

Ninna Granucci

**ESTUDO DA INTERAÇÃO CELULAR PARASITO-
HOSPEDEIRO A PARTIR DA EXPRESSÃO HETERÓLOGA DE
TRANS-SIALIDASE DE *TRYPANOSOMA CRUZI* POR
TRYPANOSOMA RANGELI EM ENSAIOS *IN VITRO* E *IN VIVO***

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Mestre em Biotecnologia e Biociências.

Orientador: Prof. Dr. Edmundo Carlos Grisard
Orientadora: Dra. Patrícia Hermes Stoco

Florianópolis, SC
2013

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Granucci, Ninna

Estudo da interação celular parasito-hospedeiro a partir da expressão heteróloga de trans-sialidase de *Trypanosoma cruzi* por *Trypanosoma rangeli* em ensaios *in vitro* e *in vivo* / Ninna Granucci ; orientador, Edmundo Carlos Grisard ; co-orientadora, Patrícia Hermes Stoco. - Florianópolis, SC, 2013.
189 p.

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

Inclui referências

1. Biotecnologia e Biociências. 2. Biologia. 3. *Trypanosoma rangeli* e *Trypanosoma cruzi*. 4. Trans-sialidase e Expressão heteróloga. 5. Interação *in vitro* e *in vivo*. I. Grisard, Edmundo Carlos. II. Stoco, Patrícia Hermes. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências. IV. Título.

“Estudo da interação celular parasito-hospedeiro a partir da expressão heteróloga de trans-sialidase de *Trypanosoma cruzi* por *Trypanosoma rangeli* em ensaios *in vitro* e *in vivo*”

por

Ninna Granucci

Dissertação julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da Banca Examinadora (Port. 08/PPGBTC/2013) do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências- UFSC, composta pelos Professores Doutores:

Banca Examinadora:




Prof(a) Dr(a) Edmundo Carlos Grisard (Orientador/MIP/CCB/UFSC)




Prof(a) Dr(a) Patricia Hermes Stoco (Coorientadora/PPGBTC/UFSC)




Prof(a) Dr(a) Fernando Spiller (FMC/CCB/UFSC)



Prof(a) Dr(a) Oscar Bruna-Romero (MIP/CCB/UFSC)



Prof(a) Dr(a) José Franco da Silveira Filho (MIP/UNIFESP)



Prof(a). Dr(a). Marcelo Maraschin
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências.

Florianópolis, 22 de março de 2013.

Este trabalho é dedicado aos meus
amados pais, Stelio Maria Granucci e
Tarcisia Mônica Mazon Granucci

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a todos que se sentiram parte desta etapa na minha vida. Em especial gostaria de agradecer:

Ao meu orientador Dr. Edmundo Carlos Grisard pela confiança e oportunidade. Sou muito grata pelo acolhimento nos vários momentos de dúvida e pelo aprendizado destes últimos anos.

A minha orientadora Dr^a. Patrícia Hermes Stoco pela grande disponibilidade em ajudar e dar conselhos e dicas preciosas. Certamente tudo tornou-se possível e realizável graças a você e sua enorme competência.

Ao professor Dr. Mario Steindel pela disponibilidade e por seus valiosos conselhos, que me salvaram em muitas oportunidades.

Aos professores Dr. André Báfica, Dr. Daniel Mansur, Dr. Fernando Spiler, Dr. Álvaro Romanha, pelas conversas, pelos momentos de reflexão sobre o estudo da vida ou, simplesmente, sobre a vida.

Ao Dr. Marcelo T. Bozza pela paciência, pelo carinho e pelas correções que foram providenciais para a dissertação. Aprendi muito, apesar do pouco tempo de convivência.

Ao Dr. Sergio Schenkman e Dr. John Kelly, por ter atendido aos pedidos de anticorpos e plasmídeos, sem os quais seria impossível o início dos experimentos.

Aos membros da banca, que aceitaram o convite e fizeram considerações pertinentes e importantes: Dr. José Franco da Silveira Filho, Dr. Fernando Spiller, Dr. Oscar Bruna-Romero e Dr. Giordano Wosgrau Calloni. Aprendi muito em um dia.

Aos meus professores de Graduação e Pós, que me ensinaram e me acompanharam, mesmo sem saber, nesses anos todos.

A todos os integrantes do Laboratório de Protozoologia pelas experiências compartilhadas e ajudas requeridas, em especial a Carime, Gustavo, Mariel e Milene que me salvaram em várias oportunidades.

Aos integrantes dos outros laboratórios do departamento, que em rápidas conversas e risadas tornaram mais leve a rotina do laboratório.

Ao Álvaro Menin, que pacientemente me ensinou e ajudou com meus experimentos intermináveis em camundongos.

As "meninas" do laboratório que me ajudaram nos momentos de muito trabalho e também de muita conversa, confidências, cafés e risadas: Débora, Thaynara, Laís, Greicy e Pati. Vocês foram fundamentais nessa fase da minha vida.

Aos meus amigos da biologia e agora meus amigos para toda vida, Gabriela Ecco, Patrícia Cardoso Monteiro (Cição) e Luiz Felipe de Souza, por todos os cafés e sonhos que tive o prazer de compartilhar com vocês.

Ao meu namorado Iván, por sempre trazer para nossa convivência, muita paciência, companheirismo, parcimônia e amor. Sem você a vida seria mais difícil.

As minhas irmãs e melhores amigas Bruna, Sabrina e Mirella. E agora também ao meu cunhado pela diversão e minha tão querida e esperada sobrinha, Esperanza, por ser uma alegria inesperada e deliciosa.

Aos meus pais que sempre me amaram acima de tudo e que constantemente incentivaram o meu crescimento e minha paixão pela Biologia. Sou eternamente grata a vocês e espero um dia poder devolver uma parte ínfima do orgulho que vocês me dão. Dedico a dissertação e o mestrado a vocês.

E a Deus por me dar alento quando ninguém mais podia e me permitir ser a pessoa que sou hoje.

"De tanto ver triunfar as nulidades; de tanto ver crescer as injustiças; de tanto agigantar-se os poderes nas mãos dos maus; o homem chega a desanimar-se da virtude, rir-se da honra e ter vergonha de ser honesto."

Rui Barbosa

RESUMO

As trans-sialidases de *Trypanosoma cruzi* (TcTS) são capazes de clivar resíduos de ácidos siálicos da célula hospedeira e transferí-los à superfície do parasito, e portanto, fundamentais nessa interação. Já o *Trypanosoma rangeli*, considerado não patogênico para mamíferos e com ciclo desconhecido nestes hospedeiros, possui no seu genoma genes similares aos membros da família das Trans-sialidase (TS), embora sem nenhuma atividade catalítica. Uma vez que essa atividade está relacionada a pontos cruciais do ciclo do parasito patogênico e que, a ausência de atividade TS em *T. rangeli* é apontada como um dos motivos de sua incapacidade de infectar e sobreviver em células de mamíferos, o objetivo do presente trabalho foi estudar o envolvimento da TS a partir da expressão heteróloga de uma TcTS ativa pelo *T. rangeli*. Após a transfecção e a confirmação da atividade de TS em *T. rangeli* transfectado (*T. rangeli* TcTS), ninfas de 4° e 5° estágio de *Rhodnius prolixus* (*R. prolixus*) foram infectadas por inoculação intracelômica com formas epimastigotas de *T. rangeli* selvagem e *T. rangeli* TcTS. Observamos uma diferença estatística no número de glândulas infectadas para *T. rangeli* selvagem (92%), e *T. rangeli* TcTS (16%), seis semanas p.i.. A infecção em camundongos BALB/c e C57BL/6 não revelou diferenças na de parasitemia entre parasitos selvagens e transfectados. Já nos ensaios de infecção *in vitro* utilizando-se células Vero, observou-se que o *T. rangeli* TcTS apresentou maior capacidade de infecção quando comparados ao *T. rangeli* selvagem, não sendo observado nenhum indício de divisão celular para esses parasitos após 120 horas de interação. Os resultados apontam que a expressão heteróloga da TcTS por *T. rangeli* embora não altere o tempo e o padrão da parasitemia experimental *in vivo* em camundongos, promoveu mudanças no comportamento da interação parasito-vetor e parasito-célula, reduzindo sua capacidade de penetração nas glândulas salivares de *R. prolixus* e facilitando a entrada do parasito em células *in vitro*.

Palavras-chave: *Trypanosoma rangeli*, *Trypanosoma cruzi*, Trans-sialidases

ABSTRACT

The *Trypanosoma cruzi* trans-sialidases (*TcTS*) are able to cut and transfer sialic acid from the host cell to the parasite surface and are important molecules on this interaction. *Trypanosoma rangeli* is a non-pathogenic parasite to mammal, that posses an unknown life cycle in this host, and it has similar genes to TS family members in the genome, however, with no catalytic activity. Once TS are crucial molecules involved in parasite-host cell interaction in the pathogenic parasite, and the absence of TS activity is pointed as one of the reasons of its inability capacity of infecting and surviving in mammals cells, the aim of this work was to study the roll of TS in the host-parasite interaction using *T. rangeli* expressing an active *TcTS* (*T. rangeli TcTS*). After transfection and assessment of protein activity, 4° and 5° instar nymphs of *Rhodnius prolixus* were infected by intracelomic inoculation of *T. rangeli* wild type and *T. rangeli TcTS* epimastigote forms. A statistically significant difference was observed in the number of salivary gland infected for *T. rangeli* wild type (92%) and for *T. rangeli TcTS* (16%) at six weeks p.i.. Parasitemia of BALB/c mice and C57BL/6 infected by *T. rangeli TcTS* showed no difference from mice infected with non-transfected parasites. For *in vitro* infection assays with Vero cells, *T. rangeli TcTS* presented higher infection rates when compared with *T. rangeli* wild type, but no indication of intracellular division was detected for these parasites up to 120 hours. Despite not altering the parasitemia in mice, our results indicate that *TcTS* expressed by *T. rangeli* may be responsible for changes on the interaction between vector-parasite and cell-parasite by reducing the ability to penetrate on *R. prolixus* salivary glands and facilitating cell entry *in vitro*.

Key words: *Trypanosoma rangeli*, *Trypanosoma cruzi*, Trans-sialidases

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo biológico do <i>Trypanosoma rangeli</i> no hospedeiro invertebrado.....	30
Figura 2. Atividade da trans-sialidase em formas tripomastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i>	42
Figura 3. Mapa do plasmídeo pTEXeGFP, indicando os sítios de enzimas de restrição.	54
Figura 4. Esquema da metodologia de extração de proteínas do <i>Trypanosoma rangeli</i> solúveis ao detergente Triton X-114.....	63
Figura 5. Equação da diferença entre duas médias para cálculo de amostra.	82
Figura 6. Organização estrutural similar entre a trans-sialidase de <i>Trypanosoma cruzi</i> (A) TcTS (XP_807431.1) e sialidase de <i>Trypanosoma rangeli</i> (B) TrSial (contig 07420).....	86
Figura 7. Domínios Asp e VTV, peptídeo sinal e aminoácidos do sítio catalítico são conservados entre a trans-sialidase de <i>Trypanosoma cruzi</i> - TcTS_SAPA (XP_807431.1) e sialidase de <i>Trypanosoma rangeli</i> - TrSial (contig_07420). Alinhamento das sequências aminoacídicas preditas da através do programa ClustalW.	88
Figura 8. Conjunto de alterações de aminoácidos não-conservado é o motivo para ausência de atividade de transglicosilação da proteína TrSial.....	90
Figura 9. Obtenção do plasmídeo de expressão.	92
Figura 10. Representação esquemática do plasmídeo pTEX-TcTSeGFP indicando as posições dos sítios para enzimas de restrição e as posições dos genes da TcTS de <i>Trypanosoma cruzi</i> e da GFP.	93
Figura 11. Plasmídeo pTEXeGFP-TcTS possui os domínios característicos e os aminoácidos do sítio catalítico.	94
Figura 12. <i>Trypanosoma rangeli</i> expressando GFP como indicativo de co-expressão da TcTS de <i>T. cruzi</i>	95
Figura 13. Visualização da expressão de GFP por fluorescência direta no <i>Trypanosoma rangeli</i> transfectado com o plasmídeo pTEXeGFP-TcTS..	97
Figura 14. Confirmação da presença dos genes da TcTS e GFP para os parasitos transfectados com o plasmídeo pTEXeGFP-TcTS.....	100

Figura 15. Expressão da proteína <i>TcTS</i> e GFP fusionada com <i>TcTS</i> para os parasitos que continham o plasmídeo pTEXeGFP- <i>TcTS</i>	101
Figura 16. Proteína heteróloga <i>TcTS</i> não possui peptídeo sinal ou âncora de GPI, embora apresente grande região não-citoplasmática	104
Figura 17. Detecção da <i>TcTS</i> na superfície do <i>Trypanosoma rangeli</i>	106
Figura 18. <i>TcTS</i> está expressa na fração de membrana da cepa <i>Tr_TcTS</i>	108
Figura 19. Detecção de atividade de trans-sialidase para ambas as formas da cepa <i>Trypanosoma rangeli TcTS (Tr_TcTS)</i>	109
Figura 20. Padrão da curva de crescimento das cepas <i>Tr_GFP (T. rangeli GFP)</i> e <i>Tr_TcTS (T. rangeli TcTS)</i> de <i>Trypanosoma rangeli</i> comparada a cepa selvagem (<i>Tr_WT</i>) não é alterado pela expressão heteróloga das proteínas <i>TcTS</i> e GFP.	111
Figura 21. A expressão dos genes GFP e <i>TcTS</i> não afeta a capacidade de diferenciação <i>in vitro</i> das cepas transfectadas em relação à cepa selvagem..	112
Figura 22. Identidade de 98,7% entre as sequências das trans-sialidasases ativa (<i>TcTS</i>) e inativa (<i>TcTS2VØ</i>).....	114
Figura 23. A proteína <i>TcTS2VØ</i> está presente na fração insolúvel da bactéria.....	116
Figura 24. Proteína <i>TcTS2VØ</i> obtida com sucesso por purificação da fração insolúvel.....	117
Figura 25. Soro de camundongo imunizado reconhece as TS.	119
Figura 26. Soro do camundongo 1 possui maior titulação.....	120
Figura 27. Diminuição da sobrevivência de triatomíneos inoculados com G-418.	123
Figura 28. Ausência de formas tripomastigotas de <i>Trypanosoma rangeli TcTS</i> na glândula salivar de <i>Rhodnius prolixus</i>	124
Figura 29. Presença do gene <i>TcTS</i> nos parasitos <i>Trypanosoma rangeli TcTS</i> presentes na hemolinfa de <i>Rhodnius prolixus</i>	126
Figura 30. Presença da proteína <i>TcTS</i> nos parasitos <i>Trypanosoma rangeli TcTS (Tr_TcTS)</i> encontrados na hemolinfa de <i>Rhodnius prolixus</i> 70 dias após a infecção.....	127

Figura 31. Identificação da fluorescência de GFP nos parasitos <i>Trypanosoma rangeli</i> TcTS (<i>Tr_TcTS</i>) encontrados na hemolinfa de <i>Rhodnius prolixus</i> 70 dias após a infecção.....	129
Figura 32. Expressão heteróloga da TcTS diminui da capacidade de infecção das glândulas salivares de <i>R. prolixus</i> por <i>T. rangeli</i> TcTS (<i>Tr_TcTS</i>).....	131
Figura 33. Expressão de TcTS por <i>Trypanosoma rangeli</i> incrementa a capacidade de infecção da cepa transfectada.....	133
Figura 34. Atividade de TS em <i>Trypanosoma rangeli</i> TcTS aumenta a aderência dos parasitos no período inicial de interação.	135
Figura 35. Aumento no número de formas intracelulares e células infectadas para a cepa <i>Trypanosoma rangeli</i> TcTS.....	137
Figura 36. Formas intracelulares arredondadas, mas com flagelo visível para a cepa <i>Trypanosoma rangeli</i> TcTS (<i>Tr_TcTS</i>).....	139
Figura 37. A cepa <i>Trypanosoma rangeli</i> expressando a TcTS (<i>Tr_TcTS</i>) permanece com perfil similar as outras cepas de <i>T. rangeli</i> e ausência de multiplicação em camundongo BALB/c..	142
Figura 38. Perfil similar entre a cepa <i>Trypanosoma rangeli</i> TcTS e as outras cepas de <i>T. rangeli</i> e ausência de multiplicação em camundongos C57BL/6.....	145
Figura 39. Animais com infecção crônica por <i>T. rangeli</i> TcTS apresentam maior parasitemia quando desafiados pela inoculação de parasitos da cepa virulenta Y de <i>T. cruzi</i> (<i>Tc</i>).....	147
Figura 40. Infecção com <i>T. rangeli</i> TcTS (<i>Tr_TcTS</i>) torna os camundongos mais susceptíveis a altas parasitemias de <i>T. cruzi</i> (<i>Tc</i>).	149
Figura 41. Camundongos C57BL/6 previamente infectados por <i>T. rangeli</i> TcTS apresentam maior parasitemia quando desafiados pela inoculação de parasitos da cepa virulenta Y de <i>T. cruzi</i> (<i>Tc</i>).	151
Figura 42. Modelo esquemático representando os mecanismos de <i>trans-splicing</i> e poliadenilação do pré-mRNA em <i>Trypanosoma cruzi</i>	158

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Descrição dos anticorpos utilizados nos ensaios de imunofluorescência indireta e *Western blot*, considerando sua origem, tamanho das proteínas reconhecidas e diluições utilizadas nas diferentes metodologias.....**59**

TABELA 2. Parâmetros bioquímicos deduzidos para as proteínas *TcTS* e *TcTS2VØ* de *Trypanosoma cruzi*.....**115**

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3'-SL – 3'-Sialilactose
BLAST – do inglês *Basic Local Alignment Search Tool*
BSA – soro albumina bovina (do inglês *Bovine Serum Albumin*)
cm – centímetro
Da – Dalton
DAPI – 4'-6'-diamidino-2-fenilindol
DMEM – do inglês *Dulbecco's Modified Eagle Medium*
dNTP – desoxinucleotídeo trifosfatado (do inglês *Deoxynucleotide Triphosphate*)
DO- densidade óptica
EDTA – ácido etilenodiaminotetracético
ELISA - do inglês *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*
ExPaSy – do inglês *Expert Protein Analysis System*
g – força da gravidade
g – grama
G-418 - Geneticin
GPI – glicosilfosfatidilinositol
HAT - hipoxantina, aminopterina, timidina
HT - hipoxantina, timidina
IPTG – isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo
J – Joules
kDa – kilodalton
KV – kilovolt
LB – meio Luria-Bertani
LIT – do inglês *Liver Infusion Tryptose*
M – molar
mA – miliampere
mg – miligrama
ml – mililitro
mM – milimolar
MUGal – 4-Metilumbeliferil- β -D-galactopiranosídeo
NCBI – do inglês *National Center for Biotechnology Information*
ng – nanograma
nm – nanômetro
NP-40 – Nonidet 40, nonil fenoxi polietoxietanol
°C – graus Celsius
OPD - orto-fenileno-diamina
ORF - do inglês *Open read frame* (janela aberta de leitura)
pb – pares de bases

PBS – tampão salina fosfato, pH 7,4 (do inglês *Phosphate Buffered Saline*)

PCR – reação em cadeia da polimerase (do inglês *Polymerase Chain Reaction*)

PEG - polietilenoglicol

pH – potencial hidrogeniônico

PIPES – Piperazina-1,4-bis (ácido 2-etanosulfônico)

pmol – picomol

RIFI – Reação de Imunofluorescência Indireta

SBF – soro bovino fetal

SDS-PAGE – do inglês *Sodium Dodecyl Sulfate – Polyacrylamide Gel Electrophoresis*

Tc - *Trypanosoma cruzi* selvagem cepa Y

Tr_GFP - *Trypanosoma rangeli* transfectado com pTEXeGFP

Tr_WT - *Trypanosoma rangeli* selvagem

Tr_TcTS - *Trypanosoma rangeli* transfectado com pTEXeGFP *TcTS*

U – unidade

W – Watt

X-gal – 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosídeo

μ g – micrograma

μ l – microlitro

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	27
1.1 <i>Trypanosoma cruzi</i> e <i>Trypanosoma rangeli</i>	27
1.2 Mecanismo da invasão celular por <i>Trypanosoma cruzi</i>	35
1.3 Superfamília das Trans-sialidases.....	37
2. OBJETIVO GERAL.....	47
2.1 Objetivos Específicos.....	47
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	49
3.1 Análise <i>in silico</i> das sequências da Sialidase de <i>Trypanosoma rangeli</i> comparativamente com a Trans-sialidase de <i>Trypanosoma cruzi</i>	49
3.2 Parasitos.....	50
3.3 Obtenção da cepa <i>T. rangeli TcTS</i>	51
3.3.1 Obtenção do gene da <i>TcTS</i> e ligação no vetor de expressão.....	51
3.3.2 Clonagem dos insertos de interesse.....	52
3.3.3 Extração do DNA plasmidial e digestão com enzimas de restrição.....	52
3.3.4 Subclonagem em vetor de expressão.....	53
3.3.5 Sequenciamento e análise da sequência da proteína <i>TcTS</i> expressa heterologicamente por <i>Trypanosoma rangeli TcTS</i>	55
3.3.6 Transfecção dos parasito.....	56
3.3.7 Detecção dos produtos de expressão plasmidial por <i>Western blot</i>	58
3.4 Características da cepa <i>T. rangeli TcTS</i>	60
3.4.1 Fluorescência Direta.....	60
3.4.2 Citolocalização da proteína <i>TcTS</i> expressa heterologicamente por <i>T. Rangeli</i>	60
3.4.2.1 Ensaios de imunofluorescência indireta (RIFI).....	60
3.4.2.2 Obtenção de proteínas associadas à membrana plasmática dos parasitos.....	61
3.4.2.3 Avaliação da expressão das proteínas <i>TcTS</i> na membrana dos parasitos por <i>Western blot</i>	64

3.4.3 Ensaio de atividade funcional de Trans-Sialidase (TS).....	64
3.4.4 Avaliação comparativa das curvas de crescimento entre as linhagens transfectadas e controles.....	65
3.4.5 Avaliação comparativa da porcentagem de diferenciação <i>in vitro</i> do <i>T. rangeli</i>	65
3.5 Obtenção de soro policlonal dirigido à <i>TcTS2VØ</i>	66
3.5.1 Subclonagem, expressão heteróloga e purificação da proteína <i>TcTS2VØ</i>	66
3.5.2 Imunização dos camundongos e obtenção do antissoro.....	70
3.5.3 Avaliação e titulação dos soros dos camundongos por ELISA.....	71
3.5.4 Obtenção das células esplênicas para produção dos anticorpos monoclonais.....	72
3.5.5 Células de Mieloma (plasmocitomas) para produção dos anticorpos monoclonais.....	72
3.5.6 Obtenção dos hibridomas para produção dos anticorpos monoclonais.....	73
3.5.7 Triagem, expansão clonal e criopreservação dos hibridomas produtores de anticorpos monoclonais anti- <i>TcTS2VØ</i>	74
3.6 Interação entre Parasito- <i>Rhodnius prolixus</i>	75
3.6.1 Avaliação da mortalidade de <i>Rhodnius prolixus</i> por inoculação de G-418.....	75
3.6.2 Inoculação de <i>Trypanosoma rangeli</i> na hemolinfa de <i>Rhodnius prolixus</i>	76
3.6.3 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	77
3.6.4 Avaliação da expressão da proteína <i>TcTS</i> por <i>T. rangeli</i> presente na hemolinfa de <i>R. prolixus</i> por <i>Western blot</i>	78
3.6.5 Alimentação Artificial de <i>R. Prolixus</i>	78
3.7 Ensaios de infecção <i>in vitro</i> do <i>T. rangeli TcTS</i> com células Vero.....	79

3.7.1 Reação de imunofluorescência indireta (RIFI) para ensaio de interação <i>in vitro</i> com células Vero.....	80
3.8 Ensaios <i>in vivo</i> da infecção do <i>T. rangeli</i> TcTS em camundongos.....	80
3.8.1 Parasitemia em camundongos BALB/c.....	80
3.8.2 Parasitemia em camundongos C57BL/6.....	81
3.8.3 Influência da expressão da TcTS pelo <i>T. rangeli</i> no desenvolvimento do parasito <i>in vivo</i> e na proteção cruzada com o <i>T. cruzi</i>	82
3.9 Aspectos éticos no uso de animais e geração e manipulação de OGM..	84
4. RESULTADOS.....	85
4.1 Análise <i>in silico</i> da sequência de Sialidase de <i>Trypanosoma rangeli</i>	85
4.2 Obtenção da cepa <i>T. rangeli</i> TcTS.....	91
4.2.1 Construção do plasmídeo, sequenciamento e análise da sequência....	91
4.2.2 Transfecção e expressão heteróloga.....	94
4.2.3 Avaliação da presença do DNA plasmidial no <i>T. rangeli</i> trasfectado por PCR.....	98
4.2.4 Avaliação da expressão heteróloga da TcTS de <i>T. cruzi</i> por <i>T. rangeli</i> através da <i>Western blot</i>	100
4.3 Caracterização biológica da cepa <i>T. rangeli</i> TcTS quanto a citolocalização da TcTS heteróloga, presença de atividade TS, crescimento e diferenciação <i>in vitro</i>	103
4.4 Expressão da proteína TcTS em bactéria e produção de soro policlonal e anticorpo monoclonal.....	113
4.5 Interação entre Parasito- <i>Rhodnius prolixus</i>	121
4.6 Ensaios de interação <i>in vitro</i> do <i>T. rangeli</i> TcTS com células Vero.....	132
4.7 Ensaios de interação <i>in vivo</i> entre o <i>T. rangeli</i> TcTS e camundongos..	140
4.7.1 Parasitemia em camundongos BALB/c.....	140
4.7.2 Parasitemia em camundongos C57BL/6.....	142
4.7.3 Infecção por <i>Trypanosoma cruzi</i> em animais BALB/c cronicamente infectados com <i>Trypanosoma rangeli</i> Tr_TcTS, Tr_WT e Tc.....	146

4.7.4 Infecção por <i>Trypanosoma cruzi</i> em animais C57BL/6 cronicamente infectados com <i>Trypanosoma rangeli</i> <i>Tr_TcTS</i>, <i>Tr_WT</i> e <i>Tc</i>.....	150
5. DISCUSSÃO.....	153
6. CONCLUSÃO.....	177
REFERÊNCIAS.....	178
APÊNDICE.....	189

1. INTRODUÇÃO

1.1 *Trypanosoma cruzi* e *Trypanosoma rangeli*

O Filo Euglenozoa é um dos maiores grupos eucariotos e seus membros apresentam uma grande variedade de estilos de vida, desde organismos de vida livre, até parasitos de vertebrados, invertebrados e plantas (CAVALIER-SMITH, 1981; BREGALIA *et al.*, 2007). Este Filo está dividido em três ordens principais: Euglenoidea, Diplonemea e Kinetoplastida (BREGALIA *et al.*, 2007). Esta última Ordem está representada por organismos unicelulares de vida livre e agentes causadores de enfermidades humanas e veterinárias (SIMPSON *et al.*, 2006). Por possuírem uma única mitocôndria que apresenta uma região que concentra moléculas de DNA dupla fita circulares e concatenadas, denominada cinetoplasto ou kDNA, são então reconhecidos como kinetoplastídeos. O *Trypanosoma cruzi* Chagas, 1909 e o *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920, representantes desta Ordem, são protozoários hemoflagelados, capazes de infectar triatomíneos, mamíferos silvestres e domésticos, bem como o homem nas Américas Central e do Sul (GRISARD *et al.*, 1999; VALLEJO *et al.*, 2003; 2009). Estas espécies compartilham um grande número de reservatórios e vetores (D'ALESSANDRO *et al.*, 1992; CUBA CUBA, 1998; GRISARD *et al.*, 1999a; GUHL *et al.*, 2003; VASQUEZ *et al.*, 2004), assim como apresentam uma distribuição geográfica sobreposta, sendo comum a ocorrência de infecções mistas em hospedeiros vertebrados e invertebrados (AFCHAIN *et al.*, 1979; GRISARD *et al.*, 1999; MAIA DA SILVA *et al.*, 2004; 2007).

A doença de Chagas ou tripanossomíase americana causada pelo *T. cruzi* afeta mais de 10 milhões de pessoas, causando cerca de 10 mil mortes a cada ano no mundo (WHO, 2010). No Brasil, estimam-se dois a três milhões de pessoas infectadas (DIAS, 2006; 2007). Em 2009, segundo dados do Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAM), foram registrados no país 250 novos casos confirmados de doença de Chagas, sendo 236 (94,0%) no estado do Pará (MS, 2010).

O curso clínico da doença se caracteriza por uma fase inicial aguda, com sintomas frequentemente inespecíficos -quando presentes- como febre, dor de cabeça, dificuldade de respirar, dor no peito e dor abdominal. A fase aguda é seguida por uma fase crônica que pode ser assintomática (cerca de 60-80% dos casos) ou sintomática, com comprometimento cardíaco (cardiopatia chagásica), e/ou acometimentos digestivos graves (megaesôfago e megacólon) (PRATA, 2001; TEIXEIRA *et al.*, 2006).

O ciclo biológico do *T. cruzi* inicia-se com a infecção do triatomíneo pelo parasito quando esse ingere formas tripomastigotas durante o repasto sanguíneo em hospedeiros mamíferos infectados. O parasito se divide sob a forma epimastigota no tubo digestivo do inseto e se diferencia na ampola retal em formas tripomastigotas metacíclicas que poderão ser transmitidas ao hospedeiro mamífero através da deposição de fezes infectadas nas mucosas ou em locais próximos ao da lesão tecidual causada pela picada do inseto. No hospedeiro mamífero, o ciclo do parasito envolve fenômenos de reconhecimento, adesão e interiorização celular. As formas tripomastigotas, uma vez no interior da célula hospedeira, evadem do vacúolo endocítico e se diferenciam em formas amastigotas, que se multiplicam por sucessivas divisões binárias

no citoplasma celular. As formas amastigotas se diferenciam em tripomastigotas e após o rompimento da célula hospedeira essas formas são liberadas para o meio extracelular, sendo que podem permanecer circulantes no sangue ou infectar outras células hospedeiras, iniciando assim um novo ciclo intracelular (BRENER *et al.*, 2000).

Diferentemente do *T. cruzi*, a transmissão do *T. rangeli* ao hospedeiro mamífero - para o qual não é patogênico - ocorre predominantemente através da picada do inseto vetor. As espécies de triatomíneos relacionadas à transmissão deste parasito normalmente pertencem ao gênero *Rhodnius*. Entretanto, a susceptibilidade e o nível de infecção variam conforme a espécie do triatomíneo e a cepa do parasito (GUHL *et al.*, 2003). No hospedeiro invertebrado, o ciclo se inicia com a ingestão de formas tripomastigotas no momento do repasto sanguíneo em um mamífero infectado. No intestino do triatomíneo, os parasitos se diferenciam em formas epimastigotas que atravessam o epitélio intestinal alcançando a cavidade celômica. Uma vez na hemocele, os parasitos multiplicam-se e migram para as glândulas salivares onde penetram e diferenciam-se em tripomastigotas metacíclicos - que são infectantes e inoculados no hospedeiro mamífero no momento de um novo repasto sanguíneo (**Figura 1**). Alguns estudos em laboratório ainda demonstram que é possível a infecção de camundongos utilizando-se as fezes de triatomíneos infectados com o *T. rangeli* (GRISARD; STEINDEL, 2005), embora essa não seja a principal forma de transmissão para essa espécie.

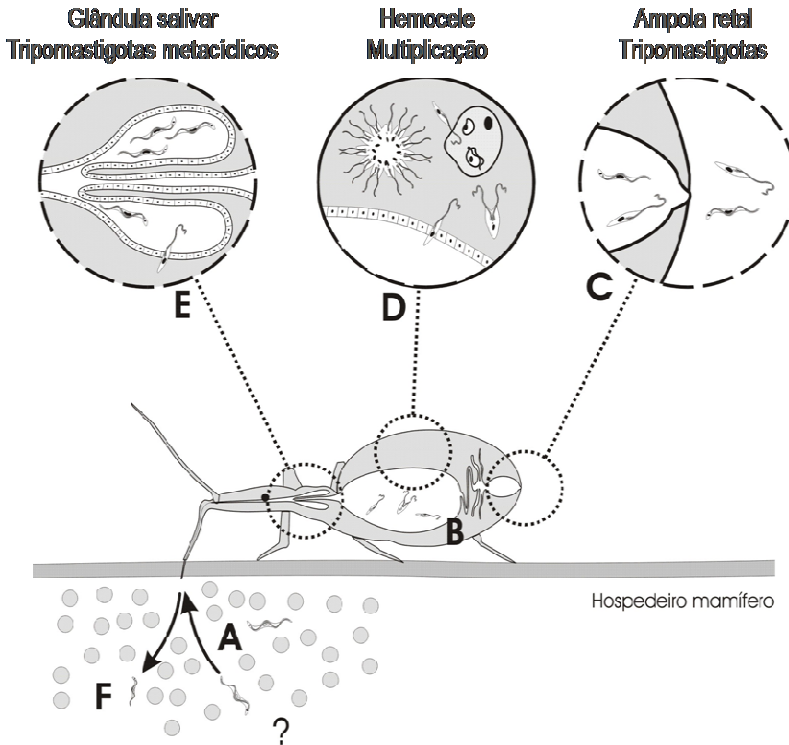


Figura 1. Ciclo biológico do *Trypanosoma rangeli* no hospedeiro invertebrado. (A) Ingestão das formas tripomastigotas durante o repasto sanguíneo do triatômíneo; (B) Formas epimastigotas no trato intestinal do triatômíneo; (C) Parasitos alcançando a ampola retal, onde alguns se diferenciam em tripomastigotas e podem ser excretados junto a fezes e urina; (D) Adesão de epimastigotas ao epitélio intestinal e passagem para a hemocele (em cinza), onde ocorre sua multiplicação; (E) Invasão pelos parasitos das glândulas salivares (em branco) e diferenciação para formas infectantes (tripomastigotas metacíclicos), as quais são inoculadas com a saliva durante o repasto sanguíneo (F). Fonte: GRISARD; STEINDEL, 2005.

Pouco ainda se sabe sobre o curso da infecção deste parasito no hospedeiro mamífero, sendo que vários estudos demonstram que a taxa de infecção de diferentes cepas desta espécie em linhagens celulares distintas (fagocíticas e não fagocíticas) é sempre muito baixa e de curta duração. Os dados a respeito da existência ou não de formas em divisão nos tecidos e no sangue são escassos e controversos (MENESES *et al.*, 2004). Em relação a formas intracelulares, foram realizadas extensivas análises histopatológicas em camundongos infectados com *T. rangeli*, que não apresentaram qualquer indício de multiplicação intracelular (HERBIG-SANDREUTER, 1955). Em outros estudos *in vitro*, observou-se que os parasitos tendem a desaparecer ao longo do tempo de interação, incluindo a evidente desintegração especialmente observada em macrófagos, igualmente sugerindo a ausência de replicação intracelular (OSORIO *et al.*, 1995; TANOURA *et al.*, 1999; EGER-MANGRICH *et al.*, 2001). Contrariamente, De Scorza e colaboradores (1986) e Urdaneta-Morales e Tejero (1986) observaram numerosas formas intracelulares do *T. rangeli* da cepa "Dog82", chamadas de "amastigotas-like", no coração, fígado e baço de camundongos lactantes, sendo estas as únicas descrições de formas intracelulares do parasito observadas *in vivo* - as quais podem ser devidas ao uso de cepas não caracterizadas ou à contaminações laboratoriais com o *T. cruzi*.

Já em relação à replicação no hospedeiro mamífero, a possível multiplicação intracelular, como no *T. cruzi*, se sobrepõe com a proliferação sanguínea extracelular igualmente ao que ocorre no *Trypanosoma brucei*. Existem evidências de que haja um mecanismo de sobrevivência de *T. rangeli* neste hospedeiro. Esta possibilidade é

demonstrada através do isolamento repetido do parasito em animais cronicamente infectados (STEINDEL, 1993), embora este ponto do ciclo ainda permaneça obscuro.

Em relação aos possíveis vetores, *Rhodnius prolixus* além de ser uma espécie chave na manutenção do ciclo de vida de *T. rangeli*, também é considerada de grande relevância na transmissão da doença de Chagas. Essa espécie de triatomíneo pertence a Ordem Hemiptera, família Reduviidae e sub família Triatominae e seu habito hematófago torna-o relevante como vetor na transmissão de parasitos, destacando-se o *T. cruzi* e o *T. rangeli*. No ambiente silvestre, *R. prolixus*, utiliza preferencialmente como fonte alimentar marsupiais e roedores, enquanto no ambiente domiciliar, utiliza principalmente o ser humano, cães e gatos (ALDANA *et al.*, 2006). Esses insetos desenvolvem-se adequadamente em temperaturas em torno de 27 a 30°C e umidade relativa do ar de 75%, com grande resistência ao jejum, e podendo sobreviver em média de um a dois anos (AZAMBUJA *et al.*, 1991). *R. prolixus*, bem como todos os insetos, possuem um sistema eficiente para evitar e eliminar possíveis infecções. Esse sistema está composto por barreiras físicas e químicas além de respostas do sistema imune inato bem desenvolvido (LAVINE; STRAND, 2002). Existem dois mecanismos de defesa para os insetos, i) resposta imune celular, mediadas por hemócitos que são células especializadas presentes na hemolinfa, e ii) resposta imune humoral, relacionada ao plasma, sendo que ambas funcionam conjuntamente para minimizar ou evitar a multiplicação de patógenos (GILLESPIE; KANOST, 1997; FEDER *et al.*, 1997; AZAMBUJA, 1999). As respostas imunes celulares caracterizam-se pela interação direta entre hemócitos e partículas

invasoras, sendo que esta interação pode resultar em fagocitose, microagregação, nodulação e encapsulação (LAVINE; STRAND, 2002). Já a resposta imune humoral está composta, por exemplo, por polipeptídios antibacterianos e sistema de "reconhecimento do não-próprio" (do inglês, *non-self recognition*) que inclui as aglutininas e o sistema proPO (do inglês, *prophenoloxidase*).

O *T. cruzi* e *T. rangeli* relacionam-se de maneira distinta com esses componentes do sistema imune, uma vez que o ciclo de vida neste hospedeiro se dá de maneira muito particular para cada um deles, tanto em período, como localização. *T. cruzi* se desenvolve no tubo digestivo do vetor e acredita-se que a presença de enzimas digestivas e um fator hemolítico geram um ambiente hostil para esse parasito (AZAMBUJA *et al.*, 1983; GARCIA; AZAMBUJA, 1991). Mello e colaboradores, 1995, concluíram que *T. cruzi* não tem habilidade de escapar de reações imunes da hemolinfa, como, por exemplo, o sistema proPO e nodulação. Já o *T. rangeli* desenvolve-se no intestino, invade e sobrevive na hemolinfa do triatomíneo. O parasito é reconhecido pelo sistema imune do inseto, e faz com que os níveis de PO, lisozima, e o número de hemócitos aumentem de maneira significativa na hemolinfa do *R. prolixus* inoculado com *T. rangeli* (TAKLE, 1988). A nodulação também foi um evento observado por Takle (1988), demonstrando que apesar de ser reconhecido e encerrado pelas defesas celulares, o parasito é capaz de sobreviver e utilizar as células envolvidas para sua multiplicação.

Não apenas o *T. cruzi*, mas também o *T. rangeli* está envolvido em infecções de seres humanos em diferentes países da América Latina (GUHL, 2003). Apesar de não patogênica para seus hospedeiros

mamíferos, a infecção pelo *T. rangeli* induz uma resposta imune humoral com elevados títulos de anticorpos, os quais determinam uma reatividade cruzada com antígenos do *T. cruzi* - dificultando o diagnóstico sorológico da doença de Chagas, especialmente em sua fase crônica (SCHOTTELIUS, 1987; GRISARD *et al.*, 1999). Em relação a similaridade antigênica, ao analisar formas epimastigotas de cultura do *T. rangeli*, Afchain e colaboradores (1979) verificaram que este compartilha cerca de 60% de sua constituição antigênica solúvel com o *T. cruzi*, o que corrobora a reatividade sorológica cruzada e os possíveis resultados falso-positivos em diagnósticos sorológicos que incorrem em um elevado custo socioeconômico. Recentemente, estes dados foram confirmados em um estudo que utilizou diferentes cepas e formas do *T. rangeli* e *T. cruzi* com soros de pacientes apresentando distintas formas clínicas da doença de Chagas (MORAES *et al.*, 2008).

Apesar do compartilhamento de antígenos entre *T. cruzi* e *T. rangeli*, algumas características particulares resultam em grandes diferenças entre ambas as espécies, como por exemplo, o estabelecimento da infecção no hospedeiro mamífero. Para o *T. cruzi*, sabe-se que a interação e invasão da célula hospedeira e o escape do vacúolo fagocítico são alguns dos pontos cruciais para a infecção e, por isso, tem sido extensivamente estudados *in vitro*, utilizando diferentes cepas do parasito e linhagens celulares. Já para o *T. rangeli*, os trabalhos existentes mantêm inconclusivas as informações relacionadas ao ciclo de vida em mamíferos, perpetuando-se desta forma uma lacuna de informação sobre um organismo estritamente relacionado ao *T. cruzi*.

