

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA E BIOQUÍMICA



**Desenvolvimento de técnicas imunoquímicas e moleculares para a detecção do
Triatoma vírus (TrV) em amostras humanas e animais**

Jailson Fernando Brito Querido

Mestrado em Bioquímica

(Área de Especialização: Bioquímica Médica)

2011

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA E BIOQUÍMICA



**Desenvolvimento de técnicas imunoquímicas e moleculares para a detecção do
Triatoma vírus (TrV) em amostras humanas e animais**

Jailson Fernando Brito Querido

Mestrado em Bioquímica

(Área de Especialização: Bioquímica Médica)

Dissertação orientada pelo Doutor Marcelo Sousa Silva e pela Doutora Maria Margarida
Meireles

2011

Esta dissertação foi redigida de acordo com as regras da antiga ortografia.

Agradecimentos

Gostaria de começar por agradecer a toda a minha família e aos meus amigos que de uma forma ou de outra, contribuíram para o sucesso do meu trabalho.

À minha colega e companheira da vida académica e não só, Rita Medina Costa, um especial obrigado.

Não poderia deixar de agradecer ao Doutor Marcelo Sousa Silva, por me ter dado a oportunidade de realizar este trabalho de investigação no IHMT-UNL. Mais do que a oportunidade de realizar este trabalho, gostaria de lhe agradecer pelo entusiasmo e apoio transmitido durante o processo de aprendizagem e realização dos trabalhos.

Gostaria de agradecer à Doutora Maria Margarida Meireles por ter aceite ser a minha orientadora interna na FCUL.

Gostaria de agradecer ao CYTED pelo financiamento do consórcio Iberoamericano “*Red Iberoamericana para el Estudio del Control Biológico de Triatomíneos Transmisores de Chagas*”- Acción 209RT0364 (www.redtrv.org).

Agradecer ao grupo de investigação do Doutor Carlos Robello (Instituto Pasteur de Montevideo – Uruguay), por nos ter cedido o plasmídeo contendo a sequência nucleotídica específica para TrV, utilizado como controlo positivo nas reacções de PCR.

Agradecer ao grupo de investigação do Doutor Gerardo Marti, Centro de Estudios Parasitológicos y de Vectores (CEPAVE. CONICET-UNLP – Argentina), por nos ter cedido o TrV utilizado em todo o trabalho experimental.

Agradecer ao grupo de investigação do Doutor Felipe Guhl (CIMPAT, Universidade Los Andes – Colômbia), em especial à mestre Nadia Lorena González por me ter acompanhado nas experiências com triatomíneos e por me ter cedido alguns materiais de apoio bibliográfico.

Agradecer ao grupo de investigação da Doutora Olga Matos (Unidade de Parasitologia - IHMT-UNL – Portugal), por nos ter cedido soros de pacientes com doença de Chagas residentes em Portugal.

Agradecer a Dra. Andreia Sofia Lança (IHMT-UNL – Portugal), pelo seu contributo nos trabalhos de investigação.

Agradecer ao grupo de investigação do Doutor Diego Guérin (Unidad de Biofísica, CSIC-UPV/EHU – Espanha), pela colaboração prestada na purificação do TrV e das partículas vazias de TrV.

Agradecer a todos os membros da *RedTrV* pelas colaborações e apoios prestados ao longo da realização dos trabalhos de investigação. Sem essas colaborações, esta investigação não seria possível.

Por último, mas não menos importante, gostaria de agradecer à minha mãe, Ester Monteiro de Brito, por todo o apoio que me tem dado ao longo de toda a minha caminhada académica.

“Gostaria de dedicar esta tese ao Sr. José de Brito, meu avô de quem tanto ouvi falar, mas a vida não me deu a oportunidade de o ter conhecido. Sr. José de Brito foi um Homem de quem muitos se gabam, graças à sua curiosidade e vontade de poder responder a algumas questões relacionados com as enfermidades que sempre afectaram os trópicos. Estou certo que se o Sr. José de Brito tivesse tido as mesmas oportunidades que hoje estou a ter, os voos dele teriam sido bem maiores do que os meus. Ao meu avô, dedico-lhe esta tese pela inspiração que me deu ao longo da realização dos trabalhos.”

Índice

	Página
Agradecimentos	IV
Abreviaturas e símbolos	IX
Resumo	XII
Abstract	XIII
1 Introdução	1
1.1 Doença de Chagas – contextualização	1
1.2 Transmissão vectorial da doença de Chagas – Triatomíneos.....	4
1.3 Vírus.....	7
1.4 Imunidade em insectos.....	10
1.5 O triatoma vírus (TrV).....	11
1.6 Desenvolvimento de bioinsecticidas – uma perspectiva.....	17
2 Objectivos e Organização do Trabalho	20
3 Materiais e Métodos.....	22
3.1 Reagentes	22
3.2 Isolamento e purificação de TrV.....	22
3.3 Produção de anticorpo policlonal em murganhos	23
3.4 Optimização de um ensaio imunoenzimatico (ELISA) para a pesquisa de anticorpos anti-TrV em amostras humanas	24
3.5 Optimização de um ensaio imunoenzimatico (ELISA) para a pesquisa de anticorpos anti-TrV em murganhos	26
3.6 Inoculação de murganhos com TrV e com partículas vazias de TrV.....	28
3.7 Purificação de vRNA a partir de amostras biológicas (sangue em papel de filtro).....	29
3.8 Optimização de uma PCR para pesquisa de TrV em amostras biológicas (sangue em papel de filtro).....	30
4 Resultados e discussão	37
4.1 Pesquisa de anticorpos anti-TrV em soros de pacientes com doença de Chagas.....	38
4.2 Estudo da possível infectividade do TrV em murganhos <i>Mus musculus</i> (BALB/c) através do método de RT-PCR	43

4.3	Estudo da possível infectividade do TrV em murganhos <i>Mus musculus</i> (BALB/c) através do método de ELISA.....	47
5	Conclusões e perspectivas futuras.....	53
6	Referências Bibliográficas	55

Abreviaturas e símbolos

TrV	Triatoma vírus
bp	Pares de base
<i>T. cruzi</i>	<i>Trypanosoma cruzi</i>
<i>T. infestans</i>	<i>Triatoma infestans</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
RNA	Ácido ribonucleico
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
DNase	Desoxirribonuclease (<i>deoxyribonuclease</i>)
dNTP	Desoxirribonucleótido trifostato (<i>deoxyribonucleotide triphosphate</i>)
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético (<i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>)
PCR	Reacção em Cadeia da Polimerase (<i>polymerase chain reaction</i>)
IFN	Interferão
MHC	Do inglês: <i>Major Histocompatibility Complex</i>
Células NK	Células <i>natural killer</i>
TNF-α	Do inglês: <i>Tumor necrosis factors</i>
CTL	Células T citotóxica
Células Th	Do inglês: <i>T helper</i>
ADCC	Do inglês: <i>antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity</i>

ORF	Do inglês: <i>Open reading frame</i>
VP	Proteína viral (<i>Viral protein</i>)
ELISA	Do inglês: <i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
PBS	Do ingles: <i>Phosphate buffered saline</i>
HRP	Do inglês: <i>Horseradish peroxidase</i>
OPD	Do inglês: <i>o-Phenylenediamine</i>
H₂O₂	Peróxido de hidrogénio
N	Normalidade
OD	Do inglês: <i>Optical density</i>
Pab	Anticorpo policlonal (<i>Polyclonal antibody</i>)
FCA	Do inglês: <i>Freund's Complete Adjuvant</i>
FIC	Do inglês: <i>Freund's Incomplete Adjuvant</i>
DEPC	Do inglês: <i>Diethylpyrocarbonate</i>
vRNA	Ácido ribonucleico viral

Resumo

O Triatoma Vírus (TrV) é um patogénio de *Triatoma infestans*, o mais importante vector responsável pela Tripanosomose Americana, patologia também conhecida como doença de Chagas, causada pela infecção com o protozoário *Trypanosoma cruzi*. Devido ao seu modo de transmissão, especula-se que milhões de seres humanos e animais residentes em zonas endémicas para a doença de Chagas já estiveram expostos ao TrV. No entanto, até à presente data o TrV só foi encontrado em populações de triatomíneos de algumas regiões da Argentina. Tendo em conta a transmissão horizontal, vertical bem como a alta patogenicidade, o TrV é considerado um potencial agente no controlo biológico do *Triatoma infestans*. Contudo, alguns aspectos permanecem por esclarecer, como a infectividade de TrV em modelo animal. Assim, os dois principais objectivos deste estudo são pesquisar a presença de anticorpos anti-TrV em soros de pacientes com doença de Chagas, residentes ou não em países endémicos e estudar a possível infectividade de TrV em modelo animal (*Mus musculus*, *BALB/c*). Na pesquisa de anticorpos anti-TrV em soros de pacientes com doença de Chagas utilizou-se soros de pacientes residentes no Brasil, Cuba e soros de pacientes residentes em Portugal e que estiveram em zonas endémicas para a doença de Chagas. No estudo da possível infectividade do TrV utilizou-se cinco grupos de murganhos *Mus musculus* (*BALB/c*), onde cada grupo foi inoculado com diferentes concentrações de TrV e partículas vazias de TrV. A partir da análise imunoquímica, através de ELISA anti-TrV, pode-se constatar que não é possível encontrar anticorpos específicos anti-TrV em soros desses pacientes. Contudo, pode-se observar que todos os soros de pacientes com doença de Chagas, bem como soros de pacientes que nunca estiveram em zonas endémicas para a doença de Chagas apresentam uma certa reactividade frente a antígenos do TrV. A análise das amostras de sangue e do soro dos murganhos por RT-PCR e por ELISA, permite concluir que TrV não é infectivo para murganhos. Estes resultados em conjunto, bem como os resultados de estudos anteriores podem reforçar a hipótese da utilização de TrV como ferramenta no controlo biológico da doença de Chagas.

Palavras-chave: Triatoma vírus (TrV); *Triatoma infestans*; doença de Chagas; controlo biológico.

Abstract

Triatoma virus (TrV) is a viral pathogen of the blood-sucking reduviid bug *Triatoma infestans*, the main vector of human Chagas disease, also called American Trypanosomiasis, caused by infection with the protozoan *Trypanosoma cruzi*. Due to its mode of transmission, it is speculated that millions of humans and animals living in endemic areas for Chagas disease have been exposed to the TrV. However, to date the TrV was only found in populations of triatomines from Argentina. Taking into account the horizontal and vertical transmission as well as the high pathogenicity, the TrV is considered a potential agent in biological control of *Triatoma infestans*. However, some aspects remain unclear, as the TrV infectivity in an animal model. Thus, the two main purpose of this study are to research the presence of anti-TrV antibody in sera of patients with Chagas disease, residents or non in endemic countries and study the possible infectivity of TrV in an animal model (*Mus musculus*, *BALB/c*). In search of anti-TrV antibody in serum of patients with Chagas disease, we used serum of patients from Brazil, Cuba and serum from patients who living in Portugal, but were in endemic areas for Chagas disease. In the study of possible infectivity of TrV were used five groups of mice *Mus musculus* (*BALB/c*), and each group was inoculated with different concentrations of TrV and empty particles of TrV. From immunochemistry analysis, by ELISA anti-TrV, we note that we cannot find specific antibodies anti-TrV in serum of these patients. However it can be observed that all serum from patients with Chagas disease and serum from patients who never have been in endemic areas for Chagas disease have some reactivity against TrV antigen. The analysis of blood samples and serum of mice by RT-PCR and ELISA, allow us to conclude that TrV is not infective to mice. These results together and the results of previous studies may reinforce the hypothesis that TrV is a potential control agent against the vectors of Chagas disease.

Keywords: Triatoma virus (TrV); *Triatoma infestans*, Chagas disease, biological control.

1 Introdução

A doença de Chagas, também conhecida como Tripanosomose Americana é uma infecção aguda e/ou crónica, sistémica, parasitária causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) [1]. A sua transmissão dá-se essencialmente através do insecto vector, triatomíneos. Não existe nenhuma vacina eficaz na prevenção da doença de Chagas, por isso o controlo vectorial é a principal forma do controlo desta doença. Desde 1960, o controlo químico tem sido a principal forma de controlo vectorial da doença de Chagas [2]. O uso contínuo de insecticidas conduziu o desenvolvimento de resistência em populações de *Rhodnius prolixus* da Venezuela [3-4], desenvolvimento de resistência a piretróides em *Triatoma infestans* do Brasil [3] e desenvolvimento de resistência a insecticidas em populações de *T. infestans* da Argentina [2]. Por isso, urge o desenvolvimento de novas técnicas de controlo vectorial da doença de Chagas. O Triatoma vírus (TrV) é um vírus entomopatogénico que infecta o *T. infestans* (principal vector para a transmissão da doença de Chagas em humanos), provocando alta taxa de mortalidade, atraso no desenvolvimento, bem como a diminuição da fertilidade [5]. Para além de *T. infestans*, o TrV é infectivo para outras espécies de triatomíneos, como *T. patagonica* [6], *T. platensis*, *T. delpontei*, *T. pallidipennis*, *T. rubrovaria*, *R. prolixus*, *T. guasayana*, *T. sórdida*, *T. pallescens* e *Dipetalogaster máxima* [7-8]. Por isso, este vírus tem sido apontado como um agente potencial a ser utilizado no controlo biológico dos triatomíneos [9].

1.1 Doença de Chagas - contextualização

A doença de Chagas é uma infecção crónica e sistémica, provocado pelo protozoário *T. cruzi*. Estima-se que 16 a 18 milhões de pessoas estão infectados com este parasita em todo mundo, dos quais estima-se que 50 mil irão morrer todos os anos [10]. Antigamente a doença de Chagas estava confinada apenas a regiões pobres e rurais da América Central e do Sul, contudo, o recente influxo migratório, a partir de regiões endémicas para o resto do mundo, tornou a doença de Chagas uma questão importante

em saúde pública nos Estados Unidos da América, Canadá e vários países europeus, como Espanha [1;11].

Esta doença foi descoberta em 1909 pelo investigador brasileiro de nome Carlos Chagas (1878-1934). A sua transmissão pode ocorrer por diferentes mecanismos, como transfusões sanguíneas, transplantes de órgãos, vertical (via congénita), via oral, acidentes laboratoriais e essencialmente através do insecto vector, triatomíneos (nas zonas endémicas).

A infecção pela doença de Chagas em humanos possui duas fases, a fase aguda em que os sintomas aparecem logo após a infecção, e a fase crónica em que os sintomas se manifestam após um longo período de silêncio (vários anos) [12].

A fase aguda é definida como o período onde o parasita é facilmente encontrado no sangue e tem um período de incubação que vai de 5 a 110 dias, dependendo do mecanismo de transmissão [13]. Durante a fase aguda o indivíduo pode apresentar alguns sintomas (não específicos). Se a transmissão for vectorial, pode se observar edema no local de contágio, como o sinal de *Romaña* (é um edema inflamatório bipalpebral ou unilateral, associado a conjuntivite, dacrioadenite e aumento ganglionar pré-auricular, ocorre em 10 a 20% dos casos agudos de doença de Chagas), que normalmente persiste por 1 a 2 meses. Porém esta fase pode ser pouco sintomática ou mesmo assintomática, principalmente em adultos. A maioria dos casos de manifestação de sintomas em fase aguda é detectada em pacientes com menos de 15 anos de idade, com alta incidência entre pacientes com 1 a 5 anos de idade [12].

Durante a fase crónica ocorrem algumas lesões irreversíveis, que afectam alguns órgãos internos, nomeadamente o coração, esófago, cólon e o sistema nervoso periférico. Estima-se que 27 % dos pacientes infectados com o *T. cruzi* na fase crónica desenvolvem sintomas cardíacos (resultando na morte do paciente), 6 % apresentam danos no sistema digestivo e 3 % apresentam sintomas a nível do sistema nervoso periférico [14].

Durante a fase aguda da doença de Chagas a administração de fármacos como Nifurtimox ou Benzonidazol pode minimizar as complicações e reduzem a severidade [12;14].

A doença de Chagas pode ser diagnosticada através de métodos parasitológicos directos, métodos parasitológicos indirectos e através de métodos serológicos.

Método parasitológico directo:

Pode ser por exame directo do sangue, em que uma gota de sangue é observada ao microscópio óptico com uma ampliação de 400 X. Nesta técnica pesquisa-se a presença de tripomastigotas metacíclicos em movimento no sangue [15];

Gota espessa, pesquisa-se a presença de tripomastigotas metacíclicos, com as suas estruturas características, em C ou em S, com núcleo, cinetoplasto, flagelo e membrana ondulante [15];

Método de Strout, baseia-se na concentração dos parasitas no soro e observá-los ao microscópio óptico com uma ampliação de 400 X [15].

Métodos parasitológicos indirectos:

Xenodiagnóstico e hemocultivo, são os métodos de parasitológicos indirectos clássicos. Estas técnicas consistem em alimentar as ninfas de terceiro estágio de *Rhodnius prolixus*, com sangue dos pacientes. Trinta e sessenta dias após a inoculação, examinam-se as fezes e os intestinos dos insectos para detectar a presença de *T. cruzi* [15];

Um outro método parasitológico indirecto é a reacção em cadeia da polimerase (PCR). Esta técnica baseia-se na amplificação de sequencias de DNA do parasita.

Métodos serológicos:

Imunofluorescência indirecta (IFI), é uma técnica que permite a visualização de antígenos nos tecidos ou em suspensões celulares utilizando corantes fluorescentes, que absorvem luz e a emitem num determinado comprimento de onda. Esta técnica baseia-se na reacção anticorpo primário-antígeno e ligação do anticorpo secundário conjugado com uma molécula fluorescente ao anticorpo primário [15];

Hemaglutinação indirecta (HAI), é um método de quantificação de vírus, bactérias e parasitas que consiste na aglutinação das proteínas de superfície com hemácias do sangue;

ELISA (Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay) é um ensaio imunoenzimático que permite a detecção de anticorpos específicos no soro.

Apesar da incidência da doença de Chagas nas zonas endémicas e o crescente número de casos importados para Europa e para os EUA, ainda não existe nenhuma

vacina eficaz na prevenção desta doença. Por isso, o controlo vectorial é a principal forma de prevenção da doença de Chagas nas zonas endémicas.

1.2 Transmissão vectorial da doença de Chagas – Triatomíneos

A doença de Chagas é transmitida a seres humanos e a mais de 150 espécies de animais domésticos (cães e gatos, etc.) e mamíferos selvagens (roedores) através de dejectos de triatomíneos infectados [1]. A transmissão vectorial da doença de Chagas entre/para humanos, normalmente é causado pelos dejectos de triatomíneos domiciliados como o *P. megistus*, *R. prolixus*, *T. brasiliensis*, *T. dimidiata*, e *T. infestans* [1;12].

Os triatomíneos são insectos pertencentes ao reino *animalia*, filo *arthropoda*, classe *insecta*, ordem *hemiptera*, subordem *heteroptera*, família *reduviidae*, subfamília *triatominae* e género *Triatoma*. São conhecidos mais de 130 espécies de triatomíneos pertencentes a 16 géneros [14;16;17]. Contudo, apenas algumas espécies pertencentes a três géneros (*Triatoma*, *Rhodnius* e *Panstrongylus*) são importantes vectores para a transmissão de *T. cruzi* em zonas endémicas para a doença de Chagas [12]. Os triatomíneos com importância epidemiológica na transmissão de *T. cruzi* estão amplamente distribuídos no continente Americano, desde o México até a Argentina e Chile (figura 1) [12]. As espécies selvagens de triatomíneos têm uma distribuição mais ampla desde o norte dos EUA até a região da Patagónia no sul [12;17].

Os triatomíneos nascem sempre livres da infecção pelo *T. cruzi*, contudo podem-se contaminar durante o repasto sanguíneo num reservatório contaminado com *T. cruzi* ou a através do contacto com dejectos de outros triatomíneos contaminados. Uma vez infectado, o triatomíneo está pronto para infectar um mamífero. Tanto o macho como a fêmea se alimentam de sangue na fase adulta, por isso, ambos os sexos podem ser vectores para o *T. cruzi* [16].

Os insectos pertencentes a subfamília *Triatominae* passam por cinco estádios de ninfas, desde a eclosão até atingir o estágio adulto. Durante estas fases, esses insectos normalmente são hematófagos. Por isso, utilizam o hospedeiro mamífero para o seu repasto sanguíneo [18].

