados 45 µL de meio LIT+5 µL de G418 (5 mM) por poço.

Uma semana depois, amostras de todos os poços da placa foram avaliadas em microscópio óptico (Olimpus bx41) para verificar a viabilidade e



motilidade dos parasitos, seguido por análise em microscópio de fluorescência (Leica DMLB). Os poços foram classificados de acordo com o grau e homogeneidade de expressão da GFP, sendo adicionado 45 µL de meio LIT+5 µL de G418 (5 mM) aos poços classificados com expressão homogênea. A fluorescência foi novamente avaliada após 72 horas, sendo que as amostras com expressão elevada e homogênea foram reunidas em um tubo cônico de 15 ml para a expansão da cultura, cujos epimastigotas foram utilizados para os ensaios subsequentes.

#### **4.3 Confirmação da expressão de GFP em todos os estágios evolutivos após seleção**

A expressão da GFP foi avaliada por observação direta em microscópio de fluorescência (Leica DMLB) em todos os estágios evolutivos e confirmada por Imunofluorescência Indireta (IFI) em epimastigotas e amastigotas intracelulares.

##### **4.3.1 Imunofluorescência indireta (IFI) de epimastigotas**

Epimastigotas da cepa Y selvagem (TcWT), usados como controle negativo, e transfectada (TcGFP) foram colhidos do 4º dia de cultivo em LIT, lavados 3x com PBS e ressuspensos em paraformaldeído 4%, por 30 minutos. Após fixação, os parasitos foram lavados e ressuspensos em PBS + BSA (Albumina Sérica Bovina) 3%, e então submetidos à adesão em lâmina própria para imunofluorescência (Perfecta), por 1 hora. A lâmina foi então lavada com PBS e os parasitos aderidos foram permeabilizados com PBS + triton 0,1% por 5 minutos. A lâmina foi lavada com PBS e incubada a temperatura ambiente com anticorpo monoclonal murino anti-GFP, gentilmente cedido pelo Dr. Juliano Bordignon (ICC – Fiocruz/PR) na diluição de 1:50 em PBS-BSA 3%. Após 1 hora de incubação, a lâmina foi lavada 3x com PBS e incubada a temperatura ambiente com o anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado ao fluoróforo Alexa 488 na diluição de 1:1000 em PBS-BSA 3%. Após 1 hora de incubação, a lâmina foi lavada 3x com PBS e incubada com DAPI (4',6'-diamino-2-fenil-indol) por 5 minutos. A lâmina foi lavada 2x com PBS e 1x com água destilada e após

a secagem foi coberta com Fluoromount (Sigma) e lamínula e analisada em microscópio de fluorescência (Zeiss Imager A2).

#### 4.3.2 *Imunofluorescência indireta (IFI) de amastigotas intracelulares*

Células Vero E6 ( $15 \times 10^3$  células/lamínula) foram semeadas sobre lamínulas circulares de vidro distribuídas em placas de 24 poços (Greiner) utilizando o meio DMEM+10%SBF. Após 24 horas de incubação a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>, as células foram infectadas (5 tripomastigotas por célula) durante 4 horas. Em seguida, os tripomastigotas não aderidos ou interiorizados foram removidos com PBS e a placa novamente incubada nas mesmas condições descritas acima. Após 30 horas de infecção, as lamínulas foram removidas da placa e as células fixadas com paraformaldeído 4%, por 40 minutos, lavadas em PBS e permeabilizadas com PBS + triton 0,1% por 5 minutos. Em seguida, as lamínulas foram lavadas em PBS e bloqueadas com PBS + BSA (Albumina Sérica Bovina) 3% por 1 hora. Após a remoção do meio de bloqueio, as lamínulas foram incubadas na presença ou ausência do anticorpo monoclonal murino anti-GFP na diluição de 1:50 em PBS-BSA 3% por 1 hora a temperatura ambiente. Em seguida, as lamínulas foram lavadas em PBS e incubadas com anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado ao fluoróforo Alexa 488 na diluição de 1:1000 por 1 hora a temperatura ambiente. Após a lavagem em PBS, as lamínulas foram expostas ao DAPI (4',6'-diamino-2-fenil-indol) por 5 minutos, lavadas 2x com PBS e 1x com água destilada, montadas em Fluoromount (Sigma) e analisadas em microscópio de fluorescência (Zeiss Imager A2).

#### 4.4 **Comparações biológicas entre as cepas selvagem (TcWT) e transfectada (TcGFP)**

##### 4.4.1 *Curva de crescimento de formas epimastigotas*

Para verificar se a inserção do gene da GFP e a seleção de subculturas com expressão elevada e homogênea não alteraram o comportamento biológico de *T. cruzi* foi comparada a curva de crescimento de formas epimastigotas. Para tanto, TcWT e TcGFP foram mantidos em meio LIT+10% de SBF a 27°C com

inóculo inicial de  $5 \times 10^6$  parasitos/ml. O número de parasitos foi determinado diariamente através da contagem em câmara de Neubauer em microscópio óptico, por oito dias. Três experimentos independentes foram realizados em triplicata.

#### 4.4.2 Suscetibilidade de epimastigotas ao benzonidazol (Bz)

Epimastigotas de TcWT e TcGFP foram lavados 3x com PBS e  $10^7$  parasitos/ml foram semeados em placas de 96 poços em Tampão Salina Fosfato + glicose 5,4% (PSG) suplementado com 10% de SBF. Os parasitos foram incubados a 27°C na ausência ou presença de diferentes concentrações de Bz (6,25-100  $\mu$ M), em volume final de 200  $\mu$ l/poço. Como controle negativo, foi utilizado o veículo DMSO (dimetilsulfóxido) 1%. A análise de viabilidade por MTT (descrito no item 3.4.2.1) (Inlab) e contagem microscópica em câmara de Neubauer, tipicamente utilizadas em ensaios anti-epimastigotas, foram realizadas 48 horas após a aplicação do fármaco. Dois experimentos independentes foram realizados em triplicata.

##### 4.4.2.1 Análise de viabilidade por MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)

Após centrifugação da placa por 7 minutos à 2000 rcf, para remoção do sobrenadante, foram acrescentados 50  $\mu$ l do reagente de MTT (RISS et al, 2004) (solubilizado em PBS, em concentração 2 mg/ml) em cada poço. A placa foi incubada por 3 horas a 37°C, protegida da luz. Após esse período, foram adicionados 20  $\mu$ l de HCl 0,01 M + 10% SDS e a placa foi incubada novamente nas mesmas condições por 15 minutos. Em seguida, foram acrescentados 80  $\mu$ l de DMSO para solubilizar os cristais de formazan e a absorbância foi determinada em leitor de placas (*EL800 Microplate Reader*, Biotek) em comprimento de onda de 570 nm.

#### 4.5 **Padronização de ensaios fluorimétricos para formas epimastigotas**

##### 4.5.1 *Concordância entre fluorimetria e MTT*

A fim de verificar se a detecção por fluorimetria possui correlação com a quantidade de parasitos e com os valores obtidos pela análise de viabilidade do MTT, epimastigotas de TcWT e TcGFP do 4º dia de cultivo foram lavados 3x com PBS e distribuídos em placa escura de 96 poços (Greiner) em diferentes inóculos (0,05 a  $50 \times 10^6$  parasitos/ml), utilizando PBS como meio. A fluorescência foi imediatamente avaliada através de fluorímetro de placa (*Synergy H1 Hybrid Reader*, Biotek), em comprimento de onda de excitação/emissão de 480/512 nm. Os parasitos foram então transferidos para uma placa clara e submetidos à avaliação de viabilidade por MTT, conforme descrito no item 3.4.2.1. Os valores de detecção parasitária através da fluorimetria foram comparados aos obtidos pela análise de viabilidade através de MTT. Estes dados também permitiram a comparação da sensibilidade entre os métodos.

##### 4.5.2 *Padronização do meio para os testes fluorimétricos*

Devido à autofluorescência do meio LIT e a perda de viabilidade dos parasitos em PBS em poucas horas, foi realizada uma triagem para verificar o meio mais apropriado para os ensaios de fluorescência, com menor interferência nas leituras e que mantenha os parasitos viáveis por 48 horas. Para isso, 200 µl de cada meio testado foram adicionados em placa escura de 96 poços, em triplicata, para avaliação da autofluorescência. Os meios testados foram LIT, Schneider (*Schneider's Insect Medium*), DMEM, PSG (PBS+5,4% de glicose), PSG+10%SBF e PSG+20%SBF. A autofluorescência dos meios foi avaliada usando fluorímetro de placa em comprimento de onda de excitação/emissão de 480/512 nm. Em seguida, foi avaliada a viabilidade de epimastigotas nos meios com menor nível de autofluorescência.

#### 4.5.2.1 Viabilidade de epimastigotas em PSG

Para verificar se o cultivo temporário de epimastigotas de *T. cruzi* em PSG suplementado com SBF altera padrões biológicos destes parasitos, testes comparativos avaliando fluorescência (através de fluorímetro de placa e microscopia de fluorescência), morfologia e motilidade (por microscopia óptica), viabilidade e densidade (por MTT e contagem em câmara de Neubauer) foram realizados. Os parasitos (WT e GFP) foram colhidos das culturas, lavados 3x com PBS e semeados em placas de 96 poços em diferentes concentrações (5, 10, 15 e  $20 \times 10^6$  parasitos/ml) utilizando PSG+10%SBF e PSG+20%SBF como meio, em triplicatas. As análises foram realizadas após 48 horas de incubação a 27°C. Parasitos semeados em LIT+10%SBF foram utilizados como controle de viabilidade.

#### 4.5.3 Análise e remoção de fluorescência residual

Com o intuito de verificar se a morte de epimastigotas por lise e a consequente liberação de GFP no meio pode acarretar em ruído de sinal e perda da correlação de intensidade de fluorescência e número de parasitos viáveis, foram realizados ensaios de lise de parasitos com HCl 0,01 M + 10% SDS. Epimastigotas de TcGFP foram colhidos das culturas, lavados 3x com PBS e distribuídos em placa escura de 96 poços numa concentração de  $10^7$  parasitos/ml em PSG+10%SBF, em volume final de 200  $\mu$ l. Após mensuração da fluorescência, foram adicionados 10 $\mu$ l de HCl 0,01 M + 10% SDS para lisar a membrana dos parasitos. A fluorescência foi monitorada a cada 30 minutos durante 2 horas.

Com a finalidade de verificar se a fluorescência residual pode ser removida para não interferir nas leituras, a placa contendo os parasitos lisados foi centrifugada a 2000 rcf por 7 minutos, o sobrenadante foi descartado e os parasitos ressuspendidos em PBS. A fluorescência resultante dessa suspensão foi avaliada em fluorímetro de placa. Parasitos íntegros foram utilizados como controle, utilizando o PBS como branco. Ambos os testes descritos foram realizados em triplicata.

#### 4.5.4 Validação dos ensaios fluorimétricos para teste de compostos anti-epimastigotas de *T. cruzi*

Para validar o modelo como teste de triagem de compostos tripanocidas, os parasitos selvagens e transfectados foram lavados 3x em PBS e  $10 \times 10^6$  parasitos/ml foram semeados em placas de 96 poços em PSG+10%SBF e expostos a diferentes concentrações de Bz (6,25 a 100  $\mu$ M), em volume final de 200  $\mu$ l/poço. Após 48 horas de incubação a 27°C, a atividade tripanocida foi avaliada por fluorescência, antes e depois da centrifugação da placa (2000 rcf por 7 minutos). Paralelamente, foi realizada a contagem microscópica em câmara de Neubauer e análise de viabilidade por MTT, ambos após a centrifugação. Também foram recolhidas amostras para análise em microscópio de fluorescência. Dois experimentos independentes foram realizados em triplicata.

#### 4.6 Padronização de ensaios fluorimétricos para formas amastigotas intracelulares

##### 4.6.1 Concordância entre fluorimetria e contagem

Para verificar se há concordância entre o método de detecção de viabilidade de amastigotas proposto com o método de contagem tipicamente utilizado, células Vero E6 foram semeadas em placas clara e escura de 96 poços ( $15 \times 10^3$  células/poço) em meio DMEM+10%SBF, e imediatamente expostas a diferentes inóculos de tripomastigotas de TcGFP (10, 5 e 1 parasitos/célula) e incubadas à 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Após 4 horas, o meio das placas foi trocado, e com 24 horas de incubação, as monocamadas celulares foram lavadas com PBS para remoção de tripomastigotas livres. Depois de 48 horas de infecção foi realizada uma leitura de fluorescência com a placa escura, utilizando PBS como meio. A placa clara foi corada pelo método May-Grünwald, descrito no item 3.6.1.1. A determinação da quantidade de parasitos pela técnica de contagem foi realizada em microscópio óptico invertido (Olimpus bx41) através da contagem aleatória de 200 células/poço, observando-se o número de células

infectadas, o número de amastigotas/célula e o número total de amastigotas contados. Dois experimentos independentes foram realizados em triplicata.