1.2 Mecanismo da invasão celular por *Trypanosoma cruzi*

Existem poucas informações sobre mecanismos de invasão e da participação destes no estabelecimento da infecção dos hospedeiros mamíferos pelo *T. rangeli*. Entretanto, muito se sabe acerca dos mecanismos cruciais do *T. cruzi* relacionados ao reconhecimento, adesão, penetração na célula, escape do vacúolo fagocítico e resistência ao sistema imune do hospedeiro. Desta forma, é de extrema importância compreender os mecanismos diferenciais envolvidos durante todo o processo de infecção, uma vez que esses podem ser responsáveis pela diferença existente entre a patogenicidade destes dois parasitos.

O *T. cruzi* é um parasito patogênico e apresenta um tropismo celular e via de sinalização, ativada durante o processo de invasão à célula do hospedeiro mamífero, particulares e relacionados às características de cada cepa (MORTARA *et al.*, 2005; NEIRA *et al.*, 2002). Membros da família da Trans-sialidases (TS), juntamente com outras glicoproteínas de superfície, formam uma população heterogênea de proteínas ancoradas a GPI na superfície de tripomastigotas que desempenham importante papel no início do reconhecimento da célula hospedeira (BURLEIGH; WOOLSEY, 2002). Um arsenal de glicoproteínas, proteases secretadas e agonistas sinalizadores são utilizados pelos tripomastigotas para interagir ativamente com múltiplas vias de sinalização e penetrar em uma grande variedade de células não-fagocíticas (BURLEIGH; WOOLSEY, 2002). Resumidamente, ao entrarem em contato com os receptores de superfície na membrana da célula do hospedeiro vertebrado, os tripomastigotas disparam uma cascata de sinais que leva à liberação de cálcio no meio intracelular

(MORENO *et al.*, 1994; TARDIEUX *et al.*, 1994; CALER *et al.*, 2000; SCHARFSTEIN *et al.*, 2000). Esta alteração no nível de cálcio regula a entrada gradual do parasito na célula por promover um rearranjo de actina (RODRÍGUEZ *et al.*, 1995) além da fusão dos lisossomos com a membrana plasmática, formando um vacúolo derivado da membrana celular da célula hospedeira (RODRÍGUEZ *et al.*, 1997).

Ao contrário de muitos patógenos intracelulares, que evitam a fusão com os lisossomos das células do hospedeiro, a residência no interior do vacúolo parasitóforo é um pré-requisito para a sobrevivência do *T. cruzi* na fase inicial da infecção celular (LEY *et al.*, 1990). A exposição do *T. cruzi* ao ambiente ácido do vacúolo lisossomal é requerido para a atividade das moléculas formadoras de poros secretadas pelo *T. cruzi* denominadas *TcTox*, as quais ajudam no rompimento dessa estrutura (ANDREWS *et al.*, 1989; 1990). Além disso, o pH ácido do interior do vacúolo parasitóforo parece ser importante para a diferenciação da forma tripomastigota do *T. cruzi* em forma amastigota (TOMLINSON *et al.*, 1994). Rubin-de-Celis e colaboradores (2006), evidenciaram que a atividade da TS também está relacionada com o rompimento do vacúolo parasitóforo pelo *T. cruzi*, tendo demonstrado que a super expressão de TS em formas metacíclicas promove um escape prematuro dos parasitos dos vacúolos das células e que isto não é observado em culturas de células deficientes em ácido siálico. Salienta-se, então, que a alteração da atividade da TS do *T. cruzi* incorre em modificação no mecanismo e na eficiência da infecção celular pelo parasito, evidenciando assim o quão crucial é a atividade enzimática TS para o parasito.

1.3 Superfamília das Trans-sialidases

A interiorização do *T. cruzi* nas células hospedeiras e o escape do vacúolo fagocítico envolvem uma série de eventos, incluindo interações de moléculas na superfície do parasito com componentes do hospedeiro através de adesão celular via receptores de membrana e de interações com componentes da matriz extracelular (YOSHIDA, 2006). Dentre estes componentes encontra-se o ácido siálico, sendo o mais comum o ácido N-acetil-neuramínico (Neu5Ac), considerado o precursor dos outros membros da família. Geralmente é encontrado em glicoproteínas e glicolipídeos, formando ligações, α -2,3- e α -2,6- com a galactose e N-acetil-D-galactosamina, através da atividade de sialiltransferases. Estas últimas estão presentes no complexo de Golgi da maioria dos organismos eucariotos e utilizam a citidina monofosfato-Neu5Ac (CMP-Neu5Ac) como substrato doador (SCHENKMAN *et al.*, 1994). Como o ácido siálico confere carga negativa à superfície das moléculas em que está presente, é capaz de alterar drasticamente as propriedades das mesmas e desencadear efeitos biológicos - como nos processos de reconhecimento celular, na meia vida de células e proteínas plasmáticas, na modulação do sistema imune e apoptose (TRIBULATTI *et al.*, 2005). Estes resíduos podem ainda ter um papel importante na interação parasito-hospedeiro, uma vez que são ligantes para moléculas de adesão como selectinas ou sialoadesinas, mediando adesão celular ou transdução de sinais (SCHENKMAN *et al.*, 1994; TRIBULATTI *et al.*, 2005).

Tripanosomas são incapazes de sintetizar o ácido siálico *de novo*, entretanto, alguns tripanosomas africanos e o *T. cruzi* na América, conseguem incorporar o ácido siálico derivado do hospedeiro, através de

proteínas de sua membrana (FRASCH, 2000). O *T. cruzi* expressa na sua superfície uma grande variedade de proteínas e glicoproteínas cujas massas moleculares variam de 70 a 220 kDa, sendo que algumas delas sabidamente estão envolvidas nos processos de adesão e penetração do parasito na célula hospedeira. Estudos cinéticos revelam ainda que o perfil destas moléculas de superfície podem variar de acordo com as formas do ciclo biológico (KATZIN *et al.*, 1983; BARRY *et al.*, 1990; MANQUE *et al.*, 2000), sendo preferencialmente expressos na forma tripomastigota, que é a forma infectante do parasito para o hospedeiro mamífero (YOSHIDA, 1983; COLLI, 1993).

As proteínas mais abundantes na superfície do parasito são os membros das superfamílias das mucinas e das trans-sialidases (TS), cujos genes somados correspondem a cerca de 5% do genoma de *T. cruzi*. As mucinas estão envolvidas na incorporação do ácido siálico proveniente do hospedeiro, que foi transferido anteriormente pela atividade das TS (FRASCH, 2000). A superfamília das TS foi primeiramente subdividida em quatro famílias ou grupos (COLLI, 1993; CROSS *et al.*, 1993; FRASCH, 2000; EL-SAYED *et al.*, 2005), sendo recentemente ampliada para oito grupos (FREITAS *et al.*, 2011). Na grande variedade de genes que codificam para proteínas da superfamília das TS em *T. cruzi*, alguns dos membros codificam um produto enzimaticamente ativo, os quais são agrupados no chamado grupo I que é caracterizado por possuir três domínios principais. O primeiro domínio denominado **SAPA** (Shed Acute Phase Antigen) é formado por repetições de 12 aminoácidos (DSSAHGTPSTPV) e está localizado na extremidade C-terminal, não sendo necessário para a atividade de TS da molécula e em alguns casos não está presente na sequência. Este

domínio é imuno-dominante e está relacionado à modulação negativa da produção prematura de anticorpos contra a região catalítica, resultando assim na manutenção da atividade da proteína (FRASCH, 2000). Os outros dois domínios, denominados **Asp** (*Aspartic*) e **VTV**, estão presentes na porção N-terminal, a qual é responsável pela atividade catalítica. O domínio Asp (SxDxGxTW), no qual x representa um resíduo não conservado, foi primeiramente descrito em neuroaminidases de bactérias e pode ser encontrado completo ou parcialmente conservado (SCHENKMAN *et al.*, 1994). Já o domínio VTV é constituído pelos aminoácidos VTVxNVLYNR e tem homologia com o módulo III da fibronectina (Fn3) (SCHENKMAN *et al.*, 1994). Pode ainda estar presente próximo à porção N-terminal o motivo denominado FRIP, que possui o padrão xRxP (onde x representa qualquer aminoácido), e estando envolvido na ligação dos grupos carboxilados ao ácido siálico. Além do grupo I este motivo aparece nos grupos III, IV, VII e VIII. Na porção C-terminal da proteína pode estar presente ainda a âncora de glicofosfatidilinositol (GPI), que pode ser hidrolisada permitindo a liberação da enzima no espaço extracelular e/ou na circulação sanguínea do hospedeiro (SCHENKMAN *et al.*, 1992). A TS purificada de tripomastigotas comporta-se como uma proteína oligomérica formada por dois ou três polipeptídios heterogêneos com tamanho molecular de 120 a 240 kDa (EICHINGER *et al.*, 1994). Já em formas epimastigotas de cultura essas proteínas contém apenas o domínio catalítico da TS e é um polipeptídio monomérico de 90 kDa e não contém o domínio SAPA (CHAVES *et al.*, 1993).

O grupo II codifica produtos que, mesmo possuindo uma similaridade de até 95% com as TS ativas, são enzimaticamente inativos

e, por exemplo, compreende membros das glicoproteínas de superfície gp85 TSA-1, SA85, gp90, gp82 e ASP-2. Apesar de não possuírem atividade catalítica de transglicosilação, essas proteínas ainda são capazes de ligarem-se ao ácido siálico e a terminais de resíduos de galactose. As proteínas desse grupo estão relacionadas a um papel de ancoragem aos substratos ou à superfícies celulares (FRASCH, 2000), além de desencadear a transdução de sinais celulares, podendo exacerbar as reações imunopatológicas na doença de Chagas (TRIBULATTI *et al.*, 2005). O grupo III, contém centenas de genes e codifica para proteínas que possuem o motivo VTVxNVFLYNR na região C-terminal e ausência do motivo Asp. FL-160 é um representante deste grupo, e como os demais representantes deste grupo, é uma proteína regulatória que está envolvido na inibição da via clássica e alternativa do sistema complemento (FREITAS *et al.*, 2011). O grupo IV é composto por genes que codificam antígenos de superfície de formas tripomastigotas, por exemplo, TsTc13, cujas propriedades biológicas são desconhecidas. Entretanto, apresentam as repetições SAPA características na região C-terminal e o motivo VTVxNVFLYNR que está presente em todos os membros da família TS e que permite incluí-los na superfamília das TS (FRASCH, 2000).

Em 2011, Freitas e colaboradores, após realizarem análises formando clusters de sequências com todos os genes completos das TS, identificaram quatro grupos adicionais, demonstrando que a Superfamília TS é ainda mais complexa e heterogênea do que o inicialmente especulado. Com base nestas observações, atualmente sabe-se que família TS congrega mais de 1.400 genes membros, com 693 pseudogenes (EL-SAYED *et al.*, 2005) e que pode ser dividida em

oito grupos (FREITAS *et al.*, 2011). A nova classificação foi realizada em função de motivos chaves das TS, da localização nos cromossomos, do perfil de expressão e das propriedades antigênicas. Os autores apontam que os grupos V e VI são mais relacionados ao grupo II e os grupos VII e VIII, por sua vez, mais próximos ao grupo III, embora uma análise funcional das proteínas codificadas pelos genes presentes nestes grupos seja essencial para ampliar o escopo de informação a cerca deste tema. Para aumentar ainda mais a complexidade sobre essa família, os genes de TS em *T. cruzi* apresentam-se dispersos pelos cromossomos do parasito (ASLETT *et al.*, 2010), e sua organização estrutural é variável entre os cromossomos e cepas (FREITAS *et al.*, 2011).

Dentre os diferentes grupos da TS, o grupo I é um dos mais estudados e é formado por representantes que catalisam a transferência do ácido siálico dos glicoconjugados da célula hospedeira, preferencialmente os resíduos da posição 2-3 de cadeias polissacarídicas, para um acceptor terminal de galactose, normalmente, mucinas ancoradas na membrana plasmática do parasito (SCHENKMAN *et al.*, 1994) (**Figura 2**). A atividade de TS nos parasitos é única, uma vez que não utiliza ácido-siálico-CMP como doador de monossacarídeo, como ocorre com as neuroaminidases ou sialittransferases presentes no complexo de Golgi dos organismos eucariontes (FRASCH, 2000). Este fato representa uma vantagem para sua utilização como potencial alvo terapêutico e diagnóstico.

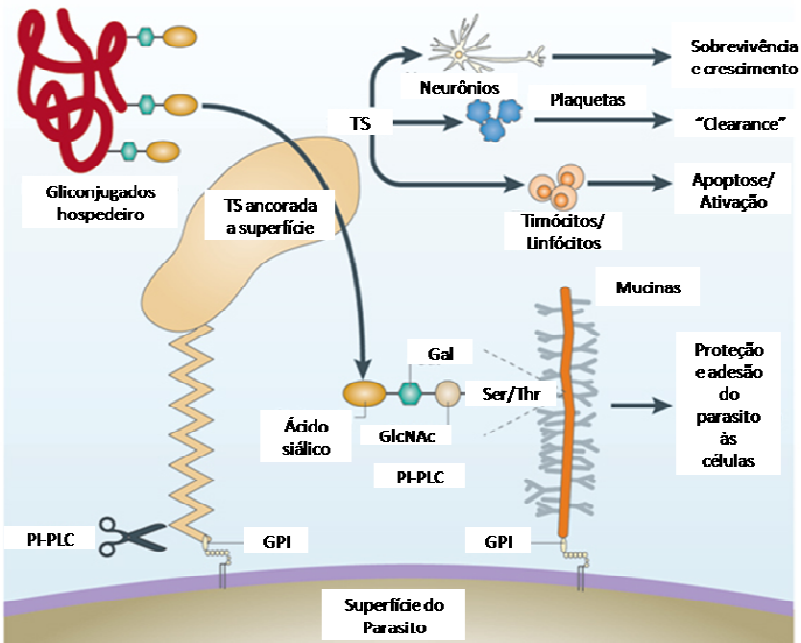


Figura 2. Atividade da trans-sialidase em formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*. O diagrama mostra esquematicamente a sialilação de um *O*-oligossacarídeo de uma mucina ancorada por GPI, mediada por uma TS associada à membrana do parasito. Após a clivagem da âncora de glicosilfosfatidilinositol (GPI) pela ação da fosfatilinositol-fosfolipase C (PI-PLC), a TS é solta na corrente sanguínea e causa vários efeitos biológicos em diversos tipos celulares, provavelmente, alterando o perfil de sialidação em suas superfícies. Gal, galactose; GlcNAc, *N*-acetylglucosamina; Ser/Thr, resíduo de serina ou treonina. Fonte: Adaptado de BUSCAGLIA, 2006.

A participação das TS ativas na interação do *T. cruzi* com a célula hospedeira já foi bastante investigada (MING *et al.*, 1993, SCHENKMAN *et al.*, 1994; 1994a; TOMLINSON *et al.*, 1994),

revelando que a adesão e invasão celular envolvem moléculas da superfície da célula que contém ácido siálico (HALL *et al.*, 1992). Além disso, a transferência destes resíduos para a superfície do parasito protege as formas tripomastigotas da lise mediada pela via alternativa do complemento (TOMLINSON *et al.*, 1994). Mais recentemente foi demonstrado que um aumento de expressão da TS em tripomastigotas de cultura de células favoreceu a liberação mais rápida dessas formas do parasito do vacúolo parasitóforo para o citoplasma da célula hospedeira, pela de-sialilação de sialoglicoproteínas da membrana do fagolisossoma (HALL *et al.*, 1992) e a sua subsequente diferenciação em amastigotas (SCHENKMAN, 2006). Este grupo de proteínas também apresenta relação na diminuição da resposta antígeno-específica dos linfócitos T citotóxicos, através da adição de ácidos siálicos (“*Resialylation*”) na membrana plasmática dessas células (FREIRE-DE-LIMA *et al.*, 2010).

A presença de vários genes que codificam para TS do grupo I foi observada no genoma de *T. rangeli* e de *T. cruzi*, embora a atividade catalítica seja exclusivamente observada em *T. cruzi* (*TcTS*) (PONTES DE CARVALHO, *et al.*, 1993; PARIS *et al.*, 2005). A sialidase encontrada em *T. rangeli* (*TrSial*), possui 70% de identidade com sequência aminoacídica da *TcTS* (BUSCHIAZZO *et al.*, 1993). É uma hidrolase, isto é, possui capacidade de clivagem principalmente de resíduos de ácido siálico, além de possuir dois domínios estruturais que interagem com uma interface hidrofóbica (BUSCHIAZZO *et al.*, 1997). Em sua porção N-terminal possui uma estrutura similar a sialidases virais e bacterianas, contém o sítio catalítico da proteína, enquanto que a porção C-terminal possui uma topologia “*lectina-like*” (PARIS *et al.*, 2005). A partir de estudos comparando a estrutura da *TcTS* com *TrSial*,

somados a trabalhos que realizaram mutações pontuais tanto na proteína de *T. cruzi* (UEMURA *et al.*, 1992; SCHENKMAN *et al.*, 1994) como na de *T. rangeli* (PARIS *et al.*, 2005), Paris e colaboradores (2005) sugerem que alterações nas proximidades do sítio catalítico e na orientação da cadeia lateral de tirosina são importantes fatores para a atividade de transglicosilação, que está presente em *T. cruzi* e totalmente ausente em *T. rangeli*. Buschiazzo e colaboradores, 1997, hipotetizaram que a enzima de *T. cruzi* poderia ser uma proteína derivada do acúmulo de mutações no gene da sialidase de *T. rangeli*, sendo a presença da atividade de TS um dos pontos chave da capacidade do *T. cruzi* em infectar células do hospedeiro mamífero. Uma vez que essa está relacionada a pontos cruciais do ciclo do *T. cruzi*, a ausência de atividade TS em *T. rangeli* poderia explicar sua incapacidade de infectar e sobreviver em células de mamíferos (PONTES DE CARVALHO *et al.*, 1993).

Desta maneira, através da viabilidade de transfectar o *T. rangeli* - um modelo de tripanosoma não patogênico para mamíferos - com o gene que codifica uma TS funcional relacionada à virulência do *T. cruzi* é possível realizar um estudo da TcTS e do seu efeito biológico sob outra óptica. Neste sentido, a possibilidade de utilização do *T. rangeli* expressando moléculas heterólogas relacionadas a fatores de virulência do *T. cruzi* é um modelo para estudos de interação celular de alta relevância. Além disso, o modelo citado permite estudar os processos envolvidos nos diferentes estágios de vida do *T. rangeli* em seus hospedeiros, possibilitando o esclarecimento dos mecanismos envolvidos nas etapas da infecção por este parasito.

Nesse contexto, no presente estudo investigamos a hipótese de que a expressão heteróloga da porção N-terminal de uma trans-sialidase ativa de *T. cruzi* (TcTS) por *T. rangeli* modificaria o fenótipo deste parasito em relação a interação com hospedeiros invertebrados e vertebrados.

2. OBJETIVO GERAL

O objetivo geral do presente estudo foi avaliar o processo de interação parasito-hospedeiro *in vitro* e *in vivo* do *Trypanosoma rangeli* expressando uma trans-sialidase ativa de *Trypanosoma cruzi* (TcTS).

2.1 Objetivos Específicos

- Analisar comparativamente as sequências aminoacídicas de sialidasas de *T. rangeli* e de *T. cruzi*;
- Obter a TcTS recombinante por expressão heteróloga em *Escherichia coli* e produzir antissoro policlonal e anticorpos monoclonais para estudos de citolocalização e *Western blot*;
- Avaliar crescimento e diferenciação *in vitro*, presença de atividade TS e citolocalização da TcTS na cepa de *T. rangeli* transfectada com a trans-sialidase ativa de *T. cruzi* (TcTS);
- Avaliar, comparativamente, a capacidade de infecção e replicação *in vitro* do *T. rangeli* TcTS para a linhagem celular Vero em relação à linhagem selvagem do parasito;
- Avaliar comparativamente a infecção por *T. rangeli* TcTS em triatomíneos e em camundongos BALB/c e C57BL/6 em relação à linhagem selvagem do parasito.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Análise *in silico* das sequências da Sialidase de *Trypanosoma rangeli* comparativamente com a Trans-sialidase de *Trypanosoma cruzi*

As análises das sequências das trans-sialidasas foram realizadas com o apoio do Laboratório de Bioinformática (MIP/CCB/UFSC). Para o alinhamento e análises de identidade e similaridade entre as sequências aminoacídicas de TS de *T. cruzi* (XP_807431.1) e *T. rangeli* (contig_07420) foram realizadas através dos programas *ClustalW* e *EMBOSS pairwise*, sendo a sequência de *T. cruzi* obtida nas bases de dados do GenBank e a de *T. rangeli* em www.rangeli.lncc.br. A sequência de *T. rangeli* utilizada neste estudo foi a única sequência completa entre vários fragmentos gênicos com similaridade com a TcTS encontrados no genoma. A identificação dos domínios conservados (motivos e sítio catalítico) foi realizada utilizando-se o programa *Conserved Domains Search Service* disponível no NCBI (<http://ncbi.nlm.nih.gov/structure/cdd/wrpsb.cgi>). Para um segundo alinhamento, que ilustrava de maneira diferenciada os aminoácidos conservados e não conservados, usou-se o programa *WebLogo* (<http://weblogo.berkeley.edu/>). Realizamos a predição de peptídeo sinal, âncora de GPI e topologia transmembranar para essas sequências de trans-sialidasas de *T. cruzi* e *T. rangeli*. Para a presença de peptídeo sinal usou-se o programa *SignalP 4.0* (<http://www.cbs.dtu.dk/services/signalp/>) e também o programa *Phobius* (<http://phobius.sbc.su.se/>), sendo este último também utilizado para

previsão da topologia transmembranar da proteína. Já a análise da presença de sinal para âncora de GPI, utilizamos o programa *Predgpi* (<http://gpcr.biocomp.unibo.it/predgpi/pred.htm>).

3.2 Parasitos

Neste trabalho a cepa base para as transfecções foi a cepa Choachí de *T. rangeli*. Esta cepa foi originalmente isolada de glândulas salivares de *R. prolixus* naturalmente infectado capturado na Colômbia (SCHOTTELIUS, 1987). Os epimastigotas da cepa Choachí selvagem (não transfectada), bem como da cepa Choachí transfectada com os plasmídeos pTEXeGFP e pTEXeGFP-*TcTS* foram cultivados a 27,5°C em meio LIT (do inglês *Liver Infusion Tryptose*) suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF), 50 U/ml de penicilina e 50 µg/ml de estreptomicina (Cultilab, Campinas) através de repiques semanais.

Formas epimastigotas da cepa Y de *T. cruzi* também foram cultivadas em meio LIT suplementado com 10% de SBF a 27,5°C através de passagens semanais. Para obtenção de tripomastigotas de cultura de *T. cruzi* foram utilizadas células Vero (célula epitelial derivada de rim de macaco verde africano). As células foram cultivadas em meio DMEM, com 5% de SBF a 37°C em 5% de CO₂ através de passagens semanais ou quando atingiram confluência celular. As monocamadas de células foram infectadas com a cepa Y de *T. cruzi* e as formas tripomastigotas foram obtidas do sobrenadante das culturas após 72 h de infecção (EGER-MANGRICH *et al.*, 2001), sendo lavadas em PBS pH 7,4 antes dos ensaios, conforme o descrito acima. Todas as cepas utilizadas no presente estudo estão criopreservadas no laboratório de Protozoologia (MIP/CCB/UFSC).

3.3 Obtenção da cepa *T. rangeli* TcTS

3.3.1 Obtenção do gene da TcTS e ligação no vetor de expressão

O gene da *TcTS* de *T. cruzi* foi amplificado via PCR a partir de um plasmídeo que contém a sua região codificante, o qual foi gentilmente cedido pelo Dr. Kevin M. Tyler da *Biomedical Research Centre* da *University of East Anglia*, Reino Unido (BMRC/UEA, Reino Unido). As amplificações foram realizadas utilizando o par de iniciadores TcTS-F2 5'- GTC GAC ATG GCA CCC GGA TCG AGC CGA GTT GAG -3'/ TcTS-R2nt 5'- GTC GAC TGT CAT TCA CTG CTG CCG CTG CTG CT -3', os quais apresentam sítios para a enzima de restrição *SalI* em suas extremidades 5' (sublinhados), a fim de permitir a subclonagem direta do inserto no plasmídeo pTEXeGFP, com tamanho esperado de 1,9 Kb aproximadamente.

As reações foram padronizadas na presença de uma unidade da enzima *Taq* DNA polimerase no tampão do fabricante (Invitrogen, Carlsbad), 1,5 mM de MgCl₂, 2 mM de dNTP (desoxinucleotídeo trifosfatado) (Invitrogen, Carlsbad), 10 pmol de cada iniciador e 50 ng de DNA molde. A amplificação foi realizada em um termociclador *Mastercycler[®] Gradient* (Eppendorf, Hamburg), iniciando com uma etapa de desnaturação a 94°C por dois minutos, seguida por 35 ciclos contendo uma etapa de desnaturação (94°C por 30 segundos), uma etapa de ligação dos iniciadores (58°C por 45 segundos) e uma etapa de alongação do DNA pela polimerase (72°C por dois minutos). Ao término destes ciclos, as amostras foram submetidas a uma extensão final da cadeia de DNA a 72°C por 5 minutos. O resultado da PCR foi

resolvido através de eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio (1 µg/ml), sendo os resultados registrados digitalmente.

3.3.2 Clonagem dos insertos de interesse

Os produtos de amplificação obtidos foi inicialmente clonados utilizando-se o kit *pGEM-T easy*[®] *Vector* (Promega, Madison) segundo as especificações do fabricante. O produto de ligação foi então utilizado na transformação por eletroporação de células eletrocompetentes *Escherichia coli* DH5- α em aparelho *MicroPulser*[®] (BioRad, Richmond) a 2,5 Kilovolt (KV). A seleção dos clones recombinantes foi baseada na coloração azul/branco das colônias crescidas em meio LB (Luria Bertani) ágar suplementado com ampicilina (100 µg/ml), X-Gal (20 µg/ml) e isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo (IPTG) na concentração final de 40 µg/ml. A seleção dos clones positivos foi realizada através da técnica de “*toothpick*” (SAMBROOK; RUSSELL, 2001). A confirmação de que o inserto se trata do gene da *TcTS* foi feita através de uma PCR diretamente das colônias selecionadas, utilizando os iniciadores TcTS-F2 / TcTS-R2nt nas condições anteriormente descritas.

3.3.3 Extração do DNA plasmidial e digestão com enzimas de restrição

Os clones contendo o gene da *TcTS* foram crescidos a 37°C sob agitação por 15 horas em 5 ml de meio LB contendo ampicilina (100µg/ml). Decorrido o tempo de crescimento, os plasmídeos recombinantes foram extraídos através do procedimento padrão de lise

alcalina (“*mini-prep*”), conforme descrito por Sambrook e Russell (2001).

3.3.4 Subclonagem em vetor de expressão

A expressão heteróloga da *TcTS* por *T. rangeli* foi realizada utilizando como base o plasmídeo pTEXeGFP (KELLY *et al.*, 1992) (Figura 3), o qual foi gentilmente cedido pelo Dr. John Kelly da *London School of Hygiene and Tropical Medicine*, Reino Unido (LSHTM, Reino Unido). Este plasmídeo possui ligado ao sítio múltiplo de clonagem o gene da GFP de *Aequoria victoria*.

Para a inserção do gene da *TcTS* no vetor de expressão, o plasmídeo contendo o gene *TcTS*, assim como o vetor pTEXeGFP, foram submetidos a digestão com 100 unidades das enzimas de restrição *SaI*, em tampão apropriado a 37°C por aproximadamente 16 horas. Concluída a digestão, os produtos foram resolvidos em gel de agarose 1%, sendo as bandas de tamanho adequado excisadas do gel e purificadas utilizando-se o kit *GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification* (GE Healthcare, Buckinghamshire) de acordo com as especificações do fabricante.

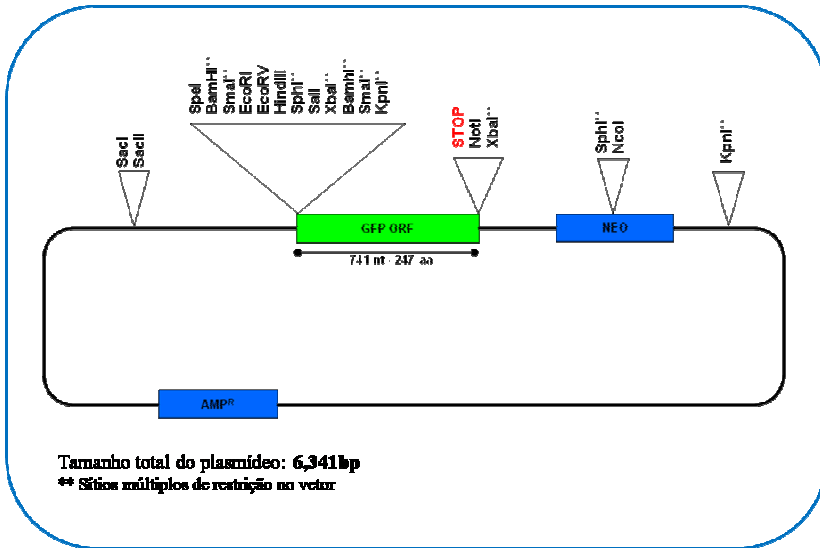


Figura 3. Mapa do plasmídeo pTEXeGFP, indicando os sítios de enzimas de restrição.

A ligação ocorreu na presença de três unidades da enzima T4 DNA ligase (BioLabs, Ipswich) em tampão próprio do fabricante durante 16 horas a 16°C. Os produtos de ligação foram utilizados para transformação de células eletrocompetentes *E. coli* DH5- α , nas mesmas condições descritas no item 3.3.2. Após a seleção dos clones contendo os insertos desejados, através de PCR diretamente das colônias, os clones positivos foram crescidos em meio LB suplementados com ampicilina 100 μ g/ml, durante 16 horas a 37°C também submetidos a extração do DNA plasmidial através de *mini-prep* (SAMBROOK; RUSSELL, 2001).

3.3.5 Sequenciamento e análise da sequência da proteína *TcTS* expressa heterologicamente por *Trypanosoma rangeli TcTS*

O sequenciamento de todos os clones obtidos contendo o gene *TcTS* foi realizado em um equipamento *MegaBace 1000[®] DNA Analysis System* (GE Healthcare, Buckinghamshire), sendo a reação de sequenciamento preparada com o *Kit DYEnamic[®] ET Dye Terminator* (GE Healthcare, Buckinghamshire), de acordo com as instruções do fabricante.

Em suma, as reações foram realizadas na presença de 5 pmol dos iniciadores descritos anteriormente para amplificação do gene *TcTS* e aproximadamente 800 ng de DNA plasmidial, nas seguintes condições térmicas: 95°C por 25 segundos, seguidos de 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 segundos, ligação dos iniciadores a 55°C por 30 segundos e extensão a 60°C por 80 segundos. Posteriormente, os produtos marcados foram precipitados utilizando-se isopropanol 70% e etanol absoluto para retirada dos nucleotídeos e iniciadores não incorporados. Os produtos purificados foram eletroinjetados a 2 KV por 120 segundos e eletroeluídos por 150 minutos a 9 KV.

Primeiramente, as sequências geradas foram analisadas quanto à sua qualidade utilizando-se o pacote *Phred/Phrap/Consed* (<http://www.phrap.org>). Neste pacote cada nucleotídeo sequenciado recebe um valor de qualidade dado pela fórmula $q = -10 \log_{10}(p)$ onde q e p são respectivamente o valor de qualidade e a probabilidade de erro de uma determinada base. As sequências nucleotídicas que não apresentaram um valor mínimo de qualidade ($Phred \geq 20 = <1$ erro a cada 100 bases) foram descartadas e novamente sequenciadas. A

confirmação da identidade dos fragmentos e sua comparação com outros organismos foi realizada através da ferramenta *blastx* (ALTSCHUL *et al.*, 1990) do programa BLAST utilizando-se a base de dados não redundante, disponível no GenBank (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). A partir do programa *Protparam* do pacote ExpASy (*Expert Protein Analysis System*) (<http://expasy.org>), foi possível prever a massa da proteína TcTS, presente no plasmídeo pTEXeGFP-TcTS e expressa pela cepa *Tr_TcTS*. Novamente utilizamos o programa *Conserved Domains Search Service* - NCBI para identificar os domínios conservados presentes na sequência aminoacídica. Essa sequência também foi avaliada para predição de peptídeo sinal, sinal de adição de âncora de GPI e topologia transmembranar. Para a presença de peptídeo sinal usou-se o programa *SignalP 4.0* (<http://www.cbs.dtu.dk/services/signalp/>) e também o programa *Phobius* (<http://phobius.sbc.su.se/>), sendo este último também utilizado para previsão da topologia transmembranar da proteína. Já a análise da presença de sinal para âncora de GPI, utilizamos o programa *Predgpi* (<http://gpcr.biocomp.unibo.it/predgpi/pred.htm>).

3.3.6 Transfecção dos parasito

Os ensaios de transfecção foram realizados utilizando os kits *Basic Parasite Starter Nucleofector* ou o *Human Dendritic Cell Nucleofector* (Lonza, Basel) conforme as instruções do fabricante. Basicamente, 2×10^6 parasitos foram lavados duas vezes em PBS pH 7,4, adicionados de 100 μ l do tampão de eletroporação do kit e 10 μ g do DNA plasmidial. Todo o volume desta suspensão foi transferido para cubetas de eletroporação de 0,4 centímetros (cm) de abertura e

submetido à eletroporação no aparelho *Nucleofector*[®] (Lonza, Basel) em condições elétricas estabelecidas pelos programas U-33 e U-002, para os kits *Basic Parasite Starter Nucleofector* e *Human Dendritic Cell Nucleofector*, respectivamente. Após um único pulso, os parasitos foram transferidos para tubos contendo 2 ml de meio NNN-LIT. Após 48 horas a 27°C, as culturas foram acrescidas de G-418 (Geneticin) (Sigma-Aldrich, Saint Louis) em uma concentração inicial de 25 µg/ml. Os parasitos foram então mantidos em fase exponencial de crescimento a 27°C através de repiques semanais em meio LIT suplementado com 10% SBF e crescentes concentrações de G418 (50, 100, 200, 300, 500 e 1.000 µg/ml).

Após a transfecção dos parasitos, a técnica de PCR foi mais uma vez utilizada, sendo que, neste caso, o intuito era de evidenciar a eficiência da técnica de transfecção realizada. Desta forma, o DNA total extraído dos parasitos transfectados e selvagens foram utilizados como moldes para amplificar os genes da *TcTS* de *T. cruzi* através de PCR. Para tal, foram usados dois pares diferentes de iniciadores, incluindo os já descritos acima, além de iniciadores desenhados a partir de regiões do plasmídeo pTEXeGFP: pTEX-F 5'-CCC ACA ATT GTC AAC CTC CCC TTC-3'/ GFP-R 5'-CAG CTT GCC GGT GGT TGC-3'. Estes iniciados foram usados nas reações de PCR contendo: 50 ng do DNA total de *T. rangeli* ou *T. cruzi*, 10 pmol de cada um dos dois iniciadores, 200 µM de dNTP, 1 unidade de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen, Carlsbad) em seu tampão apropriado, nas mesmas condições anteriores de temperatura, e todos os produtos de PCR obtidos foram visualizados em géis de agarose corados pelo brometo de etídio (1 µg/ml) e registrados digitalmente.

De agora em diante a cepa transfectada com o plasmídeo pTEXeGFP, foi denominada *Tr_GFP*, e a cepa transfectada com o plasmídeo pTEXeGFP-*TcTS*, foi denominada *Tr_TcTS*. As cepas de *T. rangeli* e de *T. cruzi* selvagens serão denominadas *Tr_WT* e *Tc*, respectivamente.

3.3.7 Detecção dos produtos de expressão plasmidial por *Western blot*

Com o intuito de confirmar e avaliar o nível de expressão da proteína heteróloga em *T. rangeli* foram realizados ensaios de western blot com anticorpos específicos (tabela 1). Aos extratos proteicos foi adicionado tampão de amostra (20% glicerol, 0,5% azul de bromofenol, 0,5 M Tris-HCl pH 6,8, 4,4% SDS e 2% β -mercaptoetanol), sendo então aquecidas a 95°C por 5 min e submetidas à separação eletroforética em gel SDS-PAGE (do inglês *Sodium Dodecyl Sulfate – Polyacrylamide Gel Electrophoresis*) 12%, a 100 volts (V). As proteínas foram então transferidas para membranas de nitrocelulose *Hybond-ECL*[®] (GE Healthcare, Buckinghamshire) durante 3 h a 100 V, com modificações da técnica descrita por Towbin e colaboradores (1979). Após confirmação da transferência das proteínas pela coloração com Ponceau 1%, as membranas foram bloqueadas com leite desnatado 5% diluído em tampão de transferência (25 mM Tris-HCl, pH 7,4; 150 mM NaCl e 0,1% Tween 20) durante 1 h a temperatura ambiente. As membranas foram mantidas em solução de leite desnatado a 2% em tampão de transferência contendo o anticorpo primário por 90 min sob agitação branda a temperatura ambiente. O anticorpo secundário (1:10.000) anti-

IgG conjugado à peroxidase (Sigma-Aldrich, Saint Louis) foi mantido por 1 h a TA. Entre cada etapa as membranas foram lavadas por 5 min, cinco vezes cada, com tampão de transferências sob agitação branda.

A revelação das membranas em filmes radiográficos foi realizada através do reagente *Pierce® ECL Western Blotting Substrate* (Pierce Biotechnology, Rockford), utilizando o processador SRX-101A (Konica Minolta Medical & Graphic, INC - China).

Tabela 1. Descrição dos anticorpos utilizados nos ensaios de imunofluorescência indireta e *Western blot*, considerando sua origem, tamanho das proteínas reconhecidas e diluições utilizadas nas diferentes metodologias.

Anticorpo	Tipo	Tamanho	Diluição <i>Western blot</i>	Diluição RIFI
<i>TcTS</i> sítio catalítico <i>T. cruzi</i>	Policlonal IgG coelho	100-200kDa	1:500	1:500
<i>TcTS</i> SAPA <i>T. cruzi</i>	Antissoro IgG camundongo	100-200kDa	1:750	1:100
GFP <i>A. Victoria</i>	Monoclonal IgG camundongo	26 kDa	1:200	1:50
TAT-1 Alfa Tubulina <i>T. brucei</i>	Monoclonal IgG camundongo	55 kDa	1:10.000	----

3.4 Características da cepa *T. rangeli* TcTS

3.4.1 Fluorescência Direta

Inicialmente a detecção dos produtos de expressão plasmidial foi realizada nos parasitos transfectados através da observação direta da fluorescência da GFP em um microscópio de imunofluorescência Olympus – Bx40–FL (Olympus, Tóquio), sendo as imagens digitalizadas.

3.4.2 Citolocalização da proteína TcTS expressa heterologicamente por *T. rangeli*

3.4.2.1 Ensaios de imunofluorescência indireta (RIFI)

Para os ensaios de RIFI foram utilizadas formas epimastigotas de *T. rangeli* da cepa Choachí selvagem e transfectada, assim como formas epimastigotas e tripomastigotas de *T. cruzi*. Os parasitos foram coletados após centrifugação a 3.000 x g (10 minutos) e duas lavagens com PBS pH 7,4, tendo sua concentração ajustada para 1×10^6 células/ml. Dessa suspensão, 50 µl foram depositados sobre uma lamínula circular (diâmetro de 13 mm) em placa de poliestireno de 24 cavidades. Foram utilizados 20 minutos para a adesão dos parasitos, seguidos da fixação com paraformaldeído a 4% diluído em PBS pH 7,4 durante cinco minutos. As lamínulas foram, então, submetidas a três lavagens de cinco minutos cada em PBS pH 7,4, sob leve agitação, sendo que as etapas subsequentes foram também intercaladas com lavagens nessas condições. A permeabilização dos parasitos, quando necessária, foi realizada com o detergente Nonidet 40 (NP-40) a 0,5%

durante cinco minutos. O bloqueio de sítios de ligação inespecíficos foi feito durante 1 hora à temperatura ambiente com solução de leite desnatado a 5% diluído em PBS pH 7,4. Os diferentes anticorpos primários, anti-*TcTS* sítio catalítico e anti-*TcTS* SAPA, gentilmente cedidos pelo Dr. Sérgio Schenkman da Universidade Federal de São Paulo, anti-GFP (Santa Cruz, Biothecnology) e anti-TAT-1-Tubulina foram diluídos em solução de leite desnatado em PBS pH 7,4 a 2%, sendo então mantidos sobre a lamínula durante 90 minutos a temperatura ambiente. Após novas lavagens, os anticorpos secundários anti-IgG de camundongo ou anti-IgG de coelho, ambos conjugados a Alexa-fluor 488 ou Alexa-fluor 594 (Molecular Probes, Carlsbad) foram diluído (1:10.000) em solução de leite desnatado em PBS pH 7,4 a 2%, e mantidos sobre as lamínulas por 15 minutos protegido da luz. As lamínulas foram coradas com 1 µg/ml de 4',6-diamidino-2-fenilindole (DAPI) por cinco minutos, lavadas novamente e montadas com o reagente *Hydromount* (National Diagnostics, Atlanta) em lâminas de vidro. As análises foram realizadas em microscópio óptico de fluorescência Olympus – Bx40–FL (Olympus, Tóquio) e digitalmente registradas.