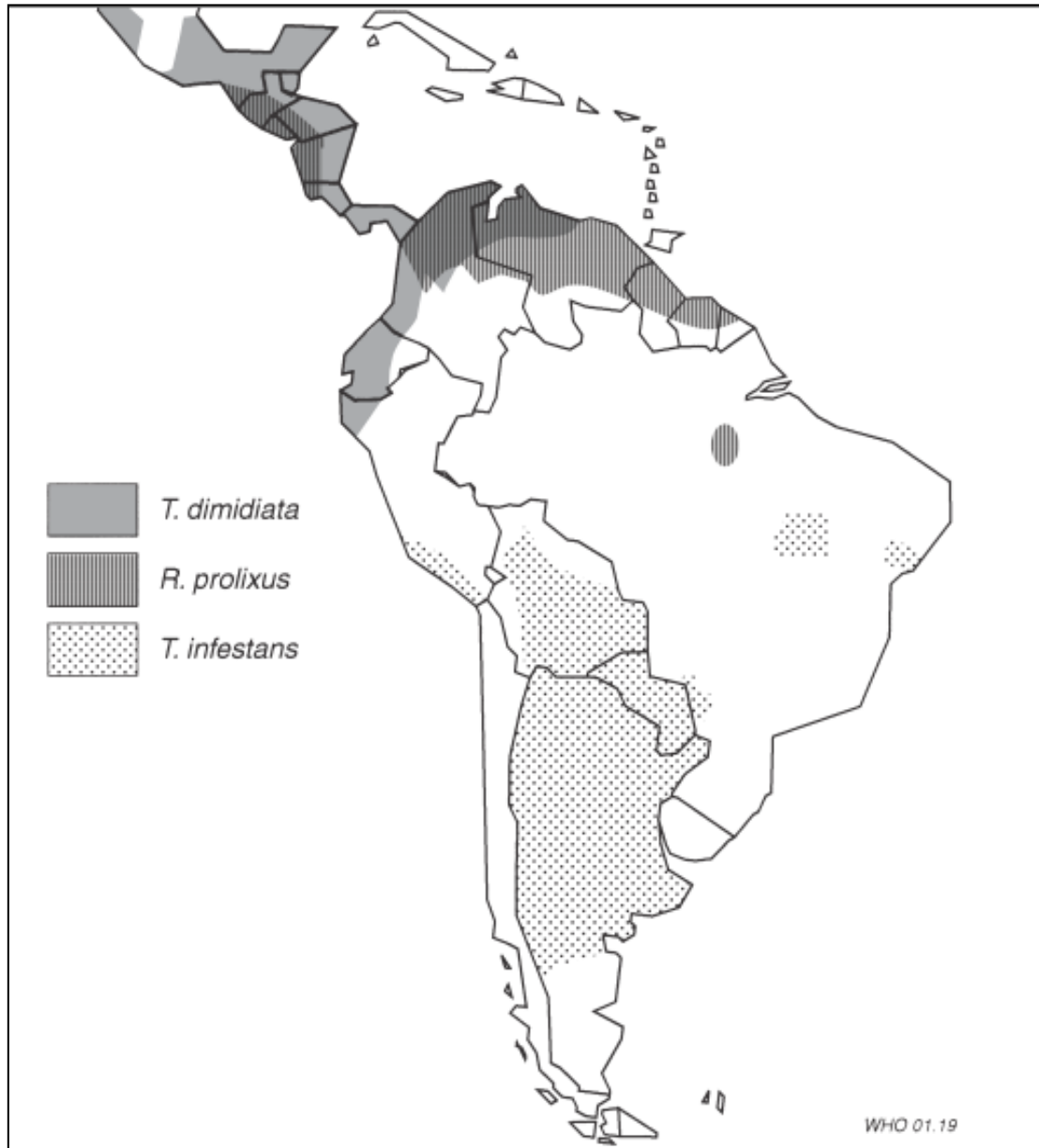


Figura 1: Distribuição geográfica das três espécies de triatomíneos com maior importância epidemiológica na transmissão vectorial da doença de Chagas. Retirado de: [12].

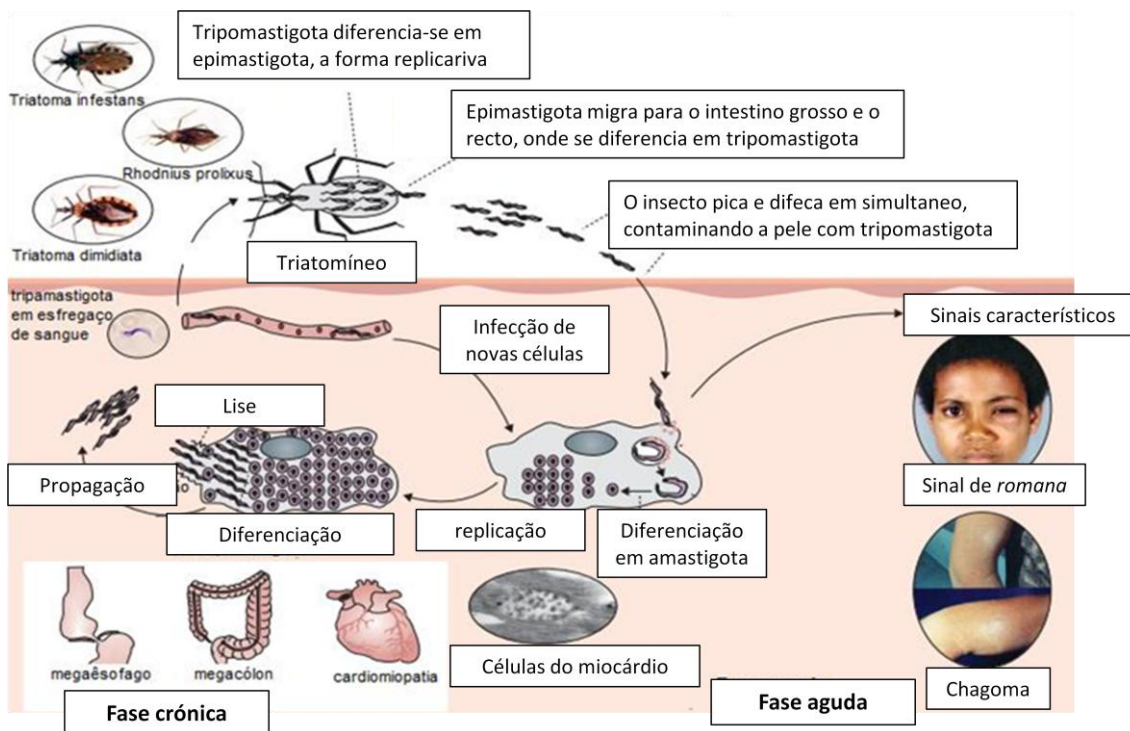


Figura 2: Transmissão vectorial da doença de Chagas e o ciclo de vida do *T. cruzi*. Adaptado de: [1].

O triatomíneo pode ser contaminado com tripomastigotas ao ingerir sangue de um hospedeiro animal infectado com *T. cruzi* (figura 2). No intestino delgado do triatomíneo, o tripomastigotas diferencia-se em epimastigota (a forma replicativa). Após a replicação, o epimastigota migra para o intestino grosso e o recto, onde se diferencia em tripomastigotas. Durante um novo repasto sanguíneo, o insecto vector pode defecar e contaminar a pele com fezes contaminadas com *T. cruzi*. Os parasitas que estão nas fezes podem contaminar a região da pele lesada com a picada do insecto ou podem contaminar a superfície conjuntiva. Desta forma o triatomíneo consegue transmitir a doença de Chagas entre animais e humanos [1]. Após a invasão, o parasita é encontrado no interior de células fagocíticas, como os macrófagos, e de células não fagocíticas, como os fibroblastos, células epiteliais e endoteliais. No interior das células o tripomastigotas diferencia-se em amastigota, e estas formas replicam-se por fusão binária. Ainda no interior das células, o amastigota diferencia-se e tripomastigotas e estas formas vão provocar a lise das células, levando à libertação do parasita para a corrente sanguínea [1;19].

Apesar de serem portadores de *T. cruzi*, os triatomíneos parecem não desenvolver nenhuma patologia relacionada com a presença deste parasita [1;20].

O controlo da transmissão vectorial da doença de Chagas tem sido feito através do controlo físico e químico. O controlo físico implica melhorar as condições das habitações (dentro e fora das mesmas) de forma a torna-las desfavoráveis à colonização por parte dos triatomíneos. Este mecanismo de controlo tem-se revelado muito importante no controlo da doença de Chagas, contudo o custo financeiro inerente ao melhoramento das habitações tem sido uma das limitações desta ferramenta de controlo vectorial da doença de Chagas [12].

O controlo químico consiste em pulverizar as residências e o peridomicílio com formulações, como o organocloreto, organofosfato e insecticidas piretróides. Nos últimos anos foram desenvolvidas duas novas ferramentas de controlo vectorial da doença de Chagas, uma vaselina fumigante e tintas que incorporam insecticidas numa formulação de libertação lenta. Contudo, existem alguns estudos onde é relatado o desenvolvimento de resistência a insecticidas por parte dos triatomíneos [2-21]. Além disso, os insecticidas são tóxicos e não selectivos.

As limitações do controlo físico, bem com o desenvolvimento de resistência as insecticidas, conduziram ao desenvolvimento de novos métodos de controlo vectorial da doença de Chagas. A utilização do TrV como agente no controlo biológico tem sido defendida por alguns investigadores [9]. Contudo, a sua aprovação está dependente de estudos da acção do TrV na relação parasita-vector-hospedeiro, bem como do impacto deste vírus na flora e na fauna local.

1.3 Vírus

Os vírus são parasitas intracelulares obrigatórios de pequenas dimensões, que se replicam no interior da célula hospedeira, utilizando a maquinaria sintética da célula.

Para perceber a natureza dos vírus é preciso entender a diferença entre vírus e virião. O virião é uma partícula, constituída por DNA ou RNA que está envolvida por proteínas. O virião está na fase extra-celular do ciclo de infecção viral. O ácido nucléico contem a informação genética necessária para programar a maquinaria sintética da célula hospedeira, com vista à replicação viral. O invólucro proteico serve para proteger

o ácido nucléico de agressões no exterior da célula por parte de agentes como os nucleases, e também permitem a ancoragem do virião à membrana da célula hospedeira [22].

A localização intracelular do vírus serve como mecanismo de protecção contra o sistema imune do hospedeiro. No entanto esta localização torna o vírus bastante vulnerável, uma vez que necessita da maquinaria sintética da célula hospedeira [22].

As propriedades epidemiológicas dos vírus dependem das características da associação vírus-hospedeiro. Por exemplo, alguns vírus de artrópodes requerem uma estreita faixa de temperatura para se replicarem no interior dos insectos, como resultado esses vírus são encontrados apenas em certas condições climáticas e geográficas [22].

A resposta imune à infecções viral é causada por um conjunto de mecanismos específicos e não específicos. O organismo infectado desenvolve um conjunto de respostas antivirais através da imunidade inata e através da imunidade adaptativa [23-24].

O principal mecanismo da imunidade inata contra os vírus é a secreção de interferões (IFN) pelas células infectadas e produção de um estado antiviral nas células vizinhas não infectadas. A infecção viral conduz à produção de IFN α/β , que activam os mecanismos antivirais nas células vizinhas, permitindo que essas células desenvolvam mecanismos de resistências a vírus [24].

Para além da secreção de interferões, o sistema imune inato pode desenvolver resposta antiviral através das células NK (*Natural killer*) e dos macrófagos. A ligação dos ligandos a receptores inibitórios ou receptores activadores determinam a função efectora das células NK. Os receptores inibitórios destas células reconhecem as MHC I expressas nas superfícies de células não infectadas e desta forma previnem a sua activação. No entanto, durante uma infecção viral a expressão de moléculas MHC I encontra-se suprimida de forma a impedir a apresentação de antígeno viral, o que provoca a diminuição de sinais inibitórios e conseqüente activação das células NK [24].

Durante a infecção viral os macrófagos actuam a três níveis no combate ao vírus e as células infectadas com vírus. Podem fagocitar os vírus e as células infectadas com vírus, destruir as células infectadas com vírus e também podem produzir moléculas antivirais, como factor de necrose tumoral- α (TNF- α), óxido nítrico e IFN- α [23-24].

A imunidade adaptativa contra a infecção viral é mediada por anticorpos neutralizadores, que bloqueiam a ligação e a entrada do vírus na célula hospedeira, e

também é mediada pelas células citolíticas (CTL), que eliminam as células infectadas pelos vírus [23-24].

A resposta humoral a vírus inibe a propagação do vírus no local da infecção e confere memória imunológica que irá prevenir à reinfecções (figura 3) [25]. Os anticorpos produzidos durante a resposta humoral a vírus, normalmente ligam-se a proteínas estruturais do vírus, neutralizando-as. Os anticorpos livres podem actuar a nível dos vírus livres, bloqueando a sua ancoragem e entrada na célula. Para além da sua acção isolada, o anticorpo pode actuar na via do complemento, destruindo o envelope do vírus e bloquear os seus receptores [23-24].

A resposta humoral a vírus é caracterizada pelo aparecimento de IgA nas secreções e IgG no soro, num processo dependente das células T auxiliares (Th) [26]. As células Th são classificadas em Th1, Th2 e Th17. As Th2 secretam interleucina-4 (IL-4), IL-5, IL-6 e IL-10, que estão associados a produção de IgG1, IgE e IgA [23;27]. As células Th1 produzem interferão gama (IFN- γ), IL-2 e factor de necrose tumoral beta (TGF- β) [27-28]. Esses factores são importantes na activação dos macrófagos e das células T citotóxicas, assim como na mudança de isotipo de imunoglobulina para IgG2a. A mudança de isotipo para IgG2a é dependente da replicação viral e em parte deve-se à produção de IFN- γ induzido por vírus [29]. A produção de IgG2a durante uma infecção viral é vantajosa porque este subtipo é muito eficiente na fixação do complemento e medeia a ADCC (citotoxicidade celular dependente de anticorpo). Coutelier e colaboradores [30] demonstraram que em muitos sistemas de infecção viral em ratinhos, a infecção viral resulta preferencialmente no aumento do nível de IgG2a no soro [30-31].

Os anticorpos do tipo IgG são responsáveis pela maior parte da actividade antiviral no soro. Durante uma infecção primária ou imunização, há uma resposta primária por parte das IgMs, posteriormente, alguns dias após a infecção, inicia-se a repostas por parte das IgAs e IgGs. No caso de uma reinfecção produz-se essencialmente a IgGs, contudo são produzidos alguns IgAs e IgMs [32].

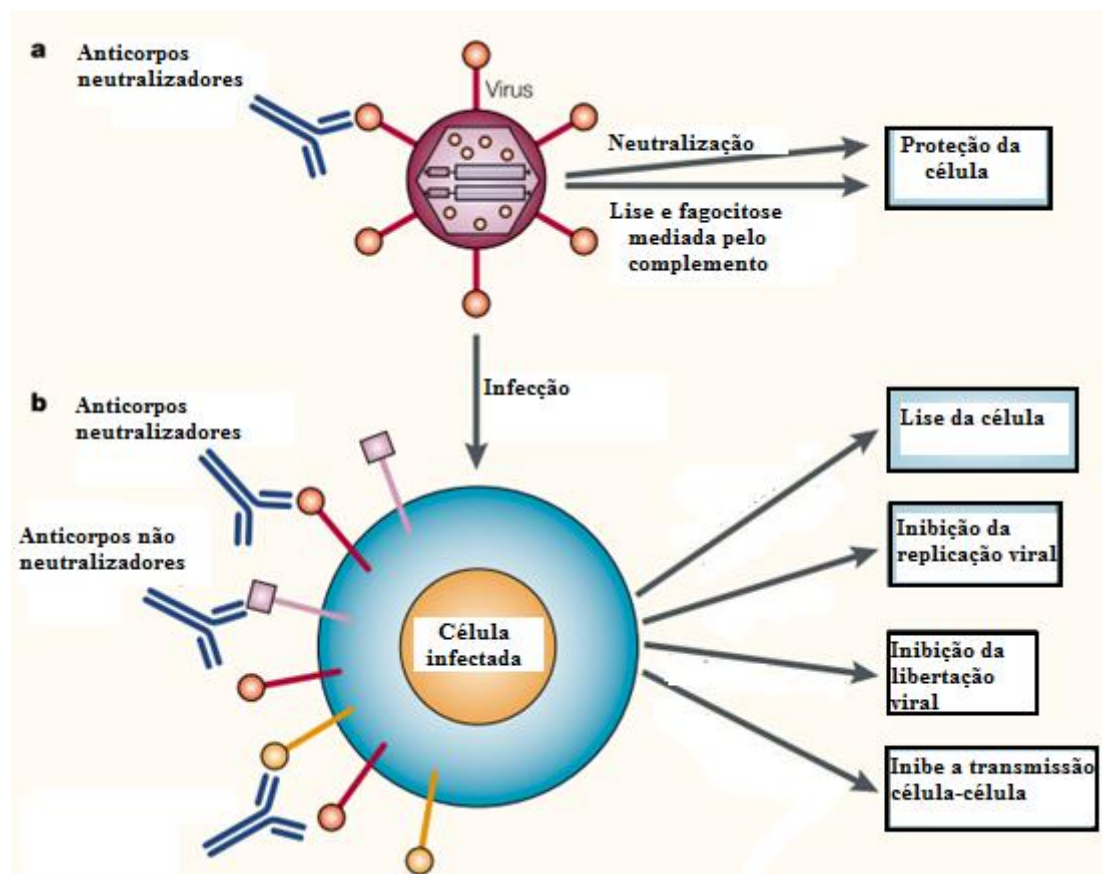


Figura 3: Actividade antiviral dos anticorpos. Anticorpos neutralizadores podem se ligar as proteínas a superfícies do vírus e bloquear a infecção. Adaptado de: [25].

1.4 Imunidade em insectos

O sistema imune nos insectos é mais simples do que nos mamíferos, embora possuam uma grande variedade de reacções de defesa, tanto a nível celular como humoral [33]. Uma grande diferença entre o sistema imune dos insectos e o sistema imune dos humanos é a capacidade que o sistema imune humano possui de criar uma memória imunológica a uma anterior exposição a um patógeno, e desta forma combater uma reinfecção. Este tipo de imunidade pode ser explorado através da exposição a patógenos inactivos, levando a protecção contra a infecção pelo patógeno que ocorrem naturalmente, o que é conhecido como a vacinação [34]. Os insectos são incapazes de

produzir anticorpos [35-37], por isso a abordagem profilática por pré-exposição a patogénio não é possível em triatomíneos ou outros insectos.

A capacidade dos insectos em resistir a um patogénio depende de muitos factores. A primeira linha de defesa dos insectos é o comportamento, em que um insecto evita entrar em contacto ou remove do seu ninho material potencialmente infeccioso. O segundo são as barreiras fisiológicas, tais como exoesqueleto, enzimas digestivos e o baixo pH do intestino [38-39]. Contudo se o patogénio conseguir atravessar essas primeiras barreiras de defesa será activada a imunidade celular [34;40]

O estudo da imunidade antiviral em insectos ainda está em fase embrionária. Algumas espécies de vespas (*Hymenoptera: Braconidae e Ichneumonidae*) têm associações com *polydnaviruses*. Estes vírus suprimem o sistema imune do insecto [41] por formação de bolhas irregulares nos hematócitos, apoptose e produção de proteínas immunosupressoras. No entanto, estes mecanismos não facilitam a replicação do vírus dentro de tecidos do hospedeiro, mas protege-o do encapsulamento [41].

Hemócitos de insectos podem fagocitar partículas de certos vírus [41]. Este mecanismo é uma resposta não específica do insecto a presença de organismos estranhos. No entanto, pode ser induzida por vírus para garantir a replicação e transmissão aos tecidos secundários. Uma redução na contagem total de hemócitos tem sido observada em insectos infectados por várias espécies de vírus [42-43]

A inoculação de partículas virais inactivadas em insectos não induz imunidade para infecções subsequentes [37-38], este facto deve-se à ausência de células B que conferem memória a infecções anteriores. Por isso a ausência de memória imunológica nos insectos pode ser mais um argumento a favor da utilização de TrV no controlo biológico de triatomíneos.

1.5 O triatoma vírus (TrV)

Em 1984 através de uma colaboração entre o Centro de Estudos Parasitologicos e Vectores (Cepave-Conicet, Argentina) e o Centro de Virologia Animal (Cevan-Conicet,

Argentina) iniciou-se uma pesquisa para encontrar patogénios de triatomíneos, com o fim de identificar possíveis agentes a serem utilizados no controlo biológico dos triatomíneos.

Em 1987 foram descritos os primeiros casos de partículas do tipo picornavirus em *T. infestans* [44]. O TrV é um vírus patogénio de *T. infestans*, o principal vector para a transmissão do *T. cruzi* na América Central e do Sul. Recentemente foi demonstrado que TrV é capaz de infectar outras populações de triatomíneos como, *R. prolixus domésticos*, *R. prolixus silvestres*, *R. ecuadoriensis*, *T. dimidiata* e *T. maculata* [45].

É um vírus do género Cripavirus, pertencente à família *Dicistroviridae* que infecta insectos [46]. Inicialmente este vírus foi classificado como sendo membro da família *Picornaviridae* [44], tendo em conta apenas as suas propriedades físico-químicas. Contudo após a completa sequenciação do seu genoma [47], este vírus passou a ser classificado como membro da família *Dicistroviridae* [46].