#### 4.6.1.1 Método de coloração May-Grünwald

As células foram fixadas com 100 µl de solução de formol 2% em PBS por 10 minutos. Após descartar essa solução, foram adicionados 100 µl da solução de May-Grünwald por 5 minutos. Em seguida, foram acrescentados 100 µl de água destilada por poço e, após descartar essa água, foi acrescentado 100 µl da solução de Giemsa por 15 minutos. Essa solução foi descartada e a placa foi lavada com água destilada.

#### 4.6.2 *Validação dos ensaios fluorimétricos para teste de compostos anti-amastigotas intracelulares de T. cruzi*

Para validar o modelo como teste de triagem de compostos tripanocidas, placas clara e escura de 96 poços foram infectadas, conforme descrito no item 3.6.1. Para esses ensaios, foi utilizado o meio DMEM+10%SBF e as placas foram mantidas à 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Após 4 horas, o meio das placas foi trocado, e com 24 horas de incubação, as monocamadas celulares foram lavadas com PBS para remoção de tripomastigotas livres. Após a lavagem, as células infectadas foram expostas a diferentes concentrações de Bz (6,25 a 100 µM) em meio DMEM + 10% de SBF. Após 24 horas de incubação a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> as placas foram lavadas com PBS para remoção do meio e a placa escura foi submetida ao fluorímetro para avaliação das taxas de infecção. A placa clara foi corada pelo método May-Grünwald e posteriormente analisada por contagem em microscópio óptico invertido (Olimpus bx41), através da contagem aleatória de 200 células/poço, observando-se o número de células infectadas, o número de amastigotas/célula e o número total de amastigotas contados. Dois experimentos independentes foram realizados em duplicata.

#### 4.7 **Análise estatística**

Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando a análise de variância (ANOVA 2-way) através do programa Graph Prism InStat 7<sup>®</sup>. O valor de  $p < 0,05$  foi considerado como significativo em todos os ensaios. Os valores de  $CI_{50}$  foram obtidos através do programa CompuSyn.

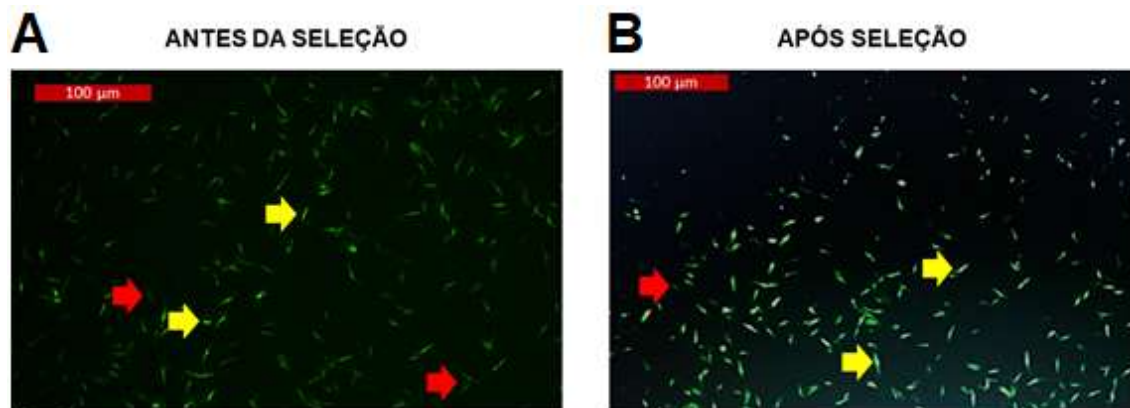


## 5 RESULTADOS

### 5.1 Transfecção e seleção de epimastigotas com expressão homogênea de GFP

A transfecção da cepa Y de *T. cruzi* foi confirmada inicialmente em formas epimastigotas através da visualização da expressão de GFP em microscopia óptica de fluorescência, com parasitos colhidos no 4º dia de cultivo. A expressão da proteína apresentou-se de forma heterogênea na cultura (Figura 6A), fazendo com que uma seleção de parasitos com expressão homogênea se tornasse necessária. A diluição seriada em placas de 96 poços, resultou em oito subculturas com expressão intensa e homogênea (Figura 6B), as quais foram agrupadas e utilizadas nos ensaios subsequentes, bem como para a confirmação da expressão de GFP nos demais estágios evolutivos.

**Figura 6. Expressão de GFP em epimastigotas de *T. cruzi* antes (A) e após (B) a seleção das subculturas.**

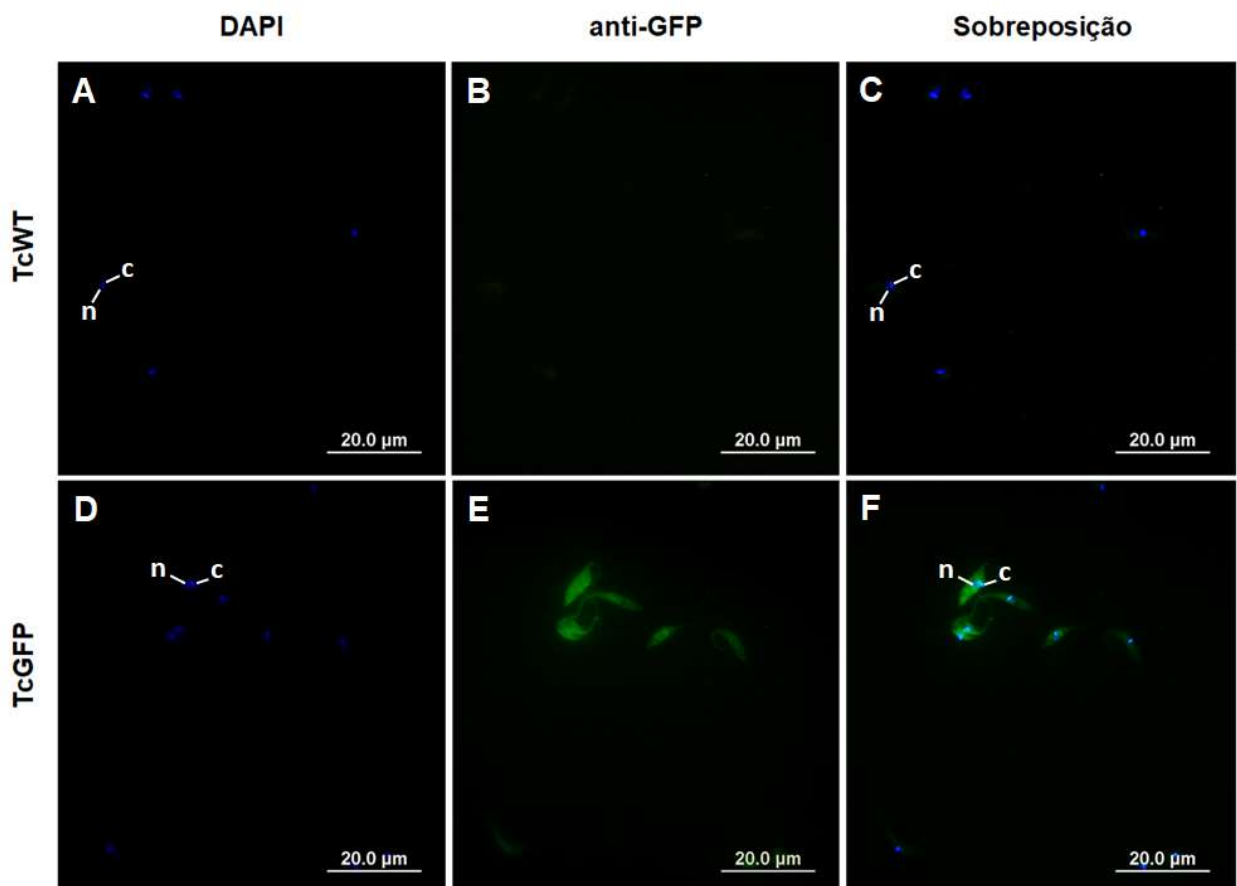


(A) A heterogeneidade da cultura antes da seleção pode ser vista pelos parasitos indicados pelas setas vermelha e amarela, apresentando baixa e alta expressão, respectivamente. (B) Uma homogeneidade na expressão da proteína pode ser visualizada na cultura provinda da seleção. A região indicada pela seta vermelha indica um parasito que estava fora da região focal do microscópio. Aumento: 400x. Fonte: o autor.

## 5.2 Avaliação da expressão de GFP em todos os estágios evolutivos após a seleção

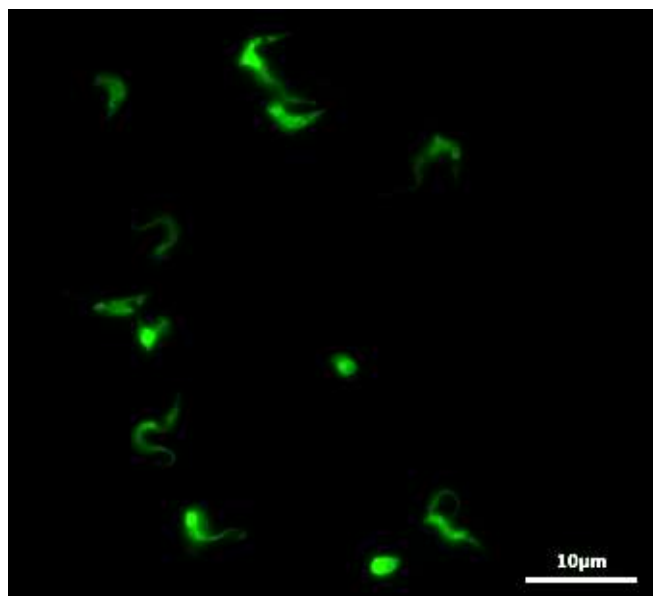
A partir da cultura de epimastigotas com expressão intensa e homogênea de GFP foram obtidos os demais estágios de desenvolvimento do parasito. Dessa forma, foi possível verificar que a expressão da GFP se manteve tanto em epimastigotas (Figura 7) como em tripomastigotas (Figura 8) e amastigotas intracelulares (Figura 9), confirmada pela observação direta em microscópio fluorescente e/ou por imunofluorescência indireta. Além disso, pode-se observar que a transfecção não alterou a morfologia de *T. cruzi* e que a expressão da proteína é mantida por todo o corpo celular do parasito.

**Figura 7. Expressão de GFP em epimastigotas confirmada por imunofluorescência indireta.**



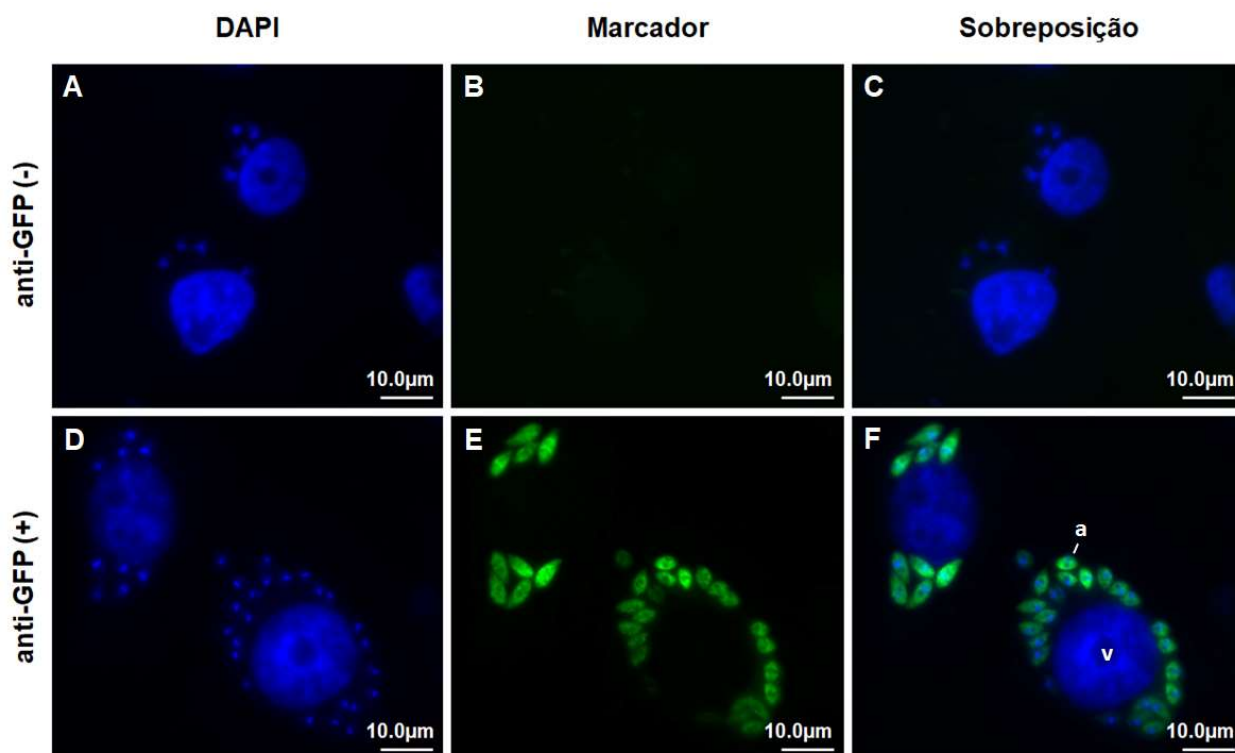
Epimastigotas de TcWT (A-C), utilizados como controle negativo, e TcGFP (D-F) incubados com DAPI (A, D) e anti-GFP (B, E). Em C e F encontramos as imagens sobrepostas mostrando a localização do núcleo (n) e do cinetoplasto (c). Fonte: o autor.

