

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
Centro de Ciências Biológicas  
Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia  
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências

**Ana Paula Gruending**

**Caracterização molecular e funcional das amastinas e  
tuzina do *Trypanosoma rangeli***

Florianópolis  
2019



**Ana Paula Gruending**

**Caracterização molecular e funcional das amastinas e  
tuzina do *Trypanosoma rangeli***

Tese de Doutorado  
submetida ao Programa de  
Pós-graduação em  
Biotecnologia e Biociências  
da Universidade Federal de  
Santa Catarina para  
obtenção do título de Doutor  
em Biotecnologia e  
Biociências.

**Orientador:** Prof. Dr. Edmundo Carlos Grisard  
**Co-orientadora:** Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Patricia Hermes Stoco

Florianópolis  
2019



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

Gruending, Ana Paula

Caracterização molecular e funcional das  
amastinas e tuzina do *Trypanosoma rangeli* / Ana  
Paula Gruending ; orientador, Edmundo Carlos  
Grisard, coorientadora, Patricia Hermes Stoco,  
2019.

151 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa  
Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de  
Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências,  
Florianópolis, 2019.

Inclui referências.

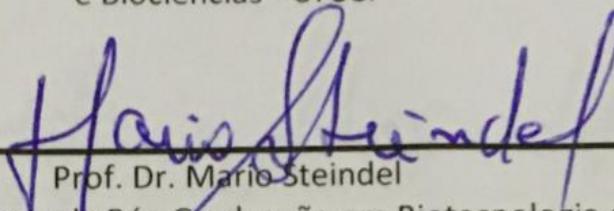
1. Biotecnologia e Biociências. 2. *Trypanosoma*  
*rangeli*, *Trypanosoma cruzi*, amastinas e tuzina. I.  
Grisard, Edmundo Carlos. II. Stoco, Patricia Hermes  
. III. Universidade Federal de Santa Catarina.  
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e  
Biociências. IV. Título.

**"Caracterização molecular e funcional das amastinas e tuzina do *Trypanosoma rangeli*"**

Por

**Ana Paula Gruending**

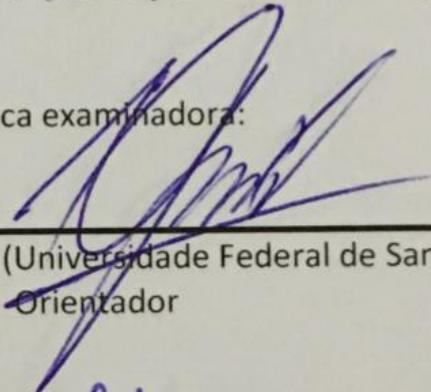
Tese julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da Banca Examinadora (18/PPGBTC/2017) do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências - UFSC.



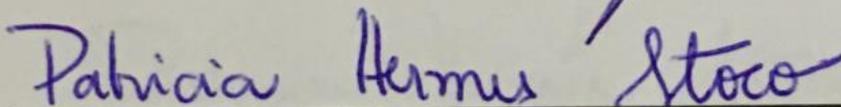
Prof. Dr. Mario Steindel

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências

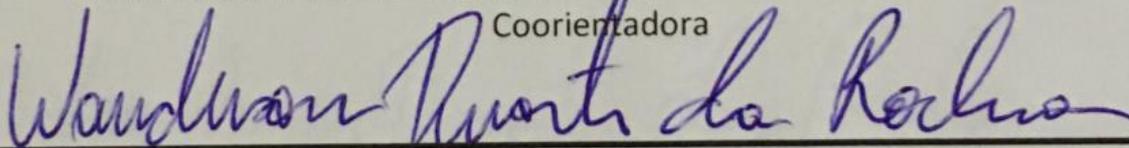
Banca examinadora:



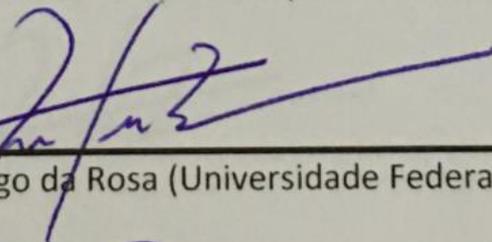
Dr. Edmundo Carlos Grisard (Universidade Federal de Santa Catarina)  
Orientador



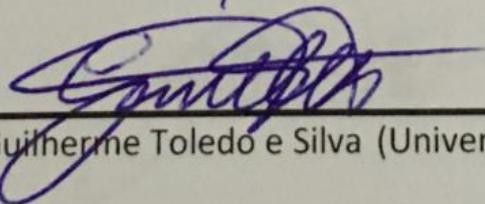
Dr. Patrícia Hermes Stoco (Universidade Federal de Santa Catarina)  
Coorientadora



Dr. Wanderson Duarte da Rocha (Universidade Federal do Paraná)



Dr. Rafael Diego da Rosa (Universidade Federal de Santa Catarina)



Dr. Guilherme Toledo e Silva (Universidade Federal de Santa Catarina)

Florianópolis, 29 de setembro de 2017.



## **Dedicatória**

Dedico este trabalho  
primeiramente a Deus e  
aos meus pais, Paulo e  
Vera, pelo apoio  
incondicional.



## **Agradecimentos**

A Deus, por abençoar meu caminho e torná-lo mais leve.

Às agências de fomento CAPES e CNPq pelo fornecimento da bolsa de estudos e financiamento da pesquisa.

Ao meu orientador, Prof. Edmundo Carlos Grisard, pela dedicação, ensinamentos científicos, profissionalismo, essenciais ao desenvolvimento dessa pesquisa, e também pelos momentos de descontração, a quem devo além do conhecimento passado, a oportunidade de conhecer novas fronteiras. Obrigada pela oportunidade, pelos puxões de orelha e pelos conselhos, sem eles jamais esse caminho seria possível.

A Pati, minha co-orientadora Professora Patrícia Hermes Stoco principalmente por toda a dedicação: todos que te conhecem sabem o quanto você é dedicada e extremamente capaz, sem você esse trabalho não existiria. Obrigada Pati por todos os momentos, e não foram poucos tanto científicos quanto de descontração. Você tornou essa tese possível. Guardo com muito carinho nossos momentos de descontração: desde as escapadas para Santo Antônio, shoppings, praia até as comilanças regadas a muita banofe. Pati, você é demais, nunca deixe que digam o contrário. OBRIGADA!!!!

Aos membros da banca: Professores Wanderson Duarte da Rocha, Luiz Claudio Miletto, Rafael Diego da Rosa, Guilherme Toledo e Silva e Daniel Mansur pela disponibilidade e dedicação para contribuir com esse trabalho, o meu sincero obrigada.

Aos Professores Mario Steindel, Carlos Pinto e Glauber Wagner, pelos conselhos, ensinamentos e momentos de dedicação. Obrigada Professor Mario também pelos ensinamentos culinários e por toda disponibilidade sempre.

Aos colegas de laboratório: Abadio Junior, Adriana Correa, Aline Schlindwen, Ana Paula Machado do Nascimento, Bruno Tavares, Carime Lessa, Carine Moreira, Caroline da Cunha, Danna Moura, Gustavo Campagnaro, Greicy Malaquias Dias, Ibeth Calderon, Ingrid Beltrame, Jair Telles, Lais Yamanaka, Lucas Dhom, Milene Morais, Natalia Gutierrez, Laryssa Liz, Tatiana Catecati, Thais Assis, Thaynara Pereira e Vagner Portes pelos momentos científicos e também de risadas, café, comilanças e descontração. Em especial a Carine, Greicy e as verdadeiras amigas que seguem pela vida, obrigada pelo companheirismo e colaboração durante essa jornada.

Aos membros dos Laboratórios: LiDI, LIA e LVA pela disposição em ajudar, especialmente a Clarissa Feltrin, Laurita Boff, Lara

Perish, Vanessa Moresco, Sthefany Pagliari, Carlos Quiroz, Wellington Muniz e Naira Fernanda Schneider.

Aos funcionários do LAMEB de forma geral por toda disponibilidade e dedicação.

Aos meus pais, Paulo Gruending e Vera Lúcia Gruending, pelo amor, pela confiança, dedicação, e incentivo durante toda minha vida. Mesmo longe tão perto. Vocês são o exemplo de toda minha caminhada e o alicerce dos meus sonhos. Amo vocês. À minha avó Anna Demeterko, pelo carinho e apoio.

Ao meu verdadeiro Amor: João Paulo Schmalz Junior: obrigada por me mostrar o sentido real do amor, companheirismo e dedicação. Você é meu exemplo de garra e determinação. Sem você eu não teria tido forças para perseguir esse caminho, obrigada! Obrigada também pelo maior presente de nossas vidas: A Sofia!

À minha família de Floripa: Naira e Oto Zanchett Schneider. Obrigada por todos os momentos vividos, construímos uma amizade baseada no amor e confiança, tornando-nos mais fortes e felizes. Ao apê 302 – C, onde dividimos muitas histórias: Naira e Bruna Bonaldo, as melhores amigas com quem eu poderia dividir tantos momentos de confiança e descontração, saudades eternas da companhia de vocês. Amo vocês demais.

À minha amiga-irmã Greicy B. Malaquias Dias, que muito contribuiu com este trabalho, obrigada por todos os momentos que passamos juntas, eles são inesquecíveis. Obrigada por tornar os momentos no laboratório mais leves e os fora dele mais engraçados e emocionantes. Te amo!!!

Aos colegas de minha turma do Doutorado da Biotec.

A todos, que direta ou indiretamente contribuíram com meu trabalho, o meu sincero obrigada.



A sabedoria dos homens é proporcional não à sua experiência, mas à sua capacidade de adquirir experiência.

George Bernard Shaw



## RESUMO

O *Trypanosoma rangeli*, é um protozoário de ciclo heteroxênico, e para que esta alternância de hospedeiros ocorra, o parasito possui uma regulação gênica em nível pós-transcricional, que permite rápida mudança nos padrões de expressão gênica, possibilitando uma adaptação do parasito a diferentes ambientes. As amastinas constituem uma família multigênica, subdividida em quatro grupos:  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  e  $\delta$ . Genes representativos de amastinas estão presentes no genoma do *T. rangeli*, mas o seu padrão de expressão, localização celular, envolvimento na interação com células do hospedeiro neste parasito ainda precisam ser investigados. Sendo assim, este estudo, têm como objetivo avaliar o ciclo celular do *Trypanosoma rangeli* com a finalidade de atribuir o possível papel das amastinas e tuzina na interação parasito/hospedeiro. Neste trabalho foram identificados 21 (sendo quatro genes truncados) genes pertencentes à família das amastinas, divididos em sete grupos, e um gene referente à tuzina e ambos com localização membranar. Através de uma análise filogenética, classificar esses genes de amastinas como pertencentes ao grupo das  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\delta$ -amastinas. Analisamos dois genes de duas diferentes subfamílias *TrAma7\_1* ( $\beta$ -amastina) e *TrAma4\_1* ( $\alpha$ -amastina) quanto a produção dos níveis de transcritos e de expressão proteica, observamos que ambos os genes produzem níveis de transcritos nas formas evolutivas epimastigotas e tripomastigotas com diferença entre as mesmas, mas, apenas para *TrAma4\_1* foi observada a expressão proteica no *Western blot*. Para Tuzina, observamos que as mesmas encontram-se intercaladas no genoma com as  $\delta$ -amastinas, e apesar de os níveis de transcritos serem diferentes entre diferentes formas evolutivas analisadas, os níveis de proteína expressa são iguais entre todas as formas, tanto para *T. rangeli* e *T. cruzi*. Com isso, observamos então que o nível de proteína expressa não é estágio dependendo como a produção dos níveis de transcritos, para ambos os genes. Parasitos da cepa Choachí de *T. rangeli* foram transfectados com amastinas de *T. cruzi* de duas diferentes subfamílias e com a *TrAma4\_1* de *T. rangeli* fusionadas com GFP, e com base nos resultados encontrados no estudo *in vivo* da infecção experimental com essas cepas transfectadas em comparação com a cepa parental pudemos observar que não houveram diferenças significativas na evolução da infecção.

Palavras-chave: amastinas, tuzina, *Trypanosoma rangeli*.

## ABSTRACT

*Trypanosoma rangeli* is a protozoan of heteroxenic cycle and for this host alternation to occur the parasite has a post-transcriptional level of gene regulation that allows a rapid change in the gene expression patterns, allowing an adaptation of the parasite to different environments. The amastins constitute a multigenic family, subdivided into four groups:  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  and  $\delta$ . Representative amastin genes are present in the *T. rangeli* genome, but their pattern of expression, cell localization, involvement with host cells interaction in this parasite still needs to be investigated. Thus, this study aims to evaluate the cell cycle of *Trypanosoma rangeli* in order to attribute the possible role of amastines and tuzin in the parasite/host interaction. In this work 21 genes (those: four are truncated genes) were identified belonging to the amastine family, divided into seven groups, and one gene related to the tuzin and both of them with membrane localization. Through a phylogenetic analysis, these amastine genes were classified belonging to the  $\alpha$ ,  $\beta$  and  $\delta$ -amastins group. We analyzed two different genes from two different amastin subfamilies: *TrAma7\_1* ( $\beta$ -amastine) and *TrAma4\_1* ( $\alpha$ -amastine) for the production of transcript levels and protein expression, and we observed that both genes produce levels of transcripts in epimastigote and trypomastigote evolutionary forms with difference between themselves but only for *TrAma4\_1* was observed protein expression in the *Western blot*. For Tuzin, we observed that they are intercalated in the genome with the  $\delta$ -amastines, and the transcript levels are different between different evolutionary forms analyzed, expressed protein levels are equal between all forms, both for *T. rangeli* and *T. cruzi*. So, until now we observed that the protein expression levels are not stage specific, different as the transcriptions levels. Parasites of *T. rangeli* strain Choachi were transfected with four different *T. cruzi* amastins from two different subfamilies and with *T. rangeli* *TrAma4\_1* and fused with GFP, and based on the results found in the *in vivo* study of the experimental infection with these strains transfected into comparison with the parental strain showed that there were no significant differences in the evolution of the infection.

Key words: amastin, tuzin, *Trypanosoma rangeli*.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Microfotografia da forma tripomastigota sanguínea de *Trypanosoma rangeli* em sangue de camundongo experimentalmente infectado (corado por Giemsa) (aumento de 1.000x). Fonte: Stoco (2010).....25
- Figura 2:** Distribuição geográfica do *Trypanosoma cruzi* (doença de Chagas) e pontos de ocorrência do *Trypanosoma rangeli*. Mapa das Américas Central e do Sul, mostrando a sobreposição geográfica da distribuição da doença de Chagas humana (sombreado) e os registros de ocorrência comprovada do *Trypanosoma rangeli* em humanos, triatomíneos ou animais silvestres (●). Fonte: Grisard, Steindel (2005).....26
- Figura 3:** Ciclo biológico do *Trypanosoma rangeli* no hospedeiro invertebrado. **(A)** Ingestão das formas tripomastigotas durante o repasto sanguíneo do triatomíneo; **(B)** Formas epimastigotas curtas no intestino médio do triatomíneo se dividem e podem invadir a hemocele ou seguir até a ampola retal, onde algumas se diferenciam em formas tripomastigotas e podem ser excretadas junto com as fezes e urina; **(C)** na hemocele dividem-se de forma livre como epimastigotas longos ou **(D)** podem invadir hemócitos onde a multiplicação não é certa. **(E)** Invasão das glândulas salivares pelos epimastigotas de forma longa e **(F)** diferenciação para formas infectantes (tripomastigotas metacíclicos), as quais são inoculadas com a saliva durante o repasto sanguíneo **(F)**. Fonte: Stoco *et al.* (2016).....28
- Figura 4:** Topologia predita das proteínas de superfície Amastinas. A maioria das amastinas contém quatro regiões transmembrana (TM) com N-terminal curto e cauda C-terminal, ambos voltados para o citosol. Letras representam aminoácidos conservados. Fonte: Kangussu-Marcolino, 2014.....34
- Figura 5:** Organização genômica das isoformas das amastinas de *T. cruzi*. NOTA: As seis amastinas atualmente identificadas em *Trypanosoma cruzi* são pertencentes a duas subfamílias,  $\beta$  e  $\delta$ . As  $\delta$ - amastinas são codificadas por genes presentes nos cromossomos 26 ( $\delta$ -Ama40) e 34, com uma e três cópias respectivamente, sendo acompanhadas por sequências codificadoras de tuzina. As  $\beta$ - amastinas são codificadas por duas cópias do gene presentes no cromossomo 32 (JACKSON, 2010; TRITRYPDB, 2011). As setas indicam regiões codificadores de proteínas. As setas correspondentes a amastinas apresentam acima seu código identificador. As caixas indicam pseudogenes FONTE: Kangussu-

Marcolino, 2014 (Adaptado de TRITRYPDB, 2014 e Jackson, 2010).....	36
<b>Figura 6:</b> Desenho esquemático dos vetores contendo os genes de diferentes amastinas de <i>Trypanosoma cruzi</i> clonados no vetor pTREX <sub>e</sub> GFP (Kangussu- Marcolino <i>et al</i> ; 2013.....	58
<b>Figura 7:</b> Análise comparativa das amastinas de <i>Trypanosoma rangeli</i> . Porcentagens de nucleotídeos (A) e aminoácidos (B) idênticos entre todas as sequências identificadas.....	66
<b>Figura 8:</b> Domínios conservados das amastinas de <i>Trypanosoma rangeli</i> . Sequências representativas de cada grupo de amastinas estão representadas graficamente e apresentam os domínios característicos pfam07344 e/ou PTZ00201 (Azul escuro) e superfamília cl06401 (Azul claro).....	68
<b>Figura 9:</b> Predição de regiões transmembranas (vermelho) nas amastinas de <i>Trypanosoma rangeli</i> utilizando o programa TMHMM Server v. 2.0 do pacote Expasy. Prováveis regiões extracelulares estão demonstradas em rosa e intracelulares em azul.....	69
<b>Figura 10:</b> Representação esquemática e análise de sintenia de uma região do scaffold 2 de <i>Trypanosoma rangeli</i> contendo 6 amastinas do grupo 1 e 4. Uma região do cromossomo 30 de <i>Trypanosoma cruzi</i> CL Brener Não Esmeraldo está representada. As setas azuis ( <i>T. cruzi</i> ) e vermelhas ( <i>T. rangeli</i> ) correspondem a regiões codificantes e suas orientações nos dois genomas. As setas com destaque em amarelo correspondem aos genes de amastinas. Os números de acesso das sequências de <i>T. cruzi</i> são referentes ao TriTrypDB.....	70
<b>Figura 11:</b> Representação esquemática de diferentes regiões do scaffold 1 de <i>Trypanosoma rangeli</i> e análise de sintenia com os cromossomos 7 (A), 32 (B) e 34 (C-E) de <i>Trypanosoma cruzi</i> . Em <b>A</b> ) encontra-se a <i>TrAma2_1</i> ; <b>B</b> ) <i>TrAma6_1</i> e <i>7_1</i> ; <b>C</b> ) todas as <i>TrAma3</i> ; <b>D e E</b> ) as duas <i>TrAma5</i> . As setas azuis ( <i>T. cruzi</i> ) e vermelhas ( <i>T. rangeli</i> ) correspondem a regiões codificantes e suas orientações nos dois genomas. As setas com destaque em amarelo correspondem aos genes de amastinas e as destacadas com verde correspondem aos genes de tuzina. As ORF identificadas com X correspondem a pseudogenes de amastinas. Os números de acesso das sequências de <i>T. cruzi</i> são referentes ao TriTrypDB.....	70/71
<b>Figura 12:</b> Análise de sintenia com representação de identidade entre os ortólogos de duas regiões do scaffold 1 de <i>Trypanosoma rangeli</i> com os cromossomos 34 de <i>Trypanosoma cruzi</i> (Esmeraldo). Em <b>A</b> ) encontra-se a <i>TrAma5_1</i> e a <i>TrTuzina</i> e em <b>B</b> ) as <i>TrAma3</i> . Na figura a linha superior corresponde ao scaffold de <i>T. rangeli</i> e a inferior ao cromossomo 34-S de	

*T. cruzi*. As faixas em vermelho apontam regiões de similaridade e a intensidade do vermelho indica maior grau de identidade entre as sequências. As barras em amarelo correspondem aos genes de amastinas, em verde a tuzina e em preto genes de RNA polimerase.....72

**Figura 13:** A) Análise da organização dos genes de amastina de *Trypanosoma rangeli* por *Southern Blot*. B) Mapa de restrição dos genes apontando os sítios de restrição das enzimas utilizadas. A barra azul representa o quadro aberto de leitura do gene *TrAma7\_1* e a barra vermelha representa o quadro aberto de leitura do gene *TrAma4\_1*.....73

**Figura 14:** Quantificação do número de cópias gênicas por genoma haplóide do *Trypanosoma rangeli* dos genes *Tr\_Ama7\_1* e *TrAma4\_1* utilizando qPCR. O número final de cópias foi obtido a partir da normalização com os valores de quantificação das mesmas amostras para dois genes de DNA topoisomerasas sabidamente de cópia única. O resultado corresponde à média  $\pm$  desvio padrão da quantificação de quatro réplicas biológicas.....74

**Figura 15:** Árvore filogenética das amastinas de tripanosomatídeos baseadas nas sequências utilizadas por Jackson, 2010 para a classificação desta família. O alinhamento das sequências foi realizado pelo programa *T-coffee* e a história evolutiva foi inferida pelo método de Máxima Verossimilhança usando o MEGA versão 6.0. A filogenia foi construída usando o modelo de substituição de aminoácidos WAG+G. A árvore foi desenhada em escala, com o tamanho dos ramos relacionado ao número de substituições por sítio. A análise utilizou 92 sequências completas de amastinas, sendo todos os 863 sítios informativos. Porcentagens de *bootstrap* estão apontadas próximo aos ramos, e correspondem a porcentagem da de árvores nas quais os táxons foram agrupados (1.000 replicatas).....76

**Figura 16:** Padronização da PCR em tempo real para quantificação dos níveis de transcritos das amastinas *TrAma4\_1* e *TrAma7\_1* em diferentes formas evolutivas de *Trypanosoma rangeli*. As curvas de dissociação dos produtos de amplificação de *TrAma4\_1* e *TrAma7\_1* apresentaram-se como picos únicos com temperatura de *melting* de 84,5°C e 80,5 °C (C e F), respectivamente. Curvas padrão geradas a partir da região linear de cada curva de amplificação de *TrAma7\_1* (A) e *TrAma4\_1* (D). Curvas de amplificação para o gene de *TrAma7\_1* (B) e *TrAma4\_1* (E) demonstrando amplificação nas diluições seriadas do cDNA.....77/78

**Figura 17:** Níveis de RNAm dos genes de amastina *TrAma7\_1* e *TrAma4\_1* de *Trypanosoma rangeli*. Foram analisadas formas

epimastigotas (EPI) e tripomastigotas (TRIPO) de *T. rangeli*, utilizando como referência a média geométrica dos genes GAPDH e RNA60s. Os dados foram obtidos por ensaio de qPCR e representam a média e o desvio padrão de três experimentos independentes, realizados em triplicata. O sinal \* indica diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) utilizando o teste ANOVA de uma direção seguida pelo teste de comparação múltipla de Tukey.....79

**Figura 18:** Teste de expressão heteróloga das proteínas recombinantes amastinas de *Trypanosoma rangeli* em *E. coli* BL21(DE3), em diferentes condições. A) rTrAma7\_1 (tamanho esperado  $\pm 12$  kDa), B) rTrAma4\_1 (tamanho esperado  $\pm 39$  kDa). Em vermelho estão identificados os locais dos respectivos pesos moleculares esperados de cada proteína recombinante. P: padrão de peso molecular (*Precision Plus Protein Dual Color Standart* – Bio-Rad), CNI: controle não induzido e ON: “overnight”.....80

**Figura 19:** A amastina TrAma4\_1 é expressa nas duas formas evolutivas de *Trypanosoma rangeli*. O ensaio de *Western Blot* foi conduzido utilizando 30  $\mu$ g extratos proteicos totais de epimastigotas (E) e tripomastigotas (T) de *T. rangeli* e o soro produzido contra um peptídeo dessa proteína reconheceu uma proteína de  $\pm 39$  kDa. Como controle de quantidade proteica foi utilizado um anticorpo anti-Beta tubulina.....81

**Figura 20:** Citolocalização da amastina Tr\_AMA4\_1 de *Trypanosoma rangeli* em formas epimastigotas e tripomastigotas permeabilizadas e não permeabilizadas. A barra corresponde a 10  $\mu$ m.....83

**Figura 21:** Formas epimastigotas de *Trypanosoma rangeli* expressando amastinas de *T. cruzi* fusionadas com a proteína verde fluorescente GFP. A) Tr\_AMA40, B) Tr\_AMAF, C) Tr\_AMA390 e D) Tr\_AMA394 (Barra: 10  $\mu$ m).....84

**Figura 22:** Detecção da expressão amastinas de *Trypanosoma cruzi* fusionadas com GFP em epimastigotas de *Trypanosoma rangeli* através de gel de SDS-PAGE (A) e *Western blot* (B) com anticorpo anti-GFP.....85

**Figura 23:** Análise quantitativa por citometria de fluxo das linhagens de *Trypanosoma rangeli* que apresentam fluorescência associada às amastinas de *Trypanosoma cruzi* fusionadas a GFP. A) Tr\_AMA40; B) Tr\_AMAF; C) Tr\_AMA390 e D) Tr\_AMA394.....86

**Figura 24:** Análise da superexpressão de uma amastina de *Trypanosoma rangeli* na linhagem TrAma\_TR fusionada com a proteína verde

fluorescente GFP. A) Microscopia de fluorescência (Barra: 10  $\mu$ m) e B) Citometria de fluxo.....87

**Figura 25:** Curva de parasitemia média em camundongos BALB/c inoculados por via peritoneal com as linhagens de *Trypanosoma rangeli* Tr\_AMATR. Os valores correspondem a média e desvio padrão da parasitemia de cinco animais por grupo, inoculados com  $5 \times 10^6$  tripomastigotas de *T. rangeli*. A cepa Choachí selvagem foi utilizada como controle (Tr\_WT).....88

**Figura 26:** Curva de parasitemia em camundongos BALB/c inoculados via peritoneal com as linhagens de *Trypanosoma rangeli* expressando as amastinas AMA40, AMAF, AMA 394 e AMA390 de *Trypanosoma cruzi*. Os valores correspondem a média e desvio padrão da parasitemia de cinco animais por grupo, inoculados com  $5 \times 10^6$  tripomastigotas das diferentes linhagens de *T. rangeli*. A cepa Choachí selvagem foi utilizada como controle (Tr\_WT).....89

**Figura 27:** Análises histopatológicas de secções de diferentes tecidos de animais inoculados com as cepas de *Trypanosoma rangeli* transfectada e selvagem. **A:** Amostras de diferentes tecidos corados por HE de animais infectados com Tr\_AMATR e Tr\_WT no 15º dpi, sendo **1:** baço de animais infectados com Tr\_AMATR, **3:** intestino grosso de animais infectados com Tr\_AMATR e **5:** tecido adiposo de animais infectados com Tr\_AMATR; **2:** baço de animais infectados com Tr\_WT, **4:** intestino grosso de animais infectados com Tr\_WT e **6:** tecido adiposo de animais infectados com Tr\_WT; **B)** Tecidos com alterações histopatológicas (**1**) e com detecção de DNA dos parasitos por PCR convencional .....85

**Figura 28:** Alterações teciduais nos camundongos infectados com distintas linhagens de *Trypanosoma rangeli* expressando diferentes amastinas de *T. cruzi*. **A)** Análises histopatológicas de secções de tecido adiposo corados por HE. **1 e 2:** Tecido adiposo de animais infectados com Tr\_AMA40, sendo 1) 5º dpi e 2) 15º dpi; **3 e 4:** Tecido adiposo de animais infectados com Tr\_AMAF, sendo 3) 5º dpi e 4) 15º dpi; **5 e 6:** Tecido adiposo de animais infectados com Tr\_AMA394, sendo 5) 5º dpi e 6) 15º dpi; **7:** Tecido adiposo de animais infectados com Tr\_AMA390 com 5º dpi; **8:** Tecido adiposo de animais infectados com Tr\_WT 5º dpi. **B)** Tecidos com alterações histopatológicas (1) e com detecção de DNA dos parasitos por PCR convencional (2).....96

**Figura 29:** Domínios conservados encontrados na sequência predita de aminoácidos da tuzina de *Trypanosoma rangeli*. PTZ00202 referente ao domínio denominado de Tuzin, Provisional e AAA ATPase referente a

família de domínios que contêm um motivo P-loop que é característico da superfamília AAA.....	112
<b>Figura 30:</b> Predição de possíveis regiões transmembranas (vermelho) da tuzina de <i>Trypanosoma rangeli</i> utilizando o programa <i>TMHMM Server v. 2.0</i> do pacote <i>Expasy</i> . Prováveis regiões extracelulares estão demonstradas em rosa e intracelulares em azul.....	113
<b>Figura 31:</b> Alinhamento múltiplo das sequências aminoacídicas de Tuzina. Em preto estão destacados os aminoácidos idênticos presentes na maioria das sequências listadas, sendo o * correspondente a 100% das sequências possuindo o mesmo aminoácido em uma dada posição. Os aminoácidos conservados estão representados por: na sequência consenso. Identificação das sequências pelo número de acesso no GenBank ou TriTrypDB. LmjF- <i>Leishmania major</i> ; CUG- <i>Bodo saltans</i> ; Tb- <i>Trypanosoma brucei</i> ; Tbg- <i>Trypanosoma brucei gambiense</i> ; Tev- <i>Trypanosoma evansi</i> ; DQ04- <i>Trypanosoma grayi</i> ; ORC- <i>Trypanosoma theileri</i> ; TcCLB- <i>Trypanosoma cruzi CL Brener</i> ; TcSYL- <i>T. cruzi Sylvio</i> ; Tc_MARK- <i>T. cruzi marinkellei</i> ; Tr – <i>Trypanosoma rangeli</i> .....	115/116
<b>Figura 32:</b> Análise filogenética das sequências de aminoácidos das tuzinas de espécies do gênero <i>Trypanosoma</i> . O alinhamento das sequências foi realizado pelo programa Clustal Omega e a história evolutiva foi inferida pelo método de Máxima Verossimelhança usando o MEGA versão 6.0. A filogenia foi construída usando o modelo de substituição de aminoácidos JTT+G. A árvore foi desenhada em escala, com o tamanho dos ramos relacionado ao número de substituições por sítio. A análise utilizou 17 sequências completas de tuzinas. Porcentagens de <i>bootstrap</i> estão apontadas próximo aos ramos, e correspondem a porcentagem da de árvores nas quais os taxons foram agrupados (1.000 replicatas). As sequências de <i>Bodo saltans</i> e <i>Leishmania major</i> foram incluídas para fins de resolução da árvore.....	117
<b>Figura 33:</b> Padronização da PCR em tempo real para quantificação dos níveis de transcritos de tuzina em diferentes formas evolutivas de <i>Trypanosoma rangeli</i> e <i>Trypanosoma cruzi</i> . Curvas de dissociação do gene tuzina de <i>T. rangeli</i> com pico em torno de 83 °C (A) e do gene tuzina de <i>T. cruzi</i> com pico em torno de 85,5°C (D). Curvas padrão geradas a partir da região linear de cada curva de amplificação de <i>T. rangeli</i> (B) e <i>T. cruzi</i> (E). Curvas de amplificação para o gene de <i>T. rangeli</i> (C) e <i>T. cruzi</i> (F) demonstrando amplificação nas diluições seriadas do cDNA. ....	119

**Figura 34:** Níveis de mRNA de tuzina em diferentes formas biológicas de (A) *Trypanosoma rangeli* (Tr\_TUZINA) e (B) *Trypanosoma cruzi* (Tc\_TUZINA). Foram analisadas formas epimastigotas (EPI), tripomastigotas (TRIPO) e amastigotas (AMA) utilizando como referência a média geométrica dos genes GAPDH e RNA60s. Os dados foram obtidos por ensaio de qPCR e representam a média e o desvio padrão de três experimentos independentes, realizados em triplicata. O sinal \* indica diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) utilizando o teste ANOVA de uma direção seguida pelo teste de comparação múltipla Tukey.....120

**Figura 35:** Teste de expressão da rTrSc\_Tuzina em *Escherichia coli* BL21(DE3) pLys S (1) e *E. coli* BL21(DE3) códon plus (2) em diferentes temperaturas e concentrações de IPTG. A e B) [0,15] IPTG; C e D) [0,25] IPTG; E e F) [0,5] IPTG. Em A, C e E são imagens referente à resolução das amostras em SDS-PAGE posteriormente coradas com azul de comassie R250 e B, D e F imagens referentes ao *Western blot* utilizando o anticorpo anti-Histag. P - Padrão de peso molecular: *Protein Precision Plus Dual Color* (Bio-Rad), CNI: controle não induzido e ON: “overnight”.....122

**Figura 36:** Teste de solubilidade da rTrSc\_Tuzina expressa em *Escherichia coli* BL21(DE3) (A) códon plus e (B) pLysS, em três diferentes concentrações de IPTG [0,15; 0,25 e 0,5 e diferentes temperaturas e tempos de indução. P - Padrão de peso molecular: *Protein Precision Plus Dual Color* (Bio-Rad), CNI: controle não induzido e ON: “overnight”.....122

**Figura 37:** Etapas da purificação da rTrSc\_Tuzina por cromatografia de afinidade. A e B): Purificação da fração solúvel da bactéria e C e D): Purificação da fração insolúvel da bactéria. Sendo, A e C: Gel de poliacrilamida SDS-PAGE 12 % corado com Coomassie blue. B e D: *Western blot* utilizando anticorpo monoclonal anti-His•Tag®. P - Padrão de peso molecular: *Protein Precision Plus Dual Color* (Bio-Rad) Lisado bacteriano: L; *Flow Through*: FT – proteínas que não aderiram à resina; Lavagens: L1, L2, L3 e L4; Eluições (E1, E2, E3, E4 e E5).....124

**Figura 38:** (A) *Western blot* utilizando o antissoro anti-TrTuzina em extratos proteicos totais de epimastigotas e tripomastigotas metacíclicos de cultura de *T. rangeli* e *T. cruzi*, e (B) quantificação da expressão da Tr\_TUZINA e Tc\_TUZINA em diferentes formas evolutivas do parasito (ImageJ®). E: epimastigota, T: tripomastigota.....125

**Figura 39:** Citolocalização da tuzina em formas epimastigotas e tripomastigotas *Trypanosoma rangeli* por imunofluorescência utilizando o soro anti-TrTuzina. A barra corresponde a 10  $\mu\text{m}$ .....126

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Iniciadores utilizados para a amplificação dos genes específicos.....	43
<b>Tabela 2:</b> Descrição dos anticorpos utilizados nos ensaios de <i>Western blot</i> , considerando sua origem e diluições utilizadas nas diferentes metodologias.....	53
<b>Tabela 3:</b> Avaliação comparativa da parasitemia e da detecção tissular e sanguínea do <i>Trypanosoma rangeli</i> superexpressando a amastina <i>TrAma4_1</i> (Tr_AMATR) em sangue e tecidos de camundongos experimentalmente infectados.....	90
<b>Tabela 4:</b> Avaliação comparativa da parasitemia e da detecção tissular e sanguínea do <i>Trypanosoma rangeli</i> expressando diferentes amastinas de <i>Trypanosoma cruzi</i> : Tr_AMA40, Tr_AMAF, Tr_AMA390 e Tr_AMA394 em sangue e tecidos de camundongos experimentalmente infectados.....	91
<b>Tabela 5</b> – Detecção de <i>Trypanosoma rangeli</i> por PCR convencional utilizando os iniciadores S35 e S36 em amostras de tecidos de camundongos BALB/c infectados com a linhagem de <i>Trypanosoma rangeli</i> superexpressando a amastina <i>TrAma4_1</i> (Tr_AMATR) em dois diferentes tempos da infecção (5 <sup>o</sup> e 15 <sup>o</sup> dpi). NE representa amostras negativas.....	92
<b>Tabela 6</b> – Detecção de <i>Trypanosoma rangeli</i> por PCR convencional utilizando os iniciadores S35 e S36 em amostras de tecidos de camundongos BALB/c infectados com diferentes linhagens de <i>T. rangeli</i> expressando amastinas de <i>Trypanosoma cruzi</i> . NE representa amostras negativas.....	93