3.4.2.2 Obtenção de proteínas associadas à membrana plasmática dos parasitos

Para a obtenção de uma fração enriquecida de proteínas associadas à membrana plasmática dos parasitos foi utilizado o protocolo descrito por Ko e colaboradores (2011) (Figura 4). Inicialmente, as formas epimastigotas e tripomastigotas das cepas *Tc*, *Tr*_WT e *Tr*_TcTS foram coletadas por centrifugação a 14.000 x g e ao

sedimento foi adicionado 1 ml de tampão de lise (150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCL pH 7,4, 1% Triton X-114, 1 mM coquetel de inibidor de proteases), permanecendo por 1 h em gelo, com agitações a cada 10 min. Em seguida, as amostras foram submetidas a centrifugação por 8.800 x g por 10 min, a 0°C, sendo o sobrenadante retirado e armazenado a -20°C por 24 h (S1). Aos precipitados foi adicionado 1 ml do tampão A (150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCL pH 7,4, 0,06% Triton X-114, 1 mM coquetel de inibidor de proteases), sendo mantidos em gelo por 10 min e centrifugados a 8.800 x g por 10 min a 0°C. Os sobrenadantes foram coletados (SBA) e armazenados a -80°C, e os sedimentos (P1) adicionados de 500 µl de tampão SDS (2 mM SDS, 22% glicerol, 100 mM Tris-HCL pH 7,4, 1 mM coquetel de inibidor de proteases). Após 24 h a fração S1 foi descongelada a temperatura ambiente (TA) e mantida a 37°C durante 12 min, seguida de centrifugação a 3.000 x g por 3 min a TA. O sobrenadante denominado S2, que possui uma fase rica em detergente, foi coletado e adicionado de 3X o seu volume de tampão A. Este foi mantido em gelo por 10 min, e em seguida a 37°C por mais 10 min, e centrifugado a 3.000 x g por 3 min a TA, resultando em um novo sobrenadante, denominado S3. À fase rica em detergente, foi adicionado 3X o volume de tampão A, mantido em gelo por 10 min e em seguida centrifugado a 18.000 x g por 10 min a 0°C, gerando o sobrenadante S4 e o precipitado P2. Este último foi solubilizado com tampão SDS e o S4 foi transferido para outro tubo para uma nova extração. Acrescentou-se ao S4, 3 X o volume do tampão A, e seguiu-se 10 min em gelo, 37°C durante 10 min e uma centrifugação a 3.000 x g por 3 min a TA, gerando o sobrenadante S5 e uma fase rica em proteínas de membrana. Esta fase foi precipitada com 3 volumes de

acetona gelada à -80°C por 30 min e as proteínas recuperadas por centrifugação à $18.000 \times g$ em 0°C por 15min, onde o sobrenadante foi descartado e o precipitado seco em TA por 10 min e congelado à -80°C até o momento do uso para *Western blot*.

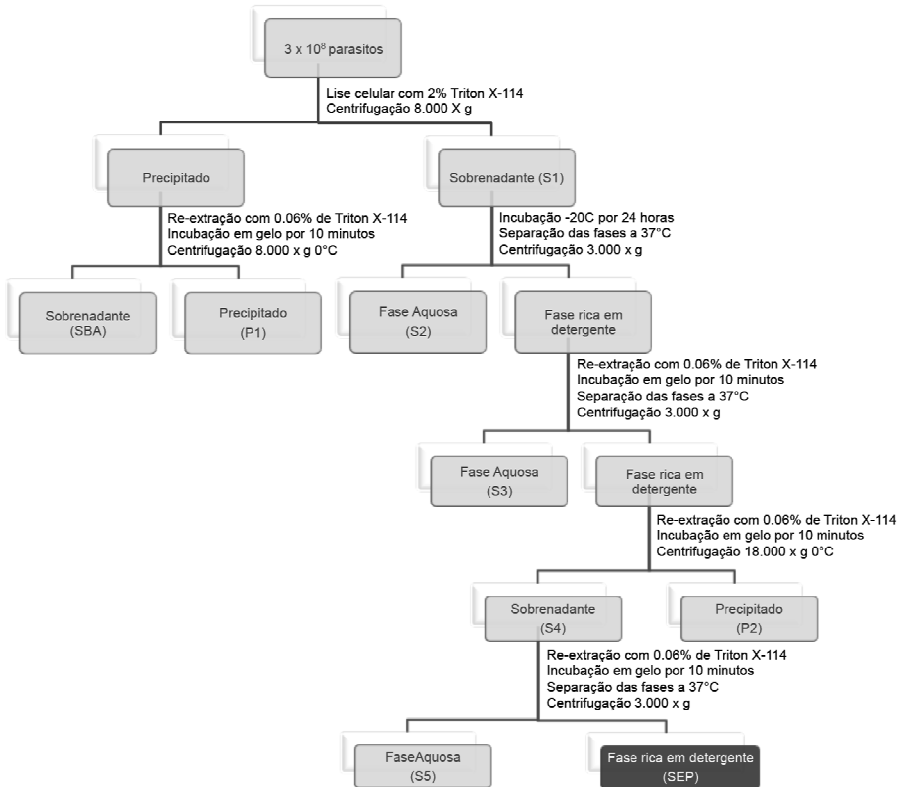


Figura 4. Esquema da metodologia de extração de proteínas do *Trypanosoma rangeli* solúveis ao detergente Triton X-114. Fonte: Elaborado com base em Ko e Thompson (1995).

3.4.2.3 Avaliação da expressão das proteínas TcTS na membrana dos parasitos por *Western blot*

Após a obtenção da fração rica em proteínas de membrana (SEP), os extratos foram quantificados pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976), sendo um total de 6 µg de proteína utilizado em SDS-PAGE 10% e posteriormente transferido para membrana de nitrocelulose. O procedimento de western blot foi realizado conforme descrito no item 3.3.7 utilizando como anticorpo primário o anti-TcTS sítio catalítico.

3.4.3 Ensaio de atividade funcional de Trans-Sialidase (TS)

A avaliação funcional das TS foi realizada conforme o proposto por Schrader *et al.* (2003). Para tal, foram utilizados, epimastigotas e tripomastigotas das cepas *Tc*, *Tr_WT*, *Tr_GFP*, *Tr_TcTS* e o extrato purificado da proteína TS inativa (*TcTS2VØ*). O ensaio foi realizado em triplicata com um volume final de reação de 25 µl contendo extrato proteico total de $1,2 \times 10^8$ parasitos em de tampão de lise (50 mM NaCl, 200 mM Tris HCl pH8,0 e 1% de NP-40) suplementado com 1 µg/µl de um coquetel de inibidores de proteases, 100 mM PIPES (Piperazina-1,4-bis (ácido 2-etanosulfônico)/NaOH (pH 7,0), 0,55 mM 3'-Sialilactose (3'-SL) como doador de ácido siálico (Sigma- Aldrich) e 0,5 mM MUGal (Sigma-Aldrich) como acceptor de ácido siálico, sendo mantidos por 45 min a 20°C. A reação foi interrompida através da transferência de todo o volume de reação para um microtubo contendo 1 ml de água ultrapura gelada. Durante a incubação eram preparadas as colunas de separação com 900 µl da resina *Q-Sepharose Fast Flow* (GE Healthcare, Buckinghamshire), sendo estas lavadas inicialmente com água ultrapura. A reação foi adicionada no centro da coluna equilibrada e mantida a

temperatura ambiente por 1 min. Em seguida, o excesso de MUGal da coluna retirado através de três lavagens com 1 ml de água ultrapura e uma lavagem final com 75 µl de 1M HCl. O produto ligado a coluna, substrato com ácido siálico incorporado, foi eluído com 450 µl de 1M HCl, e este foi mantido por 45 min a 95°C. Após este período as amostras foram neutralizadas pela adição de 150 µl de 2 M NaOH e 300 µl 1M glicina/NaOH pH 10,0 e misturadas vigorosamente. A reação foi transferida para uma placa de 24 poços e a fluorescência avaliada a 365nm (excitação) e 450nm (emissão) em aparelho *Infinite 200 PRO Multimode Reader* (Tecan[®]), sendo os resultados expressos em valores relativos de fluorescência.

3.4.4 Avaliação comparativa das curvas de crescimento entre as linhagens transfectadas e controles.

Com o objetivo de realizar uma avaliação comparativa do crescimento *in vitro* das cepas transfectadas em relação à cepa selvagem dos parasitos, formas epimastigotas de culturas em fase exponencial de crescimento foram ajustadas para uma concentração de 2×10^6 parasitos em 3 ml meio LIT e contados diariamente em câmara de Neubauer durante 22 dias. O experimento foi realizado em triplicata.

3.4.5 Avaliação comparativa da porcentagem de diferenciação *in vitro* do *T. rangeli*

Tripomastigotas de cultura de *T. rangeli* foram obtidos no oitavo dia de cultivo em meio DMEM (do inglês *Dulbecco's Modified Eagle Medium*) pH 8,0 (Sigma Aldrich, Saint Louis) a partir de modificações da técnica descrita por Koerich *et al.* (2002). Inicialmente, 12×10^7

epimastigotas em fase exponencial de crescimento, em meio LIT, foram lavados duas vezes com PBS 1X (Tampão salina fosfato) pH 7,4 e transferidos para garrafas de cultura celular de 25 cm² com 15 ml de meio DMEM pH 8,0 contendo 1 g/l glicose e suplementado com 6 mM L-glutamina e 5% SBF. O processo de diferenciação foi acompanhado através da quantificação dos parasitos por contagem direta em câmara de Neubauer e da determinação da porcentagem de formas tripomastigotas em microscópio óptico após a coloração dos parasitos com Giemsa (Merck, Darmstadt).

3.5 Obtenção de soro policlonal dirigido à *TcTS2VØ*

3.5.1 Subclonagem, expressão heteróloga e purificação da proteína *TcTS2VØ*

Por razões técnicas, várias tentativas falharam no intuito de expressar a *TcTS* ativa em bactéria para suprir a necessidade inicial de produção de anticorpos mais específicos contra a TS de *T. cruzi*. Por este motivo, questionou-se a possibilidade de utilizar a forma inativa da proteína, *TcTS2VØ*. Para tanto, o alinhamento e as análises de identidade e similaridade entre as sequências aminoácídicas da TS ativa (*TcTS*) e inativa (*TcTS2VØ*) foram realizadas conforme o descrito no item 3.3.5.

O plasmídeo pTrcHis-*TcTS2VØ* contendo o gene para a porção N-terminal de uma trans-sialidase inativa de *T. cruzi* (*TcTS2VØ*), também cedido pelo Dr. Kevin M. Tyler (BMRC/UEA), foi utilizado para transformar células *E. coli* cálcio-competentes TOP10F'. Para tanto, as células que estavam a -80°C foram descongeladas em banho de

gelo por cerca de 10 min, sendo acrescentado 2 μ l do plasmídeo pTrcHis-TcTS2VØ. Esta mistura foi mantida por 30 min em banho de gelo. Após esse tempo, o tubo foi aquecido a 42°C por 45 seg e, imediatamente, ao final deste procedimento, transferido para banho de gelo por mais 2 min. Foi acrescentado então, 350 μ l de meio SOC (Tryptona 20 g/l, extrato de levedura 5 g/l, NaCl 0,5 g/l, KCl 0,186, Mg⁺² 2M, glicose 2M) para crescimento por 1 h em estufa a 37°C sob agitação. Terminado o período de crescimento, a suspensão foi plaqueada em meio LB ágar (100 μ g/ml ampicilina) e mantida a 37°C por 18 h.

Primeiramente, para a expressão da proteína recombinante, uma colônia foi selecionada e cultivada em 10 ml de meio LB (100 μ g/ml ampicilina) por 15 h a 37°C sob agitação. Deste pré-inóculo, 3 ml foram adicionados a frascos contendo 30 ml do mesmo meio e o crescimento ocorreu a 37°C sob agitação, até que fosse atingida densidade óptica (D.O._{600nm}) de 0,6 através de leitura em espectrofotômetro *BioPhotometer*[®] (Eppendorf, Hamburg). Neste momento, 3 ml das culturas foram separados previamente à indução para servirem como controle não induzido, e aos 30 ml restantes acrescentou-se IPTG para uma concentração final de 1 mM. Para padronização do crescimento ótimo das bactérias associado à expressão da TcTS2VØ, as culturas induzidas foram em duas diferentes temperaturas (27°C e 37°C) por 4 h sob agitação. Após este período, as culturas foram coletadas por centrifugação a 4.000 x g por 10 min e os extratos proteicos bacterianos foram avaliados em gel SDS-PAGE 12%. O gel foi corado com azul de Coomassie R-250 0,25% por 4 h e por comparação da intensidade da banda de tamanho esperado no gel foi determinada a melhor temperatura

de crescimento. Uma vez definida a temperatura de 27°C para o crescimento bacteriano e indução da expressão heteróloga, passamos a verificar a solubilidade da proteína de interesse. Para tanto, ao sedimento bacteriano obtido por centrifugação a 10.000 x g por 10 min foi adicionado 300 µl de Tris-HCl pH 7,4 na concentração final de 20 mM e submetido à sonicação a 8-9 Joules por cinco ciclos de 30 seg no equipamento *60 Sonic Dismembrator* (Fisher Scientific, Pittsburgh), em banho de gelo. Após a sonicação, a amostra foi centrifugada a 4°C por 20 min a 12.000 x g. O sobrenadante, contendo a fração solúvel do lisado bacteriano, foi separado e ao precipitado, contendo a fração insolúvel, foi adicionado 50 µl de SDS 10%. As amostras proteicas de ambas as frações (solúvel e insolúvel) e o extrato proteico de bactérias não induzidas (controle) foram resolvidas em SDS-PAGE 12% e transferidas para membranas de nitrocelulose. O ensaio de *Western blot* foi realizado conforme o descrito no 3.3.7 utilizando o anticorpo monoclonal anti-His*Tag[®] (Sigma-Aldrich, Saint Louis) produzido em camundongo, específico para a cauda de poli-histidina, diluído 1:10.000.

Determinadas as melhores condições para a expressão e tendo obtido a proteína recombinante somente na fração insolúvel, a expressão da proteína heteróloga foi realizada em 500 ml de cultura, e, após o período de indução com IPTG, as bactérias foram coletadas por centrifugação a 4.000 x g por 10 min a 4°C e conservadas a -20°C até o momento da purificação.

A purificação da proteína recombinante *TcTS2VØ* da fração insolúvel de extratos de *E. coli* foi realizada através de cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados (LUCAST *et al.*, 2001; ESHAGHI *et al.*, 2005). Para isso, o sedimento do extrato proteico foi

submetido à lise através da adição de 12 ml de tampão B em condições desnaturantes (10 mM Tris-HCl pH 8,0; 100 mM NaH₂PO₄, 8 M Uréia ajustado para pH 8,0) e sonicado a 8-9 Joules por cinco ciclos de 30 seg, no equipamento *60 Sonic Dismembrator* (Fisher Scientific, Pittsburgh), em banho de gelo. A seguir, a amostra foi mantida sob agitação a 60°C por 1 h. O material lisado foi centrifugado a 4°C por 30 min a 12.000 x g e o sobrenadante foi coletado. Este sobrenadante foi adicionado a uma coluna contendo 800 µl da resina Ni-NTA agarose (Qiagen, Duesseldorf) pré-tratada com o tampão B por 1 h sob agitação orbital (100 rpm) e refrigeração de 4-8°C. As lavagens da coluna e eluição da proteína foram realizadas utilizando-se o tampão de eluição (100 mM NaH₂PO₄, 8 M Uréia, 10 mM Tris- HCl) em diferentes pH (lavagens em pH 6,3 e eluição em pH 4,5). A coluna foi lavada 3 vezes com 10 ml do tampão de eluição pH 6,3 e a proteína liberada em cinco etapas de adição de 600 µl do tampão de eluição pH 4,5. Para a renaturação da proteína após a purificação, as eluições foram dialisadas duas vezes a 4°C em tampão de diálise (100 mM Tris-HCl; pH 8,5; 500 mM NaCl; 0,5 mM EDTA, 20% glicerol; 5 mM DTT) e por último dialisadas mais duas vezes no mesmo tampão contendo glicerol 40%. Os extratos proteicos bacterianos, assim como as proteínas purificadas e cada uma das etapas de purificação foram avaliadas em géis SDS-PAGE 12% e coloração por azul de Coomassie R-250, sendo os resultados digitalmente registrados utilizando o *Perfection 4990 Scanner*[®] (Epson, Suwa).

Após a diálise, procedeu-se a quantificação da concentração proteica das amostras através por espectrofotometria (BioPhotometer – Eppendorf[®]) utilizando o método de Bradford (1976).

3.5.2 Imunização dos camundongos e obtenção do antissoro

Para a produção do soro policlonal anti-*TcTS2VØ* três camundongos foram imunizados com uma dose de aproximadamente 50 µg da proteína *TcTS2VØ* recombinante purificada. Foram realizadas três inoculações, com intervalo de 10 dias, sendo todas elas por via subcutânea. As imunizações utilizaram *Alu-Gel S* (Hidróxido de Alumínio 1,3 %) (Serva, Heidelberg) como adjuvante. No dia da realização da quarta imunização, os camundongos foram sangrados através secção da ponta da cauda, quando cerca de 20 µl de sangue foi obtido por animal, mantido por 30 min sob refrigeração de 4-8°C e centrifugado a 3.000 x *g* por 10 min para separação do soro, e armazenado, quando necessário, a -80°C.

Os soros obtidos foram então testados em ensaios de *Western blot* para verificar a especificidade frente a diferentes extratos proteicos de formas epimastigotas e tripomastigotas de *Tc*, *Tr_WT*, *Tr_GFP* e *Tr_TcTS*. Após 10 dias, os três camundongos foram submetidos a um novo reforço via subcutânea utilizando 50 µg de proteína e o adjuvante *Alu-Gel S*. Quinze dias após a última imunização, os camundongos foram anestesiados com cloridrato de cetamina (Dopalen[®]) e cloridrato de xilazina (Rompum[®]) e sangrados através de punção cardíaca, quando que cerca de 1 ml de sangue foi obtido e processado para separação do soro, como descrito anteriormente. Os soros dos dois camundongos que apresentaram melhor resposta nos ensaios de *Western blot* foram então testados em diversas diluições por ensaio imuno absorvente de ligação de enzimas – ELISA (ENGVALL; PEARLMANN, 1972) para verificar os títulos de anticorpos contra a proteína *TcTS2VØ* recombinante. O camundongo que apresentou o soro com a resposta mais específica e de

maior título contra a proteína *TcTS2VØ* foi selecionado para a produção de anticorpos monoclonais. O novo soro policlonal foi denominado Anti-*TcTS* e foi utilizado no *Western blot* do ensaio de atividade.

3.5.3 Avaliação e titulação dos soros dos camundongos por ELISA

A avaliação dos soros dos camundongos foi feita por ELISA direto frente a proteína purificada. Para tal, microplacas descartáveis de poliestireno com 96 cavidades foram sensibilizadas com 50 ng da proteína purificada diluída em solução tamponada carbonato-bicarbonato 0,5 M, pH 9,6; durante 3 h a 37°C. As placas foram lavadas três vezes pela adição de 200 µl de PBS-T (PBS 1X; 0,05% Tween20) e, em seguida, seus sítios livres foram bloqueados durante 16 h a 4°C com 300 µl de PBS-T acrescido de 3% de soro albumina bovina (BSA) (Sigma-Aldrich, Saint Louis). Após três lavagens com PBS-T, o soro dos camundongos foram adicionados à placa nas diluições de 1:50 até 1:3.200 em PBS-T/ 3% BSA e mantidos por 1 h a 37°C. Como controle negativo utilizou-se a solução de PBS-T/ 3% e soro pré-imune. Após a lavagem da placa com PBS-T, foi adicionado a cada poço 200 µl do anticorpo secundário conjugado polivalente (Anti-IgG murino conjugado à peroxidase) (Sigma-Aldrich, Saint Louis) diluído 1:7.500 em PBS-T/ 3% BSA e mantido por 1 h a 37°C.

A revelação ocorreu através da adição de 100 µl de solução substrato-cromógeno orto-fenilenodiamino (0,4% OPD em 100 mM de solução tampão citrato-fosfato pH 5,0 e 0,03% H₂O₂), e após 5 min a reação foi interrompida pela adição de 50 µl de H₂SO₄ 2,5 M. A leitura da densidade óptica foi realizada a 492 nm em leitor de microplacas

(Tecan[®]), e o limite de reatividade adotado foi correspondente a uma absorbância três vezes maior que a média do controle negativo.

3.5.4 Obtenção das células esplênicas para produção dos anticorpos monoclonais

O camundongo cujo soro revelou a detecção específica e de melhor título de anticorpos para a proteína *TcTS2VØ* foi sacrificado por deslocamento cervical, embebido em álcool 70% e teve o baço retirado e macerado em meio RPMI-1640 em ambiente estéril. O material resultante da maceração, excluindo-se as cápsulas de tecido conjuntivo do órgão, foi separado em tubo plástico de 50 ml e mantido em gelo por 10 min. O sobrenadante foi coletado e centrifugado duas vezes a 400 x g por 10 min em TA. Ao sedimento celular foram adicionados 5 ml de solução de lise de eritrócitos (168 mM cloreto de amônio, 10 mM bicarbonato de potássio, 0,1 mM EDTA, pH 7,4) durante 5 min. Após este período, foram adicionados 45 ml de meio RPMI-1640, para posterior centrifugação nas mesmas condições acima. Após o descarte do sobrenadante, foi adicionado 10 ml de meio de cultura para posterior quantificação dos esplenócitos em câmara de Neubauer, numa diluição 1:2 em azul de tripan a 0,1%.

3.5.5 Células de Mieloma (plasmocitomas) para produção dos anticorpos monoclonais

Os plasmocitomas não secretores da linhagem P3X63-Ag8.653 (KEARNEY *et al.*, 1978) provenientes de linfoma de camundongos, foram descongelados do criobanco do laboratório de Protozoologia e transferidos para um tubo cônico contendo 15 ml de meio RPMI-1640

acrescido de 10% de SBF (Cultilab, Campinas), uma semana antes da fusão celular. As células foram centrifugadas a 800 x g durante 5 min a temperatura ambiente e, em seguida, transferidas para uma garrafa de 25 cm² a 37°C em estufa de CO₂ a 5% até o crescimento e a transferência para garrafas de 75 cm². No dia da fusão, as células foram centrifugadas três vezes a 400 x g por 5 min a temperatura ambiente, sendo a cada centrifugação adicionado novo meio RPMI-1640 ao sedimento. Após a última centrifugação, 10 ml de meio RPMI-1640 suplementado com antibióticos (0,1% gentamicina e 1% PSA (penicilina, estreptomicina e ampicilina-Antibiotic-Antimycotic 100X, Gibco®) foi adicionado e as células quantificadas em câmara de Neubauer utilizando uma diluição 1:2 em azul de tripan a 0,1%.

3.5.6 Obtenção dos hibridomas para produção dos anticorpos monoclonais

Os mielomas e os esplenócitos dos camundongos foram misturados na proporção de 1:5 e lavados duas vezes, sendo centrifugados a 400 x g por 5 min a temperatura ambiente, com meio RPMI-1640 (1% PSA; 0,1% gentamicina) e o sobrenadante retirado. Sobre as células foi então adicionado 1 ml de polietilenoglicol (PEG - Hybrid Max®, Sigma) 50%, vagarosamente, sob leve agitação por 2 min. Em seguida, foram realizados dois passos sucessivos de adição de 1 ml de meio RPMI-1640 lentamente por 1 min sob leve agitação e mais 7 ml durante 2 min, sendo as células posteriormente centrifugadas por 5 min a 400 x g. Ao sedimento novamente foi adicionado meio RPMI-1640 (1% PSA, 0,1% gentamicina, 20% SBF), sendo o volume ajustado a fim de se obter uma solução final de aproximadamente 2 x 10⁶ células/ml.

Por fim, a suspensão celular foi semeada em placa de cultura de 96 cavidades (100 µl/orifício) e mantidas a 37°C em estufa de CO₂ a 5%. Após 24 h foi adicionado a cada orifício 100 µl de meio RPMI-HAT (Hipoxantina, aminopterin e timidina) (Sigma-Aldrich, Saint Louis) acrescido de 20% de SBF. Subsequentemente, foi realizada a manutenção diária das culturas, descartando-se 100 µl/orifício e adicionando a mesma quantidade de meio RPMI-HAT (20% SBF). Após 15 dias, o HAT foi substituído por hipoxantina e timidina (HT) (Sigma-Aldrich, Saint Louis) no meio de cultivo e no 20º dia foi utilizado somente o meio RPMI (20% SBF). Quando as células ocuparam 2/3 da cavidade da placa foram realizados os procedimentos de detecção de anticorpos no sobrenadante das culturas.

3.5.7 Triagem, expansão clonal e criopreservação dos hibridomas produtores de anticorpos monoclonais anti- *TcTS2VØ*

A fim de selecionar os hibridomas produtores de anticorpos dirigidos a proteína recombinante *TcTS2VØ*, foi utilizado o ensaio de ELISA. O protocolo foi o mesmo utilizado para a titulação dos soros dos camundongos (item 3.4.3), porém, neste caso, 100 µl do sobrenadante da cultura dos hibridomas foi utilizado como anticorpo primário na reação. Além disso, o controle positivo utilizado foi soro dos camundongos imunizados com a proteína recombinante *TcTS2VØ* diluído 1.000 vezes. As culturas de hibridomas que revelaram ser produtoras de anticorpos anti- *TcTS2VØ* foram transferidas para garrafas de cultura de 25cm² para expansão das culturas. Após a obtenção de massa celular, os hibridomas positivos foram criopreservados em nitrogênio líquido. Para tanto, a suspensão de

células em garrafas de cultura foi centrifugada a 400 x g por 10 min a 4°C e ao sedimento celular foi adicionado meio de congelamento contendo 49% de meio RPMI, 40% de SBF, 10% de DMSO (Sigma) e 1% de PSA. A seguir, 2×10^6 células foram distribuídas em cada criotubo e estes foram mantidos por 24 h a -80°C, seguido de transferência para nitrogênio líquido (OI; HERZENBERG, 1980). Os hibridomas estão criopreservados para futura diluição limitante e estabelecimento da linhagem monoclonal, bem como isotipagem dos anticorpos.

3.6 Interação entre Parasito-*Rhodnius prolixus*

3.6.1 Avaliação da mortalidade de *Rhodnius prolixus* por inoculação de G-418

Grupos de 30 ninfas de 4^o e 5^o estádios de *R. prolixus* foram inoculadas por via intracelômica com cerca de 10 µl de uma suspensão de PBS estéril contendo 100 µg/ml ou 500 µg/ml de G-418. G-418 ou, comercialmente, chamado de Geneticin[®] (Invitrogen) é um aminoglicosídeo relacionado análogo da neomicina, utilizado como agente seletor para células eucariotas e procariotas. Este agente é produzido pela bactéria *Micromonospora rhodorangea* e seu mecanismo de ação está focado na inibição da síntese de proteínas. Como análogo da neomicina sulfato ele liga-se ao ribossomo 80S ou 30S interferindo no funcionamento destas estruturas em células eucarióticas e procarióticas, respectivamente (JIMENEZ; DAVIES, 1980; COLBBRE-GARAPIN *et al.*, 1981; SOUTHERN; BERG, 1982). A resistência a esse agente seletor é conferida pelos genes *APH (3') - I* e *APH (3') - II*, encontrados em *E. coli* e que são adicionados a vetores que podem ser

usados na transfecção de células (BECK *et al.*, 1982). Segundo informações da bula do reagente, uma cultura celular de mamífero estável e selecionada para este marcador (neo) é alcançada entre 10 a 14 dias em doses de 200 – 500 µg/ml.

Um grupo inoculado somente com PBS estéril foi utilizado como controle. A mortalidade dos insetos foi acompanhada a cada dois dias e os dados foram analisados usando o teste log-rank que faz a comparação das taxas cumulativas de sobrevivência para cada grupo.

3.6.2 Inoculação de *Trypanosoma rangeli* na hemolinfa de *Rhodnius prolixus*

Grupos de 60 ninfas de 4^o e 5^o estádios de *R. prolixus* foram infectados por inoculação intracelômica com formas epimastigotas de cultura de *Tr*_WT, *Tr*_GFP e *Tr*_TcTS. Os triatomíneos foram inoculados com 10 µl de uma suspensão contendo uma concentração aproximada de 1×10^6 parasitos/ml. Todas as culturas de parasitos foram lavadas previamente com PBS para retirada do G-418. A avaliação comparativa da infecção dos triatomíneos foi realizada semanalmente através da observação direta da hemolinfa e das glândulas salivares de cinco animais por grupo. Os insetos de cada grupo experimental foram sacrificados pela retirada da cabeça e tiveram suas glândulas salivares dissecadas e hemolinfa coletada para a preparação de lâminas coradas com Giemsa, visando a observação da morfologia dos parasitos. Amostras de hemolinfa também foram coletadas para realização de PCR e *Western blot*.

Dois grupos adicionais contendo 25 ninfas de 4^o e 5^o estádios de *R. prolixus* foram infectadas por inoculação intracelômica com formas

epimastigotas de cultura de *Tr_WT* e *Tr_TcTS*, recém isoladas por hemocultura de camundongos BALB/c. Os triatomíneos foram inoculados seguindo o mesmo protocolo anterior, e ao final da sexta semana, todos os insetos de ambos os grupos foram sacrificados e tiveram suas glândulas salivares dissecadas e examinadas para o estabelecimento da porcentagem de pares de glândulas infectadas. Para as análises estatísticas foi utilizado o teste exato de Fisher através do programa GraphPad Prism 5.01 e considerou-se $p < 0,05$.

3.6.3 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Amostras de hemolinfa de insetos experimentalmente infectados com as cepas *Tr_WT*; *Tr_TcTS*; *Tr_GFP* e de insetos não infectados, bem como formas epimastigotas de cultura (*Tr_WT*, *Tr_TcTS*, *Tr_GFP*) foram coletadas. Cerca de 15 μ l, de hemolinfa e da cultura de cada cepa, foram coletados em tubo contendo 150 μ l de tampão PBS estéril e tratados com 1 μ l de proteinase K (20 μ g/ μ l) para depois serem centrifugados a 8.000 x *g* por 10 min. O sobrenadante foi descartado e ao precipitado foi adicionado 10 μ l de H₂O ultra-pura, sendo as amostras aquecidas a 95°C por 5 min. Novamente, o tubo foi centrifugado a 8.000 x *g* por 10 min e utilizou-se 1 μ l do sobrenadante para as reações de PCR. Como controle positivo da PCR foi utilizado o plasmídeo pTEXeGFP-*TcTS*. As amplificações do gene da *TcTS* foram realizadas via PCR utilizando as condições descritas em 3.3.1.

3.6.4 Avaliação da expressão da proteína *TcTS* por *T. rangeli* presente na hemolinfa de *R. prolixus* por *Western blot*

Para os ensaios de *Western blot* as amostras de hemolinfa de insetos infectados (*Tr_WT*; *Tr_TcTS*; *Tr_GFP*) e não infectados (grupos de três animais) foram lavadas duas vezes com 200 μ l de tampão PBS através de centrifugação a 8.000 x *g* por 10 min. Também foram utilizados como controle extratos proteicos de cultura de formas epimastigotas de *Tr_WT*, *Tr_GFP* e *Tr_TcTS*. Todas as amostras foram preparadas com tampão de amostra (20% glicerol, 0,5% azul de bromofenol, 0,5 M Tris-HCl pH 6,8, 4,4% SDS e 2% β -mercaptoetanol) e fervidas a 95°C por 5 min. Géis foram preparados em triplicata, sendo o primeiro processado para *Western blot* conforme o item 3.3.7 com os anticorpos anti-*TcTS* sítio catalítico e anti-GFP e o segundo foi corado com azul de Coomassie R-250 e sua imagem digitalizada em equipamento *Perfection 4990 Scanner*[®] (Epson, Suwa).

Adicionalmente, a detecção da expressão da proteína GFP nos parasitos transfectados foi realizada através da observação direta da fluorescência da GFP em um microscópio de imunofluorescência Olympus – Bx40-FL (Olympus, Tóquio), sendo as imagens digitalizadas.

3.6.5 Alimentação Artificial de *R. prolixus*

Com o intuito de realizar o ciclo completo do *T. rangeli* em *R. prolixus* optou-se pela realização do experimento de alimentação artificial utilizando formas tripomastigotas diferenciadas *in vitro* das cepas *Tr_WT*, *Tr_GFP* e *Tr_TcTS* e ninfas de 4^o e 5^o estágio de *R.*

prolixus. Cerca de 5 ml de sangue humano desfibrinado e inativado foram misturados a 3 ml de cultura contendo, aproximadamente, 10^8 parasitos. Essa suspensão foi colocada nos alimentadores artificiais e a alimentação realizada conforme o descrito por Garcia e colaboradores (1989). Durante todo o experimento foi mantida a temperatura constante dos alimentadores em 37°C por meio da passagem de água aquecida, sendo o conteúdo dos alimentadores homogeneizado a cada 30 min para evitar sedimentação dos parasitos. Ao término de 2 h os alimentadores foram retirados e as ninfas armazenadas em estufa com temperatura $27,0 \pm 2^\circ\text{C}$, sendo alimentadas diretamente sobre camundongos sadios uma semana depois da alimentação artificial infectiva. A hemolinfa de cinco ninfas de cada grupo foi avaliada por microscopia ótica a cada 15 dias a partir do primeiro mês da alimentação.

3.7 Ensaios de infecção *in vitro* do *T. rangeli* TcTS com células Vero

Nos ensaios de interação celular com o *T. rangeli* utilizou-se a linhagem celular Vero, célula epitelial derivada de rins de macacos, como descrito no item 3.1.2. Os ensaios cinéticos de interação de formas tripomastigotas da cepa *Tr_TcTS*, utilizou como controles tripomastigotas das cepas *Tr_WT*, *Tr_GFP* e *Tc*, e foram conduzidos conforme o descrito por Croxford e colaboradores (2005) com pequenas modificações. Em suma, à monocamadas celulares não confluentes da linhagem celular Vero com, aproximadamente, $3,5 \times 10^4$ células, cultivadas sobre lamínulas de vidro, foram adicionadas formas tripomastigotas das duas espécies em um MOI (razão parasito:célula) de 30 sendo mantidos a 37°C , 5% CO_2 por 3 h. Transcorrido este tempo de

interação, as células foram lavadas duas vezes com PBS estéril para remoção dos parasitos não aderentes e novamente mantidas, em meio DMEM nas mesmas condições anteriores até o momento de serem processadas, seguindo os períodos fixados para este experimento. Os tempos escolhidos foram o tempo zero (T0) (após as 3 h de interação), quatro (T4), dezesseis (T16) e cento e vinte horas (T120). Decorrido os tempos de interação, duas das lamínulas de cada tempo do experimento foram coradas pelo método de Giemsa e as outras duas submetidas a imunofluorescência indireta, conforme descrito a seguir no item 3.6.1. Para a determinação do número de parasitos aderidos e internalizados foram contadas 200 células por lamínula, de maneira aleatória para cada um dos tempos e cepa utilizada. A análise estatística foi através de Anova de duas vias, seguido pelo pós-teste de Bonferroni, considerando diferenças estatisticamente significativas se $p < 0,05$.

3.7.1 Reação de imunofluorescência indireta (RIFI) para ensaio de interação *in vitro* com células Vero

Após o período de interação, as lamínulas foram submetidas aos procedimentos já descritos no item 3.4.2.1. Neste caso, utilizou-se o anticorpo primário anti-TAT-1-Tubulina

3.8 Ensaios *in vivo* da infecção do *T. rangeli* TcTS em camundongos

3.8.1 Parasitemia em camundongos BALB/c

Tripomastigotas diferenciados *in vitro* foram usados na inoculação de camundongos para obtenção de tripomastigotas sanguíneos que foram utilizados na avaliação da parasitemia das

diferentes cepas de *Tr*_WT, *Tr*_GFP e *Tr*_TcTS, e como controle positivo interno do experimento foi usada a cepa *Tc* advinda de infecção de cultura célula Vero (item 3.2). Para este ensaio, grupos de três camundongos BALB/c de quatro a seis semanas de vida foram infectados pela inoculação intraperitoneal de $2,1 \times 10^5$ tripomastigotas sanguíneos, sendo a curva de parasitemia determinada pelo método de Brener (1962). O acompanhamento da infecção foi realizado diariamente por exame à fresco do sangue obtido por secção da ponta da cauda de cada camundongo entre lâmina/lâminula (22x22 mm), até que a parasitemia não fosse mais detectável. O soro de um camundongo de cada grupo foi coletado, através de punção cardíaca, e posteriormente será utilizado para ensaios de *Western blot*. Os demais camundongos foram utilizados para a realização do ensaio desafio piloto conforme consta no item 3.8.3.

3.8.2 Parasitemia em camundongos C57BL/6

Para este ensaio, grupos de seis camundongos C57BL/6 (número determinado pela equação de diferença entre duas médias - Figura 5) de quatro a seis semanas de vida foram infectados pela inoculação intraperitoneal de 5×10^7 tripomastigotas de *Tr*_WT, *Tr*_GFP e *Tr*_TcTS, diferenciadas *in vitro*, e como controle positivo interno do experimento foi usada a cepa *Tc* obtida da mesma maneira descrita no item 3.1.2, sendo a curva de parasitemia e o acompanhamento da infecção realizados conforme o descrito para camundongos BALB/c. O soro de um camundongo de cada grupo foi coletado através de punção cardíaca, sendo também coletado o coração, baço, fígado, músculo esquelético, rim, glândulas supra renais, linfonodos mesentéricos e cérebro para

posterior utilização em ensaios de detecção por PCR, de histopatologia e de imuno-histoquímica. Dos camundongos restantes, quatro foram utilizados para a realização do ensaio desafio conforme consta no item 3.8.3.

Diferença entre duas médias

$$N = \frac{Z(z\alpha + z\beta)^2 \sigma^2}{\Delta^2}$$

- Δ = tamanho do efeito ou a diferença entre duas médias
- σ = desvio padrão (σ^2 = variância)
- $z\alpha = 1.96$ quando $\alpha = 0.05$
- $z\beta = 0.84$ quando $\beta = 0.20$ que significa um poder = 80%

Este é o tamanho da amostra para cada grupo

Figura 5. Equação da diferença entre duas médias para cálculo de amostra.

3.8.3 Influência da expressão da *TcTS* pelo *T. rangeli* no desenvolvimento do parasito *in vivo* e na proteção cruzada com o *T. cruzi*

Após 70 dias da infecção em camundongos BALB/c, por *T. rangeli* e *T. cruzi* é classificada como crônica e um ensaio piloto de desafio com a infecção por *T. cruzi* foi realizado. Para tanto, cada animal foi infectado com 10^3 tripomastigotas de cultura da cepa *Tc*, sendo a curva de parasitemia novamente determinada seguindo o método de Brener (1962). Os camundongos foram sacrificados após 35 dias da inoculação através de deslocamento cervical, e seus órgãos (coração, baço, fígado e músculo esquelético) foram coletados e armazenados para exames histopatológicos futuros. O soro dos

camundongos também foi coletado, através de punção cardíaca, e posteriormente será utilizado em ensaios de *Western blot* e ELISA. Os resultados foram analisados através da comparação entre o número de parasitos no pico da parasitemia, sendo este a média dos dois animais de cada grupo. Estes resultados foram então submetidos ao teste estatístico *oneway* Anova, e ao pós-teste Bonferroni, considerando estatisticamente significativas as diferenças com $p < 0,05$.

Um segundo experimento visou a análise da indução de proteção cruzada da infecção prévia por *T. rangeli* expressando a TS de *T. cruzi* (*Tr_TcTS*) contra a infecção por *T. cruzi* em animais C57BL/6. Após 70 dias da infecção, camundongos C57BL/6 na fase crônica da infecção por *T. cruzi* (*Tc*) ou por *T. rangeli* (*Tr_WT*, *Tr_GFP*, *Tr_TcTS*), assim como animais controle não infectados (Naïve_*Tc*), foram desafiados pela inoculação de 10^5 tripomastigotas sanguíneos da cepa *Tc*, sendo a curva de parasitemia determinada seguindo o método de Brener (1962). Os camundongos foram sacrificados após 30 dias da infecção-desafio através de deslocamento cervical, e seus órgãos (coração, baço, fígado, músculo esquelético, rim, supra-renal, tecido adiposo e linfonodo mesentérico) foram coletados e armazenados para exames histopatológicos e imuno-histoquímicos futuros. O soro dos camundongos também foi coletado, através de punção cardíaca, e posteriormente será utilizado em ensaios de *Western blot* e ELISA. A análise do resultado foi realizada por observação das curvas de parasitemia dos animais.

3.9 Aspectos éticos no uso de animais e geração e manipulação de OGM

Foram utilizados camundongos da espécie *Mus musculus*, linhagem BALB/c e C57BL/6, isogênicos, com idade aproximada de 45 dias, provenientes e mantidos no biotério setorial do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia/CCB/UFSC, sob padrão sanitário convencional, com água e alimento *ad libitum*. Os procedimentos de produção de antissoros foram realizados observando-se os Princípios Éticos para o Uso de Animais de Laboratório, estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal – COBEA, tendo sido sendo aprovados pela Comissão de Ética em Uso de Animais da UFSC (Protocolo PP00822 - Ofício 120 / CEUA / PRPE / 2012).

Como houve a geração e manipulação de organismos geneticamente modificados (OGM), neste trabalho é importante salientar que o Laboratório de Protozoologia está inserido no certificado de Qualidade em Biossegurança (CQB 101/99) da UFSC, estando apto a desenvolver estudos que envolvam a geração e a manipulação de OGM em regime de contenção.