Figura 8. Expressão de GFP em tripomastigotas.



Tripomastigotas de TcGFP emitindo fluorescência através da expressão de GFP. Aumento: 400x. Fonte: o autor.

Figura 9. Expressão de GFP em amastigotas intracelulares confirmada por imunofluorescência indireta.



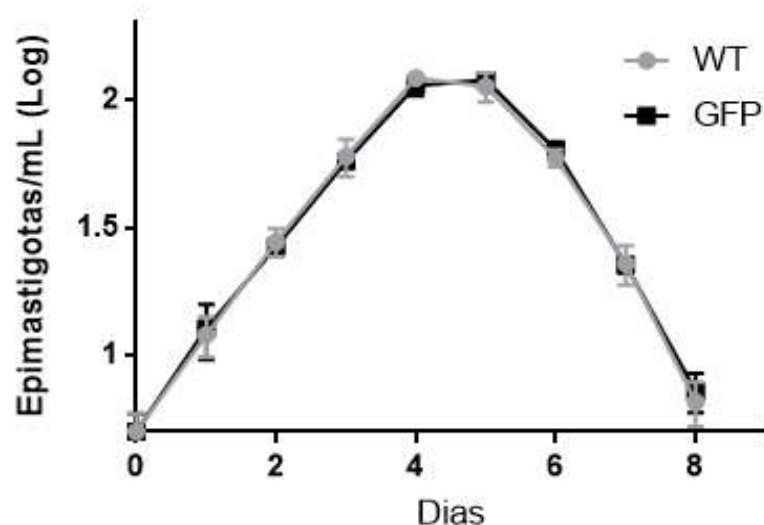
Amastigotas intracelulares de TcGFP no interior das células hospedeiras com ausência (A-C) ou presença (D-F) do anticorpo anti-GFP. A sobreposição de imagens (C, F) mostra a localização dos amastigotas (a) no interior das células Vero E6 (v). Fonte: o autor.

### 5.3 Comparações biológicas entre TcWT e TcGFP

#### 5.3.1 Curva de crescimento *in vitro* de epimastigotas de TcWT e TcGFP

Após confirmar que a transfecção e seleção de parasitos com expressão homogênea de GFP não alteraram a morfologia dos parasitos, foi comparada a curva de crescimento de epimastigotas entre as cepas TcWT e TcGFP. Como observado na Figura 10, epimastigotas selvagens e transfectados apresentaram o mesmo padrão de crescimento *in vitro*: fase exponencial até o 4º dia de cultivo, atingindo o pico de crescimento com cerca de  $11^7$  parasitos/ml entre o 4º e 5º dia, fase estacionária entre 4º e 6º e fase de declínio e morte entre o 6º e 8º dias de cultivo.

Figura 10. Epimastigotas das cepas TcWT e TcGFP apresentam o mesmo perfil de crescimento *in vitro*



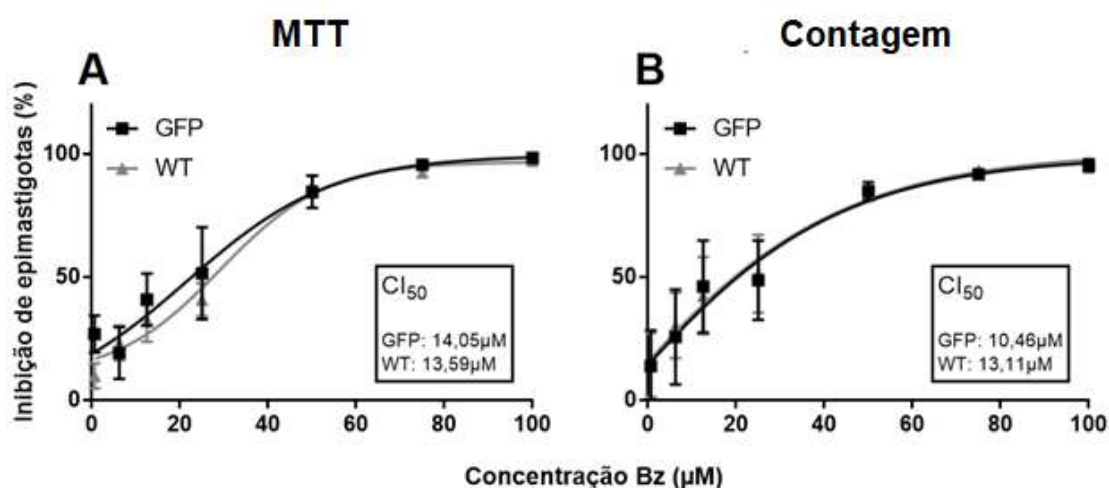
Fonte: o autor.

#### 5.3.2 Suscetibilidade de epimastigotas ao benzonidazol (Bz)

Com o intuito de verificar se a transfecção não alterou a sensibilidade da cepa Y ao fármaco de referência, Bz, formas epimastigotas de TcWT e TcGFP foram expostas ao fármaco e a atividade tripanocida avaliada através de contagem em microscópio e teste colorimétrico do MTT. Ambas as amostras de epimastigotas apresentaram o mesmo padrão de resposta *in vitro* ao fármaco

(Figura 11), não apresentando diferença entre os valores de  $CI_{50}$  ( $p=0,8863$ ). Pela técnica do MTT (Figura 11A) os valores foram  $13,59 \mu\text{M}$  e  $14,05 \mu\text{M}$  para TcWT e TcGFP, respectivamente. Através de contagem microscópica (Figura 11B) os valores obtidos foram  $10,46 \mu\text{M}$  e  $13,11 \mu\text{M}$  para as cepas selvagem e transfectada, respectivamente.

Figura 11. Epimastigotas TcWT e TcGFP apresentam o mesmo perfil de suscetibilidade ao Bz.



Avaliação *in vitro* do efeito do Bz nas cepas TcWT e TcGFP através de MTT (A) e contagem microscópica (B). Não há diferença estatística entre os valores de  $CI_{50}$  encontrados ( $p=0,8863$ ). Dados relativizados considerando as médias dos parasitos não expostos ao Bz como 100% de viabilidade. Fonte: o autor.

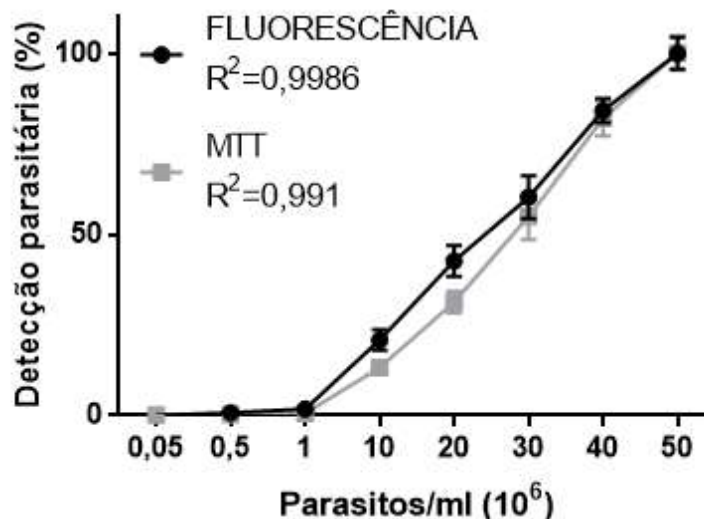
## 5.4 Padronização de ensaios fluorimétricos para formas epimastigotas

### 5.4.1 Concordância entre fluorimetria, MTT e densidade de parasitos

Para validar a utilização do método fluorimétrico para triagem de compostos anti-epimastigotas de *T. cruzi* foi necessário verificar a correlação da intensidade de fluorescência com a concentração de parasitos, assim como a concordância entre os valores obtidos por fluorimetria com densidade óptica pelo MTT, normalmente empregado nesses ensaios. Ambas as metodologias apresentaram um alto valor de correlação entre a concentração de parasitos e o método de detecção. Os valores são de  $R^2=0,9986$  para fluorescência e  $R^2=0,991$  para MTT. A sensibilidade da detecção parasitária difere ligeiramente entre os métodos. Em nossas condições experimentais, a fluorimetria detectou

uma concentração mínima de  $0,5 \times 10^6$  parasitos/ml em 200  $\mu$ l, enquanto por MTT o limiar de detecção é acima de  $1 \times 10^6$  parasitos/ml em 200  $\mu$ l (Figura 12). O PBS foi utilizado como meio durante a realização desses ensaios.

**Figura 12.** Semelhanças na sensibilidade dos métodos e nos dados de correlação entre número total de parasitos e detecção parasitária obtidos por fluorimetria e MTT.



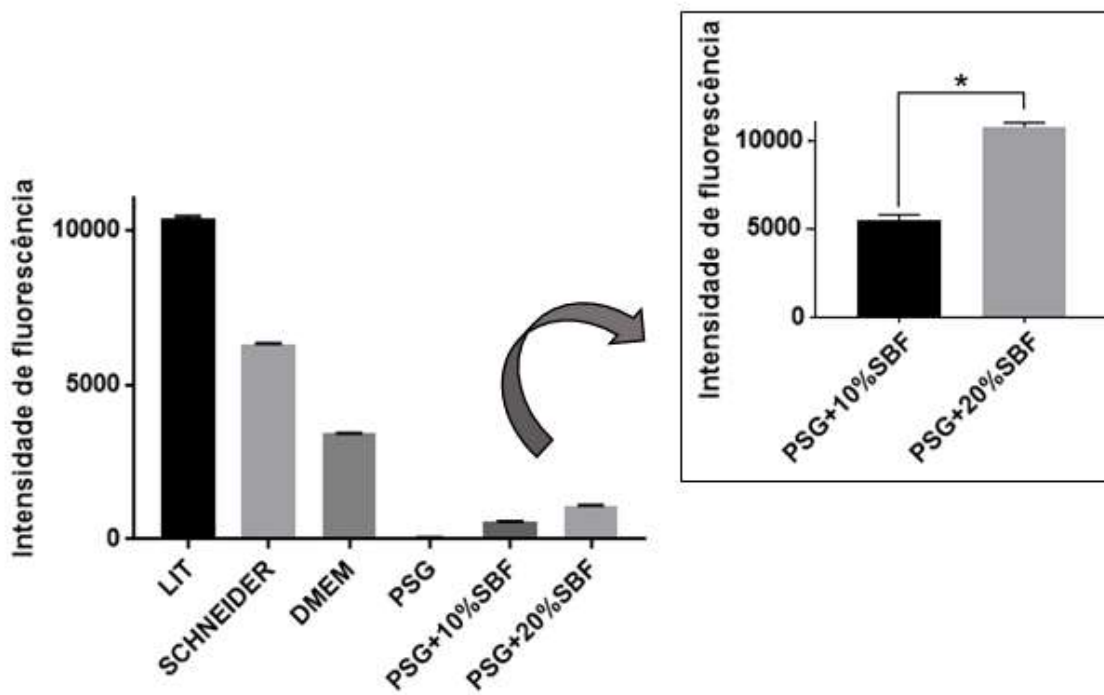
A sensibilidade de detecção parasitária é semelhante nas duas metodologias testadas, sendo que ambas apresentam alto coeficiente de correlação com a densidade parasitária. Nesses ensaios o PBS foi utilizado como meio. Dados relativizados considerando a média dos parasitos em maior inóculo como 100%. Fonte: o autor.