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1:</b> Características gerais das sequências de amastinas identificadas no genoma do <i>Trypanosoma rangeli</i> . MW- peso molecular; pI – ponto isoelétrico.....	67
<b>Quadro 2:</b> Características gerais das sequências de tuzinas de <i>Trypanosoma</i> sp. MW- peso molecular; pI – ponto isoelétrico. As sequências em vermelho correspondem a sequências parciais e algumas análises não foram realizadas para estas sequências.....	114

## ANEXOS

**Anexo 1:** Alinhamento múltiplo das sequências aminoacídicas das  $\alpha$ -amastinas de tripanosomatídeos. Em preto estão destacados os aminoácidos idênticos presentes na maioria das sequências listadas. Os aminoácidos similares estão representados em cinza. Em vermelho encontra-se a região de assinatura das amastinas. A identificação das sequências é pelo número de acesso no TriTrypDB ou descritas no trabalho de Jacson, 2010. Crithidia- *Crithidia fasciculata*; LmjF- *Leishmania major*; LinJ- *Leishmania infantum*; Tb- *Trypanosoma brucei*; Tr – *Trypanosoma rangeli*.....145

**Anexo 2:** Alinhamento múltiplo das sequências aminoacídicas das  $\beta$ 1/2 -amastinas de tripanosomatídeos. Em preto estão destacados os aminoácidos idênticos presentes na maioria das sequências listadas. Os aminoácidos similares estão representados em cinza. Em vermelho encontra-se a região de assinatura das amastinas. A identificação das sequências é pelo número de acesso no TriTrypDB ou descritas no trabalho de Jacson, 2010. Crithidia- *Crithidia fasciculata*; LmjF- *Leishmania major*; LinJ- *Leishmania infantum*; TcCLB- *Trypanosoma cruzi* CL Brener; Tr – *Trypanosoma rangeli*.....147

**Anexo 3:** Alinhamento múltiplo das sequências aminoacídicas das  $p\delta$  -amastinas de tripanosomatídeos. Em preto estão destacados os aminoácidos idênticos presentes na maioria das sequências listadas. Os aminoácidos similares estão representados em cinza. Em vermelho encontra-se a região de assinatura das amastinas. A identificação das sequências é pelo número de acesso no TriTrypDB ou descritas no trabalho de Jacson, 2010. Crithidia- *Crithidia fasciculata*; LmjF- *Leishmania major*; LinJ- *Leishmania infantum*; TcCLB- *Trypanosoma cruzi* CL Brener; Tr – *Trypanosoma rangeli*.....148

**Anexo 4:** Alinhamento múltiplo das sequências aminoacídicas do grupo de ortólogos das amastinas TrAma\_2.1 e TcCLB.506511.80. Em preto estão destacados os aminoácidos idênticos presentes na maioria das sequências listadas. Os aminoácidos similares estão representados em cinza. Em vermelho encontra-se a região de assinatura das amastinas. A identificação das sequências é pelo número de acesso no TriTrypDB ou descritas no trabalho de Jacson, 2010. CFAC1- *Crithidia fasciculata*; LENLEM- *Leishmania enrietti*; TcCLB- *Trypanosoma cruzi* CL Brener; Tr – *Trypanosoma rangeli*. Tc\_MARK- *T. cruzi marinkellei*; DQ04- *Trypanosoma grayi*; EMOLV- *Endotrypanum monterogeii*; Lpyr- *Leptomonas pyrrochoris*.....149

**Anexo 5:** Alinhamento múltiplo das sequências aminoacídicas do grupo de ortólogos das amastinas TrAma\_2.1 e TcCLB.506511.80. Em preto estão destacados os aminoácidos idênticos presentes na maioria das sequências listadas. Os aminoácidos similares estão representados em cinza. A identificação das sequências é pelo número de acesso no TriTrypDB ou descritas no trabalho de Jacson, 2010. CFAC1- *Crithidia fasciculata*; LENLEM- *Leishmania enrietti*; TcCLB- *Trypanosoma cruzi* CL Brener; Tr – *Trypanosoma rangeli*. Tc\_MARK- *T. cruzi marinkellei*; DQ04- *Trypanosoma grayi*; EMOLV- *Endotrypanum monterogeei*; Lpyr- *Leptomonas pyrrochoris*.....150

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	25
1.1 <i>Trypanosoma rangeli</i> .....	25
1.2 Interação do <i>Trypanosoma rangeli</i> com o inseto vetor.....	28
1.3 Interação do <i>Trypanosoma rangeli</i> com o hospedeiro mamífero.....	30
1.4 Tripanosomatídeos e os marcadores de interação celular.....	31
1.5 Papel das amastinas na interação parasito-hospedeiro.....	33
1.6 Tuzina e sua relação com as Amastinas e o hospedeiro.....	36
2. OBJETIVO.....	38
2.1 Objetivo Geral.....	38
2.1 Objetivos Específicos.....	38
3. METODOLOGIA.....	39
3.1 Análise <i>in silico</i> da organização genômica das amastinas e da tuzina.....	39
3.2 Parasitos .....	40
3.3 Obtenção das sequências codificadoras das amastinas e tuzina de <i>Trypanosoma rangeli</i> e <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	41
3.3.1 Extração do DNA total de <i>Trypanosoma rangeli</i> e <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	41
3.3.2 Desenho dos iniciadores.....	42
3.3.3 Padronização da PCR.....	44
3.4 Determinação do número de cópias dos genes das Amastinas no genoma do <i>T. rangeli</i> através de <i>Southern Blot</i> .....	45
3.5 PCR quantitativa em tempo real (qPCR) para avaliação do número de cópias dos genes das Amastinas no genoma do <i>T. rangeli</i> .....	46
3.5.1 Análise dos resultados da qPCR.....	46
3.6 Clonagem dos insertos.....	46
3.7 Extração do DNA plasmidial.....	47
3.8 Clonagem em vetor de expressão pET 14b.....	47
3.9 Sequenciamento do DNA.....	48
3.10 Análise da qualidade e identidade das sequências gênicas obtidas por sequenciamento.....	48
3.11 Análise dos níveis de transcritos dos genes das amastinas e tuzinas em diferentes formas evolutivas do <i>T. rangeli</i> e <i>T. cruzi</i> .....	48
3.11.1 Extração de RNA total.....	49
3.11.2 Tratamento com DNaseI.....	49
3.11.3 Reação de Transcrição Reversa (RT-PCR).....	49
3.11.4 PCR quantitativa em tempo real (qPCR) para avaliação dos níveis de transcritos.....	50

3.11.5	Análise dos resultados da qPCR.....	51
3.12	Expressão heteróloga das proteínas recombinantes.....	52
3.13	<i>Western Blot</i> .....	52
3.14	Purificação da proteína Tuzina em <i>E. coli</i> BL21(DE3) Códon Plus.....	54
3.15	Dosagem de proteínas.....	55
3.16	Obtenção de soro policlonal anti- rTrSc_Tuzina.....	55
3.16.1	Considerações Éticas e de Biossegurança.....	55
3.16.2	Obtenção do soro.....	55
3.17	Obtenção de soro policlonal anti- Amastina.....	56
3.18	Superexpressão da amastina <i>TrAma4_1</i> de <i>T. rangeli</i> .....	56
3.19	Expressão heteróloga das amastinas pertencentes às subfamílias $\beta$ e $\delta$ de <i>T. cruzi</i> em <i>T. rangeli</i> .....	57
3.20	Citometria de fluxo.....	59
3.21	Caracterização das cepas transfectadas.....	59
3.22	Imunofluorescência indireta (RIFI).....	59
3.23	Ensaio <i>in vivo</i> com os parasitos expressando diferentes amastinas de <i>T. cruzi</i> e superexpressando uma amastina de <i>T. rangeli</i> .....	60
3.23.1	Camundongos.....	60
3.23.2	Infecção de camundongos BALB/c.....	60
3.23.3	Avaliação histopatológica de camundongos infectados com as cepas transfectadas de <i>T. rangeli</i> .....	60
3.23.4	PCR convencional para diagnóstico de parasitos em sangue e tecido de camundongos.....	61
	<b>Capítulo 1:</b> Análises <i>in silico</i> , características biológicas e dinâmica da infecção <i>in vivo</i> das amastinas de <i>Trypanosoma rangeli</i> .....	62
1.	JUSTIFICATIVA.....	63
2.	RESULTADOS.....	65
2.1	Conservação, estrutura e organização genômica das Amastinas de <i>T. rangeli</i> .....	65
2.2	Análise dos níveis de transcritos das amastinas de <i>T. rangeli</i> .....	69
2.3	Expressão heteróloga das amastinas <i>TrAma4_1</i> e <i>TrAma7_1</i> de <i>T. rangeli</i> .....	79
2.4	Obtenção e avaliação de linhagens de <i>T. rangeli</i> expressando amastinas de <i>T. cruzi</i> .....	84
2.5	Obtenção e avaliação de uma linhagem de <i>T. rangeli</i> superexpressando uma $\alpha$ -amastina de <i>T. rangeli</i> ( <i>Tr_AMATR</i> ).....	86
2.6	Ensaio <i>in vivo</i> com parasitos da cepa Choachí de <i>T. rangeli</i> expressando amastinas de <i>T. cruzi</i> e superexpressando a <i>TrAma4_1</i> ( <i>Tr_AMATR</i> ) de <i>T. rangeli</i> .....	87
3.	DISCUSSÃO.....	97

4. CONCLUSÕES.....	108
<b>Capítulo 2: Análises <i>in silico</i>, níveis de transcritos e expressão da tuzina de <i>T. rangeli</i>.....</b>	<b>110</b>
1. JUSTIFICATIVA.....	111
2. RESULTADOS.....	112
2.1 Conservação, estrutura e organização genômica da Tuzina de <i>T. rangeli</i> .....	112
2.2 Análise dos níveis de transcritos da tuzina de <i>T. rangeli</i> e de <i>T. cruzi</i> nos diferentes estágios evolutivos dos parasitos.....	117
2.3 Análise dos níveis de expressão proteica da tuzina de <i>T. rangeli</i> e <i>T. cruzi</i> nos diferentes estágios evolutivos do parasito.....	120
2.4 Ensaio de citolocalização da tuzina de <i>T. rangeli</i> .....	125
3. DISCUSSÃO.....	127
4. CONCLUSÕES.....	131
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	132
Anexos.....	145

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 *Trypanosoma rangeli*

Protozoários do gênero *Trypanosoma* pertencentes à Ordem Kinetoplastida, Família Trypanosomatidae, são parasitos com ciclos de vida alternando entre um hospedeiro invertebrado e também frequentemente, entre um hospedeiro mamífero, estando presente no sangue e tecidos (MYLER, 1993). *Trypanosoma (Herpetosoma) rangeli* é um protozoário hemoflagelado (Figura 1), sendo um tripanosomatídeo que ocorre exclusivamente no continente americano capaz de infectar diversos mamíferos, incluindo o ser humano (GUHL e VALLEJO, 2003).



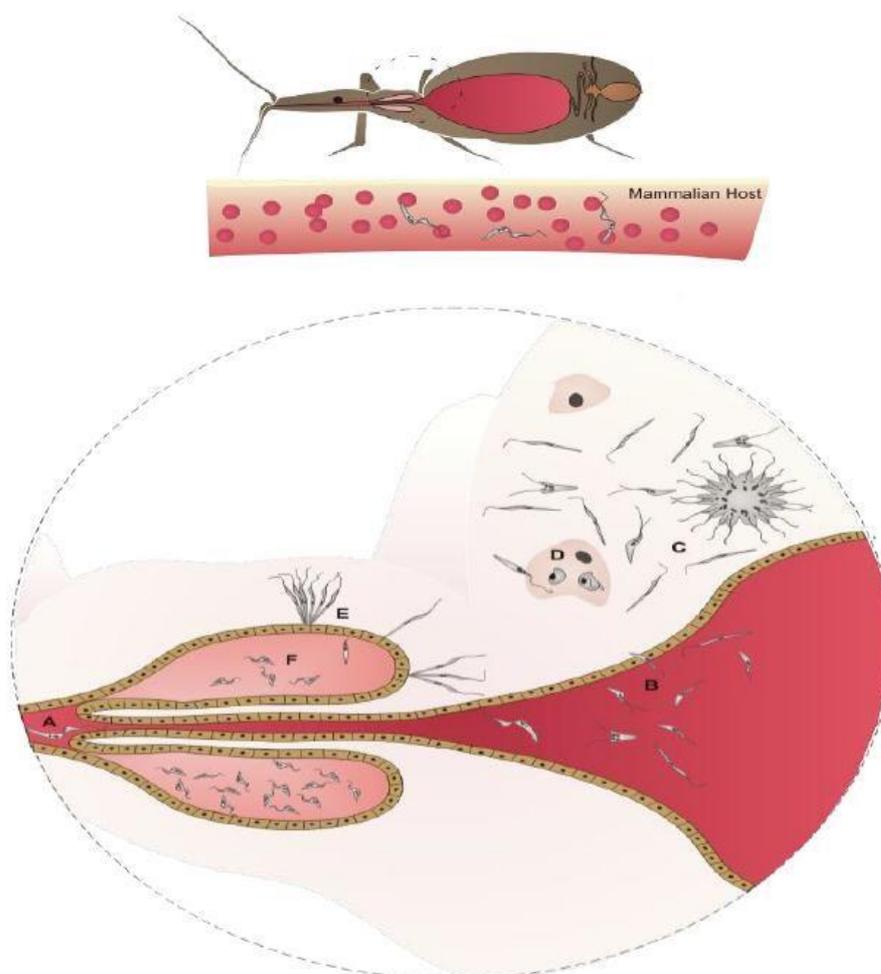
**Figura 1:** Microfotografia da forma tripomastigota sanguínea de *Trypanosoma rangeli* em sangue de camundongo experimentalmente infectado (corado por Giemsa) (aumento de 1.000x). Fonte: Stoco (2010).

De Leon (1952) detectou pela primeira vez *T. rangeli* em amostras de sangue humano ao estudar a doença de Chagas na Guatemala. Desde então, mais de 2.600 casos de infecção humana já foram descritos (D'ALESSANDRO, 1976; D' ALESSANDRO e SARAVIA, 1992; STEINDEL, 1993; GRISARD *et al.*, 1999). Sabe-se que *Trypanosoma cruzi* e *T. rangeli* vivem em simpatria, possuindo ampla distribuição nas Américas Central e do Sul, com sobreposição de áreas geográficas (Figura 2). Além disso, estas duas espécies compartilham uma grande variedade de reservatórios mamíferos, incluindo as Ordens Xenartha, Marsupialia, Carnivora, Rodentia e Primata (AÑES, 1987; CUBA CUBA, 1998). Entretanto, de forma contrária ao que ocorre para *T. cruzi* não há evidências de que *T.*



## 1.2 Interação do *Trypanosoma rangeli* com o inseto vetor

O ciclo de vida dos parasitos pertencentes ao gênero *Trypanosoma* é complexo, sendo possível observar diferentes estágios de desenvolvimento caracterizados por alterações estruturais e metabólicas em consequência das adaptações decorrentes de passagens pelos diferentes organismos hospedeiros: invertebrados e vertebrados (SOUTO-PADRÓN, 2002). De forma distinta ao observado para o *T. cruzi*, a transmissão do *T. rangeli* para o hospedeiro mamífero ocorre por via inoculativa, sendo que nos triatomíneos este parasito invade a hemolinfa e posteriormente as glândulas salivares onde são formadas as suas formas infectivas (Figura 3) (AÑEZ *et al.*, 1987; GROOT, 1954; MARINKELLE, 1968; TOBIE, 1965, 1970; HECKER *et al.*, 1990; D'ALESSANDRO, 1999; FERREIRA *et al.*, 2010). Ao contrário do observado em insetos infectados pelo *T. cruzi*, a infecção dos triatomíneos pelo *T. rangeli* determina patologia ao inseto vetor (VALLEJO *et al.*, 2009), afetando a homeostase de suas glândulas salivares, alterando a atividade anti-hemostática da saliva e, por conseguinte, incorrendo em dificuldade ao repasto sanguíneo. A infecção pode ainda acarretar em um aumento do volume da hemolinfa e uma variação no desenvolvimento do inseto, promovendo dificuldade nas mudas entre estádios de desenvolvimento e/ou deformidade das ninfas/adultos emergentes, levando ao aumento da mortalidade destes triatomíneos (GARCIA *et al.*, 1994; GUHL e VALLEJO, 2003).



**Figura 3:** Ciclo biológico do *Trypanosoma rangeli* no hospedeiro invertebrado. (A) Ingestão das formas tripomastigotas durante o repasto sanguíneo do triatomíneo; (B) Formas epimastigotas curtas no intestino médio do triatomíneo se dividem e podem invadir a hemocele ou seguir até a ampola retal, onde algumas se diferenciam em formas tripomastigotas e podem ser excretadas junto com as fezes e urina; (C) na hemocele dividem-se de forma livre como epimastigotas longos ou (D) podem invadir hemócitos onde a multiplicação não é certa. (E) Invasão das glândulas salivares pelos epimastigotas de forma longa e (F) diferenciação para formas infectantes (tripomastigotas metacíclicos), as quais são inoculadas com a saliva durante o repasto sanguíneo (F). Fonte: Stoco *et al.* (2016).

A infecção do trato intestinal do vetor pelo *T. rangeli* pode persistir por toda a vida do inseto, entretanto, parasitos são usualmente encontrados nas fezes de 31 a 70% dos insetos infectados (PIFANO *et*

*al.*, 1948; D'ALESSANDRO, 1976; CUBA, 1975; HECKER *et al.*, 1990). Estes parasitos eliminados juntamente com as fezes do vetor também podem ser infectantes para os hospedeiros mamíferos, não sendo, entretanto a forma primordial de transmissão (RENTIFO *et al.*, 1950; D'ALESSANDRO, 1976; TOBIE, 1964; HECKER *et al.*, 1990).

Os membros da Família Trypanosomatidae caracterizam-se por apresentarem uma diversidade de estágios morfológicos relacionados às fases do ciclo biológico e às interações com o meio em que se encontram (CUBA CUBA, 1998). No vetor, *T. rangeli* apresenta-se em sua forma epimastigota replicativa no trato intestinal e na hemolinfa, ao passo que após a penetração das glândulas salivares, diferencia-se em formas tripomastigotas metacíclicas infectivas para os hospedeiros mamíferos. Nestes, *T. rangeli* é unicamente observado em sua forma tripomastigota sanguínea (REY, 2001; SOUTO-PADRÓN, 2002).

No trato digestivo de *R. prolixus*, a diferenciação das formas tripomastigotas do *T. rangeli* ingeridas durante o repasto sanguíneo dá origem a formas epimastigotas curtas e longas que se dividem e colonizam o trato intestinal. Estas formas aderem e interagem com o epitélio do intestino médio, sendo estas interações mediadas provavelmente por lectinas/ligantes presentes na superfície do parasito e nas células epiteliais do inseto, ultimando com sua passagem à hemocele do triatomíneo (OLIVEIRA e SOUZA, 2001).

O tempo que decorre entre a colonização do trato intestinal pelo *T. rangeli* e a detecção do parasito na hemolinfa do triatomíneo é dependente da cepa do parasito e da espécie do vetor, podendo variar consideravelmente e mesmo ficar restrita ao trato intestinal. No curso normal de infecção, a invasão da hemolinfa ocorre entre duas a quatro semanas após a colonização do intestino (GROOT, 1954; GREWAL, 1957; D'ALESSANDRO, 1976).

Entretanto, a presença do parasito na hemolinfa já foi registrada apenas 24 horas após o repasto infectivo (AÑEZ, 1980). No decorrer da infecção da hemolinfa de *R. prolixus* por *T. rangeli* ocorre uma diminuição da atividade dos mecanismos humorais e celulares de defesa imune do vetor, sendo coincidente com o desaparecimento das formas curtas do parasito neste compartimento (FEDER *et al.*, 1999; GOMES *et al.*, 2002; GARCIA *et al.*, 2004). Vários trabalhos têm demonstrado que a resposta imune do inseto é voltada preferencialmente às formas curtas, enquanto que as formas longas teriam a capacidade de evadir e seriam responsáveis pela manutenção da infecção, bem como pela

invasão das glândulas salivares (MELLO *et al.*, 1995, 1999; GOMES *et al.*, 1999, 2002).

Uma vez que a transmissão do *T. rangeli* ao hospedeiro mamífero ocorre quando os parasitos são inoculados juntamente com a saliva durante a picada do triatomíneo, um passo crucial no ciclo do parasito é a penetração nas glândulas salivares do inseto (MEIRELLES *et al.*, 2005). Na hemolinfa, os epimastigotas multiplicam-se livremente e migram para as glândulas salivares do inseto onde penetram, aderem-se pelos flagelos aos microvilos das células glandulares e iniciam a diferenciação em formas tripomastigotas metacíclicas no lumen glandular (MEIRELLES *et al.*, 2005). Não foram descritos até o momento mecanismos de defesa que sejam desencadeados pela presença do *T. rangeli* nas glândulas salivares, apesar dos efeitos deletérios ao inseto provocados pela presença do parasito nas mesmas. Entretanto, foi demonstrado que a infecção por *T. rangeli* promove a inibição da atividade de uma tirosina fosfatase, o que induz uma redução da atividade da enzima óxido nítrico sintase, responsável pela produção de óxido nítrico (GAZOS-LOPES *et al.*, 2012). A redução na produção desse potente vasodilatador, provavelmente, contribui para o aumento nos tempos de ingestão sanguínea.

### **1.3 Interação do *Trypanosoma rangeli* com o hospedeiro mamífero**

Embora o ciclo no hospedeiro invertebrado já esteja bem esclarecido, pouco se sabe sobre a interação do *T. rangeli* com seus hospedeiros mamíferos. A existência de multiplicação intracelular do parasito nestes hospedeiros permanece controversa apesar de análises histopatológicas de camundongos experimentalmente infectados não terem mostrado evidências desse tipo de comportamento (HERBIG-SANDREUTER, 1955). A literatura apresenta resultados heterogêneos quanto à persistência do *T. rangeli* no sangue periférico de seus hospedeiros mamíferos. Embora normalmente apresente parasitemia baixa e de curta duração, estudos como o de Urdaneta-Morales e Tejero (1985) mostram que durante uma infecção experimental em camundongos foi possível observar níveis de parasitemia até sete vezes maiores que o inóculo original, sugerindo que o parasito seria capaz de se multiplicar nesse hospedeiro. Estes mesmos autores também descreveram formas amastigotas em secções do coração, fígado e baço

de camundongos infectados com a cepa Perro-82, no entanto esses resultados nunca foram reproduzidos.

Diversos estudos *in vitro* demonstraram que a taxa de infectividade de diferentes cepas deste parasito frente a distintas linhagens celulares, sendo elas fagocíticas ou não, é sempre muito baixa e os parasitos desaparecem ao longo do tempo de interação, sugerindo a ausência de multiplicação intracelular e sua desintegração, especialmente em macrófagos (MOLYNEUX, 1973; OSORIO *et al.*, 1995; TANOURA *et al.*, 1999; EGER-MANGRICH *et al.*, 2001). Contrariamente a outros estudos, Zuñiga e colaboradores (1997) realizaram experimentos com ensaios de interação *in vitro* e verificaram um aumento no número de parasitos intracelulares em tempos prolongados de interação, sugerindo a capacidade de multiplicação da cepa C23 de *T. rangeli* em células Vero e em promonócitos murinos. Assim, estudos sobre aspectos fundamentais da capacidade replicativa do *T. rangeli* no hospedeiro mamífero são contraditórios e incipientes, sendo necessário ensaios com cepas devidamente caracterizadas que possibilitem explicar de forma mais clara, a aparente falta de virulência e multiplicação.

#### **1.4 Tripanosomatídeos e os marcadores de interação celular**

Sabe-se que o estabelecimento de infecção por tripanosomatídeos em hospedeiros mamíferos depende de uma série de eventos envolvendo interações entre diferentes moléculas do parasito com as células hospedeiras, o que leva a uma mobilização de cálcio intracelular em ambas as células (YOSHIDA, 2006; KIMA, 2000). Tipicamente, é possível encontrar uma proporção significativa do genoma de um tripanosomatídeo contendo grandes famílias que codificam proteínas de superfície. Muitas dessas proteínas funcionam como: moléculas de adesão à célula hospedeira, moléculas envolvidas na invasão celular, componentes de mecanismos de evasão imune e/ou proteínas de sinalização (STOCO *et al.*, 2014).

Os tripanosomatídeos, apresentam mecanismos genéticos peculiares, como por exemplo, a organização dos genes codificadores de proteínas em unidades policistrônicas, mantendo os genes organizados em conjuntos, mas que não codificam proteínas com funções relacionadas entre si (MARTÍNEZ CALVILLO *et al.*, 2010). Sabe-se também que o processamento dos transcritos é feito por um mecanismo de *trans-splicing* que inicialmente forma os pré-mRNA e, em seguida, pela edição do RNA é formado o mRNA maduro. O

mRNA maduro dos tripanosomatídeos apresentam, na extremidade 5', uma sequência extremamente conservada de 39 nucleotídeos denominada sequência líder (*Spliced-leader*, *SL* ou *Mini-exon*), derivada inicialmente de um RNA de aproximadamente 110 nucleotídeos. Como o RNA mensageiro e o RNA do SL são codificados por genes situados em diferentes sítios do genoma, o processo é denominado de *trans-splicing* (LANDFEAR, 2003, ARAÚJO, TEIXEIRA, 2011).

Nestes parasitos, a RNA polimerase I transcreve os genes ribossomais e a RNA polimerase III transcreve moléculas de RNA nuclear. Os genes do SL são transcritos pela RNA polimerase II, a qual também transcreve o mRNA. Contudo, as polimerases e os promotores associados à transcrição dos genes que codificam proteínas ainda não foram completamente identificados (GILINGER, BELLOFATTO, 2001, LANDFEAR, 2003). O fato de que genes presentes na mesma unidade policistrônica apresentam níveis de mRNA processado distintos reforça a ideia de que a regulação ocorra em nível pós-transcricional, pois sabe-se que essas alterações não implicam necessariamente na expressão de uma determinada proteína, sendo necessários mais estudos a fim de elucidar esses mecanismos de controle transcricionais e pós-transcricionais (LÜCKEMEYER, 2014).

Sabe-se que nestes parasitos ocorre uma rápida alteração dos padrões de expressão gênica, a qual possibilita a adaptação do parasito a diferentes ambientes, característica importante já que eles apresentam diferentes formas e hospedeiros durante seus ciclos de vida. Diversos estudos mostram que a forma tripomastigota do *T. cruzi* é altamente móvel e capaz de infectar diferentes tipos de células, incluindo células não fagocíticas. A invasão da célula hospedeira, além de ser uma estratégia de escape do sistema imune, é essencial para a sobrevivência, replicação e estabelecimento da infecção pelo *T. cruzi* (TEIXEIRA *et al.*, 1994).

Alves e Mortara, em 2009, relatam a caracterização de algumas proteínas de *T. cruzi* diferencialmente expressas na interação parasito-hospedeiro, especialmente durante o processo invasivo. Dentre estas, as mucinas são glicoproteínas ancoradas por GPI expressas em maior quantidade na superfície de *T. cruzi*, com tamanho e conteúdo glicano característico para cada fase do ciclo do parasito (BUSCAGLIA *et al.*, 2006). *T. cruzi* não possui a maquinaria necessária para a síntese de ácido siálico e, portanto, as trans-sialidades, também ancoradas por GPI, transferem estas moléculas do hospedeiro para o parasito mimetizando a superfície das células com a atuação mais intensa no

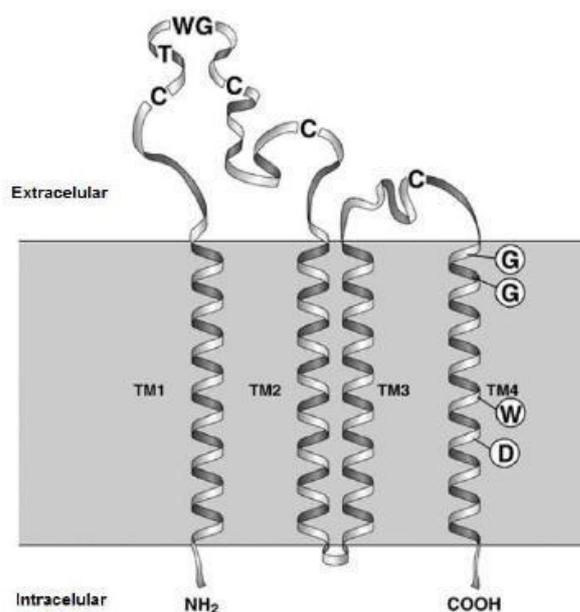
estágio infectivo, ou seja, na fase tripomastigota (GIORGI E DE LEDERKREMER, 2011).

Para *T. cruzi*, os dois estágios do parasito presentes no hospedeiro mamífero (tripomastigota e amastigota) apresentam grande relevância para a doença, pois há o constante contato com o hospedeiro vertebrado e os antígenos produzidos nesse estágio são constantemente apresentados ao sistema imune. Devido à estas características importantes e à falta de dados acerca do parasito em sua forma intracelular, Teixeira e colaboradores (1994) iniciaram estudos de genes cujo mRNA era muito mais expresso na forma amastigota. Estes genes foram então denominados de amastinas.

### 1.5 Papel das amastinas na interação parasito-hospedeiro

Inicialmente, Teixeira e colaboradores (1994) observaram que as amastinas constituem uma família multigênica que apresenta 12 cópias no genoma de *T. cruzi*. Stoco e colaboradores (2014), a partir de dados genômicos do clone CL Brener de *T. cruzi* utilizaram uma abordagem baseada na cobertura do *reads* e constataram a existência de 27 cópias gênicas dessa família. Através de uma metodologia similar à utilizada por Teixeira e colaboradores (1994), Wu e colaboradores (2000) identificaram um gene com 36 % de similaridade à amastina de *T. cruzi* em diferentes espécies de *Leishmania* sp. A partir dos dados gerados pelo sequenciamento do genoma do *T. rangeli* foi possível observar com base em cobertura de *reads* aproximadamente 72 cópias gênicas de amastina neste parasito (STOCO *et al.*, 2014). Entretanto, até o momento permanecem desconhecidos os níveis de expressão destes genes, bem como as funções biológicas das amastinas neste parasito que aparentemente não apresenta uma forma amastigota intracelular.

Em *T. cruzi*, as amastinas foram primeiramente descritas através de uma seleção de genes diferencialmente expressos em uma biblioteca de cDNA de formas amastigotas. Os clones dessa biblioteca foram selecionados com uma sonda elaborada a partir de RNA de formas amastigotas ou epimastigotas, permitindo a determinação de quais clones continham cDNA mais expressos em cada forma (TEIXEIRA *et al.*, 1994). A estrutura secundária das amastinas apresenta quatro regiões transmembranares, sendo que a primeira região corresponde a um potencial peptídeo sinal, duas regiões extracelulares e as extremidades voltadas para o citoplasma (Figura 4).



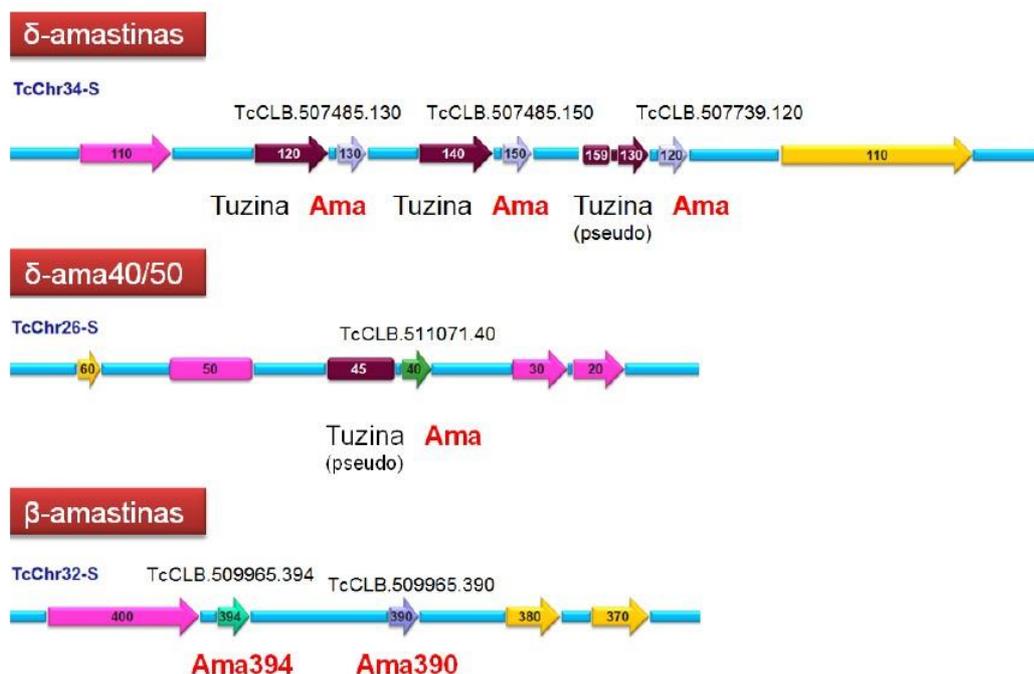
**Figura 4:** Topologia predita das proteínas de superfície Amastinas. A maioria das amastinas contém quatro regiões transmembrana (TM) com N-terminal curto e cauda C-terminal, ambos voltados para o citosol. Letras representam aminoácidos conservados. Fonte: Kangussu-Marcolino, 2014.

A transcrição do gene de amastina durante os diferentes estágios de vida do *T. cruzi* é semelhante, o que indica a presença de um mecanismo de regulação pós-transcricional para explicar a diferença nos níveis de transcritos desse gene nos diferentes estágios evolutivos do parasito. Acredita-se que a modulação da estabilidade do mRNA de amastina é o principal mecanismo responsável pelos altos níveis deste mRNA no estágio amastigota (COUGHLIN *et al.*, 2000).

Estudando a dinâmica de evolução e diversificação da família das amastinas, Jackson (2010) subdividiu essa família gênica em quatro grupos de levando em consideração a posição genômica e a estrutura secundária. As  $\alpha$ -amastinas estão presentes, em *L. major* como um par *in tandem* de isoformas estruturalmente distintas, localizadas no cromossomo 28. As  $\beta$ -amastinas estão presentes como um agrupamento de genes *in tandem*, compreendendo múltiplas cópias de duas isoformas estruturalmente distintas. As  $\gamma$ -amastinas são conservadas no gênero *Leishmania* sp. e ocorrem como um agrupamento gênico composto de múltiplas cópias, porém sendo ausentes no gênero *Trypanosoma* sp. Por fim, os genes de  $\delta$ -amastinas (incluindo as amastinas denominadas  $p\delta$ ) formam um grupo altamente diverso e estão espalhadas em diversos *loci* em vários cromossomos tanto para *T. cruzi* quanto para o gênero *Leishmania* sp., estando

intercaladas com os genes de tuzina. Somente um *locus* é conservado entre estes organismos como um agrupamento gênico *in tandem*. Na figura 5 é possível observar a organização genômica de algumas amastinas de *T. cruzi* (CRUZ *et al.*, 2012; KANGUSSU-MARCOLINO *et al.*, 2013).

A maioria das amastinas de *T. cruzi* está localizada na superfície do parasito e nem todos os genes têm sua expressão regulada em amastigotas. Acredita-se que elementos de regulação pós-transcricional localizados na região 3'UTR sejam responsáveis pela expressão diferencial das  $\delta$ -amastinas em amastigotas de diferentes cepas de *T. cruzi*. Enquanto isso, os transcritos de  $\beta$ -amastina são mais abundantes em epimastigotas. As  $\delta$ -amastinas de *T. cruzi* têm sido associadas à diferenciação de amastigotas em tripomastigotas infectantes. Genes representativos das subfamílias de amastinas  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\delta$  estão presentes no genoma do *T. rangeli* (STOCO *et al.*, 2014), mas o seu padrão de expressão, localização celular, envolvimento na interação com células do hospedeiro e a importância relacionada a expansão desta família gênica neste parasito precisam ser investigados.