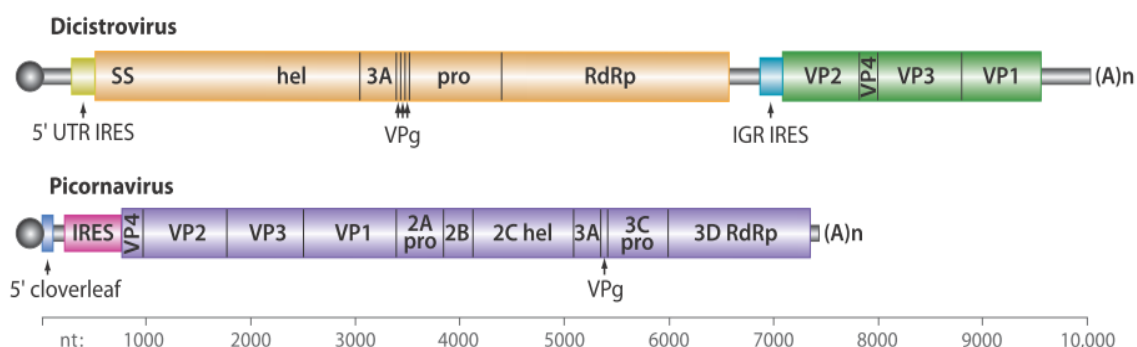


Figura 4: Organização genômica do *Dicistrovirus* e do *Picornavirus*. As caixas de cor laranja, verde e violeta indicam as regiões ORF. A verde representa a ORF2, responsável pela codificação das proteínas estruturais do *Dicistrovirus*. Retirado de: [48].

O genoma de *Dicistrovirus* é caracterizado pela presença de dois *open reading frames* (ORF), ORF1 e ORF2, que codificam as proteínas não estruturais e as proteínas estruturais, respectivamente (figura 4). Esta família de vírus é constituída por dois géneros, *Aparaviruses* e *Cripaviruses*, que infecta uma grande variedade de espécies de insectos (figura 5) [48-49].

O TrV replica-se nas células do epitélio do intestino dos triatomíneos, causando atraso no desenvolvimento, redução da fecundidade e morte do insecto (figura 6) [9].

O virião do TrV é uma estrutura esférica de 30 nm de diâmetro (figura 7), composto por um capsídeo sem envelope que delimita o genoma viral e uma molécula linear de RNA (sentido positivo). É constituído por quatro proteínas estruturais VP0, VP1, VP2, VP3. Estas proteínas têm de massa molecular 45 kDa, 39 kDa, 37 kDa e 33 kDa, respectivamente. Para além destas 4 proteínas, a estrutura do virião apresenta uma proteína de baixa massa molecular de valor teórico 5,5 kDa, VP4 [50].

A proteína VP4, de menor tamanho, participa na entrada do vírus na célula [51-52], movendo-se junto com o N-terminal do VP1, formando um canal na membrana [53], com o objectivo de permitir a libertação do RNA viral para dentro da célula hospedeira.

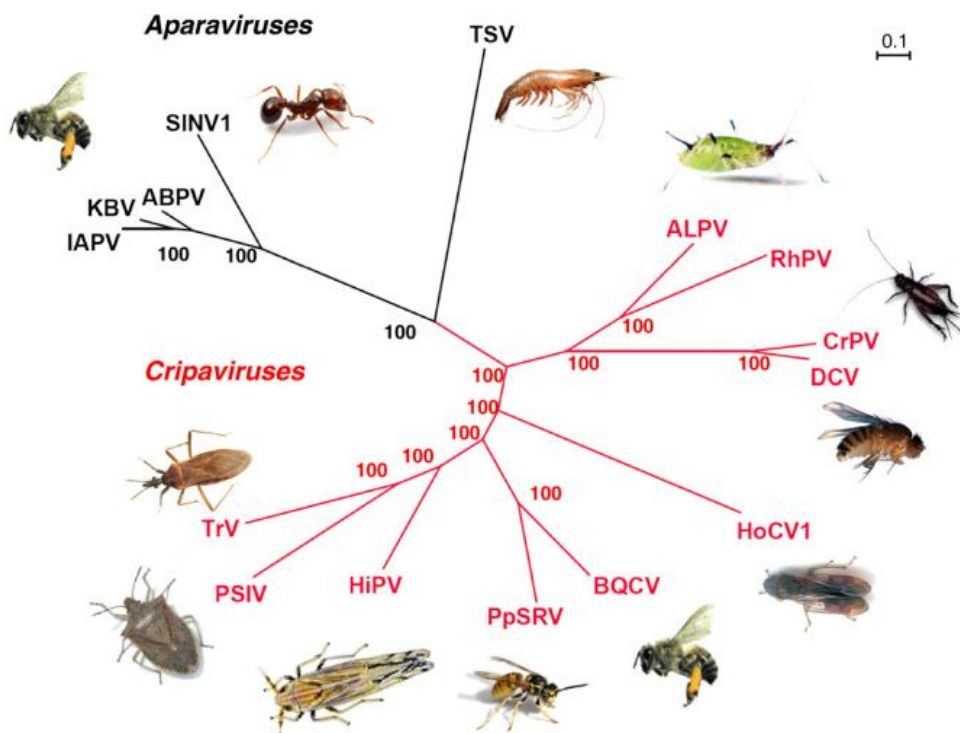


Figura 5: Árvore filogenética de *Dicistroviridae*. A vermelho está indicado o género *Cripaviruses* e a preto o género *Aparaviruses*. Para cada um dos vírus estão indicados exemplos de hospedeiros naturais. Retirado de: [49].

A estrutura tridimensional está amplamente ligada a função das proteínas. Por isso, alguns vírus não conseguem resistir às condições extremas do tracto digestivo dos insectos. Contudo, o TrV consegue manter a sua infectividade mesmo depois de passar pelo intestino do insecto ou mesmo depois de estar meses num meio desidratado como são as fezes dos insectos.

Enquanto alguns grupos de insectos utilizam serinoproteases e esterases como enzimas digestivo [54], os *hemiptéras* efectuam uma digestão ácida, utilizando outras classes de enzimas. Nos triatomíneos já foram identificados alguns enzimas digestivos, como catepsina B, D e L, que são enzimas que funcionam a pH óptimo inferior a 5. Valores de pH inferiores a 4, resultam na auto-agregação do TrV [55].

A Transmissão do TrV dá-se tanto pela via vertical como pela via horizontal. Nas populações selvagens de triatomíneos a transmissão vertical é a principal forma de persistência do vírus [9]. Por outro lado, em colónias laboratoriais a transmissão horizontal é a principal forma de transmissão do vírus. Durante ou após o repasto sanguíneo o triatomíneo pode defecar contaminando a epiderme com fezes contaminadas com TrV [18], e desta forma os triatomíneos não infectados que estão em posições adjacentes ao insecto infectado podem ser contaminados pela superfície contaminada ao picar o hospedeiro [56-57].

Especula-se que a transmissão horizontal de TrV dá-se por vários mecanismos, uma vez que a taxa de infecção em populações de insectos é muito maior em colónias laboratoriais do que nas populações selvagens [9].

Para além de provocar morte dos insectos, o TrV também pode provocar atraso no desenvolvimento das ninfas, bem como a redução da fecundidade [5].

Até à presente data o TrV só foi encontrado em populações de *T. infestans* da argentina, por isso, o estudo da sua prevalência só tem sido possível nesse país da América Latina. O TrV já foi identificado em sete províncias da Argentina, sendo a maior prevalência na província de La Rioja (figura 8) [58].

A relevância biológica, económica e médica do TrV baseia-se no facto dos triatomíneos serem os agentes responsáveis pela transmissão da doença de Chagas, epidemia que afecta 16 a 18 milhões de pessoas em todo mundo [10].

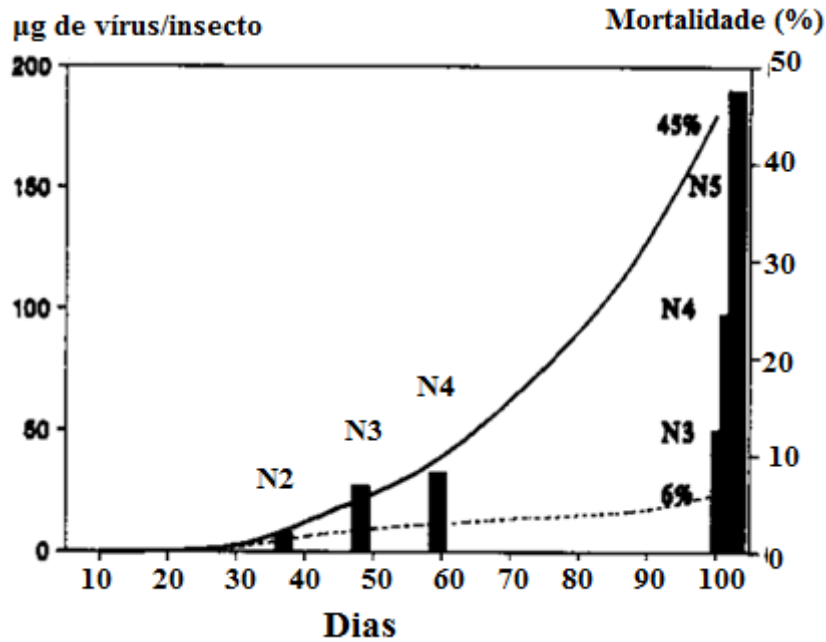


Figura 6: Acumulação de TrV por insecto e taxa de mortalidade das ninfas infectadas ao longo do tempo. Barras pretas representam a média de TrV por insecto (μg), quantificado após a purificação em gradiente de sacarose. Taxa de mortalidade para insectos infectados (—) e para o grupo controlo (---). Adaptado de: [9].

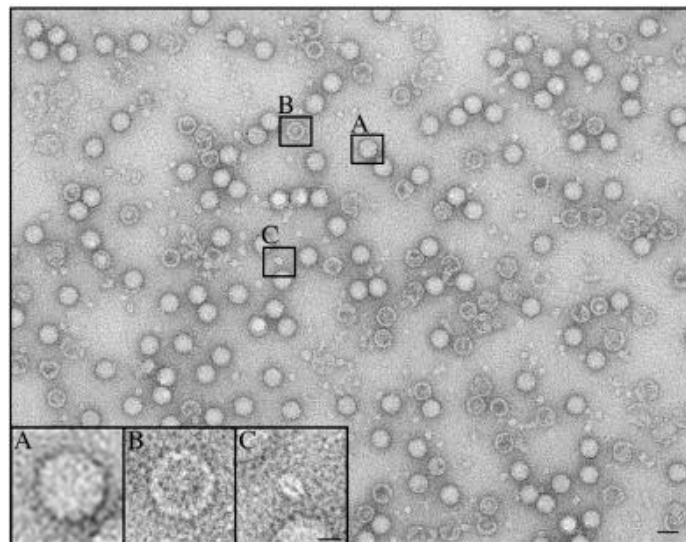


Figura 7: Imagem de do TrV obtida através da microscopia electrónica de transmissão. (A) Partícula completa de TrV. (B) Partícula vazia de TrV. (C) Uma pequena partícula. Retirado de: [58].

A completa sequenciação do genoma do TrV veio a reforçar a hipótese de utilização deste vírus como ferramenta no controlo biológico da doença de chagas uma vez que permitiu a reclassificação deste vírus e a sua inclusão numa família de vírus específico para insectos [47]. Por isso, acredita-se que este vírus poderá vir a ser utilizado como ferramenta no controlo biológico da doença de Chagas. Contudo até à presente data o TrV só foi identificado em populações de triatomíneos de algumas regiões da Argentina [59].

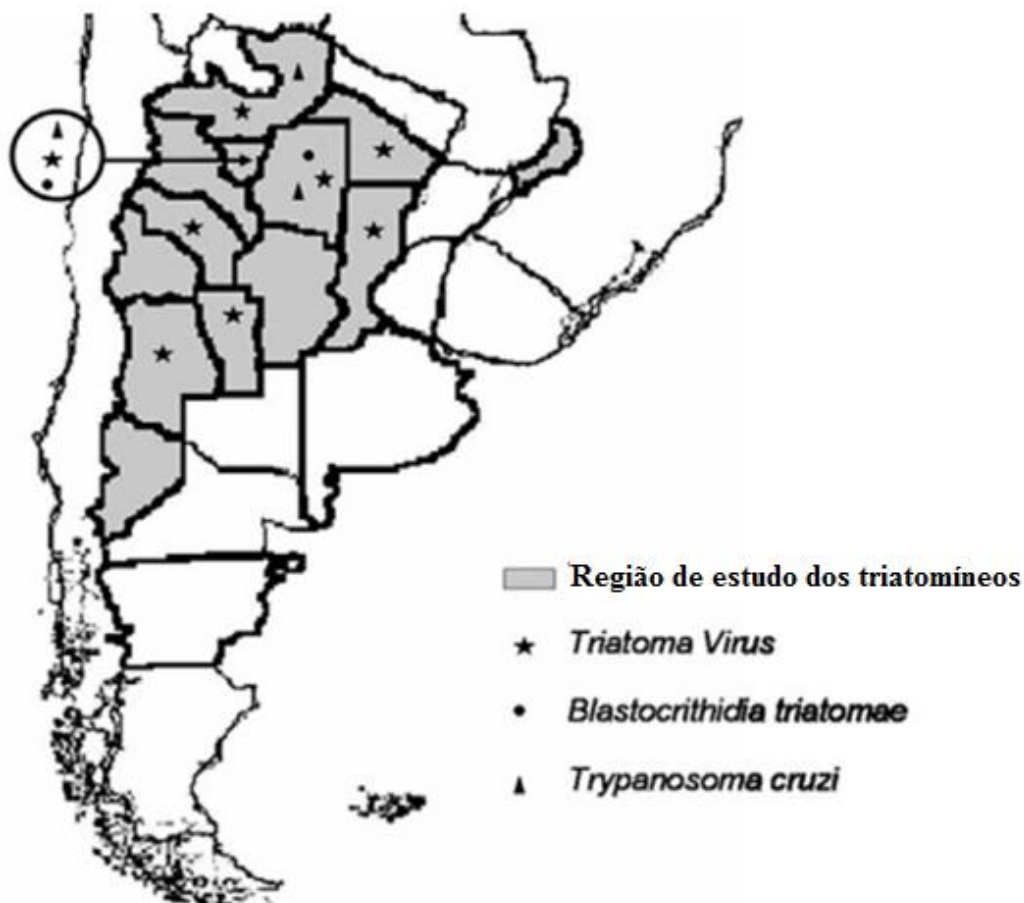


Figura 8: Distribuição geográfica de *Blastocrithidia triatomae*, *Trypanosoma cruzi* e TrV em populações naturais de triatomíneos na Argentina. Adaptado de: [59].

1.6 Desenvolvimento de bioinsecticidas – uma perspectiva

O controlo biológico consiste na redução da população de insectos através da acção de outros organismos vivos. Várias famílias de insectos possuem inimigos naturais como, vírus, fungos e bactérias, e esses inimigos naturais podem ser utilizados como agentes no controlo dessas populações de insectos.

O controlo vectorial da doença de Chagas tem sido feito à base do controlo químico [2]. Contudo, o risco da toxicidade inerente ao controlo químico, bem como o desenvolvimento de resistência a insecticidas pelos triatomíneos [2-21] impulsionaram o desenvolvimento de novas técnicas de controlo vectorial da doença de Chagas. Por isso, em 1984 através de uma colaboração entre o Centro de Estudios Parasitológicos y de Vectores (CEPAVE-CONICET, La Plata, Argentina) e o Centro de Virología Animal (CEVAN-CONICET, Buenos Aires, Argentina) investigou-se a presença de patogénios naturais em populações de triatomíneos, que poderiam ser utilizados como ferramentas no controlo biológico dos triatomíneos. Todos os estudos realizados na pesquisa de patogénios candidatos se assentaram essencialmente sobre as populações de *T. infestans*, porque esta espécie de triatomíneo é o principal vector na transmissão da doença de Chagas na América Latina.

Até ao momento foram identificados alguns patogénios candidatos (quadro 1).

Quadro 1: Patogénios candidatos isolados em *T. infestans*.

Vírus	Fungos	Protozoários
TrV	<i>Beauveria bassiana</i>	<i>Trypanosoma cruzi</i>
	<i>Paecilomyces lilacinus</i>	<i>e</i>
	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Blastocrithidia triatomae</i>

Alguns fungos foram identificados em populações de *T. infestans*. Contudo, esses fungos só foram encontrados em *T. infestans* mortos e colocados em câmara húmida (figura 9 e 10) [8].

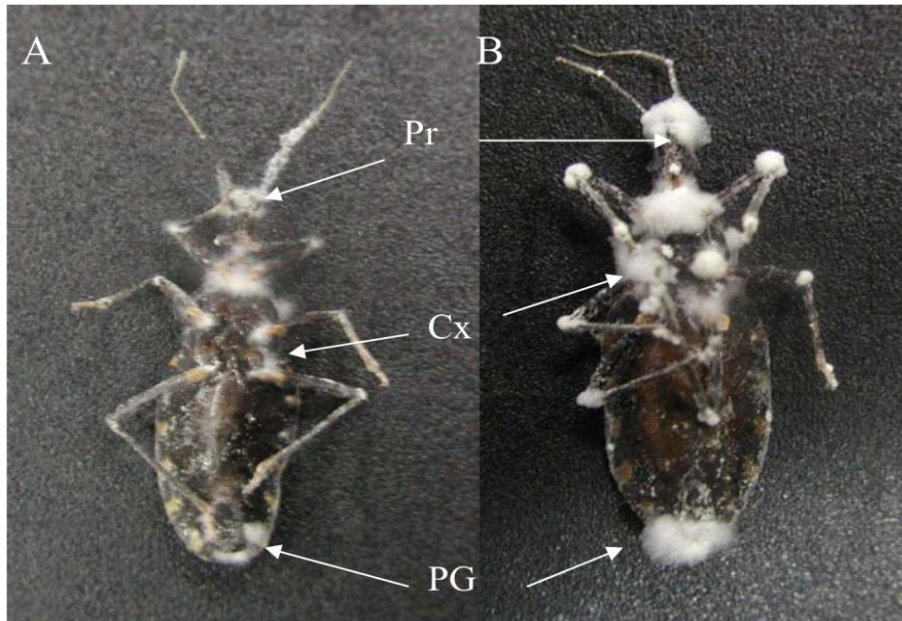


Figura 9: (A) *T. infestans* infectado com *Beauveria bassiana* após três dias em câmara húmida. (B) *T. infestans* infectado com *Beauveria bassiana* após cinco dias em câmara húmida. Retirado de: [8].

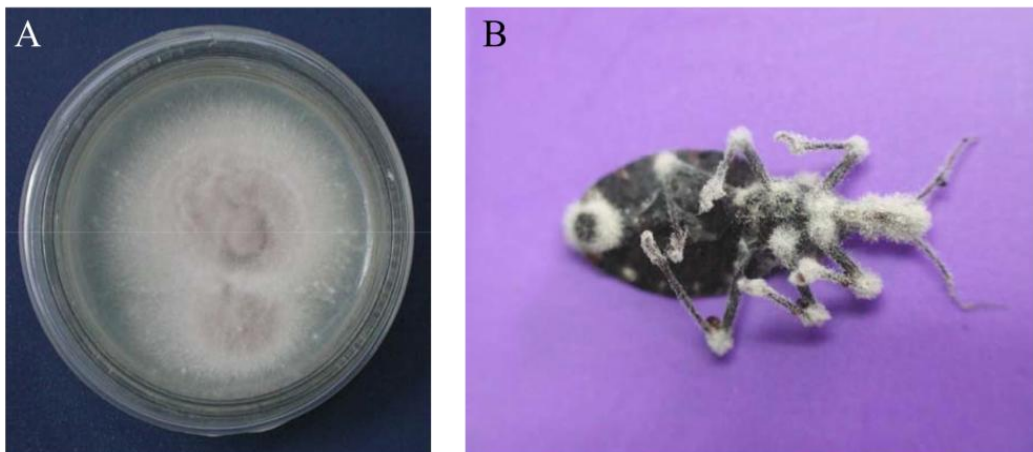


Figura 10: A- Cultivo de *Paecilomyces lilacinus*. (B) Adulto de *Triatoma infestans* infectado com *Paecilomyces lilacinus*, 10 dias após a morte. Retirado de: [8].

Para além dos fungos e dos vírus, foram encontrados alguns protozoários, como *Blastocrithidia triatomae* e *T. cruzi* no tracto digestivo dos triatomíneos [63]. Contudo, até a presente data admite-se apenas a utilização de TrV com ferramenta no controlo biológico de triatomíneos [57].

O TrV é o único vírus patogénio de triatomíneo identificado até agora. A sua transmissão dá-se tanto pela via vertical como pela via horizontal. A transmissão horizontal do TrV entre triatomíneos dá-se através da via fecal-oral e pela prática de canibalismo. Em ambientes naturais, essa transmissão é favorecida pela presença de feromonas presentes nas fezes das ninfas que atraem outros triatomíneos, e isso aumenta a densidade de insectos, que contribui para a transmissão do vírus [18]. Tendo em conta a taxa de mortalidade nas populações de insectos contaminados com o TrV, bem como o seu modo de transmissão, o TrV tem sido apontado com um agente potencial a ser utilizado como ferramenta no controlo biológico da doença de Chagas [57].