#### 5.4.2 Padronização de meio para ensaios fluorimétricos anti-epimastigotas

Dados preliminares não mostrados revelaram que há intensa autofluorescência no meio LIT, usualmente utilizado para cultivo e ensaio com formas epimastigotas, interferindo na detecção de parasitos nas amostras. Devido à essa autofluorescência e a perda de viabilidade dos parasitos em PBS a longo prazo, buscou-se um novo meio que não gerasse interferência nas leituras. Os meios de cultivo Schneider e DMEM apresentaram autofluorescência moderada. Já o PSG (PBS+5,4% de glicose) apresentou baixa fluorescência, sobretudo quando não suplementado com SBF. Quando suplementando com 10% ou 20% de SBF, o PSG apresentou valores de fluorescência de aproximadamente 5% e 10% da média de fluorescência emitida pelo LIT, respectivamente (Figura 13). Quando analisados isoladamente (destaque da

Figura 13) observa-se que o PSG+10%SBF interfere significativamente menos na fluorimetria do que o PSG+20%SBF.

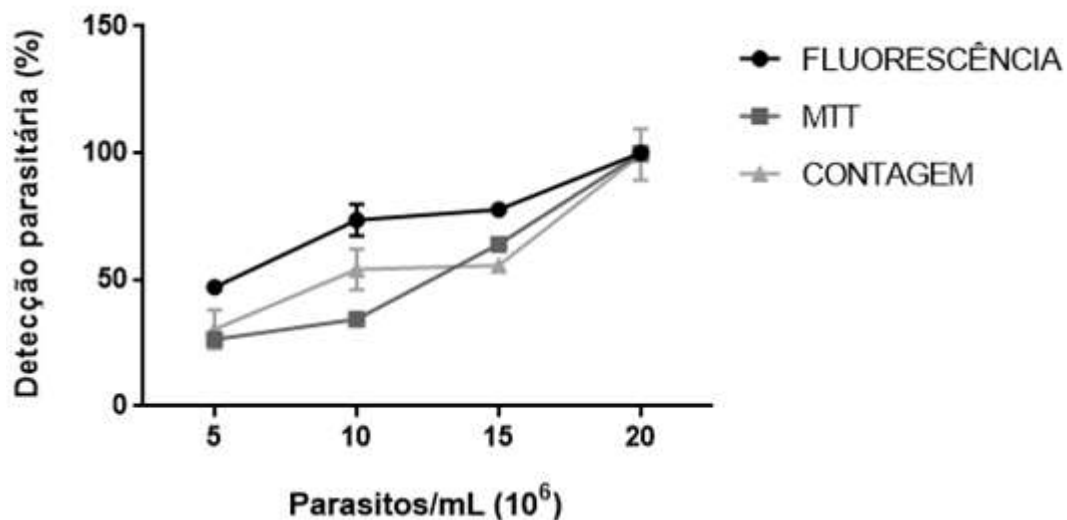
Figura 13. Autofluorescência dos meios de cultivo.



Autofluorescência de diferentes meios detectadas através de fluorímetro de placa em comprimento de onda de excitação e emissão próximos aos descritos para a GFP. Fonte: o autor.

Outro requisito do meio de ensaio é manter a viabilidade do cultivo de parasitos por um período de até 48 horas, quando normalmente se faz a avaliação da atividade tripanocida. Dessa forma, epimastigotas incubados a 27°C em PSG+10%SBF por 48 horas apresentaram-se viáveis e proliferativos, em todos os métodos de avaliação utilizados: microscopia óptica e contagem em câmara de Neubauer, fluorimetria e MTT (Figura 14).

Figura 14. Viabilidade de epimastigotas em PSG+10%SBF durante 48 horas.

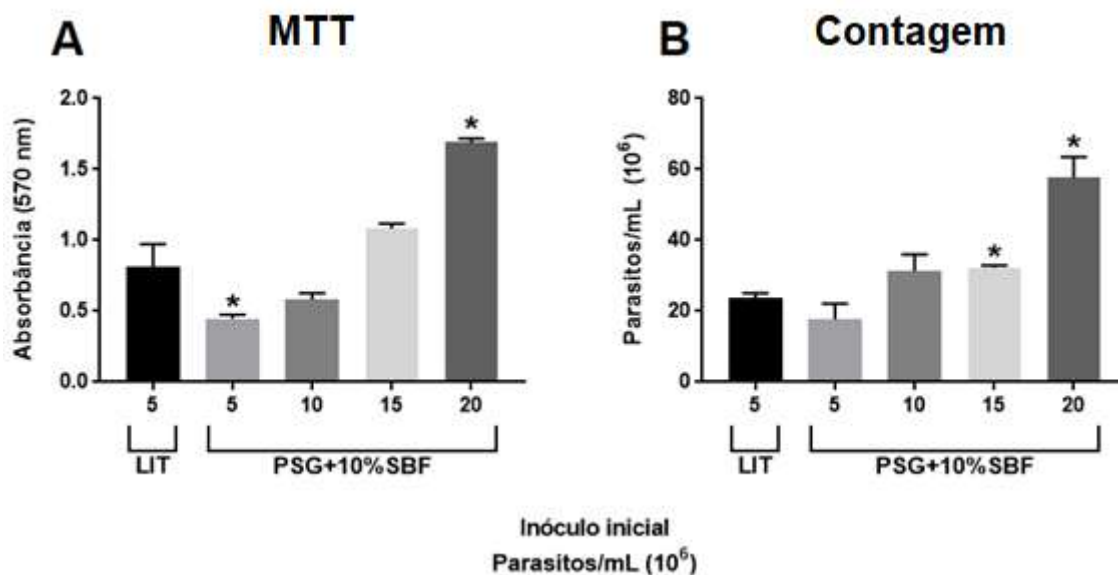


Dados obtidos após cultivo de epimastigotas em PSG+10%SBF por 48 horas. Os parasitos foram submetidos a três metodologias distintas: fluorimetria, MTT e contagem microscópica. Dados relativizados considerando a média dos parasitos em maior inóculo como 100%. Fonte: o autor.

Quando comparadas com o típico cultivo em LIT (inóculo inicial de  $5 \times 10^6$  parasitos/ml), as condições de viabilidade em PSG+10%SBF que mais se assemelham são as com inóculo inicial de  $10 \times 10^6$  parasitos/ml analisadas tanto por MTT (Figura 15A) e contagem (Figura 15B). Através de contagem microscópica, semelhanças de viabilidade com LIT foram encontradas nos inóculos de 5 e  $10 \times 10^6$  parasitos/ml (Figura 15B). A análise morfológica através de microscopia óptica (dados não mostrados) revelou que em inóculo de  $5 \times 10^6$  parasitos/ml há alteração na morfologia, apresentando parasitos arredondados. Com inóculo de  $15 \times 10^6$  há formação de *clusters*, diferindo do cultivo em LIT. O inóculo de  $10 \times 10^6$  parasitos/ml não mostrou sinais de alteração morfológica dos protozoários. Dessa forma, a melhor condição para os ensaios de atividade tripanocida contra formas epimastigotas é PSG+10%SBF com inóculo inicial de  $10 \times 10^6$  parasitos/ml.



Figura 15. Determinação do inóculo inicial de epimastigotas para os ensaios tripanocidas em meio PSG+10% SBF, avaliados por e MTT (A) e contagem (B).

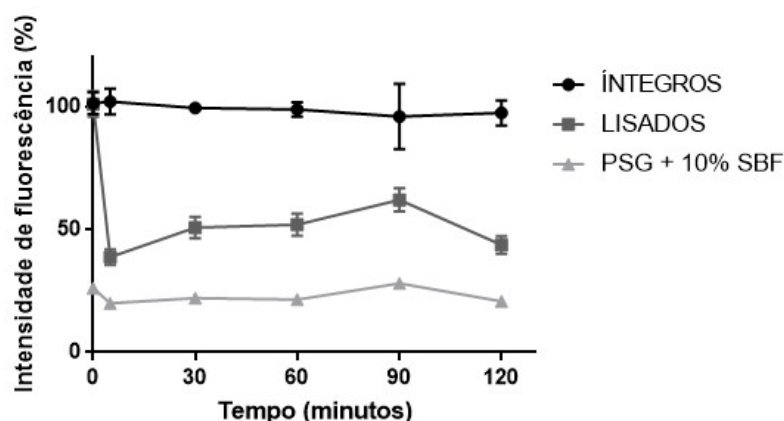


Dados obtidos após cultivo de epimastigotas em LIT ou PGS+10%SBF por 48 horas. A densidade de parasitos foi avaliada por duas metodologias distintas: MTT (A) e contagem microscópica (B). Em ambas as metodologias não há diferença entre o cultivo em LIT e o cultivo em PSG+10%SBF com inóculo inicial de  $10 \times 10^6$  parasitos/ml. Fonte: o autor.

#### 5.4.3 Detecção e remoção da fluorescência residual

Em virtude da ação lítica de muitos compostos antiparasitários, uma possível fluorescência residual liberada com a lise poderia interferir nas leituras de fluorescência. Para mensurar isso, epimastigotas foram lisados com HCl 0,01M+10%SDS e a fluorescência foi avaliada periodicamente ao longo de 2 horas. Os resultados mostraram que a GFP liberada no sobrenadante de epimastigotas lisados foi detectada na fluorimetria (Figura 16), sendo significativamente maior em relação ao meio PSG+10%SBF sem parasitos (Figura 17A).

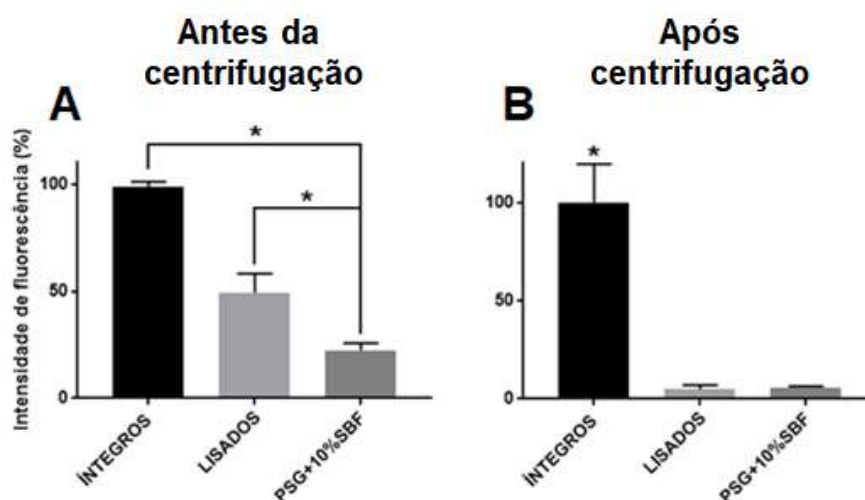
Figura 16. Cinética da fluorescência residual após 2 horas de lise de epimastigotas.



Deteção de fluorescência residual por 5, 30, 60, 90 e 120 minutos após lise de epimastigotas-GFP. Embora reduzida, comparada aos parasitos íntegros, a fluorescência residual apresenta valores superiores ao meio sem parasitos. Dados relativizados considerando a média dos parasitos não lisados como 100%. Fonte: o autor.

Um experimento semelhante ao descrito acima, com posterior centrifugação da placa mostra que a fluorescência residual foi removida, exibindo valores que não apresentam diferença entre os parasitos lisados e o meio de cultivo utilizado como controle (Figura 17B). Em conjunto, esses resultados mostram a necessidade da remoção da GFP residual, por centrifugação, no sobrenadante de testes de compostos que lisam os parasitos.

Figura 17. Deteção de fluorescência residual antes (A) e depois (B) da centrifugação da placa.