**Figura 5:** Organização genômica das isoformas das amastinas de *T. cruzi*. As seis amastinas atualmente identificadas em *Trypanosoma cruzi* pertencem as subfamílias,  $\beta$  e  $\delta$ . As  $\delta$ - amastinas são codificadas por genes presentes nos cromossomos 26 ( $\delta$ -Ama40) e 34, com uma e três cópias respectivamente, acompanhadas por seqüências codificadoras de tuzina. As  $\beta$ - amastinas são codificadas por duas cópias do gene presentes no cromossomo 32 (JACKSON, 2010; TRITRYPDB, 2011). As setas indicam regiões codificadores de proteínas. As setas correspondem a amastinas e as caixas indicam pseudogenes. FONTE: Kangussu-Marcolino, 2014 (Adaptado de TRITRYPDB, 2014 e Jackson, 2010).

A expressão de amastinas pelas formas amastigotas sugere que estas proteínas podem ser relevantes para a internalização do parasito durante a infecção do hospedeiro mamífero. Em 2005, demonstrou-se que as amastinas estimulam uma forte resposta imune durante a infecção por *Leishmania* sp. ou *T. cruzi* (MORTARA *et al.*, 2005). Camundongos imunizados com vetores de DNA contendo genes codificadores de amastinas de *L. major* apresentaram maior resistência a infecção (STOBER *et al.*, 2006).

### 1.6 Tuzina e sua relação com as Amastinas e o hospedeiro

Estudando a organização genômica das amastinas, Teixeira e colaboradores em 1995 encontraram genes denominados tuzinas que se intercalam aos genes de amastina. Apesar de estarem agrupados no

genoma e de serem transcritos em um único pré- mRNA policistrônico, a regulação dos genes de amastinas e tuzinas é distinta. O mRNA de amastina é cerca de 50 vezes mais abundante no estágio amastigota em relação às outras formas do parasito e também está em níveis mais elevados quando comparado com os níveis do mRNA de tuzina. Enquanto em *T. cruzi* existem 83 cópias do gene da tuzina, em *T. rangeli* foram observadas apenas 34 cópias (STOCO *et al.*, 2014).

As tuzinas encontram-se intercaladas no genoma dos tripanosomatídeos apenas com as  $\delta$ -amastinas, mesmo após uma grande diversificação evolutiva, as tuzinas continuam associadas unicamente com essa subfamília (JACKSON, 2010). Sabe-se que evolutivamente determinados tripanosomatídeos perderam algumas das subfamílias de amastinas, como por exemplo, as  $\delta$ -amastinas são encontradas em *T. cruzi*, mas não em *T. brucei*. Entretanto, mesmo com a ausência de amastinas pertencentes à subfamília delta, *T. brucei* ainda mantém os genes de tuzina em seu genoma (JACKSON, 2010).

Até o presente momento pouco se sabe a respeito das tuzinas presentes nos tripanosomatídeos. Estas moléculas encontram-se intercaladas às  $\delta$ -amastinas no genoma e apresentam sua expressão variada em determinadas fases do ciclo dos tripanosomatídeos. Até pouco tempo, imaginava-se que as mesmas não desempenhavam papel significativo na biologia do parasito. Entretanto, estudos recentes da sequência aminoacídica das tuzinas revelou a presença de um domínio ATPase, o qual pode estar ligado a alguma função destes genes (LAIBIDA *et al.*, 2014).

Estudos recentes realizaram uma triagem imunológica, através de ensaios imunológicos *in vitro*, que identificou, dentre quatro novos antígenos, a tuzina como um importante candidato à vacina contra leishmaniose visceral, principalmente devido a sua grande capacidade antigênica (LAKSHMI *et al.*, 2014). Logo, é de extrema importância o conhecimento aprofundado deste gene, não apenas pela sua associação com as amastinas, mas também pelas suas características e funções individuais.

## 2. OBJETIVO

### 2.1 Objetivo geral

Realizar a caracterização das amastinas e tuzina durante o ciclo celular do *Trypanosoma rangeli* e na interação parasito/hospedeiro.

### 2.2 Objetivos Específicos

- Estudar a organização genômica *in silico* das sequências aminoacídicas das amastinas e tuzina de *T. rangeli*;
- Quantificar o número de transcritos de duas diferentes amastinas e uma tuzina de *T. rangeli*;
- Avaliar a sublocalização e o padrão de expressão dessas proteínas nas diferentes formas evolutivas do parasito;
- Avaliar os efeitos da superexpressão da  $\alpha$ -amastina Tr\_AMA4\_1 de *T. rangeli* na interação com células de mamíferos *in vivo*;
- Realizar a expressão heteróloga de duas amastinas dos grupos  $\beta$  e  $\delta$  de *T. cruzi* em *T. rangeli* e verificar a capacidade de infecção e replicação dos parasitos transfectados.

### 3. METODOLOGIA

#### 3.1 Análise *in silico* da organização genômica das amastinas e da tuzina

As buscas das sequências correspondentes aos genes de amastinas e tuzinas no genoma de *T. rangeli* foram realizadas utilizando diferentes abordagens. Foram realizadas buscas nas sequências disponíveis no GenBank, TriTrypDB e em bancos de dados genômicos do *T. rangeli* disponível em nosso laboratório. Estes bancos contêm diferentes montagens do genoma desse parasito obtidas a partir de sequenciamentos nas seguintes plataformas: 454, Illumina HiSeq e PacBio. Alguns desses dados foram gerados após a publicação do genoma do *T. rangeli* (STOCO *et al.*, 2016) em colaboração com o Dr. Björn Andersson do Karolinska Institutet (Suécia). As buscas pelos genes codificantes para amastina e tuzina foram realizadas via tBLASTn ou BLASTP utilizando sequências já descritas em *T. cruzi*. Além dessa abordagem, o domínio de amastina foi procurado nas sequências genômicas de *T. rangeli* a partir de rpsBlast usando o banco de dados CDD e HMMsearch usando o domínio pfam07344. Para as análises comparativas, as demais sequências de tripanosomatídeos utilizadas neste trabalho foram obtidas em sua maioria no TriTrypDB e as sequências de *Bodo saltans* e *Trypanosoma theileri* foram obtidas do GenBank. Especificamente para a classificação das amastinas nas sub-famílias  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$  e  $\gamma$  foram utilizadas as sequências de amastinas do estudo de Jackson *et al.* (2010).

A tradução das sequências nucleotídicas de *T. rangeli* para sequências aminoacídicas foi realizada utilizando o programa *Translate* (<http://web.expasy.org/translate/>) e a predição dos parâmetros físico-químicos foi realizada com o programa *ProtParam* (<http://web.expasy.org/protparam/>), ambos do pacote ExPASy (*Expert Protein Analysis System*). Os domínios conservados presentes nas sequências foram identificados a partir de rpsBlast sendo as representações esquemáticas obtida com a ferramenta disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>.

A predição da presença de peptídeo sinal, sítios de clivagem e/ou sequências de endereçamento de todas as sequências foi utilizando os programas iPsrt (<http://ipsort.hgc.jp/>), *SignalP* (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) e *mitoprot* (<https://ihg.gsf.de/ihg/mitoprot.html>), respectivamente. As prováveis

regiões transmembranares foram identificadas utilizando o programa TMHMM Server v. 2.0 também disponível no pacote ExPASy.

As análises de sintenia foram realizadas utilizando o programa Artemis (RUTHERFORD *et al.*, 2000) no qual os *scaffolds* de *T. rangeli* foram alinhados aos cromossomos de *T. cruzi* CL Brener. As representações dos alinhamentos entre os *scaffolds* de *T. rangeli* e cromossomos de *T. cruzi* CL Brener e a identificação dos genes ortólogos foi realizada em escala no programa IBS 1.0 (WENZHONG *et al.*, 2015).

As sequências aminoacídicas foram alinhadas utilizando-se o programa Clustal Omega (SIEVERS; HIGGINS, 2014) para as tuzinas e o programa T-coffee (NOTREDAME, HIGGINS, HERINGA, 2000) para as amastinas. As análises evolutivas e a geração das árvores filogenéticas foram realizadas utilizando-se o programa MEGA 6.0. O alinhamento referente a cada gene foi submetido a pesquisa do melhor modelo proteico usando o ModelTest ou o próprio MEGA e o modelo com o menor BIC score (*Bayesian Information Criterion*) foi considerado para descrever o padrão de substituição. A história filogenética foi inferida pelo método de Máxima verossimilhança baseado no modelo Le\_Gascuel\_2008. O teste de bootstrap (1.000 replicatas) foi aplicado e a porcentagem de árvores nas quais os táxons associados agruparam juntos está apresentada próximo aos ramos.

### 3.2 Parasitos

Neste trabalho foi utilizada a cepa Choachí de *T. rangeli*, originalmente isolada de glândulas salivares de *R. prolixus* naturalmente infectado na Colômbia (SCHOTTELIUS, 1987), e a cepa Y de *T. cruzi* isolada de um paciente na fase aguda da doença (SILVA & NUSSENZWEIG, 1953). Os parasitos foram submetidos a passagens cíclicas camundongo-triatomíneo-camundongo antes do início dos experimentos. Para o grupo controle, em alguns experimentos, foi utilizada a cepa Choachí de *T. rangeli* expressando a proteína verde fluorescente (GFP). Esta cepa foi previamente transfectada por nosso grupo com o plasmídeo pTREXGFPNeo descrito por Vasquez e Levin (1999). Todas as cepas descritas encontram-se criopreservadas no Laboratório de Protozoologia – UFSC.

Formas epimastigotas de *T. rangeli* e de *T. cruzi* foram cultivadas a 27,5 °C e submetidas a repiques semanais em meio LIT

(*Liver Infusion Tryptose*), suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF).

Formas tripomastigotas de cultura de *T. rangeli* foram obtidas no oitavo dia de cultivo em meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) pH 8,0 (Sigma Aldrich) a partir de modificações da técnica descrita por Koerich *et al.* (2002). Para obtenção de formas tripomastigotas de *T. cruzi* foi realizada a infecção *in vitro* de células da linhagem Vero, cultivadas em garrafa de cultura de 75 cm<sup>2</sup> em meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) acrescido de 5% de soro bovino fetal (SBF) a 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>.

Para obtenção de formas amastigotas de *T. cruzi* foi utilizado o protocolo de amastigogênese *in vitro* através da indução dos parasitos por acidificação do meio de cultura, conforme descrito a seguir. Tripomastigotas de *T. cruzi* obtidos através da infecção de células foram lavados três vezes com meio DMEM pH 7,2 sem soro fetal bovino e incubados por 24 horas em meio DMEM pH 5,0 sem adição de soro bovino fetal (SBF) a 37 °C com 5% CO<sub>2</sub>. Após as 24 horas, os parasitos foram fixados em lâmina microscópica com metanol por dois min e corados com Giemsa por 25 min, e então foi realizada a contagem da porcentagem de amastigotas para um total de 100 parasitos. Foi atingida uma pureza de 95% de amastigotas.

### **3.3 Obtenção das sequências codificadoras das amastinas e tuzina de *Trypanosoma rangeli* e *Trypanosoma cruzi***

#### **3.3.1 Extração do DNA total de *Trypanosoma rangeli* e *Trypanosoma cruzi***

Para a extração do DNA, formas epimastigotas da cepa Choachí de *T. rangeli* em fase exponencial de crescimento foram centrifugadas a 3.000 x *g* e lavadas duas vezes com PBS (pH 7,2). Em seguida, os parasitos foram mantidos por 12 horas a 37 °C em tampão de lise (Tris-HCl 100 mM pH 7,4, NaCl 10 mM, EDTA 25 mM pH 8,0, 1 % SDS) acrescido de Proteinase K (100 µg/ml), utilizando cerca de quatro vezes o volume do precipitado obtido. As etapas subsequentes foram realizadas através do método de fenol-clorofórmio, descritas por SAMBROOK, RUSSELL, 2001.

As amostras de DNA obtidas foram dosadas e avaliadas quanto a sua pureza através de espectrofotometria em equipamento BioPhotometer® (Eppendorf), observando-se a absorbância a 260 e

a 280 nm, além das relações 260/280 nm e 260/230 nm. As amostras extraídas foram também resolvidas em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio (1 mg/mL), sendo os resultados registrados digitalmente.

### 3.3.2 Desenho dos iniciadores

Os iniciadores para a amplificação dos genes de amastina ou tuzina foram desenhados a partir da sequência dos genes alvos utilizando-se o programa *Primer Select* do pacote DNASTAR<sup>©</sup> (Lasergene), assim como também foram verificadas a ausência de dímeros e grampos entre os pares de iniciadores foi confirmada também pelos programas *Primer Select* e *Fast PCR*. Na tabela 1 estão listados os iniciadores utilizados para identificação e clonagem das sequências alvo em vetores específicos, análises de expressão relativa e quantificação do número de cópias através da técnica de PCR quantitativa em tempo real (qPCR).

### 3.3.3 Padronização da PCR

Para a amplificação das ORF completas de cada gene que codifica as amastinas e tuzina de *T. rangeli* via PCR foram utilizados os seguintes reagentes: 1 unidade da enzima *Taq* DNA polimerase (Invitrogen), 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 200 µM de dNTP (Invitrogen), 10 pmoles de cada iniciador e 25 ng de DNA genômico da cepa Choachí de *T. rangeli*. A amplificação foi realizada em um termociclador Veriti<sup>®</sup> (*Applied Biosystems*), utilizando o seguinte programa: desnaturação inicial a 95 °C por 5 min seguida de 35 ciclos de desnaturação a 94 °C por 45 s, ligação dos iniciadores a 60 °C por 45 s e extensão 72 °C por 1 min e 20 s. Ao final dos ciclos, foi realizada extensão final por 10 min a 72 °C. Os produtos de amplificação foram visualizados através de eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio (1 mg/mL), sendo registrados digitalmente.

**Tabela 1:** Iniciadores utilizados para a amplificação dos genes específicos.

Iniciador	Sequencia 5' → 3'	Finalidade	Produto
TrAma7_1- R1	S <sup>1</sup> : 5`CATATGAATATGGCATTTCGAAGCTCTC 3` AS <sup>2</sup> : 5`GGATCCCCTAACAGATCGCAAACAAGCA 3`		731pb
TrAma7_1 R2	S: 5`CATATGAATATGGCATTTCGAAGCTCTC 3` AS: 5`GGATCCCGAGACTTGTGATGAAGAGC 3`	Iniciadores desenhados para os ensaios de Southern blot e clonagem no vetor pET14b.	1121pb
TrAma4_1	S: 5`CATATGTGTTTCTGTGGGTGGTGTAG 3` AS: 5`GGATCCGCCTTACACTACAAGAACAAAC 3`		1279pb
TrSc_TUZINA	S: 5`CATATGGTACCACGTGAAATGATTGCTC 3` AS: 5`GGATCCTCAGTAACTGCATTGTACATGAC 3`		1428pb
qTrAma7_1 R1	S: 5`AGCCAACATGCCGAAACTCT 3` AS: 5`TCAGACTGTAATGATAGACAC 3`		160pb
qTrAma7_1 R2	S: 5`TACAGCAGGTATTTTCAGGCC 3` AS: 5`CACGGAATCAGCACAGTTAC 3`		193pb
qTrAma4_1	S: 5`TCTGGCAACAACGCTTTCTC 3` AS: 5`ACCGCAGCAGTCATTATCAT 3`		192pb
qTrSc_TUZINA	S: 5`TGTGGCATTGGCATGCGATC 3` AS: 5`GAAGTCGAGACGTGGTAGAG 3`	Iniciadores desenhados para análise da expressão relativa e quantificação do número de cópias.	100pb
qTc_TUZINA	S: 5`TCTGCCACGTCATCATCGAG 3` AS: 5`CGATTAGGTGGTGC GTGTAG 3`		132pb
qTrSc_TOPOG	S: 5`CTGGACGCAGACGTATAAGA 3` AS: 5`CGGATCGCAGATCACCGAT 3`		98pb
Tr_GAPDH <sup>3</sup>	S: 5`GCGACACCAGCATCAAAGAG 3` AS: 5`CTGTGCTCACAAGTTCCTCG 3`		102
Tc_GAPDH <sup>4</sup>	S: 5`GTGCGGCTGCTGTCAACAT 3` AS: 5`AAAGACATGCCCGTCAGCTT 3`		
Tr_RNA60S	S: 5`CGATGAAGCTCAAGTGGACC 3` AS: 5`CGGTTGTA CTTGACGGGAAC 3`		113
TrAma4_1 - GFP	S: 5`GAATTC/AGATCTTGT TTTCTGTGGGTGGTGTAG 3` AS: 5`AAGCTT/AGGGTACCCACTACAAGAACAAACAATACC 3`	Iniciadores desenhados para clonagem no vetor pTEX-GFP.	

<sup>1</sup> Senso; <sup>2</sup> Antissenso; <sup>3</sup> *T. rangeli*; <sup>4</sup> *T. cruzi*.

### **3.4 Determinação do número de cópias dos genes das Amastinas no genoma do *T. rangeli* através de *Southern Blot***

O DNA genômico de *T. rangeli* (30 µg) foi digerido por completo com diferentes enzimas de restrição (*SacII*, *SphI*, *TaqI* e *EcoRI*) em reações contendo 60 unidades de cada enzima e seus respectivos tampões em volume final de 20 µl. As reações foram mantidas a 37 °C *overnight* e os fragmentos resultantes resolvidos em eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TBE (Tris 890 mM, Ácido Bórico 890 mM, EDTA 20 mM) a 5 Volts/cm. O gel foi corado com brometo de etídio (1 mg/mL) e os resultados digitalmente registrados.

Na sequência, o gel foi imerso em uma solução de depurinação (HCl 250 mM) por 12 min, lavado em água ultrapura estéril e em seguida colocado em uma solução de desnaturação (NaCl 1,5 M, NaOH 0,5 M) por 25 min. O gel foi lavado novamente com água ultrapura estéril e imerso em uma solução de neutralização (NaCl 1,5 M, Tris 0,5 M pH 7,5) sob agitação por 30 min, sendo este procedimento repetido com troca da solução por mais 15 min. A transferência do DNA para a membrana de Nylon (Sigma Alderich) foi realizada através de capilaridade descrito por SOUTHERN, 1975.

Após a transferência, a membrana foi fixada através de luz ultravioleta (Energia 1.200 J) em um aparato *UV Cross Linker*<sup>®</sup> (GE Healthcare) e mantida durante uma hora a 42 °C em tampão de hibridização (NaCl 0,5 M, 5% agente bloqueador diluído em *ECL Gold Hybridization Buffer*<sup>®</sup>) (GE Healthcare). As sondas correspondentes aos genes das amastinas foram obtidas através de amplificação por PCR a partir de DNA genômico com os iniciadores TrAma7\_1 e TrAma4\_1 (tabela 2), sendo os produtos de amplificação marcados pelo kit *ECL Direct Nucleic Acid Labelling and Detection System*<sup>®</sup> (GE Healthcare) conforme especificações do fabricante.

Esta sonda foi adicionada à membrana a qual, após 16 horas sob agitação suave a 42 °C, foi lavada três vezes com o tampão de lavagem primário (SSC 0,5X, 0,4% SDS, Uréia 6 M) por 15 min a 42 °C e duas vezes com o tampão de lavagem secundário (SSC 2X) por 5 min. Em seguida, a detecção foi realizada através da adição do reagente ECL sobre a membrana durante um minuto seguido de exposição a um filme radiográfico para a detecção de quimioluminescência, sendo o filme

revelado em um processador de filmes SRX-101A (Konica Minolta Medical & Graphic, INC).

### **3.5 PCR quantitativa em tempo real (qPCR) para avaliação do número de cópias dos genes das Amastinas e Tuzina no genoma do *T. rangeli***

Para quantificação absoluta do número de cópias foram utilizados plasmídeos contendo os seguintes genes: TopoG e TopoM de cópia única, e os contendo os genes em estudo: *TrAma4\_1*, *TrAma7\_1* e *Tr\_TUZIN*. As reações ocorreram na presença do reagente *GoTaq<sup>®</sup> qPCR Master Mix* (Promega), de acordo com as orientações do fabricante, 2 µl do cDNA diluído e 0,3 µM dos iniciadores, sendo realizadas em placas de PCR de 96 poços (Axygen), em volume final de 10 µl. As placas cobertas por selante óptico *MicroAmp<sup>®</sup> Optical Adhesive Film* (Applied Biosystems) foram analisadas em equipamento *ABI Prism<sup>®</sup> 7900HT Sequence Detection System* (Applied Biosystems) do Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia (LAMEB/UFSC). As reações tiveram início com uma etapa de desnaturação a 95 °C por 10 min, seguida por 40 ciclos contendo uma etapa de desnaturação (95 °C por 15 s), uma etapa de ligação dos iniciadores e extensão (±60 °C por 1 minuto). Ao final, foi incluída uma etapa para obtenção da curva de dissociação (95 °C por 15 s, 60 °C por 15 s e, novamente, 95 °C por 15 s). Em cada placa foi adicionado um controle negativo para cada par de iniciadores, composto por todos os reagentes necessários à amplificação, à exceção do DNA molde.

A eficiência da qPCR com cada par de iniciadores foi calculada utilizando uma diluição seriada 1:2 de amostras de DNA genômico e de misturas de cDNA (cinco pontos). A inclinação da reta obtida a partir da função entre o Cq (ciclo de quantificação) e cada ponto da diluição foi aplicada à equação:

$$[E = 10(-1/slope) - 1]$$

Nesta equação, *E* representa a eficiência da qPCR e *slope* é o valor de inclinação da reta. O valor de *E* é obtido como fração de uma unidade.

### 3.5.1 Análise dos resultados da qPCR

Os experimentos de qPCR foram realizados em triplicatas biológicas e em triplicatas técnicas, sendo posteriormente analisados pelo software SDS 2.4 (Applied Biosystems). Para avaliar a variação relativa nos níveis de cada transcrito entre as amostras analisadas, foi utilizado o método da quantificação relativa (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001), comparando o Cq apresentado para os genes das amastinas e tuzina de *T. rangeli* e *T. cruzi* à média dos Cq dos genes de cópia única (Tabela 1).

### 3.6 Clonagem dos insertos

Os produtos de amplificação das ORF das amastinas e tuzina foram inicialmente clonados utilizando-se o kit *pGEM-T-easy*<sup>®</sup> Vector (Promega) segundo as especificações do fabricante. Posteriormente o produto desta ligação foi transformado em células *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  cálcio competentes segundo protocolos padrão (42 °C por 45 s) e imediatamente incubadas em gelo novamente durante 2 min. Após adição de meio SOC (2% triptona; 0,5% extrato de levedura; NaCl 10 mM; KCl 2,5 mM; MgCl<sub>2</sub> 10 mM; MgSO<sub>4</sub> 10 mM; glicose 20 mM) e crescimento das células pelo período de 1h a 37 °C, as bactérias foram plaqueadas em meio LB ágar contendo ampicilina (100  $\mu$ g/ml) IPTG (40  $\mu$ g/ml) e X-Gal (20 $\mu$ g/ml). A seleção dos clones recombinantes foi baseada na coloração azul/branco das colônias crescidas na placa de cultivo. A confirmação dos clones com plasmídeo contendo o inserto foi através de PCR diretamente das colônias utilizando os iniciadores M13 senso e antisense. Após a confirmação da presença e da correta orientação do inserto, foi realizado o crescimento bacteriano de um clone positivo para cada gene de interesse para posterior extração do DNA plasmidial.

### 3.7 Extração do DNA plasmidial

Os clones contendo os genes de interesse foram crescidos a 37 °C sob agitação em 10 ml de meio LB contendo ampicilina (100  $\mu$ g/ml). Transcorrido o tempo de crescimento, os plasmídeos recombinantes foram extraídos através do procedimento de lise alcalina (“*mini-prep*”) conforme descrito por SAMBROOK e RUSSELL, 2001.

### 3.8 Clonagem em vetor de expressão pET 14b

A subclonagem dos insertos em vetor de expressão foi realizada através da digestão dos plasmídeos purificados previamente com as enzimas de restrição *NdeI* e *BamHI*. Os produtos destas digestões, assim como o produto da digestão do vetor pET-14b (Novagen) foram resolvidos em gel de agarose 1%, corados em brometo de etídeo (1 mg/mL), sendo as bandas de tamanho adequado excisadas do gel e purificadas utilizando-se o kit *GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification* (GE Healthcare) de acordo com as especificações do fabricante.

A ligação dos produtos das amastinas e da tuzina ao vetor ocorreu na presença de três unidades da enzima T4 DNA ligase (BioLabs) em tampão próprio do fabricante durante 12 horas a 16 °C. Os produtos de ligação foram utilizados para transformação de células cálcio competentes de *E. coli* DH5α. Após a seleção dos clones positivos contendo os insertos desejados, através de PCR diretamente das colônias, os mesmos foram crescidos em meio LB suplementados com ampicilina 100µg/ml, durante 16 horas a 37 °C e submetidos à extração do DNA plasmidial com o kit *PureYield™ Plasmid Midiprep System* (Promega). Foi então realizado o sequenciamento para confirmação da inserção na correta janela de leitura do gene.

### 3.9 Sequenciamento do DNA

A reação de sequenciamento foi preparada utilizando-se os plasmídeos purificados e o kit BigDYE 3.1 (Thermo Scientific), segundo orientações do fabricante.

As reações foram realizadas na presença de 5 pmol dos iniciadores descritos na tabela 1, bem como utilizando os iniciadores T7 F (5' TAATACGACTCACTATAGGG 3') e T7 R (5' GCTAGTTATTGCTCAGCGG 3'), direcionados para sequências do vetor pET-14b. As reações de sequenciamento contaram com as seguintes etapas: desnaturação inicial (95 °C por 25 s), seguida de 35 ciclos com etapas de desnaturação (95 °C por 15 s), ligação dos iniciadores (50 °C por 20 s) e extensão da cadeia de DNA (60°C por 4 min). Os produtos dessas reações foram precipitados com etanol 100% e 125 mM de EDTA para a retirada dos nucleotídeos e iniciadores não incorporados. A leitura das bases foi realizada em um equipamento automático Abi3500 (Thermo Scientific) do LAMEB/UFSC.

### 3.10 Análise da qualidade e identidade das sequências gênicas obtidas por sequenciamento

Inicialmente, 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 foi realizada através da ferramenta BLASTx do programa BLAST utilizando-se base de dados não redundante, disponível no GenBank (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) e no TriTryp (<http://TriTrypDB.org>) (ASLETT *et al.*, 2010).

### 3.11 Análise dos níveis de transcritos dos genes das amastinas e tuzinas em diferentes formas evolutivas do *T. rangeli* e *T. cruzi*

#### 3.11.1 Extração de RNA total

Amostras referentes a formas epimastigotas e tripomastigotas de *T. rangeli* e epimastigotas, tripomastigotas e amastigotas de *T. cruzi* foram processadas para a extração de RNA visando a realização da quantificação dos níveis de transcritos através de RT-qPCR. Para isto os parasitos foram coletados (3.000 x g por 10 min a TA), lavados duas vezes com PBS pH 7,2 e homogeneizados vigorosamente em 1 ml do reagente Trizol<sup>®</sup> (Invitrogen). As amostras foram armazenadas a -80 °C até a realização da extração de RNA total.

Após o descongelamento, as amostras foram mantidas por cinco min a TA antes da extração de RNA total. Em seguida, foram adicionadas de 200 µl de clorofórmio 98 % (Merck), e as amostras foram agitadas por 15 s, mantidas a TA por dois min e, então, centrifugadas a 12.000 x g por 15 min a 4 °C. A fase aquosa resultante foi transferida para um tubo novo, foi acrescida de 500 µl de isopropanol (Merck) e novamente submetida à centrifugação (12.000 x g por 20 min a 4 °C). O sobrenadante foi descartado e o precipitado

lavado com 1 ml de etanol 75 %, gelado, através de centrifugação a 7.500 x g por cinco min a 4 °C. Novamente, o sobrenadante foi descartado e o precipitado contendo o RNA total foi seco, invertendo-se os tubos sobre papel por aproximadamente 10 min a TA. O RNA total foi então solubilizado em 20 µl de água ultrapura livre de nucleases.

As amostras obtidas tiveram sua concentração e pureza avaliadas a 260 nm em um espectrofotômetro BioPhotometer (Eppendorf), observando-se as relações de absorvância 260/280 nm e 260/230 nm.

### 3.11.2 Tratamento com DNaseI

A fim de eliminar qualquer DNA contaminante indevidamente purificado durante o processo de extração de RNA que possa interferir nas reações subsequentes, 1 µg de RNA de cada amostra foi submetido a tratamento com DNaseI (Invitrogen), na razão de 1 unidade por µg de RNA extraído. A reação foi realizada durante 15 min a TA, na presença de tampão recomendado pelo fabricante. A inativação da enzima ocorreu com a adição de EDTA na concentração final de 2,5 mM e aquecimento a 65 °C por 10 min. O RNA foi então armazenado a -80 °C.

### 3.11.3 Reação de Transcrição Reversa (RT-PCR)

A partir das amostras tratadas com DNaseI, foi utilizado 1 µg de RNA nas reações de transcrição reversa. A RT-PCR foi conduzida a 37 °C por 50 min na presença de 200 unidades da enzima transcriptase reversa M-MLV (Invitrogen), 200 µM de dNTP (Invitrogen), 10 pmoles do iniciador *OligodT-Anchor* direcionado à cauda poli(A) (5' GACCACGCGTATCGATGTCGACT16 3'), 10 mM de DTT (Invitrogen) e 40 unidades do inibidor de ribonucleases RNaseOUT™ (Invitrogen), em tampão recomendado pelo fabricante. A inativação da reação ocorreu por 15 min a 70 °C. O DNA complementar (cDNA) obtido foi armazenado a -20 °C.

### 3.11.4 PCR quantitativa em tempo real (qPCR) para avaliação dos níveis de transcritos

Para utilização como molde na qPCR, o cDNA foi diluído cinco vezes em água ultrapura livre de nucleases. As reações ocorreram

na presença do reagente *GoTaq*<sup>®</sup> *qPCR Master Mix* (Promega), de acordo com as orientações do fabricante, 2 µl do cDNA diluído e 0,3 µM dos iniciadores, sendo realizadas em placas de PCR de 96 poços (Axygen), em volume final de 10 µl. As placas cobertas por selante óptico *MicroAmp*<sup>®</sup> *Optical Adhesive Film* (Applied Biosystems) foram analisadas em equipamento *ABI Prism*<sup>®</sup> *7900HT Sequence Detection System* (Applied Biosystems) do Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia (LAMEB/UFSC). As reações tiveram início com uma etapa de desnaturação a 95 °C por 10 min, seguida por 40 ciclos contendo uma etapa de desnaturação (95 °C por 15 s), uma etapa de ligação dos iniciadores e extensão (±60 °C por 1 minuto). Ao final, foi incluída uma etapa para obtenção da curva de dissociação (95 °C por 15 s, 60 °C por 15 s e, novamente, 95 °C por 15 s). Em cada placa foi adicionado um controle negativo para cada par de iniciadores, composto por todos os reagentes necessários à amplificação, à exceção do DNA molde.

A eficiência da qPCR com cada par de iniciadores foi calculada utilizando uma diluição seriada 1:2 de amostras de DNA genômico e de misturas de cDNA (cinco pontos). A inclinação da reta obtida a partir da função entre o C<sub>q</sub> (ciclo de quantificação) e cada ponto da diluição foi aplicada à equação:

$$[E = 10(-1/slope) - 1]$$

Nesta equação, *E* representa a eficiência da qPCR e *slope* é o valor de inclinação da reta. O valor de *E* é obtido como fração de uma unidade.

### 3.11.5 Análise dos resultados da qPCR

Os experimentos de qPCR foram realizados em triplicatas biológicas e em triplicatas técnicas, sendo posteriormente analisados pelo software SDS 2.4 (Applied Biosystems). Para avaliar a variação relativa nos níveis de cada transcrito entre as amostras analisadas, foi utilizado o método da quantificação relativa (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001), comparando o C<sub>q</sub> apresentado para os genes das amastinas e tuzina de *T. rangeli* e *T. cruzi* à média dos C<sub>q</sub> dos genes de referência GAPDH e RNA60S (Tabela 3). Os cálculos necessários para obtenção dos valores de abundância relativa foram realizados em planilha do Excel (Microsoft Office), através das seguintes equações:

Equação 1

$$\Delta Cq = Cq (\text{gene alvo}) - Cq (\text{gene de referência})$$

Equação 2

$$\Delta\Delta Cq = \Delta Cq (\text{amostra}) - \Delta Cq (\text{calibrador})$$

Equação 3

$$QR = 2e^{-\Delta\Delta Cq}$$

As análises estatísticas, bem como a confecção dos gráficos foram realizadas no programa Prism 5.0 (GraphPad). Uma vez que os resultados possuíam uma distribuição normal, foi utilizado o teste estatístico Análise de Variância (ANOVA) de uma via, seguida do teste de comparação múltipla de Tukey. Valores de  $p$  menores que 0,01 foram considerados como estatisticamente significantes.

### 3.12 Expressão heteróloga das proteínas recombinantes

Depois de construídos os vetores de expressão com os genes específicos foi realizada a expressão heteróloga dos mesmos. Diferentes linhagens de *E. coli* foram transformadas de acordo com o protocolo descrito no item 3.6. Inicialmente para triagem de expressão foi utilizada a cepa de *E. coli* BL21(DE3) e foram testadas diferentes condições de temperatura (15, 27 e 37 °C), tempos de indução (3, 6 e 14 h) e diferentes concentrações do indutor (0,15; 0,25; 0,5 e 1 mM).

Depois de uma análise das sequências dos genes, quanto à presença de códons raros, foram selecionadas diferentes linhagens da *E. coli* BL21(DE3): pLysS, Rosetta e Códon plus para os testes de expressão heteróloga, tendo sido utilizadas as mesmas condições descritas anteriormente.

Primeiramente, para a expressão da proteína recombinante, uma colônia foi selecionada e cultivada em 10 ml de meio LB (100 µg/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<sup>®</sup> (Eppendorf). Neste momento, 3 ml de cada cultura foram separados previamente à indução para servirem como controle não induzido, e ao volume restante acrescentou-se IPTG. As culturas foram então 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 condição de crescimento.

Após o teste das condições ideais de expressão foram selecionadas diferentes condições de expressão e a linhagem ideal de *E. coli* para o crescimento bacteriano e indução da expressão heteróloga visando a análise solubilidade da proteína. Para tanto, ao sedimento bacteriano obtido por centrifugação a 10.000 x g por 10 min foi adicionado 300 µl de PBS pH 7,4 e submetido à sonicação a 8-9 Joules por cinco ciclos de 30 seg no equipamento 60 Sonic Dismembrator (Fisher Scientific), em banho de gelo. Após a sonicação, a amostra foi centrifugada a 4 °C por 30 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 150 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 avaliadas por *Western blot* conforme o descrito a seguir, utilizando o anticorpo monoclonal anti-His•Tag<sup>®</sup> (Sigma- Aldrich), específico para a cauda de poli-histidina (1:2.000).

### 3.13 *Western Blot*

Com o intuito de confirmar e avaliar o nível de expressão das proteínas recombinantes foram realizados ensaios de *Western blot* com anticorpos específicos (Tabela 3). 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 aquecidos a 95°C por 5 min e submetidos à separação eletroforética em gel SDS- PAGE 12%, a 100 volts (V). As proteínas foram então transferidas para membranas de nitrocelulose Hybond-ECL<sup>®</sup> (GE Healthcare) durante 2 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 *blotting* (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 *blotting* contendo o anticorpo primário por 90 min sob agitação branda a temperatura ambiente. O anticorpo secundário (1:5.000) anti- IgG conjugado à peroxidase

(Sigma Aldrich) foi mantido por 1 h a TA. Entre cada etapa as membranas foram lavadas por cinco min, cinco vezes cada, com tampão de *blotting* sob agitação branda. A revelação das membranas em filmes radiográficos foi realizada através do reagente Pierce<sup>®</sup> ECL *Western blotting* Substrate (Pierce Biotechnology), utilizando o processador SRX-101A (Konica Minolta Medical & Graphic, INC). Na tabela 2, encontram-se listados os anticorpos e respectivas diluições utilizadas para os ensaios de *Western blot*.

**Tabela 2:** Descrição dos anticorpos utilizados nos ensaios de *Western blot*, considerando sua origem e diluições utilizadas nas diferentes metodologias.