4. RESULTADOS

4.1 Análise *in silico* da sequência de Sialidase de *Trypanosoma rangeli*

Recentemente, o genoma do *T. rangeli* foi sequenciado (www.rangeli.incc.br) e, apesar dos dados ainda não estarem publicamente disponíveis, realizamos uma varredura para buscar as sequências identificadas como pertencentes a família das TS para este parasito. Com o objetivo de avaliar a estrutura da sialidase encontrada para *T. rangeli* e reforçar os possíveis motivos para a falta de atividade de transglicosilação para neste organismo, foi selecionado o contig 07420 para a comparação com a TS de *T. cruzi* (XP_807431.1). O contig 07420 apresenta boa qualidade de sequenciamento e foi a única sequência identificada em *T. rangeli* com ORF (*Open Read Frame*) completa. A sequência nucleotídica obtida para o gene da *TrSial* revelou que sua janela aberta de leitura (ORF) possui 2.103pb e codifica para uma proteína de 701 aminoácidos, com massa molecular predita de aproximadamente 77,8 kDa. A sequência de *T. cruzi* foi selecionada por ter sido utilizada como base para outros trabalhos (EL-SAYED *et al.*, 2005; SCHENKMAN *et al.*, 2006; RATIER *et al.*, 2008). Usaremos os termos *TcTS* e *TrSial* para nos referirmos às sequências de sialidases de *T. cruzi* e de *T. rangeli*, respectivamente.

As primeiras comparações foram realizadas com o programa *Predgpi* para avaliação de sinais para a adição de âncora de GPI, e com o programa *SignalP 4.0* para a busca de peptídeo sinal (Apêndice 1). Para ambas as sequências foi encontrada uma alta probabilidade da presença de âncora de GPI, além da existência de um peptídeo sinal, sendo localizado entre os aminoácidos (aa) 1-23 para *TcTS* e 1-25 para

TrSial. A presença do peptídeo sinal mais uma vez foi apontada pelo programa *Probius*, que também trouxe a representação gráfica da distribuição das porções citoplasmática, não-citoplasmática e transmembranar das proteínas (**Figura 6**).

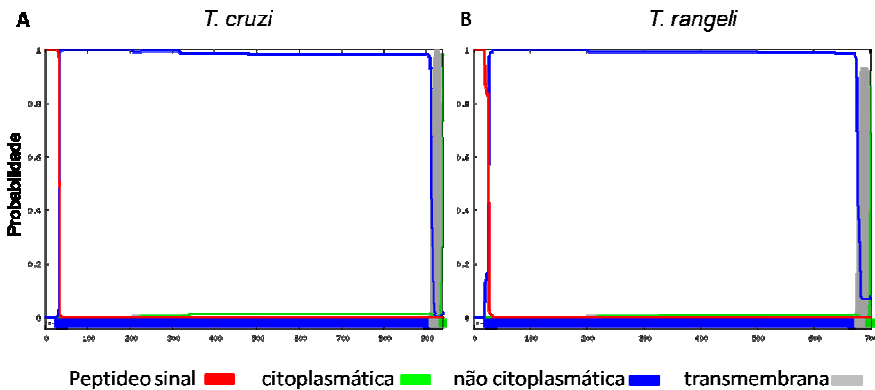


Figura 6. Organização estrutural similar entre a trans-sialidase de *Trypanosoma cruzi* (A) *TcTS* (XP_807431.1) e sialidase de *Trypanosoma rangeli* (B) *TrSial* (contig 07420). Predição, pelo programa *Probius*, da presença e posição de: peptídeo sinal (vermelho); região citoplasmática (verde); não-citoplasmática (azul) e transmembranar (cinza) para a *TcTS* e *TrSial*.

Em ambas as sequências notamos o mesmo padrão de predição (**Figura 6 A e B**), sendo um peptídeo sinal no início da sequência da porção N-terminal, seguido por uma grande parte não-citoplasmática e finalizando por uma parte trans-membrana. Essa distribuição corroborou com a ideia da sialidase ser uma proteína que é direcionada para a membrana desses parasitos, onde posiciona-se na parte externa da célula ancorada por GPI. Notamos que a sequência de *TcTS* possui cerca de 900 kDa, enquanto que a de *TrSial* é menor, com aproximadamente 700

kDa. Essa diferença está primariamente relacionada a ausência da região repetitiva denominada SAPA na proteína de *T. rangeli*. Isso pode ser evidenciado pela análise do alinhamento mostrado posteriormente para ambas as sequências preditas, no qual não foi possível encontrar nenhuma repetição da sequência de 12 aminoácidos na porção C-terminal da proteína *TrSial*. Portanto podemos observar uma organização estrutural similar entre as proteínas. Também apontamos a localização de ambas na superfície dos parasitos. Unicamente por estes resultados não foi possível encontrar uma diferença que justifique a falta de atividade TS da proteína de *T. rangeli*.

Para aprofundar a análise das sequências na busca do possível motivo para a ausência de atividade TS em *T. rangeli* realizamos o alinhamento das mesmas via ClustalW, revelando uma similaridade de 76,3% e identidade de 66,5% (Apêndice 2). Os valores de identidade informam a percentagem de aminoácidos idênticos entre as sequências analisadas, enquanto os valores de similaridade englobam também a percentagem de aminoácidos com propriedades semelhantes. Nesse alinhamento (**Figura 7**) foi possível visualizar para ambas as sequências a localização o peptídeo sinal na região N-terminal, os dois domínios Asp, o domínio VTV e o sinal para adição da âncora GPI. Para a proteína de *T. cruzi* ainda foi possível ressaltar a presença da região SAPA, que não aparece para a proteína predita de *T. rangeli*. Em relação a conservação de aminoácidos, podemos notar que existem alguns blocos conservados, intercalados por regiões não-conservadas. A respeito dos aminoácidos que fazem parte do sítio catalítico na proteína de *T. cruzi*, notamos que todos eles são conservados para a sialidase de *T. rangeli*.

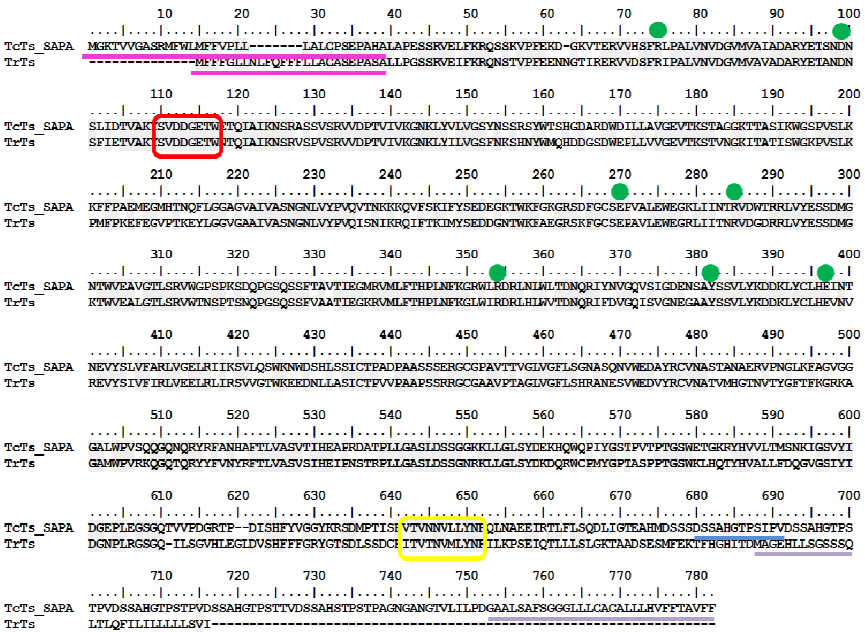


Figura 7. Domínios Asp e VTV, peptídeo sinal e aminoácidos do sítio catalítico são conservados entre a trans-sialidase de *Trypanosoma cruzi* - TcTS_SAPA (XP_807431.1) e sialidase de *Trypanosoma rangeli* – TrSial (contig_07420). Alinhamento das sequências aminoacídicas previstas através do programa ClustalW. Estão representados em cores os aminoácidos correspondentes ao sítio catalítico (*), dois motivos Asp (*), domínio VTV (*), peptídeo sinal (*), âncora GPI (*) e 1 repetição SAPA (*). Os aminoácidos idênticos encontram-se sombreados em cinza.

Com as informações do alinhamento (**Figura 7**), concluímos que a falta da atividade da TrSial não está relacionada a perda de domínios característicos ou substituições pontuais nos aminoácidos do sítio catalítico da enzima.

Com o objetivo de verificar a influência das alterações de aminoácidos ao longo da sequência, na ausência de atividade TS para a proteína de *T. rangeli*, utilizamos o programa *Weblogo*. Nessa representação, além da presença de blocos conservados intercalados por não conservados, foi possível visualizar que nos blocos não conservados existem trocas de aminoácidos, que na maioria das vezes é do tipo não-conservada. Isso quer dizer que os aminoácidos pertencem a classes diferentes em relação a sua carga (**Figura 8**). Com esse resultado, reforçamos que é o conjunto de alterações dos aminoácidos dispersas ao longo de toda a sequência o principal motivo para a ausência de atividade de TS para *TrSial*.

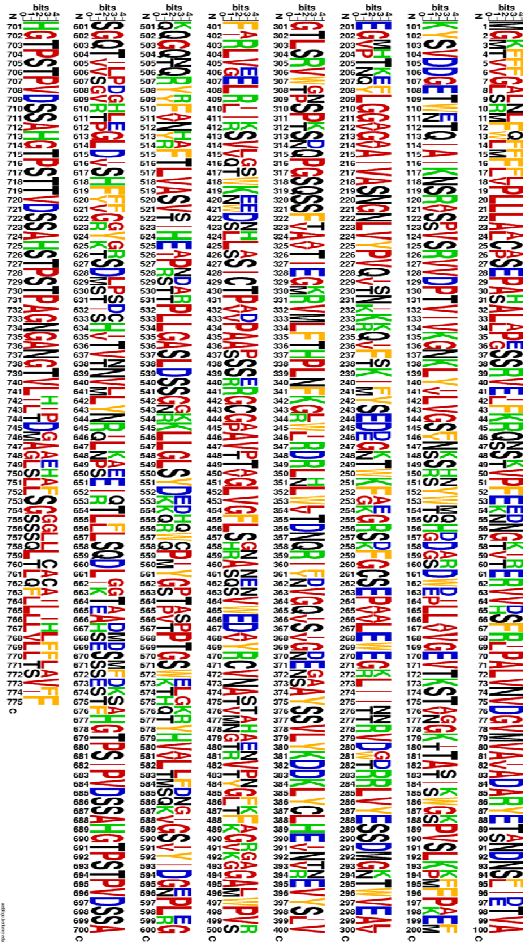


Figura 8. Conjunto de alterações de aminoácidos não-conservado é o motivo para ausência de atividade de transglicosilação da proteína *TrSial*. Figura mostra o alinhamento das seqüências aminoacídicas previstas das trans-sialidases de *Trypanosoma cruzi* (XP_807431.1) e *Trypanosoma rangeli* (contig_07420) através do programa *Weblogo*. Estão representados os aminoácidos em cores correspondentes a sua classificação. Apolares: Alifáticos (AVLIGP - *) e Aromáticos (FWY- *). Polares: Não carregados (STCNQM - *), Positivos (KRH - *) e Negativos (DE - *).

De maneira geral, com as informações obtidas das análises da sequência das proteínas *TcTS* e *TrSial*, podemos concluir que a sequência da sialidase de *T. rangeli*, comparativamente, com *TcTS* de *T. cruzi* possui os domínios característicos da porção N-terminal da proteína, Asp e VTV, o peptídeo sinal e os seis aminoácidos do sítio catalítico conservados. Já para a porção C-terminal, foi predita para ambas as sequências uma âncora GPI, embora o domínio SAPA foi observado apenas para a sequência aminoacídica de *T. cruzi*. Por fim, a falta de atividade TS da sialidase de *T. rangeli* é possivelmente em consequência da série de modificações dispersas na sequência e não devido a perda ou alteração de domínios característicos ou de uma modificação pontual.

4.2 Obtenção da cepa *T. rangeli TcTS*

4.2.1 Construção do plasmídeo, sequenciamento e análise da sequência

Após a reação de PCR (**Figura 9A**), um único produto de aproximadamente 1,9 Kb foi obtido para o gene da *TcTS* e este foi clonado. Decorrido o tempo de crescimento dos clones selecionados, os plasmídeos recombinantes pGEM-*TcTS* foram extraídos. Para a expressão heteróloga da *TcTS* de *T. cruzi* por *T. rangeli*, uma nova construção plasmidial foi gerada a partir da ligação dos produtos da digestão dos plasmídeos pGEM-*TcTS* e pTEXeGFP com a enzima de restrição *SalI* (**Figura 9B**). Após a transformação, oito clones positivos foram obtidos, submetidos à extração de DNA plasmidial (**Figura 9C**) e posteriormente a quantificação do DNA através de espectrofotometria.

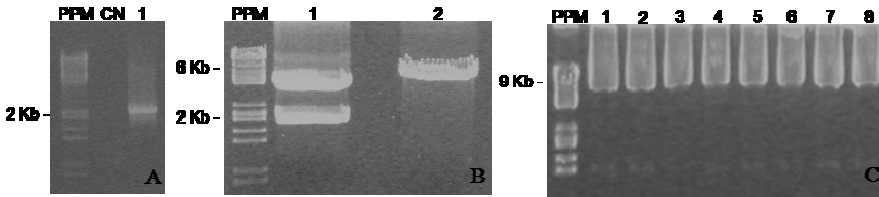


Figura 9. Obtenção do plasmídeo de expressão. Eletroforese em gel de agarose a 1% corado pelo brometo de etídeo revelando (A) o controle negativo da reação (CN) e produto de amplificação de 2 Kb do fragmento do gene *TcTS* de *Trypanosoma cruzi* (1); (B) os produtos de digestão dos plasmídeos pGEM-*TcTS* (1) e pTEXeGFP (2) com a enzima *SalI*; (C) a extração de DNA plasmidial dos clones obtidos correspondentes ao pTEXeGFP-*TcTS* (1-8). PPM- Padrão de Peso Molecular (DNA de Fago lambda digerido com *HindIII*).

Todos os plasmídeos obtidos foram sequenciados e as sequências obtidas foram primeiramente analisadas quanto à sua qualidade utilizando-se o pacote *Phred/Phrap/Consed*. Para todos os plasmídeos obtidos foi possível confirmar a identidade do gene da *TcTS* de *T. cruzi* através do programa BLAST. Entretanto, dentre os diferentes clones sequenciados, somente um apresentava o gene da *TcTS* na fase correta de leitura e esse foi utilizado para as transfecções posteriores, sendo o plasmídeo denominado pTEXeGFP-*TcTS*, contendo os genes que codifica para a proteína *TcTS* e GFP como indicado na **Figura 10**.

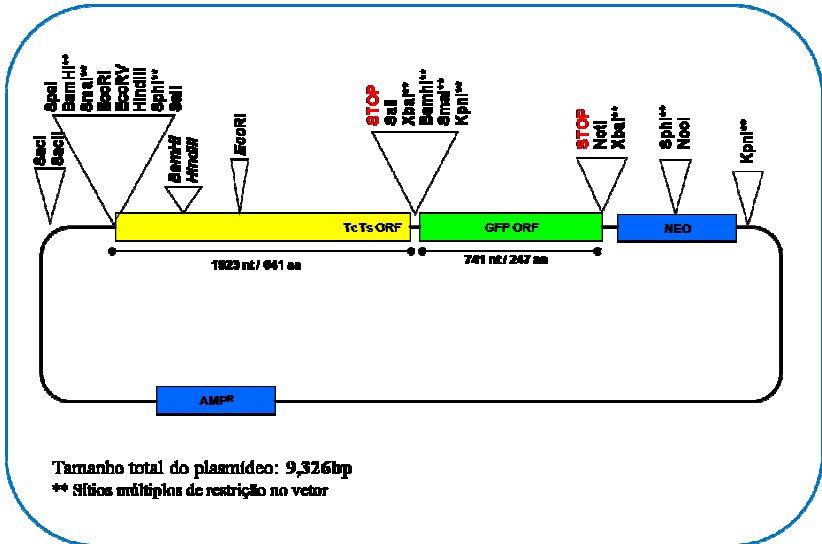


Figura 10. Representação esquemática do plasmídeo pTEX-TcTsGFP indicando as posições dos sítios para enzimas de restrição e as posições dos genes da *TcTS* de *Trypanosoma cruzi* e da GFP.

A partir desta sequência de nucleotídeos também foi realizada a predição da sequência aminoacídica da proteína para análises subsequentes. Inicialmente, os motivos característicos das proteínas pertencentes ao grupo I da superfamília das TS presentes na porção N-terminal para as proteínas de *T. cruzi* foram encontrados na sequência obtida. Dentre estes, estão evidenciados na **Figura 11** o motivo Asp, o motivo VTV, e os sete aminoácidos relacionados ao sítio catalítico. Além disso, através da sequência aminoacídica do gene da *TcTS* de *T. cruzi* foi possível prever que o tamanho esperado da proteína a ser expressa está em torno de 70,4 kDa.

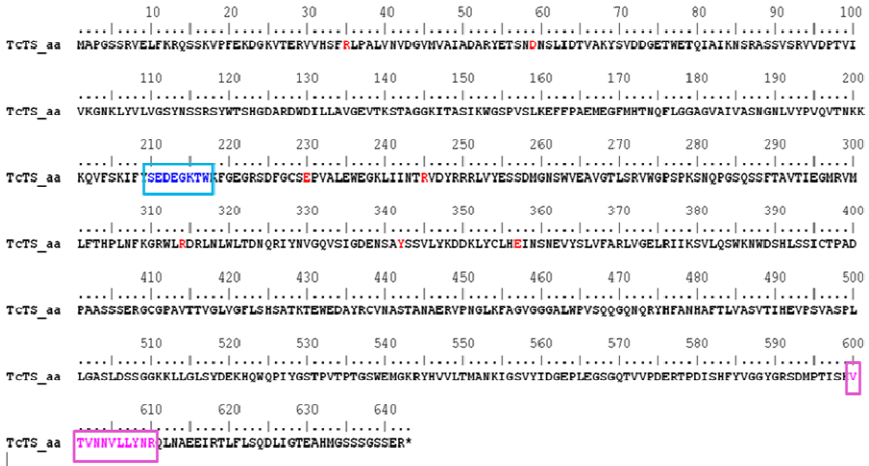


Figura 11. Plasmídeo pTEXeGFP-*TcTS* possui os domínios característicos e os aminoácidos do sítio catalítico. Sequência aminoacídica da *TcTS* de *Trypanosoma cruzi* presente no plasmídeo com diferentes motivos identificados: aminoácidos relacionados ao sítio catalítico (*); domínio Asp (*) e domínio VTV (*).

4.2.2 Transfecção e expressão heteróloga

Após a construção e caracterização do plasmídeo, os ensaios de transfecção dos parasitos foram realizados utilizando dois kits distintos. O primeiro kit utilizado era destinado a transfecção de protozoários parasitos (*Basic Parasite Nucleofector Kit*) e o segundo para a transfecção de células dendríticas humanas (*Human Dendritic Cell Nucleofector Kit*). A transfecção foi realizada de acordo com as instruções do fabricante sendo a seleção iniciada após 24 horas. Transcorridas 24 horas após a primeira dose de G-418 (25 µg/ml) a detecção dos produtos de expressão plasmidial foi realizada em

microscópio de fluorescência, onde parasitos emitindo fluorescência foram observados, evidenciando o sucesso da transfecção e a expressão da GFP pelo parasito (**Figura 12**).

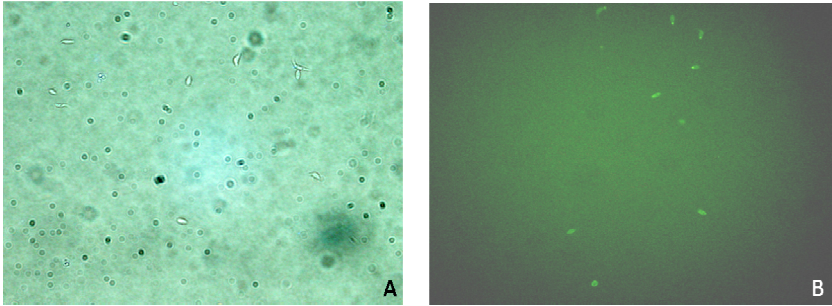


Figura 12. *Trypanosoma rangeli* expressando GFP como indicativo de co-expressão da TcTS de *T. cruzi*. Observação da fluorescência da GFP da cepa Choachi de *T. rangeli* transfectada com o plasmídeo pTEXeGFP-TcTS após 24 horas da adição de 25 μ g/ml de G418. (A) Campo claro; (B) Fluorescência a 490nm. Objetiva de 40.

Para selecionar os parasitos que possuam maior expressão, doses crescentes de G-418 passaram a ser utilizadas, incluindo concentrações de 50; 100; 200; 300; 500 até 1.000 μ g/ml. Os parasitos transfectados através do kit de parasitos, assim como aqueles obtidos pelo kit de células dendríticas apresentaram resultados semelhantes quando consideradas a intensidade da fluorescência direta e a sobrevivência aos acréscimos de G-418. Além disso, a intensidade da fluorescência foi, em ambos os casos, diretamente proporcional a concentração de G-418 utilizada, como pode ser observado comparativamente entre os parasitos mantidos na presença de 300 μ g/ml (**Figura 13A e 13C**) e 1.000 μ g/ml (**Figura 13B e 13D**). A distribuição da fluorescência também foi diferenciada conforme a concentração de G-418, onde uma localização

pontual na extremidade posterior é majoritariamente presente na concentração de 300 $\mu\text{g/ml}$ em comparação a uma localização dispersa na concentração de 1.000 $\mu\text{g/ml}$. Considerando estes resultados, pode-se inferir que a pressão exercida pela presença crescente de G-418 resultou na seleção dos parasitos que possuem maior número de cópias do plasmídeo e/ou que apresentam maior expressão de produtos plasmidiais.

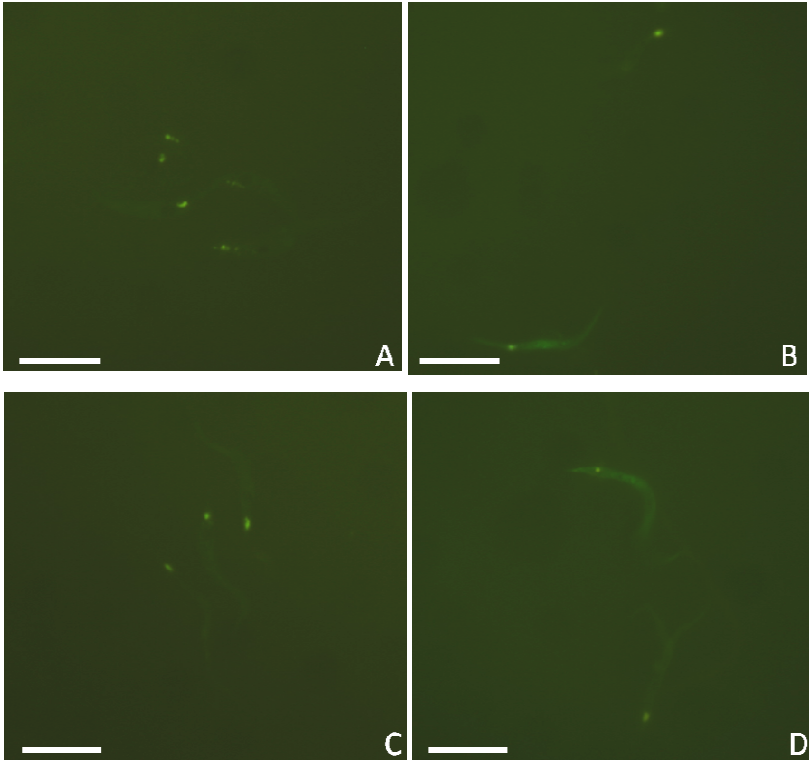


Figura 13. Visualização da expressão de GFP por fluorescência direta no *Trypanosoma rangeli* transfectado com o plasmídeo pTEXeGFP-TcTS : (A) – Kit Parasito: 300 µg/ml; (B) - Kit Parasito:1000 µg/ml; (C) – Kit Célula dendrítica: 300 µg/ml e (D) - Kit Célula dendrítica: 1000 µg/ml. Objetiva de 100. A barra representa a escala de 10 µm.

Na transfecção foram utilizados dois *kits* diferentes, o primeiro (*Amaxa Basic Protocol for Parasitic Protozoa*, Lonza) é recomendado para protozoários parasitos (*Plasmodium berghei*, *Plasmodium yoelii*, *T. brucei*, *Toxoplasma gondii*, *Eimeria tenella*, *Leishmania* sp. e *Perkinsus marinus*), sendo que o protocolo faz uma ressalva na qual coloca que o

resultado pode variar muito de acordo com a espécie e a forma evolutiva utilizada na transfecção. O segundo é específico para células dendríticas humanas maduras e imaturas (*Amaxa Optimized Protocol for Human Dendritic Cells*, Lonza). Como ainda não havia testes comprovando a eficiência de transfecção utilizando estes *kits* para o *T. rangeli*, ambos foram utilizados devido a sua disponibilidade no laboratório. Após as transfecções, dentre os resultados obtidos por fluorescência direta, imunofluorescência, PCR e *Western blot*, não foram observadas diferenças na eficiência das transfecções comparando os dois *kits* utilizados. Como os reagentes e condições da transfecção não são especificados para nenhum dos *kits*, não se pode inferir qual seria o motivo para obtenção destes resultados, embora podemos concluir que a utilização de ambos os kits são satisfatórios para a transfecção de formas epimastigotas de *T. rangeli*.

4.2.3 Avaliação da presença do DNA plasmidial no *T. rangeli* trasfectado por PCR

Com o intuito de verificar a presença de DNA codificante para a *TcTS* nas cepas de *T. rangeli* transfectadas foram realizadas reações de amplificação via PCR. Para tanto, dois pares diferentes de iniciadores, *TcTS* R/ *TcTS* R e pTEX F/GFP R foram utilizados. O primeiro par de iniciadores amplifica a região codificante do gene da *TcTS* de *T. cruzi*, sendo que um produto de aproximadamente 1,9 Kb é esperado nas amostras contendo o DNA dos transfectantes, o DNA plasmidial e o DNA genômico de *T. cruzi* (**Figura 14A**). Já o segundo par de iniciadores se liga ao plasmídeo pTEXeGFP, amplificando o inserto contido entre a região regulatória e o gene da GFP. Neste caso, um produto de aproximadamente 2,1 Kb é esperado para as amostras

contendo o DNA dos transfectantes e o DNA plasmidial controle (**Figura 14B**). Para ambos os pares de iniciadores foi observado o padrão de amplificação de acordo com o esperado, sendo que todas as amostras correspondentes aos parasitos transfectados foram positivas para a presença de DNA correspondente ao plasmídeo utilizado na transfecção. A amostra contendo DNA de *T. cruzi* na amplificação com o segundo par de iniciadores apresentou uma banda inespecífica de tamanho inferior ao esperado, não sendo considerada como positiva para a presença do fragmento esperado. Vale ressaltar que não observamos diferença entre o padrão de amplificação para as amostras obtidas com os distintos kits de transfecção utilizados e mantidas sob diferentes concentrações de G-418, para ambos os pares de iniciadores.

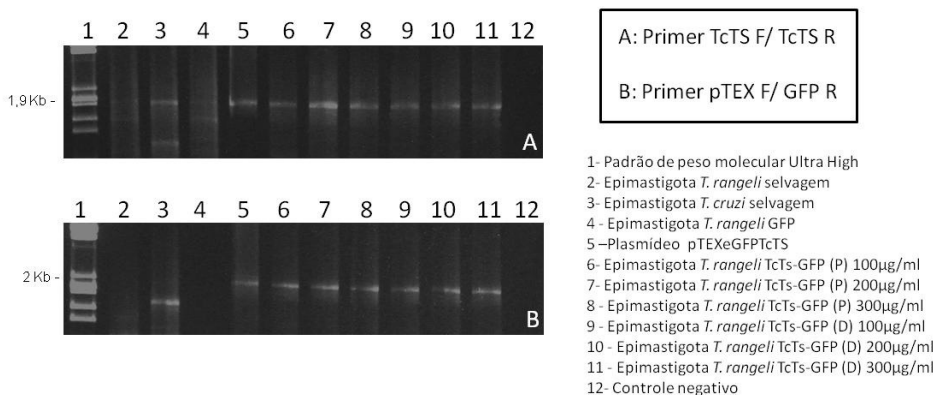


Figura 14. Confirmação da presença dos genes da *TcTS* e GFP para os parasitos transfectados com o plasmídeo pTEXeGFP-*TcTS*. Eletroforese em gel de agarose a 1% corado pelo brometo de etídeo revelando o resultado da PCR utilizando diferentes pares de iniciadores. (A) uma banda de aproximadamente 1,9 Kb referente ao gene da *TcTS* e (B) banda de cerca de 2,1 Kb resultante da amplificação referente ao plasmídeo.

4.2.4 Avaliação da expressão heteróloga da *TcTS* de *T. cruzi* por *T. rangeli* através da *Western blot*

Os mesmos anticorpos utilizados nos ensaios de imunofluorescência, mostrados na **Tabela 1**, foram avaliados em ensaios de *Western blot* (**Figura 15**). O soro policlonal anti-*TcTS* sítio catalítico (**Figura 15A**) foi capaz de reconhecer um polipeptídeo de aproximadamente 70 kDa somente nas amostras de *T. rangeli* transfectadas com o plasmídeo pTEXeGFP-*TcTS*. Nos extratos proteicos de *T. cruzi*, o tamanho das proteínas identificadas é amplo, entretanto um grupo entre 120 e 200 kDa encontra-se dentro do esperado teórico para TS em *T. cruzi*. Provavelmente, o uso de um soro

policlonal e não de um anticorpo monoclonal permitiu o reconhecimento de bandas inespecíficas encontradas para este painel.

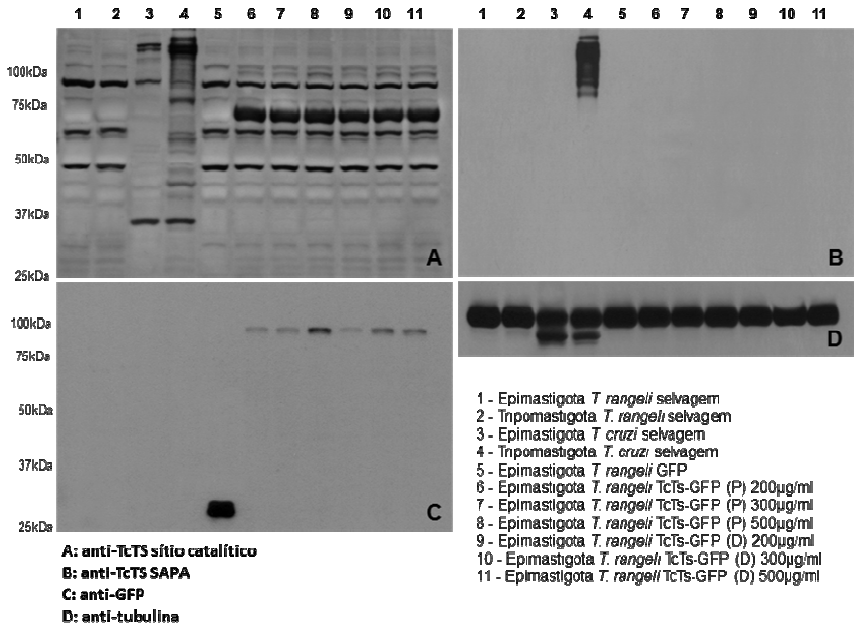


Figura 15. Expressão da proteína *TcTS* e GFP fusionada com *TcTS* para os parasitos que continham o plasmídeos pTEXeGFP-*TcTS*. Análise da expressão de *TcTS* (A e B), GFP (C) e alfa tubulina (D) em extratos proteicos totais de *Trypanosoma rangeli* cepa Choachí selvagem, *T. cruzi* cepa Y e *T. rangeli* transfectado com os plasmídeos pTEXeGFP e pTEXeGFP-*TcTS* sob diferentes concentrações de G418, através de ensaios de *Western blot* utilizando os anticorpos contra *TcTS* sítio catalítico, *TcTS* SAPA, GFP e α -tubulina.

O anticorpo anti-*TcTS* SAPA (**Figura 15B**) reconheceu somente um grupo de polipeptídios de 120 a 200 kDa no extrato proteico total de formas tripomastigotas de *T. cruzi*, evidenciando a ausência da porção

C-terminal nas proteínas provenientes dos parasitos transfectados, nas formas epimastigotas de *T. cruzi*, bem como nas formas epimastigotas e tripomastigotas de *T. rangeli* selvagem e transfectada com o plasmídeo pTEXeGFP.

Para o anticorpo anti-GFP (**Figura 15C**) o polipeptídeo de tamanho esperado, 26 kDa, foi encontrado somente no extrato proteico do *T. rangeli* transfectado com o plasmídeo pTEXeGFP. Nos extratos proteicos dos parasitos transfectados com pTEXeGFP-*TcTS* uma banda de aproximadamente 100 kDa foi observada, com uma tendência de aumento da expressão da proteína proporcional ao aumento da concentração de G-418 nos parasitos transfectados. Esta mesma banda de 100 kDa pode ser visualizada no painel correspondente ao anticorpo anti-*TcTS* sítio catalítico somente nos extratos dos parasitos *T. rangeli TcTS*.

A **Figura 15D** apresenta o resultados do teste de normalização da quantidade de proteína utilizada, evidenciando-se um padrão bastante similar de concentração proteica revelado pelo anticorpo anti- alfa tubulina.

Dessa maneira podemos concluir que os parasitos tranfectados com o plasmídeo pTEXeGFP-*TcTS* expressam a proteína de interesse *TcTS*, independente do kit de transfecção usado. O nível de expressão da *TcTS* parece acompanhar a concentração de G-418 sob qual é mantida a cultura. Também podemos apontar para uma expressão fusionada para proteína GFP com a *TcTS*, em vista do reconhecimento de uma banda de aproximadamente 100 kDa para ambos os anticorpos anti-*TcTS* sítio catalítico e anti-GFP somente para os parasitos transfectados com o plasmídeo pTEXeGFP-*TcTS* .

4.3 Caracterização biológica da cepa *T. rangeli* TcTS quanto a citolocalização da TcTS heteróloga, presença de atividade TS, crescimento e diferenciação *in vitro*

Uma vez que as trans-sialidases de *T. cruzi* tem sua principal ação na superfície do parasito, ancorada na membrana por GPI, ou sendo depois clivada e liberada na circulação do hospedeiro, era de grande importância saber se a TcTS, expressa heterologicamente pela cepa transfectada de *T. rangeli*, estaria localizada na membrana deste parasito. Com o intuito de verificar elementos que poderiam indicar a localização da proteína na superfície da célula realizamos análises *in silico*. Constatamos nessa análise a ausência de peptídeo sinal e da âncora GPI na sequência da TcTS presente no plasmídeo pTEXeGFP-TcTS (**Figura 16A e B**, respectivamente). Também identificamos uma grande região não-citoplasmática na mesma sequência (**Figura 16C**). Portanto, a proteína heteróloga não possui elementos presentes para a maioria das proteínas de membrana, peptídeo sinal e âncora de GPI, embora grande parte de sua estrutura foi identificada como não-citoplasmática. Esses resultados analisados em conjunto, não são esclarecedores em relação a localização da proteína heteróloga.

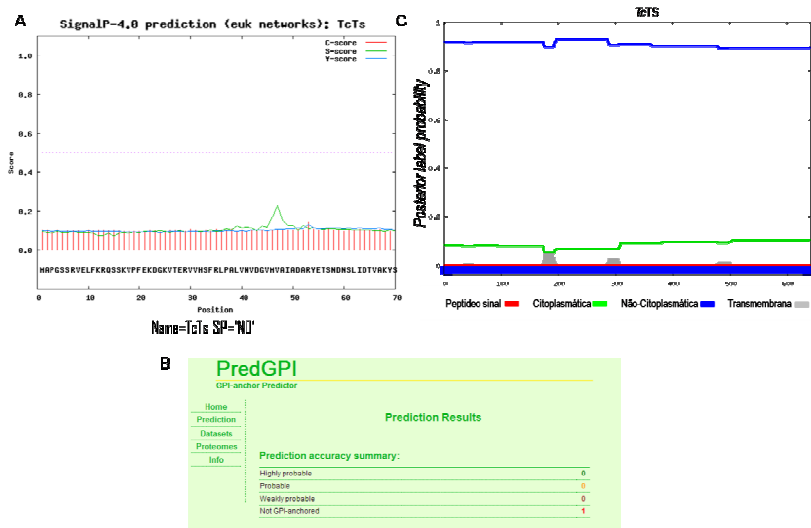


Figura 16. Proteína heteróloga *TcTS* não possui peptídeo sinal ou âncora de GPI, embora apresente grande região não-citoplasmática. Análises na sequência da proteína heteróloga expressa por *Trypanosoma rangeli* *TcTS* para predição de (A) peptídeo sinal determinado pelo programa *SignalP 4.0*; (B) sinal para adição de âncora de GPI determinado pelo programa *Predgpi* e (C) topologia transmembranar identificada pelo programa *Phobius*.

Ainda com o intuito de avaliar os locais de expressão das proteínas heterólogas, foram realizados ensaios de imunofluorescência indireta utilizando os anticorpos dirigidos ao sítio catalítico (Anti-*TcTS* sítio catalítico) e às repetições SAPA da *TcTS*, assim como um anticorpo anti-GFP (**Figura 17**). Ressaltamos que para os todos os anticorpos foram testadas duas condições, com e sem a utilização prévia de agente permeabilizante. Para o anticorpo anti-*TcTS* sítio catalítico, uma maior intensidade de fluorescência foi detectada para as amostras permeabilizadas em comparação às não tratadas. Uma fluorescência

variável em intensidade foi observada para as amostras de *T. rangeli* selvagem, formas epimastigotas e tripomastigotas de *T. cruzi* e para os parasitos transfectados cultivados em diferentes concentrações de G-418. As formas tripomastigotas de *T. cruzi* apresentaram uma maior intensidade de fluorescência, seguidas gradativamente pelas células transfectadas cultivadas na presença de 1.000 µg/ml de G418, seguida dos transfectantes cultivados em 300 µg/ml G-418 e por fim um reconhecimento de intensidade similar entre formas epimastigotas de *T. cruzi* e de *T. rangeli* selvagem. Independentemente do kit utilizado, mais uma vez os transfectantes apresentaram resultados similares, sendo que neste trabalho apresentamos somente os resultados referentes ao kit de parasitos. Somente as formas tripomastigotas de *T. cruzi* apresentaram fluorescência quando o anticorpo anti-*Tc*Ts SAPA foi utilizado.

Utilizando-se o anticorpo anti-*Tc*Ts sítio catalítico, foi possível observar que a proteína reconhecida pode estar também localizada na superfície do parasito, uma vez que se observa uma fluorescência de alta intensidade na condição de não permeabilização do parasito.

O reconhecimento relacionado ao anticorpo anti-GFP foi positivo para as amostras de *T. rangeli* transfectado com o plasmídeo pTEXeGFP e para as transfectadas com pTEXeGFP-*Tc*Ts. Evidenciou-se a tendência de aumento da intensidade da fluorescência proporcional ao aumento a concentração de G-418 utilizada no cultivo. Também é possível observar que distribuição da proteína é preferencialmente pontual nas amostras transfectadas com o plasmídeo pTEXeGFP-*Tc*Ts, enquanto que para os parasitos transfectados com o plasmídeo pTEXeGFP a fluorescência está dispersa uniformemente pelo citoplasma.

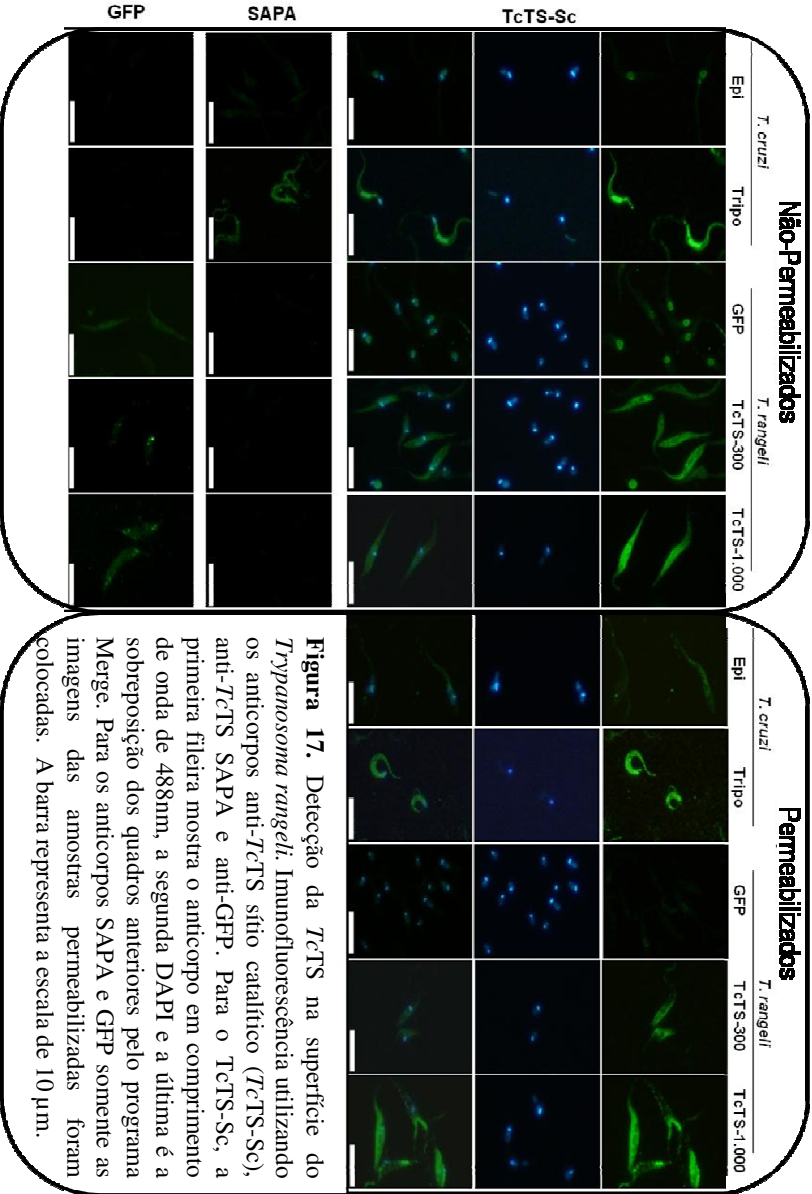


Figura 17. Detecção da TcTS na superfície do *Trypanosoma rangeli*. Imunofluorescência utilizando os anticorpos anti-TcTS sítio catalítico (TcTS-Sc), anti-TcTS SAPA e anti-GFP. Para o TcTS-Sc, a primeira fileira mostra o anticorpo em comprimento de onda de 488nm, a segunda DAPI e a última é a sobreposição dos quadros anteriores pelo programa Merge. Para os anticorpos SAPA e GFP somente as imagens das amostras permeabilizadas foram colocadas. A barra representa a escala de 10 µm.