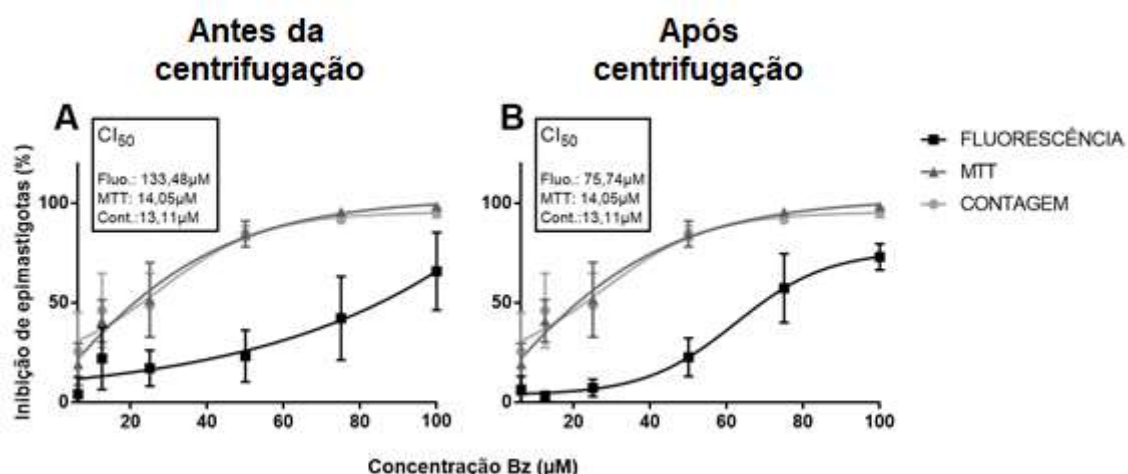
(A) Fluorescência mensurada duas horas após a lise mediada por HCl 0,01M+10%SDS antes da centrifugação da placa. (B) Mensuração da fluorescência após a centrifugação da placa. Após

centrifugação, apenas os parasitos íntegros apresentam diferenças em relação aos demais grupos ( $p < 0,0001$ ). Dados relativizados considerando a média dos parasitos não lisados como 100%. Fonte: o autor.

#### 5.4.4 Validação da fluorimetria para teste de compostos anti-epimastigotas de *T. cruzi*

Definidas as condições apropriadas para os ensaios, a validação da triagem de compostos anti-epimastigotas por fluorimetria foi realizada utilizando o Bz. Após 48 horas de incubação com o medicamento, a detecção por fluorescência exibiu valores mais altos que os demais métodos, sobretudo antes da centrifugação da placa (Figura 18A). Nessas condições, o valor de  $CI_{50}$  é de 133,48  $\mu\text{M}$ . Após centrifugação da placa para possível remoção de fluorescência residual ocasionada pela morte dos parasitos com o Bz, os valores obtidos por mensuração de fluorescência ainda permaneceram mais altos que os valores obtidos pelos demais métodos. Os valores de  $CI_{50}$  encontrados foram 75,74  $\mu\text{M}$  por fluorimetria, 14,05  $\mu\text{M}$  por MTT e 13,11  $\mu\text{M}$  por contagem microscópica (Figura 18B).

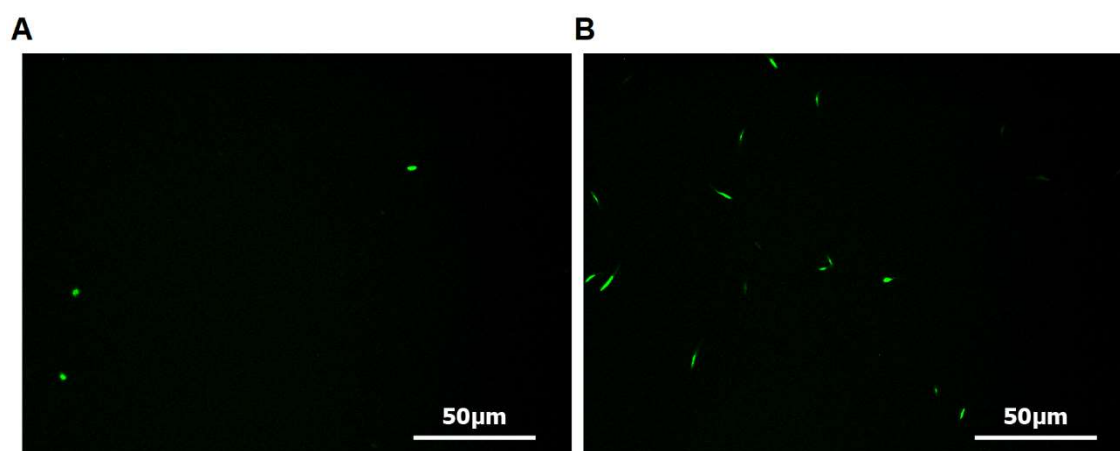
Figura 18. Curva de concentração de inibição do Bz para parasitos transfectados antes (A) e depois da centrifugação da placa (B).



Epimastigotas de TcGFP expostos a diferentes concentrações de Bz por 48 horas foram submetidos aos diferentes métodos de viabilidade celular. A fluorescência apresenta valores diferentes dos demais métodos. Dados relativizados considerando a média dos parasitos não tratados como 100%. Fonte: o autor.

As amostras recolhidas para análise em microscópio óptico e de fluorescência permitiram observar que não houve lise de todos os parasitos expostos ao Bz, mesmo na maior concentração utilizada (100  $\mu$ M). Entretanto, o MTT e a alteração morfológica (arredondados) mostraram a inviabilidade desses parasitos. A ausência de lise reteve a GFP intracelular (Figura 19A), e conseqüentemente gerou sinal na fluorimetria mesmo após a centrifugação da placa.

**Figura 19. Parasitos inviáveis emitindo fluorescência através da GFP.**



Parasitos inviáveis expostos a uma concentração de 100  $\mu$ M de Bz (A) e parasitos viáveis não tratados (B) permanecem emitindo fluorescência através da GFP. Aumento: 400x. Fonte: o autor.

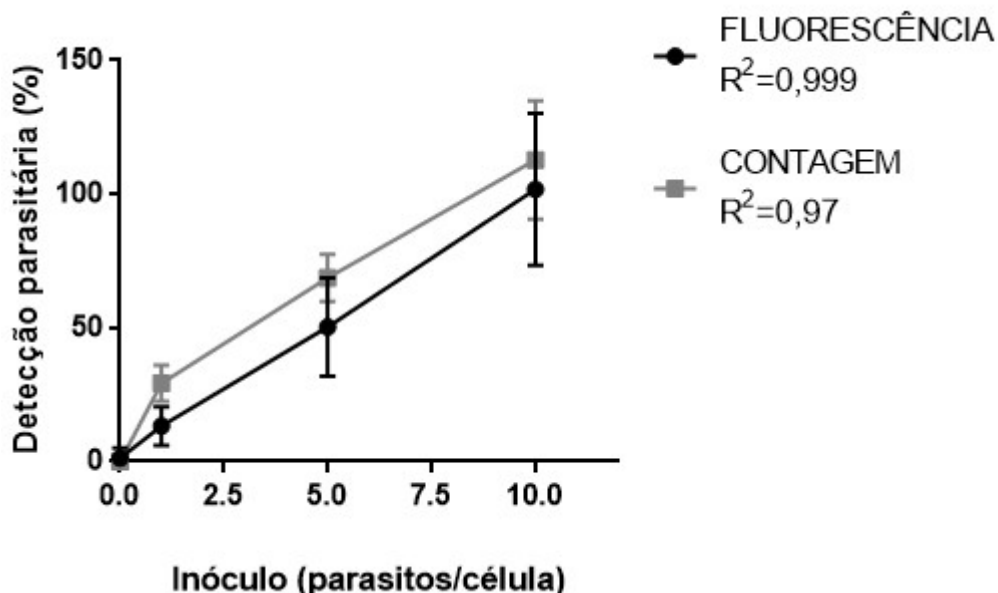
## 5.5 Padronização dos ensaios fluorimétricos para detecção de formas amastigotas intracelulares

### 5.5.1 Concordância entre contagem microscópica e fluorimetria

Para validar a utilização do método fluorimétrico para teste de compostos anti-amastigotas de *T. cruzi* foi necessário compará-lo com o método de contagem microscópica, amplamente empregado nesses ensaios. Para tanto, células Vero E6 foram infectadas com inóculos variando de 1 a 10 parasitos por célula e a carga parasitária avaliada após 48 horas de infecção, por contagem e fluorimetria. Ambas as metodologias apresentam um alto valor de correlação entre a concentração de amastigotas intracelulares e o método de detecção. Os valores são de  $R^2=0,999$  para fluorescência e  $R^2=0,97$  para contagem.

Fluorescência não foi detectada nas monocamadas celulares não infectadas (Figura 20). O PBS foi utilizado como meio durante a leitura de fluorescência.

**Figura 20. Correlação entre fluorescência ou contagem microscópica e carga parasitária intracelular.**



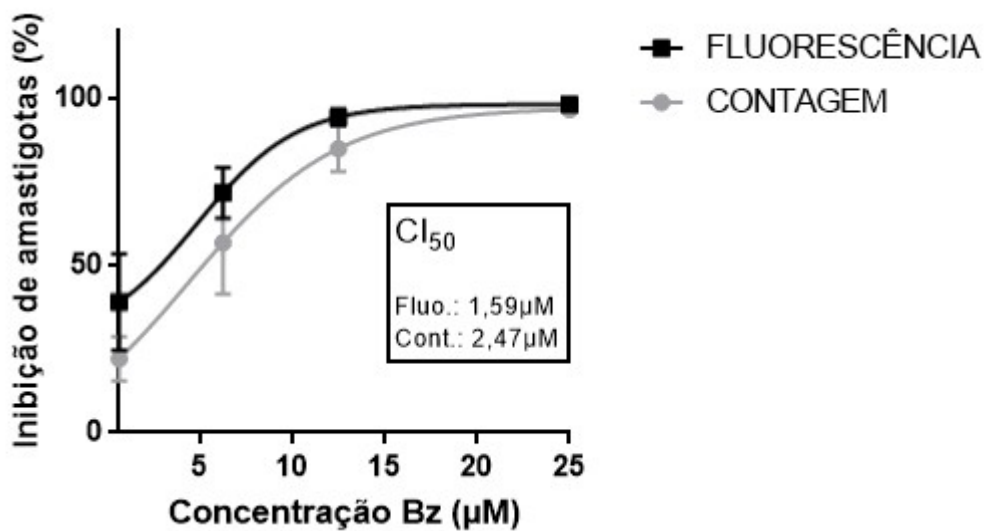
Células Vero E6 foram expostas a diferentes inóculos e a carga parasitária intracelular detectada por fluorescência e contagem microscópica após 48 horas de infecção. Ambas as metodologias apresentam alto índice de correlação entre o inóculo inicial de parasitos e a detecção parasitária. Não há diferença entre os métodos. Dados relativizados considerando a média dos resultados de maior inóculo como 100%. Fonte: o autor.

### 5.5.2 Validação da fluorimetria para teste de compostos anti-amastigotas de *T. cruzi*

A validação dos testes de compostos anti-amastigotas por fluorimetria foi realizada utilizando o Bz. Após 24 horas de incubação com o medicamento em meio DMEM, este foi substituído por PBS na placa escura para realização de uma leitura de fluorescência. Paralelo a isso, a placa clara foi corada pelo método de May-Grünwald para contagem microscópica de amastigotas intracelulares. Os resultados nos mostram que não há diferença entre os métodos de detecção. Ambos apresentam valores semelhantes de  $CI_{50}$  (Figura 21), sendo calculado o valor de  $1,59 \mu\text{M}$  por fluorimetria e  $2,47 \mu\text{M}$  por contagem microscópica. Esses

resultados mostram que é possível substituir a contagem pela fluorimetria em testes anti-amastigotas de *T. cruzi*.

Figura 21. Curva de concentração-resposta após 24 horas de incubação com Bz frente a amastigotas de TcGFP.



Os valores de  $CI_{50}$  obtidos pelos métodos de fluorescência e contagem foram semelhantes ( $p=0,064$ ). Dados relativizados considerando a média dos resultados dos parasitos não tratados como 100% de viabilidade. Fonte: o autor.

## 6 DISCUSSÃO

A doença de Chagas é responsável por aproximadamente 10.000 óbitos a cada ano (COURA, 2015; DIAS et al, 2016). Os pacientes ficam à espera de um medicamento eficaz para a fase crônica, mas devido ao baixo interesse da indústria farmacêutica, a busca por novas alternativas terapêuticas é realizada por instituições públicas de pesquisa (DIAS et al, 2016). Apesar de vários compostos tripanocidas estarem em testes, o trabalho é árduo e moroso devido à falta de praticidade da principal técnica, que é realizada através da contagem microscópica de parasitos residuais (FONSECA-BERZAL, 2018). A fim de facilitar a busca por novos compostos, foi proposto neste trabalho um método alternativo, semi-automatizado, para os testes com as formas epimastigotas e amastigotas intracelulares, com resultados imediatos e sem toxicidade. Este método se baseia na detecção da fluorescência emitida pela GFP expressa por parasitos transfectados.