Anticorpo	Tipo	Diluição Western blot
anti-His•Tag	Monoclonal de camundongo específico para a cauda de polihistidina / Sigma-Aldrich, Saint Louis	1:2.000
anti-GFP	Monoclonal de camundongo anti-GFP 11E5 (isotipo IgG1) / Santa Cruz Biothechnology	1:500
anti – IgG mouse HRP	Anti-IgG de camundongo conjugado a peroxidase / Sigma-Aldrich, Saint Louis	1:5.000
anti – IgG rabbit HRP	Anti-IgG de coelho conjugado a peroxidase / Sigma-Aldrich, Saint Louis	1:20.000

### 3.14 Purificação da proteína Tuzina em *E. coli* BI21(DE3) Códon Plus

Após o estabelecimento das melhores condições para a expressão da tuzina recombinante de *T. rangeli* (rTrSc\_Tuzina), a proteína obtida manteve-se fração insolúvel. Para a sua purificação, a expressão da rTrSc\_Tuzina foi realizada em 200 ml de cultura induzida com IPTG na concentração final de 0,15 mM à 27 °C durante 6 horas. Após o período de indução, as bactérias foram coletadas por centrifugação a 4.000 x g por 10 min e conservadas a -20 °C até o momento da purificação. A purificação da rTrSc\_Tuzina 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). Primeiro, as bactérias foram submetidas à lise pela adição de 12 ml de tampão B em condições desnaturantes (10 mM Tris-HCl pH 8,0; 100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 8 M Uréia pH 8,0), por 1 h à 60 °C sob agitação, sendo posteriormente submetidas a sonicação a 8-9 Joules por cinco ciclos de 30 seg, no equipamento 60 Sonic Dismembrator (Fisher Scientific), em banho de gelo. 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 700 µl da resina Ni-NTA agarose (Qiagen) pré-tratada com o tampão B, e mantido por 1 h à 4 °C sob constante agitação. As lavagens da coluna e a eluição da proteína foram realizadas utilizando-se o tampão (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 100 mM, Uréia 8 M, Tris- HCl 10 mM) em diferentes pH (lavagens em pH 6,3 e eluição em pH 4,5). A coluna foi lavada três 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 (Tris-HCl 100 mM; pH 8,5; NaCl 500 mM; EDTA 0,5 mM, 20% glicerol; DTT 5 mM) 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% corados por azul de Coomassie R-250 ou *Western blot*, sendo os resultados digitalmente registrados utilizando o *Perfection 4990 Scanner*<sup>®</sup> (Epson).

### **3.15 Dosagem de proteínas**

A quantificação da proteína recombinante purificada rTrSc\_Tuzina foi realizada em microplacas de 96 poços fundo chato (Kasvi) pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976). Uma curva padrão foi elaborada utilizando-se diferentes concentrações (0,5, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 5,0, 6,0 e 8,0 µg) de albumina de soro bovino (BSA), em triplicata. Para a dosagem das proteínas extraídas foi utilizado 1µl das eluições ou diluições de cinco vezes, para os quais adicionou-se 196 µl do reagente de Bradford (BioRad) e água ultrapura para completar o volume para 200 µl. A placa foi mantida à TA durante 5 min. e então submetida à leitura a 595 nm em multileitora *Infinite M200* (Tecan). A concentração das proteínas foi calculada com base na curva padrão de BSA a partir da equação da reta e cálculo da quantidade de proteína presente.

### **3.16 Obtenção de soro policlonal anti- rTrSc\_Tuzina**

#### **3.16.1 Considerações Éticas e de Biossegurança**

As dependências onde foram desenvolvidas as atividades deste trabalho estão incluídas no certificado de Qualidade em Biossegurança da UFSC (CQB 101/99 publicado no D.O.U. n<sup>o</sup> 34-E de 22/02/1999, Seção 3, página 01) expedido pela Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio). Os procedimentos realizados em animais ocorreram de acordo com a observância dos preceitos estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação animal – COBEA, tendo sido previamente aprovados pela Comissão de Ética em Uso de Animais da UFSC (CEUA/UFSC) (Processo CEUA: 9923170516).

#### **3.16.2 Obtenção do soro**

Para a produção do soro policlonal dois camundongos fêmeas da linhagem Balb/C, com 21 dias de idade, foram imunizados com 50 µg da proteína rTrSc\_Tuzina recombinante purificada para cada imunização. Foram realizadas quatro inoculações, num intervalo de 10 dias, todas elas por via subcutânea com o adjuvante Alu-Gel S (Hidróxido de Alumínio 1,3 %) (Serva). Após a realização da terceira imunização, sangue da cauda do animal foi coletado, mantido por 30 min. sob refrigeração de 4-8 °C e então centrifugado a 3.000 x g por 10 min para separação do soro, que foi armazenado a -80 °C. Os soros obtidos foram testados em ensaios de *Western blot* para verificar

a especificidade frente a diferentes extratos proteicos de formas epimastigotas e tripomastigotas das cepas de *T. rangeli* e *T. cruzi*. Quinze dias após a última imunização, os animais foram anestesiados com cloridrato de cetamina (Dopalen<sup>®</sup>) e cloridrato de xilazina (Rompum<sup>®</sup>) e sangrados através de punção cardíaca, o sangue obtido foi processado para separação do soro, como descrito anteriormente.

### 3.17 Obtenção de soro policlonal anti- Amastina

Dois peptídeos foram desenhados baseados nas amastinas *TrAma7\_1* (CVALWDMAKQC) e *TrAma4\_1* (CYTFWGYKNRC) com base região de hidrofílica e correspondente a identidade das amastinas e foram sintetizados pela empresa Biomatik visando a geração de anti-soros contra cada uma das amastinas. Os peptídeos foram então conjugados ao KLH (*Keyhole Limpet Haemocyanin* – transportador de proteínas altamente imunogênico) pela empresa Célula B (Porto Alegre, Brasil) e utilizados para imunização de camundongos (dois animais para cada peptídeo) de acordo com o descrito no item 3.15. O soro pré-imune dos animais foi previamente testado por *Western blot* para reconhecimento inespecífico das proteínas de *T. rangeli*. O antisoro obtido foi então coletado e armazenado a -20 °C.

### 3.18 Superexpressão da amastina *TrAma4\_1* de *T. rangeli*

O gene *TrAma4\_1* foi clonado no vetor de expressão pTEXeGFP, derivado do plasmídeo pTEX (Kelly *et al.*, 1992), o qual contém como repórter o gene da proteína verde fluorescente GFP fusionada à amastina, e os genes de resistência à ampicilina e à neomicina.

Inicialmente foi realizada a subclonagem do gene previamente clonado no vetor pGEM-Teasy (Promega) a partir da digestão do plasmídeo contendo o inserto bem como do pTEXeGFP com as enzimas de restrição *NdeI* e *BamHI*. Os produtos destas digestões foram resolvidos em gel de agarose 1%, e corados em brometo de etídeo (1 mg/ml), sendo as bandas de tamanho esperado excisadas do gel e purificadas utilizando-se o kit GFX<sup>™</sup> PCR DNA and Gel Band Purification (GE Healthcare) de acordo com as especificações do fabricante.

A ligação do produto da amastina *TrAma4\_1* ao vetor ocorreu na presença de três unidades da enzima T4 DNA ligase (BioLabs) em

tampão próprio do fabricante durante 12 horas a 16 °C. Os produtos de ligação foram utilizados para transformação de células cálcio competentes de *E. coli* DH5 $\alpha$ . Após a seleção dos clones positivos contendo os insertos desejados através de PCR diretamente das colônias, os mesmos foram crescidos em meio LB suplementados com ampicilina 100  $\mu$ g/ml, durante 16 horas a 37 °C e submetidos à extração do DNA plasmidial com o kit *PureYield™ Plasmid Midiprep System* (Promega). Foi então realizado o sequenciamento para confirmação da inserção na correta janela de leitura do gene.

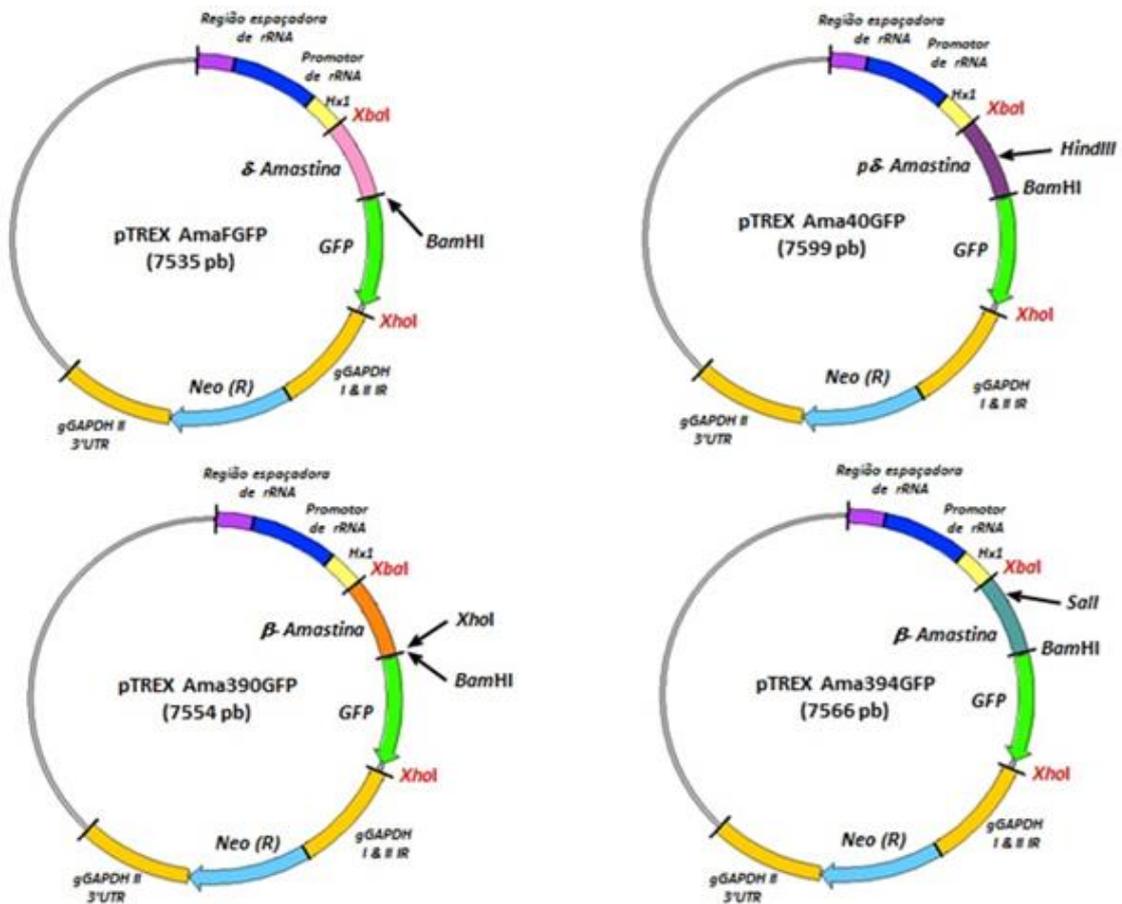
Os ensaios de transfecção foram realizados utilizando o kit *Basic Parasite Starter Nucleofector*<sup>®</sup> (Lonza) conforme as instruções do fabricante. Basicamente,  $5 \times 10^7$  epimastigotas de *T. rangeli* foram lavados duas vezes em PBS pH 7,2, adicionados de 100  $\mu$ l do tampão de eletroporação e 20  $\mu$ g do DNA plasmidial. Todo o volume desta suspensão foi transferido para cubetas de eletroporação de 0,2 centímetros (cm) de abertura e submetidos à eletroporação no aparelho *Nucleofector*<sup>®</sup> (Lonza) em condições elétricas estabelecidas pelo programa U-33. Após um único pulso, os parasitos foram transferidos para tubos contendo 2 ml de meio LIT suplementado com sangue inativado à 56 °C por 30 min. Após 24 horas a 27 °C, as culturas foram acrescidas de G-418 (Geneticin) (Sigma Aldrich) em uma concentração inicial de 25  $\mu$ g/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 (20, 50, 100, 200 e 300  $\mu$ g/ml). Foi então estabelecida a linhagem Tr\_AMATR de *T. rangeli* visando a superexpressão da amastina *TrAma4\_1*.

### **3.19 Expressão heteróloga das amastinas pertencentes às subfamílias $\beta$ e $\delta$ de *T. cruzi* em *T. rangeli***

Foram selecionadas diferentes amastinas de *T. cruzi* clonadas no vetor de expressão pTREX<sub>e</sub>GFP, correspondentes a duas diferentes sub-famílias de amastinas, para a expressão heteróloga no *T. rangeli*. Os vetores pTREX\_Ama40GFP (Tc00.1047053511071.40), pTREX\_AmaFGFP (Tc00.1047053507485.150), pTREX\_Ama390GFP (Tc00.1047053509965.390) e pTREX\_Ama394GFP (Tc00.1047053509965.394) utilizados para transfecção dos parasitos foram gentilmente cedidos pelo Prof. Dr.

Wanderson Duarte da Rocha (UFPR) e encontram-se relacionados na figura 6.

Os plasmídeos foram utilizados para transfectar formas epimastigotas de *T. rangeli* conforme o descrito no item 3.17, sendo então estabelecidas as seguintes linhagens: Tr\_AMA40GFP, Tr\_AMAFGFP, Tr\_AMA390GFP e Tr\_AMA394GFP.



**Figura 6:** Desenho esquemático dos vetores contendo os genes de diferentes amastinas de *Trypanosoma cruzi* clonados no vetor pTREXeGFP (Kangussu-Marcolino *et al*; 2013).

### **3.20 Citometria de fluxo**

Para avaliar a homogeneidade da expressão de fluorescência após a transfecção dos parasitos, as cepas obtidas foram submetidas à citometria de fluxo antes e após este processo. Para isso, 200 µl das culturas em fase exponencial, foram lavadas duas vezes, com PBS pH 7,2 por centrifugação de 12.000 x g por 10 min a temperatura ambiente, e homogeneizados em 200 µl de PBS pH 7,2 e analisadas utilizando-se um citômetro FACS Canto II (Becton Dickson). A identificação dos parasitos fluorescentes foi realizada em histograma utilizando os canais FITC e PerCP. As análises dos dados coletados foram realizadas no programa *Flowing*<sup>®</sup>, versão 2.5.1 (Turku).

### **3.21 Caracterização das cepas transfectadas**

Foi realizada a obtenção de uma fração enriquecida de proteínas associadas à membrana plasmática dos parasitos utilizando o protocolo descrito por Ko e colaboradores (2005). A avaliação da expressão das proteínas na membrana dos parasitos foi realizada pela técnica de *Western blot* conforme descrito anteriormente no item 3.12.

### **3.22 Imunofluorescência indireta (RIFI)**

Para os ensaios de RIFI foram utilizados parasitos selvagens nas formas evolutivas: epimastigotas e tripomastigotas da cepa Choací de *T. rangeli*. Primeiramente foi realizada a fixação dos mesmos em lamínulas com paraformaldeído a 4% diluído em PBS pH 7,2 durante cinco min e então permeabilizados com o detergente Triton X-100 a 0,5% durante cinco min. Em seguida, foi realizado o bloqueio dos sítios de ligação inespecíficos com solução de leite desnatado a 5% diluído em PBS pH 7,2. O anticorpo primário (para tuzina: anti-Tr\_Tuzina e para amastina: Anti-TrAma4\_1), diluídos numa concentração de 1:150 de leite desnatado a 2%, foi mantido sobre a lamínula durante 90 min a temperatura ambiente. Após novas lavagens, o anticorpo secundário anti-IgG de camundongo, conjugado Alexa-fluor 594 (Molecular Probes, Carlsbad) foi diluído (1:10.000) em solução de leite desnatado a 2% em PBS pH 7,2 e mantido sobre as lamínulas por 15 min protegido da luz. As lamínulas foram então coradas com 1 µg/ml de 4',6-diamidino-2-fenilindole (DAPI) por cinco min, lavadas novamente e montadas com o reagente *Hydromount* (National Diagnostics, Atlanta)

em lâminas de vidro. As análises serão realizadas em microscópio óptico de fluorescência Olympus – Bx40–FL (Olympus) e digitalmente registradas.

### **3.23 Ensaios *in vivo* com os parasitos expressando diferentes amastinas de *T. cruzi* e superexpressando uma amastina de *T. rangeli***

#### 3.23.1 Camundongos

Camundongos fêmeas BALB/c, com 21 dias de idade, oriundos do Biotério Setorial do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia (MIP) foram utilizados para ensaios de infecção *in vivo*.

#### 3.23.2 Infecção de camundongos BALB/c

Grupos de cinco camundongos foram infectados pela via intraperitoneal contendo  $5 \times 10^6$  tripomastigotas das cepas transfectadas Tr\_AMA40GFP, Tr\_AMAFGFP, Tr\_AMA390GFP, Tr\_AMA394GFP, Tr\_AMA4\_1 e Choachí selvagem (Tr\_WT). Os animais foram mantidos em biotério climatizado em ciclo claro/escuro de 12 horas com ração e água *ad libitum*. A parasitemia sanguínea foi realizada pela técnica de Brener (1962) em microscópio convencional todos os dias a partir do 1º dia após a inoculação até o terceiro dia após negativar a mesma. Determinou-se a percentagem de animais que apresentaram exame de sangue a fresco positivo (%ESF+), período patente médio (PP), o pico máximo de parasitemia (Pmax) e dia do pico máximo de parasitemia (Dpmax). Os dados médios  $\pm$  desvio padrão da média de cada dia de contagem foram utilizados para determinação da curva de parasitemia. Os animais que não apresentaram parasitemia sanguínea detectável no exame a fresco foram submetidos à PCR para comprovação da infecção conforme descrito no item 3.24.4.

#### 3.23.3 Avaliação histopatológica de camundongos infectados com as cepas transfectadas de *T. rangeli*

Foram definidos dois pontos experimentais para a coleta dos órgãos e sangue dos animais; no 5º dia e no 15º dia pós-infecção. Dois animais infectados de cada grupo foram sacrificados por deslocamento cervical no 5º dia pós infecção (5º dpi) e três animais no 15º dia pós infecção (15º dpi) sendo realizada a coleta de sangue para PCR e dos seguintes órgãos para PCR e análises histopatológicas: coração, músculo esquelético, baço, intestino delgado, intestino grosso, linfonodo inguinal e tecido adiposo abdominal. Cada órgão foi dividido em duas partes, uma delas foi fixada em formalina tamponada (10%) e processada através da

técnica de histologia convencional no LAMEB-UFSC. Para tanto, cortes seriados de 5 µm de espessura foram corados com hematoxilina-eosina e examinados em microscópio óptico em toda a sua extensão, determinando-se a presença do parasito (parasitismo tecidual) e a caracterização do infiltrado inflamatório. A intensidade do parasitismo e do processo inflamatório foram assim classificados: (0) = ausência de parasitismo ou de inflamação, (1) = grau discreto, (2) = grau moderado e (3) = grau intenso. A outra parte do material foi preservada em álcool 70% à 4 °C para as análises de PCR convencional.

#### 3.23.4 PCR convencional para diagnóstico de parasitos em sangue e tecido de camundongos

As amostras de sangue e tecido de animais infectados coletadas foram submetidas à extração de DNA genômico através do método de fenol-clorofórmio (SAMBROOK E RUSSELL 2001) e em seguida dosadas em espectrofotômetro (BioPhotometer, Eppendorf) para a determinação da qualidade e pureza do DNA extraído conforme exemplificado no item 3.3.1. Com a finalidade de detectar a presença do parasito nesses tecidos foram utilizados 10 pmol dos iniciadores S35 (AAATAATGTACGGGTGGAGATGCATGA) e S36 (GGGTTCGATTGGGGTTGGTGT), em reações de PCR contendo 50 ng do DNA a ser analisado, 200µM de dNTP e 1 unidade de Taq DNA polimerase (*GoTaq Green Master Mix* – Promega) em tampão fornecido pelo fabricante. As reações iniciaram-se com uma etapa de desnaturação do DNA a 94°C durante 5 min. Em seguida foram realizados 34 ciclos de desnaturação (94°C por um min), ligação dos iniciadores a sequência alvo (60°C por um min) e alongamento da cadeia de DNA pela polimerase (72°C por um min), sendo esses passos realizados em um termociclador Veriti 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems). Os produtos de PCR obtidos foram resolvidos em géis de poliacrilamida 10% e corados pelo brometo de etídeo (1 mg/ml).

## **Capítulo 1:**

*Análises in silico, características biológicas e dinâmica da infecção in vivo das amastinas de Trypanosoma rangeli*

## 1- JUSTIFICATIVA

Uma vez que *T. rangeli* caracteristicamente apresenta baixas parasitemias, havendo dificuldade em se encontrar formas sanguíneas, o conhecimento detalhado acerca das características biológicas, moleculares e as interações com o hospedeiro (GRISARD *et al.*, 1999) torna-se extremamente complicado, fazendo com que detalhes da interação com o hospedeiro durante a infecção sejam desconhecidos e haja dificuldade no diagnóstico específico (SOUSA, JOHNSON, 1971), reforçando a hipótese de que o número de infecções em seres humanos seja subestimado. Sabe-se que é de extrema importância o conhecimento de dados a respeito da interação celular e da multiplicação do *T. rangeli* no seu hospedeiro vertebrado, sendo que os mesmos são escassos e bastante controversos.

Por causa da estrutura prevista e da localização na superfície do *T. cruzi* e de *Leishmania* sp., tem sido proposto que as amastinas podem desempenhar um importante papel na interação hospedeiro-parasito dentro da célula dos mamíferos: no transporte de íons e nutrientes através da membrana, ou envolvidos com eventos de sinalização celular que iniciam a diferenciação do parasito (JACKSON, 2010). A sua expressão preferencial durante a etapa intracelular também sugere que as mesmas podem constituir um antígeno relevante durante a infecção pelo parasito, já que foi possível observar que peptídeos de amastinas provocam uma forte resposta imune durante a infecção por *Leishmania* spp. (RAFATI *et al.*, 2006). Esses antígenos de amastinas são considerados biomarcadores imunológicos, relevantes na leishmaniose cutânea e visceral (STOBER, 2006). Com base nessas informações, o estudo do padrão de expressão das amastinas, localização celular e sua importância numa possível multiplicação desses parasitos torna-se bastante relevante para *T. rangeli*, parasito considerado não patogênico, sem forma intracelular e com a presença de inúmeras cópias gênicas de amastinas.

Com relação ao hospedeiro mamífero, dados recentes ainda não publicados do nosso grupo de pesquisa, envolvendo alguns aspectos da resposta imunológica frente a *T. rangeli*, mostram que os parasitos são reconhecidos pelo hospedeiro e induzem a produção de uma resposta inflamatória. Esses importantes resultados, porém inconclusivos, servem para ressaltar a grande necessidade do estudo acerca da interação parasito-hospedeiro do *T. rangeli* com o hospedeiro

mamífero, sendo que o aprofundamento dessa relação pode fazer do mesmo um modelo interessante frente a investigações de potenciais alvos antiparasitários, um possível modelo de vetor vacinal para doença de Chagas (BASSO, MORETTI & FRETES, 2008; RODRIGUEZ *et al.*, 2009; MARINI *et al.*, 2011), e também para novas tecnologias terapêuticas, como por exemplo, terapias imunológicas e genéticas.

Com base nessas informações foram realizados diversos estudos para melhor entender o funcionamento dessa família de proteínas e sua função na maquinaria funcional do parasito com as possíveis interações que os mesmos realizam.

## 2 – RESULTADOS

### 2.1 Conservação, estrutura e organização genômica das Amastinas de *T. rangeli*.

A busca por sequências gênicas correspondentes a amastinas no *T. rangeli* foi inicialmente realizada em dois bancos de dados genômicos da cepa SC58 de *T. rangeli*, sendo um disponível no GenBank e TriTrypDB (STOCO *et al.*, 2014) e o outro disponível em nosso laboratório contendo uma nova montagem somando-se sequências obtidas através da plataforma Illumina. A partir destas buscas, apenas quatro genes correspondentes a amastinas foram identificados.

No início de 2017, foi realizado um novo sequenciamento desta cepa utilizando a tecnologia SMRT da empresa Pacific Biosciences. Utilizando o banco de dados com a montagem do genoma a partir deste sequenciamento foi possível realizar uma busca mais detalhada das amastinas de *T. rangeli* a partir de tBLASTn, rpsBlast e HMMsearch, tendo sido identificados 17 genes e 4 pseudogenes de amastinas no genoma desse parasito. Os pseudogenes identificados correspondem a sequências similares as duas  $\beta$  amastinas de *T. cruzi* e a duas  $\delta$  amastinas relacionadas a tuzinas. Os *reads* obtidos com as diferentes estratégias de sequenciamento foram analisados confirmando a real existência de códons de parada prematuros para estas sequências. Além disso, o gene *TrAma7\_1* foi sequenciado através de método de Sanger e todas as alterações que caracterizaram estes genes como pseudogenes foram também encontradas no genoma parcial da cepa Choachí de *T. rangeli*.

De maneira geral, as sequências foram mais similares às encontradas no genoma de *T. cruzi* CL Brener, *T. cruzi marinkellei* e *T. cruzi* DM28C. Essas sequências foram divididas em sete grupos com base em similaridade (Figura 7), havendo em alguns grupos com cópias idênticas presentes. As características gerais das sequências estão descritas no quadro 1.

Gene	TrAm1_1	TrAm1_2	TrAm1_3	TrAm1_4	TrAm1_5	TrAm1_6	Grupot	TrAm2_1	Grupoz	TrAm3_1	TrAm3_2	TrAm3_3	TrAm3_4	TrAm4_1	TrAm4_2	TrAm4_3	TrAm4_4	TrAm4_5	TrAm4_6	Grupoz	TrAm5_1	TrAm5_2	Grupoz	TrAm6_1	Grupoz	TrAm7_1
TrAma1_1	99							9	6	6	6	6	6	18	18	18	17	14	14	14	7	7	6	6	8	
TrAma1_2	99	99						9	6	6	6	6	6	18	18	18	17	14	14	14	7	7	6	6	8	
TrAm1_3	99	99	99					9	6	6	6	6	6	18	18	18	17	14	14	14	7	7	6	6	8	
TrAm1_4	82	82	82	82				8	6	6	6	6	6	18	18	18	17	14	14	14	7	7	6	6	8	
TrAm1_5	82	82	82	100				8	6	6	6	6	6	18	18	18	17	14	14	14	7	7	6	6	8	
TrAm1_6	82	82	82	100	100			8	6	6	6	6	6	18	18	18	17	14	14	14	7	7	6	6	8	
TrAm2_1								8	6	6	6	6	6	18	18	18	17	14	14	14	7	7	6	6	8	
TrAm3_1									6	6	6	6	6	18	18	18	17	14	14	14	7	7	6	6	8	
TrAm3_2									6	6	6	6	6	18	18	18	17	14	14	14	7	7	6	6	8	
TrAm3_3									6	6	6	6	6	18	18	18	17	14	14	14	7	7	6	6	8	
TrAm3_4									6	6	6	6	6	18	18	18	17	14	14	14	7	7	6	6	8	
TrAm4_1										3	3	3	4	6	6	6	6	6	6	6	5	5	5	5	6	
TrAm4_2										3	3	3	4	6	6	6	6	6	6	6	5	5	5	5	6	
TrAm4_3										3	3	3	4	6	6	6	6	6	6	6	5	5	5	5	6	
TrAm4_4										3	3	3	4	6	6	6	6	6	6	6	5	5	5	5	6	
TrAm4_5										3	3	3	4	6	6	6	6	6	6	6	5	5	5	5	6	
TrAm4_6										3	3	3	4	6	6	6	6	6	6	6	5	5	5	5	6	
TrAm5_1														5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	6	
TrAm5_2														5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	6	
TrAm6_1														5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	6	
TrAm7_1														5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	6	

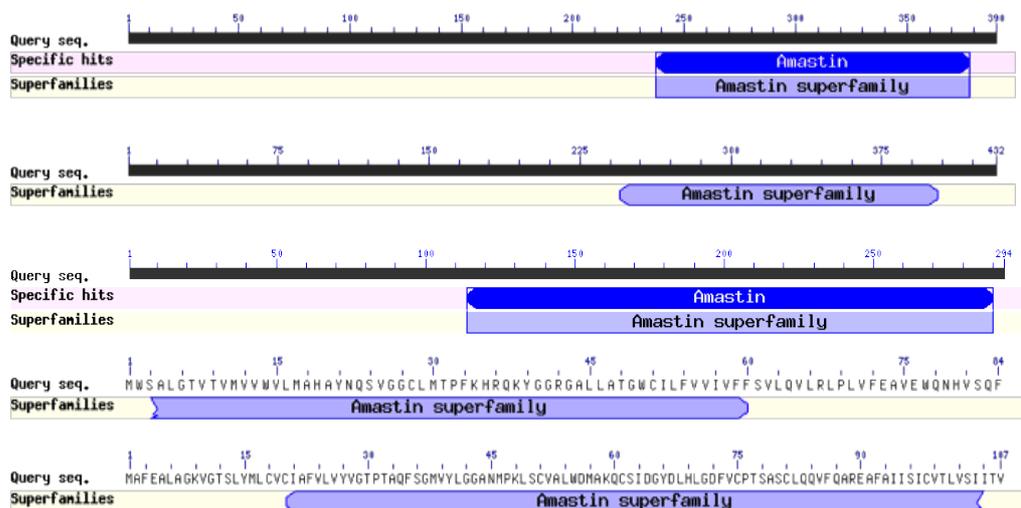
Gene	TrAm1_1	TrAm1_2	TrAm1_3	TrAm1_4	TrAm1_5	TrAm1_6	Grupot	TrAm2_1	Grupoz	TrAm3_1	TrAm3_2	TrAm3_3	TrAm3_4	TrAm4_1	TrAm4_2	TrAm4_3	TrAm4_4	TrAm4_5	TrAm4_6	Grupoz	TrAm5_1	TrAm5_2	Grupoz	TrAm6_1	Grupoz	TrAm7_1
TrAma1_1	99							27	16	16	16	16	16	32	32	32	32	30	25	25	17	17	15	16	15	
TrAma1_2	99	99						27	16	16	16	16	16	32	32	32	32	30	25	25	17	17	15	16	15	
TrAm1_3	99	99	99					27	16	16	16	16	16	32	32	32	32	30	25	25	17	17	15	16	15	
TrAm1_4	90	90	90	90				27	16	16	16	16	16	32	32	32	32	30	25	25	17	17	15	16	15	
TrAm1_5	90	90	90	100				27	16	16	16	16	16	32	32	32	32	30	25	25	17	17	15	16	15	
TrAm1_6	90	90	90	100	100			27	16	16	16	16	16	32	32	32	32	30	25	25	17	17	15	16	15	
TrAm2_1								27	16	16	16	16	16	32	32	32	32	30	25	25	17	17	15	16	15	
TrAm3_1									16	16	16	16	16	32	32	32	32	30	25	25	17	17	15	16	15	
TrAm3_2									16	16	16	16	16	32	32	32	32	30	25	25	17	17	15	16	15	
TrAm3_3									16	16	16	16	16	32	32	32	32	30	25	25	17	17	15	16	15	
TrAm3_4									16	16	16	16	16	32	32	32	32	30	25	25	17	17	15	16	15	
TrAm4_1										20	20	20	20	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	
TrAm4_2										20	20	20	20	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	
TrAm4_3										20	20	20	20	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	
TrAm4_4										20	20	20	20	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	
TrAm4_5										20	20	20	20	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	
TrAm4_6										20	20	20	20	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	
TrAm5_1														26	26	26	26	26	26	26	26	26	26	26	26	
TrAm5_2														26	26	26	26	26	26	26	26	26	26	26	26	
TrAm6_1														26	26	26	26	26	26	26	26	26	26	26	26	
TrAm7_1														26	26	26	26	26	26	26	26	26	26	26	26	

**Figura 7:** Análise comparativa das amastinas de *Trypanosoma rangeli*. Porcentagens de nucleotídeos (A) e aminoácidos (B) idênticos entre todas as sequências identificadas.

**Quadro 1:** Características gerais das sequências de amastinas identificadas no genoma do *Trypanosoma rangeli*. MW - massa molecular; pI – ponto isoelétrico teórico.

Grupo	Gene	Posição Genoma	pb	aa	MW (Da)	pI teórico	Resultado Blast			Peptídeo Sinal
							Número Acesso	e-value	Identidade/ Similaridade	
Grupo 1	TrAma1_1	scaffold11_0028931_0027759_00	1.173	390	41950.82	5.77	Tc_MARK_1197	2E-103	51%/65%	Não
	TrAma1_2	scaffold4_6_00864_0092	1.173	390	41984.83	5.77	Tc_MARK_1197	1E-104	49%/64%	Não
	TrAma1_3	scaffold8_5_008037_006865_00	1.173	390	42034.93	5.63	Tc_MARK_1197	3E-106	50%/64%	Não
	TrAma1_4	scaffold2_0002744_00026271_00	1.179	392	42310.29	5.85	Tc_MARK_1197	3E-101	49%/62%	Não
	TrAma1_5	scaffold2_0004042_00041600_00	1.179	392	42310.29	5.85	Tc_MARK_1197	3E-101	49%/62%	Não
	TrAma1_6	scaffold2_0004771_00048893	1.179	392	42310.29	5.85	Tc_MARK_1197	3E-101	49%/62%	Não
Grupo 2	TrAma2_1	scaffold1_0084577_00847074	1.299	432	48031.95	8.79	TCDM_03050-t26_1	8E-167	56%/76%	Não
	TrAma3_1	scaffold1_0023418_00233640_00	549	182	19757.49	8.40	TcCLB_507673.60	3E-67	63%/75%	Simil[MCCPTRLVILVIMVLLATACAVCANIPV]
	TrAma3_2	scaffold1_0023578_00235237_00	549	182	19827.58	8.20	TcCLB_507673.60	2E-67	62%/75%	Simil[MCCPTRLVILVIMVLLATACAVCANIPV]
	TrAma3_3	scaffold1_0023738_00236838_00	549	182	19775.42	8.20	TcCLB_507159.50	8E-66	62%/74%	Simil[MCCPSSLRVILVIMVLLATACAVCANIPV]
	TrAma3_4	scaffold1_0023898_00238440_00	549	182	19938.85	7.33	TcCLB_507485.20	1E-68	64%/79%	Simil[MCCPSSLRVILVIMVLLATACAVCANIPV]
	TrAma4_1	scaffold2_0028923_0028039_00	885	294	31403.79	9.22	TCDM_09277-t26_1	1E-95	56%/66%	Não
Grupo 3	TrAma4_2	scaffold2_0004308_00042196_00	885	294	31403.79	9.22	TCDM_09277-t26_1	1E-95	56%/66%	Não
	TrAma4_3	scaffold2_0005037_00049469_00	906	301	32153.57	9.33	TCDM_09277-t26_1	1E-95	56%/66%	Não
	TrAma4_4	scaffold8_5_009431_008549_00	621	206	22446.13	8.60	TCDM_09277-t26_1	4E-82	62%/73%	Não
	TrAma4_5	scaffold1_0003024_00029447	801	266	29876.47	8.98	TCDM_09277-t26_1	1E-71	66%/74%	Não
	TrAma4_6	scaffold4_6_00996_002376_00	621	206	22515.13	8.44	TCDM_09277-t26_1	3E-83	62%/73%	Não
	TrAma5_1	scaffold1_0021728_00216693_00	593	84	9485.33	9.30	TcCLB_506437.30	3E-10	46%/76%	Não
Grupo 5	TrAma5_2	scaffold1_0013400_00134587	588	84	9485.33	9.30	TcCLB_506437.30	3E-10	46%/76%	Não
	TrAma6_1	scaffold1_007189_00687195_0028	561	107	11399.55	4.89	TcCLB_509965.394	3E-29	49%/62%	Simil[MAFEALGKVGTSIYMLCVCIATLVVYGT]
Grupo 7	TrAma7_1	scaffold1_0072107_00721659	590	127	14312.05	9.11	TcCLB_509965.390	2E-31	50%/64%	Não

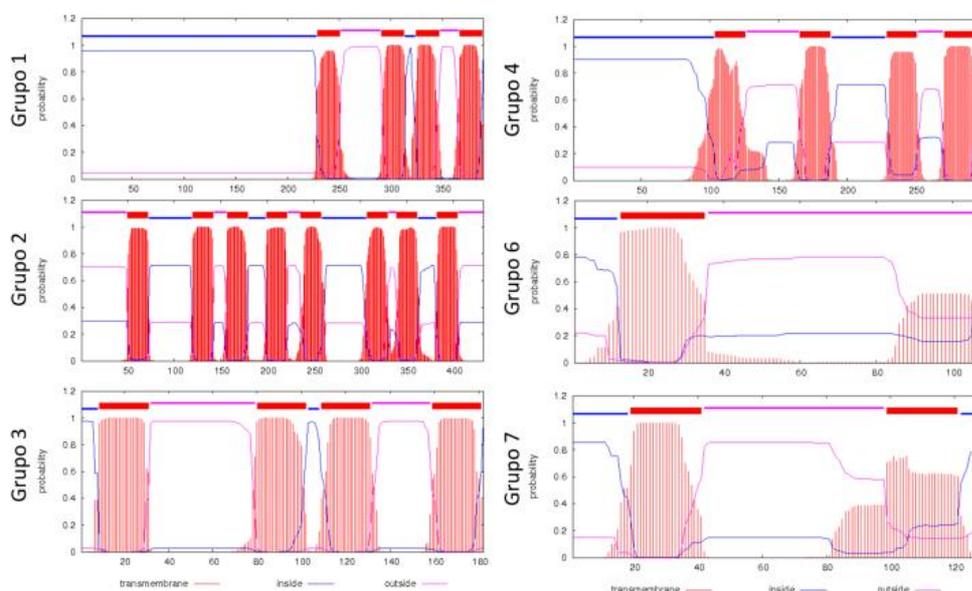
As sequências preditas de aminoácidos foram utilizadas em buscas em bancos de domínios conservados, sendo caracterizadas quando a presença de domínio de amastinas pfam07344 e/ou PTZ00201 e dentro da superfamília cl06401 (Figura 8). Com exceção da *TrAma7\_1* todas as demais sequências apresentaram ao menos uma identificação de domínio. Nessa sequência o domínio não foi identificado pois corresponde apenas a um fragmento. As sequências do grupo 3 apresentaram similaridade com os domínios nas buscas usando rps-blast e hmm-search, no entanto devido a fragmentação das regiões similares ao domínio não foi possível obter a representação esquemática.