Devido a inespecificidade do anticorpo disponível, a análise não pode ser conclusiva quanto a citolocalização da *TcTS* heteróloga. A alternativa foi a realização da metodologia de extração das proteínas de membrana.

No *Western blot* (**Figura 18**) utilizando apenas a última fração proteica extraída, a qual é enriquecida com proteínas de membrana (SEP), foi possível identificar a banda de 70 kDa pertencente a proteína *TcTS* em ambos os extratos proteicos (epimastigota e tripomastigota), da cepa transfectada *Tr_TcTS*, como também, uma banda de cerca de 120 kDa na fração pertencente a *Tc*, referente as trans-sialidades encontradas naturalmente neste parasito. Desta forma, podemos afirmar que uma parte das proteínas *TcTS* expressas de maneira heteróloga pela cepa transfectada está sendo direcionada a membrana destes parasitos, embora não esteja seguindo o padrão de endereçamento e ancoramento das TS encontradas em *T. cruzi*.

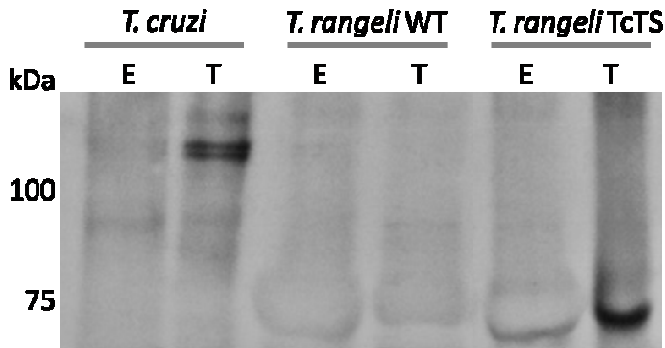


Figura 18. *TcTS* está expressa na fração de membrana da cepa *Tr_TcTS*. *Western blot* dos extratos proteicos de membrana extraída de 2×10^8 parasitos com Triton X-114 de formas epimastigotas (E) e tripomastigotas (T) de *Trypanosoma cruzi* selvagem (*Tc*), *Trypanosoma rangeli* selvagem (*Tr_WT*) e *T. rangeli TcTS* (*Tr_TcTS*) utilizando o antissoro anti-*TcTS* sítio catalítico e anticorpo secundário anti-IgG de coelho.

Um ensaio de atividade para foi realizado com o objetivo de avaliar a presença e o nível de atividade de TS nas cepas transfectadas bem como na cepa selvagem. Primeiramente, confirmamos a presença de trans-sialidasas para a cepa *Tc* e *Tr_TcTS* por ensaio de *Western blot*. Na **Figura 19 A** foi possível observar que o soro policlonal anti-*TcTS* (que foi obtido neste trabalho como descrito no item 3.5) foi capaz de reconhecer um polipeptídeo de aproximadamente 70 kDa exclusivamente nas amostras de *Tr_TcTS*. Nos extratos proteicos de *Tc*, o tamanho das proteínas identificadas ficam entre 90 e 200 kDa para epimastigotas e varia de 120 a 200 kDa para tripomastigotas com uma maior intensidade. Observamos que as bandas identificadas para ambas as formas da cepa *Tr_TcTS* são de grande intensidade e semelhantes

entre elas. Também podemos observar que, quando comparadas com as bandas reconhecidas como TS de *Tc*, existe uma maior quantidade de proteínas TS em *Tr_TcTS*, dessa forma podemos dizer que, neste caso, a quantidade de proteína não guarda relação com o nível de atividade.

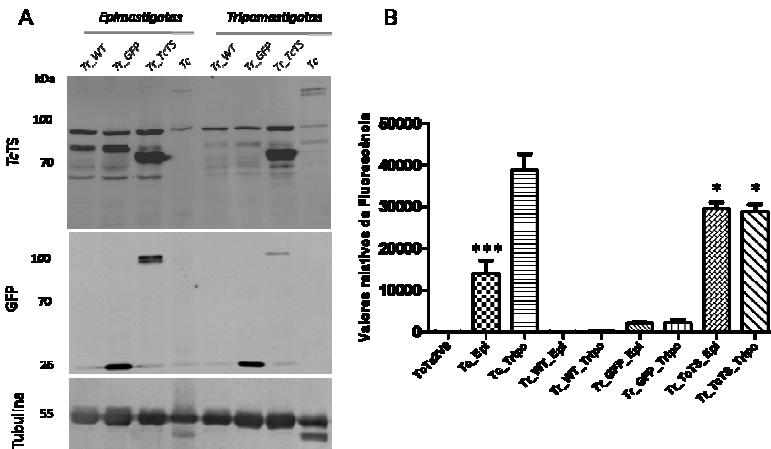


Figura 19. Detecção de atividade de trans-sialidase para ambas as formas da cepa *Trypanosoma rangeli* *TcTS* (*Tr_TcTS*). (A) Análise da concentração de proteína *TcTS*, GFP e Tubulina em extratos proteicos totais de $1,2 \times 10^8$ parasitos. Na sequência, proteína purificada *TcTS2VØ*, epimastigotas de *Tr_WT*, *Tr_GFP*, *Tr_TcTS* e *Tc* e tripomastigotas *Tr_WT*, *Tr_GFP*, *Tr_TcTS* e *Tc* de *Trypanosoma cruzi*, através de ensaios de *Western blot* utilizando o novo antissoro contra *TcTS* (obtido neste trabalho), e os anticorpos contra GFP e Tubulina. Ao lado (B), ensaio de atividade de Trans-sialidase com $1,2 \times 10^8$ parasitos. Média de triplicatas técnicas e desvio padrão, sendo o resultado expresso em valores relativos de fluorescência. *One way Anova* e pós-teste Bonferroni. * $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

Para o anticorpo anti-GFP o polipeptídeo de tamanho esperado (26 kDa) foi detectado somente nos extratos proteicos de *Tr_GFP* para ambas as formas e com intensidade similar. Nos extratos proteicos dos parasitos *Tr_TcTS* uma banda de aproximadamente 100 kDa foi observada, sendo possivelmente uma expressão fusionada das proteínas heterólogas *TcTS* (~70 kDa) e GFP (26kDa) como citado anteriormente.

No gráfico (**Figura 19 B**) podemos observar a ausência de atividade TS para ambas as formas das cepas *Tr_WT*, *Tr_GFP* e na proteína inativa purificada *TcTS2VØ* (controle negativo), bem como a presença de uma enzima ativa nos extratos de *T. cruzi* e *Tr_TcTS*. A atividade TS na forma tripomastigota de *T. cruzi* foi superior a forma epimastigota. Quando comparadas com ambas as formas da cepa *Tr_TcTS*, as formas epimastigota e tripomastigota de *T. cruzi* também apresentaram diferenças significativas, sendo a atividade da cepa transfectada maior que a encontrada para *Tc* epimastigota e menor que *Tc* tripomastigota. Já comparando as duas formas da cepa *Tr_TcTS*, ambas apresentam o mesmo nível de atividade de TS.

Portanto, observamos que não há atividade TS para as formas epimastigotas e tripomastigotas de *Tr_WT* e *Tr_GFP*. Também, que em *T. cruzi* a forma tripomastigota apresenta atividade superior à forma epimastigota, e que no *Western blot* as proteínas identificadas possuem tamanhos diferentes. Além disso, vemos que as duas formas da cepa *Tr_TcTS*, possuem a proteína heteróloga de 70 kDa e apresentam atividade de TS similares entre elas, embora menor do que a observada para tripomastigotas de *Tc*. Essa análise aponta que a cepa transfectada está expressando a *TcTS* e que esta proteína confere atividade de transglicosilação esses parasitos.

Para avaliar se a expressão heteróloga da *TcTS* gera alterações no crescimento e diferenciação *in vitro* da cepa *Tr_TcTS* realizamos dois experimentos. Em um primeiro realizamos a análise comparativa do crescimento em cultura das cepas *Tr_TcTS*, *Tr_GFP* e *Tr_WT*. O resultado foi uma curva de crescimento padrão e semelhante entre as cepas transfectadas e selvagem, com um número máximo de parasitos entre o nono (9º) e décimo primeiro (11º) dia, atingindo aproximadamente 2×10^7 parasitos/ml (**Figura 20**). Isso evidencia que a expressão do gene GFP bem como do gene *TcTS*, não alteram o comportamento do crescimento *in vitro* das cepas transfectadas em relação à cepa selvagem.

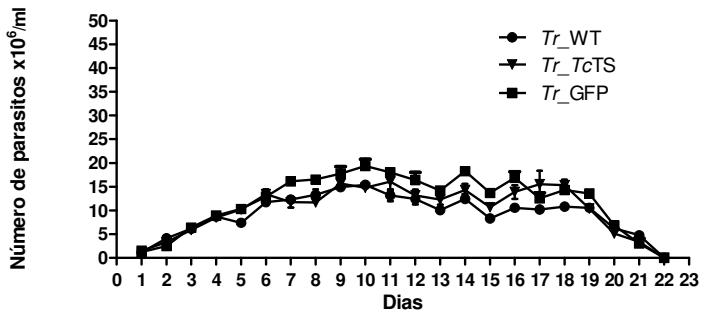


Figura 20. Padrão da curva de crescimento das cepas *Tr_GFP* (*T. rangeli* GFP) e *Tr_TcTS* (*T. rangeli* *TcTS*) de *Trypanosoma rangeli* comparada a cepa selvagem (*Tr_WT*) não é alterado pela expressão heteróloga das proteínas *TcTS* e GFP. Número inicial de parasitos foi de 2×10^6 . Os dados representam a média de três replicatas biológicas e desvio padrão de contagens diárias para cada uma das cepas.

O segundo experimento avaliou a diferenciação *in vitro*, ou seja, a passagem da forma epimastigota para a forma tripomastigota. O

resultado encontrado indica que também não foi observada diferença entre as cepas avaliadas (*Tr_WT*, *Tr_GFP* e *Tr_TcTS*) (**Figura 21**). Com esse dado podemos demonstrar que a cepa transfectada *T. rangeli* *TcTS* possui a capacidade de diferenciação *in vitro* similar a cepa selvagem de *T. rangeli*.

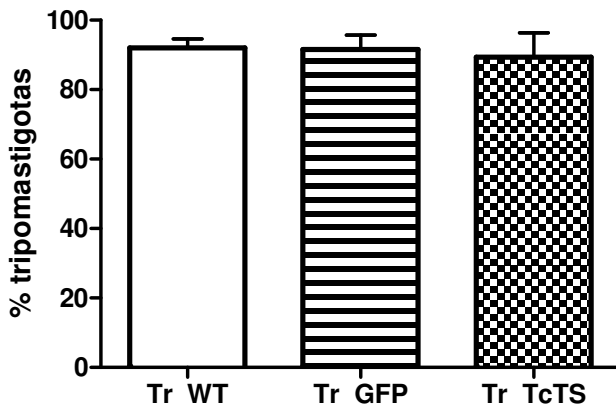


Figura 21. A expressão dos genes GFP e *TcTS* não afeta a capacidade de diferenciação *in vitro* das cepas transfectadas em relação à cepa selvagem. O gráfico representa a porcentagem de formas tripomastigotas obtidas para as cepas *Tr_WT*, *Tr_GFP* e *Tr_TcTS* de *Trypanosoma rangeli* no oitavo dia de diferenciação em meio DMEM pH 8,0. Esta análise foi realizada a partir de três replicatas biológicas. A porcentagem média de diferenciação entre as três cepas utilizadas ficou entre 89 e 91%.

4.4 Expressão da proteína *TcTS* em bactéria e produção de soro policlonal e anticorpo monoclonal

Como o antissoro contra *TcTS* disponível não possuía a especificidade necessária para ensaios de *Western blot* e RIFI, estabelecemos o objetivo de produzir um novo antissoro mais específico e, posteriormente, um anticorpo monoclonal para a proteína de interesse. Como a expressão da *TcTS* ativa em bactéria não foi possível, partimos para a expressão da forma inativa da proteína. Encontramos no alinhamento das sequências 97,8% de identidade e 98,8% de similaridade como pode ser observado na **Figura 22**. Somente 14 aminoácidos são diferentes entre as duas sequências. Em destaque no retângulo vermelho da figura 13, chamamos a atenção para a substituição de uma tirosina da *TcTS* por uma histidina na *TcTS2VØ*, sendo esta modificação responsável pela perda da atividade de TS da proteína. Cabe salientar que esta modificação ocorre naturalmente em alguns genes de TS em *T. cruzi* (CREMONA *et al.*, 1995).

```

      10      20      30      40      50      60      70      80      90      100
TcTs      .....M...P...G...S...R...V...E...L...F...K...R...Q...S...K...V...P...F...E...R...D...K...V...T...E...R...V...H...S...F...R...L...P...A...L...V...N...D...G...V...M...A...I...A...D...A...R...Y...E...T...S...H...N...D...S...L...I...D...T...V...A...K...Y...S...V...D...D...G...E...T...W...E...Q...I...A...I...K...N...S...R...A...S...S...V...R...V...D...P...T...V
TcTs2V0   M...I...A...P...G...S...R...V...E...L...F...K...R...Q...S...K...V...P...F...E...R...D...K...V...T...E...R...V...H...S...F...R...L...P...A...L...V...N...D...G...V...M...A...I...A...D...A...R...Y...E...T...S...H...N...D...S...L...I...D...T...V...A...K...Y...S...V...D...D...G...E...T...W...E...Q...I...A...I...K...N...S...R...A...S...S...V...R...V...D...P...T...V
      110     120     130     140     150     160     170     180     190     200
TcTs      .....I...V...G...N...K...L...Y...L...V...G...S...Y...N...S...R...S...Y...T...S...H...G...D...A...R...D...M...I...L...L...A...V...G...E...V...T...K...S...T...A...G...G...K...I...T...A...S...I...G...W...G...S...P...V...S...L...K...E...F...F...P...A...E...M...E...G...M...H...T...N...Q...F...L...G...G...A...G...V...I...A...V...A...S...N...G...N...L...V...Y...P...V...Q...V...T...N...K
TcTs2V0   I...V...G...N...K...L...Y...L...V...G...S...Y...N...S...R...S...Y...T...S...H...G...D...A...R...D...M...I...L...L...A...V...G...E...V...T...K...S...T...A...G...G...K...I...T...A...S...I...G...W...G...S...P...V...S...L...K...E...F...F...P...A...E...M...E...G...M...H...T...N...Q...F...L...G...G...A...G...V...I...A...V...A...S...N...G...N...L...V...Y...P...V...Q...V...T...N...K
      210     220     230     240     250     260     270     280     290     300
TcTs      .....K...K...Q...V...S...K...I...F...Y...S...E...D...G...K...W...F...G...E...G...R...S...D...P...G...C...S...E...P...V...A...L...E...W...E...G...K...L...I...N...T...R...V...D...Y...R...R...L...V...Y...E...S...S...D...M...G...N...S...V...E...A...V...G...T...L...S...R...W...G...P...S...P...K...S...N...Q...P...G...S...Q...S...S...F...T...A...V...T...I...E...G...M...R...V
TcTs2V0   K...K...Q...V...S...K...I...F...Y...S...E...D...G...K...W...F...G...E...G...R...S...D...P...G...C...S...E...P...V...A...L...E...W...E...G...K...L...I...N...T...R...V...D...Y...R...R...L...V...Y...E...S...S...D...M...G...N...S...V...E...A...V...G...T...L...S...R...W...G...P...S...P...K...S...N...Q...P...G...S...Q...S...S...F...T...A...V...T...I...E...G...M...R...V
      310     320     330     340     350     360     370     380     390     400
TcTs      .....M...L...F...T...P...L...N...F...K...G...R...W...L...R...D...R...L...N...L...W...L...D...N...Q...R...I...Y...N...V...Q...V...S...I...G...D...E...N...S...I...Y...S...V...L...Y...K...D...D...K...L...Y...C...L...H...E...I...N...S...N...E...V...I...S...L...V...F...A...R...L...V...G...E...L...R...I...K...S...V...L...Q...S...K...N...W...D...S...H...L...S...I...C...T...P...A
TcTs2V0   M...L...F...T...P...L...N...F...K...G...R...W...L...R...D...R...L...N...L...W...L...D...N...Q...R...I...Y...N...V...Q...V...S...I...G...D...E...N...S...I...Y...S...V...L...Y...K...D...D...K...L...Y...C...L...H...E...I...N...S...N...E...V...I...S...L...V...F...A...R...L...V...G...E...L...R...I...K...S...V...L...Q...S...K...N...W...D...S...H...L...S...I...C...T...P...A
      410     420     430     440     450     460     470     480     490     500
TcTs      .....D...P...A...A...S...S...E...R...G...C...G...P...A...V...T...T...V...G...L...V...G...F...L...S...H...S...A...T...R...T...E...W...E...D...A...Y...R...C...V...N...A...S...T...A...N...A...E...R...V...P...N...G...L...K...F...A...G...V...G...G...A...L...M...P...V...S...Q...Q...Q...N...Q...R...Y...H...F...A...N...H...A...F...T...L...V...A...S...V...T...I...H...E...V...P...S...V...A...S...E
TcTs2V0   D...P...A...A...S...S...E...R...G...C...G...P...A...V...T...T...V...G...L...V...G...F...L...S...H...S...A...T...R...T...E...W...E...D...A...Y...R...C...V...N...A...S...T...A...N...A...E...R...V...P...N...G...L...K...F...A...G...V...G...G...A...L...M...P...V...S...Q...Q...Q...N...Q...R...Y...H...F...A...N...H...A...F...T...L...V...A...S...V...T...I...H...E...V...P...S...V...A...S...E
      510     520     530     540     550     560     570     580     590     600
TcTs      .....L...L...C...A...S...L...D...S...S...G...C...K...L...L...G...L...S...Y...D...E...K...H...Q...Q...P...I...Y...G...S...T...P...V...T...P...T...G...S...W...E...M...C...K...R...Y...H...V...L...T...M...A...N...K...I...G...S...V...Y...I...D...G...E...P...L...E...C...S...Q...T...V...P...D...E...R...T...P...D...I...S...H...F...Y...V...G...Y...C...R...S...D...M...P...T...I...S...H
TcTs2V0   L...L...C...A...S...L...D...S...S...G...C...K...L...L...G...L...S...Y...D...E...K...H...Q...Q...P...I...Y...G...S...T...P...V...T...P...T...G...S...W...E...M...C...K...R...Y...H...V...L...T...M...A...N...K...I...G...S...V...Y...I...D...G...E...P...L...E...C...S...Q...T...V...P...D...E...R...T...P...D...I...S...H...F...Y...V...G...Y...C...R...S...D...M...P...T...I...S...H
      610     620     630     640
TcTs      .....V...T...V...N...N...V...L...L...Y...N...R...Q...L...N...A...E...I...R...T...L...F...L...S...Q...D...L...I...G...T...E...A...R...H...D...S...S...S...C...S...S...E...R
TcTs2V0   V...T...V...N...N...V...L...L...Y...N...R...Q...L...N...A...E...I...R...T...L...F...L...S...Q...D...L...I...G...T...E...A...R...H...D...S...S...S...C...S...S...E...R

```

Figura 22. Identidade de 98,7% entre as sequências das trans-sialidases ativa (*TcTS*) e inativa (*TcTS2V0*). Alinhamento das sequências aminoacídicas deduzidas de *Trypanosoma cruzi* pelo programa *ClustalW*. Os aminoácidos conservados estão marcados em cinza e os não conservados em branco. Retângulo identifica substituição de Tirosina por Histidina na proteína inativa, responsável pela perda de atividade de TS para esta proteína.

Com base nas sequências de 642 aminoácidos deduzidas para ambas as proteínas o programa *ProtParam* (<http://www.expasy.ch/tools/protparam.html>) calculamos como sendo de 70,46 kDa o peso molecular predito das proteínas heterólogas, apresentando pontos isoeletrônicos teóricos bastante similares (**Tabela 2**). Portanto, consideramos que a pequena diferença observada entre ambas as proteínas não impossibilitaria a geração de anticorpos que pudessem reconhecer ambas as TS, procedemos a expressão heteróloga da *TcTS2V0* em bactérias.

Tabela 2. Parâmetros bioquímicos deduzidos para as proteínas *TcTS* e *TcTS2VØ* de *Trypanosoma cruzi*.

Proteína	N° de Aminoácidos	Peso Molecular (Da)	Ponto Isoelétrico
<i>TcTS</i>	642	70461,1	6,59
<i>TcTS2VØ</i>	642	70464,2	6,77

O vetor pTrC-His que propicia a fusão do fragmento com uma cauda de seis histidinas foi utilizado para a expressão da *TcTS2VØ* em *E. coli* com o intuito de aumentar a estabilidade e facilitar a purificação da proteína recombinante. As condições que apresentaram maior eficiência de expressão foram a temperatura de 27°C após 15 h de indução. Além disso, a lise da cultura bacteriana e visualização dos extratos em gel durante os testes de expressão permitiu determinar que a proteína recombinante encontrava-se na fração insolúvel do lisado bacteriano. A partir do *Western blot* confirmamos a expressão da proteína *TcTS2VØ* pela presença de uma banda de aproximadamente 70 kDa (**Figura 23**), a qual foi expressa pela bactéria mesmo antes da indução por IPTG (**Figura 23**, Controle). Essa expressão aumenta consideravelmente na fração insolúvel após a ação do agente indutor, enquanto que na fração solúvel da bactéria a proteína recombinante não foi identificada.

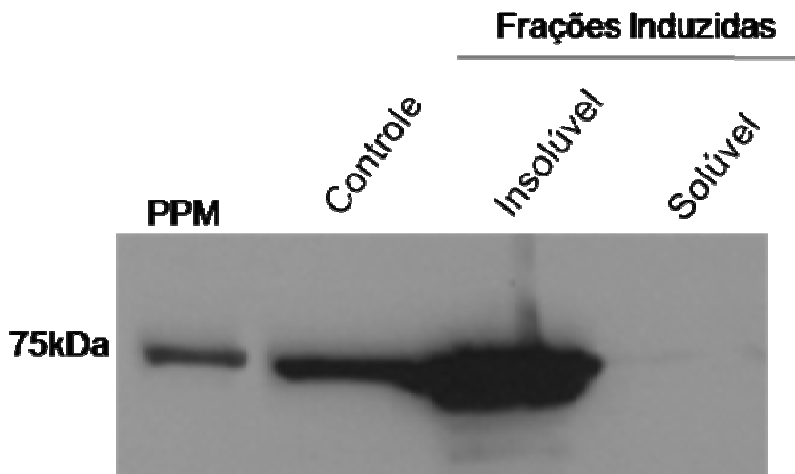


Figura 23. A proteína *TcTS2VØ* está presente na fração insolúvel da bactéria. Análise da expressão de *TcTS2VØ* em extratos proteicos de *Escherichia coli* (TOP10F') através de ensaios de *Western blot* utilizando o anticorpo contra cauda de Histidina (Anti-His-tag®). Na sequência, PPM- Padrão de peso molecular *Precision Plus Protein™ Dual Color Standards* (BioRad, Richmond), Controle não induzido, fração insolúvel e fração solúvel do lisado bacteriano após indução com 1mM de IPTG.

O fragmento proteico recombinante correspondente a *TcTS2VØ* foi então purificado, entretanto ocorreu a co-purificação de outras proteínas de menor tamanho em menor quantidade (D1, D2 e D3) (**Figura 24**).

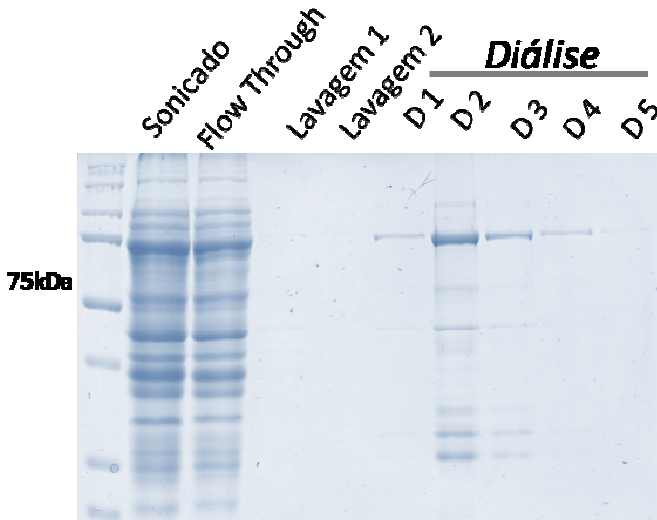


Figura 24. Proteína *TcTS2VØ* obtida com sucesso por purificação da fração insolúvel. Gel SDS-PAGE 12% corado com azul de Coomassie R-250 revelando cada uma das etapas de purificação por cromatografia da proteína *TcTS2VØ* expressa pelo vetor pTrc-His em bactérias TOP 10F⁺ induzidas com 1mM de IPTG. D1-D5: frações dialisadas. Quantificação por método de Bradford: maior concentração proteica na fração D2 de 2 µg/ml, seguida pelas frações D1, D3 e D4 (0,5-0,6 µg/ml) e menor na D5 (0,2 µg/ml).

As frações purificadas da proteína *TcTS2VØ* obtidas foram dialisadas e quantificadas em relação a sua concentração proteica através do método de Bradford. A eluição 2 mostrou ter a maior concentração, a seguir as eluições 1, 3 e 4 com concentrações intermediárias de proteínas e, por fim, a eluição 5 revelou uma menor liberação de proteína a partir da resina de purificação, e apresentou

menor concentração proteica (**Figura 24**). As frações 3 e 4 foram as utilizadas na imunização dos camundongos.

Desta forma, pudemos concluir que a expressão heteróloga da proteína *TcTS2VØ* em bactéria e a purificação do fragmento proteico recombinante foi realizado com sucesso a 27°C sendo induzida com IPTG em uma concentração final de 1 mM, e que a proteína foi purificada da fração insolúvel em quantidades suficientes para ser usada na imunização de camundongos.

A fim de avaliar a produção de anticorpos anti-TS pelos animais imunizados, realizamos um ensaio de *Western blot* com os soros obtidos dos três camundongos utilizados. O animal 1 foi o que apresentou uma resposta mais expressiva (**Figura 25**), já os outros dois não foram capazes de identificar de maneira satisfatória a proteína TS frente aos extratos proteicos dos parasitos, identificando somente a proteína recombinante purificada, provavelmente por esta estar em maior concentração do que a proteína alvo nos extratos dos parasitos (dados não mostrados). A presença de bandas inespecíficas reconhecidas para os extratos em todos os soros testados era esperada, uma vez que houve uma co-eluição de proteínas no momento da purificação. Essa inespecificidade se deve também a existência de similaridade entre os diversos membros da família das TS, que podem ser identificados por este ser um soro policlonal.

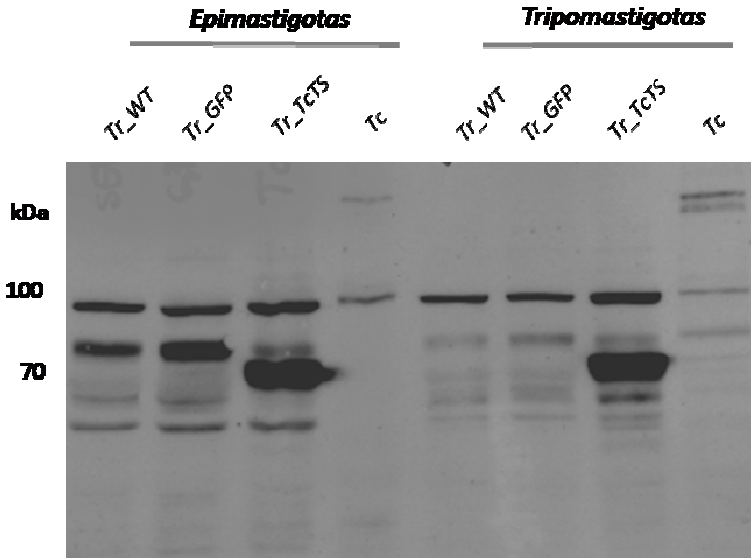


Figura 25. Soro de camundongo imunizado reconhece as TS. *Western blot* dos extratos de formas epimastigotas e tripomastigotas de *Trypanosoma rangeli* selvagem (*Tr_WT*), *T. rangeli* GFP (*Tr_GFP*), *T. rangeli* (*Tr_TcTS*) e *Trypanosoma cruzi* selvagem (*Tc*), utilizando o soro do camundongo 1 após a 4^o imunização subcutânea com 50 ng de proteína *TcTS2VØ*.

Para identificar qual dos soros possuía maior presença de anticorpos anti-TS, foi realizada uma titulação dos soros dos dois camundongos que obtiveram os melhores resultados no *Western blot*, 1 e 2 (**Figura 26**). Por apresentar os maiores títulos de anticorpos anti-TS e estes mostrarem-se mais específicos em *Western blot*, o camundongo número um foi escolhido para a produção de anticorpos monoclonais. Sendo assim, podemos concluir que dos três camundongos imunizados somente um obteve especificidade necessária para obtenção de

hibridomas produtores de anticorpos monoclonais contra TS, sendo o soro coletado e seu baço utilizado para a fusão.

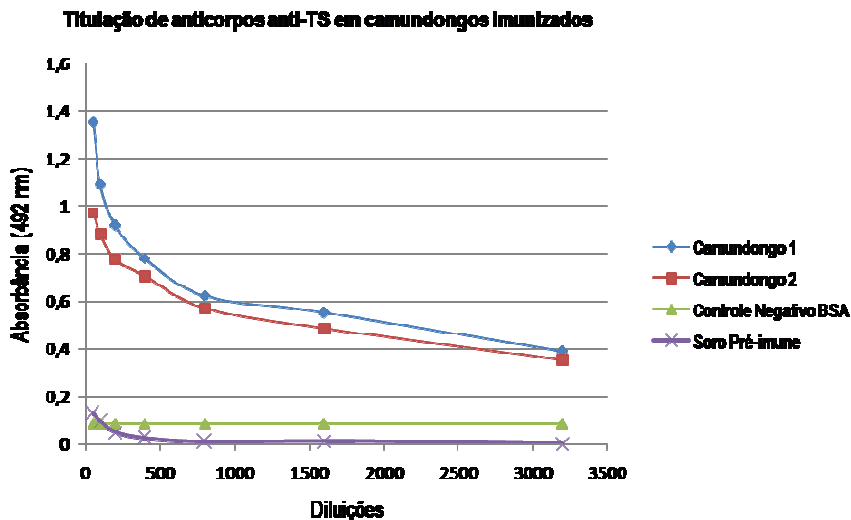


Figura 26. Soro do camundongo 1 possui maior titulação. Gráfico mostra titulação de anticorpos séricos anti-TS em camundongos, quinze dias após a última imunização dos animais com a proteína *TcTS2VØ*. ELISA utilizando placas sensibilizadas com 50 ng da proteína *TcTS2VØ*. Controle negativo BSA (solução de BSA 3%), Soro pré-imune; Camundongos 1 e 2: soros de camundongos imunizados com *TcTS2VØ*.

Os esplenócitos do camundongo número um apresentaram sucesso na fusão, fornecendo um total de nove placas de 96 poços, contendo 2×10^5 células em cada poço. Após procedimento de seleção em meio HAT as nove placas foram então testadas quanto a produção de anticorpos específicos contra a proteína *TcTS2VØ* purificada. Do total de hibridomas, apenas seis apresentaram reatividade contra *TcTS2VØ*, e

todos estes mantiveram-se estáveis e permaneceram reativos após duas semanas. Os hibridomas positivos ainda produzindo anticorpos policlonais foram expandidos em garrafas de cultura celular, sendo uma parte submetida ao congelamento em nitrogênio líquido para serem usadas futuramente.

4.5 Interação entre Parasito-*Rhodnius prolixus*

Inicialmente, promovemos a alimentação artificial de *R. prolixus* para avaliação comparativa do comportamento da cepa *Tr_TcTS* em efetuar o ciclo de vida no interior do hospedeiro invertebrado em relação à cepa selvagem. A avaliação levou em consideração desde o momento da entrada do parasito no inseto pelo repasto sanguíneo, sua travessia pelo epitélio do intestino médio para a hemolinfa, infecção das glândulas salivares, até a infecção de hospedeiro mamífero pela alimentação das ninfas infectadas em camundongos.

Apesar do seguimento de protocolos previamente estabelecidos, foram observadas poucas ninfas se alimentando, mesmo após duas horas. Das poucas ninfas em que se pode evidenciar a alimentação pela dilatação do abdômen, cerca de 5 para cada cepa, o seguimento até após 60 dias da alimentação artificial não revelou a presença de parasitos na hemolinfa de um pool de ninfas submetidas ao procedimento. Dessa forma, não foi possível continuar o acompanhamento como pretendia-se no início do experimento.

Em função da elevada mortalidade observada nas ninfas inoculadas com as cepas transfectadas na cavidade intracelômica, impossibilitando a continuação dos experimentos com os triatomíneos, decidimos investigar a relação entre a mortalidade das ninfas e a

presença de G-418 nas culturas de parasitos, ressaltando que o G-418 é o agente seletor das culturas transfectadas. Este agente é produzido pela bactéria *Micromonospora rhodorangea* e seu mecanismo de ação está focado na inibição da síntese de proteínas. Como análogo da neomicina sulfato ele liga-se ao ribossomo 80S ou 30S interferindo no funcionamento destas estruturas em células eucarióticas e procarióticas, respectivamente (JIMENEZ; DAVIES, 1980; COLBBRE-GARAPIN *et al.*, 1981; SOUTHERN; BERG, 1982). A resistência a esse agente seletor é conferida pelos genes *APH (3') - I* e *APH (3') - II*, encontrados em *E. coli* e que são adicionados a vetores que podem ser usados na transfecção de células (BECK *et al.*, 1982). O experimento consistiu na inoculação intracelômica de diferentes concentrações do G-418 e a contabilização diária do número de triatomíneos sobreviventes até 28 dias. Encontramos 66,7% de sobrevivência entre os inoculados com PBS (controle), enquanto que nos inoculados com 100 e com 500 µg/ml de G-418 a sobrevivência foi de 46,7% e 10,0%, respectivamente (**Figura 27**). Com esse resultado foi possível concluir que a sobrevivência dos triatomíneos é diminuída na presença de G-418 nas concentrações de 100µg/ml e 500µg/ml. Isso evidencia a existência de sensibilidade do triatomíneo pelo G-418 e a necessidade de eliminar essa substância para os experimentos de inoculação intracelômica com esses insetos.

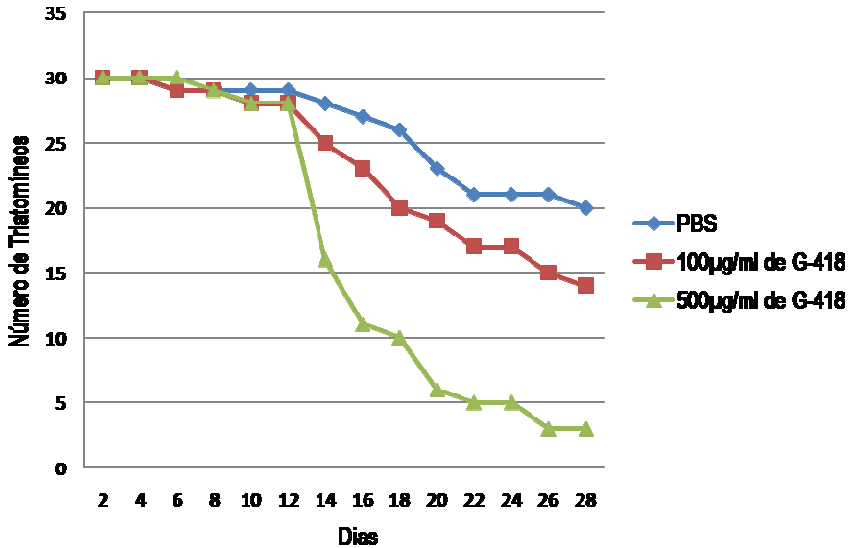


Figura 27. Diminuição da sobrevivência de triatomíneos inoculados com G-418. Mortalidade de *Rhodnius prolixus* inoculados intracelomicamente com duas concentrações de G-418 ao longo de 28 dias. Foram usados três grupos de 30 animais cada. Grupo inoculado somente com PBS estéril (Controle), com 100 µg/ml e outro com 500 µg/ml. Pelo teste *log-rank* o tempo de sobrevivência para os três grupos é diferente ($p < 0,0001$), sendo 66,7% de sobrevivência para os inoculados com PBS (controle), 46,7% nos inoculados com 100 e somente 10,0% naqueles inoculados com 500 µg/ml de G-418.

Tendo a informação de que o G-418 influenciava na biologia do triatomíneo, um novo experimento de infecção do *T. rangeli* TcTS em *R. prolixus* foi realizado para avaliar a capacidade dos parasitos de multiplicarem na hemolinfa e invadirem as glândulas salivares. Para tanto, ninfas de 4° e 5° estágio de *R. prolixus* foram infectadas intracelomicamente com uma suspensão de parasitos das cepas *Tr_WT*, *Tr_GFP* e *Tr_TcTS*, cujo G-418 foi previamente retirado. Uma semana

após a inoculação, a hemolinfa já estava densamente colonizada por formas epimastigotas das três cepas de *T. rangeli* analisadas (**Figura 28**). Após aproximadamente três semanas, já se encontravam tripomastigotas metacíclicos na glândula salivar de *R. prolixus* infectado com a cepa *Tr_WT*. Para os infectados com *Tr_GFP*, a colonização das glândulas salivares ocorreu na décima semana. Os parasitos *Tr_TcTS* não foram observados no interior das glândulas durante as 16 semanas analisadas.

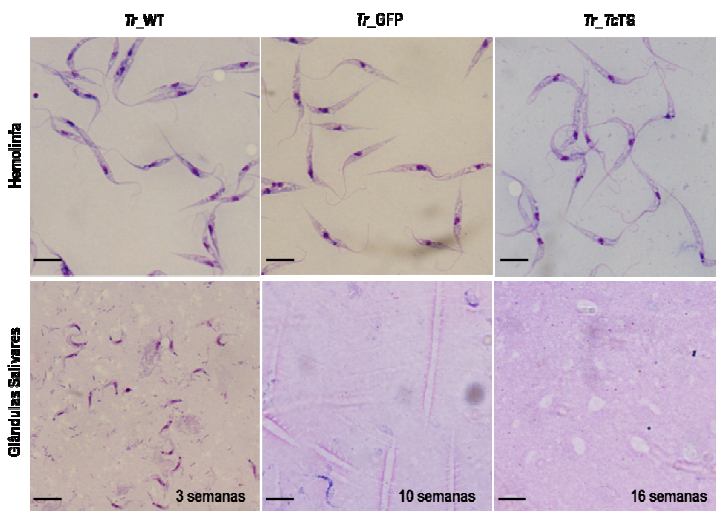


Figura 28. Ausência de formas tripomastigotas de *Trypanosoma rangeli* TcTS na glândula salivar de *Rhodnius prolixus*. Microfotografias da hemolinfa e de macerados das glândulas salivares de *R. prolixus* experimentalmente infectados com as cepas *T. rangeli* selvagem (*Tr_WT*), *T. rangeli* GFP (*Tr_GFP*) e *T. rangeli* TcTS (*Tr_TcTS*) após 3, 10 e 16 semanas de infecção. Ninfas de 4^o e 5^o estágio de *R. prolixus* infectadas intracelomicamente com cerca de 10µl de uma suspensão de parasitos das cepas *Tr_WT*, *Tr_GFP* e *Tr_TcTS* em PBS estéril. As culturas foram previamente lavadas em PBS para remoção do G-418. A barra representa 10 µm.