Um trabalho semelhante ao apresentado aqui foi realizado por Kessler et al (2013), que transfectaram o clone Dm28c de *T. cruzi* com um plasmídeo integrativo ao *locus* de rRNA18S denominado pBEX/GFP para padronizar um método de detecção de compostos tripanocidas. Embora os resultados sejam reprodutíveis *in vitro* e haja correlação entre o número total de parasitos e a intensidade de fluorescência detectada, o uso de um clone não representa a heterogeneidade de uma cepa de *T. cruzi* (ZINGALES, 2011), podendo gerar resultados de baixa reprodutibilidade diante de diferentes cepas de *T. cruzi*. Além disso, o clone Dm28c não é referência para testes de triagem de compostos com atividade tripanocida.

Outro plasmídeo construído com a intenção de inserir o gene para a expressão de GFP ao genoma de *T. cruzi* é o pROCKGFPNeo, descrito por DaRocha et al (2004) e transfectado em parasitos da cepa Tulahuén. Diferente do plasmídeo descrito por Kessler et al (2013), este insere-se aos *loci* de  $\beta$ -tubulina. Esta proteína faz parte da composição da rede de microtúbulos subpeliculares, principal estrutura do citoesqueleto de *T. cruzi* (DE SOUZA, 1999). Desta forma, a expressão de GFP mantém-se constitutiva na célula do parasito. Outra característica do plasmídeo pROCKGFPNeo que difere do pBEX/GFP é a presença de um promotor ribossomal (Figura 3), que permite a

expressão de GFP no estágio não-replicativo de *T. cruzi*. A ausência de um promotor ribossomal integrado ao plasmídeo, como no caso do pBEX/GFP, faz com que a expressão fique condicionada aos promotores nativos do parasito, que são inativados por remodelação da cromatina após a diferenciação em tripomastigotas (ELIAS et al, 2001).

Além das características supracitadas, o plasmídeo pROCKGFPNeo também apresenta uma sequência 5' UTR de TcP2 $\beta$  (proteína ribossomal), permitindo que ocorra sua editoração através da adição dos mini-exons via *trans-splicing* (DaROCHA et al, 2004). Sequências do gene da gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase glicosomal (gGAPDH) e sua sequência 3' UTR também se fazem presentes, permitindo expressão constitutiva e seu processamento via poliadenilação, garantindo a estabilidade do mRNA transcrito (NOZAKI; CROSS, 1995). O gene da neomicina fosfotransferase também é encontrado no plasmídeo, para que possa ser realizado um processo de seleção por resistência através do antibiótico G418 (MARTINEZ-CALVILLO et al, 1997).

O presente trabalho utilizou a mesma estrutura de plasmídeo descrita DaRocha et al (2004) para transfectar a cepa Y (SILVA; NUSSENZWEIG, 1953), a qual apresenta média resistência ao fármaco de referência (MURTA et al, 1998), sendo um modelo interessante e amplamente utilizado para avaliar o efeito tripanocida de novos compostos. A transfecção foi realizada com a participação dos pesquisadores Dr. Alexandre Haruo Inoue e com a Dra. Rosiane Valeriano da Silva, do Instituto Carlos Chagas (ICC/Fiocruz-PR).

A análise em microscopia de fluorescência dos parasitos transfectados permitiu observar a expressão de GFP em todos os estágios evolutivos do parasito. Apesar da expressão da proteína heteróloga ocorrer de forma constitutiva e por toda a extensão celular, incluindo o flagelo, o nível de expressão foi muito variado na cultura de epimastigotas (Figura 6A). Este não é o primeiro caso de uma transfecção com expressão heterogênea descrito para a cepa Y de *T. cruzi*. Norris (1998) transfectou esta cepa para que epimastigotas expressassem a Proteína Regulatória do Complemento (CRP, do inglês "*Complement Regulatory Protein*"), uma proteína naturalmente expressa em formas tripomastigotas, às quais são resistentes à lise mediada pelo sistema complemento do hospedeiro vertebrado. O objetivo deste trabalho foi verificar se a expressão heteróloga de CRP em epimastigotas poderia subverter a sua



sensibilidade ao efeito lítico do sistema complemento, confirmando assim o papel de CRP nesse processo. Aproximadamente, 60 a 70% dos epimastigotas apresentaram resistência, sendo que a autora sugeriu que a persistência de formas epimastigotas sensíveis pode ser atribuída à heterogeneidade nos níveis de expressão ou rearranjo genético do plasmídeo, ocasionando a expressão alterada de CRP em células mantidas continuamente em cultivo.

Já é amplamente descrito que *T. cruzi* possui grande variabilidade genética tanto entre diferentes cepas quanto entre as subpopulações que compõem uma mesma cepa, embora se propaguem por multiplicação clonal (ZINGALES, 2011). Os distintos comportamentos apresentados pelos indivíduos da cepa (ALVES et al, 1993) podem ser a possível explicação para os níveis desiguais na expressão de GFP encontrada na cepa Y transfectada. Corroborando com isso, Alonso et al (2014) transfectaram o clone Dm28c e a cepa CL Brener de *T. cruzi* com plasmídeos que continham, dentre outros componentes, o gene para expressão de GFP. Como resultados, o clone Dm28c exibiu fluorescência homogênea entre os parasitos, enquanto a cepa CL Brener apresentou alta heterogeneidade na expressão da proteína, mesmo após seleção de parasitos com semelhantes níveis de expressão. Entretanto, diferente dos resultados obtidos por Alonso et al (2014) para a cepa CL Brener, os dados de seleção para a cepa Y, descrita no item 4.2.1, revelaram que a heterogeneidade dos níveis de expressão de GFP foi minimizada após a seleção e adição periódica de G418 (Figura 6B). Os níveis de expressão em todos os estágios do parasito se mantiveram homogêneos após a seleção, sendo confirmados por imunofluorescência indireta para as formas epimastigotas (Figura 7) e amastigotas (Figura 9) ou por fluorescência direta para a forma tripomastigotas (Figura 8).

Para que uma cepa de *T. cruzi* transfectada com o plasmídeo pROCKGFPNeo possa ser utilizada em diferentes ensaios biológicos, inclusive de avaliação de compostos tripanocidas, é necessário que a transfecção não altere as características biológicas da cepa original.

O crescimento *in vitro* de epimastigotas de *T. cruzi* Y apresenta um padrão já descrito na literatura (SILVA; NUSSENZWEIG, 1953), cujo perfil pode variar de acordo com a composição do meio de cultivo ou inóculo inicial de parasitos (MARTINEZ-DIAZ et al, 2001). A comparação entre as curvas de crescimento de

TcWT e TcGFP mostraram um perfil semelhante (Figura 10) quando avaliadas nas mesmas condições experimentais, mostrando que a transfecção e a expressão de GFP não alteraram o comportamento de replicação *in vitro* de epimastigotas da cepa Y de *T. cruzi*.

Para a comparação da suscetibilidade a compostos tripanocidas entre as cepas foi utilizado o Bz, fármaco utilizado para o tratamento da doença de Chagas e referência para triagem de novos compostos (ROMANHA et al, 2010). Nas condições experimentais propostas, o padrão de resposta de epimastigotas ao medicamento foi semelhante entre TcWT e TcGFP ( $p=0,8863$ ) (Figura 11). Os valores de  $CI_{50}$  para Bz frente a formas epimastigotas descritos na literatura são variáveis (de 16,3 a 20,38  $\mu\text{M}$ ), mesmo quando os ensaios são realizados com a mesma cepa de *T. cruzi* (LUNA et al, 2009; MORENO et al, 2010), provavelmente por diferenças biológicas, condições experimentais e/ou métodos de análise.

Uma vez confirmada a correlação biológica entre os epimastigotas de TcWT e TcGFP, admite-se a substituição da cepa selvagem pela cepa transfectada em triagens de compostos tripanocidas. O passo seguinte foi a padronização do novo método de análise de viabilidade utilizando TcGFP. Os ensaios foram padronizados tanto para as formas epimastigotas, tipicamente utilizadas na triagem inicial de compostos tripanocidas, quanto para as formas amastigotas, estágio clinicamente relevante para aplicação do fármaco.

Antes de iniciar a padronização dos métodos fluorimétricos foi necessário confirmar se a fluorescência emitida por TcGFP está correlacionada com a quantidade de parasitos em uma amostra.

Para epimastigotas foi mensurada a fluorescência dos parasitos distribuídos em diferentes concentrações em placa escura utilizando PBS como meio. Os índices de emissão de fluorescência foram comparados com os valores obtidos por colorimetria pelo MTT (RISS et al, 2004). Tanto a densidade óptica quanto a fluorescência foram proporcionais à concentração de parasitos (Figura 12), mostrando que a expressão de GFP, detectada por fluorimetria, pode estimar a concentração de parasitos em uma amostra, em um limite mínimo de  $0,5 \times 10^6$  parasitos/ml em 200  $\mu\text{l}$ , sendo levemente mais sensível que o MTT, que detecta parasitos em concentrações superiores à  $1 \times 10^6$  parasitos/ml em 200  $\mu\text{l}$ . Através dessas análises pode-se admitir a substituição da técnica de MTT por

fluorimetria, sendo este um método mais rápido, mais sensível, livre de toxicidade e que permite a utilização dos parasitos em ensaios posteriores.

Com a confirmação da possibilidade da utilização de fluorimetria em ensaios com epimastigotas de TcGFP, a etapa subsequente foi encontrar o meio de cultivo apropriado para realizar os ensaios tripanocidas, visto que eles exigem um tempo de incubação de 24 a 48 horas e o PBS não suporta a sobrevivência do parasito por períodos tão longos. Um ensaio preliminar foi realizado utilizando o meio LIT em placa escura de 96 poços. Após a mensuração da fluorescência da placa em comprimentos de onda de emissão e excitação próximos aos descritos para GFP (DE FARIAS, 2009), foi observado que todos os poços apresentavam alto nível de fluorescência (dados não mostrados), sendo impossível distinguir quais poços continham mais parasitos. Esse efeito não deve ter sido causado por espalhamento da fluorescência entre os poços próximos, pois placas escuras absorvem a fluorescência dispersa e impedem que esta seja difundida para os poços adjacentes (SIMEONOV; DAVIS, 2015). Esse impasse encontrado foi a autofluorescência do meio LIT. Simeonov e Davis (2015) descreveram que a autofluorescência dos compostos, tanto dos que estão em teste quanto dos reagentes utilizados nos ensaios podem interferir em ensaios fluorimétricos. Grande parte dos reagentes disponíveis atualmente possuem autofluorescência em espectro azul-verde, tendendo a causar interferência nas leituras de fluorescência que utilizem tais comprimentos de onda (SIMEONOV et al, 2008). O meio LIT apresenta alta autofluorescência nesse espectro, impossibilitando seu uso em testes fluorimétricos para detecção de GFP, sendo que nos ensaios de triagem de compostos ativos essa interferência subestima a atividade tripanocida.

A fim de minimizar a interferência nas leituras de fluorescência, buscou-se um meio alternativo para os ensaios biológicos com TcGFP. A autofluorescência de PSG (PBS+5,4% de glicose, suplementado ou não com SBF) e alguns meios típicos de cultivo foi avaliada. O PSG foi incluído nos testes porque PBS não apresenta autofluorescência, mas devido à sua carência em nutrientes, não permite manter os parasitos viáveis por 24 ou 48 horas em cultivo, impossibilitando seu uso em teste de compostos tripanocidas. Dentre os meios testados, o LIT possui a maior autofluorescência, seguido por Schneider, DMEM e PSG (Figura 13). Com esses resultados, foi descartada a possibilidade

da utilização dos meios LIT, Schneider e DMEM nos testes fluorimétricos. Após análise isolada dos valores de autofluorescência do PSG suplementado com 10% ou 20% de SBF, percebeu-se que há diferença entre esses dois meios, sendo o PSG+10%SBF o mais indicado para os ensaios por permitir a menor interferência na fluorescência dentre os meios testados.

Embora seja reconhecido que o SBF contenha fatores que promovem a proliferação e manutenção celular (VAN DER VALK et al, 2018), testes foram realizados para confirmar se PSG+10%SBF permite o cultivo de *T. cruzi* por até 48 horas. Diferentes inóculos de parasitos distribuídos em placa de 96 poços usando esse meio, avaliado após 48 horas quanto à morfologia, concentração e viabilidade dos parasitos. Para essa condição, as comparações realizadas mostram que *T. cruzi* se manteve viável, independente do inóculo (Figura 14).