2 Objectivos e Organização do Trabalho

Devido à transmissão vertical e horizontal, bem como à alta patogenicidade em populações de triatomíneos, o TrV tem sido considerado um potencial agente no controlo biológico dos triatomíneos [9;47;57]. Contudo, até à presente data pouco se sabe sobre o papel do TrV durante a relação parasita-vector-hospedeiro e a sua incidência natural em populações de triatomíneos tem sido circunscrito apenas a populações de triatomíneos de algumas regiões da Argentina [59]. Especula-se que milhões de seres humanos e animais residentes em zonas endémicas para a doença de Chagas já estiveram exposto ao TrV [47]. Estudos da reactividade de soros de pacientes com doença de Chagas frente a antigénios nativos do TrV realizados na Argentina indicaram que esses pacientes não possuem anticorpos específicos anti-TrV [57]. Esta observação preliminar permitiu especular-se que o TrV não era infectivo em humanos nem em outros animais vertebrados. No entanto, nesses anos iniciais de estudo do TrV os conhecimentos sobre esse vírus eram bastante escassos. Hoje sabe-se que vírus pertencentes a esta família são vírus que infectam insectos pertencentes à ordem *Diptera*, *Hemiptera*, *Hymenoptera*, *Lepidoptera* e *Orthoptera* (figura 5) [49]. Estas famílias de insectos incluem espécies de estão amplamente distribuídos em meios urbanos e rurais na generalidade dos países. Por isso, especula-se que uma percentagem significativa de indivíduos humanos seleccionados aleatoriamente em qualquer país já esteve exposto a um vírus pertencente à família do TrV. À luz dos conhecimentos actuais sobre *Dicistrovirus* pode-se afirmar que o estudo serológico feito por Muscio e seus colaboradores [57] em pacientes com doença de Chagas foi realizado mediante um procedimento que não separa os soros positivos com anticorpos específicos anti-TrV dos soros positivos para outros vírus pertencentes à família *Dicistrovirus*. Por isso, um dos objectivos deste trabalho é avaliar a reactividade de soros de paciente com doença de Chagas frente a antigénios nativos do TrV pelo medo de ELISA indirecto. Para diferenciar os soros positivos dos soros que reagem devido a uma pré-exposição a um vírus pertencente ao género *Cripaviruses*, definiu-se um ponto limite (*Cut-off*), com soros de indivíduos que nunca estiveram em regiões endémicas para a doença de Chagas. Este trabalho poderá permitir identificar a presença de TrV em outras regiões da América Latina, algo que até à presente data não tem sido possível. Por outro lado,

este trabalho poderá fornecer algumas informações sobre a virulência de TrV em humanos.

Adicionalmente estudou-se a possível infectividade de TrV em modelo animal. O estudo da possível infectividade de TrV em modelo animal foi feito em murganhos *Mus musculus* após a inoculação com TrV e partículas vazias de TrV. A utilização de TrV como agente no controlo biológico do *T. infestans* depende da sua especificidade, por isso os resultados deste trabalho potenciarão ainda mais a utilização de TrV como ferramenta no controlo biológico do vector de *T. cruzi*.

3 Materiais e Métodos

3.1 Reagentes

Cloreto de sódio (NaCl), cloreto de potássio (KCl), fosfato de sódio dibásico (Na_2HPO_4), dihidrogenofosfato de potássio (KH_2PO_4), Tween[®] 20, BSA, peróxido de hidrogénio (H_2O_2), *o*-phenylenediamine dihydrochloride (OPD), água com DEPC, bicarbonato de sódio (NaHCO_3), tris base ($\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$), EDTA ($\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_8$), ácido acético (CH_3COOH), foram adquiridos à empresa Sigma-Aldrich (EUA). À empresa Plusone foi adquirido o brometo de etídio utilizado com corante do produto de PCR. Álcool isopropílico ($\text{C}_3\text{H}_7\text{OH}$), clorofórmio (CHCl_3) e etanol ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$) foram adquiridos à empresa Panreac (Espanha). À empresa Bioline (UK) adquiriu-se a agarose utilizada na visualização do produto da PCR, o kit de PCR, Biotaq[™] DNA Polymerase, contendo tampão NH_4 10x, solução de 50 mM de MgCl_2 , 100 mM de dNTP Mix, Biotaq[™] e DEPC- H_2O . Também adquiriu-se o kit de síntese de cDNA contendo tampão de RT 5x, transcriptase reversa (200u/ μl), inibidor de RNase (10 u/ μl), dNTP Mix (10 mM), *primer* mix de OligodT, Random Hexamer Primer Mix e DEPC- H_2O . M-MuLV Reverse Transcriptase e tampão de reacção 5x (RT buffer) foram adquiridos à empresa fermentas (Alemanha).

3.2 Isolamento e purificação de TrV

O isolamento e a purificação do TrV foram feitos a partir de amostras de fezes de triatomíneos infectados com TrV segundo o método descrito por Agirre e colaboradores. 2011 [60]. Por cada grama de fezes conseguiu-se purificar 0,25 mg de vírus. Esta técnica é vantajosa porque permite obter todo o material sem sacrificar o insecto. Por outro lado, também permite obtenção de vírus a partir de um material que não precisa de condições especiais de armazenamento ou transporte. A extracção do TrV faz-se tanto pelo gradiente de sacarose como pelo gradiente de cloreto de céσιο. As amostras de fezes de insectos infectados contem naturalmente TrV com todo o genoma e partículas vazias TrV [60]. O TrV e as partículas vazias de TrV foram purificados no

laboratório do Doutor Diego M.A. Guérin (Unidade de Biofísica - CSIC-UPV/EHU - Espanha).

3.3 Produção de anticorpo policlonal em murganhos

Fundamentos da técnica e procedimento

Anticorpos são imunoglobulinas do soro, que possuem a capacidade de se ligarem de uma forma específica a um determinado antigénio.

Na produção e expressão de PAb o animal é injectado com uma mistura de antigénio e adjuvante para a indução da resposta imune efectiva. A produção de PAb requer alguns passos importantes: preparação do antigénio, selecção da espécie de animal a utilizar, selecção e preparação do adjuvante a utilizar, protocolo de injeção, observação pós-injeção e colheita do sangue para a obtenção do soro contendo o PAb.

A preparação do antigénio inclui a sua purificação e quantificação. Neste estudo escolheu-se com antigénio partículas vazias de TrV, que foram purificadas de acordo com método apresentado em Agirre e colaboradores (2011) [60]. A quantidade de antigénio utilizado depende das propriedades inerentes do próprio antigénio, da espécie a ser imunizada e do adjuvante a ser utilizado. Hanly e colaboradores (1995) [61] publicaram que a dose usual de proteína solúvel que deve ser administrado com adjuvante de Freund em murganhos é de 10 a 200 µg [61-62]. Por isso, neste trabalho os animais foram inoculados (injeção subcutânea) com 100 µg de antigénio e 100 µl de FCA (*Freund's Adjuvant, Complete*; Sigma/EUA) na primeira inoculação e 100 µg de antigénio com 100 µl de FIA (*Freund's Adjuvant, Incomplete*; Sigma/EUA) na segunda inoculação.

A selecção da espécie animal a utilizar na produção de PAb depende da quantidade de PAb que se pretende produzir, da facilidade de obtenção da amostra de sangue, da relação filogenética e do uso que se pretende dar ao PAb. Por isso neste trabalho utilizou-se 4 murganhos *Mus musculus (BALB/c)* fêmea com 5 a 8 semanas de idade obtidas no Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Universidade Nova de Lisboa.

Quando um antígeno é pouco imunogénico o sistema imune requer estímulos para a produção da resposta imune efectiva. Os adjuvantes são agentes que estimulam a resposta imune. Por isso, neste trabalho utilizou-se FCA e FIA. Adjuvante de Freund é uma solução de antígeno emulsionado em óleo mineral. Na administração da primeira dose misturou-se 100 µg de antígeno com 100 µl de FCA. Na emulsão o antígeno distribui-se por uma larga superfície, o que aumenta o potencial de interacção com células do sistema imunitário produtoras de PAb.

Trinta dias após a injeção da primeira dose, sacrificou-se um animal para a obtenção da amostra de soro. Esta amostra permitiu averiguar se o animal estaria ou não a responder à presença de antígenos virais.

Na segunda injeção (50 dias após a primeira dose) utilizou-se FIA como adjuvante, na mesma proporção e concentração da primeira dose. A grande diferença entre FIA e FCA é que o FIA não possui micobactérias. Por isso, normalmente este segundo adjuvante é utilizado apenas na administração de injeção em animais que já tinham recebido uma primeira dose de antígeno.

Sessenta dias após a primeira injeção os animais foram sacrificados para a recolha de sangue. A amostra de sangue foi obtida através do *sinus* orbital.

A amostra de sangue obtida sem anticoagulante e incubada à 4 °C durante 30 min e posteriormente foi centrifugado durante 10 min a 3000 rpm. A incubação no frio impede a degradação dos elementos a analisar. A ausência de anticoagulante vai permitir a formação de fibrina a partir de fibrinogénio. O soro obtido foi armazenado a – 20 °C e analisado pelo método de ELISA indirecto anti-TrV. Este soro foi utilizado como controlo positivo nas experiências de ELISA.

3.4 Optimização de um ensaio imunoenzimático (ELISA) para a pesquisa de anticorpos anti-TrV em amostras humanas

Na determinação de anticorpos anti-TrV em amostras de humanos utilizou-se o método de ELISA indirecto.

Partículas vazias de TrV foram utilizadas como antígeno na pesquisa de anticorpos anti-TrV em soros de paciente com doença de Chagas oriundos do Brasil,

Cuba e pacientes residentes em Portugal e que estiveram em zonas endémicas para a doença de Chagas. Para além desses grupos de soros, utilizou-se como controlo negativo um conjunto de soros de indivíduos portugueses saudáveis e que nunca estiveram em zonas endémicas para a doença de Chagas.

Todas as amostras de sangue de pacientes com doença de Chagas foram oferecidas por grupos de investigação membros da *RedTrV*, e a sua obtenção foi feito de acordo com as normas do conselho ético local.

Inicialmente preparou-se duas placas com diferentes concentrações de antigénio, 100 ng. Por isso cada poço foi incubado com 100 µl de antigénio dissolvido em tampão bicarbonato (0,1 M e pH 8,5) durante toda a noite à temperatura ambiente. Após o período de incubação as placas foram lavadas 3 vezes com 200 µl de tampão de lavagem (PBS-Tween20 0,05%) por poço, para remover o excesso que antigénio que não ficou ligado a placa. De seguida as placas foram incubadas com 200 µl/poço de tampão de bloqueio (PBS-Tween 20; 0,05%-BSA) durante 1 h à temperatura ambiente, com o objectivo de reduzir a ocorrência de ligações inespecíficas. Voltou-se a lavar as placas por três vezes com 200 µl/poço de tampão de lavagem. As microplacas foram incubadas com 100 µl/poço de solução de anticorpo primário em várias diluições (soro 1:800, 1:1600, 1:3200, 1:6400, 1:12800, 1:25600 e 1:51200) durante 1 h, à temperatura ambiente, o que permite a ligação do anticorpo presente no soro ao antigénio adsorvido na placa.

Após o período incubação com amostra de soro, as microplacas foram lavadas 5 vezes com 200 µl/poço de tampão de lavagem, com o objectivo de remover o excesso de anticorpos que não ficaram ligados ao antigénio adsorvido na placa.

Para a detecção e quantificação do anticorpo primário anti-TrV, cada uma das placas foram incubadas com 100 µl/poço de solução de anticorpo secundário anti-IgG conjugado com HRP (1:4000 anti-Human IgG; Sgma-Aldrich/EUA) durante 1h a temperatura ambiente com agitação orbital. Após este período de incubação fez-se uma nova lavagem por 5 vezes com 200 µl/poço de tampão de lavagem, para remover o excesso de conjugado que não ficou ligado ao anticorpo primário

A microplaca foi incubada durante 30 min com 100 µl/poço de solução de substrato (10 ml de tampão de citrato com 10 mg de OPD e 5 µl de H₂O₂ 3 % v/v). O enzima HRP do conjugado ao catalisar a reacção do substrato produz uma substancia

cromofora que absorve a 490 nm (leitura da absorvência no leitor de placas: BIO-RAD, Modelo 680).

Para parar a reacção utilizou-se o ácido sulfúrico 4N, o que vai inibir a actividade do enzima através da desnaturação pela variação do pH.

3.5 Optimização de um ensaio imunoenzimático (ELISA) para a pesquisa de anticorpos anti-TrV em murganhos

Fundamentos e procedimentos da técnica

Este método é um método imunoenzimático que permite a detecção de anticorpos específicos no soro. É uma técnica que se baseia na interacção anticorpo-antigénio.

Os anticorpos são proteínas produzidas em resposta a presença de moléculas estranhas ao organismo. São sintetizados pelas células plasmáticas derivadas dos linfócitos B. Os anticorpos possuem zonas de ligação aos antigénios e zonas de ligação a células especializadas do sistema imune.

A região do antigénio que interage com o anticorpo chama-se epítopo. A interacção anticorpo-antigénio faz-se através de ligações não covalentes como ligações de hidrogénio, forças de Van der Waals, interacções de Coulomb e interacções hidrofóbicas.

Normalmente são utilizados três sistemas de ELISA, ELISA *directo*, ELISA *indirecto* e ELISA em *sandwich*. Neste trabalho optou-se pelo ELISA *indirecto*, porque este método permite pesquisar a presença de anticorpos específicos frente a antigénios do vírus de uma forma simples e sem grandes custos.

Proteínas estruturas da capsídeo do vírus foram utilizadas com antigénio na pesquisa de anticorpos anti-TrV em soros de murganhos (*M. musculus BALB/c*). Inicialmente preparou-se duas placas com diferentes concentrações de antigénio, 50 ng e 100 ng de partículas vazias de TrV. Para isso, cada poço foi incubado com 100 µl de antigénio (nas respectivas concentrações) dissolvido em tampão bicarbonato (0,1 M e pH 8,5) durante toda noite a 4 °C. Após o período de incubação as placas foram lavadas 3 vezes com 200 µl de tampão de lavagem (PBS-Tween20 0,05%) por poço, para remover o excesso que antigénio que não ficou ligado à placa. De seguida as placas

foram incubadas com 200 µl/poço de tampão de bloqueio (PBS-Tween 20; 0,05%-BSA) durante uma hora a temperatura ambiente, com o objectivo de reduzir a ocorrência de ligações inespecíficas. Voltou-se a lavar as placas por três vezes com 200 µl/poço de tampão de lavagem. Após a lavagem as microplacas foram incubadas com 100 µl/poço de solução de anticorpo primário em diluições seriadas (soro 1:100, 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600, 1:3200 e 1:6400 em tampão de anticorpo) durante uma hora à temperatura ambiente, com agitação orbital. Esta incubação permite a ligação do anticorpo presente no soro ao antigénio adsorvido na placa. A diluição seriada permite identificar qual a melhor diluição de soro a utilizar neste estudo. Após o período de incubação com amostra de soro, as microplacas foram lavadas 5 vezes com 200 µl/poço de tampão de lavagem, com o objectivo de remover o excesso de anticorpo que não ficou ligado ao antigénio adsorvido na placa.

Para a detecção e quantificação do anticorpo primário anti-TrV, cada uma das placas foi incubada com 100 µl/poço de solução de anticorpo secundário conjugado com HRP (1:4000; Sigma-Aldrich/USA) durante 1h a temperatura ambiente e com agitação orbital. Após este período de incubação fez-se uma nova lavagem por 5 vezes com 200 µl/poço de tampão de lavagem, para remover o excesso de anticorpo secundário que não ficou ligado ao anticorpo primário. Para além de IgG totais analisou o nível de IgM (1:4000 anti-Mouse IgM:HRP; Sigma-Aldrich/USA), IgG1 (50 ng anti-Mouse IgG1:HRP; AbD Serotec/UK) e IgG2a (25 ng anti-Mouse IgG2a:HRP; AbD Serotec/UK).

Para revelar a presença do conjugado, a microplaca foi incubada com 100 µl/poço de solução de substrato (10 ml de tampão de citrato com 10 mg de OPD e 10 µl de peróxido de hidrogénio 30 % v/v) durante 30 min, à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. O enzima HRP na presença de H₂O₂ catalisa a reacção da OPD, produzindo uma substancia cromofora que absorve a 490 nm.

Para parar a reacção utilizou-se o ácido sulfúrico 4N, o que vai inibir a actividade do enzima através variação do pH.

3.6 Inoculação de murganhos com TrV e com partículas vazias de TrV

No estudo da possível infectividade de TrV em murganhos utilizou-se 5 grupos (3 animais por grupo) de ratinhos *Mus musculus* (BALB/c) com 5 a 8 semanas de idade obtidas no Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Universidade Nova de Lisboa. A inoculação do TrV nos animais fez-se através de injeção intraperitoneal. O grupo 1 é o grupo controlo, por isso foi inoculado apenas com o diluente (PBS) utilizado na inoculação dos animais. O grupo 2 foi inoculado com 3,0 µg de partículas vazias de TrV em PBS (as partículas vazias não são infectivas em *T. infestans*) [60], o que através da comparação com os restantes animais ajuda-nos a perceber se o TrV é capaz de se replicar em hospedeiro mamífero. O grupo 3 foi inoculado com 3,0 µg de TrV em PBS, grupo 4 foi inoculado com 0,3 µg de TrV em PBS e o grupo 5 foi inoculado com 0,03 µg de TrV em PBS.

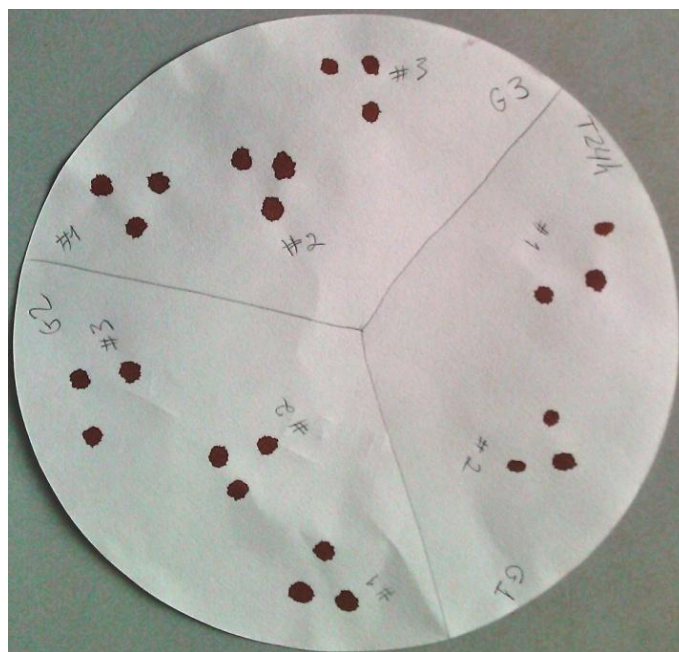


Figura 11: Esquema da recolha da amostra de sangue dos ratinhos em papel de filtro. Cada ponto representa uma amostra de sangue de cada um dos três animais que constituem os 5 grupos. Cada animal está representado por um # e um por número.

Antes da inoculação (tempo 0) dos animais recolheu-se uma amostra de sangue em papel filtro (figura 11) através do método de venosecção. Após a inoculação foram obtidos amostras de sangue do animal a vários tempos pelo mesmo método utilizado no tempo zero. Quarenta e cinco dias após a inoculação, os animais foram sacrificados para a obtenção do soro.

A análise do sangue e do soro foi feito através da técnica de ELISA *indirecto* e da técnica de RT-PCR.

O TrV é classificado como agente biológico de grupo 1 (agente biológico com baixa probabilidade de causar doenças no Homem) de acordo com as directivas 2000/54/EC do Parlamento Europeu, portanto, não foi tomada nenhuma medida especial no manuseamento do vírus para além das normas diárias de higiene e segurança no laboratório. Por isso, todos os trabalhos com TrV foram realizados numa câmara de fluxo.

3.7 Purificação de vRNA a partir de amostras biológicas (sangue em papel de filtro).

Fundamentos da técnica e procedimentos

A amostra biológica (sangue) presente em papel de filtro foi dissolvida em 50 µl de água com DEPC durante alguns minutos e posteriormente agitado num agitador tipo *vortex*. À mistura inicial, adicionou-se 800 µl de TRIsure (Bioline, UK), e deixou-se incubar à temperatura ambiente durante 5 min.

Para a separação das fases, adicionou-se 160 µl de clorofórmio, e deixou-se a incubar à temperatura ambiente durante 3 min. Após o período de incubação, a amostra foi centrifugada a 12000 x g a 4 °C durante 15 min (utilizou-se uma centrifuga Hermle, Z323K). A fase aquosa (contendo o vRNA) foi transferida para um outro tubo.

Para precipitar o RNA presente na fase aquosa, adicionou-se 400 µl de álcool isopropílico e deixou-se a incubar durante 10 min à temperatura ambiente. Após o período de incubação a mistura foi centrifugada a 12000 x g a 4 °C durante 10 min. Removeu-se o sobrenadante, e o *pellet* foi lavado com 800 µl de etanol (75 %). A mistura foi centrifugada a 7500 x g a 4 °C durante 5 min.

Após a centrifugação, evaporou-se o solvente através da exposição ao ar por 10 min. O *pellet* foi dissolvido em 40 µl água tratado com DEPC. A amostra final foi incubado a 58 °C durante 10 min e armazenado a – 80 °C. A amostra final de vRNA foi utilizada na reacção de RT-PCR.

Para determinar o grau de pureza do vRNA as amostras foram analisadas através da leitura dos valores de absorvência no NanoDrop 8000 Spectrophotometer (Thermo Scientific, USA). Considerou-se como amostra pura de vRNA todos as amostras cuja razão Abs260/Abs280 foi aproximadamente igual a 2. Para o controlo positivo (TrV diluído no sangue), o vRNA purificado foi quantificado antes da sua utilização como cadeia molde da reacção de RT-PCR. Para o controlo negativo e amostras de animais inoculados com TrV utilizou-se o máximo de volume de amostra aconselhado pelo kit (5 µl).