**Figura 8:** Domínios conservados das amastinas de *Trypanosoma rangeli*. Sequências representativas de cada grupo de amastinas estão representadas graficamente e apresentam os domínios característicos pfam07344 e/ou PTZ00201 (Azul escuro) e superfamília cl06401 (Azul claro).

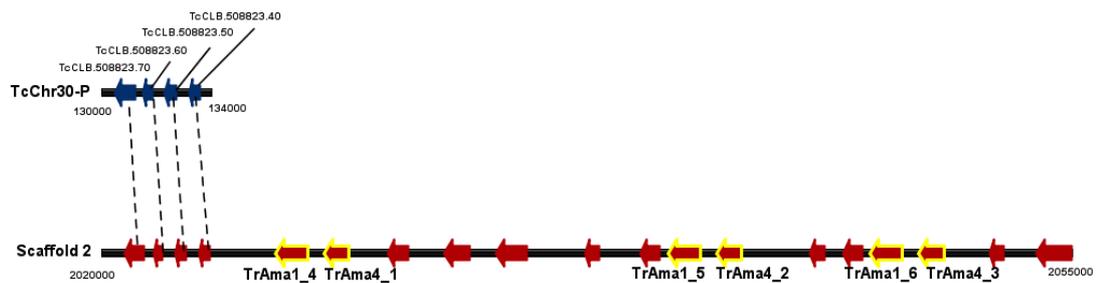
As amastinas são proteínas de superfície descritas como possuidoras de quatro regiões transmembranares. Para avaliar a presença destas regiões transmembrana foi utilizado o programa TMHMM, sendo que a maior parte das sequências apresentou as quatro regiões já descritas (Figura 9). Para os grupos 6 e 7 a representação corresponde ao fragmento que poderia ser traduzido uma vez que se tratam de pseudogenes por apresentarem códons de parada prematuros. A *TrAma2\_1* apresentou um número superior de regiões transmembrana preditas do que o esperado para a maioria amastinas.

Esta sequência apresenta 71% de similaridade e tamanho conservado com os ortólogos anotados em todos os genomas de *T. cruzi* como proteína hipotética conservada, bem como com outras espécies como *Crithidia fasciculata*, cuja anotação refere-se como amastina.



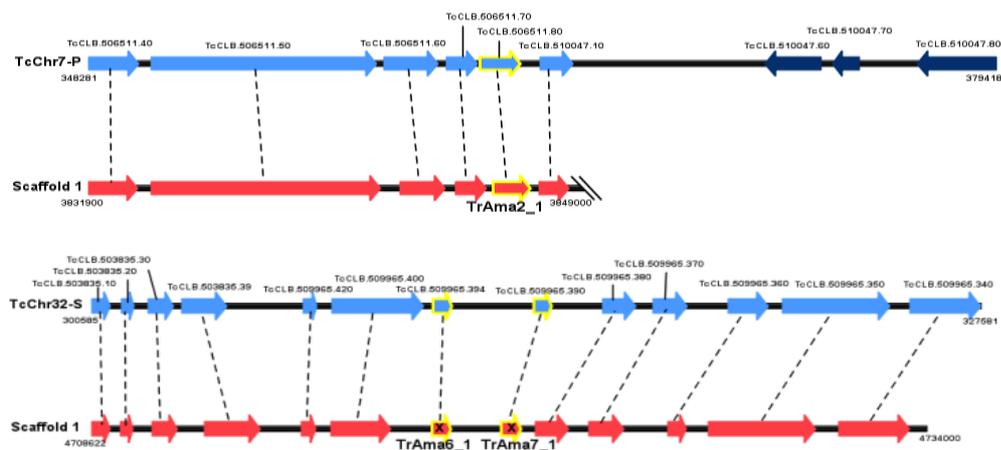
**Figura 9:** Predição de regiões transmembranas (vermelho) nas amastinas de *Trypanosoma rangeli* utilizando o programa TMHMM Server v. 2.0 do pacote ExPasy. Prováveis regiões extracelulares estão demonstradas em rosa e intracelulares em azul.

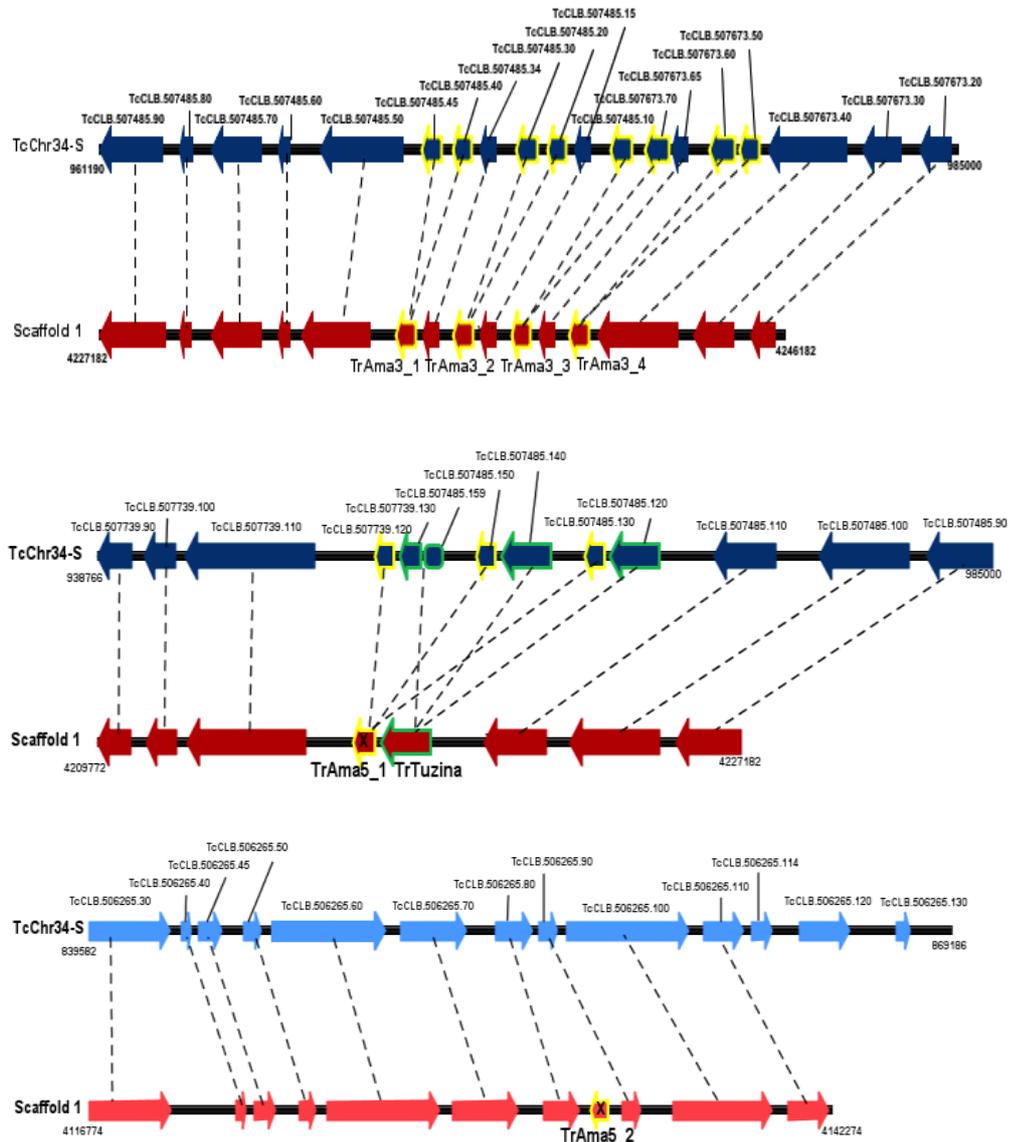
A organização genômica das amastinas foi investigada nos 120 *scaffolds* resultantes da montagem do genoma do *T. rangeli*. Embora estes *scaffolds* ainda não sejam uma representação fidedigna dos cromossomos de *T. rangeli*, foi possível realizar alinhamentos com os cromossomos da cepa CL Brener de *T. cruzi*. As sequências pertencentes aos grupos 1 e 4 não apresentaram-se em regiões de alta sintonia entre as espécies. Para as regiões contendo as demais sequências de amastinas identificadas é possível observar um alto grau de sintonia entre os genomas de *T. cruzi* e *T. rangeli*. As sequências correspondentes aos grupos 1 e 4 apresentaram-se intercaladas nos *scaffolds* 2, 46 e 85. Isto pode ser observado na representação esquemática da região correspondente no scaffold 2 (Figura 10), sendo que este possui um total de 3.011.891pb. Entre cada repetição de amastinas dos grupos 1 e 4 existem genes e pseudogenes que codificam para a proteína de superfície gp63, família gênica que possui centenas de cópias no genoma do *T. rangeli*.



**Figura 10:** Representação esquemática e análise de sintenia de uma região do scaffold 2 de *Trypanosoma rangeli* contendo 6 amastinas do grupo 1 e 4. Uma região do cromossomo 30 de *Trypanosoma cruzi* CL Brener Não Esmeraldo está representada. As setas azuis (*T. cruzi*) e vermelhas (*T. rangeli*) correspondem a regiões codificantes e suas orientações nos dois genomas. As setas com destaque em amarelo correspondem aos genes de amastinas. Os números de acesso das seqüências de *T. cruzi* são referentes ao TriTrypDB.

As demais amastinas identificadas estão distribuídas no scaffold 1 (12.576.647pb), que devido ao seu tamanho provavelmente corresponde a mais de um cromossomo no *T. rangeli*. Grandes regiões de similaridade foram encontradas nas regiões que contêm as amastinas com os cromossomos 7, 32 e 34 de *T. cruzi* CL Brener (Figura 11).



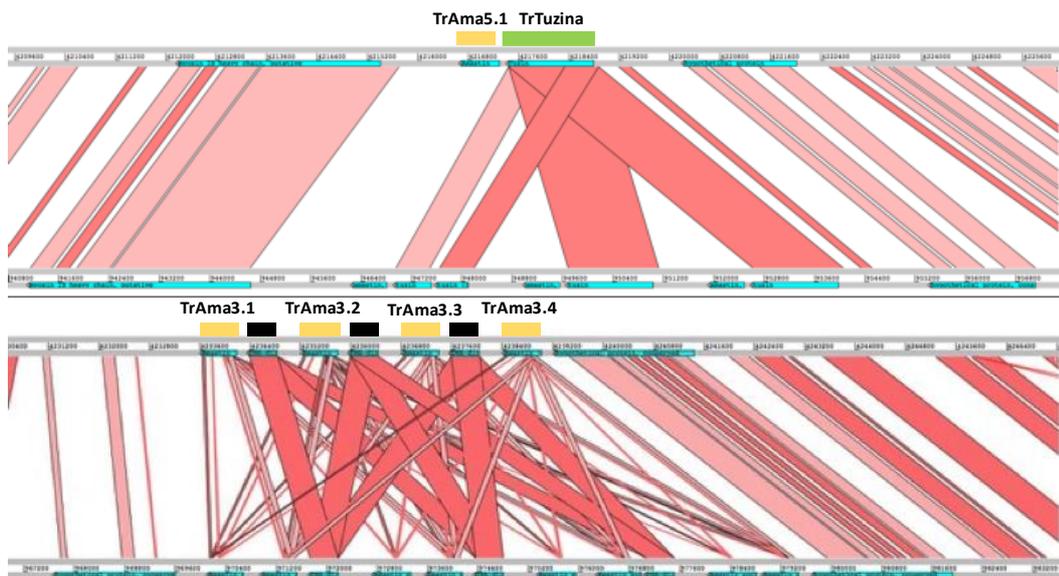


**Figura 11:** Representação esquemática de diferentes regiões do scaffold 1 de *Trypanosoma rangeli* e análise de sintenia com os cromossomos 7 (A), 32 (B) e 34 (C-E) de *Trypanosoma cruzi*. Em **A)** encontra-se a *TrAma2\_1*; **B)** *TrAma6\_1* e *7\_1*; **C)** todas as *TrAma3*; **D e E)** as duas *TrAma5*. As setas azuis (*T. cruzi*) e vermelhas (*T. rangeli*) correspondem a regiões codificantes e suas orientações nos dois genomas. As setas com destaque em amarelo correspondem aos genes de amastinas e as destacadas com verde correspondem aos genes de tuzina. As ORF identificadas com X correspondem a pseudogenes de amastinas. Os números de acesso das seqüências de *T. cruzi* são referentes ao TriTrypDB.

Algumas seqüências de amastinas como a *TrAma5.1* e a *TrAma7.1* embora tenham sido encontradas em regiões conservadas no

genoma em relação ao *T. cruzi* apresentam baixa similaridade (76 e 64% respectivamente) com as correspondentes na cepa CL Brener de *T. cruzi*.

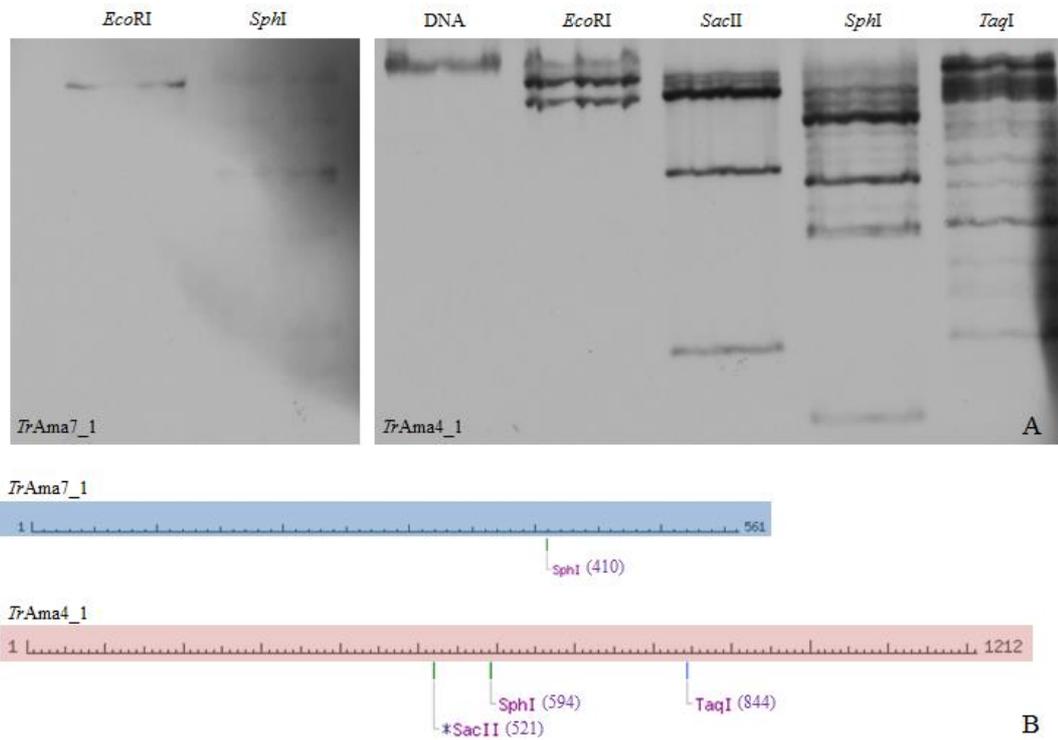
As regiões correspondentes as figuras 11C e 11D foram analisadas utilizando o programa Artemis com o qual é possível identificar além da sintonia preservada o grau de identidade entre as sequências ortólogas nas duas espécies (Figura 12) conforme a coloração das faixas entre os ortólogos.



**Figura 12:** Análise de sintonia com representação de identidade entre os ortólogos de duas regiões do scaffold 1 de *Trypanosoma rangeli* com os cromossomos 34 de *Trypanosoma cruzi* (Esmeraldo). Em **A)** encontra-se a *TrAma5\_1* e a *TrTuzina* e em **B)** as *TrAma3*. Na figura a linha superior corresponde ao scaffold de *T. rangeli* e a inferior ao cromossomo 34-S de *T. cruzi*. As faixas em vermelho apontam regiões de similaridade e a intensidade do vermelho indica maior grau de identidade entre as sequências. As barras em amarelo correspondem aos genes de amastinas, em verde a tuzina e em preto genes de RNA polimerase.

Com o objetivo de confirmar o número de cópias dos genes referentes a duas das amastinas presentes no genoma do *T. rangeli* (Grupo 4 e Grupo7) foram realizados ensaios de *Southern Blot* (Southern, 1975) utilizando-se como sondas os genes *TrAma4\_1* e *TrAma7\_1* (Figura 13). Para o gene *TrAma4\_1*, quando o DNA genômico do parasito foi digerido com a enzima *EcoRI*, que não possui sítio de clivagem dentro da região da sonda sendo observada a detecção

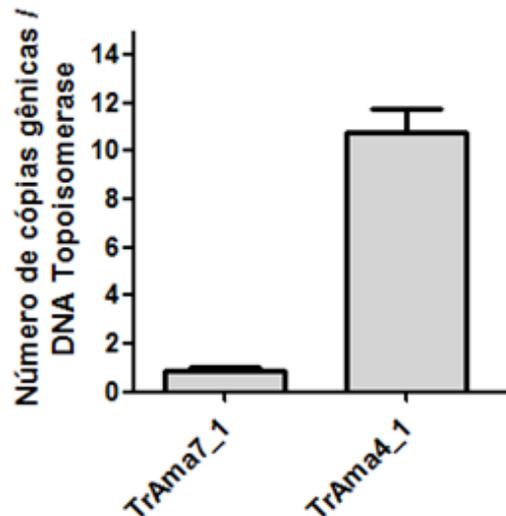
de três bandas. Enquanto que, para os DNA digeridos com as enzimas *SacII*, *SphI*, *TaqI*, para as quais existe um sítio de clivagem dentro da região da sonda, foi observado o reconhecimento de diversas bandas compatível com um padrão de múltiplas cópias deste gene. Já para o gene *TrAma7\_1* quando o DNA genômico do parasito foi digerido com a enzima *EcoRI*, que não possui o sítio de clivagem dentro da região da sonda foi observada a detecção de apenas uma banda, sugerindo se tratar de uma única cópia genômica.



**Figura 13:** A) Análise da organização dos genes de amastina de *Trypanosoma rangeli* por *Southern Blot*. B) Mapa de restrição dos genes apontando os sítios de restrição das enzimas utilizadas. A barra azul representa o quadro aberto de leitura do gene *TrAma7\_1* e a barra vermelha representa o quadro aberto de leitura do gene *TrAma4\_1*.

Uma vez que a técnica de *Southern Blot* pode não ser sensível e precisa na definição do número de cópias de famílias multigênicas, foi realizado um ensaio de qPCR para quantificação absoluta de cópias dessas amastinas de *T. rangeli* (Figura 13). Para essa quantificação foram utilizados como controle dois genes de cópia única no genoma de *T. rangeli* (DNA topoisomerase II nuclear/ DNA topoisomerase II mitocondrial). Todos os genes foram clonados por Stoco (2010) e com uma curva padrão estabelecida com diferentes quantidades dos

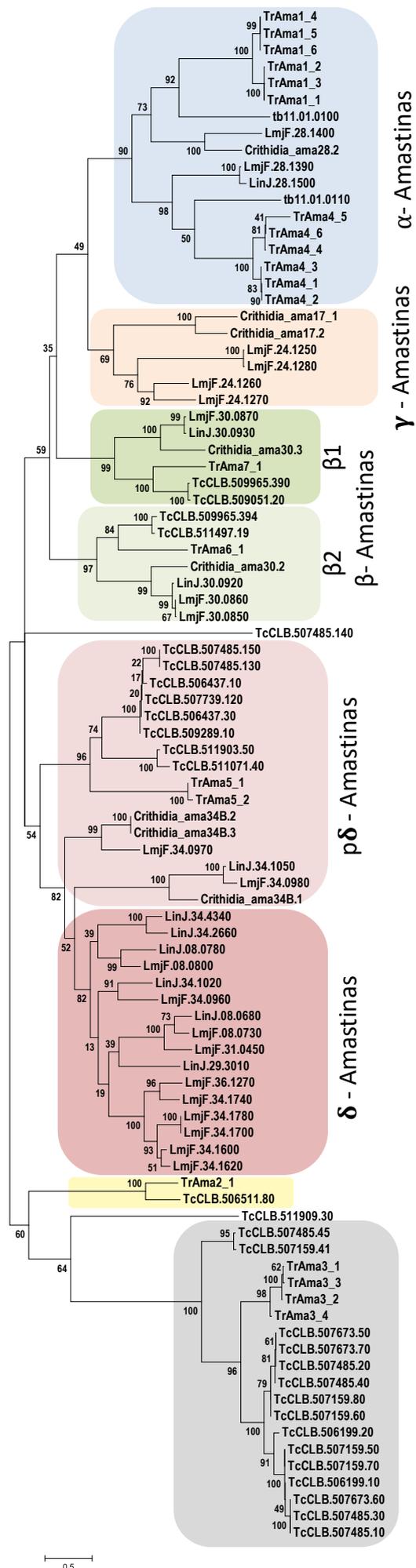
respectivos plasmídeos foi possível calcular o número de cópias em uma dada amostra de DNA. Desta forma, foi possível averiguar a presença de uma cópia para o gene *TrAma7\_1* e 10 cópias para o gene *TrAma4\_1*. Nas buscas no genoma estes iniciadores proporcionariam a amplificação de seis genes por genoma haploide.



**Figura 14:** Quantificação do número de cópias gênicas por genoma haploide do *Trypanosoma rangeli* dos genes *Tr\_Ama7\_1* e *TrAma4\_1* utilizando qPCR. O número final de cópias foi obtido a partir da normalização com os valores de quantificação das mesmas amostras para dois genes de DNA topoisomerase sabidamente de cópia única. O resultado corresponde a média  $\pm$  desvio padrão da quantificação de quatro réplicas biológicas.

Para classificar as amastinas identificadas em *T. rangeli* nas subfamílias ( $\alpha$ ,  $\beta$ 1/2,  $\delta$  e  $\gamma$ ) foi contruída uma árvore filogenética utilizando algumas das sequências aminoacídicas descritas por Jackson (2010), basicamente foram removidas somente algumas sequências do grupo das  $\delta$ -amastinas de *Leishmania* sp. e foram inseridas nas análises todas as sequências de *T. rangeli* e as identificadas no TriTrypDB para a cepa CL Brener de *T. cruzi* que continham domínio de amastina (Figura 15). A partir desta árvore conseguimos classificar as amastinas de *T. rangeli* em  $\alpha$ ,  $\beta$ 1/2 e  $p\delta$ . Além disso, dois grupos de amastinas que incluíram somente sequências de *T. rangeli* (*TrAma2\_1* e *TrAma3*) e de *T. cruzi* foram formados.

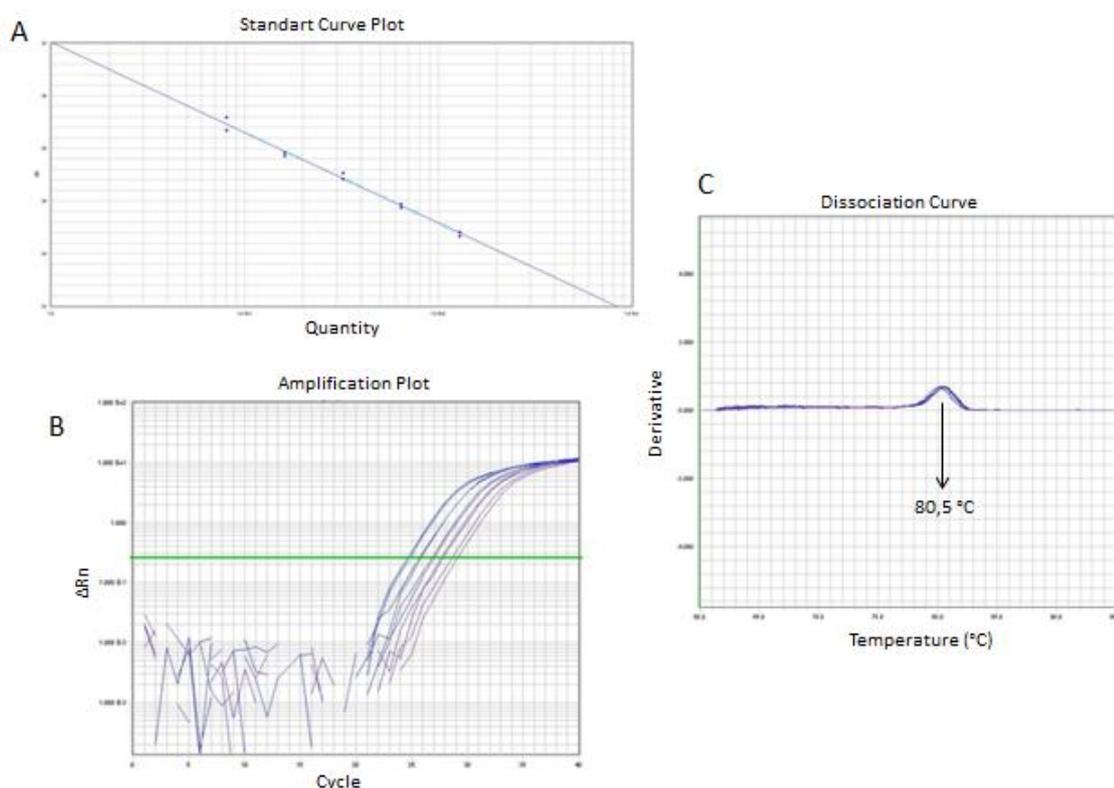
Quando analisamos cada subfamília em que sequências do *T. rangeli* foram encontradas através de alinhamentos (Anexos 1 a 5) é possível observar em todos os casos existem regiões conservadas bem definidas. A região de assinatura das amastinas foi identificada em todas as subfamílias com pequenas diferenças entre as sequências, sendo esta região extremamente discrepante para as *TrAma\_5*, lembrando que as duas sequências deste grupo no *T. rangeli* correspondem a pseudogenes. Em relação aos agrupamentos que contêm as sequências *TrAma2\_1* e *TrAma3* e sequências de *T. cruzi*, estas amastinas não são exclusivas destes parasitos sendo que ortólogos foram encontrados em outras espécies. Para o grupo formado o *TrAma2\_1* e TcCLB.506511.80 ortólogos foram encontrados em um número restrito de espécies incluindo *Blechnomonas ayalai*, *Leishmania enrietti*, *Endotrypanum monterogeei*, *Leptomonas* sp., *Crithidia fasciculata*, *T. cruzi marinkellei* e *Trypanosoma grayi*. Para o clado que inclui as sequências do grupo *TrAma\_3* ortólogos foram encontrados na grande maioria das espécies com sequências disponíveis no TriTrypDB. Nesses dois clados não classificados por Jackson, 2010, a região de assinatura de amastinas apresentou uma grande variação, havendo a ausência da cisteína final.

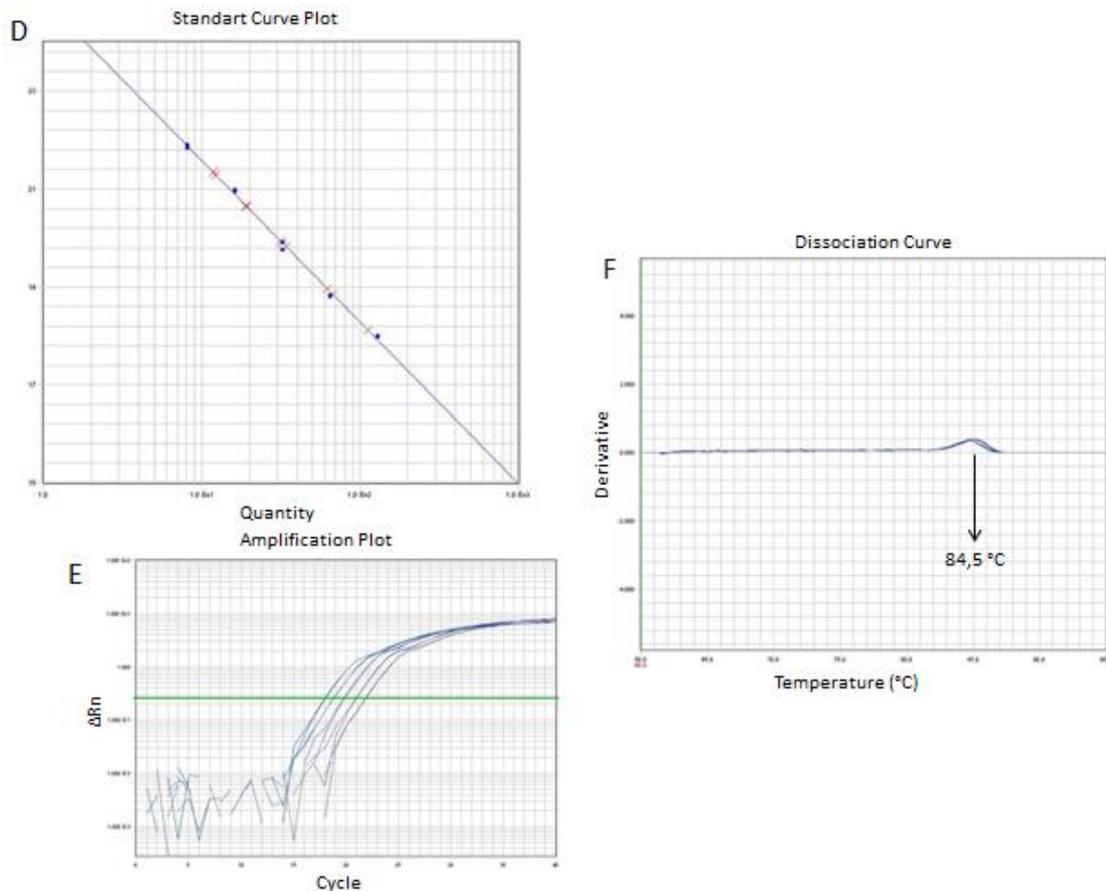


**Figura 15:** Árvore filogenética das amastinas de tripanosomatídeos baseadas nas sequências utilizadas por Jackson, 2010 para a classificação desta família. O alinhamento das sequências foi realizado pelo programa T-coffee e a história evolutiva foi inferida pelo método de Máxima Verossimilhança usando o MEGA versão 6.0. A filogenia foi construída usando o modelo de substituição de aminoácidos WAG+G. A árvore foi desenhada em escala, com o tamanho dos ramos relacionado ao número de substituições por sítio. A análise utilizou 92 sequências completas de amastinas, sendo todos os 863 sítios informativos. Porcentagens de bootstrap estão apontadas próximo aos ramos, e correspondem a porcentagem da de árvores nas quais os taxons foram agrupados (1.000 replicatas).

## 2.2 Análise dos níveis de transcritos das amastinas de *T. rangeli*

Para validar os iniciadores específicos para as análises por qPCR foram padronizadas reações com cinco pontos de diluição seriada 1:2 de misturas de cDNA com amostras de três replicatas de epimastigotas e tripomastigotas de *T. rangeli*. Para cada um dos genes de amastina em questão foi determinado o C<sub>q</sub> de cada ponto na curva em função de sua diluição através de uma reta, e então determinado o valor da eficiência dos iniciadores. A eficiência média da qPCR para cada par de iniciadores foi calculada e os valores foram de 93% para o gene *TrAma7\_1* e de 94% para *TrAma4\_1*, conforme Pfaffl (2004). Através das curvas de dissociação é possível observar a especificidade dos iniciadores para cada gene (Figura 16).



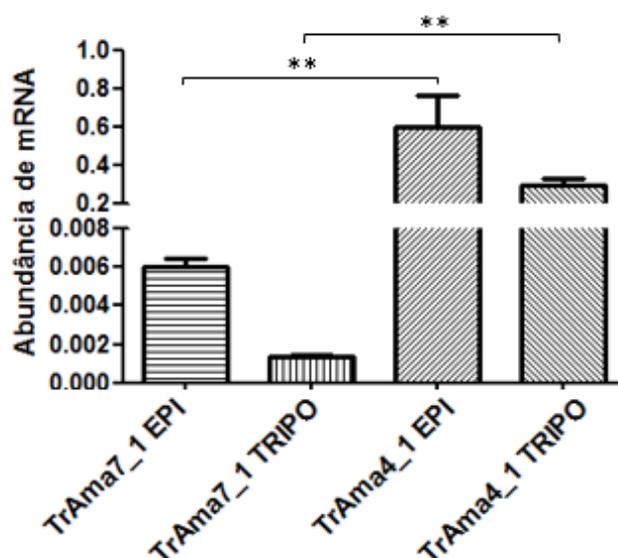


**Figura 16:** Padronização da PCR em tempo real para quantificação dos níveis de transcritos das amastinas *TrAma4\_1* e *TrAma7\_1* em diferentes formas evolutivas de *Trypanosoma rangeli*. As curvas de dissociação dos produtos de amplificação de *TrAma4\_1* e *TrAma7\_1* apresentaram-se como picos únicos com temperatura de *melting* de 84,5°C e 80,5 °C (C e F), respetivamente. Curvas padrão geradas a partir da região linear de cada curva de amplificação de *TrAma7\_1* (A) e *TrAma4\_1* (D). Curvas de amplificação para o gene de *TrAma7\_1* (B) e *TrAma4\_1* (E) demonstrando amplificação nas diluições seriadas do cDNA.

Uma vez que a eficiência das reações utilizando esses iniciadores foi similar (diferença menor que 10%) a eficiência dos genes já padronizados como referência para *T. rangeli* GAPDH e RNA60s foi possível realizar os cálculos dos níveis de expressão gênica a partir dos valores de  $2^{-(\Delta Cq)}$ . Para tal, três replicatas biológicas foram utilizadas dos diferentes estágios evolutivos de *T. rangeli*: formas epimastigotas e tripomastigotas.

De acordo com os resultados da figura 17 é possível observar diferentes níveis de transcritos para as formas epimastigotas e tripomastigotas entre *TrAma7\_1* e *TrAma4\_1*, sendo essa diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ). Entretanto, não foram

observadas diferenças na abundância de RNAm de cada amastina entre as formas evolutivas de *T. rangeli*.