Com o intuito de verificar se a mudança de comportamento da cepa *Tr_TcTS* do *T. rangeli* poderia estar relacionada com a expressão diferencial da proteína *TcTS*, utilizamos duas abordagens distintas, a busca do gene e a verificação da expressão da proteína *TcTS* pelos parasitos presentes na hemolinfa. Inicialmente, amostras de hemolinfa foram coletadas 50 dias após a infecção, antes de realizarmos as reações de PCR para detecção do gene da *TcTS*. A amplificação do gene foi realizada e os produtos revelaram uma banda de tamanho compatível com o gene *TcTS* (~2Kb) na hemolinfa dos três triatomíneos deste grupo, sendo do mesmo tamanho dos produtos de amplificação obtidos para os controles positivos da reação (amostra de cultura de *Tr_TcTS* e o plasmídeo pTEXeGFPT*cTS*) (**Figura 29**). Assim confirmamos que os parasitos *Tr_TcTS* inoculados na hemolinfa de ninfas de *R. prolixus* ainda possuem o plasmídeo contendo o gene que codifica para proteína de interesse.

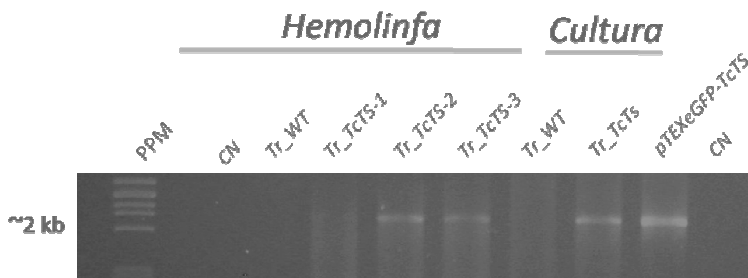


Figura 29. Presença do gene *TcTS* nos parasitos *Trypanosoma rangeli* *TcTS* presentes na hemolinfa de *Rhodnius prolixus*. Eletroforese em gel de agarose a 1% corado pelo brometo de etídeo revelando o resultado da amplificação do gene *TcTS* a partir de amostras de hemolinfa de *R. prolixus* após 50 dias da infecção com o *T. rangeli TcTS*. PPM- Padrão de Peso Molecular (DNA de Fago lambda digerido com *HindIII*), CN: Controle negativo (hemolinfa de *R. prolixus* não infectado), *Tr_WT* (*T. rangeli* selvagem): Hemolinfa de *R. prolixus* infectado com *Tr_WT*, *Tr_TcTS* (*T. rangeli TcTS*)1 - 3: Hemolinfa de três ninfas de *R. prolixus* infectado com *Tr_TcTS*, *Tr_WT*: DNA de cultura da cepa *Tr_WT*, *Tr_TcTS*: DNA de cultura da cepa *Tr_TcTS*, pTEXeGFP-*TcTS*: DNA do plasmídeo pTEXeGFP-*TcTS* e CN-controle negativo da reação (sem adição de DNA).

Com a confirmação da presença do gene *TcTS* nos parasitos observados na hemolinfa, procedemos a análise da presença da proteína *TcTS* expressa pelos parasitos presentes na hemolinfa dos insetos. Para tanto, realizamos nova extração de hemolinfa das ninfas infectadas, conforme o descrito no item 3.5.4, sendo o primeiro gel corado por azul de Coomassie-R250 para visualização do perfil proteico e o segundo e o terceiro géis foram transferidos para membranas, cujas foram utilizadas em ensaios de *Western blot* (**Figura 30**).

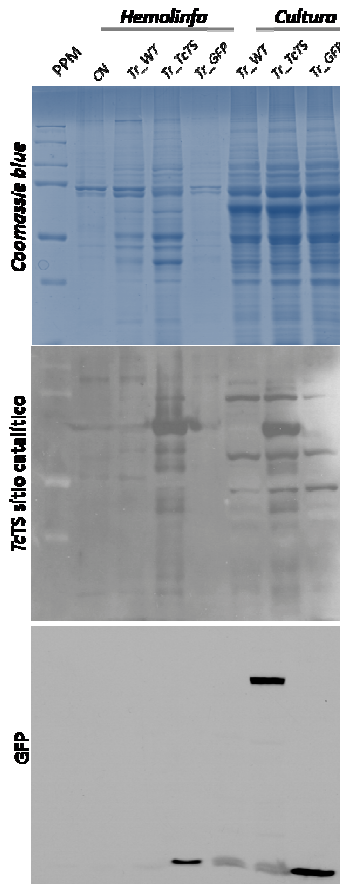


Figura 30. Presença da proteína *TcTS* nos parasitos *Trypanosoma rangeli TcTS* (*Tr_TcTS*) encontrados na hemolinfa de *Rhodnius prolixus* 70 dias após a infecção. Análise da expressão de *TcTS* e GFP em extratos proteicos totais de hemolinfa não infectada (CN), Hemolinfa infectada com *Tr_WT* (*T. rangeli* selvagem), Hemolinfa infectada com *Tr_TcTS*, Hemolinfa infectada com *Tr_GFP* (*T. rangeli* GFP), Cultura de *Tr_WT*, Cultura de *Tr_TcTS* e Cultura de *Tr_GFP*, através de gel de SDS-PAGE 12% corado com azul de Coomassie R-250 e ensaios de *Western blot* utilizando os anticorpos contra *TcTS* sítio catalítico e GFP.

No gel corado por azul de Coomassie R-250 (**Figura 30**) observamos uma quantidade maior de proteínas nas amostras de cultura do que na hemolinfa de *R. prolixus* experimentalmente infectados. Ainda foi possível visualizar que o extrato proteico da hemolinfa dos insetos infectados com *Tr_GFP*, possui uma quantidade menor de proteínas quando comparado aos extratos do mesmo grupo. Essa heterogeneidade era esperada uma vez que as amostras foram coletas diretamente dos triatomíneos e pela pequena quantidade extraída não foram quantificadas.

Os resultados de *Western blot* (**Figura 30**) revelaram a expressão da GFP utilizada como controle tanto na cultura da cepa *Tr_GFP* quanto na hemolinfa de *R. prolixus* infectado com parasitos da cepa *Tr_GFP*, além de uma banda de cerca de 100 kDa na cultura da cepa *Tr_TcTS*, sendo este aumento devido à provável expressão fusionada da GFP com a *TcTS* como o já mencionado anteriormente. Entretanto, não houve reconhecimento do anticorpo anti-GFP na amostra de hemolinfa de *R. prolixus* infectado com a cepa *Tr_TcTS*, onde esperava-se uma banda de mesmo tamanho (100 kDa) da encontrada para a cultura (**Figura 30**). A utilização do anticorpo anti-*TcTS* sítio catalítico no ensaio de *Western blot*, revelou uma banda de aproximadamente 70 kDa somente nas amostras de cultura da cepa *Tr_TcTS* e na de hemolinfa de *R. prolixus* infectado com a cepa *Tr_TcTS*.

Em função do resultado negativo para a detecção da GFP na amostra de hemolinfa de *R. prolixus* infectado com a cepa *Tr_TcTS* via *Western blot*, realizamos a observação direta da fluorescência da GFP na amostra de hemolinfa dos triatomíneos infectados com a cepa *Tr_TcTS*, confirmando expressão da mesma com intensidade fraca (**Figura 31**). A

ausência da pressão de G-418, faz com que a expressão da GFP, que já era baixa, fique em níveis muito baixos, a ponto não mais ser detectada por *Western blot*. Assim, confirmamos que mesmo após 70 dias de infecção, os parasitos transfectados com plasmídeo pTEXeGFP-*TcTS* e inoculados na hemolinfa dos triatomíneos *R. prolixus*, continuam expressando a proteína heteróloga *TcTS*. em observações da hemolinfa por fluorescência direta é possível ver uma intensidade fraca, mas presente da fluorescência da GFP.

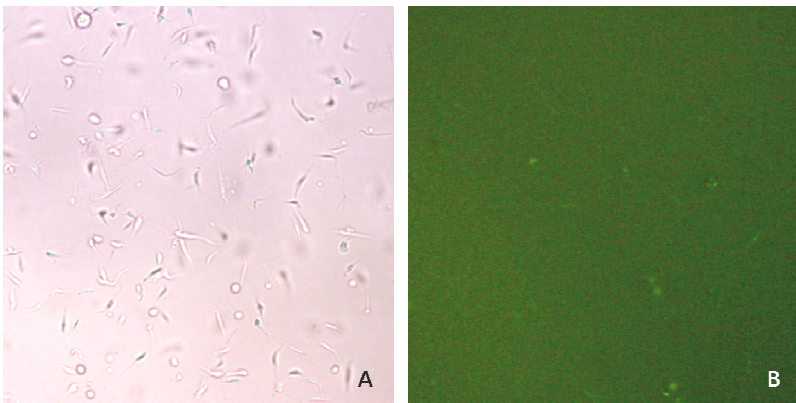


Figura 31. Identificação da fluorescência de GFP nos parasitos *Trypanosoma rangeli TcTS* (*Tr_TcTS*) encontrados na hemolinfa de *Rhodnius prolixus* 70 dias após a infecção. Microscopia de campo claro (A) e de fluorescência a 490nm (B) da hemolinfa de *R. prolixus* infectado com a cepa *Tr_TcTS* de *T. rangeli*. Objetiva de 40X.

Após os resultados encontrados neste primeiro ensaio de interação com *R. prolixus*, foi visto que após três semanas, formas tripomastigotas de *T. rangeli* selvagem estavam presentes na glândula salivar, enquanto que para os infectados com *T. rangeli* GFP, isso

ocorreu na décima semana. Para *T. rangeli* *TcTS* não foram observados parasitos no interior da glândula durante as 16 semanas analisadas e sendo confirmada a presença do gene da *TcTS* bem como a expressão da proteína nestes parasitos. Dessa forma podemos concluir provavelmente a presença da proteína heteróloga *TcTS* está alterando a interação do parasito com o inseto vetor.

Como as culturas de *Tr_TcTS* estavam, por muito tempo, sendo mantidas por repiques sucessivos *in vitro*, essa condição poderia acarretar em uma perda da capacidade de infecção dos triatomíneos. Desta maneira, a fim de retirar esse possível viés, as cepas de *Tr_WT* e *Tr_TcTS* foram utilizadas na infecção em camundongos e re-isoladas por hemocultura e, após uma passagem em meio LIT, um novo experimento foi realizado. Desta vez, adotamos a sexta semana como o ponto final do experimento, isto é, quando todas as ninfas foram sacrificadas e suas glândulas extraídas e processadas para produção de lâminas visando a detecção de parasitos.

Do total de 30 ninfas infectadas, ao final das seis semanas, 13 ninfas inoculadas com a cepa *Tr_WT* e 19 com a cepa *Tr_TcTS* sobreviveram. Dos 13 pares de glândulas salivares provenientes de triatomíneos infectados com a cepa *Tr_WT*, 92%, foram positivos para a presença de tripomastigotas metacíclicos, e apenas 16% foram positivos entre os infectados com a cepa *Tr_TcTS* (**Figura 32**).

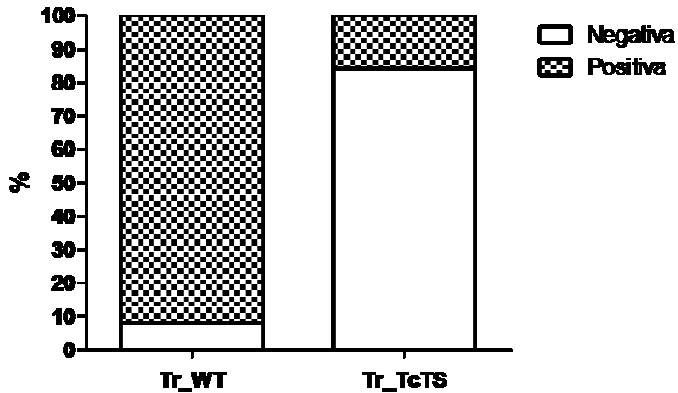


Figura 32. Expressão heteróloga da *TcTS* diminui da capacidade de infecção das glândulas salivares de *R. prolixus* por *T. rangeli* *TcTS* (*Tr_TcTS*). Gráfico mostra a porcentagem das glândulas infectadas por tripomastigotas após seis semanas da inoculação na hemolinfa de *T. rangeli* selvagem (*Tr_WT*) e expressando a trans-sialidase de *T. cruzi* (*TcTS*) ($p < 0,0001$). As cepas foram recém re-isoladas por hemocultura. Pares de glândulas extraídos individualmente, maceradas em 10 μ l de meio DMEM e depositados em lâmina e coradas pelo Giemsa. O teste de Fisher indica uma diferença estatisticamente significativa ($p < 0,0001$) entre as porcentagens de infecção entre a cepa *Tr_TcTS* e a cepa selvagem (*Tr_WT*).

Com este segundo ensaio de interação de *Tr_TcTS* e *R. prolixus* podemos concluir que a manutenção *in vitro* das culturas pode acrescentar um viés no experimento, e por isso é importante a utilização de cepas recém isoladas. Também podemos observar que, mesmo que haja infecção das glândulas de *R. prolixus* já na sexta semana para *Tr_TcTS*, ainda permanece alterada a interação entre parasito e vetor.

4.6 Ensaios de interação *in vitro* do *T. rangeli* TcTS com células Vero

Com o intuito de avaliar o comportamento da cepa de *T. rangeli* TcTS no momento de interação com células de mamíferos, realizamos experimentos de interação *in vitro* entre parasitos *T. cruzi* e *T. rangeli* e células Vero por distintos períodos de tempo. O resultado obtido no experimento indicou diferenças entre as cepas testadas, embora não apresente diferença entre os tempos T0, T4 e T16. Isso quer dizer que a variável cepa influencia na interação, mas que a variável tempo não modifica o resultado final.

Consideramos a cepa *Tr*_WT como sendo padrão de infecção para *T. rangeli* e a infecção celular pelo *T. cruzi* como controle positivo de infecção. Como esperado, observamos uma porcentagem maior de infecção para *Tc* nos três tempos do experimento quando comparado a *Tr*_WT. Não foram encontradas diferenças significativas nas taxas de infecção da cepa *Tr*_WT em relação à cepa *Tr*_GFP, o que também era esperado, já que esta cepa foi usada como controle negativo de cepa transfectada, por possuir exatamente o mesmo plasmídeo de *Tr*_TcTS, somente diferindo quanto a presença do gene *TcTS*. Finalmente, a cepa *Tr*_TcTS comparada com *Tr*_WT, apresentou maior porcentagem de células infectadas nos tempos T0 e T16, mas não atingiu os níveis de infecção observados para a cepa *Tc* de *T. cruzi* (**Figura 33**). Todos os valores de *t*, intervalo de confiança e valor de *p*, encontrados nas comparações entre as quatro cepas e os três tempos do experimento, foram descritos na tabela no **Apêndice 3**. Este resultado indica que a atividade da proteína heteróloga expressa por *Tr*_TcTS altera o padrão de interação do parasito com a célula. Esta alteração está relacionada ao

aumento da capacidade de infecção de *T. rangeli* TcTS em linhagem celular não fagocítica, Vero.

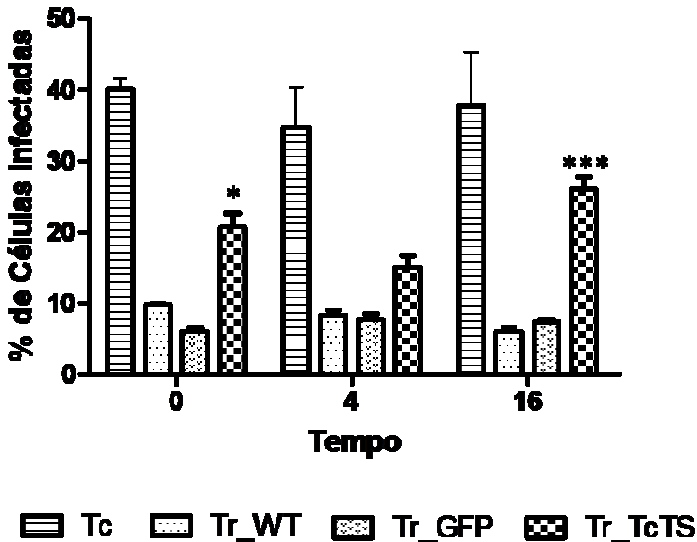


Figura 33. Expressão de TcTS por *Trypanosoma rangeli* incrementa a capacidade de infecção da cepa transfectada. Representação gráfica da porcentagem de células infectadas resultantes da interação *in vitro* da cepa Tc de *Trypanosoma cruzi* e das cepas *T. rangeli* selvagem (*Tr_WT*), *T. rangeli* GFP (*Tr_GFP*) e *T. rangeli* TcTS (*Tr_TcTS*), com a linhagem celular Vero, nos tempos T0, T4 e T16. Influência somente da variante cepa ($p < 0,0001$) nos resultados. *($p < 0,05$) e ***($p < 0,001$) indicam diferenças estatisticamente significativas encontradas pelo teste *Two ways Anova* e pós-teste de Bonferroni em relação à cepa *Tr_WT*. Também está representado o desvio padrão observado com a contagem de 400 células, sendo realizados experimentos em duplicatas técnicas e biológicas.

Com o objetivo de avaliar a influência da atividade de TS na aderência dos parasitos a superfície das células de mamíferos, uma vez que a TS está envolvida nesse processo em *T. cruzi*, procedemos as contagens do número de parasitos aderidos, ou seja, parasitos que se encontram em contato com a superfície das células, embora não internalizados. Observamos para este caso que as variantes cepa e tempo influenciam os resultados de aderência. Ainda consideramos a cepa *Tr_WT* como sendo padrão para aderência de *T. rangeli* e sendo esta usada nas comparações com as demais cepas. *T. cruzi*, somente no tempo T0, apresenta menor quantidade de parasitos aderidos em cem células. Como esperado, não foram encontradas diferenças entre as cepas *Tr_WT* e *Tr_GFP*. Já a cepa *Tr_TcTS* apresentou maior relação parasitos aderidos/cem células somente para o tempo T0 (**Figura 34**).

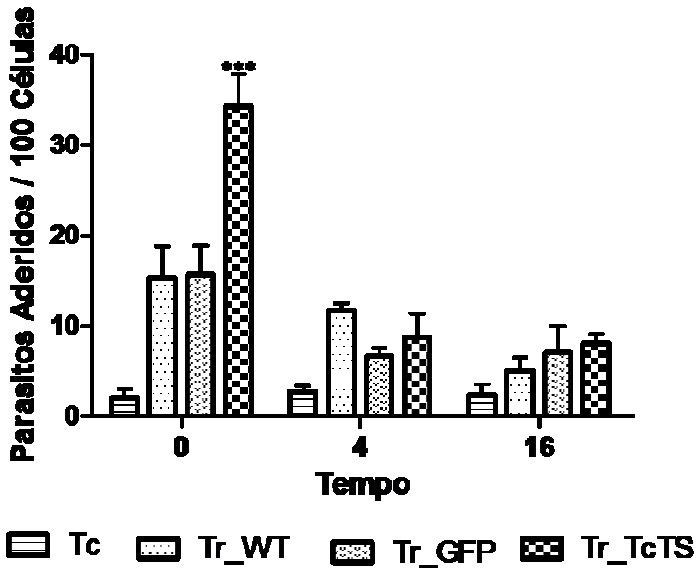


Figura 34. Atividade de TS em *Trypanosoma rangeli* TcTS aumenta a aderência dos parasitos no período inicial de interação. Gráfico com o número de parasitos aderidos por 100 células Vero em ensaios de interação *in vitro* com a cepa Tc de *T. cruzi* e as cepas Tr_WT, Tr_GFP e Tr_TcTS de *T. rangeli*, nos tempos T0, T4 e T16. Influência das variáveis cepa e tempo ($p < 0,0001$) nos resultados ***($p < 0,001$) indica diferença estatisticamente significativa pelo teste *Two ways Anova* e pós-teste de Bonferroni em relação à cepa Tr_WT. Também está representado o desvio padrão observado com a contagem de 400 células, sendo realizados experimentos em duplicatas técnicas e biológicas.

Na **Figura 34**, ficou claro que a cepa TcTS possui uma capacidade maior de aderir-se a superfície das células no princípio do período de interação, quando comparada as demais cepas analisadas. Essa característica, todavia, não foi mais observada nos tempos

posteriores, T4 e T16. Dessa forma podemos concluir que a atividade de TS também altera o padrão de interação com células Vero no que se refere a aderência celular inicial.

Para verificar a ocorrência de divisão intracelular e as características morfológicas do parasito durante o experimento de interação parasito-célula hospedeira, foi usado um anticorpo anti- α Tubulina em ensaios de imunofluorescência indireta conforme o descrito no item 3.4.2.1. Os resultados estão apresentados na **Figura 35** onde podem ser observadas todas as cepas utilizadas no experimento assim como o controle com células Vero nos quatro tempos (T0, T4, T16 e T120), imagens em detalhe da cepa *Tr_TcTS* (**Figura 36**).

Observando as imagens na **Figura 35** no tempo T0 foi possível identificar parasitos aderidos às células, além de alguns internalizados, caracterizados por uma estrutura mais arredondada, nas quatro cepas de parasitos avaliados, *Tc*, *Tr_WT*, *Tr_GFP* e *Tr_TcTS*. Já no T4, vemos os parasitos totalmente arredondados, observando-se uma menor frequência de parasitos intracelulares para as cepas *Tr_WT* e *Tr_GFP*, enquanto que para as cepas *Tc* e *Tr_TcTS* essa frequência se manteve, além de um número maior de células infectadas. Resultados semelhantes foram encontrados no T16. Após 120 horas de interação, observamos poucos parasitos aderidos ou internalizados correspondentes as cepas *Tr_WT* e *Tr_GFP* e poucas células infectadas. Para a cepa *Tc*, identificamos uma grande quantidade de amastigotas no interior das células e maior quantidade de células infectadas (**Figura 35**).

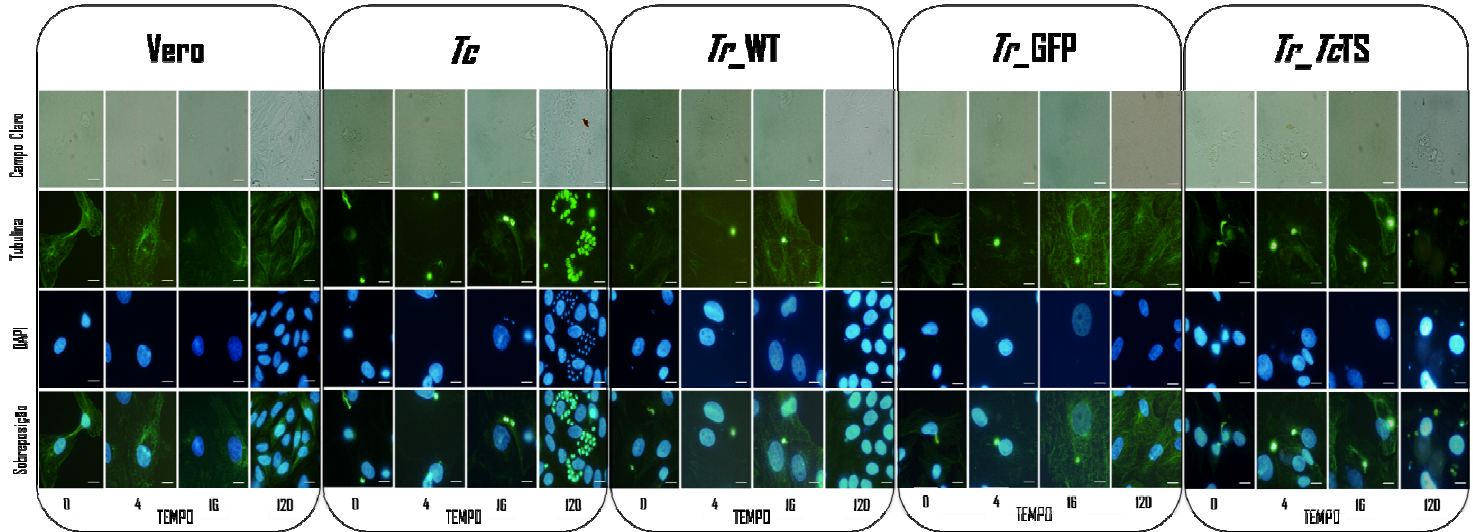


Figura 35. Aumento no número de formas intracelulares e células infectadas para a cepa *Trypanosoma rangeli* TcTS. Painel mostra ensaios de interação celular de cepas de *Trypanosoma cruzi* (Tc) e *T. rangeli* (Tr_WT, Tr_GFP e Tr_TcTS) com células Vero em diferentes tempos revelados por imunofluorescência indireta utilizando um anticorpo anti- α Tubulina e coloração por DAPI. A primeira linha mostra o campo claro, a segunda o anticorpo anti- α Tubulina em comprimento de onda de 488nm, a terceira o DAPI e a última é a sobreposição dos dois quadros anteriores pelo programa *Merge*. A barra representa a escala de 10 μ m.

Quando observamos a cepa *Tr_TcTS* (**Figura 36**) e a comparamos às outras cepas de *T. rangeli*, podemos concluir que a primeira possui um número maior de parasitos internalizados em relação às demais cepas analisadas e maior quantidade de células infectadas. Também observamos que estes encontram-se em formato arredondado com flagelo visível, entretanto não há qualquer indicativo de que estejam perfazendo multiplicação intracelular.

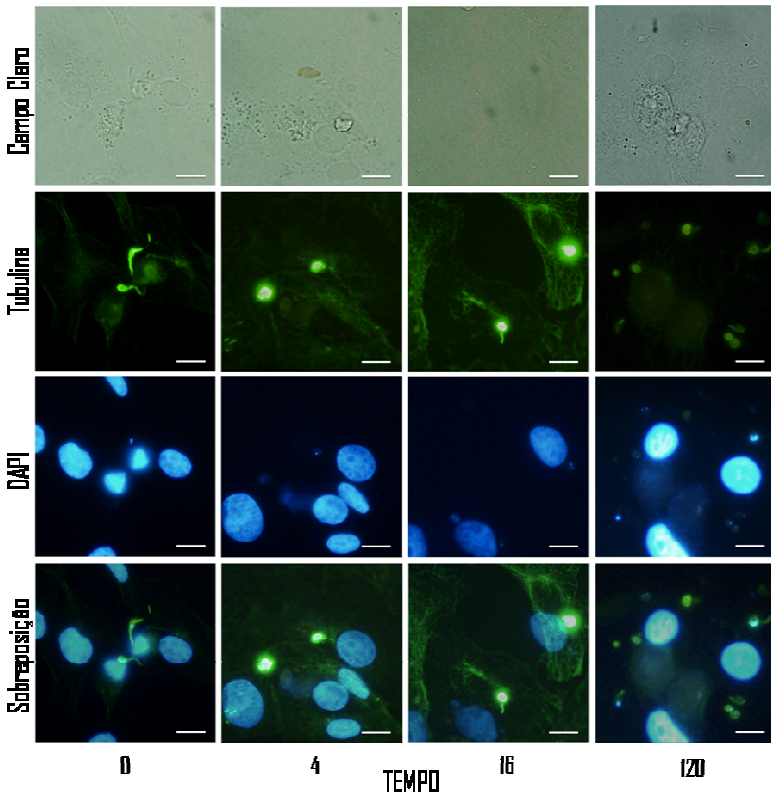


Figura 36. Formas intracelulares arredondadas, mas com flagelo visível para a cepa *Trypanosoma rangeli* TcTS (*Tr_TcTS*). Detalhe do painel mostra os ensaios de interação celular da cepa *Tr_TcTS* com células Vero em diferentes tempos, revelados por imunofluorescência indireta utilizando um anticorpo anti- α Tubulina e coloração por DAPI. A primeira linha mostra o campo claro, a segunda o anticorpo anti- α Tubulina em comprimento de onda de 488nm, a terceira o DAPI e a última é a sobreposição dos dois quadros anteriores pelo programa *Merge*. A barra representa a escala de 10 μ m.

4.7 Ensaios de interação *in vivo* entre o *T. rangeli* TcTS e camundongos

4.7.1 Parasitemia em camundongos BALB/c

Para a avaliação do comportamento dos parasitos *T. rangeli* TcTS durante infecção *in vivo* de camundongos BALB/c, os animais foram inoculados com as formas tripomastigotas de cultura de *Tc*, *Tr_WT*, *Tr_GFP* e *Tr_TcTS*, e a parasitemia foi monitorada diariamente. Observamos tripomastigotas de todas as cepas de *T. rangeli* na corrente sanguínea dos animais infectados desde o primeiro dia **Figura 37 A**.

O número de parasitos na corrente sanguínea dos animais infectados com as cepas de *T. rangeli* teve um crescimento pequeno nos primeiros quatro dias, embora não existiu um pico bem definido. Após o 4º dia as curvas entraram em descendência, não sendo mais detectados parasitos 16 dias pós inoculação (d.p.i.). Para a cepa *Tr_TcTS* existe uma tendência ao aumento no início da parasitemia, quando comparada as outras duas cepas, embora a partir do quinto dia a curva adotou o mesmo perfil das outras, e, também a mesma duração. Assim podemos considerar que não houve alteração no perfil de parasitemia para a cepa *Tr_TcTS* em relação as outras cepas de *T. rangeli* (**Figura 37 A**). O aumento do número de parasitos em relação ao inoculo realizado para as três cepas de *T. rangeli* utilizadas não foi observado, sendo o número de parasitos no pico de parasitemia inferior ao inoculo inicial. Esse resultado indica que não existe multiplicação desse parasitos durante a infecção *in vivo*.

Diferentemente ao observado em animais inoculados com *T. rangeli*, nos camundongos infectados com *Tc*, parasitos foram

detectados somente a partir de 9 d.p.i. (**Figura 37 B**), com dois picos distintos e definidos. O primeiro pico foi atingido no 13° dia e o segundo 18° d.p.i. após a inoculação. Também foi possível observar através da parasitemia a proliferação de *Tc*, uma vez que nestes animais foram detectados quatrocentas vezes mais parasitos do que o inoculo inicial. Estes parasitos persistiram na circulação mesmo após o término das contagem, 35 d.p.i. (**Figura 37 B**). Os resultados encontrados para *Tc* permite-nos considerá-lo como controle interno dos ensaios de infecção *in vivo*, uma vez que segue o padrão de parasitemia descrito na literatura.

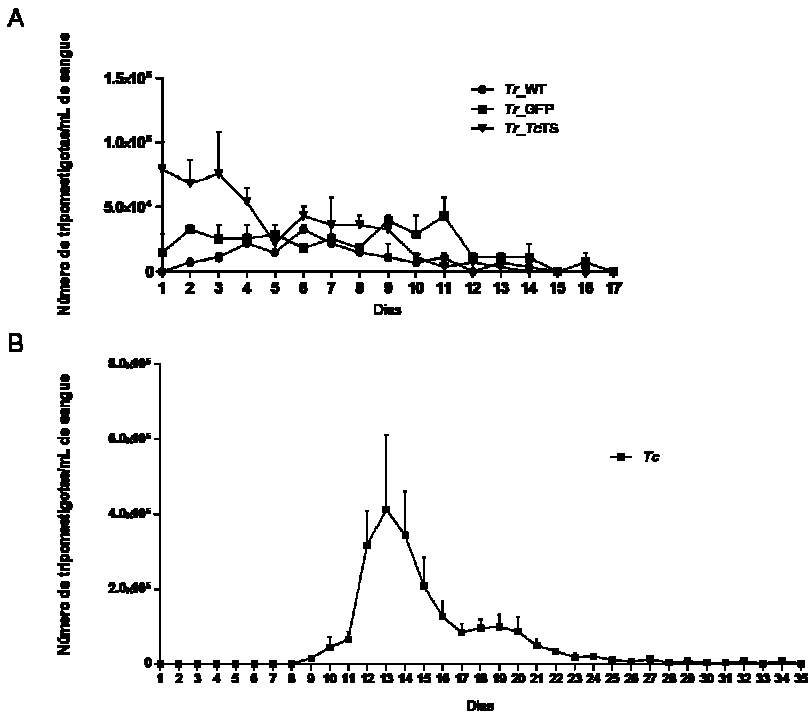


Figura 37. A cepa *Trypanosoma rangeli* expressando a *TcTS* (*Tr_TcTS*) permanece com perfil similar as outras cepas de *T. rangeli* e ausência de multiplicação em camundongo BALB/c. Gráfico mostra a cinética parasitêmica na infecção por *T. rangeli* e *T. cruzi* em modelo murino. Camundongos BALB/c (A) inoculados com 5×10^5 tripomastigotas sanguíneos das cepas *T. rangeli* selvagem (*Tr_WT*), *T. rangeli* GFP (*Tr_GFP*) e *T. rangeli TcTS* (*Tr_TcTS*) ou (B) 10^3 tripomastigotas de *T. cruzi* (*Tc*), por animal. Os valores correspondem à média e desvio padrão da parasitemia de três animais.

4.7.2 Parasitemia em camundongos C57BL/6

Tendo em vista o grande desvio encontrado com o uso de apenas três camundongos no experimento de parasitemia com camundongos

BALB/c e a possibilidade de realizar ensaios futuros em animais *knockout*, em primeiro lugar, calculamos o n amostral com base na equação de diferença entre médias, e em segundo, realizamos a nova parasitemia em camundongos C57BL/6, uma vez que este animal possui uma série de linhagens *knockout* que poderiam ser usadas futuramente.

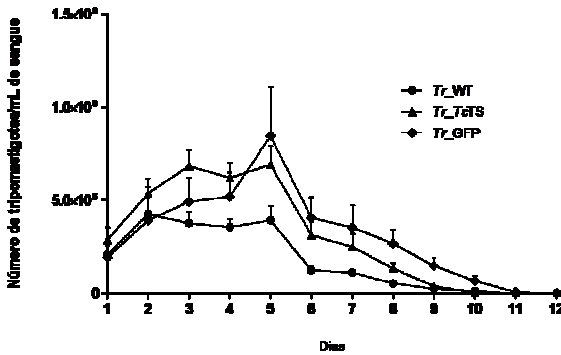
Usando a equação de diferença entre duas médias (**Figura 5**), realizamos o cálculo utilizando o tamanho de efeito de 800.000 e desvio padrão de 460.000, ambos baseados nos resultados de experimento prévio apresentado no item (4.7.3), com nível de significância de 5% ($\alpha=0,05$) e Poder de 80%. Nosso cálculo de amostra foi de cinco camundongos (5,18) por grupo. Acrescentamos um animal extra por grupo, uma vez que consideramos a mortalidade existente neste tipo de experimento, totalizando seis camundongos C57BL/6 por grupo experimental.

Para a nova parasitemia, seis camundongos C57BL/6 foram inoculados com formas tripomastigotas de cultura de *Tc*, *Tr_WT*, *Tr_GFP* e *Tr_TcTS*, sendo a parasitemia monitorada diariamente. No dia subsequente à inoculação foram observados tripomastigotas na corrente sanguínea de animais infectados com todas as cepas de *T. rangeli*. O pico da parasitemia foi atingindo 5 dias após a infecção, não sendo mais detectados parasitos 11 d.p.i. Através da comparação do número de parasitos no inóculo inicial e o número encontrado no pico de parasitemia, a proliferação de *T. rangeli* também não foi detectada nestes animais (**Figura 38A**). Com esses resultados, mais uma vez, concluímos que a cepa *Tr_TcTS* permanece com o perfil similar as outras cepas de *T. rangeli* quando avaliada na infecção de camundongos

C57BL/6 e que também não há nenhuma evidência de multiplicação celular para nenhuma cepa de *T. rangeli*.

Já para *Tc* (**Figura 38B**), os parasitos foram detectados somente entre 6 e 18 d.p.i. A cinética parasitêmica em camundongos para esse parasito revelou dois picos distintos, sendo o primeiro atingido no nono dia e o segundo e mais expressivo 11 d.p.i. Também observamos um novo e pequeno aumento no 16° dia d.p.i. Através dessa parasitemia, também foi possível detectar a proliferação de *T. cruzi*, uma vez que nestes animais foram detectados oitenta vezes mais parasitos do que no inoculo inicial. A parasitemia observada para o *T. cruzi* apresentou-se como característica para essa cepa de parasito, sendo utilizada como controle interno do experimento.

A



B

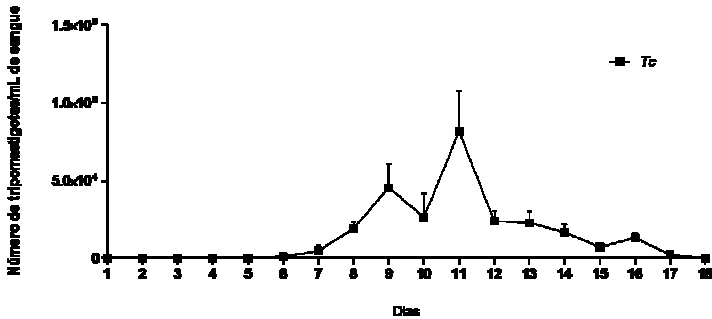


Figura 38. Perfil similar entre a cepa *Trypanosoma rangeli* TcTS e as outras cepas de *T. rangeli* e ausência de multiplicação em camundongos C57BL/6. Gráfico mostra a cinética parasitêmica na infecção por *Trypanosoma rangeli* e *Trypanosoma cruzi* em modelo murino. Camundongos C57BL/6 (A) inoculados com 5×10^7 tripomastigotas de cultura das cepas *T. rangeli* selvagem (*Tr_WT*), *T. rangeli GFP* (*Tr_GFP*) e *T. rangeli TcTS* (*Tr_TcTS*) ou (B) 10^3 tripomastigotas de *T. cruzi* (*Tc*), por animal. Os valores correspondem à média e desvio padrão de parasitemia de seis animais.

4.7.3 Infecção por *Trypanosoma cruzi* em animais BALB/c cronicamente infectados com *Trypanosoma rangeli* *Tr_TcTS*, *Tr_WT* e *Tc*

Um ensaio de desafio piloto foi executado no intuito de avaliar a capacidade de produção de uma resposta imune protetora pelo camundongo a partir de uma infecção prévia com parasitos das cepas de *T. rangeli* e posteriormente desafiados pela infecção com *T. cruzi*. Dois camundongos BALB/c de cada grupo utilizados para a determinação do perfil de parasitemia com as cepas *Tr_WT*, *Tr_GFP*, *Tr_TcTS* e *Tc* foram usados nesse ensaio. Além disso, utilizou-se outros três camundongos BALB/c para uma nova inoculação com *Tc*, como controle da infecção (*Naïve_Tc*) (**Figura 39**).

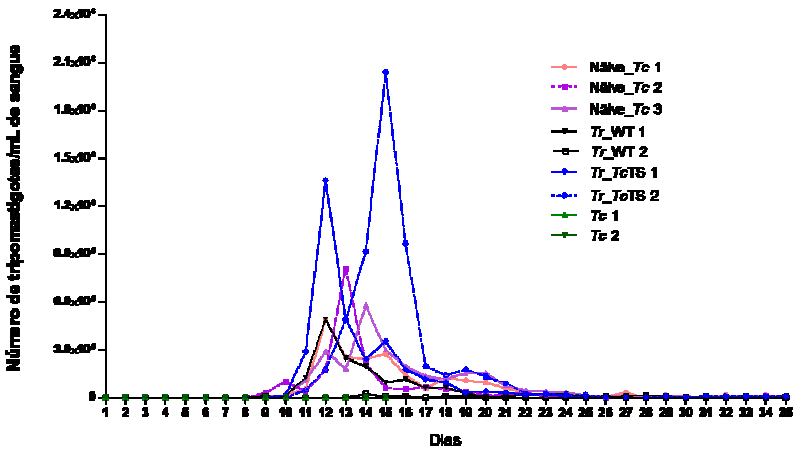


Figura 39. Animais com infecção crônica por *T. rangeli* TcTS apresentam maior parasitemia quando desafiados pela inoculação de parasitos da cepa virulenta Y de *T. cruzi* (*Tc*). Gráfico mostra a cinética parasitária de *T. cruzi* no ensaio piloto. Foram inoculados com 10^3 tripomastigotas de *Tc* de cultura, os camundongos BALB/c que estavam cronicamente infectados por *T. cruzi* (*Tc*) ou *T. rangeli* (*Tr_WT*, *Tr_GFP*, *Tr_TcTS*). Um grupo de camundongos infectados pela primeira vez com *Tc* (Naïve_*Tc*) também foi utilizado. A parasitemia dos animais foram plotadas separadamente no gráfico e as cepas da primeira infecção identificada por tonalidades de diferentes cores: preto *Tr_WT*1 e 2; azul *Tr_TcTS*1 e 2; verde *Tc*1 e 2 e rosa representam os inoculados pela primeira vez com *T. cruzi* (Naïve_*Tc*1-3).

Os parasitos foram detectados a partir de 9 d.p.i. em todos os animais infectados com cepas do *T. rangeli* e naqueles de nova infecção com *T. cruzi*. Nos animais *Tc*, já infectados previamente, não foi detectado nenhum parasito nos 15 dias avaliados. A cinética parasitária dos animais positivos revelou um mesmo perfil de curva,

embora houve variação temporal nos eventos entre os indivíduos. O perfil das curvas apresenta dois picos distintos, o que é esperado para uma infecção com *T. cruzi*. Sendo, o primeiro pico maior e o segundo, menor e ocorrendo com uma diferença de 3 a 4 dias. Também foi possível observar através da parasitemia que os dois animais que foram infectados previamente com *Tr_TcTS*, chegaram a níveis de parasitemia maiores do que os outros animais, sendo que o pico dos dois indivíduos deste grupo possui uma diferença de três dias entre eles. Isto é, apesar da variação temporal entre os picos encontrados para os animais *Tr_TcTS*, o perfil da parasitemia apresentado é similar entre eles e visualizamos níveis superiores de parasitemia de *Tc* para este grupo comparativamente com os demais grupos avaliados.