3.8 Optimização de uma PCR para pesquisa de TrV em amostras biológicas (sangue em papel de filtro)

Fundamentos da técnica e procedimento

PCR foi desenvolvido em 1980 por Kary Mullis (PN em 1994). Esta técnica baseia-se na síntese de fragmentos específicos de DNA através da acção do enzima DNA polimerase. No processo de replicação do DNA são preciso um grande número de proteínas e outras moléculas, como *primers de RNA*. A síntese de DNA pelo DNA polimerase requer pequenas sequencias de DNA (*primers*) que é complementar a sequencia molde. Os *primers* são sequencias de DNA sinteticamente produzidos que normalmente possuem 20 nucleótidos de comprimento [63]. O DNA-polimerase adiciona nucleótidos na região 3'-OH do *primer*, de acordo com a regra de emparelhamento normal das bases (A-T; G-C).

A PCR requer apenas alguns componentes do complexo de replicação para replicar pequenos fragmentos do DNA. Para desemparelhar as cadeias complementares a célula utiliza um sistema complexo constituído por uma variedade de enzimas e proteínas [63]. No entanto, na PCR este sistema de enzimas e proteínas é substituído por ciclos térmico, por isso o desemparelhamento das cadeias complementares é feito

através do aumento da temperatura, o que irá hidrolisar as ligações de hidrogénio e desnaturar a cadeia dupla [63].

Após a desnaturação da cadeia molde, os dois *primers* ligam-se a sequência complementar da cadeia molde de DNA (figura 12). A ligação dos *primers* a cadeia molde define a região do DNA molde que irá ser copiada. Com a ligação dos *primers*, o DNA polimerase irá adicionar desoxirribonucleótidos ao grupo 3'-OH de ambos os *primers*, produzindo uma nova molécula de DNA de cadeia dupla (figura 13).

Neste trabalho utilizou-se dois *primers* de oligonucleótido: TrVs-5'TCAAACTAACTATCATTCTGG 3' (nt 7427-7448 da sequência ORF2 do TrV) e TrVa-TTCAGCCTTATCCCCCCC 3' (nt 8240-8258 da sequência ORF2 do TrV), que se espera produzirem um produto de 832 pb [50]. A sequência de *primers* foi seleccionada da região ORF2 do TrV, que codifica as proteínas da cápside VP2 e VP3, com base no GenBank AF 178440. Os *primers* foram produzidos pela empresa Thermo Scientific (USA).

Durante o segundo ciclo a molécula de DNA heteroduplexes sintetizada durante o primeiro ciclo é desnaturada e cada uma das duas cadeias do DNA irá servir como molde para a síntese de uma nova molécula de DNA de cadeia dupla, por isso, é durante o segundo ciclo que se forma a primeira cadeia simples de DNA de comprimento definido pela posição dos *primers*. No terceiro ciclo, forma-se a primeira molécula de cadeia dupla de produtos exclusivos da PCR. Nos ciclos subsequentes formam-se um número exponencial de moléculas de DNA de tamanho definido.

Na reacção de PCR utilizou-se 5 µl da solução de cDNA obtido na reacção de RT-PCR. Também utilizou-se 25 ng de pDNA (832 pb) como controlo positivo da reacção de PCR. A molécula de DNA presente nessa solução irá funcionar como cadeia molde no processo de amplificação. Utilizou-se 5 µl de tampão (10x NH₄) e 3 µl de MgCl₂ 50 mM. O Magnésio é um dos componentes mais importantes da PCR, a sua concentração pode afectar a especificidade e a eficiência da reacção. O complexo dNTP-Mg²⁺ é de vital importância para a actividade do DNA-polimerase. A esta mistura adicionou-se 1 µl da solução de dNTP (10 mM), 0,07 µg de primer (TrVs), 0,06 µg de primer (TrVa), 33,5 µl de H₂O e 2,5 u de BIOTAQTM DNA polimerase.

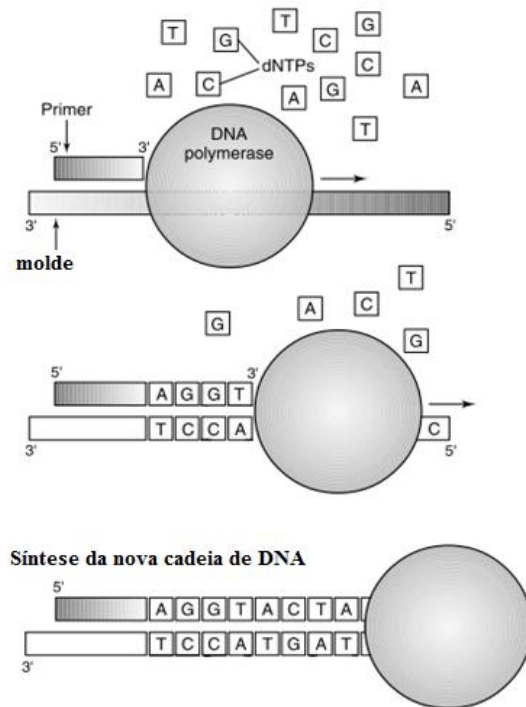


Figura 12: Extensão dos *primers* pelo DNA polimerase. O *primer* emparelha-se com a cadeia complementar do DNA molde e o DNA polimerase utiliza a cadeia molde para alongar os *primers* através da incorporação do dNTP. Adaptado de: [63].

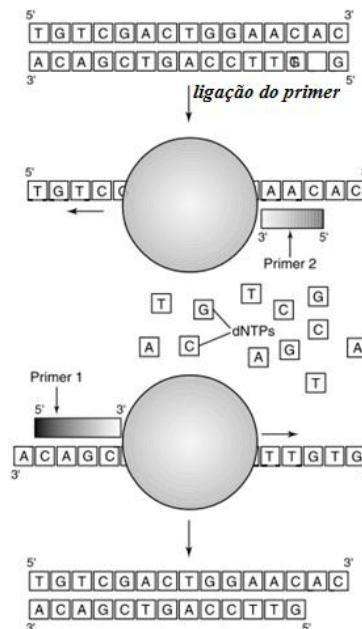


Figura 13: Durante o primeiro ciclo de PCR a dupla cadeia do DNA molde é desnaturada. Após o primeiro ciclo de PCR são gerados duas sequências alvas por cada cadeia molde. Adaptado de: [63].

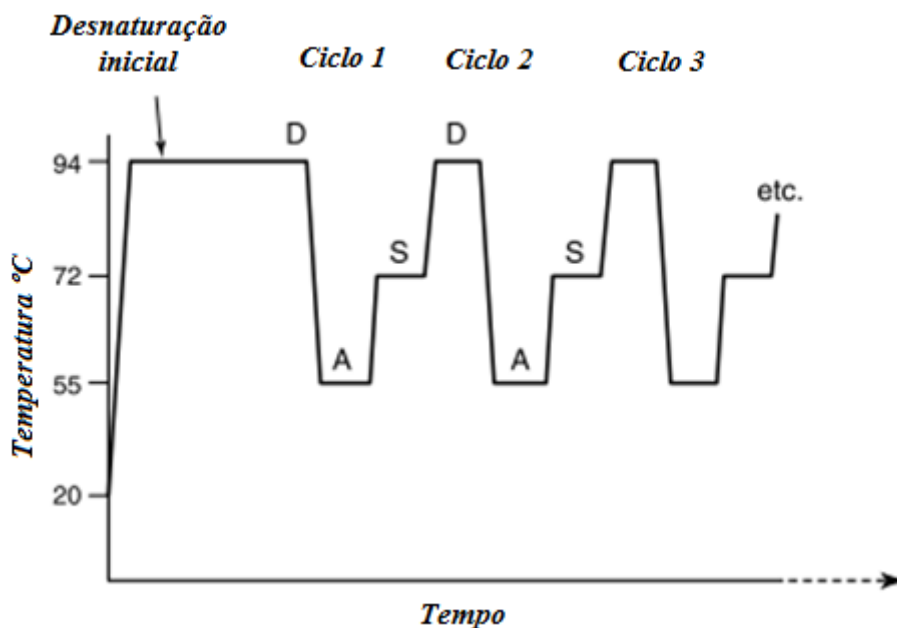


Figura 14: Representação dos ciclos térmicos durante a PCR. A temperatura é aumentada da temperatura ambiente até atingir a temperatura de desnaturação da dupla cadeia, 94 °C, e permanece a essa temperatura durante 2 min. Após essa fase, seguem-se 35 ciclos térmicos com variações da temperatura entre a temperatura de desnaturação (D), *annealing* dos *primers* a cadeia molde (A) e síntese do DNA a partir do primer (S). Adaptado de: [63].

Todo o processo de PCR é controlado por ciclos térmicos, por isso a PCR assenta-se em diferentes temperaturas que vão permitir a desnaturação, emparelhamento e alongamento das cadeias (figura 14). O aumento da temperatura (normalmente até 94-95 °C) permite a separação da dupla cadeia do DNA molde. Após essa primeira fase a temperatura é baixada de modo a permitir a ligação dos *primers*. Normalmente a temperatura utilizada é de 55 °C, contudo, em alguns casos esta temperatura pode atingir os 72 °C. Após o abaixamento da temperatura para a ligação dos *primers* a temperatura volta a ser aumentada de modo a atingir a temperatura óptima para a actividade do enzima DNA polimerase, e desta forma permitir o alongamento da cadeia (figura 14) [63].

A amplificação do DNA molde requer vários ciclos térmicos, e o número de ciclos pode variar, por isso neste trabalho optou-se por utilizar 35 ciclos térmicos com

variações de temperatura entre 95, 55 e 72 °C. A utilização de temperaturas elevadas para desnaturar a dupla cadeia molde não representa uma limitação para a actividade do DNA polimerase, porque o enzima *Taq DNA-polimerase* é termoestável, por isso, não é inactivado durante o aumento da temperatura [63].

A PCR é uma técnica que permite a amplificação do DNA e não do RNA, por isso, para efectuar uma PCR de um vírus de RNA é preciso produzir uma cadeia complementar do DNA (cDNA) a partir do RNA. A produção do cDNA dá-se por um processo semelhante ao utilizados por vírus de RNA na célula hospedeira, transcrição reversa. A RT-PCR baseia-se na capacidade do enzima transcriptase reversa em produzir o cDNA utilizando como cadeia molde o RNA. A transcrição reversa pode ser feita a partir do RNA citoplasmático total ou a partir do mRNA purificado. A utilização de RNA purificado é aconselhável neste passo, porque aumenta o rendimento na produção do cDNA, contudo, para o vírus purificado optou-se por fazer RT-PCR a partir da amostra sem purificar o RNA.

Para a reacção da síntese do cDNA preparou-se uma mistura inicial contendo, 5 µl de água tratada com DEPC (DEPC inibe a actividade de enzimas RNase), 0,724 µg da amostra de vRNA (controlo positivo) ou 5 µl da amostra resultante da purificação de vRNA do sangue dos animais inoculados com TrV e 200 µM de oligo-dT. A mistura foi incubada no termociclador à 65 °C durante 5 min e de seguida a 4 °C durante 2 min. O aumento da temperatura inicial da reacção para 65 °C é capaz de provocar a ruptura da capsídeo do vírus, por isso mesmo sem purificar o RNA conseguimos ter resultados positivos em RT-PCR feitos a partir de TrV purificado. A oligo-dT irá emparelhar com a cauda 3'-polyA do RNA, permitindo ao enzima transcriptase reversa sintetizar uma molécula de cDNA por cada molécula de RNA presente na reacção (figura 15) [63].

À mistura inicial, adicionou-se 4 µl de tampão da reacção (5x), 40 u de inibidores de RNase, 2 µl de dNTP mix (10 mM) e 40 u de transcriptase reversa M-MuLV ou 200 u do enzima transcriptase reversa do kit da Bioline.

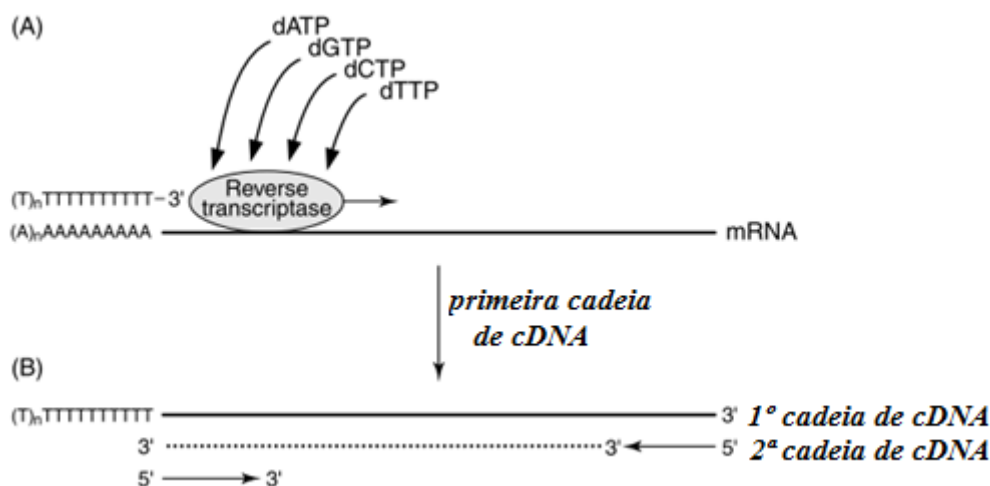


Figura 15: Síntese de cDNA pelo enzima transcriptase reversa. (A) Transcrição reversa do RNA, utilizando oligo-dT como primer. (B) Síntese da segunda cadeia de cDNA. Adaptado de: [63].

O M-MuLV Reverse Transcriptase, possui actividade tanto 5'-3', com RNA e DNA como molde, como no sentido 3'-5', com actividade RNase H, degradando a porção de RNA da heteroduplex RNA-DNA. A reacção do enzima M-MuLV Reverse Transcriptase requer 100 ng-5 µg de RNA. A optimização foi feita com quantidades decrescentes, a partir de 5 µg de vírus, numa quantificação feita com base nas proteínas do vírus. Este enzima é capaz de manter a sua actividade a altas temperaturas (60-70 °C), contudo possui actividade óptima a 37 °C, por isso a mistura foi incubada no termociclador à 37 °C durante 1h. Para parar a reacção aumentou-se a temperatura para 70 °C durante 10 min.

O cDNA produzido foi utilizado como molde para a amplificação na PCR. O produto de PCR foi corrido num gel de agarose de 1,5% a 90 mV com o tampão TAE e marcado com brometo de etídio. O brometo de etídio é um agente intercalante e fluorescente, que quando está ligado ao DNA aumenta o seu nível de fluorescência em vinte vezes. O tamanho das bandas foi determinado por comparação com o marcador de massa molecular HyperLadder™ I (200 a 10000 pb) e por comparação com um plasmídeo de DNA.

O plasmídeo de DNA utilizado como controlo positivo na reacção da PCR contém a região do ORF2 com as sequencias nt 7427-8258, o que vai produzir uma sequencia de 832 pb, correspondente ao fragmento esperado no produto de PCR. Esta sequência foi clonada num plasmídeo p-GEM[®]-T (Clon 7427-8258). O vector p-GEM[®]-T é um vector linearizado com um único terminal 3' de timidina em ambos os lados. O pDNA foi produzido e oferecido pelo Doutor Carlos Robello (*Unidad de Biología Molecular do Institut Pasteur de Montevideo, Uruguai*).

4 Resultados e discussão

Conforme foi descrito na introdução, o TrV pode ser transmitido entre triatomíneos através de fezes de insectos contaminados com o vírus, por isso especula-se que milhões de seres humanos e animais domésticos residentes nas zonas endémicas para a doença de Chagas já estiveram exposto a este vírus [47]. No entanto, até à presente data o TrV só foi encontrado em populações de triatomíneos em algumas regiões da Argentina [50]. O objectivo principal deste trabalho é contribuir para a utilização de TrV como ferramenta de controlo biológico do vector da doença de Chagas, através de uma melhor compreensão do papel deste vírus durante a relação parasita-vector-hospedeiro e identificar a presença anticorpos anti-TrV em soros de pacientes que já estiveram em contacto com triatomíneos. Por isso, fez-se: (1) a pesquisa de anticorpos anti-TrV em soros de pacientes com doença de Chagas. Como a caracterização de soros de pacientes com doença de Chagas indicaram que esses indivíduos não apresentam um nível significativo de anticorpos específicos anti-TrV, resolveu-se (2) estudar a possível infectividade do TrV em modelo animal (murganho).

O método de ELISA utilizado neste trabalho é um método semi-quantitativo, que permite auferir a reactividade dos soros de um modo semi-qualitativo. Por isso, escolheu-se 100 ng de antigénio por poço, porque esta concentração de antigénio é suficiente para distinguir os soros negativos dos soros de animais que foram inoculados com TrV. Como controlo positivo da reacção de ELISA utilizou-se um “pool” de soros de animais onde foram produzidos anticorpo policlonal anti-TrV, que são soros que apresentam elevada reactividade frente a antigénios nativos do TrV (figura 16).

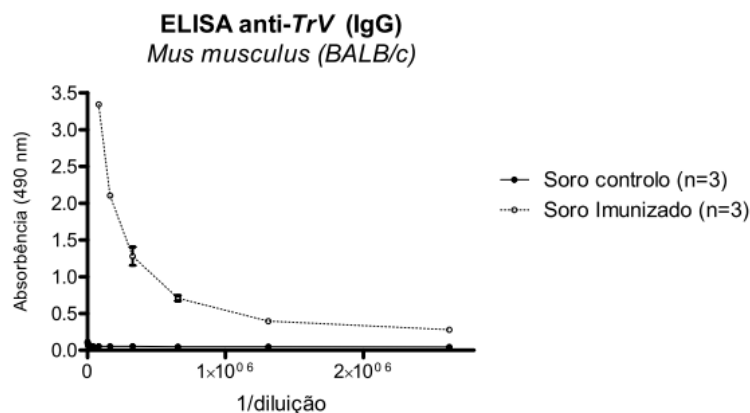


Figura 16: Perfil de reactividade de soros de animais inoculados com partículas vazias de TrV, num ELISA anti-TrV, frente a antigénios nativos do vírus.

4.1 Pesquisa de anticorpos anti-TrV em soros de pacientes com doença de Chagas

Animais utilizados para alimentar triatomíneos infectados com TrV revelaram-se positivos num ELISA anti-TrV [57], indicando que os triatomíneos podem inocular o vírus (presente nas fezes) no hospedeiro durante o seu repasto sanguíneo. Por isso, estudou-se a reactividade de soros de pacientes com doença de Chagas, que são pessoas que já foram picadas por triatomíneos, e se esses triatomíneos estiveram infectados com TrV, os soros desses pacientes podem ser positivos num ELISA anti-TrV para a pesquisa de IgG. Este trabalho pode permitir identificar (de uma forma indirecta) ou não a presença de TrV em populações de triatomíneos de outras regiões da América Central e do Sul.

O ELISA é uma técnica bastante utilizada na caracterização serológica para o estudo da infecção por vírus de RNA em humanos. Estudos anteriores mostraram que a técnica de ELISA é bastante sensível na detecção de infecção por TrV em triatomíneos [50]. Por isso, neste trabalho utilizou-se esta técnica para pesquisar anticorpos específicos do tipo IgG em soros de pacientes que já estiveram em contacto com triatomíneos, podendo ou não terem estado expostos ao TrV.

Neste estudo utilizou-se soros de pacientes com doença de Chagas residentes no Brasil (n = 46), soros de pacientes com doença de Chagas residentes em Portugal (n = 11), soros de pacientes com doença de Chagas residentes em Cuba (n = 12) e soros de indivíduos saudáveis residentes em Portugal (n = 23).

Na definição da diluição a utilizar no estudo da reactividade dos soros de pacientes com doença de Chagas frente a antígenos nativos do TrV, fez-se um gráfico de absorvência em função da diluição (figura 17) com soros de indivíduos saudáveis, residentes em Portugal Continental. Através da análise desse gráfico pode-se concluir que a partir da diluição de 1:12000 o valor de absorvência mantém-se constante com o aumento da diluição, o que de uma certa forma permite eliminar alguma reacção inespecífica. Por isso, todos os soros de pacientes foram analisados numa diluição de 1:12000.

Para diferenciar os soros potencialmente positivos dos soros negativos, definiu-se um ponto limite (*cut-off*) que permite distinguir esses dois grupos de soros. Para determinar o valor do *cut-off* utilizou-se um grupo de 23 soros de indivíduos saudáveis

residentes em Portugal continental e que nunca estiveram em zonas endêmicas para a doença de Chagas, conseqüentemente, acredita-se que nunca estiveram em contacto com triatomíneos. O *cut-off* foi dado pela soma da média dos valores de absorvência dos soros negativos com o desvio padrão a uma dada diluição. O peso que o desvio padrão pode ter no valor de *cut-off* depende da sensibilidade e da especificidade que esse valor de *cut-off* vai conferir ao método [64-65]. Por isso, neste trabalho, para a diluição de 1:12000 o *cut-off* foi definido como sendo a soma da média dos valores de absorvência dos soros negativos com o quádruplo do desvio padrão [*Cut-off* = média + 4SD]. Escolheu-se esta ponderação (4SD), porque com este valor de *cut-off* todos os soros do grupo utilizado como controlo negativo têm um valor de absorvência inferior ou igual ao valor de *cut-off* para a diluição escolhida.