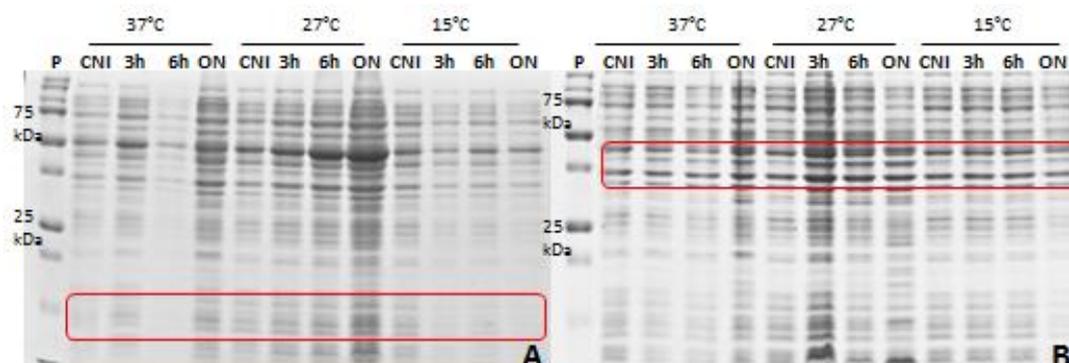
**Figura 17:** Níveis de RNAm dos genes de amastina *TrAma7\_1* e *TrAma4\_1* de *Trypanosoma rangeli*. Foram analisadas formas epimastigotas (EPI) e tripomastigotas (TRIPO) de *T. rangeli*, utilizando como referência a média geométrica dos genes GAPDH e RNA60s. Os dados foram obtidos por ensaio de qPCR e representam a média e o desvio padrão de três experimentos independentes, realizados em triplicata. O sinal \*\* indica diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) utilizando o teste ANOVA de uma direção seguida pelo teste de comparação múltipla de Tukey.

### 2.3 Expressão heteróloga das amastinas *TrAma4\_1* e *TrAma7\_1* de *T. rangeli*

Inicialmente foi realizada a tentativa de realizar a expressão heteróloga das proteínas recombinantes *rTrAma7\_1* e *rTrAma4\_1*. Para o gene *TrAma7\_1* dois conjuntos de iniciadores foram inicialmente desenhados. Um deles amplifica do códon de iniciação ao códon de parada prematuro, o que corresponderia a ORF truncada e o segundo par amplifica do códon de iniciação ao segundo códon de parada identificado, para verificar se o códon de parada prematuro identificado nas sequências do genoma realmente existia.

Os produtos da PCR foram clonados no vetor de clonagem pGEM-T Easy<sup>®</sup>, e então subclonados no vetor de expressão pET14b. Após confirmação da presença do códon de parada prematuro e da

confirmação da posição correta dos demais insertos no vetor, iniciaram-se os testes de expressão heteróloga das proteínas recombinantes em células *E. coli* BL21(DE3). Na figura 18, podemos observar o padrão de expressão resultante desse teste de expressão inicial.



**Figura 18:** Teste de expressão heteróloga das proteínas recombinantes amastinas de *Trypanosoma rangeli* em *E. coli* BL21(DE3), em diferentes condições. A) rTrAma7\_1 (tamanho esperado  $\pm 12$  kDa), B) rTrAma4\_1 (tamanho esperado  $\pm 39$  kDa). Em vermelho estão identificados os locais dos respectivos pesos moleculares esperados de cada proteína recombinante. P: padrão de peso molecular (*Precision Plus Protein Dual Color Standart* – Bio-Rad), CNI: controle não induzido e ON: “overnight”.

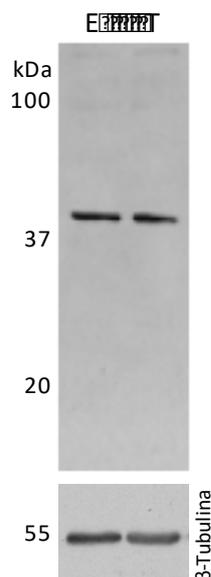
Como observa-se na figura acima, não é possível identificar as bandas proeminentes nos tamanhos esperados, indicando a ausência de expressão das proteínas recombinantes esperadas. Para confirmar isso, foram realizados ensaios de *Western blot* dessas amostras visando à detecção da cauda de histidinas e, conforme o esperado, os resultados foram negativos para todas as amostras (dados não mostrados).

As sequências de nucleotídeos foram então analisadas no programa RaCC quanto à presença de códons raros. Fato este que poderia indicar uma dificuldade da *E. coli* em expressar essas proteínas. Para a amastina TrAma7\_1 foi identificado um códon raro de prolina (CCC), e para TrAma4\_1 foram identificados 11 códons raros para arginina (AGG, AGA e CGA), 7 códons CCC (prolina), 2 códons raros para isoleucina (CTA) e 1 códon para leucina (CTA).

Com base nesses resultados optou-se por inserir mais variáveis na triagem de expressão dessas recombinantes e foram selecionadas novas linhagens de *E. coli* BL21(DE3), sendo: Rosetta, Códon Plus e PlyS. Os tempos de indução e temperatura foram mantidos,

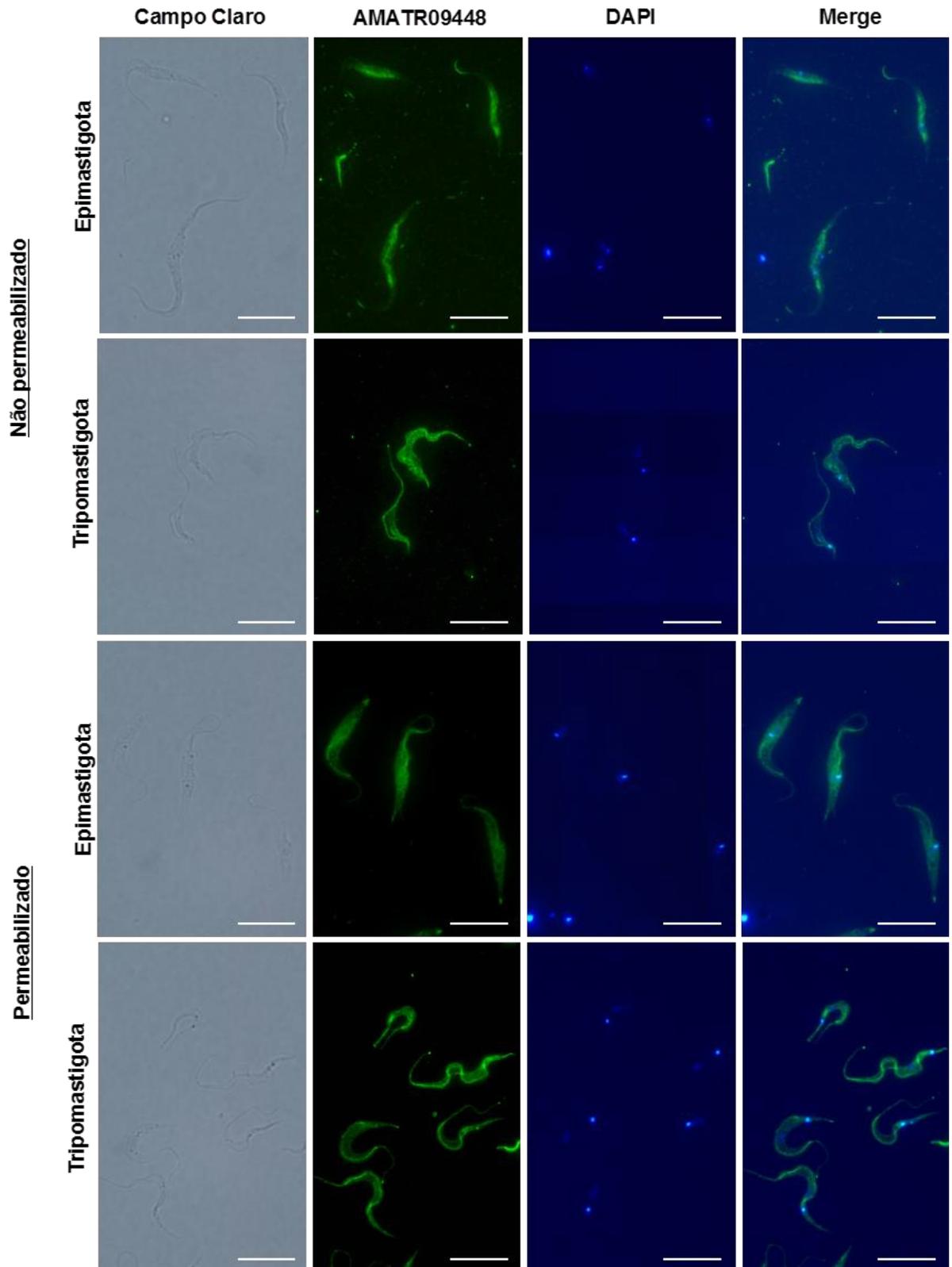
entretanto foram adicionadas outras três concentrações diferentes de indutor: 0,15; 0,25 e 0,5 mM de IPTG. Apesar destas modificações também não foi possível obter a expressão heteróloga das amastinas de *T. rangeli*.

Para avaliar a expressão dessas amastinas durante o ciclo biológico do *T. rangeli* foram selecionadas as regiões de domínio hidrossolúvel, referente ao domínio amastina das sequências *TrAma7\_1* e *TrAma4\_1* de *T. rangeli* para a síntese de peptídeos. Antissoros policlonais murinos contra as proteínas *TrAma7\_1* e *TrAma4\_1* foram obtidos e utilizados em ensaios de *Western Blot*. O soro anti- *TrAma4\_1* permitiu a identificação de uma proteína de  $\pm 39$  kDa de mesma intensidade nos extratos proteicos totais de epimastigotas e tripomastigotas de *T. rangeli* (Figura 19). Esse mesmo soro foi testado utilizando extratos proteicos de epimastigotas, tipomastigotas e amastigotas de *T. cruzi* e não foi capaz de reconhecer nenhuma proteína deste parasito. O soro anti- *TrAma7\_1* não detectou nenhuma proteína nos extratos de *T. rangeli* bem como de *T. cruzi* (dados não mostrados).



**Figura 19:** A amastina *TrAma4\_1* é expressa nas duas formas evolutivas de *Trypanosoma rangeli*. O ensaio de *Western Blot* foi conduzido utilizando 30  $\mu$ g extratos proteicos totais de epimastigotas (E) e tripomastigotas (T) de *T. rangeli* e o soro produzido contra um peptídeo dessa proteína reconheceu uma proteína de  $\pm 39$  kDa. Como controle de quantidade proteica foi utilizado um anticorpo anti-Beta tubulina.

O soro anti-*TrAma4\_1* foi também utilizado em ensaios de imunofluorescência para verificar a sublocalização desta proteína (Figura 20). Não houve diferença no padrão de reconhecimento entre as formas do parasito e uma vez tanto parasitos permeabilizados quanto não permeabilizados apresentaram fluorescência sugere-se que esta seja uma proteína de membrana como havia sido predito nos programas de topologia. As amastinas têm como característica a presença de quatro domínios transmembrana.

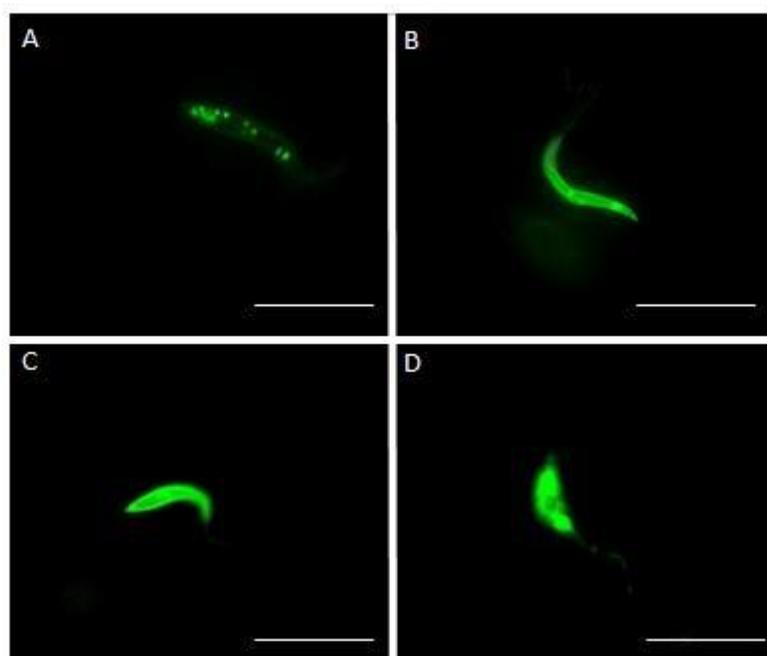


**Figura 20:** Sublocalização da amastina *Tr\_AMA4\_1* de *Trypanosoma rangeli* em formas epimastigotas e tripomastigotas permeabilizadas e não permeabilizadas. A barra corresponde a 10  $\mu$ m.

## 2.4 Obtenção e avaliação de linhagens de *T. rangeli* expressando amastinas de *T. cruzi*

Visando a expressão isolada de quatro diferentes amastinas de *T. cruzi* em *T. rangeli*, foram utilizados vetores contendo os genes de amastinas de *T. cruzi*:  $\delta$ -AMA40,  $\delta$ -AMAF,  $\beta$ 1-AMA390 e  $\beta$ 2-AMA394.

Parasitas da cepa Choachí de *T. rangeli* foram transfectados conforme detalhado no item 3.16.2, com os vetores contendo as diferentes amastinas de *T. cruzi* fusionadas com GFP. Após 24 horas, a seleção dos parasitos transfectados iniciou com a adição de G-418 (25  $\mu$ g/ml) no meio de cultivo, a qual foi incrementada à medida que os parasitos se mostravam estáveis, em crescimento e com boa motilidade. Atualmente, os parasitos encontram em cultura contendo 300  $\mu$ g/ml de G-418.

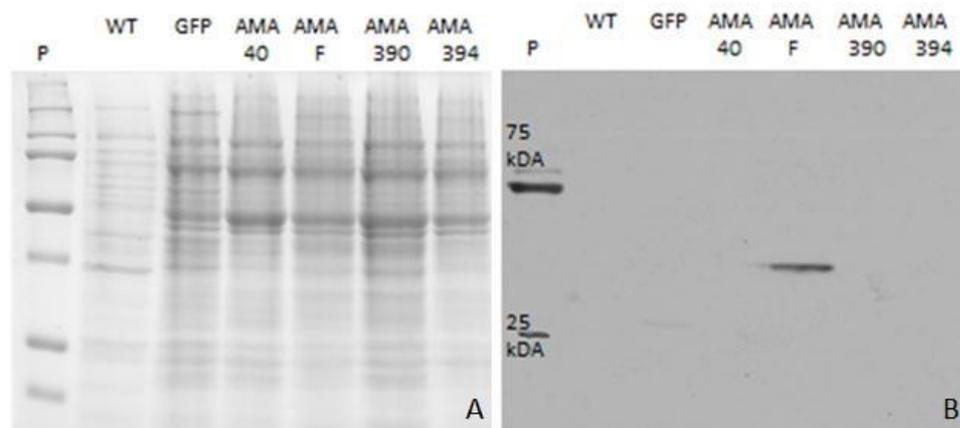


**Figura 21:** Formas epimastigotas de *Trypanosoma rangeli* expressando amastinas de *T. cruzi* fusionadas com a proteína verde fluorescente GFP. A) Tr\_AMA40, B) Tr\_AMAF, C) Tr\_AMA390 e D) Tr\_AMA394 (Barra: 10  $\mu$ m).

Após a transfecção, os parasitos foram observados em microscópio de fluorescência a fim de observar a expressão da proteína GFP. Na figura 21, é possível observar formas epimastigotas de *T. rangeli* expressando as amastinas de *T. cruzi* recombinantes. Com base na fluorescência das diferentes linhagens de *T. rangeli* é possível

obeservar que existem distintas localizações para essas proteínas, para as linhagens Tr\_AMAF, Tr\_AMA390 e Tr\_AMA394 foi possível observar que a fluorescência distribui-se ao longo de todo o parasito. Enquanto isso a linhagem Tr\_AMA40 apresentou distribuição diferenciada em forma de vesículas ao longo do citoplasma do parasito.

A confirmação das linhagens transfectadas foi também realizada através de *Western blot* utilizando o anticorpo monoclonal anti-GFP (Figura 22).



**Figura 22:** Detecção da expressão amastinas de *Trypanosoma cruzi* fusionadas com GFP em epimastigotas de *Trypanosoma rangeli* através de gel de SDS-PAGE (A) e *Western blot* (B) com anticorpo anti-GFP.

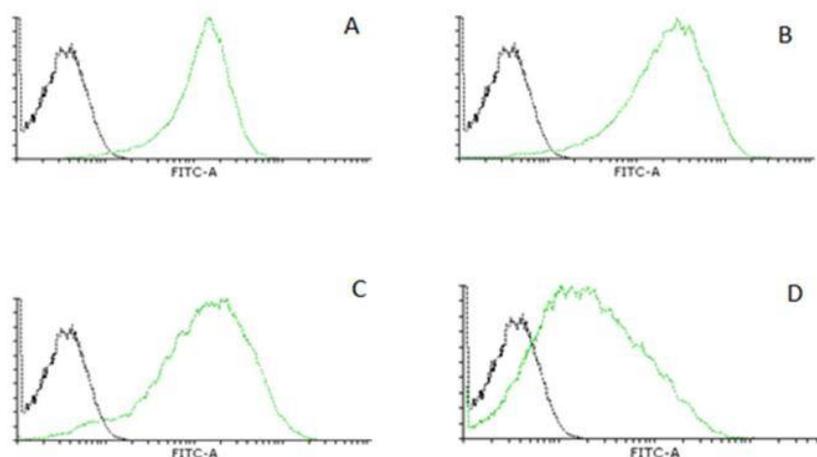
Embora fluorescentes na visualização ao microscópio, no *Western blot* não foi possível detectar a expressão da GFP em todos os extratos proteicos (Figura 22). O tamanho esperado das amastinas de *T. cruzi* quando fusionadas a GFP eram de 40 kDa para AMA40 e de 45 kDa para AMAF, AMA390 e AMA394, e 25 kDa para o controle com o plasmídeo pTREX\_GFP. Desta forma, pela presença da identificação de uma proteína de tamanho esperado somente a AMAF foi detectada fusionada a GFP.

No presente estudo foram testados diferentes métodos de extração de proteínas totais dos parasitos, e também diferentes concentrações do anticorpo primário, a fim de obter o sucesso na detecção da expressão dessas proteínas (dados não mostrados). Infelizmente não foi possível obter sucesso em nenhuma das tentativas, não sendo encontrado perfil diferente do que foi apresentado na figura 22.

Foi realizado também, um novo ensaio de *Western blot*, onde foram adicionados novos controles contra o anticorpo anti-GFP, a fim

de testar a eficácia do mesmo, sendo selecionada uma cepa de *T. rangeli* – Choachí expressando a gp82 e GFP de forma independente, sendo então possível observar a expressão do GFP apenas no extrato proteico deste parasito.

Decorridas três semanas após a transfecção, foi realizado um ensaio de citometria de fluxo para verificar a porcentagem de parasitos em cultura que estavam expressando as proteínas fusionadas a GFP. Na figura 23 é possível observar a presença da fluorescência em todas as linhagens transfectadas, sendo que exceto para a linhagem Tr\_AMA394, todas as cepas transfectadas possuíam mais de 90% dos parasitos fluorescentes.



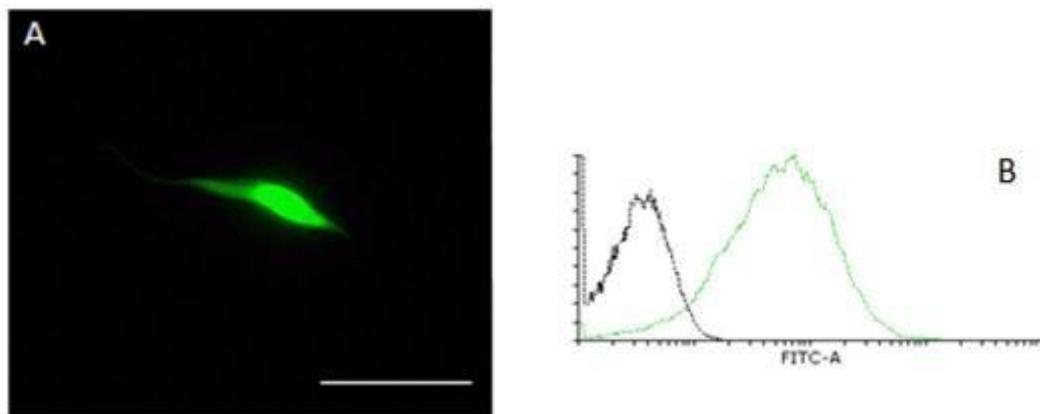
**Figura 23:** Análise quantitativa por citometria de fluxo das linhagens de *Trypanosoma rangeli* que apresentam fluorescência associada às amastinas de *Trypanosoma cruzi* fusionadas a GFP. A) Tr\_AMA40; B) Tr\_AMAF; C) Tr\_AMA390 e D) Tr\_AMA394.

### **2.5 Obtenção e avaliação de uma linhagem de *T. rangeli* superexpressando uma $\alpha$ -amastina de *T. rangeli* (Tr\_AMATR)**

Conforme descrito anteriormente foi desenvolvida uma linhagem de *T. rangeli* superexpressando uma  $\alpha$ -amastina denominada de TrAma4\_1 fusionada com a proteína verde fluorescente GFP. Esta linhagem foi também selecionada através de diferentes concentrações de G418 no meio de cultivo, a qual era incrementada à medida que os parasitos se mostravam estáveis e com boa mobilidade durante os repiques semanais.

Após a transfecção, os parasitos foram observados em microscópio de fluorescência, sendo que na figura 24-A, é possível

observar um epimastigota de *T. rangeli* com fluorescência associada a expressão da *TrAma4\_1* fusionada com a GFP. A proporção de parasitos fluorescentes e a homogeneidade da fluorescência foi também verificada utilizando citometria de fluxo (Figura 24-B). Nesta análise 95% dos parasitos apresentam fluorescência. Embora a fluorescência da GFP tenha sido detectada pela microscopia e citometria de fluxo, não foi possível evidenciar a expressão dessa proteína pela detecção com o anticorpo anti-GFP por *Western blot*. Esta nova linhagem de *T. rangeli* foi denominada de Tr\_AMATR.



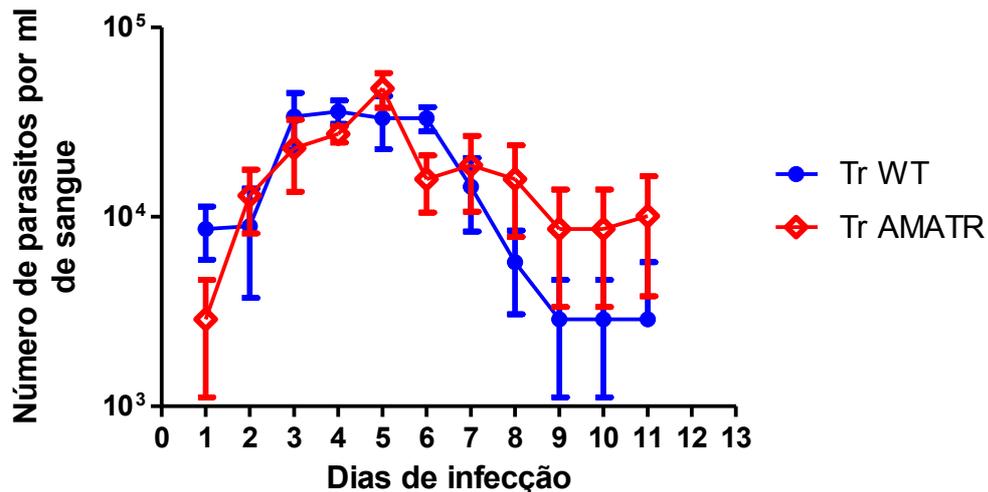
**Figura 24:** Análise da superexpressão de uma amastina de *Trypanosoma rangeli* na linhagem TrAma\_TR fusionada com a proteína verde fluorescente GFP. A) Microscopia de fluorescência (Barra: 10  $\mu$ m) e B) Citometria de fluxo.

## **2.6 Ensaio *in vivo* com parasitos da cepa Choachí de *T. rangeli* expressando amastinas de *T. cruzi* e superexpressando a *TrAma4\_1* (Tr\_AMATR) de *T. rangeli***

Para compreender melhor a dinâmica da infecção de uma cepa de *T. rangeli* superexpressando uma amastina foi realizado um ensaio *in vivo* com a infecção experimental por via intraperitoneal de camundongos Balb/C. Com isso, foram analisadas o nível e a duração da parasitemia, assim como a distribuição tissular e alterações teciduais determinadas pela presença do parasito durante a evolução experimental da infecção.

Todos os animais do grupo selvagem e do grupo transfectado apresentaram parasitemia patente com duração média de 7,5 dias conforme o determinado pela técnica de Brener (1962). O pico máximo de parasitemia de cada linhagem variou conforme pode ser observado

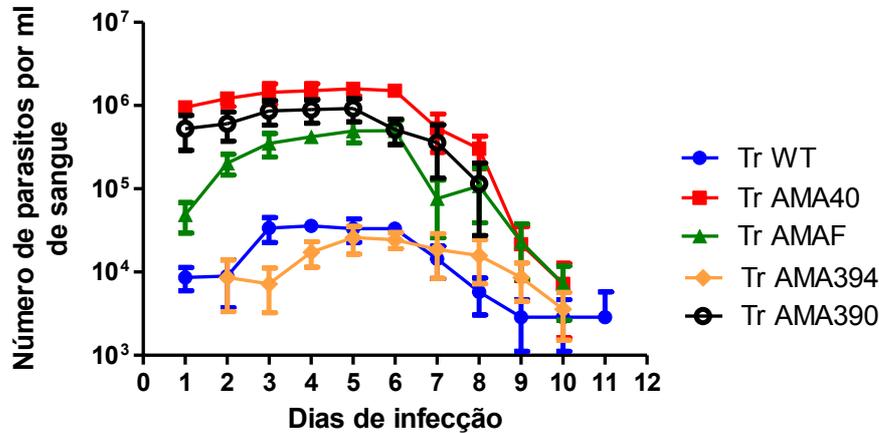
na tabela 3, sendo que para ambas as linhagens selvagem e transfectada a quantidade de parasitos foi semelhante. Desta forma, não foi possível observar diferenças no comportamento durante a infecção experimental em camundongos entre as linhagens Tr\_AMATR e Tr\_WT (figura 25).



**Figura 25:** Curva de parasitemia média em camundongos BALB/c inoculados por via peritoneal com as linhagens de *Trypanosoma rangeli* Tr\_AMATR. Os valores correspondem a média e desvio padrão da parasitemia de cinco animais por grupo, inoculados com  $5 \times 10^6$  tripomastigotas de *T. rangeli*. A cepa Choachí selvagem foi utilizada como controle (Tr\_WT).

Todos os grupos de camundongos infectados com as diferentes linhagens de *T. rangeli* expressando as amastinas de *T. cruzi* apresentaram parasitemia sanguínea, com um período patente médio de sete dias. Com exceção de um único animal infectado com a linhagem Tr\_AMA390 que não apresentou parasitemia, todos os animais dos demais grupos apresentaram exame de sangue a fresco positivo (ESF+). Na figura 26 é possível observar as curvas de parasitemia obtidas que descrevem a evolução da infecção experimental em camundongos. Os animais infectados com a linhagem Tr\_AMA40 apresentaram o maior número de parasitos,  $1,588 \times 10^6$  parasitos/ml de sangue, quando comparado com as demais linhagens de *T. rangeli* expressando diferentes amastinas de *T. cruzi* e o grupo controle selvagem. A média do valor do pico máximo de parasitos foi semelhante entre os grupos de animais infectados com as linhagens Tr\_AMA 40, Tr\_AMAF e Tr\_AMA390. Os animais infectados com Tr\_WT e Tr\_AMA394

apresentaram um número médio de parasitos menor, como demonstrado a curva de parasitemia, no entanto, essas diferenças não foram significativas.



**Figura 26:** Curva de parasitemia em camundongos BALB/c inoculados via peritoneal com as linhagens de *Trypanosoma rangeli* expressando as amastinas AMA40, AMAF, AMA 394 e AMA390 de *Trypanosoma cruzi*. Os valores correspondem a média e desvio padrão da parasitemia de cinco animais por grupo, inoculados com  $5 \times 10^6$  tripomastigotas das diferentes linhagens de *T. rangeli*. A cepa Choachí selvagem foi utilizada como controle (Tr\_WT).

Quando foram analisados os diversos parâmetros parasitológicos e de detecção molecular na tabela 3 podemos observar que não houveram diferenças entre a evolução da infecção experimental tanto dos animais infectados com a cepa de *T. rangeli* expressando TrAMA4\_1 quanto para o grupo controle para os seguintes parâmetros analisados: exame de sangue a fresco, período patente, pico máximo de parasitemia, dia de pico máximo e porcentagem de PCR positivo.

**Tabela 3:** Avaliação comparativa da parasitemia e da detecção tissular e sanguínea do *Trypanosoma rangeli* superexpressando a amastina TrAma4\_1 (Tr\_AMATR) em sangue e tecidos de camundongos experimentalmente infectados.

Parâmetros		Tr_WT	Tr_AMATR
ESF+ <sup>1</sup>		5/5	5/5
PP <sup>2</sup>		7,8	7,6
Pmax <sup>3</sup>		36.000	47.520
Dpmax <sup>4</sup>		4° dia	5° dia
PCR+SG <sup>5</sup>	5°dpi <sup>7</sup>	2/2	2/2
	15°dpi <sup>8</sup>	3/3	3/3
PCR+TC <sup>6</sup>	5°dpi	6/12	8/12
	15°dpi	10/18	13/18

<sup>1</sup>ESF+: exame de sangue a fresco positivo, <sup>2</sup>PP: período patente (parasitos/ml sangue), <sup>3</sup>Pmax: pico máximo de parasitemia (parasitos/ml sangue), <sup>4</sup>Dpmax: dia de pico máximo, <sup>5</sup>PCR+SG: PCR positiva de sangue, <sup>6</sup>PCR+TC: PCR positiva dos tecidos, <sup>7</sup>5°dpi: 5° dia pós infecção, <sup>8</sup>15°dpi: 15° dia pós infecção.

Quando os mesmos parâmetros foram analisados para a evolução da infecção experimental de animais infectados com *T. rangeli* expressando diferentes amastinas de *T. cruzi* podemos observar com base nos resultados apresentados na tabela 6, é possível observar diferenças no comportamento durante a infecção experimental em camundongos entre as linhagens, e é possível observar que as linhagens Tr\_AMA40, Tr\_AMAF e Tr\_AMA390 apresentaram uma grande diferença da cepa selvagem principalmente em relação pico máximo de parasitemia, que indica uma maior quantidade de parasitos circulantes na corrente sanguínea desses animais em relação ao controle.

Na tabela 4, podemos também observar resultados referentes a porcentagem de PCR positivas, tanto para sangue quanto para tecido, nas diferentes fases da infecção analisadas. Quando analisadas por PCR convencional, as amostras de sangue de todos os animais apresentaram-se positivas, com exceção de um animal da linhagem Tr\_AMA390 e um da Tr\_AMA394 que também não apresentaram exame de sangue a fresco positivo. Quando foram analisados os demais tecidos dos animais por PCR convencional, tanto no 5° dia de infecção, quanto no 15° dia de infecção sendo que foi observado que no 5° dpi a relação de

tecidos positivos para PCR foi maior que negativos, diferente do 15º dpi, que foram observados um maior número de tecidos com PCR negativa. Esses resultados são pioneiros no estudo da evolução experimental com *T. rangeli* expressando uma família de proteínas essencial para o estabelecimento da infecção tecidual do *T. cruzi* como as amastinas, pois apesar do pouco conhecimento sobre as mesmas, sabe-se que elas são importantes para a evolução da infecção do *T. cruzi*.

**Tabela 4:** Avaliação comparativa da parasitemia e da detecção tissular e sanguínea do *Trypanosoma rangeli* expressando diferentes amastinas de *Trypanosoma cruzi*: Tr\_AMA40, Tr\_AMAF, Tr\_AMA390 e Tr\_AMA394 em sangue e tecidos de camundongos experimentalmente infectados.

Parâmetros	Tr WT	Tr AMA40	Tr AMAF	Tr AMA390	Tr AMA394
ESF+ <sup>1</sup>	5/5	5/5	5/5	4/5	5/5
PP <sup>2</sup>	7,8	8,2	6,8	7	6
Pmax <sup>3</sup>	36.000	1.588.320	499.680	923.040	25.920
Dpmax <sup>4</sup>	4º dia	5º dia	6º dia	5º dia	5º dia
PCR+SG <sup>5</sup>	5ºdpi <sup>7</sup>	2/2	2/2	2/2	1/2
	15ºdpi <sup>8</sup>	3/3	3/3	2/3	2/3
PCR+TC <sup>6</sup>	5ºdpi	6/12	10/12	12/12	12/12
	15ºdpi	10/18	6/18	8/18	9/18

<sup>1</sup>ESF+: exame de sangue a fresco positivo, <sup>2</sup>PP: período patente (parasitos/ml sangue), <sup>3</sup>Pmax: pico máximo de parasitemia (parasitos/ml sangue), <sup>4</sup>Dpmax: dia de pico máximo, <sup>5</sup>PCR+SG: PCR positivo de sangue, <sup>6</sup>PCR+TC: PCR positivo dos tecidos, <sup>7</sup>5ºdpi: 5º dia pós infecção, <sup>8</sup>15ºdpi: 15º dia pós infecção.

Na tabela 5, podemos observar os resultados referentes ao ensaio de PCR convencional para detecção de parasitos nos tecidos de camundongos inoculados experimentalmente durante duas fases da infecção: 5º dpi e 15º dpi. Como é possível observar abaixo, apenas o músculo esquelético e intestino grosso de animais infectados com Tr\_WT no 15º dpi não apresentaram nenhum tecido positivo para PCR. Ára todos os demais tecidos analisados houve pelo menos um representante dos dois analisados para cada fase da infecção positivos para análise de PCR.

**Tabela 5** – Detecção de *Trypanosoma rangeli* por PCR convencional utilizando os iniciadores S35 e S36 em amostras de tecidos de camundongos BALB/c infectados com a linhagem de *Trypanosoma rangeli* superexpressando a amastina *TrAma4\_1* (Tr\_AMATR) em dois diferentes tempos da infecção (5° e 15° dpi). NE representa amostras negativas.

Tecido	5° dpi		15° dpi	
	Tr WT	Tr AMATR	Tr WT	Tr AMATR
Coração	1/2	1/2	2/3	1/3
Baço	2/2	1/2	2/3	2/3
Músculo Esquelético	1/2	1/2	NE	1/3
Linfonodo Inguinal	1/2	1/2	1/3	1/3
Tecido Adiposo	1/2	1/2	1/3	1/3
Intestino Grosso	2/2	2/2	NE	2/3
Intestino Delgado	2/2	2/2	1/3	2/3

Quanto às análises qualitativas de PCR convencional dos tecidos dos camundongos infectados com as diferentes linhagens de *T. rangeli* foi possível observar que no 5° dpi todos os tecidos analisados em pelo menos um dos camundongos de cada grupo o resultado foi positivo. No 15° dpi, apesar da positividade dos tecidos para a reação ainda ser alta, apenas a linhagem transfectante Tr\_AMA394 teve PCR positiva para todos os tecidos analisados em pelo menos um dos animais infectados. Na tabela 6, é possível observar com detalhes as informações citadas acima.