Ao comparar o típico cultivo em LIT com inóculo inicial de  $5 \times 10^6$  parasitos/ml, através de MTT e contagem microscópica, a condição que mais se assemelha é a que teve uma distribuição inicial de  $10 \times 10^6$  parasitos/ml (Figura 15). Os inóculos de  $5 \times 10^6$  e  $15 \times 10^6$  parasitos/ml tiveram semelhança com o cultivo em LIT detectadas por apenas um dos métodos, enquanto que a condição inicial de  $10 \times 10^6$  parasitos/ml foi observada em ambos. Através de análise morfológica por microscopia óptica (dados não mostrados) foi constatada alteração na morfologia dos parasitos no inóculo mais baixo, apresentando parasitos arredondados. Já em inóculos superiores a  $10 \times 10^6$  parasitos/ml há formação de *clusters*, o que também os faz diferir do cultivo em LIT. O inóculo de  $10 \times 10^6$  parasitos/ml não mostrou sinais de alteração morfológica dos protozoários, sendo a condição mais apropriada para os ensaios de atividade tripanocida.

Devido à algumas características da GFP, como (1) estabilidade em amplo intervalo de pH (entre 5,5 e 12,0); (2) fluorescência emitida mesmo em temperaturas altas, próximas a  $65^\circ\text{C}$  (BOKMAN; WARD, 1981) e; (3) capacidade de permanecer ativa no meio extracelular quando secretada (LIU et al, 2001), pressupôs-se que em testes tripanocidas utilizando TcGFP ela poderia permanecer no meio após a lise dos parasitos mediada por algum composto. Para confirmar essa fluorescência residual, formas epimastigotas foram lisadas e a fluorescência mensurada ao longo de 2 horas. As amostras contendo os parasitos lisados apresentaram fluorescência inferior aos íntegros, mas superior

ao controle negativo - meio sem parasitos (Figura 17A), indicando a presença de GFP solúvel e detectável na fluorimetria. Portanto, a fluorescência residual, assim como a autofluorescência do LIT, são fatores limitantes para o uso de fluorimetria em testes de compostos tripanocidas.

Para diminuir a interferência da GFP residual nas leituras de fluorescência, buscou-se uma estratégia para remoção desse sinal. Uma possível solução é a retirada do meio utilizado e adição de PBS antes da leitura da placa. Entretanto, epimastigotas crescem em suspensão, e por isso, é necessária a realização de uma centrifugação para que os parasitos não sejam removidos com o meio. Pela massa molecular de uma proteína como a GFP (HINK et al, 2000), a proteína solúvel no meio não será sedimentada com os parasitos, nas condições utilizadas, permanecendo dispersa no sobrenadante e passível de ser removida. Após um novo teste de lise, seguido da remoção do meio por centrifugação, a fluorimetria mostrou valores semelhantes entre a amostra de epimastigotas lisados e o controle negativo (Figura 17B), demonstrando que a GFP residual pode ser removida por centrifugação.

Após superar os dois impedimentos para a utilização de fluorimetria como método para teste de compostos tripanocidas em epimastigotas (autofluorescência do meio e ruído de GFP residual pós lise), foi realizado um ensaio de atividade tripanocida utilizando o Bz frente a formas epimastigotas, comparando a detecção entre os métodos já utilizados com a nova técnica proposta. No entanto, mesmo utilizando um meio sem autofluorescência e centrifugando a placa para remoção da fluorescência residual, os valores obtidos por fluorimetria foram mais altos que os obtidos pelos demais métodos utilizados, subestimando a atividade tripanocida (Figura 18). Embora o Bz não apresente autofluorescência (dados não mostrados), os parasitos expostos às concentrações ativas do fármaco geraram sinal detectável na fluorimetria, o que pode ser decorrente da morte sem lise dos parasitos, não liberando a GFP no meio e impossibilitando a remoção da fluorescência residual por centrifugação (Figura 19). O Bz atua através de estresse oxidativo envolvendo modificações covalentes de macromoléculas, causando danos no DNA, proteínas e lipídeos do parasito. Os metabólitos do Bz podem ainda afetar o metabolismo do protozoário, potencializando seu efeito tripanocida, não atuando de forma diretamente lítica (MOREIRA et al, 2018; SALES et al, 2017).

Apesar da restrição do uso da técnica para epimastigotas, os testes realizados com amastigotas intracelulares mostraram resultados mais promissores. Inicialmente foi realizada uma avaliação para verificar se a fluorescência estava correlacionada com o número de parasitos utilizados na infecção das células, bem como avaliar a concordância entre a fluorescência e o número de parasitos contados através de microscopia óptica, nas mesmas condições. Os resultados mostram que há correlação para ambos os casos descritos (Figura 20).

As condições experimentais padronizadas para o teste de compostos anti-amastigotas foram aprovadas após realização de ensaios com Bz, nos quais os valores de  $CI_{50}$  obtidos por fluorescência e por contagem microscópica foram muito semelhantes, sem diferença estatística (Figura 21). A interferência encontrada para epimastigotas com a morte sem lise dos parasitos não foi observada nos testes com amastigotas intracelulares, provavelmente devido à degradação dos parasitos mortos e da GFP pela célula hospedeira (CLIFT et al, 2017), inibindo o sinal na fluorimetria.

Sendo assim, aceita-se que a utilização da mensuração de fluorescência de parasitos transfectados com GFP possa substituir a morosa contagem microscópica em testes anti-amastigotas de *T. cruzi*. Por ser um método de fácil realização, rápido e livre de toxicidade, facilitará triagens em larga escala de compostos tripanocidas, possibilitando assim a descoberta de um novo fármaco em um menor período de tempo.

## 7 CONCLUSÕES

- A expressão de GFP foi observada em todas as formas evolutivas do parasito;
- A transfecção não alterou o perfil de crescimento *in vitro* de epimastigotas, nem seu padrão de resposta *in vitro* ao Bz;
- TcGFP foi capaz de infectar células Vero E6 e completar o ciclo de multiplicação intracelular;
- A intensidade de fluorescência foi diretamente proporcional à concentração de epimastigotas e de amastigotas intracelulares;
- A triagem de compostos tripanocidas por fluorimetria, utilizando epimastigotas de TcGFP fica restrita para teste de compostos que causam a lise do parasito;
- A triagem de compostos tripanocidas por fluorimetria, utilizando amastigotas intracelulares de TcGFP pode ser utilizada em substituição à contagem microscópica.

## REFERÊNCIAS

AKIYOSHI, B., GULL, K. Evolutionary cell biology of chromosome segregation: insights from trypanosomes. **Open Biology**. 1;3(5):130023, May., 2013.

ALONSO, V. L., RITAGLIATI, C., CRIBB, P., SERRA, E. C. Construction of three new Gateway® expression plasmids for *Trypanosoma cruzi*. **Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz**. 109, n.8, p.1081-1085, Dec., 2014.

ALVES, A. M. B., TANUI, A., ALMEIDA, D. F., VON GRUGER, W. M. A. Reversible changes in the isoenzyme electrophoretic mobility patterns and infectivity in clones of *Trypanosoma cruzi*. **Experimental Parasitology**. 77: 246-253, Sep., 1993.

ANDRADE, S. G., MAGALHÃES, J. B. Biodemes and zymodemes of *Trypanosoma cruzi* strains: correlations with clinical data and experimental pathology. **Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. 30(1), 27–35, Feb., 1997.

ANDRADE, Z. A. Immunopathology of Chagas disease. **Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz**. vol 94 (Suppl I): p. 71-80, Sep., 1999.

ANDREWS, N. W., ABRAMS, C. K., SLATIN, S. L., GRIFFITHS, G. A. *T. cruzi*-secreted protein immunologically related to the complement component C9: Evidence for membrane pore-forming activity at low pH. **Cell**. 61(7), 1277–1287, Jun., 1990.

APT, W., GALAFÉ, S., ZULANTAY, I., YUHASZ, S., URBINA, P., et al. Chagas Disease: A Global Neglected Disease that Require Continuous Medical Education. **Journal of Community Medicine and Health Education**. 4:260, Nov., 2013.



BERN, C. Chagas' Disease. **New England Journal of Medicine**. 373(5), 456–466, Jul., 2015.

BLUM, B., BAKALARA, N., SIMPSON, L. A model for RNA editing in kinetoplastid mitochondria: "guide" RNA molecules transcribed from maxicircle DNA provide the edited information. **Cell**. 60 (2): 189-198, Jan., 1990.

BOKMAN, S. H., WARD, W. W. Renaturation of *Aequorea* green-fluorescent protein. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. 101, pp. 1372-1380, Aug., 1981.

BUCKNER, F. S., VERLINDE, C. L., LA FLAMME, A. C., VAN VOORHIS, W. C. Efficient technique for screening drugs for activity against *Trypanosoma cruzi* using parasites expressing beta-galactosidase. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. 40: 2592-2597, Nov., 1996.

CANÇADO, J. R. Long term evaluation of etiological treatment of Chagas disease with benznidazole. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. São Paulo. 44:29-37, Feb., 2002.

CAVALIER-SMITH, T. Higher classification and phylogeny of Euglenozoa. **European Journal of Protistology**. v. 56, p. 250-276, Oct., 2016.

CHAGAS, C. Nova Trypanozomíase Humana. **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**. p. 160-218, Aug., 1909.

CLAYTON, C. E. Life without transcriptional control? From fly to man and back again. **EMBO Journal**. 21, 1881-1888, Apr., 2002.

CLAYTON J. Chagas disease: pushing through the pipeline. **Nature**. 24;465(7301):S12-5, Jun., 2010.

CLIFT, D., MCEWAN, W. A., LABZIN, L. I., KONIECZNY, V., MOGESSIE, B., JAMES, L. C., et al. A Method for the Acute and Rapid Degradation of Endogenous Proteins. **Cell**. 14;171(7):1692-1706.e18, Dec., 2017

CONTRERAS, V. T., ARAÚJO-JORGE, T. C., BONALDO, M. C., THOMAZ, N., BARBOSA, H. S., MEIRELLES, M. N. S. L., GOLDENBERG, S. Biological aspects of the Dm28c clone of *Trypanosoma cruzi* after metacylogenesis in chemically defined media. **Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz**. 83(1), 123–133, Jan.-Mar., 1988.

COURA, J. R. Chagas disease: what is known and what is needed – A background article. **Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz**. Rio de Janeiro, Vol. 102 (Suppl. I): 113-122, Oct., 2007.

COURA, J. R. The main sceneries of Chagas disease transmission. The vectors, blood and oral transmissions - A comprehensive review. **Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz**. Rio de Janeiro, v. 110, n. 3, p.277-282, May., 2015.

COURA, J. R.; DE CASTRO, S. L. A critical review on Chagas disease chemotherapy. **Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz**. Rio de Janeiro, v. 97, n. 1, p. 3-24, Jan., 2002.

DaROCHA, W. D., SILVA, R. A., BARTHOLOMEU, D. C., PIRES, S. F., FREITAS, J. M., et al. Expression of exogenous genes in *Trypanosoma cruzi*: improving vectors and electroporation protocols. **Parasitology Research**. 92: 113–120, Jan., 2004.

DEANE, M. P. et al. Are our laboratory "strains" representative samples of *Trypanosoma cruzi* populations that circulate in nature? **Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz**. Rio de Janeiro, v. 79, supl. p. 19-24. 1984.

DE FARIAS, F. M. C. GFP: Uma Ferramenta Brilhante para a Visualização da Vida. **Revista Virtual Química**. 1º ed, Jan., 2009.

DE SOUZA, W. A short review on the morphology of *Trypanosoma cruzi*: from 1909 to 1999. **Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz**. Rio de Janeiro, v. 94, supl. 1, p. 17-36, Sep., 1999.

DIAS, J. C. P. et al. II Consenso Brasileiro em Doença de Chagas, 2015. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**. Brasília, v. 25, n. esp, p. 7-86, Jun., 2016.

DINARDI, L., PALAZZO, J., PEREIRA, T., COELHO, A., ROSSENER, R., SSANTOS, M., SANTOS JÚNIOR, V., CANIZARES, B., FIORELLI, A., STOLF, N. A. Transplante cardíaco na doença de Chagas. **Revista De Medicina**. 91(4), 229-240, Oct.-Dec., 2012.

ELIAS, M. C., MARQUES-PORTO, R., FREYMULLER, E., SCHENKMAN, S. Transcription rate modulation through the *Trypanosoma cruzi* life cycle occurs in parallel with changes in nuclear organization. **Molecular and Biochemical Parasitology**. 112 (1), 79-90, Jan., 2001.

FERREIRA, R. T. B., BRANQUINHO, M. R., LEITE, P. C. Transmissão oral da doença de Chagas pelo consumo de açaí: um desafio para a Vigilância Sanitária. **Vigilância Sanitária em Debate**. Rio de Janeiro 2: 4–11, Nov., 2014.