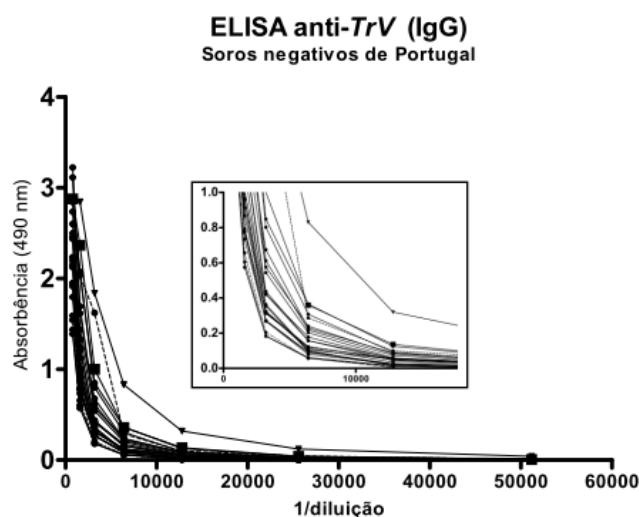


Figura 17: Fez-se uma diluição seriada a partir de uma primeira diluição de 1:800 até uma diluição de 1:51200. A partir da diluição de 1:12000 a generalidade dos soros apresentam valores de absorvência constante com o aumento da diluição.

Com esse grupo de 23 soros de indivíduos saudáveis e que potencialmente nunca estiveram expostos aos triatomíneos fez-se um pool que serviu para determinar o *cut-off* de cada placa numa diluição de 1:12000. Na análise dos soros de pacientes do Brasil o valor de *cut-off* utilizado foi de 0,954, e para os soros de pacientes com doença de Chagas residentes em Cuba e Portugal o valor de *cut-off* utilizado foi de 0,772.

Para cada um dos soros fez-se um duplicado na diluição de 1:12000. Analisou-se a média dos valores de absorvência (490 nm) de cada soro, menos a soma da média dos valores de absorvência do conjunto dos poços que não foram incubados com antígenos virais e poços que não foram incubados com anticorpo primário.

Na análise dos resultados utilizou-se dois critérios: no primeiro critério é considerado como positivo todos os soros que apresentam um valor de absorvência superior ao valor do *cut-off* mais dez por cento do *cut-off* [absorvência (positivo) > *cut-off* + 10% *cut-off*], e no segundo critério são considerados como positivo todos os soros cuja razão entre o valor de absorvência e o *cut-off* é superior a 1,1.

Para além do grupo dos positivos e do grupo dos negativos estabeleceu-se um grupo dos indeterminados, que são todos os soros que apresentam um valor de absorvência no intervalo $\textit{cut-off} \pm 10\% \textit{cut-off}$ pelo critério 1.

A análise dos resultados da pesquisa de IgG anti-TrV pelo método de ELISA indirecto parece indicar que todos os soros de pacientes de Portugal e do Brasil são negativos no ELISA anti-TrV, tanto pelo critério 1 como pelo critério 2 (figura 18, 19 e 21).

Quando analisados pelo critério 1, dois dos soros de pacientes com doença de Chagas, residentes em Cuba apresentam resultados que foram classificados como indeterminado (figura 20). Contudo, na análise pelo critério 2, todos os soros de pacientes de Cuba foram considerados como sendo negativos no ELISA anti-TrV (figura 21).

Até à presente data o TrV só foi identificado em *T. infestans* de algumas regiões da Argentina [59]. Contudo, dado a virulência deste vírus no *T. infestans*, bem com o seu modo de transmissão, acredita-se que é possível que populações de *T. infestans* de outras zonas endémicas em algum momento já estiveram em contacto com este vírus. A análise serológica de pacientes com Chagas residentes no Brasil, Cuba e Portugal, revelaram que estes não apresentam níveis de anticorpos anti-TrV passíveis de serem detectados pelo método de ELISA indirecto.

A ausência de TrV em outras regiões endémicas fora da Argentina pode explicar este resultado, por outro lado a não virulência de TrV em humanos também poderá ser um outro factor a ter em conta na interpretação deste resultado. O TrV provoca alta taxa de mortalidade, bem como a redução da fertilidade nas populações de triatomíneos [9], o que faz com que os insectos que estejam infectados com TrV tenham um tempo de

vida mais curto e uma menor probabilidade de ser o agente responsável pela transmissão de *T. cruzi*.

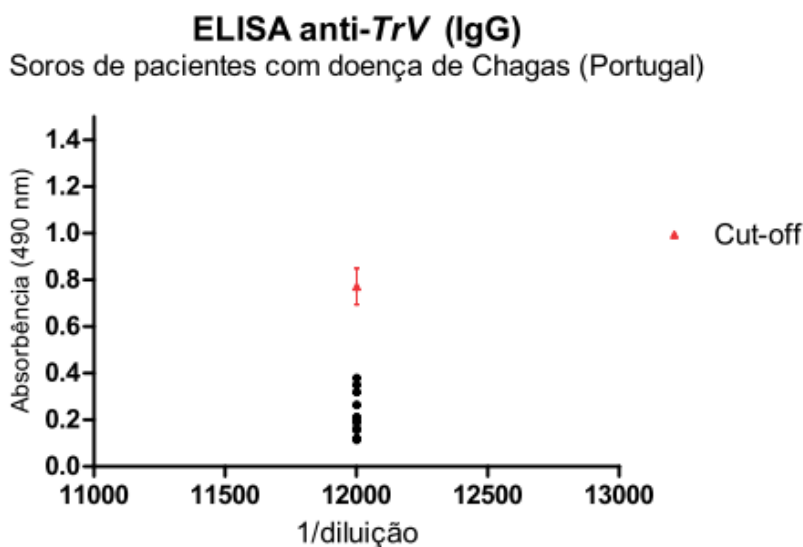


Figura 18: Estudo da reactividade de soros de pacientes com doença de Chagas residentes em Portugal. Pesquisou-se a presença de IgGs específicos anti-TrV em 11 soros.

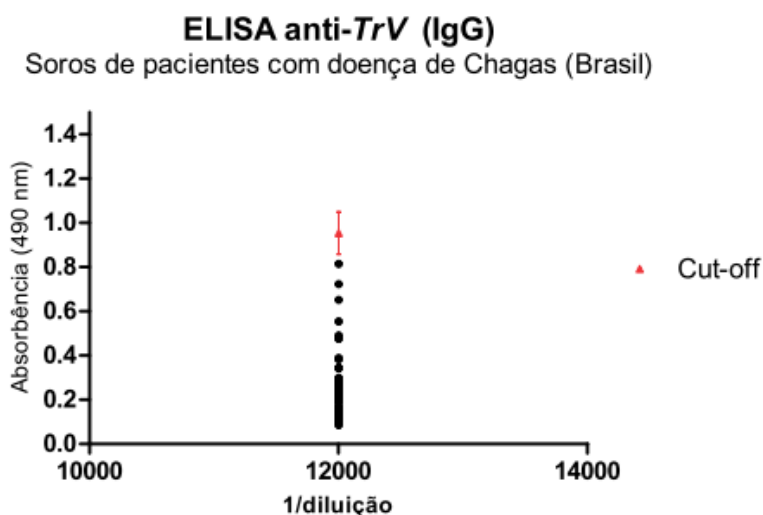


Figura 19: Resultado do estudo da reactividade de soros de pacientes com doença de Chagas residentes no Brasil. Pesquisou-se a presença de IgGs específicos anti-TrV em 50 soros.

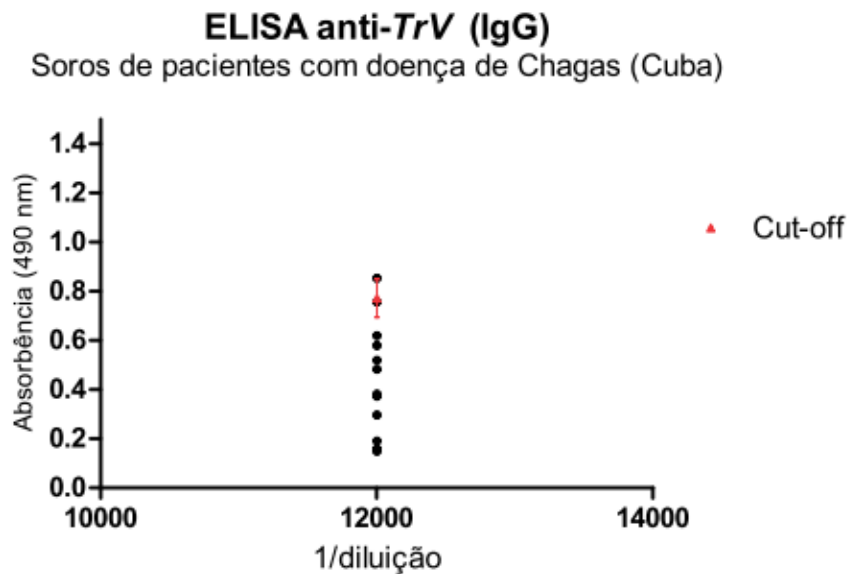


Figura 20: Resultado do estudo da reactividade de soros de pacientes com doença de Chagas residentes em Cuba. Pesquisou-se a presença de IgGs específicos anti-TrV em 12 soros.

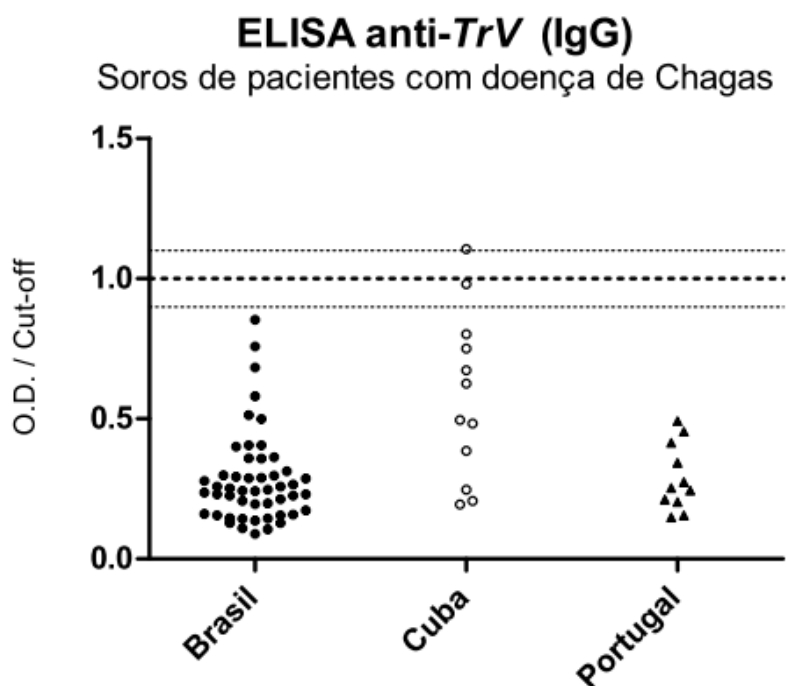


Figura 21: Resultado da análise dos soros de pacientes com doença de Chagas pelo critério 2. Fez-se a pesquisa de IgGs pelo método de ELISA indirecto. Para cada grupo de soros, fez-se a razão entre o valor de OD com o respectivo valor de *cut-off* correspondente.

A incidência de TrV nos triatomíneos nas zonas onde este vírus foi identificado em populações naturais de *T. infestans* é inferior a 10% [57]. A existir infecção natural dos triatomíneos com TrV em outros países endémicos, a sua incidência seria ainda menor, o que reduz ainda mais a hipótese de um paciente com doença de Chagas, escolhido ao acaso, ter sido picado por um insecto contaminado com TrV.

Todos os soros analisados, incluindo os soros de indivíduos que nunca estiveram em zonas endémicas para a doença de Chagas, parecem apresentar uma certa reactividade para as proteínas totais das partículas vazias do TrV. Este facto pode indicar que naturalmente entramos em contactos com vírus pertencentes ao género *Cripavirus*. Esta hipótese é sustentada pelo estudo da infectividade do TrV em modelo animal, onde se pode constatar que soros de animais que crescem em cativeiros e que nunca estiveram em contactos com um vector de *Cripavirus*, não apresentam essa reactividade inespecífica frente a antígenos nativos do TrV.

4.2 Estudo da possível infectividade do TrV em murganhos *Mus musculus* (BALB/c) através do método de RT-PCR

Especula-se que milhões de seres humanos e animais domésticos e peri-domésticos residentes em zonas endémicas para doença de Chagas já estiveram expostos ao TrV [59]. Contudo, estudos da pesquisa de anticorpos anti-TrV realizados em amostras de soros de pacientes com doença de Chagas indicaram que estes não apresentam níveis significativos de anticorpos específicos anti-TrV. Ademais, pouco se sabe sobre infectividade deste vírus em modelo animal. Por isso, neste trabalho estudou-se a infectividade do TrV em modelo animal, através da inoculação do vírus em murganhos *Mus musculus* (BALB/c).

Utilizou-se 5 grupos de murganhos *Mus musculus* (BALB/c) fêmea (cada grupo com 3 animais) com 6 a 8 semanas de vida. O grupo 1 (grupo controlo) foi inoculado apenas com PBS, o grupo 2 foi inoculado com 3,0 µg de partículas vazias de TrV em PBS (não contém o genoma, por isso não é infectivo), o grupo 3 foi inoculado com 3,0 µg de TrV em PBS, o grupo 4 foi inoculado com 0,3 µg de TrV em PBS e o grupo 5 com 0,03 µg de TrV em PBS.

Nenhum animal apresentou alguma diferença fisiológica em relação ao grupo controle, apresentando sempre uma aparência saudável durante todo o tempo da experiência. Estes resultados também são acompanhados pelos resultados da comparação de alguns órgãos internos do animal, como o baço e o fígado que apresentaram uma morfologia e dimensão idêntica entre o grupo controle e os grupos de animais inoculados com TrV.

Recolheram-se amostras de sangue em papel filtro a diferentes tempos (0 h, 48 h, 96 h, 7 dias e 45 dias) para a realização da RT-PCR. As amostras de sangue foram analisadas por RT-PCR para a pesquisa do RNA viral.

Como controle positivo da reação de transcrição reversa utilizaram-se amostras de TrV puro sem proceder com a extração do RNA. Para além de amostras de TrV puro, também utilizou-se como controle positivo da reação de RT-PCR amostras de vRNA purificados a partir de amostras de TrV diluídas no sangue e depositadas em papel de filtro. Para determinar qual a quantidade mínima de TrV a utilizar como controle positivo da reação, fez-se uma RT-PCR com diferentes concentrações de TrV (figura 22). Os resultados da RT-PCR indicam que se pode ter uma amplificação positiva até uma quantidade mínima de 6 ng de TrV. Por isso, como controle positivo da reação de RT-PCR utilizou-se TrV purificado nas quantidades de 6,0 µg até um mínimo de 0,03 µg. Para além do controle positivo da reação de transcrição reversa, também se utilizou um controle positivo da PCR. Como controle positivo da PCR utilizou-se um pDNA que contém a região de interesse. Para definir qual a quantidade mínima de pDNA a utilizar na reação de PCR fez-se uma PCR a diferentes concentrações de pDNA (figura 23). Os resultados da PCR indicam que até uma quantidade mínima de 0,63 pg de pDNA se pode ter uma amplificação na reação de PCR. Por isso, como controle positivo das reações de PCR utilizou-se o pDNA até uma quantidade mínima de 0,63 pg. Ambos os controles positivos, apresentam um produto de PCR de 832 pb, que corresponde à região ORF2, responsável pela codificação das proteínas estruturais VP2 e VP3.

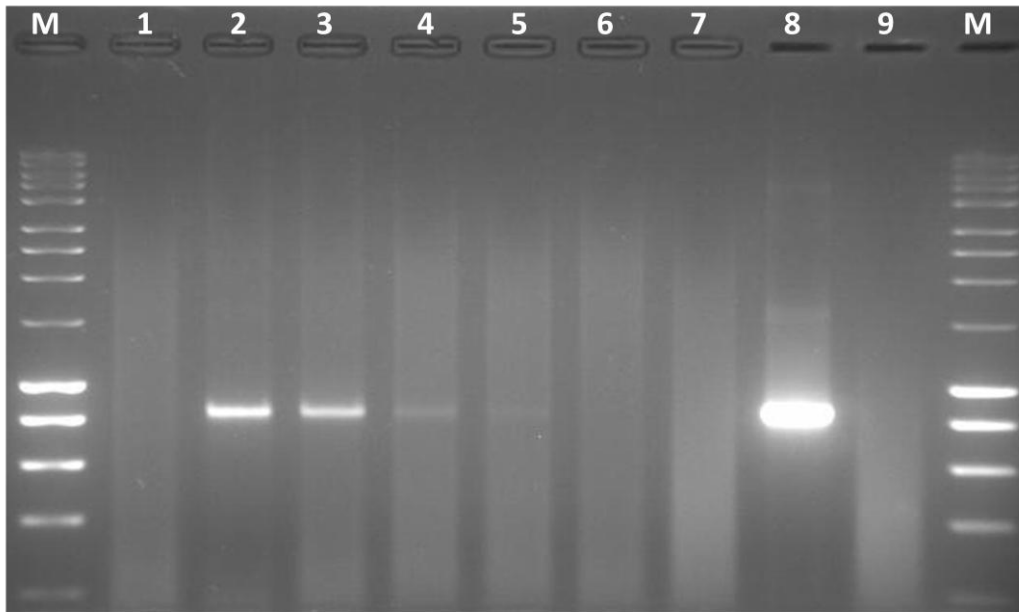


Figura 22: O produto de RT-PCR corrido num gel de agarose de 1,5%, marcado com brometo de etídio. (M) marcador de 200 a 10000 bp; (1) controlo negativo RT-PCR; (2) 3,0 µg de TrV; (3) 0,3 µg de TrV; (4) 0,03 µg de TrV; (5) 6 ng de TrV; (6) 3 ng de TrV; (7) 0,6 ng de TrV; (8) 25 ng de pDNA e (9) controlo negativo PCR. O produto de PCR teve o tamanho esperado (≈ 832 pb).

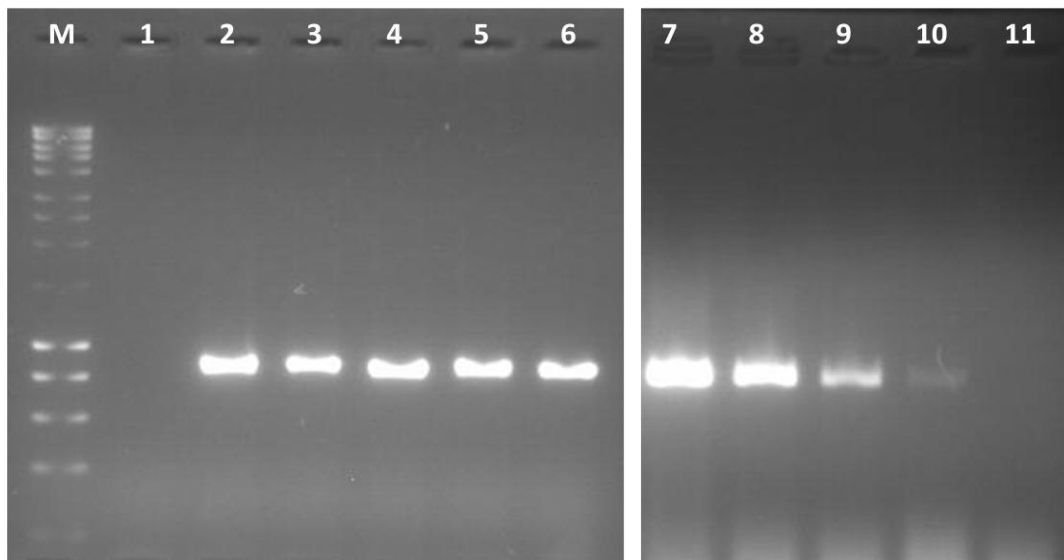


Figura 23: Produto de PCR do pDNA num gel de agarose de 1,5%, marcado com brometo de etídio. (M) marcador de 200 a 10000 bp; (1) controlo negativo PCR; (2) 200 ng pDNA; (3) 100 ng pDNA; (4) 50 ng pDNA; (6) 25 ng pDNA; (7) 12,5 ng pDNA; (8) 625 pg pDNA; (9) 62,5 pg pDNA; (10) 6,25 pg pDNA e (11) controlo negativo PCR.