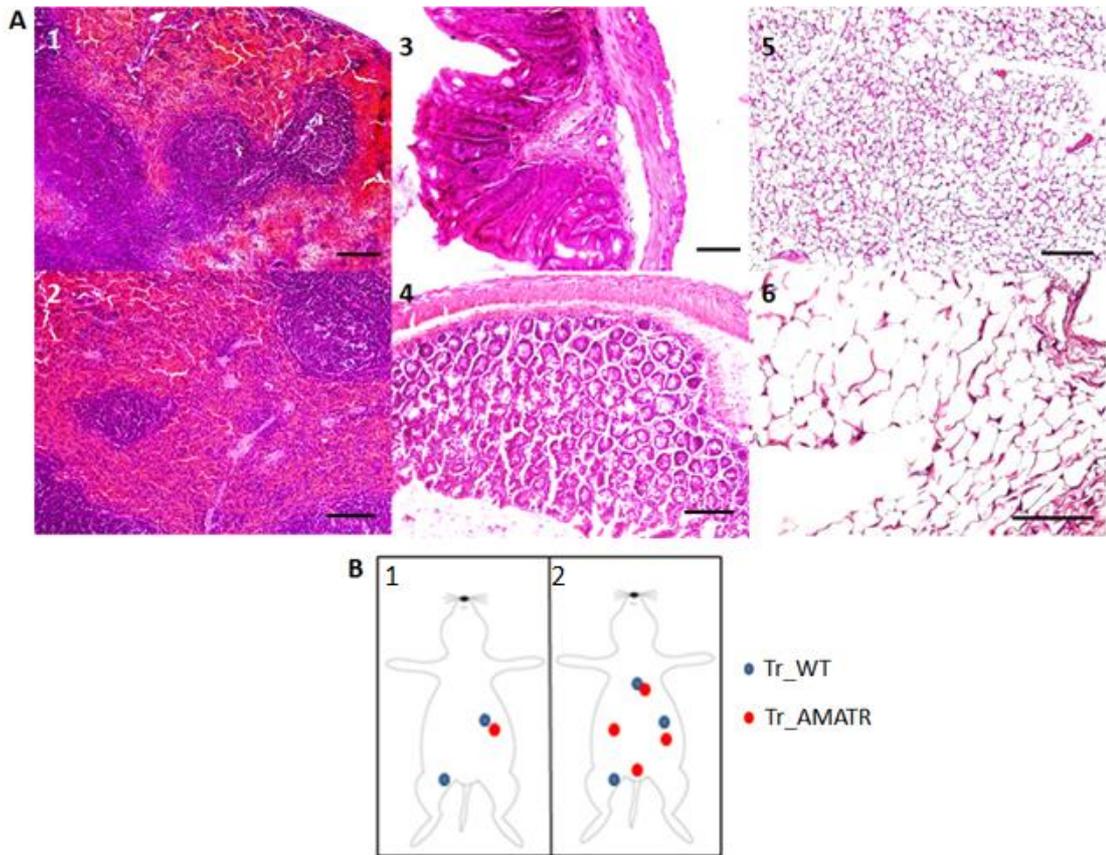
**Tabela 6** – Detecção de *Trypanosoma rangeli* por PCR convencional utilizando os iniciadores S35 e S36 em amostras de tecidos de camundongos BALB/c infectados com diferentes linhagens de *T. rangeli* expressando amastinas de *Trypanosoma cruzi*. NE representa amostras negativas.

Tecido	5° dpi						15° dpi			
	Tr WT	Tr AMA40	Tr AMAF	Tr AMA390	Tr AMA394	Tr WT	Tr AMA40	Tr AMAF	Tr AMA390	Tr AMA394
Coração	1/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/3	1/3	1/3	1/2	1/3
Baço	2/2	1/2	2/2	2/2	2/2	2/3	NE	1/3	NE	2/3
Músculo Esqueletico	1/2	1/2	NE	2/2	2/2	NE	2/3	1/3	1/2	2/3
Linfonodo Inguinal	1/2	1/2	2/2	2/2	2/2	1/3	1/3	NE	1/2	2/3
Tecido Adiposo	1/2	1/2	2/2	2/2	2/2	1/3	1/3	NE	1/2	2/3
Intestino Grosso	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	NE	1/3	1/3	1/2	1/3
Intestino Delgado	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	1/3	1/3	2/3	1/2	1/3

Com base nos resultados das análises histopatológicas dos tecidos de camundongos infectados experimentalmente com Tr\_AMATR e Tr\_WT foi possível observar alterações inflamatórias apenas no baço, onde foi observada uma hiperplasia da região linfocítica, caracterizando o aumento de linfócitos no órgão. Para os demais tecidos analisados, para ambos grupos experimentais; coração, musculatura esquelética, linfonodos, tecido adiposo e intestinos grosso e delgado não foi possível observar alterações referentes a presença de processo inflamatório ou quanto a presença de formas amastigotas.

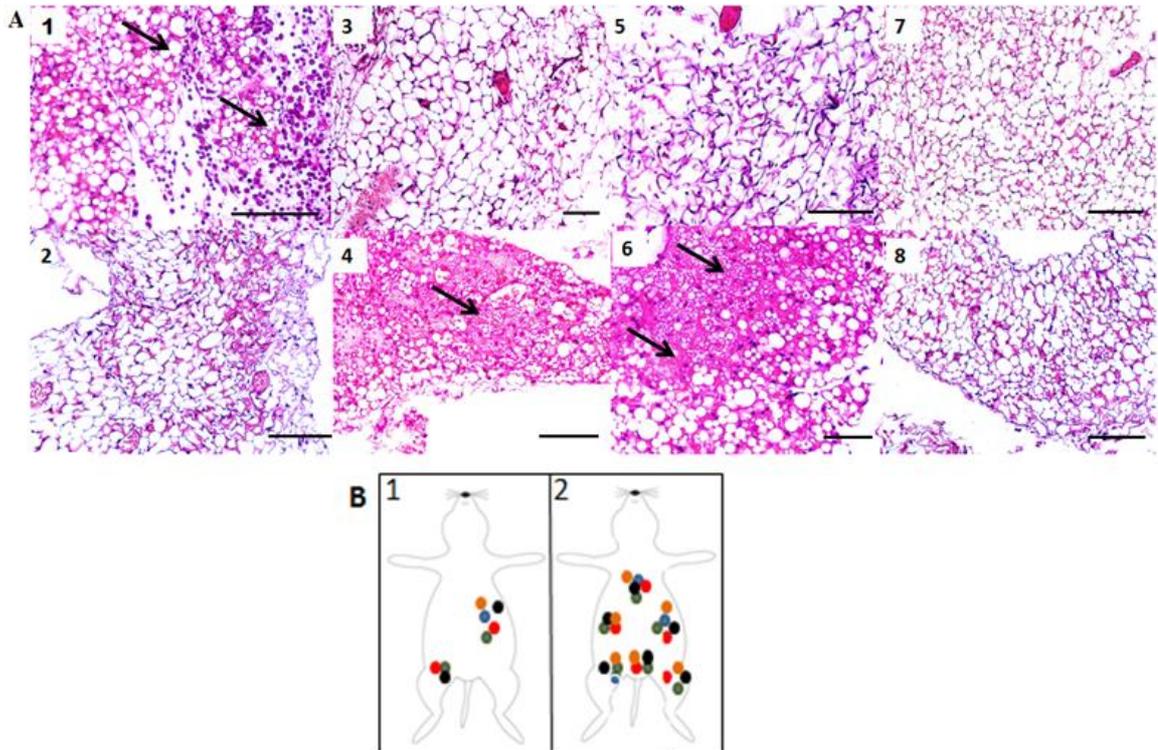
A partir das análises histopatológicas dos tecidos das diferentes linhagens transfectadas de *T. rangeli*, não foi possível observar alterações quanto a presença de processo inflamatório na maioria dos tecidos, com a exceção do baço e do tecido adiposo e não foi observada a presença de ninhos de amastigotas em nenhum dos tecidos analisados. Para o baço, para todas as linhagens foi possível observar uma hiperplasia da região linfocítica, caracterizando o aumento de linfócitos no órgão em ambas as fases da infecção analisadas. Para o tecido adiposo foi possível observar a presença de exsudato inflamatório de intensidade moderada para as linhagens: Tr\_AMA40, Tr\_AMAF e Tr\_AMA394, sendo que para a linhagem Tr\_AMA40 foram observadas alterações com cinco dias de infecção, enquanto que para Tr\_AMAF e TR\_AMA394 essas alterações foram percebidas durante somente com 15 dias de infecção.

Na figura 27, é possível ter um panorama geral da evolução da infecção experimental de animais infectados com Tr\_AMATR e Tr\_WT, onde encontram-se demonstrados resultados referente as análises histopatológicas e dados de detecção molecular dos parasitos. Para as análises histopatológicas as imagens mostram uma visão geral da infecção, onde apenas o baço apresentou alterações inflamatórias enquanto que os outros tecidos encontraram-se preservados, como por exemplo, no intestino grosso onde é possível observar o órgão preservado, com uma camada muscular íntegra.



**Figura 27:** Análises histopatológicas de secções de diferentes tecidos de animais inoculados com as cepas de *Trypanosoma rangeli* transfectada e selvagem. **A:** Amostras de diferentes tecidos corados por HE de animais infectados com Tr\_AMATR e Tr\_WT no 15º dpi, sendo **1:** baço de animais infectados com Tr\_AMATR, **3:** intestino grosso de animais infectados com Tr\_AMATR e **5:** tecido adiposo de animais infectados com Tr\_AMATR; **2:** baço de animais infectados com Tr\_WT, **4:** intestino grosso de animais infectados com Tr\_WT e **6:** tecido adiposo de animais infectados com Tr\_WT; **B)** Tecidos com alterações histopatológicas (**1**) e com detecção de DNA dos parasitos por PCR convencional (**2**).

Na figura 28, é possível observar de forma detalhada essas alterações teciduais referentes à presença de infiltrado inflamatório no tecido adiposo dos comundongos infectados com Tr\_AMA40, Tr\_AMAF e Tr\_AMA394 (destacadas pelas setas). Ainda na mesma figura é possível realizar uma comparação entre os tecidos com alterações nas análises histopatológicas e com detecção de DNA do parasito a partir de PCR convencional.



**Figura 28:** Alterações teciduais nos camundongos infectados com distintas linhagens de *Trypanosoma rangeli* expressando diferentes amastinas de *T. cruzi*. **A)** Análises histopatológicas de secções de tecido adiposo corados por HE. **1 e 2:** Tecido adiposo de animais infectados com Tr\_AMA40, sendo 1) 5º dpi e 2) 15º dpi; **3 e 4:** Tecido adiposo de animais infectados com Tr\_AMAF, sendo 3) 5º dpi e 4) 15º dpi; **5 e 6:** Tecido adiposo de animais infectados com Tr\_AMA394, sendo 5) 5º dpi e 6) 15º dpi; **7:** Tecido adiposo de animais infectados com Tr\_AMA390 com 5º dpi; **8:** Tecido adiposo de animais infectados com Tr\_WT 5º dpi. **B)** Tecidos com alterações histopatológicas (1) e com detecção de DNA dos parasitos por PCR convencional (2).

### 3 - DISCUSSÃO

O ciclo de vida do *T. rangeli*, bem como de outros tripanosomatídeos, está diretamente relacionado com suas características gênicas e a regulação desses genes. Sabe-se que existem diversas proteínas e interações entre as mesmas que regulam tanto a capacidade de sobrevivência quanto a possibilidade de alternância entre hospedeiros que possibilitam a realização bem-sucedida do ciclo biológico do parasito. Dentre essas proteínas incluem-se as amastinas, entretanto, até o presente momento pouco se sabe sobre o papel delas tanto em *T. cruzi*, quanto em *T. rangeli*.

Os genes que codificam para as amastinas estão presentes tanto no *T. rangeli* quanto no *T. cruzi*, e de forma diferente entre eles. Com a necessidade em se entender melhor a respeito do comportamento do *T. rangeli*, Stoco e colaboradores (2014) realizaram um estudo acerca do genoma desse parasito e observaram características importantes que os diferenciam geneticamente do *T. cruzi*. A partir do estudo do genoma do *T. rangeli* quando comparado ao *T. cruzi*, foi possível observar uma grande diferença no número de cópias de diferentes genes entre esses dois parasitos. As amastinas foram então uma família de proteínas que chamou a atenção devido a grande diferença de número de cópias entre os dois parasitos, enquanto que para *T. cruzi* foram identificados até o presente momento 27 cópias, para *T. rangeli* um estudo preliminar identificou aproximadamente 72 cópias no genoma diplóide.

Inicialmente, com o objetivo de verificar o número de cópias dos genes referentes às amastinas presentes no genoma do *T. rangeli* foi realizada o *Southern Blot* foi observado para o gene TrAma4\_1 quando digerido com a enzima *EcoRI*, que não possui o sítio de clivagem dentro da região da sonda foi observada a detecção de três bandas. Enquanto que, para as digestões com as enzimas *SacII*, *SphI*, *TaqI*, as quais possuem um sítio de clivagem dentro da região da sonda, foi observado o reconhecimento de diversas bandas compatível com a presença de múltiplas cópias do gene. Já para o gene TrAma7\_1 quando digerido com a enzima *EcoRI*, que não possui o sítio de clivagem dentro da região da sonda foi observada a detecção de apenas uma banda.

Com base nos resultados obtidos através do *Southern blot*, é possível observar que ao menos um dos dois genes de amastina avaliados apresenta um padrão de multicópias no genoma, mas a resolução das bandas não proporcionou uma estimativa mais apurada do número de

cópias em questão. Acreditamos que essa má resolução se deve pelo DNA não ter sido totalmente digerido pelas enzimas utilizadas, o que poderia causar uma confusão na interpretação dos resultados, sugerindo um número de cópias diferente do real. Outro fator limitante para a precisa identificação no número de cópias pode ser a possível presença de cópias em tandem do gene, uma vez que apareceram bandas com diferentes intensidades.

Assim, optamos por realizar duas abordagens para identificar o número de cópias dos genes de amastinas no genoma do *T. rangeli*: novas análises *in silico* e ensaios de qPCR. Durante uma nova análise *in silico* foram então identificadas 42 cópias do gene amastina, 21 em cada genoma haploide desse parasito. Dessas 21 cópias, 17 genes encontram-se íntegros e quatro foram então identificados como sendo pseudogenes, ou seja, apresentam um códon de parada no meio da sequência gênica. Para validar esses resultados encontrados nas análises *in silico* e esclarecer a real quantidade do número de cópias desses genes foi então realizado um ensaio para quantificação absoluta de cópias das amastinas de *T. rangeli*. Os resultados esses que corroboram com os encontrados nas análises *in silico*, confirmando o perfil multicópias de *TrAma4\_1* e cópia única para o gene *TrAma7\_1*.

Esses resultados são consequência ainda de uma análise preliminar dessa nova montagem do genoma de *T. rangeli*, sendo que, com a finalização da estrutura organizacional desse genoma, pode ocorrer ainda uma alteração da quantificação do número de cópias referente as amastinas. Essa nova montagem pode até mesmo se aproximar da contagem inicial observada por Stoco e colaboradores (2014), visto que, *in silico* foram observadas 6 cópias do gene *TrAma4\_1* e para a quantificação por qPCR foram encontradas 10 cópias.

Segundo Jackson (2010), para *T. cruzi* existem 12 genes (Seis em cada genoma haploide) anotados como amastinas e localizadas em três cromossomos diferentes. Entretanto em 2013, Kangusso-Marcolino e colaboradores, através de uma nova análise dos bancos de dados existentes encontrou um total de 14 cópias do gene de amastina, dados esses que conferem com a análise realizada por Franzen e colaboradores (2011), que encontrou o mesmo número de cópias de amastinas presentes no genoma da cepa Sylvio X-10 de *T. cruzi*. Em *Leishmania* sp., é observada uma grande diversificação para as amastinas, em 2005, Rochette e colaboradores publicaram um estudo onde, através de análises *in silico*, especialmente com base nos dados contidos no banco de dados GeneDB, encontraram para *L. major* 55 cópias e para *L. infantum* 37 cópias de amastinas no genoma. Para *L. brasiliensis* foram

encontradas 52 cópias dos genes de amastinas no genoma (PAIVA *et al.*, 2015).

Analisando dados internos e presentes no TriTrypDB (2017) observamos que de forma organizacional, as amastinas de *T. rangeli* encontram-se localizadas em quatro *scaffolds* diferentes, sendo em *T. cruzi*, correspondente a três cromossomos (JACKSON, 2010; KANGUSSO-MARCOLINO *et al.*, 2013). Já em *Leishmania* sp., para diferentes espécies são observados padrões diferentes na distribuição dos genes de amastinas nos diferentes cromossomos do genoma destes parasitos. Para *L. major*, os genes de amastinas encontram-se divididos em sete cromossomos diferentes, enquanto que para *L. infantum*, os genes de amastinas encontram-se organizados em repetições *in tandem* num mesmo cromossomo (ROCHETTE *et al.*, 2005; JACKSON, 2010). Para *T. rangeli*, ainda é cedo para considerar esses *scaffolds* como cromossomos, visto que, por exemplo, o tamanho do *scaffold* 1 provavelmente corresponde a mais de um cromossomo. Entretanto, ainda sim é possível relacionar esses *scaffolds* de *T. rangeli* com os cromossomos de *T. cruzi* e observar as regiões de sintenia entre o genoma desses dois parasitos.

Através de uma análise detalhada das prováveis ORF e das sequências aminoacídicas preditas das amastinas, foi possível observar a presença de quatro pseudogenes. Dentre esses, destacamos o gene denominado de TrAma7\_1, que possui um códon de parada no meio da sua sequência, sendo considerado um gene truncado, já que a região C-terminal que está presente na sequência ortóloga em *T. cruzi* não será expressa nesta amastina de *T. rangeli*.

A confirmação da presença do códon de parada nesse gene de amastina é um importante achado deste estudo. Sabe-se que as amastinas possuem quatro domínios transmembrana e duas regiões extracelulares hidrofílicas, que conferem a localização como uma proteína de membrana. Para TrAma7\_1-frag, a ausência da região C-terminal na proteína resultante implica na perda de duas das quatro regiões transmembrana.

Ao avaliar os dados referentes ao genoma do *T. rangeli* pode-se observar que este tripanosomatídeo tem a característica de apresentar diversos pseudogenes. Como exemplo, ao pesquisar por ortólogos de componentes da maquinaria de RNA de interferência (RNAi) foi descoberto que quatro dos cinco genes relacionados a RNAi em *T. brucei* estão presentes no genoma do *T. rangeli* como pseudogenes, pois estes apresentavam um ou mais códons de parada ao longo das sequências relacionados a mudanças na janela de leitura

(STOCO *et al.*, 2014). Romero *et al.*, (2015) identificou que o gene da cisteína sintase de *T. rangeli* também apresentava-se como pseudogene, além de apresentar diversas mutações em domínios específicos.

Conforme descrito anteriormente, sabe-se que as amastinas dividem-se em diferentes subfamílias e que sua função até o presente momento encontra-se relacionada com essa família em questão. Com base nessas informações foram então realizados estudos detalhados a respeito dessas ORF de amastinas de *T. rangeli* tendo como finalidade identificar regiões de domínio e transmembrana e com isso classificar as mesmas dentro das subfamílias identificadas.

Com o objetivo de categorizar as amastinas identificadas em *T. rangeli* nas subfamílias descritas na literatura ( $\alpha$ ,  $\beta$ 1/2,  $\delta$  e  $\gamma$ ), foi realizada uma classificação interna em 7 diferentes grupos baseado nas similaridades entre elas mesmas. A classificação desta família gênica das amastinas está relacionada à conservação das regiões hidrofílicas e hidrofóbicas, associação a outros genes (por exemplo, a tuzina) e a fase do ciclo biológico em que a proteína é expressa em maior quantidade (TEIXEIRA *et al.*, 1994; JACKSON, 2010; KANGUSSO-MARCOLINO *et al.*, 2013).

Em 2005, Rochete e colaboradores realizaram a caracterização dos genes de amastinas de *Leishmania* sp. e determinaram através de um alinhamento incluindo diversas sequências de amastinas que, dada a conformação estrutural dessas proteínas, elas seriam classificadas como transmembranares. A região delimitada entre as duas cisteínas, na região hidrofílica, é altamente conservada entre todos os genes homólogos de amastina em *Leishmania* spp. e *Trypanosoma* spp., sendo exclusivo para esta família de proteínas e considerada a assinatura da amastina (ROCHETE, *et al.*, 2005).

Em relação ao *T. cruzi*, foi proposto inicialmente que as amastinas estavam divididas em duas subfamílias: as  $\delta$  e as  $\beta$ -amastinas. As  $\delta$ -amastinas, encontram-se subdivididas em dois subgrupos, sendo que no maior ramo estão as amastinas descritas por Teixeira e colaboradores, (1994), cujos genes estão agrupados sequencialmente no genoma intercalados pelos genes de tuzina. No ramo menor das  $\delta$ -amastinas, encontra-se os genes de amastinas de cópia única no genoma, que apresentam cerca de 50% de similaridade com as demais  $\delta$ -amastinas, e estão acompanhados por um pseudogene de tuzina. Este subgrupo de  $\delta$ -amastinas foi denominado  $\delta$ -Ama40/50 (KANGUSSO-MARCOLINO *et al.*, 2013).

Uma maior divergência foi encontrada para as  $\beta$ -amastinas, que diferem bastante entre si, e de forma semelhante ao observado em

*Leishmania* sp., estes genes foram subdivididos em  $\beta$ 1-amastinas e  $\beta$ 2-amastinas, e encontram-se arranjados em sequência (em *tandem*) no genoma de CL Brener e Sylvio X-10 (KANGUSSO-MARCOLINO *et al.*, 2013).

Jackson em 2010, descreveu as  $\alpha$ -amastinas como sendo de 35 a 64% mais longas em referência ao tamanho que as demais amastinas, com três a 10 hélices transmembranares na extremidade N-terminal, sem peptídeo sinal e expressas constitutivamente. Outra informação importante é que esta é a única subfamília de amastinas presentes em *T. brucei*, esta que, curiosamente, está intimamente ligada com o estágio amastigota no ciclo de vida. Acredita-se então que das  $\alpha$ -amastinas, evolutivamente surgiram as demais subfamílias.

Em 2015, Paiva *et al.* realizaram alinhamentos múltiplos de sequências de amastinas de *L. braziliensis*, *L. infantum* e *T. cruzi*, e demonstraram uma conservação significativa em estruturas previstas entre os diferentes membros da família. As quatro regiões transmembranares preditas são altamente conservadas e mostram alta similaridade de sequência entre as amastinas da mesma subfamília. Já os dois domínios hidrofílicos extracelulares, apresentam um aumento da variabilidade, usualmente relacionado com a subfamília em que estão classificados. Os resultados apresentados por estes autores reforçam a classificação estabelecida para as amastinas de *T. rangeli* com base no alinhamento destas sequências e demais representantes das diferentes subfamílias.

A fim de aproximar a classificação das amastinas de *T. rangeli* em subfamílias foram realizadas análise *in silico* e também uma análise filogenética das sequências encontradas citadas anteriormente. Foi então observado que das 21 cópias de amastinas identificadas no genoma estavam subdivididas em três famílias diferentes:  $\delta$ ,  $\beta$  e  $\alpha$  amastinas, conforme já havia sido descrito por Stoco e colaboradores em 2014. Dos quatro pseudogenes encontrados, dois estão classificados como  $\beta$ -amastinas e dois como  $\delta$ -amastinas. Dentre as duas sequências gênicas de amastinas utilizadas neste estudo, observamos então que a sequência de TrAma7\_1 de *T. rangeli* foi classificada como sendo pertencente da subfamília  $\beta$ . Já a TrAma4\_1 foi classificada como sendo uma  $\alpha$ -amastina. Com sabe nas informações encontradas pudemos observar que as  $\delta$ -amastinas de *T. rangeli*, assim como as demais encontram-se intercaladas por genes de tuzina in tandem no *scaffold* referente.

Atualmente, diversos estudos referentes às amastinas de *T. cruzi* e demais tripanosomatídeos encontram-se em andamento, principalmente da classificação das mesmas, já que os dados existentes ainda são recentes e suscetíveis a mudanças. Até 2013, imaginava-se que existiam apenas duas subfamílias de amastinas para o *T. cruzi*, as  $\beta$  e  $\delta$ -amastinas, Lemos e colaboradores (2014), identificaram a presença de duas  $\alpha$ -amastinas no genoma de *T. cruzi*, e estudos estão sendo realizados para caracterizar essas proteínas funcionalmente e biologicamente.

Para entender melhor como funcionam as amastinas de *T. rangeli*, selecionamos uma  $\beta$  e uma  $\alpha$ -amastina: *TrAma7\_1* (pseudogene) e *TrAma4\_1* respectivamente e analisamos tanto o nível de produção de RNAm quanto o de proteína expressa de ambas. Com base nos resultados observamos então que os níveis de transcritos para o gene que codifica uma  $\alpha$ -amastina *TrAma4\_1* foi, em números brutos, maior que os níveis de transcritos encontrados para o pseudogene da  $\beta$ -amastina *TrAma7\_1*, não havendo diferenças significativas. Quando comparamos a transcrição destes genes entre as formas evolutivas em separado, pudemos observar então que tanto para epimastigotas quanto para tripomastigotas houve diferença significativa nos níveis de expressão, sendo notadamente maiores para epimastigotas do que para tripomastigotas.

Em 1994, Teixeira e colaboradores avaliaram os níveis de transcritos de uma amastina na cepa Tulahuén de *T. cruzi* através da técnica de *Southern Blot* em três estágios evolutivos do parasito: amastigotas, epimastigotas e tripomastigotas. Neste ensaio observaram que na forma evolutiva amastigota os níveis de transcritos eram até 50 vezes mais expressos do que em epimastigotas e tripomastigotas, concluindo assim que as amastinas eram proteínas com relação estágio evolutivo específico e que provavelmente desempenhavam um importante papel no ciclo evolutivo do parasito. Através de ensaios de *Southern blot* de 20 genes homólogos de amastinas, em diferentes fases do ciclo de vida de *L. infantum*, foi constatado que 17 deles foram expressos apenas em amastigotas axênicos, um em promastigotas e dois desses homólogos foram expressos em ambos estágios evolutivos. Com isso, concluíram então que a produção dos níveis de transcritos estava também relacionada com a forma amastigota do parasito e a consideraram estágio específica em *L. infantum* e *L. brasiliensis* (ROCHETTE et al, 2005, PAIVA et al., 2015)

Cruz e colaboradores, em 2012, analisaram através de qPCR, os níveis de transcritos das  $\delta$ -amastinas de duas diferentes cepas de *T.*

*cruzi*: CL Brener e G. Observaram os autores que para cepa CL Brener o padrão de produção de RNAm foi igual ao observado anteriormente por Teixeira e colaboradores (1994), sendo maior para a forma amastigota do que para epimastigotas e tripomastigotas, já para a cepa G, esse padrão não foi observado. Assim, além de atribuírem uma característica estágio específica para esses níveis de RNAm encontrados relacionaram os mesmos com a infectividade da cepa, já que é bem detalhado que a cepa G de *T. cruzi* possui baixa capacidade infectiva. Em 2013, Kangussu-Marcolino e colaboradores avaliaram os níveis de transcritos de quatro diferentes amastinas, pertencentes as subfamílias  $\beta$  e  $\delta$  em diferentes cepas de *T. cruzi* (clone Sylvio X-10, cepa Colombiana, cepa G, clone Dm28c, cepa Y, clone CL Brener) para epimastigotas, tripomastigotas e amastigotas. Como resultado, para as  $\beta$ -amastinas, observaram uma produção maior de transcritos para parasitos na forma evolutiva epimastigotas, corroborando com dados já observados por Minning e colaboradores, 2009. Para as  $\delta$ -amastinas o resultado se repete e em todas as cepas analisadas, com exceção da cepa G, os níveis de transcritos foram maiores em amastigotas.

Essa grande variação nos padrões de produção de níveis de transcritos de diferentes subfamílias de amastinas, nas diferentes cepas de diferentes tripanosomatídeos nos levou a tentar compreender mais sobre essa família gênica. Em tripanosomatídeos já é bem esclarecido que os níveis de transcritos de determinado gene não são diretamente relacionados aos níveis de expressão da determinada proteína correspondente em função da regulação pós-transcricional (TEIXEIRA, 1998, TEIXEIRA, DAROCHA, 2003).

Buscando compreender a função das amastinas em *T. rangeli*, realizamos ensaios de *Western blot* utilizando soros anti-amastina do parasito produzidos a partir de peptídeos sintéticos desenhados a partir de genes de amastinas pertencentes às subfamílias  $\beta$  e  $\alpha$ . Inicialmente, tentamos realizar a expressão heteróloga de duas diferentes amastinas de *T. rangeli* em bactérias: *TrAma7\_1* e *TrAma4\_1*, não sendo possível observar qualquer expressão em diferentes ensaios realizados em diferentes condições e tipos de células escolhidas. Não existe até o momento estudos que realizaram a expressão heteróloga da proteína amastina em bactérias ou outros hospedeiros e Teixeira e colaboradores, em 1994, tentaram expressar amastinas de *T. cruzi* em bactérias e não obtiveram sucesso, sendo que à época, observaram que após a indução com IPTG ocorria a morte das bactérias, o que os levou a concluir que a expressão das mesmas podia ser tóxica para *E. coli*.

Através do ensaio de *Western blot* contra as duas amastinas de *T. rangeli*: TrAma7\_1 (pseudogene) e TrAma4\_1, observamos então apenas a expressão da  $\alpha$ -amastina TrAma4\_1 idêntica para as duas formas evolutivas dos parasitos analisadas: epimastigotas e tripomastigotas. Para essas duas amastinas de *T. rangeli* em questão analisadas, observamos que o pseudogene TrAma7\_1 é transcrito porém não expresso nos parasitos, tanto na forma epimastigota quanto tripomastigota e que, para a amastina TrAma4\_1, apesar dos níveis de transcritos serem diferentes entre epimastigotas e tripomastigotas (maior em epimastigotas), quando analisamos os níveis de proteína expressa não houve diferença entre as duas formas evolutivas. Esse resultado serve então para dar início aos estudos acerca dessa variada família multigênica de proteínas em *T. rangeli*.

Não existem dados acerca dos níveis de expressão das amastinas em outros tripanosomatídeos além, de *T. rangeli*, porém, Paiva e colaboradores (2015), realizaram ensaios de *knockout* em  $\delta$ -amastinas de *L. brasiliensis* e observaram que durante uma infecção *in vitro* de macrófagos os parasitos apresentaram crescimento prejudicado e não foi possível levar a infecção à frente. Este é um estudo importante, pois reforça os achados anteriores de Cruz e colaboradores (2015) que também relacionaram as  $\delta$ -amastinas com a capacidade infectiva de *T. cruzi*. Com esses dois estudos, fica cada vez mais clara a importância em se aprofundarem os estudos acerca das amastinas nos tripanosomatídeos e entender o seu papel no estabelecimento do ciclo biológico dos parasitos.

Foram também realizados ensaios de citolocalização dessas duas proteínas para confirmar o padrão de transmembrana das amastinas de *T. rangeli*. Assim como previsto nas análises *in silico*, no ensaio de RIFI, utilizando o soro anti-TrAma4\_1 os resultados sugerem a localização transmembranar dessa proteína. Esses resultados corroboram com os encontrados na literatura, sendo as amastinas encontradas localizadas na superfície celular tanto para *T. cruzi* quanto para *L. major* (TEIXEIRA *et al.*, 1994; ROCHETTE *et al.*, 2005; CRUZ *et al.*, 2012; KANGUSSU-MARCOLINO ET AL., 2013).

Para tentar compreender melhor a dinâmica da infecção *in vivo* do *T. rangeli* e também das amastinas, foram desenvolvidas linhagens de parasitos expressando diferentes amastinas: uma linhagem superexpressando uma de  $\alpha$ -amastina de *T. rangeli* (Tr\_AMATR), quatro linhagens expressando heterologicamente amastinas de *T. cruzi*, sendo duas  $\beta$ -amastinas (Tr\_AMA390 e Tr\_AMA394) e duas  $\delta$ -

amastinas (Tr\_AMA40 e Tr\_AMAF) todas fusionadas com a proteína verde fluorescente GFP.

Os parasitos foram então transfectados e, para confirmar a expressão foram realizados ensaios de Citometria de fluxo e *Western blot*. Através da Citometria de fluxo pudemos observar que mais de 95% dos parasitos de todas as linhagens estavam expressando a fluorescência. Já quando esses parasitos foram testados especificamente para a expressão da GFP através do *Western blot*, observamos resultado positivo apenas para a linhagem: Tr\_AMAF. Kangussu-Marcolino e colaboradores (2013) obtiveram sucesso na identificação da expressão dessas proteínas fusionadas em *T. cruzi* através da mesma técnica de *Western blot*, utilizando o anticorpo anti-GFP. Entretanto, Paiva *et al.* (2015) não conseguiram padronizar ensaios de expressão de  $\alpha$ -amastinas fusionadas com GFP através de *Western blot*. Através da tentativa de amplificação da GFP por qPCR, Nascimento e colaboradores, em 2015, observaram diferenças significativas na sequência da proteína GFP dependendo do vetor de expressão utilizado, que não permitiram que o iniciador desenhado para uma sequência de GFP amplificasse uma sequência de e-GFP.

Devido a isso, nos baseamos na fluorescência emitida pelo parasito quando observado através de microscópio de fluorescência, e, verificamos que existem distintos padrões de fluorescência para linhagem de parasito transfectado. Esses dados corroboram com os achados prévios de Kangussu-Marcolino e colaboradores (2013). Para as linhagens Tr\_AMAF, Tr\_AMA390 e Tr\_AMA394 foi possível observar que a fluorescência distribui-se ao longo de todo o parasito. Enquanto isso a linhagem Tr\_AMA40 apresentou distribuição diferenciada em forma de vesículas ao longo do citoplasma do parasito. Segundo Kangussu-Marcolino e colaboradores (2013) que superexpressaram estas mesmas amastinas em *T. cruzi* essa localização topológica diferenciada da AMA40 das demais pode ser devido à presença de uma cauda C-terminal hidrofílica.

Assim, foram realizados ensaios *in vivo* com camundongos Balb/C infectados com as diferentes linhagens transfectadas de *T. rangeli*, tendo como controle a cepa Choachí selvagem. Inicialmente observamos a evolução da curva de parasitemia, e, observamos diferença em relação à cepa selvagem apenas na evolução da infecção das linhagens Tr\_AMA40, Tr\_AMAF e Tr\_AMA390, que apresentaram pelo menos um log de diferença na contagem de parasitos sanguíneos, não sendo essas diferenças estatisticamente significativas. Através da análise dos parâmetros: porcentagem de exame de sangue a

fresco positivo, período patente, pico máximo de parasitemia, dia de pico máximo e porcentagem de PCR positivo também não houveram diferenças entre as linhagens transfectadas e a parental.

Schlindwein e colaboradores (2014), realizaram ensaios *in vivo* com parasitos superexpressando a proteína gp82, e, observaram para a curva de parasitemia diferenças estatisticamente significativa entre o número de parasitos circulantes entre a linhagem transfectada e a selvagem. Mesmo com esses resultados, não consideraram que houve uma multiplicação dos parasitos dentro do hospedeiro mamífero. Nascimento e colaboradores, em 2015, realizaram a transfecção de diferentes cepas de *T. rangeli* e *T. cruzi* com plasmídeos contendo os genes repórteres GFP e RFP, e avaliaram a dinâmica da evolução da infecção dessas cepas em camundongos. Para as cepas *T. rangeli* Choachí RFP e para *T. cruzi* Y GFP a manipulação gênica realizada pelo processo de transfecção não causou alterações relacionadas a infectividade das mesmas, já a cepa de *T. rangeli* SC58 RFP apresentou diferenças estatisticamente significativas em relação a cepa parental referente a quantidade de parasitos circulantes na corrente sanguínea dos animais analisados.