Para excluir da análise estatística a variação temporal existente entre os camundongos de cada grupo, consideramos apenas o número de parasitos no pico da parasitemia para cada grupo, *Naïve_Tc*, *Tr_WT* e *Tr_TcTS*. O grupo *Tc* foi excluído dessa análise por não apresentar parasitemia visível em nenhum momento do experimento. Observamos que os animais inoculados previamente com a cepa *Tr_TcTS*, possuem um número de parasitos no pico da parasitemia maior quando comparado as outras cepas do parasito no ensaio (**Figura 40**). Isso pode ser indicativo de que, ao invés de promover proteção contra a infecção com *T. cruzi*, a infecção prévia com essa cepa de parasito induz uma maior parasitemia nos animais desafiados com *Tc*. Ressaltamos que este é apenas um experimento piloto e que novos ensaios já estão em execução com um número amostral maior para a confirmação dos resultados.

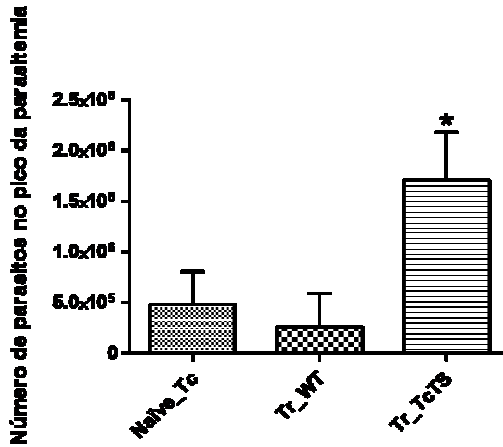


Figura 40. Infecção com *T. rangeli* TcTS (*Tr_TcTS*) torna os camundongos mais susceptíveis a altas parasitemias de *T. cruzi* (*Tc*). No gráfico, número de parasitos no pico da parasitemia em ensaio piloto em camundongos cronicamente infectados com as cepas *T. rangeli* selvagem (*Tr_WT*) e *T. rangeli* TcTS (*Tr_TcTS*) e desafiados com a cepa de *T. cruzi* (*Tc*). Naïve_*Tc* é o grupo controle de camundongos infectado apenas uma vez com *T. cruzi*. * indica diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$). Os dados representam a média e desvio padrão do número de parasitos no pico da parasitemia para cada grupo, Naïve_*Tc*, *Tr_WT* e *Tr_TcTS*. Aplicou-se o teste estatístico *One Way Anova* e o pós-teste de Bonferroni.

4.7.4 Infecção por *Trypanosoma cruzi* em animais C57BL/6 cronicamente infectados com *Trypanosoma rangeli* *Tr_TcTS*, *Tr_WT* e *Tc*

Um ensaio de desafio foi executado no intuito de avaliar a hipótese da indução de uma resposta imune protetora pelo camundongo a partir de uma infecção prévia com parasitos das cepas de *T. rangeli* e posteriormente desafiados pela infecção com *T. cruzi*. Após a infecção-desafio, os parasitos foram detectados a partir de 3 d.p.i. no sangue todos os animais infectados com cepas do *T. rangeli* e naqueles de nova infecção com *T. cruzi* (**Figura 41**). Nos animais previamente infectados com *Tc* não foi detectado nenhum parasito nos 27 dias de seguimento da parasitemia. A cinética parasitêmica dos animais positivos revelou um padrão de parasitemia esperado para uma infecção por *T. cruzi*, apresentando dois picos distintos. O primeiro pico com um maior numero de parasitos e um segundo, observado após 5 dias do primeiro, com um menor numero de parasitos (**Figura 41**). Também é possível observar na Figura 31 que os dois animais que foram infectados previamente com a cepa *Tr_TcTS*, apresentaram níveis de parasitemia maiores do que os outros animais infectados com as cepas *Tr_WT* e *Tr_GFP*. Desta forma, além de não promover uma proteção cruzada, a infecção prévia com a cepa *Tr_TcTS* induziu uma maior parasitemia nos animais desafiados com *Tc*.

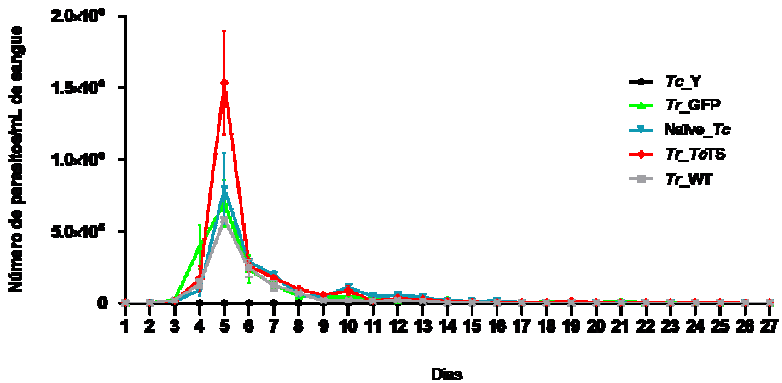


Figura 41. Camundongos C57BL/6 previamente infectados por *T. rangeli* TcTS apresentam maior parasitemia quando desafiados pela inoculação de parasitos da cepa virulenta Y de *T. cruzi* (*Tc*). Gráfico mostra a cinética parasitêmica de *T. cruzi* no ensaio piloto. Foram inoculados com 10^3 tripomastigotas de *Tc* sanguíneos, os camundongos C57BL/6 que estavam cronicamente infectados por *T. cruzi* (*Tc*) ou *T. rangeli* (*Tr_WT*, *Tr_GFP*, *Tr_TcTS*). Um grupo de camundongos infectados pela primeira vez com *Tc* (*Naive_Tc*) também foi utilizado. Os valores correspondem à média e desvio padrão de parasitemia de quatro animais.

5. DISCUSSÃO

Parasito é um organismo agressor que se relaciona com um hospedeiro em uma associação na qual existe unilateralidade de benefícios, sendo prejudicado o hospedeiro associado (NEVES *et al.*, 1974). A relação entre dois seres vivos depende e é influenciada por uma série de fatores, que vão desde o genético/molecular, até os de ordem comportamental. Para os parasitos do gênero *Trypanosoma*, que incluem organismos unicelulares eucarióticos, o fator molecular é de extrema importância, já que a modificação de alguns poucos genes, ou moléculas é capaz de alterar completamente a relação deste com o entorno. Para o *T. cruzi*, esta afirmação é corroborada pela existência de vários trabalhos de caracterização de cepas oriundas de diferentes regiões geográficas, hospedeiros e vetores. Observa-se, nesses trabalhos, que dependendo do marcador ou conjunto de características utilizadas, a classificação pode ser bastante alterada (SOUTO *et al.*, 1996; MACEDO *et al.*, 2004; ZINGALES *et al.*, 2009; GUHL; RAMÍREZ, 2011). Ainda dentro do gênero *Trypanosoma*, existem espécies relacionadas e que apresentam conjuntos de moléculas de superfície muito semelhantes, sendo estas a primeira interface de interação do parasito com seus hospedeiros. Dentre estes organismos encontram-se espécies que podem deflagrar uma infecção com quadros clínicos graves em humanos, enquanto para outras, nenhum indício de estabelecimento de doença ou comprometimento clínico nesse hospedeiro são detectados. Estes são os casos de *T. cruzi* e *T. rangeli*, que são espécies relacionadas e que possuem inúmeras semelhanças, embora interajam de maneira extremamente diferenciada com seus hospedeiros (GRISARD

et al. 1999; DEVERA *et al.*, 2003; ZÚÑIGA *et al.*, 2007; YOSHIDA *et al.*, 2008).

Neste sentido, sabe-se que alguns protozoários pertencentes ao gênero *Trypanosoma* possuem uma enzima singular expressa em sua superfície e capaz de clivar o ácido siálico dos glicoconjugados das células do hospedeiro e transferi-lo para proteínas tipo mucinas em sua própria superfície, a trans-sialidase (SCHENKMAN *et al.*, 1994). A importância desse processo para a interação dos parasitos é evidenciada pela existência de centenas de genes que codificam para as TS e mucinas no genoma de *T. cruzi* (FRASCH, 2000). Para o *T. rangeli* as sialidases encontradas são ativas, mas ainda não foram descritas proteínas com atividade enzimática de transglicosidase, como as encontradas em *T. cruzi* (PONTES-DE-CARVALHO *et al.*, 1993; BUSCHIAZZO *et al.*, 1997; PARIS *et al.*, 2005). Apesar deste parasito possuir genes similares às TS e mucinas em seu genoma (www.rangeli.lncc.br) e haver a expressão destas proteínas pelo parasito (WAGNER *et al.*, 2013), não possui atividade de transglicosidase, fato que pode ser investigado como uma das possíveis causas da não patogenicidade deste organismo para humanos. Dessa forma, o estabelecimento de uma linhagem de *T. rangeli*, expressando de maneira heteróloga uma TS ativa de *T. cruzi* e sua posterior utilização em ensaios de interação *in vivo* e *in vitro*, torna-se atrativos para elucidar alguns pontos ainda não esclarecidos para estes parasitos.

Nesse sentido, a transfecção de *T. rangeli* da cepa Choachí com uma TS ativa de *T. cruzi* foi realizada. Em relação à expressão das proteínas heterólogas pelas cepas trasfectadas, os ensaios de *Western blot* revelaram que, com o uso do anticorpo anti-*TcTS* sítio catalítico,

houve o reconhecimento de inúmeras bandas inespecíficas, o que pode ser explicado por se tratar de um soro policlonal. Apesar destas bandas inespecíficas, uma de maior intensidade com aproximadamente 70 kDa foi observada nas amostras de parasitos transfectados com pTEXeGFP-*TcTS*, estando de acordo com o tamanho da *TcTS* predito pelo programa *Protparam*. Além disso, foram observadas algumas bandas entre 100 e 200 kDa para as amostras de epimastigotas e tripomastigotas de *T. cruzi*, que correspondem aos tamanhos encontrados na literatura referentes a região do sítio catalítico de ~70kDa somada a região das repetições C-terminais SAPA que podem estar presentes em número variável entre as proteínas da família das TS (COLLI, 1993; SCHENKMAN, 1994; FRASCH, 2000).

Para comprovar os resultados acima descritos, bem como certificar que a cepa *T. rangeli-TcTS* não possui as repetições C-terminais, também utilizou-se o anticorpo anti-*TcTS* SAPA, que reconhece de maneira específica as repetições de 12 aminoácidos na porção C-terminal desta proteína, denominadas SAPA. Como esperado, as únicas bandas reconhecidas estão no extrato proteico de tripomastigotas de *T. cruzi*, com uma faixa de tamanho correspondente ao observado para o primeiro anticorpo, referente à TS com número variável de repetições na porção C-terminal (BUSCAGLIA, 2006). Outro dado que pode ser visualizado é a expressão estágio-específica da TS para *T. cruzi*, já que as bandas, reconhecidas em epimastigotas deste parasito com o anticorpo anti-*TcTS* sítio catalítico, são menos expressivas do que as encontradas para formas tripomastigotas, além do que, com a utilização do anticorpo anti-*TcTS* SAPA, não houve reconhecimento para esta forma evolutiva de *T. cruzi*. Este dado está de

acordo com o descrito por Schenkman e colaboradores (1994), em que a proteína TS é expressa de forma mais abundante e em sua conformação completa (oligomerizada e contendo a região responsável pela âncora de GPI e repetições SAPA), somente em tripomastigotas de *T. cruzi*, que é a forma infectante do parasito.

A ausência de bandas reconhecidas pelo o anticorpo anti-*TcTS* SAPA nas amostras transfectadas corrobora com a sequência encontrada nas análises pós-sequenciamento plasmidial. Desta forma, no plasmídeo construído excluiu-se a porção C-terminal da *TcTS*, em que se encontram as repetições, estando presente somente a porção N-terminal desta proteína que é sabidamente responsável pela atividade enzimática (SCHENKMAN *et al*, 1994; FRASCH, 2000).

O anticorpo anti-GFP reconheceu uma banda de aproximadamente 26 kDa para o *T. rangeli* transfectado com o plasmídeo pTEXeGFP e uma banda de cerca de 100 kDa para as cepas transfectadas com o plasmídeo pTEXeGFP-*TcTS*. A hipótese formulada é de que houve a fusão da *TcTS* e da GFP expressas pelo *T. rangeli-TcTS*, uma vez que o tamanho encontrado é próximo a soma das massas teóricas das duas proteínas. Outro resultado que corrobora com esta hipótese é o reconhecimento pelo anticorpo anti-*TcTS* sítio catalítico de uma banda de intensidade semelhante, de cerca de 100 kDa, apenas nos extratos *T. rangeli-TcTS*, que poderia ser advinda do reconhecimento do produto da fusão das duas proteínas por este segundo anticorpo.

Em tripanosomatídeos, quase todos os genes estão organizados em grupos que são coordenadamente transcritos em precursores de mRNA policistrônicos (VANHAMME *et al*, 1995). Uma vez que, em *T. cruzi*, como nos demais eucariotos, somente mRNAs monocistrônicos

são traduzidos, os precursores de RNA mensageiro (mRNA) policistrônicos devem ser processados até mRNA individuais. Este processamento é feito através de uma combinação de *trans-splicing* 5', clivagem e poliadenilação 3' (URMENYI, 2010)

O *trans-splicing* consiste na adição, *in trans*, de um exon não codificante capeado chamado *spliced leader* (SL), ou mini-exon, à extremidade 5' de cada região codificante presente no pré-mRNA, com tamanho aproximado de 40 nucleotídeos (CLAYTON, 2002). Este processo soluciona o problema da criação de vários mRNA individualmente capeados a partir de um único transcrito policistrônico. Para que o processamento do RNA policistrônico seja efetivo, ambos os eventos, *trans-splicing* e a poliadenilação, devem ocorrer. A sinalização para o *trans-splicing* são, geralmente, sequências ricas em uracila com sítio acceptor AG (CLAYTON, 2002). Já para a poliadenilação, não existe uma sinalização específica, ao contrário, esta ocorre a uma distância fixa ($\pm 100-400$ nucleotídeos, dependendo da espécie), no sentido a montante em relação ao sinal do *splicing* (MATTHEWS *et al.*, 1994).

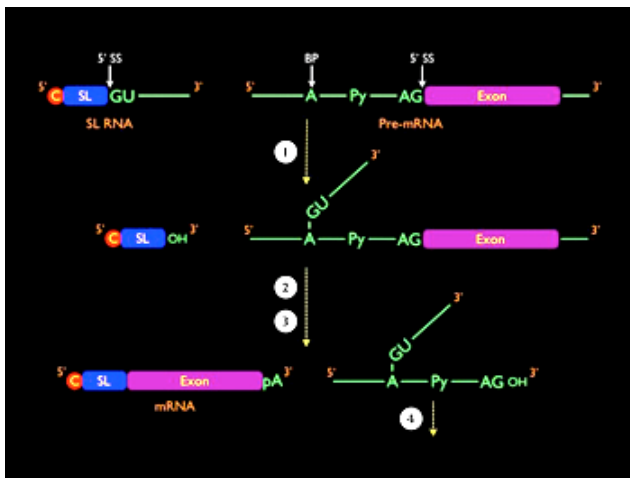


Figura 42. Modelo esquemático representando os mecanismos de *trans-splicing* e poliadenilação do pré-mRNA em *Trypanosoma cruzi*. Representação esquemática do processamento do pré-mRNA. O sítio acceptor de *splicing* 5' (5' SS), o sítio acceptor 3' (3' SS) e o ponto de ramificação (BP) estão indicados. C, cap 5'; SL, *spliced leader*; Py, região de polipirimidina; pA, cauda poli(A). 1, primeira reação de transesterificação; 2, segunda reação de transesterificação; 3, clivagem e poliadenilação; 4, desramificação e degradação do intermediário em Y. Representação não está em escala. Adaptado de: Liang *et al.*, 2003.

Analisando a sequência do plasmídeo pTEXeGFP-*TcTS*, a região entre os genes da *TcTS* e da GFP, contém apenas 39 nucleotídeos, dentre os quais não se forma uma sequência rica na base pirimídica uracila com a terminação AG do sítio acceptor. Dessa forma, o *trans-splicing* não ocorreria entre *TcTS*/GFP, gerando apenas um mRNA com ambas as sequências. Apesar de ambas as sequências estarem na fase correta de leitura e possuírem códons de parada, a fusão pode ser decorrente do

pequeno número de aminoácidos entre as sequências resultando em um processamento não eficiente durante a tradução.

A menor intensidade das bandas para o anticorpo anti-GFP para as amostras de *T. rangeli* transfectadas com pTEXeGFP-*TcTS*, pode ser resultante da maior dificuldade no processamento da GFP, já que esta, está situada posteriormente na construção do plasmídeo. Desta maneira, a proteína com processamento comprometido está sendo degradada com maior frequência. A hipótese de fusão pode ser embasada com os resultados encontrados para a fluorescência direta. Esta mostra, com maior frequência, um padrão pontual de fluorescência do que as amostra transfectadas somente com pTEXeGFP. Isso poderia ser o resultado da internalização da proteína truncada por vacúolos para sua degradação ou ainda, sua deposição em corpos de inclusão.

Na avaliação das características dessa nova cepa, *T. rangeli TcTS* (*Tr_TcTS*) foi comprovado que o crescimento dos parasitos transfectados, tanto com o plasmídeo pTEXeGFP (Controle) e pTEXeGFP-*TcTS*, foi similar ao *T. rangeli* selvagem (*Tr_WT*). Estas mesmas três cepas foram capazes de diferenciar-se em formas tripomastigotas, sendo a expressão das proteínas heterólogas confirmada através de ensaios de *Western blot*, após a diferenciação. Outro fator importante a ser considerado é a localização do sítio de expressão da proteína heteróloga no parasito. As trans-sialidases de *T. cruzi* tem sua principal ação na superfície do parasito, ancoradas na membrana por GPI, ou sendo depois clivada e liberada na circulação do hospedeiro (SCHENKMAN *et al.*, 1994; FRASCH, 2000). A ausência de peptídeo sinal e a âncora de GPI na sequência da *TcTS* presente no plasmídeo pTEXeGFP-*TcTS*, encontradas pelos programas *SignalP 4.0* e *Predgpi*,

levantaram o questionamento se a proteína heteróloga estaria sendo endereçada para a membrana, uma vez que, segundo outra análise *in silico* realizada pelo programa *Phobius*, a sequência continha uma grande região não-citoplasmática. Neste contexto, foi realizada imunofluorescência indireta (RIFI), em parasitos permeabilizados e não-permeabilizados, em que apontamos a possibilidade da proteína estar na membrana. Como somente dispunha-se de um antissoro com um elevado grau de inespecificidade no momento em que foram realizadas as análises por RIFI, realizou-se uma extração das proteínas de membrana para esclarecer este aspecto. Em análises a partir dos extratos proteicos enriquecidos com proteínas de superfície em *Western blot* encontrou-se a proteína *TcTS*, o que corrobora com a hipótese de que a proteína poderia estar presente na membrana do parasito e que, possivelmente, isso ocorra devido a seu caráter hidrofóbico. Também podemos observar que a expressão da proteína é detectada para ambas as formas do parasito, epimastigotas e tripomastigotas, uma vez que tem sua expressão episomal e dependente apenas de estímulo externo.

Além da localização da proteína avaliou-se a presença de atividade de trans-sialidase nos parasitos transfectados. Em ensaios preliminares mostrou-se que epimastigotas de *T. rangeli* selvagem não apresentam atividade deste tipo e já a cepa *Tr_TcTS* foi positiva para a atividade de TS (GRANUCCI, 2010). No presente trabalho, a realização de um novo e padronizado ensaio de atividade confirmou a ausência de atividade TS para formas epimastigotas de *Tr_WT*, além de demonstrar que a forma tripomastigota, desta mesma cepa, e ambas as formas de *Tr_GFP* também não possuem atividade de TS. Já para ambas as formas de *Tc* da cepa Y, os resultados seguem o esperado teórico, no qual a

forma tripomastigota apresenta atividade superior à forma epimastigota. A atividade de TS foi confirmada para as duas formas de *Tr_TcTS*, apresentando o mesmo nível de atividade. Como a expressão e atividade desta proteína estão vinculadas, principalmente, ao processo de infecção do hospedeiro mamífero pelo *T. cruzi*, as TS aparecem em maior quantidade e com maior nível de atividade na forma infectante para este hospedeiro (FRASCH, 1994).

No andamento do presente trabalho, o genoma de *T. rangeli* foi sequenciado e pôde-se ter acesso ao banco de dados, onde uma sequência de Sialidase dessa espécie foi identificada e realizamos algumas análises *in silico*. A sequência nucleotídica obtida para o gene da *TrSial* revelou grau de identidade aminoacídica com a *TcTS*, de *T. cruzi* é de 65,6% e similaridade de 76,3%. Essas porcentagens se devem principalmente a inexistência do domínio SAPA para a *TrSial*, além das substituições não conservadas de aminoácidos ao longo da sequência. A *TrSial* foi analisada quanto à presença de âncora de GPI por dois programas distintos. Este elemento é importante para a ancoragem, temporária ou não, de muitas proteínas à membrana, especialmente nas regiões de balsas lipídicas (FERGUSON, 1997; ALBERTS *et al.*, 2002). Os resultados dessas análises foram concordantes e mostraram que a *TrSial* possui sítio previsto para âncora de GPI, o que sugere que essa enzima se encontra integralmente na superfície externa do *T. rangeli*. Esse resultado corrobora com o que foi encontrado anteriormente, quanto à probabilidade da proteína possuir um sistema de ancoramento e estar na superfície do parasito. Esta ideia é ainda reforçada quando considera-se a localização das TS de *T. cruzi*, as quais estão dispostas na

membrana do parasito e ancoradas por GPI (COLLI, 1993; SCHENKMAN *et al.*, 1994; FRASCH, 2000).

A respeito dos sete aminoácidos que fazem parte do sítio catalítico na proteína de *T. cruzi*, todos eles são conservados para a sialidase de *T. rangeli*. Dessa forma, não se pode atribuir à falta de atividade TS por uma simples substituição nos aminoácidos pertencentes ao sítio catalítico. Fato este, que pode ser observado entre as próprias trans-sialidasas de *T. cruzi*, onde em alguns casos apenas uma substituição do aminoácido Tirosina na posição 342 por uma Histidina, já é suficiente para a perda da atividade enzimática (CREMONA *et al.*, 1995). O alinhamento utilizando o programa *WebLogo* evidencia que existem alterações aminoacídicas não conservadas entre as sequências e ao longo de toda ela. Desta forma, a provável ausência de atividade da *TrSial* presente em *T. rangeli* seja devido a um conjunto de alterações na sequência e não algo pontual. No trabalho de Paris e colaboradores (2005), somente após realizarem seis mutações ao longo da sequência de uma sialidase de *T. rangeli*, sendo estas em Met96-Val, Ala98-Pro, Ser120-Tyr, Gly249-Tyr e Gln284-Pro, foi possível obter uma proteína com atividade de transglicosidase. Além disso, a ideia de que diversas alterações não relacionadas ao sítio catalítico são capazes de resultar na falta de atividade TS para a sialidase de *T. rangeli*, pode ser vista na análise cuidadosa das trans-sialidasas de *T. cruzi* realizada por Cremona e colaboradores (1995). Esta aponta um conjunto de proteínas inativas da super família TS para este parasito, que embora mantenham conservados os aminoácidos do sítio catalítico, possuem diversas alterações em sua sequência que resultam na falta de atividade.

Para avaliar o comportamento da cepa *T. rangeli* TcTS em completar o ciclo de vida no hospedeiro invertebrado tentou-se, primeiramente, realizar a alimentação artificial de *R. prolixus* usando uma membrana de látex e não foram obtidos resultados satisfatórios. A alimentação artificial usando uma membrana sintética e sangue desfibrinado é uma ferramenta que foi usada em diversos momentos na literatura (ZELEDÓN; BLANCO, 1965; RIBEIRO; GARCIA, 1981; GARCIA *et al.*, 1989; SOUZA *et al.*, 1991; ROCHA *et al.*, 1997; BORGES *et al.*, 2006), embora já em 1965, Zeledón e colaboradores fazem uma ressalva, na qual dizem que não se pode considerar, os resultados encontrados por meio desta metodologia, como sendo um reflexo do que ocorre no ambiente natural, uma vez que as condições experimentais são bastante modificadas. Neste mesmo trabalho, são apresentados o tempo e as porcentagens de infecção encontradas com essa técnica, que quando comparados aos ensaios utilizando alimentação tradicional, ou seja, repasto sanguíneo em um hospedeiro vertebrado infectado, ou inoculação direta na cavidade intracelômica, percebe-se a necessidade de um período maior de tempo para os parasitos chegarem a hemolinfa, além de porcentagens mais baixas.

Por este motivo, realizamos então para a inoculação intracelômica de formas epimastigotas em ninfas de *R. prolixus*. Uma alta mortalidade das ninfas inoculadas com as cepas transfectadas foi observada e por esse motivo, realizou-se um experimento para avaliar a relação da presença de G-418 e a mortalidade das ninfas de triatomíneos. Na comparação das taxas cumulativas de sobrevivência dos triatomíneos inoculados com G-418, encontrou-se que as taxas de sobrevivência para os grupos que foram inoculados com as doses de 100 µg/ml ou 500

$\mu\text{g/ml}$ foi menor quando comparadas ao grupo inoculado somente com PBS. O G-418 ou, comercialmente, chamado de Geneticin[®] (Invitrogen) é análogo da neomicina e como análogo liga-se ao ribossomo 80S ou 30S interferindo no funcionamento destas estruturas em células eucarióticas e procarióticas, respectivamente (JIMENEZ; DAVIES, 1980; COLBBRE-GARAPIN *et al.*, 1981; SOUTHERN; BERG, 1982). Com estas informações se poderia hipotetizar que o G-418, presente no sobrenadante das culturas de parasitos tranfectados, estaria interagindo primeiramente com os hemócitos, células abundantes na hemolinfa dos triatomíneos e responsáveis pela imunidade inata dos insetos, causando grande mortalidade deste tipo celular. Com o desbalanço imunológico, causado pela baixa de hemócitos, as bactérias que estão naturalmente presentes ou que foram colocadas pela manipulação dos triatomíneos no momento da inoculação, poderiam multiplicar-se e causar a morte dos insetos. Essa ideia pode ser corroborada pelos trabalhos que usam o G-418 como agente seletor em culturas de células de inseto. Os tipos celulares usados variam, com células de embrião de *Bombyx mori* (OKANO *et al.*, 1992), de ovário de *Trichoplusiani* (DEO; PARK, 2006) até células somáticas Kc de *Drosophila* sp. consideradas como "macrófagos-like" (MAISONHAUTE; ECHALIER, 1986) e que teriam certa similaridade com os hemócitos.

Resolvido o problema de mortalidade das ninfas inoculadas com as culturas tranfectadas, realizamos o experimento para observar o comportamento das cepas frente à infecção da hemolinfa e glândulas salivares. No primeiro ensaio, podemos notar que os triatomíneos inoculados com *Tr*_WT e *Tr*_GFP tiveram suas glândulas infectadas com três e dez semanas, respectivamente, onde encontraram-se formas

tripomastigotas metacíclicas. Já para a cepa de *Tr_TcTS* nenhuma infecção foi vista nestas estruturas até a 16^o semana, o que seria um forte indício de que a proteína estaria interferindo na infecção do parasito sobre as glândulas salivares de *R. prolixus*. Alguns experimentos já demonstraram que culturas de parasitos mantidas *in vitro* por períodos prolongados possuem alteração em sua infectividade. Além disso, segundo estudos anteriores realizados com o marcador fluorescente, este não deveria causar alterações no crescimento e infectividade dos parasitos transfectados com a GFP (ALMEIDA, 2005; PIRES *et al.*, 2007; FLORENCIO-MARTÍNEZ *et al.*, 2010). Como a cepa *Tr_GFP* mostrou infectividade alterada em relação ao controle selvagem e as culturas da cepa *Tr_TcTS* passaram por longo período de seleção *in vitro*, mais um experimento foi executado. Desta maneira, a fim de retirar esse possível viés, as cepas de *Tr_WT* e *Tr_TcTS* foram re-isoladas por hemocultura de camundongo para o segundo experimento de infecção de *R. prolixus*. Nesta nova infecção, após seis semanas observou-se 92% dos pares de glândulas positivos para a presença de tripomastigotas metacíclicos da cepa *Tr_WT*, contra apenas 16% da cepa *Tr_TcTS*. Com este resultado podemos aceitar a afirmação de que a manutenção das culturas de parasitos *in vitro* por períodos prolongados pode incluir um viés nesse tipo de experimento, já que, no segundo experimento conseguiu-se observar tripomastigotas da cepa *Tr_TcTS* na glândula salivar já na sexta semana. Mesmo assim, a cepa *Tr_TcTS* ainda apresenta uma mudança em sua capacidade infectante perante o hospedeiro invertebrado, *R. prolixus*. Esta mudança está relacionada, possivelmente, à presença da proteína heteróloga *TcTS*, uma vez que, foram utilizados parasitos de culturas recém isoladas, além

de que a expressão desta proteína foi confirmada nos parasitos presentes na hemolinfa a concentrações elevadas e durante longos períodos de tempo.

Para corroborar com o proposto acima, Basseri e colaboradores (2002), em ensaios de inibição da infecção de glândulas salivares de *R. prolixus* por *T. rangeli*, evidenciou-se que a pré-incubação das glândulas ou dos parasitos com diversos açúcares (N-acetil-D-glicosamina (GlcNAc), N-acetil-D-galactosamina (GalNAc), galactose, fucose, manose e glicose) diminuía sobremaneira a infecção destas estruturas pelos parasitos. Cogitou-se que as proteínas do tipo lectinas, que estão na superfície de ambos, glândula salivar e parasito, são ávidas por açúcares e uma vez ligadas a estes interferem na interação com os açúcares presentes na superfície das glândulas/parasitos resultando, então, na não adesão/infecção dos parasitos às glândulas salivares. Já no trabalho que discute a interação de *T. cruzi* ao epitélio do intestino posterior em sítios específicos da membrana perimicrovilar, aponta-se que durante a passagem dos parasitos no trato intestinal do inseto, proteínas hidrofóbicas da superfície das formas epimastigotas e glicoproteínas da membrana perimicrovilar são responsáveis pela adesão destes parasitos (ALVES *et al.*, 2007). Neste mesmo trabalho, demonstra-se a influência de carboidratos na adesão do parasito ao intestino do inseto, uma vez que ocorre a inibição desse processo para o parasito que foi pré-incubado com diversos açúcares, GlcNAc, GalNAc, N-acetil-manosamina, D-galactose, D-manose e ácido siálico, com destaque ao ácido siálico. A participação das TS neste cenário é posteriormente cogitada no trabalho de revisão de Rubin-de-Celis e Schenkman (2012), uma vez que essa enzima interage com ácido siálico

da membrana das células. Neste contexto, pode-se pensar que a menor infectividade dos parasitos *Tr_TcTS* nas glândulas salivares dos triatomíneos *R. prolixus* no ensaio de inoculação realizado neste trabalho, poderia ser causada pela ação da TS ativa que realizaria a transferência de resíduos de ácido-siálico para a superfície do parasito e que este, agora dotado de uma nova carga em sua superfície, não conseguiria aderir-se a monocamada de células formadoras das glândulas e desta forma impediria ou interferiria de maneira negativa na infecção desta estrutura por estes parasitos.

Já com o intuito de aprofundar o estudo do papel da *TcTS* na infecção celular em mamíferos, bem como apontar indícios da presença ou ausência de um ciclo intracelular do *T. rangeli* neste hospedeiro, formas tripomastigotas de *Tr_TcTS* foram utilizadas em ensaios de infecção com a linhagem celular Vero. Diversos estudos de interação parasito-hospedeiro já foram realizados com cepas de *T. rangeli* isoladas de diferentes regiões geográficas e distintas linhagens celulares, buscando elucidar o ciclo de vida deste parasito. Em estudo com o clone Ub66-5b da cepa San Agustín de *T. rangeli*, isolada de glândula salivar de *R. prolixus*, Osorio e colaboradores (1995) revelaram a capacidade desta de infectar a linhagem celular U937 (promonócito) em baixas proporções. Em outro trabalho, as cepas SC-58, Macias e Choachí ao interagirem com células Vero e promonócitos J774G.8, foram observadas apenas uma ou duas formas intracelulares, 72 horas após a interação (EGER-MANGRICH *et al.*, 2001). Para os dois estudos, embora os parasitos consigam permanecer viáveis no interior das células por um tempo superior a 144 horas (EGER-MANGRICH *et al.*, 2001) e mais de 25 dias (OSORIO *et al.*, 1995), não existe qualquer evidência de

divisão intracelular para nenhuma das cepas testadas. No experimento de infecção *in vitro* do presente trabalho, a porcentagem de células infectadas para as cepas *Tr_WT* e *Tr_GFP* permaneceu dentro do encontrado na literatura, sendo observadas poucas células infectadas com um ou dois parasitos que podiam ser vistos após 120 horas de infecção. Já para a cepa *Tr_TcTS* foi identificada uma diferença estatística na porcentagem de células infectadas para os tempos T0 e T16. Como a TS em *T. cruzi* está intimamente relacionada à infecção em células de mamíferos pode-se pensar que a expressão heteróloga de TS em *T. rangeli* e a posterior atividade da enzima na superfície do parasito poderiam relacionar-se a maior infectividade observada no ensaio celular para esta cepa transfectada. No entanto, encontra-se no trabalho de Schenkman e colaboradores (2006), que a super expressão de uma *TcTS* ativa em *T. cruzi* não altera a porcentagem de infecção do parasito, embora diminua o tempo de permanência deste nos vacúolos fagocíticos e sua posterior transformação em amastigotas, reduzindo o tempo do ciclo de vida. Já para Carillo e colaboradores (2000), em ensaios usando *Leishmania major* transfectada com uma *TcTS* ativa, mostraram que não houve diferença na invasão destes parasitos frente à linhagem celular de macrófagos RAW 264.7. Sendo assim, pode-se apontar que o resultado da atividade de TS depende do organismo testado, isso, provavelmente, se deva ao resultado da interação e sinergismo dos conjuntos de moléculas presentes em cada espécie e que modificam o quadro final.

A outra característica que foi observada no experimento de infecção *in vitro* foi a capacidade de aderência dos parasitos a membrana das células. Considerando a cepa *Tr_WT* como sendo padrão para aderência para *T. rangeli*, a cepa *Tr_TcTS* apresentou diferenças

estatisticamente significativas somente para o tempo T0, sendo que a relação analisada foi maior para a cepa transfectada. Isto está de acordo com a suposição publicada por Pontes-De-Carvalho e colaboradores (1993), na qual, nas primeiras considerações feitas sobre uma transfecção de uma TS com atividade em *T. rangeli* resultaria em uma maior capacidade de aderência deste parasito à células de mamífero. Nota-se que a cepa de *T. cruzi* possui uma quantidade menor de parasitos aderidos em 100 células. Imagina-se que isso ocorra devido a grande rapidez em que os parasitos entram na célula (incluindo as 3 horas de interação inicial), e não que este possua uma aderência menor em relação a *Tr*_WT. Além disso, podemos observar que esta diferença desaparece nos outros tempos, provavelmente devido à degradação dos parasitos *Tr*_WT que não conseguiram penetrar nas células, já que o número de parasitos aderidos/100 células permanece praticamente o mesmo para *Tc* nos três tempos.

A técnica de RIFI foi utilizada para uma observação mais apurada na busca de indícios de divisão celular dos parasitos internalizados para as cepas de *T. rangeli*. Em relação à divisão celular, os dados estão em concordância com a já citada literatura. Embora os parasitos encontrem-se em formato arredondado, esta característica parece ser referente a um estado de sofrimento, visto que o flagelo, que se torna praticamente invisível nas formas amastigotas típicas vistas para *Tc*, é visível nos parasitos observados para as cepas de *T. rangeli*. Dessa maneira pode-se afirmar que, para as três cepas de *T. rangeli* testadas, não há qualquer indicativo de que realizaram ou de que possuam capacidade de multiplicação intracelular.

Para análise do comportamento dos parasitos *Tr_TcTS in vivo* foi feita a cinética parasitária em camundongos. O perfil das curvas da parasitemia tanto para a cepa selvagem como para as transfectadas em camundongos BALB/c foram bastante similares entre si, embora não seguiram o padrão observado para *T. rangeli* em experimentos anteriores de Morales (2012). Este apresentou um pico de parasitemia bastante pronunciado no quinto dia e não sendo mais observados parasitos na corrente sanguínea no 11º dia. No presente trabalho não foi observado um pico nítido e os parasitos permaneceram visíveis até o 16º dpi. A diferença do encontrado no trabalho de Morales (2012) e no presente estudo, possivelmente, é resultado do uso de tripomastigotas diferenciados *in vitro* no primeiro e formas tripomastigotas sanguíneas no segundo. Sabe-se que existem características destoantes entre esses dois tipos de parasito e que essas diferenças poderiam estar envolvidas nos perfis apresentados por cada uma delas. Já quando os camundongos utilizados foram os C57BL/6, o perfil alterou-se mostrando um pico cinco dias após a infecção e não sendo mais detectados 11 d.p.i. para todas as cepas de *T. rangeli*. Isto é, para estes animais a parasitemia além de mais curta também apresentou um pico evidente para todas as cepas, embora maiores comparações sejam impossibilitadas, visto que, os tripomastigotas usados para este último experimento são provenientes de diferenciação *in vitro*, e como anteriormente comentado este fator já serviria para obtermos diferenças nas parasitemias destas cepas. Neste caso, se observamos as curvas encontradas para a cepa *Tc*, utilizada nos experimentos com ambas as linhagem de camundongos e nos dois casos sendo provenientes da infecção de cultura de células Vero, podemos alegar que, o conjunto complexo de características pertencentes a cada

uma das linhagens de camundongos, exerce fator fundamental no perfil das parasitemias, uma vez que, o comportamento de uma mesma cepa frente a diferentes hospedeiro muda drasticamente. Ressalta-se que, em ambas as linhagens de camundongos e para todas as cepas de *T. rangeli* utilizadas, não foram encontradas quaisquer evidências de multiplicação celular. A esse respeito, alguns trabalhos alegam que existam indicativos de um mecanismo de sobrevivência deste flagelado no hospedeiro mamífero ou mesmo multiplicação. Como demonstrado por Steindel (1993), com isolamentos repetidos do parasito em animais cronicamente infectados, ou em estudos como o de Urdaneta-Morales e Tejero (1986) que, em camundongos, mostram níveis de parasitemia até sete vezes maiores que o inóculo original de parasitos, com a ressalva de que este resultado pode ser devido à contaminação da cultura por outra espécie de tripanosomatídeo. Contrariamente alguns autores, como Añez e colaboradores, (1985) não conseguiram demonstrar a presença de parasitos em camundongos e *Didelphis marsupialis* 50 a 60 dias após a infecção por xenodiagnóstico e hemocultura. Desta forma, a replicação de *T. rangeli* no hospedeiro mamífero permanece sendo uma incógnita, uma vez que os relatos encontrados na literatura permanecem desencontrados e inconclusivos para esse tema.

No ensaio de desafio com a inoculação de tripomastigotas de *T. cruzi* nos camundongos cronicamente infectados pelas cepas *Tr_WT*, *Tr_GFP*, *Tr_TcTS* e *Tc*, primeiramente, não observamos diferença na parasitemia por *Tc* dos animais previamente infectados com a cepa *Tr_WT*, em relação a *Tc_Näive*, mas notamos que existe uma tendência de que o número de parasitos seja menor quando inoculados com esta cepa. Dessa forma, uma infecção prévia com parasitos da cepa *T.*

rangeli poderia estimular a produção de uma resposta protetora contra uma infecção com *T. cruzi*. Na literatura existem trabalhos que corroboram com essa hipótese. No trabalho de Paláu e colaboradores (2003) os camundongos que foram inoculados com tripomastigotas metacíclicos da cepa Choachí 2V obtidos de triatomíneos e re-infectados com cepas virulentas de *T. cruzi* (Tulahuen, SA e clone Dm28c) mostraram diminuição na gravidade da doença, menores níveis de parasitemia e 100% de sobrevivência dos camundongos, quando comparadas aos controles não imunizados. Em outro trabalho ainda, foi observada que duas cepas de *T. rangeli*, Choachí e SC-58, quando usadas como agente vacinal, com parasitos vivos ou fixados e desafiados com a cepa virulenta Tulahuen de *T. cruzi*, produziam um quadro semelhante ao estudo anterior, também com menor parasitemia, um infiltrado inflamatório moderado no coração e músculo esquelético e maiores taxas de sobrevivência (BASSO *et al.*, 2008). Essa proteção contra *T. cruzi* produzida pela interação prévia com parasitos de cepas de *T. rangeli* está possivelmente relacionada à semelhança na molecular entre os dois parasitos. No que diz respeito a diagnósticos falso-positivos e sorologia cruzada entre ambas as espécies, Afchain e colaboradores (1979) em estudo sobre a constituição antigênica solúvel, encontrou que as duas espécies compartilham cerca de 60% desta constituição. Os resultados de outro trabalho demonstraram que o soro de camundongos infectados com *T. rangeli* da cepa C23 reconheceram seis peptídeos derivados de proteínas de *T. cruzi* Y (ZÚÑIGA *et al.*, 2007). Já em 2008, Moraes e colaboradores descreveram que utilizando culturas de tripomastigotas de *T. cruzi* e *T. rangeli* como antígenos em ensaios de imunofluorescência indireta e imunobloting contra o soro de

pacientes chagásicos é possível realizar um diagnóstico diferencial entre ambas as espécies, embora ainda existam reações cruzadas entre os parasitos. Desta forma, pode-se apontar que a semelhança entre as duas espécies é um ponto crucial a ser estudado tanto no sentido de especificar o diagnóstico, como no desenvolvimento de um agente vacinal.