FILIGHEDDU, M.T., GÓRGOLAS, M., RAMOS, J. M. Enfermedad de Chagas de transmisión oral. **Medicina clínica Facultad de Medicina de Barcelona**. n.148, p.125–131, Feb., 2017.

FONSECA-BERZAL, C., ARÁN, V. J., ESCARIO, J. A., GÓMEZ-BARRIO, A. Experimental models in Chagas disease: a review of the methodologies applied for screening compounds against *Trypanosoma cruzi*. **Parasitology Research**. 117(11):3367-3380, Nov., 2018.

GUTUYAMA, L. M., CUNHA, J. P. C. da, SCHENKMAN, S. Histone H1 of *Trypanosoma cruzi* Is Concentrated in the Nucleolus Region and Disperses upon Phosphorylation during Progression to Mitosis. **Eukaryotic Cell**. 7 (4) 560-568, Apr., 2008.

HECKER, H., BETSCHART, B., BENDER, K., BURRI, M., SCHLIMME, W. The chromatin of trypanosomes. **International Journal for Parasitology**. 24, 809–819, Sep., 1994.

HINK, M. A., GRIEP, R. A., BORST, J. W., VANHOEK, A., EPPINK, M. H. M., SCHOTS, A., VISSER, A. J. W. G. Structural dynamics of green fluorescent protein alone and fused with a single chain Fv protein. **Journal of Biological Chemistry**. 275, pp. 17556-17560, Jun., 2000.

KESSLER, R. L., GRADIA, D. F., RAMPAZZO, R. C. P., LOURENÇO, E. E., FIDÊNCIO, N. J. et al. Stage-Regulated GFP Expression in *Trypanosoma cruzi*: Applications from Host-Parasite Interactions to Drug Screening. **PLoS ONE**. 8(6): e67441, Jun., 2003.

LIU, S., BUGOS, R. C., DHARMASIRI, N., SU, W. W. Green fluorescent protein as a secretory reporter and a tool for process optimization in transgenic plant cell cultures. **Journal of Biotechnology**. 87, pp. 1-16, Apr., 2001.

LUEHRING, T. A. F. M. **Avaliação da terapia de combinação do Itraconazol e Benzonidazol no tratamento da doença de Chagas experimental**. 2012. 76f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto. 2012.

LUKEŠ, J., LYS, G. D., VOTÝPKA, J., ZÍKOVÁ, A., BENNE, R., ENGLUND, P. T. Kinetoplast DNA Network: Evolution of an Improbable Structure. **Eukaryotic Cell**. 1(4):495-502, Aug., 2002.

LUNA, K. P., HERNÁNDEZ, I. P., RUEDA, C. M., ZORRO, M. M., CROFT, S. L., ESCOBAR, P. In vitro susceptibility of *Trypanosoma cruzi* strains from Santander, Colombia, to hexadecylphosphocholine (miltefosine), nifurtimox and benznidazole. **Biomédica**. 29(3), 448-455, Sep., 2009.

MADY, C., DE MORAES, A. V., GALIANO, N., DECOURT, L.V. Estudo hemodinâmico da forma indeterminada da doença de Chagas. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**. 38/4 271-275, Apr., 1982.

MANDAL, S. Epidemiological Aspects of Chagas Disease - a Review. **Journal of Ancient Diseases & Preventive Remedies**. v.2, n.2, p. 1-7, Jan., 2014.

MARTINEZ-CALVILLO, S. et al. pRIBOTEX expression vector: a pTEX derivative for a rapid selection of *Trypanosoma cruzi* transfectants. **Gene**. 199:71–76. Oct., 1997.

MARTINEZ-DIAZ, R. A.; ESCARIO, J. A.; NOGAL-RUIZ, J. J., GOMEZ-BARRIO, A. Biological characterization of *Trypanosoma cruzi* strains. **Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz**. v.96, n.1, p.53-59, Jan., 2001.

MARTINS, A. V. et al. Biology of *Trypanosoma cruzi*: An update. **INFECTIO**. Bogotá, v. 16, n. 1, p. 45-58, Mar., 2012.

MENDONÇA, V. C. M.; BERNARDES, R. H.; DEL BIANCHI, V. L. Impacto do surto da doença de chagas na comercialização do açaí (*Euterpe Oleracea mart.*) no município de Pinheiro - MA. **Revista SODEBRAS**. v. 9, n. 100, p. 174-178. 2014.

MOREIRA, D. S., DUARTE, A. P., PAIS, F. S. M., SILVA-PEREIRA, R. A., ROMANHA, A. J., SCHENKMAN, S., MURTA, S. M. F. Overexpression of eukaryotic initiation factor 5A (eIF5A) affects susceptibility to benznidazole in *Trypanosoma cruzi* populations. **Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz**. 26;113(9):e180162, Jul., 2018.

MORENO, M., D'AVILA, D. A., SILVA, M. N., GALVÃO, L. M. C., MACEDO, A. M., et al. *Trypanosoma cruzi* Benznidazole susceptibility in vitro does not predict the therapeutic outcome of human Chagas disease. **Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz**. 105: 918–924, Nov., 2010.

MUELAS-SERRANO, S., NOGAL-RUIZ, J. J., GÓMEZ-BARRIO, A. Setting of a colorimetric method to determine the viability of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. **Parasitology Research**. 86:999–1002, Dec., 2000.

MURTA, S. M., GAZZINELLI, R. T., BRENER, Z., ROMANHA, A. J. Molecular characterization of susceptible and naturally resistant strains of *Trypanosoma cruzi* to benznidazole and nifurtimox. **Molecular and Biochemical Parasitology**. 93:203-214, Jun., 1998.

NÓBREGA, A. A., GARCIA, M. H., TATTO, E., OBARA, M. T., COSTA, E., SOBEL, J., ARAUJO, W. N. Oral transmission of Chagas disease by consumption of açai palm fruit, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**. 15(4), 653–655, Apr., 2009.

NORRIS, K. A. Stable Transfection of *Trypanosoma cruzi* Epimastigotes with the Trypomastigote-Specific Complement Regulatory Protein cDNA Confers Complement Resistance. **Infection and Immunity**. 66(6):2460-2465, Jun., 1998.

NOZAKI, T., CROSS, G. A. M. Effects of 3' untranslated and intergenic regions on gene expression in *Trypanosoma cruzi*. **Molecular and Biochemical Parasitology**. 75(1), 55–67, Dec., 1995.

NUNES, L. R., CARVALHO, M. R., SHAKARIAN, A. M., BUCK, G. A. The transcription promoter of the spliced leader gene from *Trypanosoma cruzi*. **Gene**. 188:157–168, Apr., 1997.

PÉREZ-MOLINA, J. A., MOLINA, I. Chagas disease. **The Lancet**. 391(10115), 82–94, Jun., 2018.

PINTO, P. L. S., AMATO, V., NASCIMENTO, S. A. B., SOUZA, H. B. W. T., MIYAMOTO, A., MOREIRA, A. A. B., BRAZ, L. M. A. Observações sobre a viabilidade do *Trypanosoma cruzi* no caldo de cana. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. São Paulo. 32, 325–327, Oct., 1990.

PIRES, S. F. **Geração e caracterização de linhagens de *Trypanosoma cruzi* expressando proteínas fluorescentes como ferramentas para pesquisa em Doença de Chagas.** Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais, p. 112. 2007.

RAMÍREZ, J. D., HERNÁNDEZ, C., MONTILLA, M., ZAMBRANO, P., FLÓREZ, A. C., PARRA, E., CUCUNUBÁ, Z. M. First Report of Human *Trypanosoma cruzi* Infection Attributed to TcBat Genotype. **Zoonoses and Public Health.** 61(7), 477–479, Nov., 2013.

RISS, T.L., MORAVEC, R. A., NILES, A. L., BENINK, H. A., WORZELLA, T. J., MINOR, L. Cell viability assays. **Assay guidance manual.** May., 2004.

ROMANHA, A. J., de CASTRO, S. L., SOEIRO, M. N. C., LANNES-VIEIRA, J., et al. In vitro and in vivo experimental models for drug screening and development for Chagas disease. **Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz.** 105: 233–238, Mar., 2010.

SACCOLITI, F., MADIA, V. N., TUDINO, V., De LEO, A., PESCATORI, L., MESSORE, A., et al. Biological evaluation and structure-activity relationships of imidazole-based compounds as antiprotozoal agents. **European Journal of Medicinal Chemistry.** 156, 53–60, Aug., 2018.

SALES, P. A., CARNEIRO, C. M., SÁNCHEZ-MONTALVÁ, A., CORRÊA-OLIVEIRA, R., MURTA, S. M., SALVADOR, F., MOLINA, I. Experimental and Clinical Treatment of Chagas Disease: A Review. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.** 97(5), 1289–1303, Nov., 2017.

SAMUELS, A. M., CLARK, E. H., GALDOS-CARDENAS, G., WIEGAND, R. E., FERRUFINO, L., MENACHO, S., et al. Epidemiology of and impact of insecticide spraying on Chagas disease in communities in the Bolivian Chaco. **PLOS Neglected Tropical Diseases.** 1;7(8):e2358, Aug., 2013.

SILVA, L. H. P., NUSSENZWEIG, V. Sobre uma cepa de *Trypanosoma cruzi* altamente virulenta para o camundongo branco. **Folia clinica et biologica**. 20: 191-207. 1953.

SIMEONOV, A., DAVIS, M. I. Interference with Fluorescence and Absorbance. **Assays Guide Manual**. Dec., 2015.

SIMEONOV, A., JADHAV, J., THOMAS, C. J., WANG, Y., HUANG, R., SOUTHALL, N. T., SHINN, P., SMITH, J., AUSTIN, C. P., AULD, D. S., INGLESE, J. Fluorescence Spectroscopic Profiling of Compound Libraries. **Journal of Medicinal Chemistry**. 51: 2363-2371. Apr., 2008.

SOLARI, A. J. Mitosis and genome partition in trypanosomes. **Biocell**, vol. 19, p. 65-84, Aug., 1995.

SOUZA, L. C. K., PINHO, R. E. G. G., LIMA, C. V. P., FRAGOSO, S. P., SOARES, M. J. Actin expression in trypanosomatids (Euglenozoa: Kinetoplastea). **Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz**. 108(5), 631–636, Aug., 2013.

STEINDEL, M., PACHECO, L. K., SCHOLL, D., SOARES, M., MORAES, M. H., EGER, I., KOSMANN, C., SINCERO, T. C. M., STOCO, P. H., MURTA, S. M. F., CARVALHO-PINTO, C. J., GRISARD, E. C. Characterization of *Trypanosoma cruzi* isolated from humans, vectors and animal reservoirs following an outbreak of acute human Chagas disease in Santa Catarina state, Brazil. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**. 60: 25-32, Jan., 2008.

TEIXEIRA, D.; BENCHIMOL, M.; CREPALDI, P. H. et al. Interactive Multimedia to Teach the Life Cycle of *Trypanosoma cruzi*, the Causative Agent of Chagas Disease. **PLOS Neglected Tropical Diseases**. v. 6, 13p., Aug., 2012.

TORO, G.C., GALANTI, N. H 1 histone and histone variants in *Trypanosoma cruzi*. **Exp Cell Res**. 174(1):16-24, Jan., 1988.



TYLER, K. M.; ENGMAN, D. M. The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. **International Journal for Parasitology**, Vol 31: 472-481, May., 2001.

URBINA, J. A., PAYARES, G., SANJOJA, C., LIRA, R., ROMANHA, A.J. *In vitro* and *in vivo* activities of ravuconazole on *Trypanosoma cruzi*, the causative agent of Chagas disease. **International Journal of Antimicrobial Agents**. 21(1):27-38, Jan., 2003.

VAN DER VALK, J., BIEBACK, K., BUTA, C., COCHRANE, B., DIRKS, W., FU, J., HICKMAN, J., HOHENSEE, C., KOLAR, R., LIEBSCH, M., PISTOLLATO, F., SCHULZ, M., THIEME, D., WEBER, T., WIEST, J., WINKLER, S., GSTRAUNTHALER, G. Fetal bovine serum (FBS): Past – present – future. **ALTEX - Alternatives to animal experimentation**. 35, 1, 99-118, Aug., 2018.

VARGAS, A. et al. Investigação de surto de doença de Chagas aguda na região extra-amazônica, Rio Grande do Norte, Brasil, 2016. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 34, n. 1, Jan., 2018.

ZINGALES, B. *Trypanosoma cruzi*: um parasita, dois parasitas ou vários parasitas da doença de chagas? **Revista da Biologia**, v. 6b, p. 44–48, Jul., 2011.