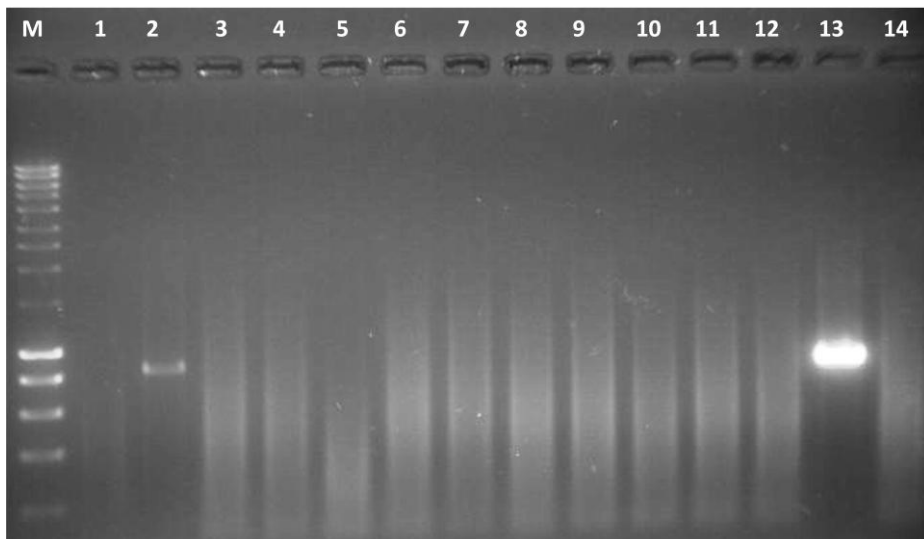


Figura 24: Gel de agarose de 1,5 % marcado com brometo de etídio, com os produtos da reacção de PCR realizados às amostras de sangue dos murganhos *M. musculus* (*BALB/c*) utilizados no estudo da infectividade. (M) Marcador de massa molecular de 200 a 10000 bp; (1) controlo negativo purificação de vRNA; (2) 0,724 µg de vRNA; (3) grupo 1 dia zero; (4) grupo 2 dia zero; (5) grupo 3 dia zero; (6) grupo 4 dia zero; (7) grupo 5 dia zero; (8) grupo 1 quarto dia; (9) grupo 2 quarto dia; (10) grupo 3 quarto dia; (11) grupo 4 quarto dia; (12) grupo 5 quarto dia; (13) 25 ng de pDNA; (14) controlo negativo PCR.

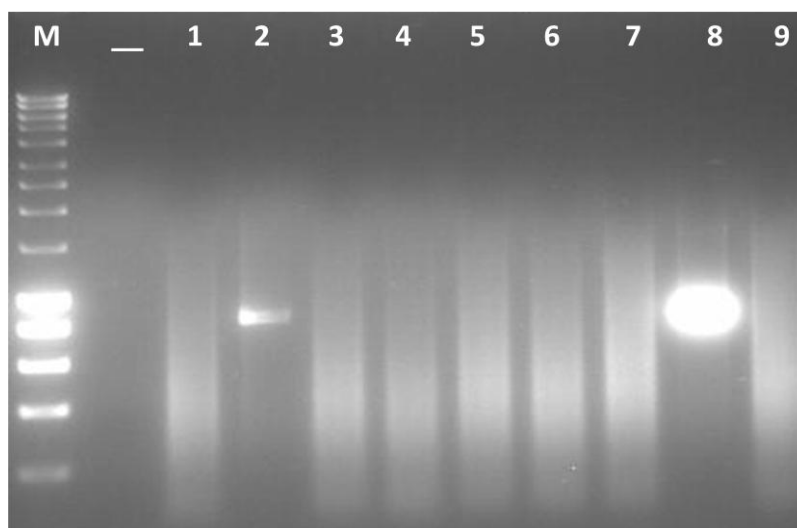


Figura 25: Gel de agarose de 1,5 % marcado com brometo de etídio, com os produtos da reacção de PCR realizados às amostras de sangue nos murganhos *M. musculus* (*BALB/c*) utilizados no estudo da infectividade. (M) Marcador de massa molecular de 200 a 10000 bp; (1) controlo negativo da purificação de vRNA; (2) 0,724 µg de vRNA; (3) grupo 1 quadragésimo quinto dia; (4) grupo 2 quadragésimo quinto dia; (5) grupo 3 quadragésimo quinto dia; (6) grupo 4 quadragésimo quinto dia; (7) grupo 5 quadragésimo quinto dia; (8) 25 ng de pDNA; (9) controlo negativo PCR.

As amostras de sangue dos animais inoculados com TrV e com partícula vazia de TrV foram analisados por RT-PCR para a pesquisa de vRNA através da técnica de RT-PCR descrita na metodologia. Para a análise das amostras de sangue por RT-PCR fez-se um pool por cada um dos cinco grupos de animais em estudo. Os resultados da RT-PCR parecem indicar que não é possível encontrar vRNA em amostras de sangue dos animais inoculados com TrV (figura 24 e 25). A ausência de vRNA nas amostras de sangue dos animais pode ser um indicador de que o TrV não é capaz de se replicar em murganhos. Estes resultados estão de acordo com os dados da literatura, que advogam que o TrV é um vírus específico de insectos [47], por isso não é capaz de se replicar em murganhos, e conseqüentemente não é infectivo.

Até à presente data pouco se sabe sobre os mecanismos de replicação dos *Dicistroviridae*. Pensa-se que o mecanismo de replicação dos *Dicistroviridae* é semelhante ao mecanismo de replicação dos *Picornaviridae* [48]. Nos *Picornaviridae* a síntese de RNA inicia-se pela ligação da proteína 3CD (protease RdRp) à extremidade 5' do genoma [66-67]. Contudo, essas duas famílias de vírus apresentam alguma diferença no mecanismo de replicação [48]. Por isso, a luz dos conhecimentos actuais não é possível apresentar uma justificação a nível molecular que explicasse a ausência de replicação de TrV em murganhos.

4.3 Estudo da possível infectividade do TrV em murganhos *Mus musculus* (BALB/c) através do método de ELISA

Uma das formas de resposta na imunidade adaptativa é a resposta humoral. Após o reconhecimento de antígeno os linfócitos B são activados, levando a sua expansão clonal e diferenciação em células B efectoras capazes de produzir anticorpos com alta afinidade. Por isso, neste trabalho analisou-se soros de 5 grupos de animais utilizados no estudo da possível infectividade de TrV em murganhos. Os soros foram analisados pelo método de ELISA indirecto para a pesquisa de anticorpos (IgM e IgG) frente a antígenos nativos do TrV. Estudou-se a expressão de várias subtipos IgG (resposta

secundária) e IgM (resposta primária), porque essas duas classes de anticorpos sofrem um aumento significativo durante a resposta imune humoral a vírus [30-32].

A escolha da diluição a ser utilizado na análise de cada soro foi feita de acordo com o perfil de reactividade que esses soros apresentam para diferentes diluições. A partir da análise do perfil de reactividade dos soros escolheu-se a diluição de 1:800 porque a partir desta diluição o valor de absorvência dos soros dos animais inoculados apenas com PBS mantêm-se constantes com o aumento da diluição (figura 26 e 27). Como controlo positivo da reacção do ELISA utilizaram-se soros de animais onde foram produzidos anticorpos policlonal anti-TrV.

A análise dos resultados do ELISA indicam que todos os soros de animais utilizados na experiencia de inoculação com TrV e com partículas vazias de TrV são reactivos frente a antigénios nativos do TrV. Por outro lado, a reactividade dos soros depende directamente da quantidade de TrV utilizado na inoculação (figura 28 e 29).

Durante os primeiros dias de exposição ao antigénio a resposta imune humoral é caracterizado pelo aumento de níveis de anticorpos do tipo IgM, contudo com o passar dos dias da inoculação a resposta imune humoral é essencialmente secundária, caracterizada pelo aumento dos níveis de anticorpos de tipo IgG, com alta afinidade para o antigénio [30-32]. Por isso, como previsto na literatura, 45 dias após a inoculação há um grande aumento dos níveis de IgG no soro e um ligeiro aumento do nível de IgM (apenas no grupo 2) comparativamente ao grupo controlo (figura 28 e 29)

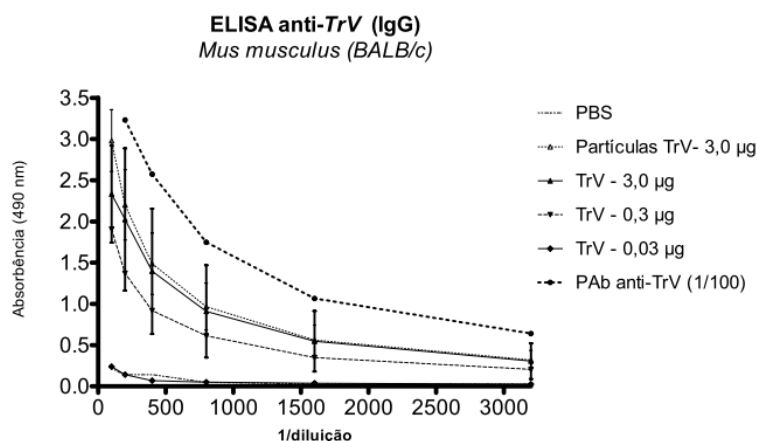


Figura 26: Perfil de reactividade de soros de animais inoculados com TrV e com partículas vazias de TrV. A análise serológica dos animais foi realizada 45 dias após a inoculação.

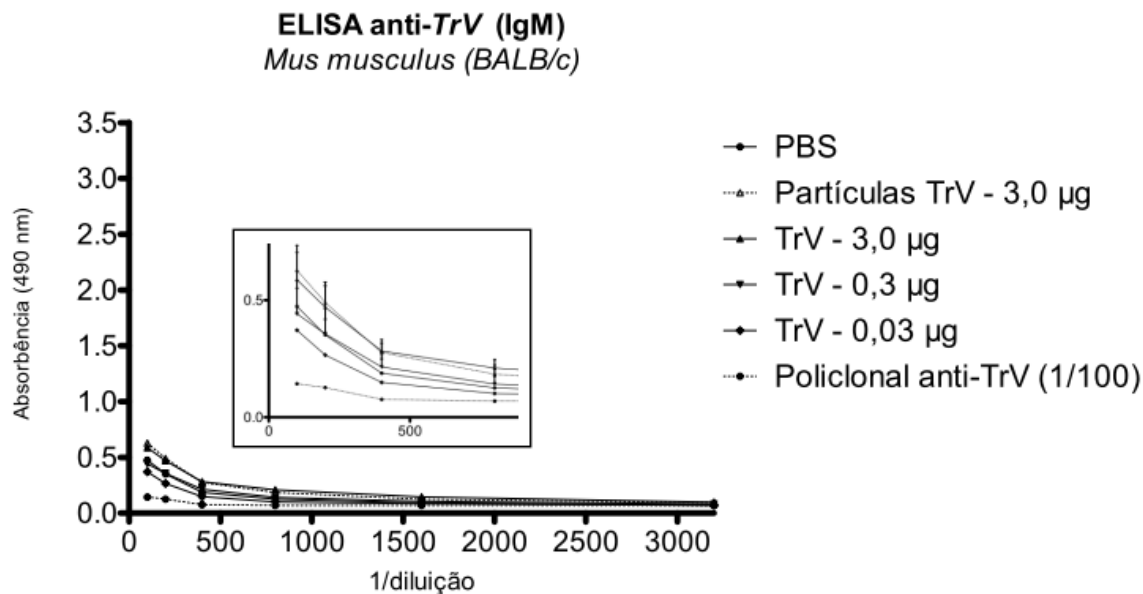


Figura 27: Perfil de reactividade de soros de animais inoculados com TrV e com partículas vazias de TrV. A análise serológica dos animais foi realizada 45 dias após a inoculação.

A reactividade dos soros depende directamente da quantidade de antigénio utilizado na inoculação (figura 28 e 29) por isso caso o TrV fosse capaz de se replicar em murganhos, o nível de anticorpo produzido pelo grupo 3 (inoculado com 3 µg de TrV) poderia ser significativamente superior ao nível de anticorpo produzido pelo grupo 2 (inoculado com 3 µg de partículas vazias). Contudo, os resultados da caracterização serológica indicam que os níveis de IgM e de IgG são semelhantes nesses dois grupos (figura 28 e 29).

O IgG2a é um subtipo de IgG que normalmente está associado a uma resposta imune humoral a vírus. Este subtipo de IgG é muito eficiente na fixação do complemento e participa na citotoxicidade celular dependente de anticorpo. Como foi referido na introdução, muitos sistemas de infecção viral em ratinhos resultam num aumento preferencial do nível de IgG2a no soro [30]. Esta mudança de isotipo depende da replicação viral [29] e do aumento da produção de IFN- γ . Por isso, neste trabalho pesquisou-se a presença de anticorpos IgG2a em soros de murganhos inoculados com TrV. Se o TrV fosse capaz de se replicar em murganhos, o nível de IgG2a do grupo 3 poderia ser significativamente superior ao nível de IgG2a do grupo 2. No entanto, a

comparação do grupo 2 com o grupo 3 sugerem que estes dois grupos de animais apresentam níveis de IgG2a semelhantes (figura 31).

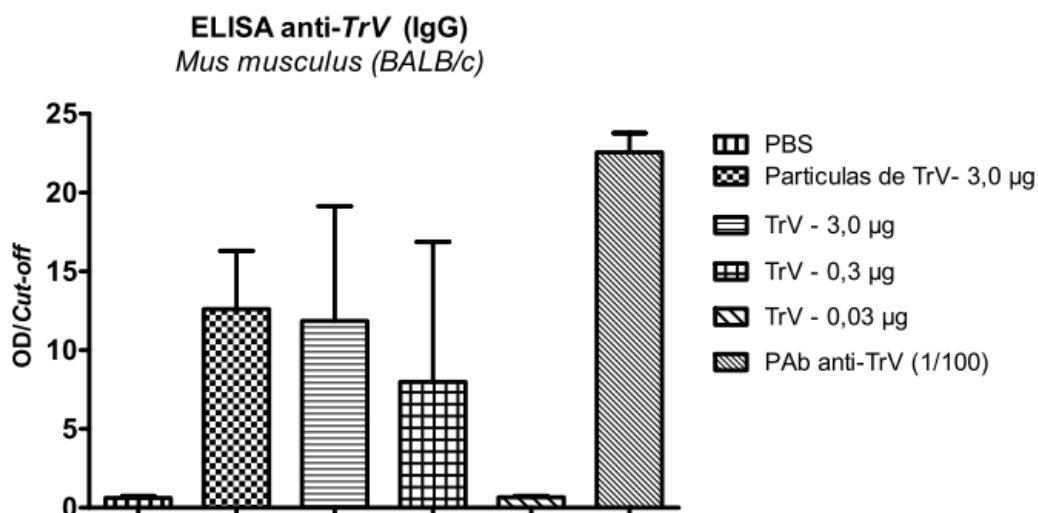


Figura 28: Caracterização serológica por ELISA anti-TrV para a pesquisa de IgG em soro de murganços utilizados na experiência de inoculação. Todas as amostras foram analisadas numa diluição de 1:800.

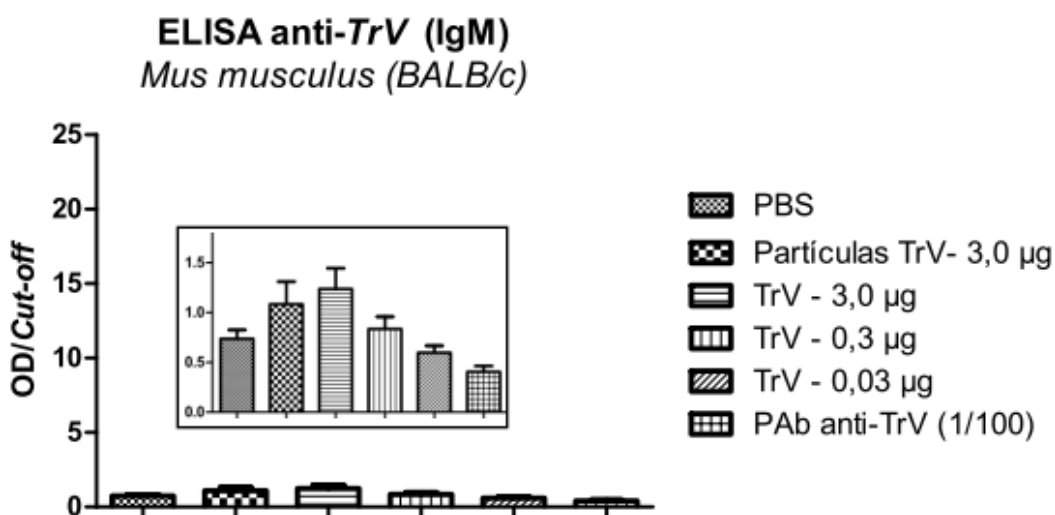


Figura 29: Caracterização serológica por ELISA anti-TrV para a pesquisa de IgM em soro de murganços utilizados na experiência de inoculação. Todas as amostras foram analisadas numa diluição de 1:800.

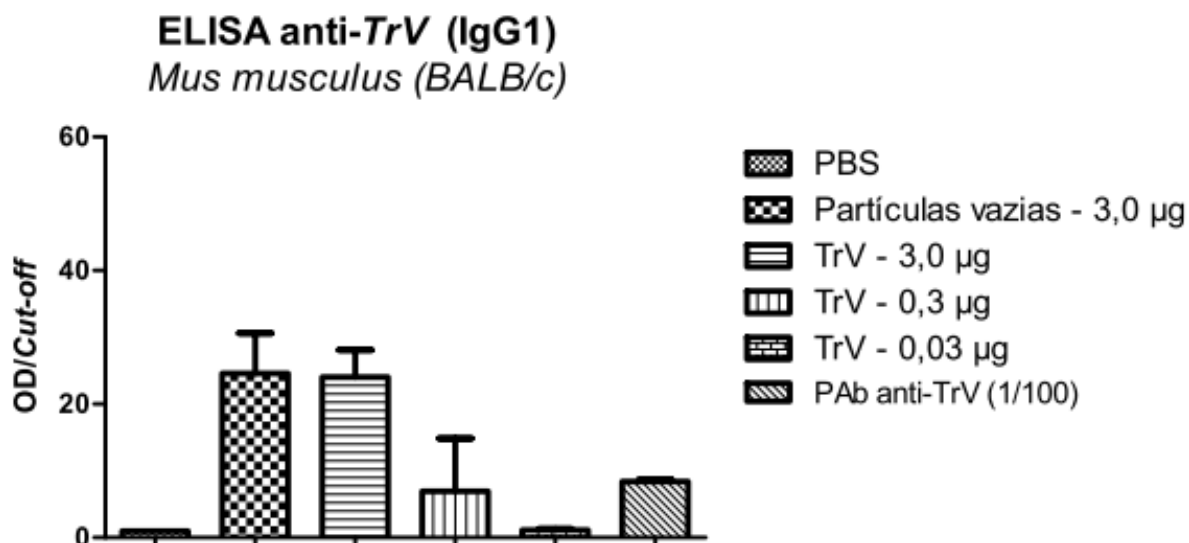


Figura 30: Caracterização serológica por ELISA anti-TrV para a pesquisa de IgG1 em soro de murganhos utilizados na experiência de inoculação. Todas as amostras foram analisadas numa diluição de 1:800.

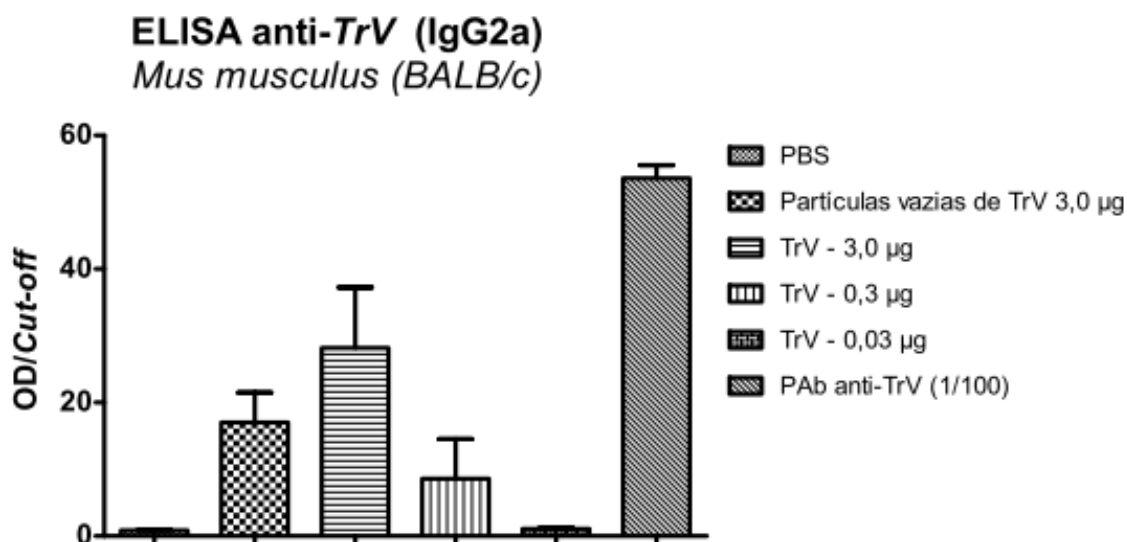


Figura 31: Caracterização serológica por ELISA anti-TrV para a pesquisa de IgG2a em soro de murganhos utilizados na experiência de inoculação. Todas as amostras foram analisadas numa diluição de 1:800.