Os ensaios de desafio realizados também revelaram, tanto em camundongos BALB/c como em C57BL/6, uma maior parasitemia por *Tc* nos animais previamente infectados com *Tr_TcTS*. No primeiro, com animais BALB/c notamos que os animais do grupo inoculado com a cepa *Tr_TcTS* possuem um alto número de parasitos no pico da parasitemia, com uma diferença significativa quando comparada as outras cepas do ensaio. No experimento utilizando os animais C57BL/6 o mesmo padrão foi confirmado, sendo a curva de parasitemia maior para os animais imunizados com *Tr_TcTS*. Desta forma, ao invés de promover proteção contra a infecção com *T. cruzi*, a infecção prévia com esta cepa induz uma maior parasitemia nos animais desafiados

Um fator que poderia estar envolvido para esta debilidade dos camundongos que foram inoculados com a cepa *Tr_TcTS* é um prejuízo mecânico e não somente no sentido de produção de resposta imune celular. Os parasitos com maior capacidade de infecção celular, como visto nos ensaios de infecção *in vitro*, poderiam danificar órgãos e por causa desta injúria, no momento em que tripomastigotas de *T. cruzi* fossem usados no desafio dos camundongos, estes já estariam debilitados e ficariam mais expostos a infecção e, portanto seriam mais permeáveis a altas parasitemias. Uma maneira de evitar esse possível viés seria o uso de uma linhagem de *T. rangeli* transfectada com a

porção N-terminal de uma TS inativa ou que contenha apenas a região SAPA, a qual se estabelece como antígeno imunodominante na infecção com *T. cruzi*. Desta maneira espera-se que as cepas transfectadas, por não possuírem atividade TS, apenas sirvam como agente vacinal, promovendo uma resposta protetora contra o parasito patogênico. Outra forma seria utilizar parasitos fixados, uma vez que mostrou-se eficiente este tipo de abordagem no estímulo de proteção em animais desafiados com *T. cruzi*, (BASSO *et al.*, 2008). Em contra partida, em 1995, Chuenkova e Pereira realizaram um experimento em que inoculou-se, por via subcutânea, apenas proteínas purificadas TS de *T. cruzi* em camundongos BALB/c, e observou-se que desafiando os animais com doses de parasitos que antes eram sub-letais, levou-os à morte. No mesmo trabalho, os autores propuseram que o aumento de virulência não estava relacionado a um efeito direto sobre a interação tripomastigota-célula, mas sim na resposta imune celular dos camundongos, uma vez que, em animais com imunodeficiência combinada severa (não possui linfócitos T e B), não existe essa diferença com os controles. Já em estudos feitos com *L. major*, utilizando cepas transfectadas com uma TS ativa de *T. cruzi*, lembrando que esta espécie não a possui naturalmente, demonstrou que a expressão heteróloga da proteína incrementou a virulência deste parasito em infecções a camundongos BALB/c, e este aumento pode ser observado na progressão da lesão, número de parasitos e macro e microscopia da lesão cutânea na pata do animal (CARILLO *et al.*, 2000). Sendo assim, permanece a dúvida no tocante ao papel da atividade de TS e sua presença na relação parasito-hospedeiro.

Podemos afirmar que o conjunto de moléculas de superfície para os parasitos é um fator que influencia marcadamente suas relações com o entorno. Uma evidência desta visão é a obtida neste trabalho, cuja transfecção apenas da porção N-terminal de uma TS ativa de *T. cruzi* em *T. rangeli* conferiu a este último uma mudança de fenótipo em relação a sua infectividade para os hospedeiros invertebrados e vertebrados.

6. CONCLUSÃO

Tomados em conjunto os resultados obtidos, podemos concluir que a expressão da TcTS por *T. rangeli* não altera características como crescimento e diferenciação *in vitro* em culturas axênicas. Entretanto, a expressão dessa proteína pelo *T. rangeli* promove a alteração do padrão de interação *in vitro* com cultura de células Vero, assim como na evolução da infecção nos hospedeiros invertebrado e mamífero, quando comparada à cepa selvagem.

REFERÊNCIAS

- AFCHAIN, D. *et al.* Antigenic make-up of *Trypanosoma cruzi* culture forms: identification of a specific component. **J. Parasitol.**, v.65, n.4, p.507-14, Aug. 1979.
- ALBERTS, B. *et al.* Molecular Biology of the cell. 4^o ed Garland science, Taylor & Francis Group, 2002.
- ALDANA, J. *et al.* Orientación de *Rhodnius prolixus*, vector de la enfermedad de chagas en Venezuela. **Creando revista científica juvenil**, v. 6, p. 41-48, 2006.
- ALMEIDA, J.H. Avaliação da expressão da proteína verde fluorescente pelo *Trypanosoma rangeli* e desenvolvimento de vetor para a transfecção integrativa no parasito. Santa Catarina: UFSC, 53p, 2005.
- ALVES, C.R. *et al.* Trypanosoma cruzi: Attachment to perimicrovillar membrane glycoproteins of *Rhodnius prolixus* **Exp. Parasitol.**, v. 116, p. 44–52, 2007.
- ANDREWS, N. *et al.* A *T. cruzi* secreted protein immunologically related to the complement component C9: evidence for membrane pore-forming activity at low pH. **Cell.**, v. 61, p. 1277-87, 1990.
- ANDREWS, N. W; EINSTEIN, M; NUSSENZWEIG, V. Presence of antibodies to the major surface glycoprotein of *Trypanosoma cruzi* amastigotes in sera from Chagasic patients. **Am J Trop Med Hyg.**, v. 40, p. 46 – 49, 1989.
- AÑEZ, N.; VELANDIA, J.; RODRÍGUEZ, A. M. Estudios sobre *T. rangeli* Tejera, 1920. VIII. Respuestas a las reinfecciones en los mamíferos. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 80, p. 149-153, 1985.
- ASLETT, M *et al.* TriTrypDB: a functional genomic resource for the Trypanosomatidae. **Nucleic Acid Res**, v. 38, p. D457–D462, 2010.
- AZAMBUJA, P. *et al.*. Immune-depression in *rhodnius prolixus* induced by the growth inhibitor, azadirachtin. **J. Insect Physiol.** v. 37, n. 10, p. 771-777, 1991.
- AZAMBUJA, P. *et al.*. Immunity in *Rhodnius prolixus*: trypanosomatid-vector interactions. **Mem Inst Oswaldo Cruz** (94Suppl), v. 1, p. 219-22, 1999.
- AZAMBUJA, P.; GUIMARÃES, J.A.; GARCIA, E.S. Haemolytic factor from the crop of *Rhodnius prolixus*: evidence and characterization. **J. Insect Physiol.** v. 29, p. 833-839, 1983.
- BARRY, J. D. *et al.* Specific mechanisms for activation and expression of variant surface glycoprotein genes in *Trypanosoma brucei*. **Biochem. Soc. Trans.**, v. 18, n. 5, p. 708-10, 1990.

- BASSERI, H.R., TEW, I.F., RATCLIFFE, N.A. Identification and distribution of carbohydrate moieties on the salivary glands of *Rhodnius prolixus* and their possible involvement in attachment/invasion by *Trypanosoma rangeli*. **Exp Parasitol.**, v. 100, p. 226-234, 2002.
- BASSO, B.; MORETTI, E.; FRETES, R. Vaccination with epimastigotes of different strains of *Trypanosoma rangeli* protects mice against *Trypanosoma cruzi* infection. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 103, n. 4, p. 370-374, 2008.
- BECK, E. *et al.* Nucleotide sequence and exact localization of the neomycin phosphotransferase gene from transposon Tn5. **Gene**, v. 19, p. 327-336, 1982.
- BORGES, E.C. *et al.* *Trypanosoma cruzi*: Effects of infection on cathepsin D activity in the midgut of *Rhodnius prolixus*. **Experimental Parasitol.**, v. 112, p. 130-133, 2006.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, v.72, p.248-54, 1976.
- BREGLIA, S. A.; SLAMOVITS, C. H; LEANDER, B. S., Phylogeny of Phagotrophic Euglenids (Euglenozoa) as Inferred from Hsp90 Gene Sequences. **J. Eukaryot. Microbiol.**, v.54, n.1, p. 86-92, 2007.
- BRENER, Z. Life cycle of *Trypanosoma cruzi*. **Rev Inst Med Trop São Paulo.**, v. 13, n. 3, p. 171-8, 1962.
- BRENER, Z., *et al.* *Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, , p. 431, 2000.
- BURLEIGH, B. A; WOOLSEY, A. M. Cell signalling and *Trypanosoma cruzi* invasion. **Cell. Microbiol.** v.11, p. 701-711, 2002.
- BUSCAGLIA, C. A. *et al.* *Trypanosoma cruzi* surface mucins: host-dependent coat diversity, **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 4, p. 229-236, 2006.
- BUSCHIAZZO, A. *et al.* Sequence of a *Trypanosoma rangeli* gene closely related to *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase. **MoL Biochem. Parasitol**, v. 62, p. 115-116, 1993.
- BUSCHIAZZO, A.; CAMPETELLA, O.; FRASCH, A. C. *Trypanosoma rangeli* sialidase: cloning, expression and similarity to *T. cruzi* trans-sialidase. **Glycobiology**, v.7, n.8, p.1167-73, 1997.
- CALER, E. V. *et al.* Dual role of signaling pathways leading to Ca(2+) and cyclic AMP elevation in host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. **Infect. Immun.**, v. 68, p.6602-10, 2000.
- CARRILLO, M.B.*et al.* Heterologous expression of *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase in *Leishmania major* enhances virulence. **Infect. Immun.**, v. 68, n. 5, p. 2728-34, 2000.

- CAVALIER-SMITH, T., Eukaryote Kingdoms: Seven or nine? **BioSystems**, v.14, p. 461-481, 1981.
- CHAVES, L.B.; BRIONES, M.R.S.; SCHENKMAN, S. Trans-sialidase from *Trypanosoma cruzi* epimastigotes is expressed at the stationary phase and is different from the enzyme expressed in trypomastigotes. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 6, n. 1, p. 97-106, 1993.
- CHUENKOVA, M.; PEREIRA, M.E.A. *Trypanosoma cruzi* trans-Sialidase: Enhancement of Virulence in a Murine Model of Chagas' Disease. **J. Exp. Med.**, v. 181, p. 1693-1703, 1995.
- CLAYTON, C. E. Life without transcriptional control? From fly to man and back again. **EMBO**, v. 21, p. 1881-1888, 2002.
- COLBBRE-GARAPIN, F. *et al.* A new dominant hybrid selective marker for higher eukaryotic cells. **J. Mol. Biol.**, v. 150, p. 1-14, 1982.
- COLLI, W. Trans-sialidase: a unique enzyme activity discovered in the protozoon *Trypanosoma cruzi*. **FASEB J.**, v. 7, p. 1257-1264, 1993.
- CREMONA, M. L., *et al.* A single tyrosine differentiates active and inactive *Trypanosoma cruzi* trans-sialidases. **Gene**, v. 160, p. 123-128, 1995.
- CROSS, G. A. M., *et al.* The surface trans-sialidase family of *Trypanosoma cruzi*. **Annu. Rev. Microbiol.**, v.. 46, p. 385-411, 1993.
- CROXFORD, J. K. *et al.* Effects of cannabinoid treatment on Chagas disease pathogenesis: balancing inhibition of parasite invasion and immunosuppression. **Cell. Microbiol.**, v. 71, p. 1592-1602, 2005.
- CUBA CUBA, A. Review of the biologic and diagnostic aspects of *Trypanosoma (Herpetosoma) rangeli*. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 31, p. 207-220, 1998.
- D´ALESSANDRO-BACIGALUPO, A.; SARAVIA, N. G. *Trypanosoma rangeli*. **Parasitic Protozoa**. London: Academic Press. *Trypanosoma rangeli*, p.1-54, 1992.
- DE SCORZA, C.; URDANETA-MORALES, S.; TEJERO, F. *Trypanosoma (Herpetosoma) rangeli* Tejera, 1920: preliminary report on histopathology in experimentally infected mice. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 28, n. 5, p. 371-8, 1986.
- DEO, V.K.; PARK, E.Y. Multiple co-transfection and co-expression of human β -1,3-*N*-acetylglucosaminyltransferase with human calreticulin chaperone cDNA in a single step in insect cells. **Biotechnol. Appl. Biochem.**, v. 43, p. 129-135, 2006.
- DEVERA, R.; FERNANDES, O.; COURA, J.R. Should *Trypanosoma cruzi* be called "cruzi" complex? a review of the parasite diversity and

- the potential of selecting population after in vitro culturing and mice infection. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 98, n. 1, p. 1-12, 2003.
- DIAS, J.C.P. Globalização, iniquidade e doença de Chagas. **Cad. Saúde Pública.**, v. 23, p. 13-22, 2007.
- DIAS, J.C.P. Chagas disease: success and challenges. **Cad. Saúde Pública**. v. 22, p. 2020-2021, 2006.
- EGER-MANGRICH, I. *et al.* Interaction of *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920 with different cell lines in vitro. **Parasitol Res**, v. 87, n. 6, p. 505-9, 2001.
- EICHINGER, D. *et al.* A proteolytic fragment of *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase lacking the carboxylterminal domain is active, monomeric, and generates antibodies that inhibit enzymatic activity. **J Biol Chem**. v. 269. p. 7970-5, 1994.
- EL-SAYED, N. *et al.* The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. **Science**, v. 309, n. 5733, p. 409-415, 2005.
- ENGVALL, E.; PEARLMANN, P. Enzyme-linked immunosorbent assay, Elisa. Quantitation of specific antibodies by enzyme-labeled anti-immunoglobulin in antigen-coated tubes. **J. Immun.**, v. 109(1), p. 129-135, 1972.
- ESHAGHI, M. *et al.* Purification of the extra-cellular domain of Nipah virus glycoprotein produced in *Escherichia coli* and possible application in diagnosis. **J. Biotech.**, v. 116, p. 221-226, 2005.
- FEDER, D. *et al.* Immune Responses in *Rhodnius prolixus*: Influence of Nutrition and Ecdysone. **J Insect Physiol**. v. 43, p. 513-519, 1997.
- FERGUSON, M. A. The surface glycoconjugates of trypanosomatid parasites. *Philos Trans R Soc. Lond B Biol Sci* , v. 352, n. 1359, p. 1295-302, 1997.
- FLORENCIO-MARTÍNEZ L. *et al.* Cellular analysis of host cell infection by different developmental stages of *Trypanosoma cruzi*. **Exp. Parasitol.**, v. 126, p. 332–336, 2010.
- FRASCH, A.C. Functional diversity in the trans-sialidase and mucin families in *Trypanosoma cruzi*. **Parasitol. Today**, v. 16, p. 282-286, 2000.
- FRASCH, A.C. Trans-sialidase, SAPA amino acid repeats and the relationship between *Trypanosoma cruzi* and the mammalian host. **Parasitology**, v. 10, n. 8, p. S37-S44, 1994.
- FREIRE-DE-LIMA, L. *et al.* *T. cruzi*-mediated CD8-T Cell Resialylation. **J. Bio. Chemistry**, v. 18, p. 13388–13396, 2010.
- FREITAS, L.M. *et al.* Genomic Analyses, Gene Expression and Antigenic Profile of the Trans-Sialidase Superfamily of *Trypanosoma*

- cruzi Reveal an Undetected Level of Complexity. **PLoS ONE**. v.6, n. 10, p. e25914, 2011.
- GARCIA, E.S. *et al.* Absorption, storage, organ distribution, and excretion of dietary [22,23- 3h2] dihydroazadirachtin a in the blood-feeding bug, *Rhodnius prolixus*. **J. Insect Physiol.**, v. 35, n. 10, p. 743-149, 1989.
- GARCIA, E.S.; AZAMBUJA, P. Development and interactions of *Trypanosoma cruzi* in insect vector. **Parasitol Today**, v. 7, p. 240-244, 1991.
- GILLESPIE, J.P; KANOST, M.R. Biological Mediators of Insect Immunity. **Annu Rev Entomol.** v.42, p. 611-643,1997.
- GRANUCCI, N. Expressão heteróloga de uma trans-sialidase de *Trypanosoma cruzi* por *Trypanosoma rangeli*. Trabalho de conclusão de Curso. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 52 p., 2010.
- GRISARD, E. C. *et al.* Characterization of *Trypanosoma rangeli* strains isolated in Central and South America: an overview. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.94, n.2, p.203-9, 1999.
- GRISARD, E. C.; CAMPBELL, D. A.; ROMANHA, A. J. Mini-exon gene sequence polymorphism among *Trypanosoma rangeli* strains isolated from distinct geographical regions. **Parasitology**, v.118 (Pt 4), p.375-82, 1999a.
- GRISARD, E.C.; STEINDEL, M. *Trypanosoma* (Herpetosoma) *rangeli*. Em: NEVES, D.P., Ed. Parasitologia Humana. Atheneu. 2005.
- GUHL, F.; RAMÍREZ, J.D. *Trypanosoma cruzi* I diversity: Towards the need of genetic subdivision? **Acta Tropica**, v. 119, p. 1–4, 2011.
- GUHL, F.; VALLEJO, G. A. *Trypanosoma* (Herpetosoma) *rangeli* Tejera, 1920: an updated review. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.98, n.4, p.435-42, 2003.
- HALL, B. F. *et al.* Desialylation of lysosomal membrane glycoproteins by *Trypanosoma cruzi*: a role for surface neuraminidase facilitating parasite entry into the host cell cytoplasm. **J. Exp. Med.**, v. 176, p. 313-325, 1992.
- HERBIG-SANDREUTER, A. Experimental study of the life cycle of *Trypanosoma rangeli* Tejera 1920 in warm-blooded animals and in *Rhodnius prolixus*. **Acta Trop.**, v. 12, n. 3, p. 261-264, 1955.
- JIMENEZ, A.; DAVIES, J. Expression of a transposable antibiotic resistance element in *Saccharomyces*. **Nature**, v. 287, p. 689-871, 1980.

- KATZIN, A. M. *et al.* Lectin receptors in *Trypanosoma cruzi*: an N-acetyl-glucosamine containing surface glycoprotein specific for the trypomastigote stage. **Biochim Biophys Acta.**, v. 727, p. 403-411, 1983.
- KEARNEY, J.F. *et al.* A new mouse myeloma cell line that has lost immunoglobulin expression but permits the construction of antibody-secreting hybrid cell lines. **J. Immu.**, v. 123, p. 1548-1551, 1979.
- KO, Y. G.; THOMPSON, G. A. Purification of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins by modified triton X-114 partitioning and preparative gel electrophoresis. **Anal Biochem** [S.I.], v. 224, n. 1, p. 166-72, 1995.
- KOERICH, L. *et al.* Differentiation of *Trypanosoma rangeli*: high production of infective trypomastigote forms in vitro. **Parasitol Res**, v.88, n.1, p.21-5, 2002.
- LAVINE, M.D.; STRAND, M.R. Insect hemocytes and their role in immunity. **Insect Biochem Mol Biol**. v.32, p. 1295-1309, 2002.
- LEY, V. *et al.* The exit of *Trypanosoma cruzi* from the phagosome is inhibited by raising the pH of acidic compartments. **J Exp Med**. v. 171, p. 401-413, 1990.
- LIANG, X. H. *et al.* *trans* and *cis* Splicing in Trypanosomatids: Mechanism, Factors, and Regulation. **Eucaryot. Cell**, v. 2, p. 830-840, 2003.
- LUCAST, L.J.; BATEY, R.T.; DOUDNA, J.A. Large-scale purification of a stable form of recombinant tobacco etch virus protease. **BioTechniques**, v. 30, p. 544-554, 2001.
- MACEDO, A.M. *et al.* *Trypanosoma cruzi*: Genetic Structure of Populations and Relevance of Genetic Variability to the Pathogenesis of Chagas Disease. **Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro**, v. 99, n.1, p. 1-12, 2004.
- MAIA DA SILVA, F. *et al.* Comparative phylogeography of *Trypanosoma rangeli* and *Rhodnius* (Hemiptera: Reduviidae) supports a long coexistence of parasite lineages and their sympatric vectors. **Mol. Ecol.**, v. 16, p. 3361-3373, 2007.
- MAIA DA SILVA, F. *et al.* Phylogeny, taxonomy and grouping of *Trypanosoma rangeli* isolates from man, triatomines and sylvatic mammals from widespread geographical origin based on SSU and ITS ribosomal sequences. **Parasitology**, v. 129, p. 549-561, 2004.
- MAISONHAUTE, C.; ECHALIER, G. Stable transformation of *Drosophila Kc* cells to antibiotic resistance with the bacterial neomycin resistance gene. **FEBS Letters**, v. 197, n. 1, p. 45-49, 1986.

- MANQUE, P.M. *et al.* Characterization of the cell adhesion site of *Trypanosoma cruzi* metacyclic stage surface glycoprotein gp82. **Infect. Immun.**, v. 68, n. 2, p. 478-84, 2000.
- MATTHEWS, K. R.; TSCHUDI, C.; ULLU, E. A common pyrimidine-rich motif governs trans-splicing and polyadenylation of tubulin polycistronic pre-mRNA in trypanosomes. **Genes Dev.**, v. 8, p. 491-501, 1994.
- MELLO, C.B. *et al.* *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli*: Interplay with hemolymph components of *Rhodnius prolixus*. **J Invertebr Pathol**, v. 65, p. 261-268, 1995.
- MENESES, A. J. M. *et al.* *Trypanosoma rangeli*: Lo que se conoce y el impacto de su presencia. **MedUNAB**, v. 7, p. 166-171, 2004.
- MING, M. *et al.* Mediation of *Trypanosoma cruzi* invasion by sialic acid on the host cell and trans-sialidase on the trypanosomes. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 59, p. 243- 252, 1993.
- Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Boletim Epidemiológico**. v. 43, n. 2, 2012
- MORAES, M.H. *et al.* Different serological cross-reactivity of *Trypanosoma rangeli* forms in *Trypanosoma cruzi*-infected patients sera. **Parasites & Vectors**. v. 1, p. 1-10, 2008.
- MORALES, S.L.V. Estudo da resposta inflamatória durante a infecção por *Trypanosoma rangeli*. Trabalho de conclusão de Curso. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 77p., 2012.
- MORENO, S.N.J. *et al.* Cytosolic free calcium elevation in *Trypanosoma cruzi* is required for cell invasion. **Exp. Med.**, v. 180, p. 1535-1540, 1994.
- MORTARA, R. A. *et al.* Mammalian cell invasion and intracellular trafficking by *Trypanosoma cruzi* infective forms. **An Acad Bras Cienc.**, v. 77, p. 77-94, 2005.
- NEIRA, I; FERREIRA, A. T; YOSHIDA, N. Activation of distinct signal transduction pathways in *Trypanosoma cruzi* isolates with differential capacity to invade host cells. **Int J Parasitol**. v. 32, p. 405-14, 2002.
- NEVES, D.P. Parasitologia Humana. 11ªEd. Atheneu, 2005.
- OI, V.T.; HERZENBERG, L. A. Immunoglobulin-production hybrid cells lines. In: MISHALL, B. B.; SHIIGI, S. M. **Selection methods in cellular immunology.**, p. 351-373, 1980.
- OKANO, K. *et al.* Basic conditions for the drug selection and transient gene expression in the cultured cell line of *bombyx mori*. **In Vitro Cell. Dev. Biol.**, v. 28, p. 779-781, 1992.

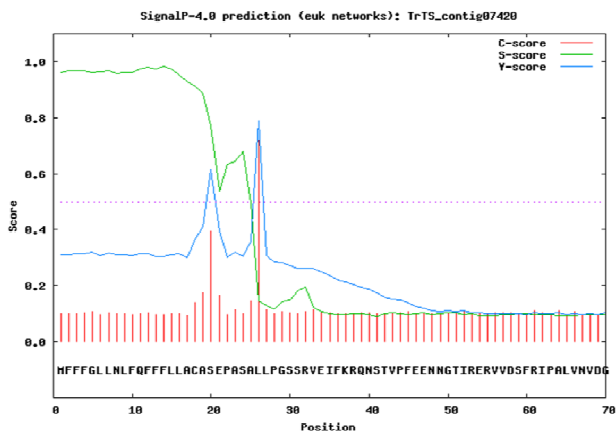
- OSORIO, Y. *et al.* Infectivity of *Trypanosoma rangeli* in a promonocytic mammalian cell line. **J. Parasitol.**, v.81, n.5, p.687-93, 1995.
- PALÁU, M.T. *et al.* Action of *Trypanosoma rangeli* in Infections with Virulent *Trypanosoma cruzi* Populations. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 98, n. 4, p. 543-548, 2003
- PARIS G. *et al.* A sialidase mutant displaying trans-sialidase activity. **J Mol Biol.**, v. 345, p. 923–934, 2005.
- PIRES, S.F. *et al.* Cell culture and animal infection with distinct *Trypanosoma cruzi* strains expressing red and green fluorescent proteins. **Int. J. Parasitol.**, v. 38, p. 289-297, 2008.
- PONTES-DE-CARVALHO, L. C.; TOMLINSON, S.; NUSSENZWEIG, V. *Trypanosoma rangeli* sialidase lacks trans-sialidase activity. **Mol Biochem Parasitol**, v.62, n.1, p.19-25, 1993.
- PRATA, A. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. **Lancet Infect. Dis.**, v. 1, p. 92-100, 2001.
- RATIER, L. *et al.* Relevance of the Diversity among Members of the *Trypanosoma Cruzi* Trans-Sialidase Family Analyzed with Camelids Single-Domain Antibodies. **PLoS One**, v. 3, n. 10, p. e3524, 2008.
- RIBEIRO, J.M.C.; GARCIA, E.S. The role of the salivary glands in feeding in *rhodnius prolixus*. **J. exp. Biol.**, v. 94, p. 219-230, 1981.
- ROCHA, D.S. *et al.* Desenvolvimento de *Rhodnius pictipes* Stal, 1872 alimentado através de membrana de silicone e em camundongos (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). **Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro**, v. 92, n. 4, p. 553-558, 1997.
- RODRIGUEZ, A. *et al.* A trypanosome-soluble factor induces IP3 formation, intracellular Ca²⁺ mobilization and microfilament rearrangement in host cells. **J. Cell Biol.** v. 129, p. 1263-1273, 1995.
- RODRIGUEZ, A. *et al.* Lysosomes behave as Ca²⁺-regulated exocytic vesicles in fibroblasts and epithelial cells. **J. Cell Biol**, 1997.
- RUBIN-DE-CELIS, S.S.C. *et al.* Expression of trypomastigote trans-sialidase in metacyclic forms of *Trypanosoma cruzi* increases parasite escape from its parasitophorous vacuole. **Cell Microbiol**, v. 8, p. 1888–1898, 2006.
- RUBIN-DE-CELIS, S.S.C.; SCHENKMAN, S. *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase as a multifunctional enzyme in Chagas' disease **Cell Microbiol.**, v. 14, n. 10, p. 1522–1530, 2012.
- SAMBROOK, J.; RUSSELL, D.W. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. Cold Spring Harbor, New York. 2001.

- SCHARFSTEIN, J. *et al.* Host cell invasion by *Trypanosoma cruzi* is potentiated by activation of bradykinin B (2) receptors. **J. Exp. Med.** v.192, p 1289-300, 2000.
- SCHENKMAN, S. *et al.* Expression of trypomastigote *trans*-sialidase in metacyclic forms of *Trypanosoma cruzi* increases parasite escape from its parasitophorous vacuole. **Cell Microbiol.**, v. 8, p. 1888–1898, 2006.
- SCHENKMAN, S. *et al.* Structural and functional properties of *Trypanosoma cruzi* *trans*-sialidase. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 48, p. 499-523, 1994.
- SCHENKMAN, S. *et al.* *Trypanosoma cruzi* *trans*sialidase and cell invasion. **P. Today**, v. 9, p. 218-221, 1994a.
- SCHENKMAN, S.; PONTES DE CARVALHO, L.; NUSSENZWEIG, V. *Trypanosoma cruzi* *trans*-sialidase and neuraminidase activities can be mediated by the same enzymes. **J. Exp. Med.**, v. 175, p. 567-575, 1992.
- SCHOTTELIUS, J. Neuraminidase fluorescence test for the differentiation of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli*. **Trop Med Parasitol**, v.38, n.4, p.323-7, 1987.
- SCHRADER, S. *et al.* A nonradioactive 96-well plate assay for screening of *trans*-sialidase activity. **Anal. Biochem.**, v. 322, p. 139-147, 2003.
- SIMPSON, A. G. B.; STEVENS, J. R.; LUKE'S, J. The evolution and diversity of kinetoplastid flagellates. **Trends Parasitol.**, v.22, p.168–174, 2006.
- SOUTHERN, P.J.; BERG, P.: Transformation of mammalian cells to antibiotic resistance with a bacterial gene under control of the SV40 early region promoter. **J. Mol. Appl. Genet.**, 1982.
- SOUTO, R.P. *et al.* DNA markers define two major phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi*., v. 83, n. 2, p. 141-152, 1996.
- SOUZA, H.B.W.T. *et al.* Tentativas de criação de triatomíneos em laboratório por meio de alimentação "in vitro". **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 33, n. 3, p. 221-226, 1991.
- STEINDEL, M. **Caracterização de cepas de *Trypanosoma rangeli* e *Trypanosoma cruzi* isoladas de reservatórios e vetores silvestres em Santa Catarina.** Tese de Doutorado. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1993.
- TAKLE, G.B. Studies on the cellular immune response of insects toward the insect pathogen *Trypanosoma rangeli*. **J Invertebr Pathol**, v. 51, p. 64-72, 1988.

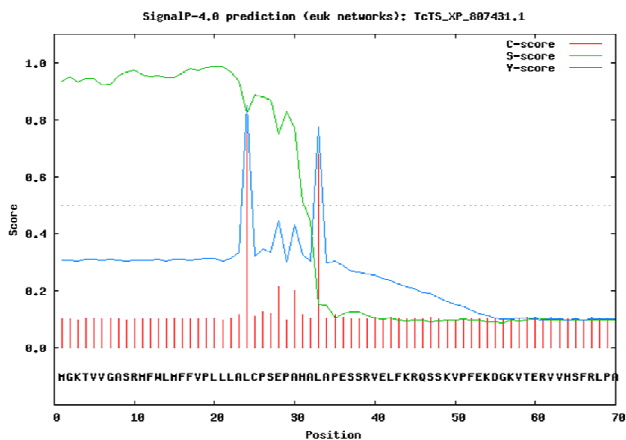
- TANOURA, K. *et al.* *Trypanosoma rangeli*--in vitro metacyclogenesis and fate of metacyclic trypomastigotes after infection to mice and fibroblast cultures. **J Eukaryot Microbiol**, v.46, n.1, p.43-8, 1999.
- TARDIEUX, I; NATHANSON, M.H. Role in host cell invasion of *Trypanosoma cruzi* – induced cytosolic – free Ca²⁺ transients. **J. Exp med.** v. 179, p 1017–22, 1994.
- TEIXEIRA, A.R.L. *et al.* Evolution and pathology in Chagas disease – A Review. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 101, p. 460-491, 2006.
- TOMLINSON, S. *et al.* Role of sialic acid in resistance of *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes to complement. **J. Immunol.**, v. 153, p. 3141-3148, 1994.
- TOWBIN, H.; STAHELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.76, n.9, p.4350-4, 1979.
- TRIBULATTI, M.V. *et al.* The trans-sialidase from *Trypanosoma cruzi* induces thrombocytopenia during acute Chagas disease by reducing the platelet sialic acid contents. **Infect Immun.**, v. 73, p. 201–207, 2005.
- UEMURA, H. *et al.* Only some members of a gene family in *Trypanosoma cruzi* encode proteins which express both trans-sialidase and neuraminidase. **EMBO J.**, v. 11, p. 3837–3844, 1992.
- URDANETA-MORALES, S.; TEJERO, F. *Trypanosoma* (Herpetosoma) *rangeli* Tejera, 1920. Intracellular amastigote stages of reproduction in white mice. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v.28, n.3, p.166-9, 1986.
- URMENYI, T. P. **Processamento do RNA**. Disponível em: <<http://www.fiocruz.br/chagas/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=76>>. Acesso em: 29/04/2013.
- VALLEJO, G.A. *et al.* Clonal population structure of *Trypanosoma rangeli* is supported by analysis of kDNA and mini-exon gene sequences from strains isolated from *Rhodnius colombiensis*, *R. pallescens* and *R. prolixus* in Colombia. **Infect. Gen. Evolution**, v. 3, p. 39-45, 2003.
- VALLEJO, G.A.; GUHL, F.; SCHAUB, G.A. Triatominae-*Trypanosoma cruzi*/*T. rangeli*: Vector-parasite interactions. **Acta Trop**, v.110, n.2-3, p.137-47, 2009.
- VANHAMME, L. *et al.* Control of gene expression in trypanosomes. **Microbiological Reviews**, v. 59, p. 223-240, 1995.

- VASQUEZ, A.M. *et al.* Eco-epidemiological aspects of *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma rangeli* and their vector (*Rhodnius pallescens*) in Panama. **Rev. Inst. Med. trop. São Paulo**, v. 46, p. 217-222, 2004.
- WAGNER G. *et al.* The *Trypanosoma rangeli* trypomastigote surfaceome reveals novel proteins and targets for specific diagnosis. **Journal of Proteomics**, *In press*, 2013.
- WHO. First WHO report on neglected tropical diseases 2010: working to overcome the global impact of neglected tropical diseases. **Technical Report Series**, Geneva, 27, 2010.
- YOSHIDA, N. Molecular basis of mammalian cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. **An. Acad. Bras. Cienc.**, v. 78, n. 1, p. 87-111, 2006.
- YOSHIDA, N. Surface antigens of metacyclic trypomastigotes of *T. cruzi*. **Infect. Immun.**, v. 40, p. 836-839, 1983.
- YOSHIDA, N. *Trypanosoma cruzi* infection by oral route: How the interplay between parasite and host components modulates infectivity. **Parasitol. International**, v. 57, n. 2, p. 105–109, 2008.
- ZELEDÓN, R.; BLANCO, E. Relaciones huésped-parásito en Tripanosomiasis Rangeli I. Infección intestinal y hemolinfática comparativa de *Rhodnius prolixus* y *Triatoma infestans*. **Rev. Biol. Trop.**, v. 13, n. 1, p. 143-158, 1965.
- ZINGALES, B. *et al.* A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. **Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro**, v. 104, n. 7, p. 1051-1054, 2009.
- ZÚÑIGA, C. *et al.* *Trypanosoma rangeli* infected mouse sera reactivity with *Trypanosoma cruzi* synthetic peptides. **Parasitol Latinoam.**, v. 62, p. 3-6, 2007.

APÊNDICE



Name=TrTS_contig07420 SP='YES'
Cleavage site between pos. 25 and 26:ASA-LI



Name=TcTS_XP_807431.1 SP='YES'
Cleavage site between pos. 23 and 24:LLA-LC

Apêndice 1. Predição de presença de peptídeo sinal e do local de clivagem para a sequência pelo programa *SignalP 4.0* de *TrSial* de *Trypanosoma rangeli* (contig 07420) e *TcTS* de *Trypanosoma cruzi* (Acesso GenBankXP_807431.1).

190 APÊNDICE

```

>lcl|65093 TrTS
Length=701

Score = 891 bits (2303), Expect = 0.0, Method: Compositional matrix adjust.
Identities = 435/655 (66%), Positives = 507/655 (77%), Gaps = 8/655 (1%)

Query 25  CFQCEPAAIALALAFEGGRVELFKRQQCKVPEERD GKVTERVVHICFRLEPALVNVVDGVMVAIAD 03
C SEEA AL P SSRVE+FKRQ+S VPFE++ G + ERVV SFR+PALVNVVDGVMVA+AD
Sbjct 18  CASEPASAALLPSSSRVEIFKRQNS TVPFEENNGTIRERVVD5FRIPALVNVVDGVMVAVD 77

Query 84  ARYETSNDNSLIDTVAKYSVDDGETWETQIAIRKNSRASSVSRVVDPTVIIVKGNKLYLVLG 143
ARYET+NDNS I+TVAKYSVDDGETW TQIAIRKNS R VSRVVDPTVIIVKGNKLY+LVG
Sbjct 78  ARYETANDNSFIETVAKYSVDDGETWNTQIAIRKNSRVSPFRVVDPTVIIVKGNKLYLVLG 137

Query 144  SYNSRSYWTSHGDARDWDLILLAVGEVTKSTAGGKTTASIKWGSPPVSLKFFPAEMEGMH 203
S+N S +YW H D DW+ LL VGEVTKST GK TA+Y WS PWSLK FF E ES+
Sbjct 138  SFNKSHNYMQLHDDGSDWEFLLVYGEVTKSTVNGKITATISWQKPVSLKMPFKPEFEGVP 197

Query 204  TNQFLGGAGVAIVASNGNLVYFVQVTNKKKQVFSKIFYSEDEGKTKWFGKGRSDFGCSEP 263
T ++LGG G AIVASNGNLVYFVQ++N K+Q+F+KI YSED+G TWK F +GRS FGCSEP
Sbjct 198  TKEYLGGVGAAIIVASNGNLVYFVQISNKRKQIFTRKIMYSEDDGNTWKFAEGRSKFGCSEP 257

Query 264  VATPWEFGKLTINFRVDWFRRTVVESSDMGNTWVEAVGTFARVMGPPKSNQPGSQSSFTA 323
LEWEG+LLII RVD RRLVYESSDMG TWVEA+GTLGRVW S S+QPGSQSSP A
Sbjct 258  AVLEWEGRLIITNRVDGDRRLVYESSDMGKTWVEALGTLGRVWVWNSPTSNQPGSQSSPVA 317

Query 324  VTIEGRVMRLFTHPLNFKGRWLRDLNLWLTDNQRIYNVGQVSGIDENSAYS SVLYKDDK 383
TIEG RVMLFTHPLNFKG W+RDRL+LW+TDNQRI++VGQ+S+G+E +AYS SVLYKDDK
Sbjct 318  ATIEGKRVMLFTHPLNFKGLWIRDLHLWVTDNQRI FVDVQISVGNEGAAYS SVLYKDDK 377

Query 384  LYCLHEINTNEVYSLVFARLVGELRIIRSVLQSWKNWDSHLSICTPADPAASSSERGCG 443
LYCLHE+N EVYS+VF RLV ELR+I+SV+ +WK D+ L+SICTP PAA SS RCGC
Sbjct 378  LYCLHEVNVREYYSIVFIRLVEELRLIRS VVGWKEEDNLLASICTPVPVPAAPSSRRGCG 437

Query 444  PAVTTVGLVGFSLGNASQNVWEDAYRCVNASTANAEVRNGLKFAVGGGALNLPVSSQGGQ 503
AV T GLVGFSL A+++VWED YRCVNA+ + V G F G GA+WPV +QGQ
Sbjct 438  AAVPTAGLVGFSLHRANESVWEDVYRCVNA TVMHGTNVTYGFTFFKRRKAGAMVPRKQGG 497

Query 504  NQRVRFANHAFTLVASVTIHEA PRDATELLGASLDSSSGKRLGLSYDERKHQNPQIYGST 563
QRV F N+ FTLVASV+IHE P ELLGASLDSSG +KLLGLSYD+ +W P+YG T
Sbjct 498  TQRVYFVNVNDFTLVASVSIHEIDNSRDLLEAGSLDSSGNRKLGLSYDQGRNCPMYCOT 557

Query 564  PVTPTGSWETGKRYHVVLTMNSKIGSVUIDGEPLEGGGQT---VVPDGRTPDISHFYVGG 620
PTGGW! ! MVV L !GG!YIDG BL GGGQ V !G D!SHF! G
Sbjct 558  ASPPTGSKWLHQYTVHVALLFDQGVGSIYIDGNPLRGGGQILSGVHLEGL--DVSHFFPGR 615

Query 621  YKRSEMPYISHVTVNVNLLYNRQLNAEEIRTLFLSQDLIGTEAHMDSSSDSSAHG 675
Y SD+ + H+TV NV+LYNR L EI+TL LS L T A +S + + HG
Sbjct 616  YGTSDLSSDCHITPVNVMLYNRILKPSIQPLLLS--LGKTAADSESMFEKTFHG 668

```

Apêndice 2. Alinhamento global das sequências aminoacídicas preditas da trans-sialidase de *Trypanosoma cruzi* - *TcTS* (Acesso GenBankXP_807431.1) (Query) e a sialidase de *Trypanosoma rangeli* - *TrSial* (Contig 07420) (Sbjct).

Apêndice 3. Valores de t, Intervalo de confiança (95%) e valor de p, do experimento de infecção de célula Vero, todas comparadas com cepa *Tr*_WT.

	<i>Tr</i> _WT vs <i>Tr</i>			<i>Tr</i> _WT vs <i>Tr</i> _GFP			<i>Tr</i> _WT vs <i>Tr</i> _ZEB		
	t	Intervalo de confiança	p	t	Intervalo de confiança	p	t	Intervalo de confiança	p
T0	7,2	-44,35 a -16,32	p<0,0001	0,8	-12,68 a 10,35	p>0,05	2,6	3,01 a 25,02	p< 0,05
T4	6,2	-40,35 a -12,32	p<0,0001	0,1	-14,68 a 13,35	p>0,05	1,5	-7,35 a 20,68	p> 0,05
T16	7,5	-45,68 a -17,65	p<0,0001	0,3	-12,68 a 15,35	p>0,05	4,7	5,98 a 34,02	p<0,0001