Durante uma infecção viral em murganhos, a resposta imunológica é essencialmente por células Th1 e não por células Th2. Por isso, numa infecção viral o nível de anticorpos do tipo IgG2a é muito superior ao nível de anticorpos do tipo IgG1

(figura 30). Sendo assim, neste trabalho também se pesquisou a presença de anticorpos do tipo IgG1 com o propósito de comparar o nível de expressão de IgG1 com o nível de expressão de IgG2a. Através da análise da figura 32 pode-se concluir que não existe uma diferença significativa na resposta por parte das células Th1 quando comparado com Th2 através do nível de expressão de IgG1 e IgG2a. Este resultado pode ser um forte indicador de que o TrV não é capaz de produzir infecção em murganhos.

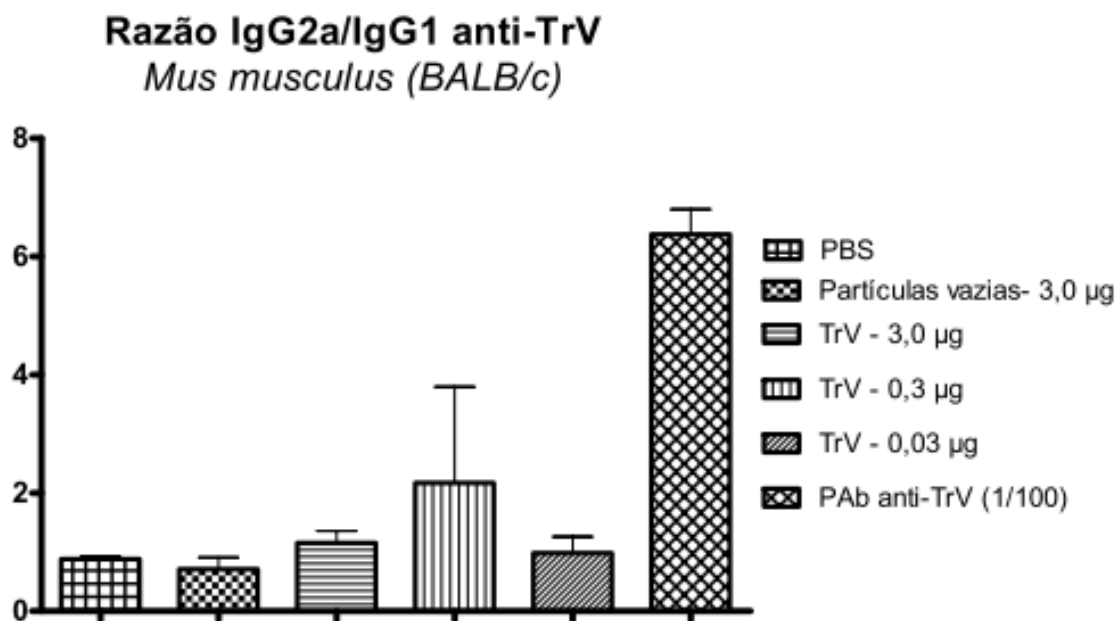


Figura 32: Razão IgG2a/IgG1. Na maioria dos sistemas de infecção viral em murganhos a razão IgG2a/IgG1 está bastante elevada, quando comparada com o grupo controle. Neste sistema a razão é semelhante para todos.

Os resultados da caracterização serológica dos animais inoculados com TrV e com partículas vazias de TrV quando comparados com os resultados obtidos na análise do sangue por RT-PCR, apresentam resultados semelhantes quanto a infectividade de TrV em murganhos. Ambos os resultados parecem indicar que o TrV não é capaz de se replicar em murganhos. Esses resultados estão de acordo com os dados encontrados na literatura, onde o TrV é apresentado como um vírus específico de insectos, e que possui uma organização gnômica completamente distinta de todos os vírus de mamíferos conhecidos até à presente data [47].

5 Conclusões e perspectivas futuras

A pesquisa de anticorpos anti-TrV em soros de pacientes com doença de Chagas residentes em Portugal, Cuba e Brasil e a sua concordância com os resultados apresentados na literatura permitiram validar a metodologia empregue, tanto a técnica utilizada como o protocolo de processamento e análise das amostras. As principais observações registadas neste trabalho poderiam ser reforçadas com experiências de caracterização de soros de pacientes com doença de Chagas residentes noutros países que fazem parte do grupo dos 21 países endémicos para a doença de Chagas.

Conclui-se ainda, através do estudo da possível infectividade de TrV em murganhos *M. musculus* (BALB/c) que o TrV não é infectivo para esta espécie animal. Tanto pela pesquisa de vRNA por RT-PCR como pelo estudo da resposta imune humoral pelo método de ELISA podemos concluir que o TrV não é virulento em murganhos, pelo menos na dose utilizado e no tempo de análise estudado. Estudo da infectividade de TrV em outras espécies de animais poderia servir para reforçar a tese da não infectividade de TrV em mamíferos. Por outro lado, as técnicas de pesquisa de TrV em amostras animais utilizados neste trabalho abrem perspectiva para a pesquisa de TrV em algumas espécies de mamíferos selvagens e domésticos que estão em permanente contacto com triatomíneos.

Através da Colaboração com os laboratórios do CIMPAT (Universidade Los Andes, Colômbia) iniciou-se um estudo da possível infectividade de dejectos de insectos infectados com TrV em triatomíneos através da alimentação artificial. Os resultados futuros deste estudo, permitirão desenvolver uma nova metodologia no estudo da possível infectividade de TrV em mamíferos selvagens, através da inoculação por via oral. A via oral poderá ser a via mais natural de exposição a TrV por esses animais, através de consumo de alimentos contaminados com fezes de triatomíneos (resultados não apresentados nesta tese).

Um dos resultados mais interessantes observado neste trabalho é a não virulência de TrV em murganhos. Tendo em conta que o grande objectivo a longo prazo deste trabalho é contribuir para utilização de TrV como ferramenta no controlo biológico dos triatomíneos, seria interessante avaliar a infectividade de TrV em primatas.

Relativamente ao TrV, os resultados desta investigação bem como os resultados de estudos anteriores realizados por outros investigadores [2;10;11] apontam para a sua utilização a longo prazo como ferramenta no controlo biológico dos triatomíneos.

Tendo em conta, a ausência de material genético e ausência de infectividade (tanto nos insectos como em outros animais vertebrados) das partículas vazias de TrV utilizadas neste trabalho, um maior número de perspectiva fica em aberto quanto ao seu potencial de utilização. Além da optimização das condições de estudo da infectividade de TrV em outras espécies animais, alguns trabalhos futuros podem basear-se no potencial biotecnológico desta partícula, tanto como transportador de moléculas benéficas para o organismo animal, ou como transportador de moléculas tóxicas, como pesticidas, permitindo uma libertação mais segura e eficaz dessas moléculas.

Como conclusão final desta tese, reitera-se a adequabilidade do método de ELISA e de RT-PCR na pesquisa de TrV em amostras humanas e animais. Também, reitera-se a não infectividade de TrV em modelo animal, e o seu potencial como ferramenta no controlo biológico dos triatomíneos.

6 Referências Bibliográficas

1. Rassi, A. Jr., Rassi, A., Marin-Neto JA. 2010. Chagas disease. *Lancet* 375: 1388–402.
2. Zerba, E. 1999. Susceptibility and resistance to insecticides of Chagas disease vectors. *Medicina* 59: 41-46.
3. Vassena, C.V., Picollo M.I., Zerba E.N. 2000. Insecticide resistance in Brazilian *Triatoma infestans* and Venezuelan *Rhodnius prolixus*. *Medical and veterinary entomology* 14 (1): 51-55.
4. Nocerino F. 1976. Susceptibilidad de *Rhodnius prolixus* y *Triatoma maculata* a los insecticidas en Venezuela. *Bol Direc Malariol San Ambiental, Venezuela* 16: 276-283.
5. Rozas-Dennis, G.S., Cazzaniga, N.J. 2000. Effects of Triatoma virus (TrV) on the fecundity and moulting of *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). *Annals of tropical medicine and parasitology* 94, 633–641.
6. Rozas-Dennis, G.S., Cazzaniga, N.J., Guerin, D.M.A. 2002. *Triatoma patagonica* (Hemiptera, Reduviidae), a new host for Triatoma virus. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 97 (3), 427–429.
7. Muscio, O.A., La Torre, J.L., Scodeller, E.A. 1988. Characterization of Triatoma virus, a Picorna-like virus isolated from the Triatomine bug *Triatoma infestans*. *The Journal of general virology* 69, 2929–2934.
8. Marti, G. 2005. Parásitos, patógenos y flora fúngica intestinal de triatominos (Hemiptera: Reduviidae) de la Argentina, con énfasis en *Triatoma infestans* (Klug) Tesis Doctoral, Universidad Nacional de La Plata, 136 pp.
9. Muscio, O.A., La Torre, J.L., Bonder, M., Scodeller, E.A. 1997. Triatoma virus pathogenicity in laboratory colonies of *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). *Journal of medical entomology*. 34, 253–256.
10. World Health Organization. 2008. Chagas disease: control and elimination. Report of the Secretariat. <http://www.who.int>
11. Gabriel, A. S. 2007. Epidemiology of Chagas disease in non-endemic countries: the role of international migration. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, Vol. 102 (Suppl. I): 75-85.
12. World Health Organization. 2002. Control of Chagas disease. Second Report from the Committee of Experts. : Series of Technical Reports 905. 117 pp.

13. François-Xavier, L., Guillaume, Le Loup, Hector F., Michel Develoux, Luc Paris, Laurent Brutus, Gilles Pialoux. 2010. Chagas disease: changes in knowledge and management. *The Lancet infectious diseases* 10: 556–70.
14. Galvão, C., Carcavallo, R., Rocha, D.S., Jurberg, J. 2003. A checklist of the current valid species of the subfamily Triatominae Jeannel, 1919 (Hemiptera, Reduviidae) and their geographical distribution, with nomenclatural and taxonomic notes. *Zootaxa*; 202: 1–36.
15. Mauricio, B., Duque, S., Guhl, F., Herrera, P., López, M., Moreno, A., Santiago, N., Santacruz, M. 2001. Manual de Procedimientos para el Diagnóstico de la Enfermedad de Chagas. Universidad de Los Andes, Santafé de Bogotá, Colombia.
16. Lent, H., Wygodzinsky, P. 1979. Revision of the Triatominae (Hemiptera, Reduviidae), and their significance as vector of Chagas disease. *Bulletin of the American Museum of Natural History* 163: 123–520.
17. Rodolfo, U., Carcavallo, Girón, I., Jurberg, J., Lent, H. 1999. Geographical distribution and alti-latitudinal dispersion. In: Carcavallo RU et al., eds. Atlas of Chagas' disease vectors in the Americas. Vol. 3. Rio de Janeiro, FIOCRUZ: 747–792.
18. Schofield, C.J. 1979. The behaviour of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae): a review. *Bulletin of entomological research* 69: 363-379.
19. Stuart, K., Brun, R., Croft, S., Fairlamb, A., Gürtler, R., McKerrow, J., Reed, S., Tarleton, R. 2008. Kinetoplastids: related protozoan pathogens, different diseases. *The Journal of Clinical Investigation* Volume 118. Number 4.
20. Conrad, L. Epting, B. M., Coates, D. M. Engman. 2010. Molecular mechanisms of host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. *Experimental Parasitology* 126. 283-291.
21. Audino, P. G., Vassena, C., Barrios, S., Zerba, E., Picollo, M. I. 2004. Role of Enhanced Detoxication in a Deltamethrin-resistant Population of *Triatoma infestans* (Hemiptera, Reduviidae) from Argentina. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* Vol. 99(3): 335-339.
22. Samuel Baron. 1996. *Medical Microbiology*, 4th edition. Chapter 41-72.
23. Emilio Flaño. 2008. Viral Immunity: It Takes Two to Tango. *Viral Immunology*. Volume 21, Pp. 281–283. DOI: 10.1089/vim.2008.0028.

24. Male, D., Brostoff, J., Roth, D. B., Roitt, I. 2006. Immunology. Seventh Edition. Elsevier Limited. 247-256.
25. Dennis R. Burton. 2002. Antibodies, viruses and vaccines. *Nature Reviews Immunology* **2**, 706-713 | doi:10.1038/nri891.
26. Mestecky, J., R. Abraham, and P. L. Ogra. 1994. Common mucosal immune system and strategies for the development of vaccines effective at the mucosal surfaces, p. 357±372. In P. L. Ogra, J. Mestecky, M. E. Lamm, W. Strober, J. R. McGhee, and J. Bienenstock (ed.), *Handbook of mucosal immunology*. Academic Press, San Diego, Calif.
27. Amy, S. M. And Cuff, C. F. 1996. Effects of the Route of Infection on Immunoglobulin G Subclasses and Specificity of the Reovirus-Specific Humoral Immune Response. *Journal of Virology*, p. 5968±5974.
28. Tracy, L., Stevens, Bossie, A., Sanders, V. M., Fernandez-Botran, R., Coffman, R. L., Mosmann, T. R., & Vitetta, E. S. 1988. Regulation of antibody isotype secretion by subsets of antigen-specific helper T cells. *Nature* **334**, 255-258 | doi:10.1038/334255a0.
29. Nguyen, L., D. M. Knipe, and R. W. Finberg. 1994. Mechanism of virus-induced Ig subclass shifts. *Journal of Immunology* **152**:478±484.
30. Coutelier, J. P., J. T. M. van der Logt, F. W. A. Heessen, A. Vink, and J. Van Snick. 1988. Virally induced modulation of murine IgG antibody subclasses. *J. Experimental medicine* **168**:2373±2378.
31. Coutelier, J. P., J. T. M. van der Logt, F. W. A. Heesen, G. Warnier, and J. Van Snick. 1987. IgG2a restriction of murine antibodies elicited by viral infections. *J. Experimental medicine* **165**: 64-69.
32. Pei-Yun, S., Li-Kuang, C., Shu-Fen, C., Yi-Yun, Y., Ling, C., Li-Jung, C., Chuan, C., Ting-Hsiang, L., and Jyh-Hsiung, H. 2003. Comparison of Capture Immunoglobulin M (IgM) and IgG Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) and Nonstructural Protein NS1 Serotype-Specific IgG ELISA for Differentiation of Primary and Secondary Dengue Virus Infections. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, p. 622-630, Vol. 10, No. 4.
33. Gillespie, J.R., Kanost, M.R. & Trenczek, T. 1997. Biological mediators of insect immunity. *Annual Review of Entomology*, **42**: 611-643.

34. Noble, E.R., Noble, G.A., Schad, G.A. & MacInnes, A.J. 1989. Parasitology: The Biology of Animal Parasites. (6th ed.). Lea & Febiger, Philadelphia.
35. Moret, Y., Schmid-Hempel, P. 2001. Immune defence in bumble-bee offspring. *Nature*. Vol 414. 506.
36. Bailey, L. & Gibbs, A.J. 1964. Acute infection of bees with paralysis virus. *Journal of Insect Pathology*, 6: 395-407.
37. Rohel, D.Z., Chadwick, J. & Faulkner, P. 1980. Tests with inactivated cricket paralysis virus as a possible immunogen against a virus infection of *Galleria mellonella* larvae. *Intervirology*, 14: 61-68.
38. Glinski, Z. & Jarosz, J. 1995. Mechanical and biochemical defenses of honeybees. *Bee World*, 76: 110-118.
39. Wago, H. 1995. Host-defense reactions of insects. *Japanese Journal of Applied Entomology and Zoology*, 39: 1-13.
40. Casteels, P. 1997. Immune response in Hymenoptera. *Molecular Mechanisms of Immune Responses in Insects* (Ed. P.T. Brey & D. Hultmark), pp.92-110. Chapman & Hall, London.
41. Lavine, M.D. & Beckage, N.E. 1995. Polydnviruses: potent mediators of host immune dysfunction. *Parasitology Today*, 11: 368-378.
42. Shapiro, M., Stock, R.D. & Ignoffo, C.M. 1969. Haemocyte changes in larvae of the cotton bollworm, *Heliothis zea*, infected with a nuclear polyhedrosis virus. *Journal of Invertebrate Pathology*, 14: 28-30.
43. Andersons, D., Gunne, H., Hellers, M., Johansson, H. & Steiner, H. 1990. Immune responses in *Trichoplusia ni* challenged with bacteria or baculoviruses. *Insect Biochemistry*, 20: 537-543.
44. Muscio, O.A., La Torre, J.L., Scodeller, E.A. 1987. Small noncluded viruses from bug *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). *Journal of invertebrate pathology* 49, 218–220.
45. González, N. L. 2008. Determinación del efecto de la infección con triatoma virus en diferentes especies de triatomíneos. Tesis de maestría. Universidad de los Andes, Bogotá, Colombia.
46. Mayo, M.A. 2002. Virus taxonomy. *Archives of virology* 147 (5), 1071–1076.
47. Czibener, C., La Torre, J.L., Muscio, O.A., Ugalde, R.A., Scodeller, E.A. 2000. Nucleotide sequence analysis of *Triatoma* virus shows that it is a member of a

- novel group of insect RNA viruses. *The Journal of general virology*. 81, 1149–1154.
48. Bryony, C. Bonning and Miller, W. A. 2010. Dicistroviruses. *Annual review of entomology* 55:129–50.
49. Marla I. Hertz, Sunnie R. Thompson. 2011. Mechanism of translation initiation by Dicistroviridae IGR IRESs. *Virology* 411. 355–361.
50. Marti, G. A., Neumann, E., Rey F. A., Guérin D. M. A., Gonzalez, E.T., García, J.J., Viguera, A.R., Guérin, D.M.A., Echeverria, M.G. 2008. AC-ELISA and RT-PCR assays for diagnosis of *Triatoma virus* (TrV) in triatomines (Hemiptera: Reduviidae) species. *Archives of virology* 153 (8), 1427–1432.
51. Brabec, M., Schober, D., Wagner, E., Bayer, N., Murphy, R. F., Blaas, D., Fuchs, R. 2005. “Opening of size-selective pores in endosomes during human rhinovirus serotype 2 in vivo uncoating monitored by single-organelle flow analysis”. *Journal of Virology*. 79:1008-1010.
52. Tuthill T. J., Bubeck D., Rowlands D. J. y Hogle J. M. 2006. “Characterization of early steps in the poliovirus infection process: receptor-decorated liposomes induce conversion of the virus to membrane-anchored entry-intermediate particles”. *Journal of Virology* 80: 172-180.
53. Danthi, P., Tosteson, M., Li, Q.-H. y Chow, M. 2003. “Genome Delivery and Ion Channel Properties Are Altered in VP4 Mutants of Poliovirus”. *Journal of Virology* 77(9):5266-5274.
54. Swingle, H. S. 1925. “Digestive enzymes of an insect”. *The Ohio Journal of Science*. XXV(5):209-218.
55. Agirre, J. 2009. “Structural basis for the stability, infectivity and (dis)assembly process of *Triatoma Virus* (TrV)”. Doctoral thesis. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea.
56. Schofield CJ. 1979. The behaviour of *Triatominae* (Hemiptera: Reduviidae): a review. *Bulletin of entomological research* 69: 363-379.
57. Muscio, O.A., Bonder, M., La Torre, J.L., Scodeller, E.A. 2000. Horizontal transmisión of *Triatoma virus* through the fecal–oral route in *Triatoma infestans*. *Journal of medical entomology* 37 (2), 271–275.

58. Estrozi, L.F., Neumann, E., Squires, G., Rozas-Dennis, G., Costabel, M., Rey, F.A., Guérin, D.M.A., Navaza, J. 2008. Phasing of the *Triatoma* virus diffraction data using a cryo-electron microscopy reconstruction. *Virology* 375 (1), 85–93.
59. Gerardo A. Marti, María G. Echeverria, María L. Susevich, James J. Becnel, Sebastián A. Pelizza, Juan J. García. 2009. Prevalence and distribution of parasites and pathogens of Triatominae from Argentina, with emphasis on *Triatoma infestans* and *Triatoma* virus TrV. *Journal of Invertebrate Pathology* 102: 233–237.
60. Agirre, J., Aloria, K., Arizmendi, J. M., Iloro, I., Elortza, F., Eugenia, R. S. 2011. Capsid protein identification and analysis of mature *Triatoma* virus (TrV) virions and naturally occurring empty particles. *Virology* 409. 91–101.
61. Hanly W.C., Artwohl J.E., Bennett B.T. 1995. Review of polyclonal antibody production procedures in mammals and poultry. *ILAR Journal* 37:93-118.
62. Leenaars M, Hendriksen C.F. 2005. Critical steps in the production of polyclonal and monoclonal antibodies: evaluation and recommendations. *ILAR Journal* 2005;46(3):269-79.
63. Michael J. McPherson and Simon Geir Møller. 2006. PCR Second Edition. Taylor & Francis Group.
64. Hui Xu, Jurgen Lohr, Matthias Greiner. 1997. The selection of ELISA cut-off points for testing antibody to Newcastle disease by two-graph receiver operating characteristic (TG-ROC) analysis. *Journal of Immunological Methods* 208. 61–64.
65. Matthias Greiner. 1995. Two-graph receiver operating characteristic (TG-ROC): a Microsoft-EXCEL template for the selection of cut-off values in diagnostic tests. *Journal of Immunological Methods* 185. 145-146.
66. Barton DJ, O'Donnell BJ, Flanagan JB. 2001. 5' cloverleaf in poliovirus RNA is a cis-acting replication element required for negative-strand synthesis. *European Molecular Biology Organization* 20:1439–48.
67. Jan, E. 2006. Divergent IRES elements in invertebrates. *Virus Research* 119:16–28