Ao contrário do *T. cruzi*, até o presente momento, não existem estudos que mostrem que o *T. rangeli* seja patogênico para o hospedeiro mamífero, além de tudo, não é possível inferir que exista a multiplicação dos parasitos no interior deste hospedeiro (HERBIG-SANDREUTER, 1955; CUBA CUBA, 1998). Baseando nos achados obtidos através da detecção do DNA de *T. rangeli* em sangue e órgãos de camundongos infectados com a cepa selvagem e as cepas transfectadas foi possível observar alta positividade para as amostras de sangue e tecido coletada desses animais. Já para as análises histopatológicas, foi possível observar alteração no tecido adiposo coletado dos camundongos infectados com as seguintes linhagens: Tr\_AMA40, Tr\_AMAF e Tr\_AMA394. Para Tr\_AMA40 foi possível observar extravasamento de tecido adiposo no 5º dpi, enquanto que para Tr\_AMAF e Tr\_AMA394 essas alterações foram observadas nos órgãos coletados no 15º dpi. Com base nesses resultados obtidos, observamos então que não ocorreram diferenças significativas na evolução da infecção experimental em camundongos infectados com cepas de *T. rangeli* expressando diferentes amastinas de *T. cruzi* e superexpressando uma amastina homóloga. É claro que, para que o *T. rangeli* consiga estabelecer a infecção no hospedeiro mamífero uma grande variedade de proteínas e sinalizações celulares precisam estar envolvidas no processo. Um achado importante encontrado nas análises

histopatológicas, que foi a presença de processo inflamatório no tecido adiposo reforçam a idéia de que mais estudos acerca da evolução da infecção *in vivo* em mamífero por *T. rangeli* são necessários.

Existem alguns estudos antigos que sugerem uma possível multiplicação de até sete vezes do inóculo inicial de parasitos na corrente sanguínea de camundongos, ou então a presença de amastigotas em análises teciduais de tecidos coletados de animais infectados pela cepa Perro-82 (URDANETA-MORALES e TEJERO, 1985). Esses dados nunca foram reproduzidos e permanecem desacreditados, e por isso são necessários diversos estudos acerca da interação parasito/mamífero para *T. rangeli*.

## 4 – CONCLUSÕES

- Foram encontradas no genoma hapóide do *T. rangeli* 21 cópias dos genes que codificam para as proteínas amastinas, sendo 17 encontram-se íntegros e quatro foram considerados pseudogenes;
- Quando classificadas em subfamílias, as amastinas de *T. rangeli* foram classificadas como:  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\delta$ -amastinas, sendo que das quatro amastinas foram consideradas como pseudogenes, duas pertencendo à subfamília  $\beta$  e duas à subfamília  $\delta$ , e as  $\delta$ -amastinas de *T. rangeli* encontram-se intercaladas com genes codificantes para tuzinas no genoma do parasito;
- Quando analisadas estruturalmente, foi observada na sequência aminoacídica das amastinas de *T. rangeli* a presença de quatro regiões transmembranares e também da porção extracelular hidrofílica denominada de amastina, embora que para os pseudogenes, a região c-terminal onde encontram-se presentes as duas últimas regiões transmembrana localizam-se depois do códon de parada;
- Através da análise dos níveis de transcritos de duas amastinas de *T. rangeli* foi possível observar uma diferença entre as formas evolutivas do parasito analisadas, sendo maior para epimastigotas do que para tripomastigotas;
- Quando foi observado o nível de expressão proteica através do *Western blot* não foi verificada diferença entre as formas evolutivas epimastigotas e tripomastigotas para a amastina TrAma4\_1 de *T. rangeli*; não foi observada expressão proteica para a amastina de *T. rangeli* codificada pelo pseudogene TrAma7\_1; e, não foi possível relacionar que a produção de níveis de transcritos e de expressão proteica das amastinas de *T. rangeli* seja estágio específica;
- Com base nos dados preliminares gerados por este trabalho, podemos constatar também que não existe relação entre quantidade de transcritos e proteína expressa entre os genes de amastinas para *T. rangeli*;

- Os resultados dos experimentos *in vivo* mostraram que não houveram diferenças na evolução da infecção experimental em camundongos da cepa selvagem para as cepas transfectadas nos diferentes parâmetros avaliados ao longo do curso da infecção.

## **Capítulo 2:**

Análises *in silico*, níveis de transcritos e expressão da tuzina de *T. rangeli*

## 1- JUSTIFICATIVA

Em 1995, Teixeira e colaboradores iniciaram estudos acerca da tuzina de *T. cruzi* e sua associação com as amastinas, nos quais identificaram a mesma estruturalmente e relataram sua organização e localização genômica. Até o presente momento pouco se sabe a respeito da função dessa proteína.

Genes de tuzina encontram-se presente em todos os tripanosomatídeos, usualmente com um perfil multicópias, estando intercalada no genoma com genes de  $\delta$ -amastinas. Uma curiosidade, é que mesmo o *T. brucei*, que não tem essa subfamília de amastina ainda apresenta a tuzina. Essa informação é importante a fim de ajudar no esclarecimento da função dessa proteína e numa possível dissociação da mesma com as amastinas. Em 2014, Lakshmi e colaboradores propuseram a tuzina como um forte candidato a vacinação contra leishmaniose visceral causada pela *L. donovani*. Apesar de ser considerado um estudo inicial de triagem, o mesmo pode ser considerado um importante fator a ser considerado em futuros estudos acerca de um melhor entendimento acerca da função dessa proteína.

Devido a estas questões ainda em aberto, resolvemos iniciar estudos acerca das tuzinas de *T. rangeli* e os dados que seguem a seguir são os primeiros a serem documentados em literatura.

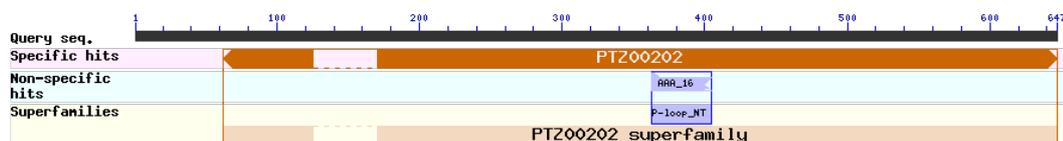
## 2 – RESULTADOS

### 2.1 Conservação, estrutura e organização genômica da Tuzina de *T. rangeli*.

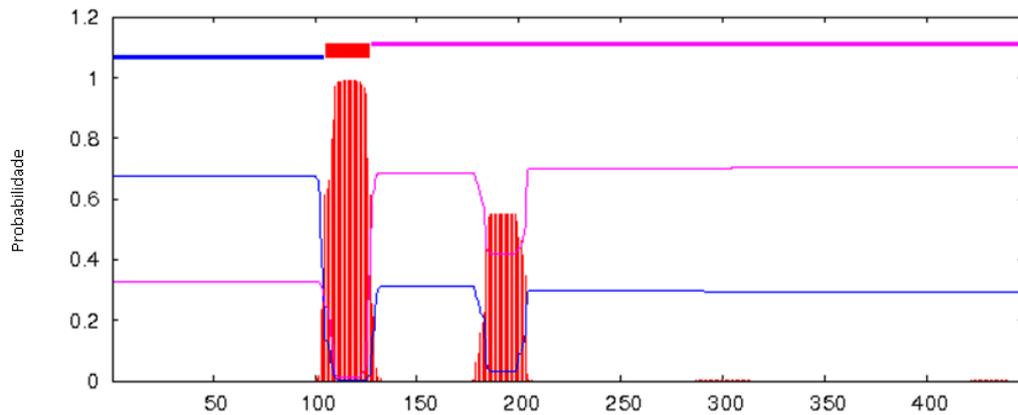
Embora previamente identificadas por Stoco *et al.* (2014), a busca por sequências gênicas correspondentes a possíveis cópias de tuzina foi novamente realizada nos bancos de dados genômicos das cepas Choachí e SC58 de *T. rangeli* incluindo os dados gerados na plataforma Illumina HiSeq e PacBio em colaboração do laboratório do Dr. Björn Andersson do Karolinska Institutet. A partir desta busca foi identificada uma única ORF correspondente ao gene da tuzina. Essa sequência apresentou a maior similaridade com uma tuzina de *T. cruzi* (TcCLB.507485.140) com 92% de identidade.

Em relação a sequência de *T. rangeli* disponível nos bancos de dados públicos (TriTrypDB - TRSC58\_04224) a sequência agora encontrada como tuzina apresenta uma adição na porção N-terminal correspondente a identificação do correto códon de iniciação.

A proteína predita de *T. rangeli* apresenta 447 aa e diversas características compartilhadas com a sequências do gene ortólogo em *T. cruzi*, incluindo a presença do domínio PTZ00202 e AAA ATPase (Figura 29) e a presença de uma região transmembrana caracterizando-se como uma proteína de membrana (Figura 30). Tanto para *T. rangeli* quanto para *T. cruzi* esta proteína mantém uma porção N-terminal citoplasmática e uma grande porção C-terminal extra-celular (~350aa).



**Figura 29:** Domínios conservados encontrados na sequência predita de aminoácidos da tuzina de *Trypanosoma rangeli*. PTZ00202 referente ao domínio denominado de Tuzin, Provisional e AAA ATPase referente a família de domínios que contém um motivo P-loop que é característico da superfamília AAA.



**Figura 30:** Predição de possíveis regiões transmembranas (vermelho) da tuzina de *Trypanosoma rangeli* utilizando o programa *TMHMM Server v. 2.0* do pacote *Expasy*. Prováveis regiões extracelulares estão demonstradas em rosa e intracelulares em azul.

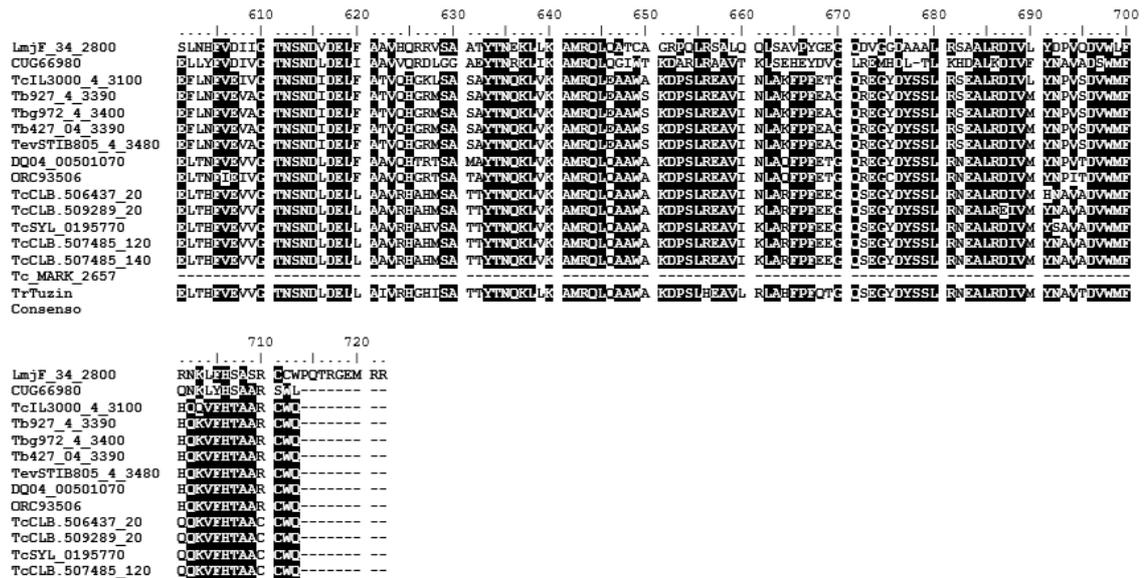
Embora os genes que codificam para tuzinas sejam encontrados em *B. saltans*, em diversos tripanosomatídeos monoxênicos e heteroxênicos há uma grande diferença em relação ao número de genes e distribuição nos genomas. Uma vez que há uma grande expansão deste gene sobretudo em *Leishmania* sp. (>30 genes), havendo uma grande variação entre as sequências decidiu-se realizar as análises comparativas somente em relação as tuzinas identificadas em parasitos do gênero *Trypanosoma* pertencentes ao grupo de ortólogos OG5\_138994, utilizando a sequência ortóloga de *L. major* e *B. saltans* para comparação e grupo externo. No quadro 2 estão relacionados os genes de tuzina de diferentes espécies do gênero *Trypanosoma*, bem como as principais características incluindo tamanho, ponto isolétrico (pI) e valores de similaridade com a sequência de *T. rangeli*.

**Quadro 2:** Características gerais das sequências de tuzinas de *Trypanosoma* sp. MW- massa molecular; pI – ponto isoelétrico. As sequências em vermelho correspondem a sequências parciais e algumas análises não foram realizadas para estas sequências.

Número Acesso	Espécie	Anotação	pb	aa	MW (Da)	pI teórico	Identidade Tr Tuzina	Sinal endereçamento
Tr_Tuzin	<i>Trypanosoma</i> <i>angeli</i> C58	tuzin	1341	447	51291	9,07		Não
DQ04_00501070	<i>Trypanosoma</i> <i>grayi</i> ANR4	tuzin	1965	655	7273	8,73	85,01	Não
ORC93506	<i>Trypanosoma</i> <i>theileri</i>	tuzin	2046	682	75347	8,78	86,13	Mitocondrial
Tb427.04.3390	<i>Trypanosoma</i> <i>brucei</i> <i>listeri</i> 27	tuzin, putative	2025	675	74165	8,03	83,23	Mitocondrial
Tb927.4.3390	<i>Trypanosoma</i> <i>brucei</i> <i>brucei</i> REU927	tuzin, putative	2025	675	74719	8,17	82,77	Mitocondrial
Tbg972.4.3400	<i>Trypanosoma</i> <i>brucei</i> <i>gambiense</i> DAL972	tuzin, putative	2025	675	74719	8,17	82,77	Mitocondrial
TevSTIB805.4.3480	<i>Trypanosoma</i> <i>evansi</i> TIB805	tuzin, putative	2025	675	74179	8,17	82,77	Mitocondrial
<b>TvY486_0403190</b>	<i>Trypanosoma</i> <i>vivax</i> Y486	tuzin, putative, (fragment)	1323	441				
<b>TvY486_0403200</b>	<i>Trypanosoma</i> <i>vivax</i> Y486	tuzin, putative, (fragment)	639	213				
TcL3000_4_3100	<i>Trypanosoma</i> <i>tongolense</i> L3000	tuzin, putative	1128	376	42901	8,47	79,79	Não
TcCLB.507485.1207	<i>Trypanosoma</i> <i>cruzi</i> <i>clbreneri</i> <i>Esmeraldo-like</i>	tuzin	1341	447	51409	9,01	90,96	Não
TcCLB.506437.20	<i>Trypanosoma</i> <i>cruzi</i> <i>clbreneri</i> <i>Non-Esmeraldo</i>	tuzin, putative	1341	447	51441	8,89	91,28	Não
TcCLB.509289.20	<i>Trypanosoma</i> <i>cruzi</i> <i>clbreneri</i> <i>Non-Esmeraldo</i>	tuzin, putative	1341	447	51479	9,02	91,5	Não
TcCLB.507485.140	<i>Trypanosoma</i> <i>cruzi</i> <i>clbreneri</i> <i>Esmeraldo-like</i>	tuzin (fragment)	1341	447	51409	9,01	91,72	Não
<b>TcCLB.509289.5</b>	<i>Trypanosoma</i> <i>cruzi</i> <i>clbreneri</i> <i>Non-Esmeraldo</i>	tuzin (fragment)	1401	467				
<b>TcCLB.507485.159</b>	<i>Trypanosoma</i> <i>cruzi</i> <i>clbreneri</i> <i>Esmeraldo-like</i>	tuzin (fragment)	489	163				
<b>TcCLB.507739.130</b>	<i>Trypanosoma</i> <i>cruzi</i> <i>clbreneri</i> <i>Esmeraldo-like</i>	tuzin (fragment)	555	185				
<b>TcCLB.506437.407</b>	<i>Trypanosoma</i> <i>cruzi</i> <i>clbreneri</i> <i>Non-Esmeraldo</i>	tuzin (fragment)	663	221				
<b>TcCLB.511071.457</b>	<i>Trypanosoma</i> <i>cruzi</i> <i>clbreneri</i> <i>Esmeraldo-like</i>	tuzin-like (pseudogene), putative	1224	408				
<b>TcCLB.511903.45</b>	<i>Trypanosoma</i> <i>cruzi</i> <i>clbreneri</i> <i>Esmeraldo-like</i>	tuzin-like (pseudogene), putative	1377	459				
<b>TcSYL_0195710</b>	<i>Trypanosoma</i> <i>cruzi</i> <i>sylvio</i> X10/1	unspecified product	444	148				
<b>TcSYL_0195720</b>	<i>Trypanosoma</i> <i>cruzi</i> <i>sylvio</i> X10/1	unspecified product	675	225				
<b>TcSYL_0195730</b>	<i>Trypanosoma</i> <i>cruzi</i> <i>sylvio</i> X10/1	unspecified product	579	193				
<b>TcSYL_0195770</b>	<i>Trypanosoma</i> <i>cruzi</i> <i>sylvio</i> X10/1	unspecified product	1341	447	51336	8,99	91,28	Não
<b>TcSYL_0195790</b>	<i>Trypanosoma</i> <i>cruzi</i> <i>sylvio</i> X10/1	unspecified product	354	118				
<b>TcSYL_0195800</b>	<i>Trypanosoma</i> <i>cruzi</i> <i>sylvio</i> X10/1	unspecified product	675	225				
<b>TcSYL_0195810</b>	<i>Trypanosoma</i> <i>cruzi</i> <i>sylvio</i> X10/1	unspecified product	432	144				
<b>Tc_MARK_2657</b>	<i>Trypanosoma</i> <i>marinkellei</i> strain B7	tuzin	990	330	38048	9,83	91,82	Não
<b>Tc_MARK_8720</b>	<i>Trypanosoma</i> <i>marinkellei</i> strain B7	tuzin, putative	579	193				
<b>Tc_MARK_8798</b>	<i>Trypanosoma</i> <i>marinkellei</i> strain B7	tuzin, putative	1542	514				
<b>Tc_MARK_9538</b>	<i>Trypanosoma</i> <i>marinkellei</i> strain B7	tuzin, putative	660	220				
LmjF_34.2800	<i>Leishmania</i> <i>major</i> strain Friedlin	tuzin, putative	1893	630	69544	9,53	56	Mitocondrial
CUG66980	<i>Bodo</i> <i>saltans</i>	tuzin, putative	1941	647	71712	8,91	61,12	Mitocondrial

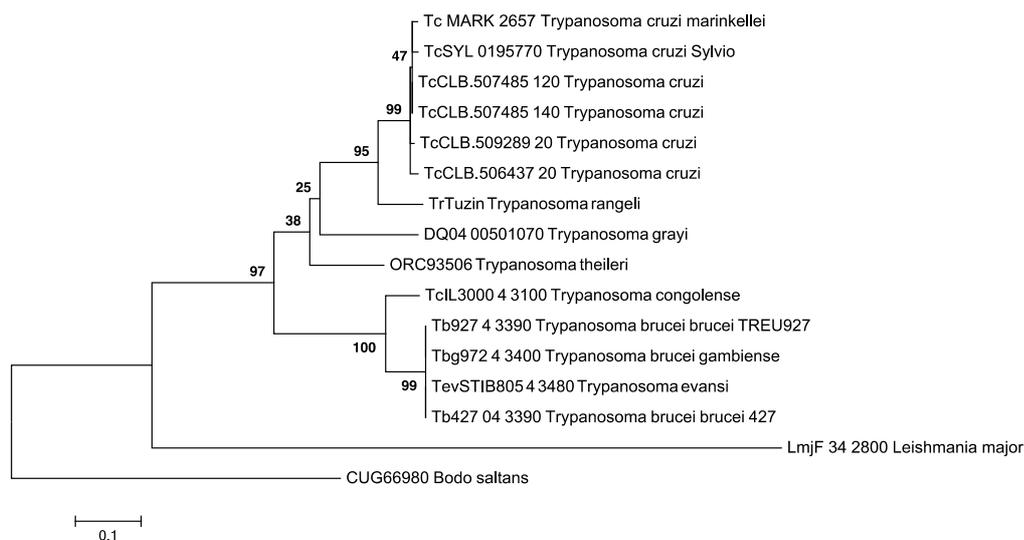
As sequências de aminoácidos de todas as espécies listadas no quadro acima foram alinhadas sendo possível identificar uma grande similaridade entre as tuzinas de todas as espécies (Figura 31). A maior variabilidade está associada a região N-terminal, que é maior em algumas espécies, nas quais foi encontrado um sinal de endereçamento mitocondrial conforme apresentado no quadro 2.





**Figura 31:** Alinhamento múltiplo das sequências aminoacídicas de Tuzina. Em preto estão destacados os aminoácidos idênticos presentes na maioria das sequências listadas, sendo o \* correspondente a 100% das sequências possuindo o mesmo aminoácido em uma dada posição. Os aminoácidos conservados estão representados por: na sequência consenso. Identificação das sequências pelo número de acesso no GenBank ou TriTrypDB. LmjF- *Leishmania major*; CUG- *Bodo saltans*; Tb- *Trypanosoma brucei*; Tbg- *Trypanosoma brucei gambiense*; Tev- *Trypanosoma evansi*; DQ04- *Trypanosoma grayi*; ORC- *Trypanosoma theileri*; TcCLB- *Trypanosoma cruzi* CL Brener; TcSYL- *T. cruzi* Sylvio; Tc\_MARK- *T. cruzi marinkellei*; Tr – *Trypanosoma rangeli*.

Com o objetivo de realizar uma análise filogenética para as tuzinas das diferentes espécies, a partir deste alinhamento inicial foi realizada a reconstrução de uma árvore filogenética (Figura 32). A árvore filogenética demonstra uma separação clara das sequências de *T. cruzi* e um agrupamento destas sequências com a tuzina de *T. rangeli* (com valor de *bootstrap* igual a 100). Além destes clados é possível observar um grupo formado pelos parasitos *T. brucei*, *T. brucei gambiense* e *T. evansi*.

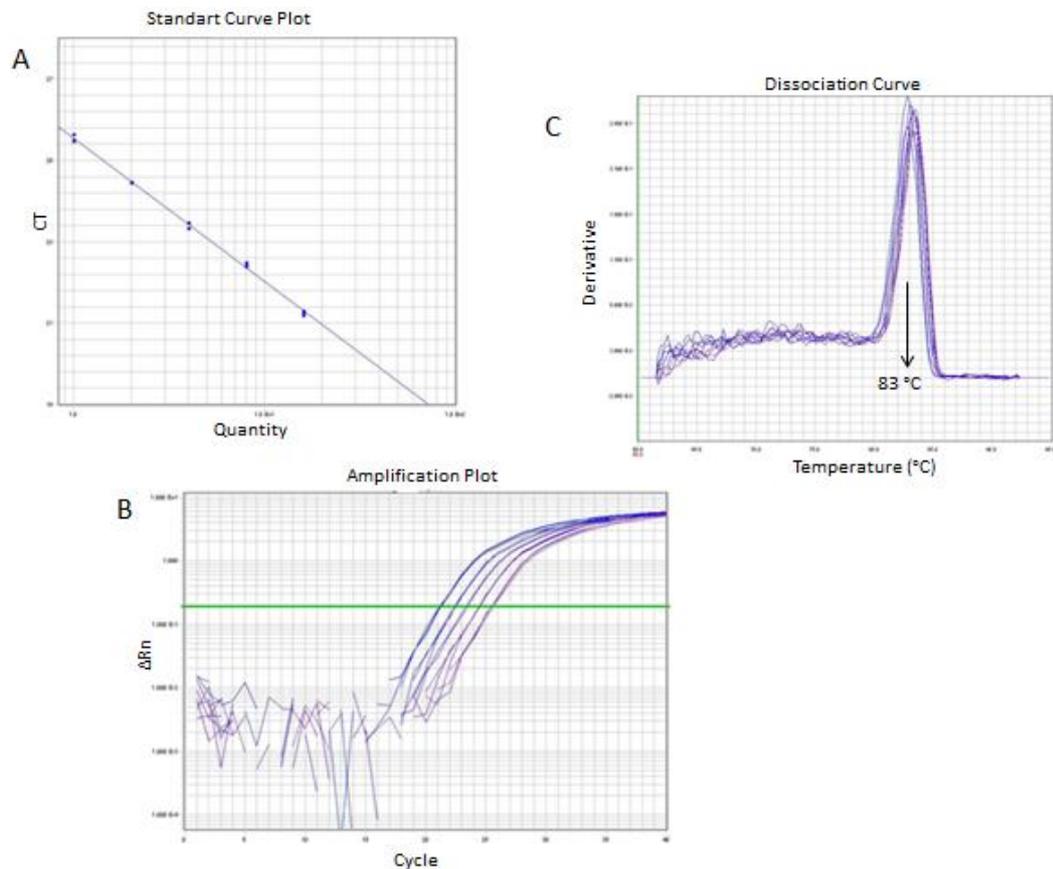


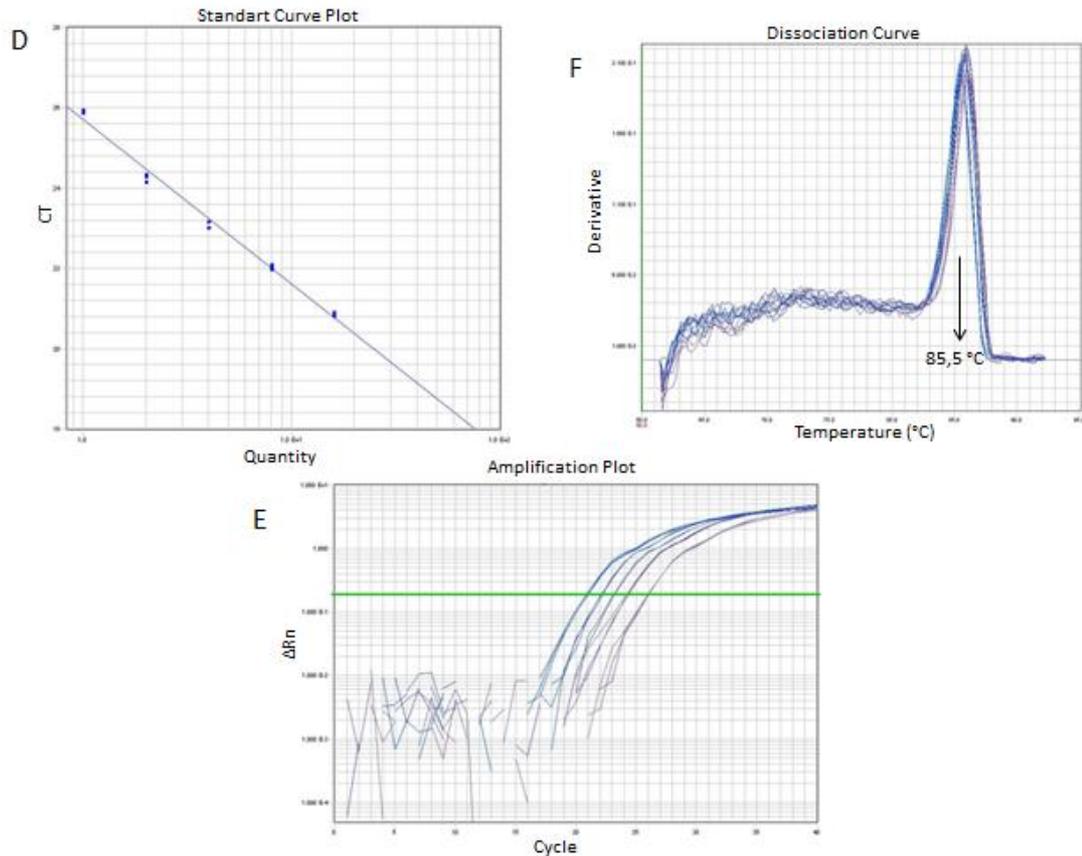
**Figura 32:** Análise filogenética das sequências de aminoácidos das tuzinas de espécies do gênero *Trypanosoma*. O alinhamento das sequências foi realizado pelo programa Clustal Omega e a história evolutiva foi inferida pelo método de Máxima Verossimelhança usando o MEGA versão 6.0. A filogenia foi construída usando o modelo de substituição de aminoácidos JTT+G. A árvore foi desenhada em escala, com o tamanho dos ramos relacionado ao número de substituições por sítio. A análise utilizou 17 sequências completas de tuzinas. Porcentagens de *bootstrap* estão apontadas próximo aos ramos, e correspondem a porcentagem da de árvores nas quais os taxons foram agrupados (1.000 replicatas). As sequências de *Bodo saltans* e *Leishmania major* foram incluídas para fins de resolução da árvore.

## 2.2 Análise dos níveis de transcritos da tuzina de *T. rangeli* e de *T. cruzi* nos diferentes estágios evolutivos dos parasitos.

Com o intuito de entender a expressão das tuzinas, buscamos determinar a geração de transcritos e verificar se havia relação destes níveis de RNAm nas diferentes fases do ciclo evolutivo do parasito. Para tanto, foram desenhados iniciadores específicos para os genes de tuzina de *T. rangeli* e *T. cruzi*, os quais foram avaliados de forma qualitativa através de uma PCR convencional. Esta análise permitiu observar a amplificação específica em duas diferentes temperaturas de ligação dos iniciadores (60 e 62 °C) para os fragmentos do gene da tuzina de ambas espécies. Em todos os produtos amplificados é possível observar a ausência de dímeros.

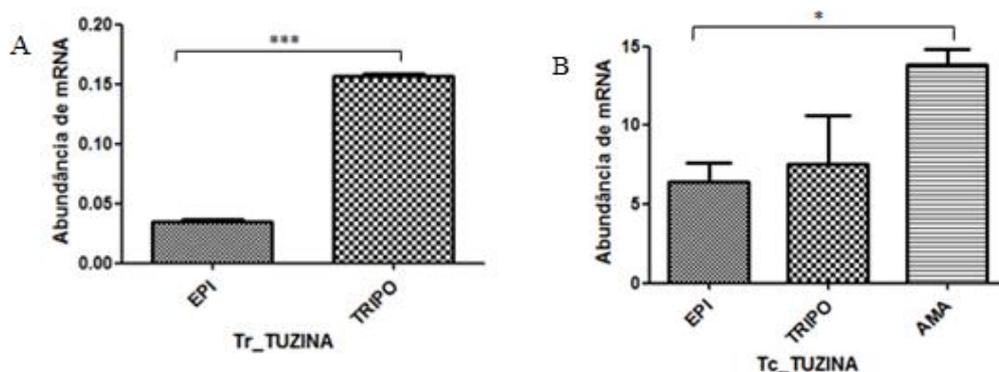
Com a padronização das reações de qPCR foi observado um valor referente a eficiência média da reação para cada par de iniciadores, sendo de 93% para o gene tuzina de *T. rangeli* e de 94% para *T. cruzi*, conforme Pfaffl (2004). Na figura 33, estão mostradas as curvas de dissociação, de amplificação e a curva padrão gerada para o cálculo de eficiência da amplificação dos genes de tuzina de *T. rangeli* e *T. cruzi*. Através das curvas de dissociação é possível observar a especificidade dos iniciadores específicos para *T. rangeli* e *T. cruzi*. Para quantificação final foi utilizado como normalizador o gene de referência GAPDH, específico para *T. rangeli* e para *T. cruzi*. Para controle de contaminação, o ensaio de qPCR contou com a presença de um controle negativo para cada par de iniciadores.





**Figura 33:** Padronização da PCR em tempo real para quantificação dos níveis de transcritos de tuzina em diferentes formas evolutivas de *Trypanosoma rangeli* e *Trypanosoma cruzi*. Curvas de dissociação do gene tuzina de *T. rangeli* com pico em torno de 83 °C (A) e do gene tuzina de *T. cruzi* com pico em torno de 85,5°C (D). Curvas padrão geradas a partir da região linear de cada curva de amplificação de *T. rangeli* (B) e *T. cruzi* (E). Curvas de amplificação para o gene de *T. rangeli* (C) e *T. cruzi* (F) demonstrando amplificação nas diluições seriadas do cDNA.

Novamente a eficiência das reações utilizando esses iniciadores foi similar (diferença menor que 10%) a eficiência dos genes de referência para *T. rangeli* e para *T. cruzi*. Desta forma, os níveis de expressão gênica foram calculados a partir dos valores de  $2^{-(\Delta Cq)}$  a partir de três replicatas biológicas dos diferentes estágios evolutivos de *T. rangeli* e de *T. cruzi*. De forma geral foi possível observar diferença dos níveis de transcritos da Tc\_TUZINA e Tr\_TUZINA nas diferentes formas evolutivas analisadas (Figura 34). Pode-se observar diferentes níveis de transcritos de tuzina entre as formas epimastigotas e tripomastigotas de cultura de *T. rangeli*, sendo essa diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,001$ ). Para o *T. cruzi* houve diferença significativa somente entre as formas amastigotas e epimastigotas ( $p < 0,05$ ).



**Figura 34:** Níveis de RNAm de tuzina em diferentes formas biológicas de **(A)** *Trypanosoma rangeli* (Tr\_TUZINA) e **(B)** *Trypanosoma cruzi* (Tc\_TUZINA). Foram analisadas formas epimastigotas (EPI), tripomastigotas (TRIPO) e amastigotas (AMA) utilizando como referência a média geométrica dos genes GAPDH e RNA60s. Os dados foram obtidos por ensaio de qPCR e representam a média e o desvio padrão de três experimentos independentes, realizados em triplicata. O sinal \* indica diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) utilizando o teste ANOVA de uma direção seguida pelo teste de comparação múltipla Tukey.

Com base nestes resultados, para entender melhor a expressão desses genes e sua relação com o comportamento do parasito nos diferentes estágios evolutivos são necessários estudos acerca dos níveis de expressão dos mesmos.

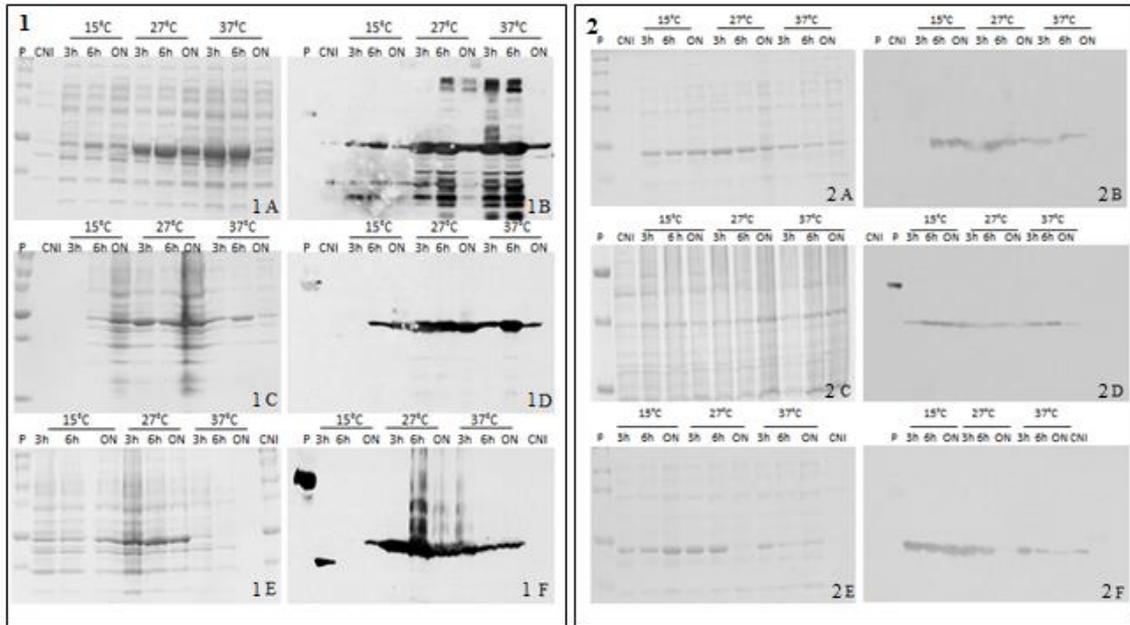
### 2.3 Análise dos níveis de expressão proteica da tuzina de *T. rangeli* e *T. cruzi* nos diferentes estágios evolutivos do parasito.

Para realizar a expressão heteróloga da proteína recombinante tuzina de *T. rangeli*, denominada de: rTrSc\_Tuzina foram desenhados e testados os iniciadores para a amplificação do gene em questão. Para iniciar o teste de expressão heteróloga das proteínas recombinantes, o plasmídeo contendo o gene TrSc\_Tuzina foi inserido em células *E. coli* BL21(DE3) e a expressão da proteína recombinante testada em diferentes condições. Não foi possível identificar a presença de banda proteica proeminente no tamanho esperado tanto em gel corado com Azul de comassie quanto em *Western blot* visando à detecção da cauda de histidinas (dados não mostrados).

Após testar a expressão proteica em diferentes condições, foi possível observar a expressão heteróloga da rTrSc\_Tuzina em duas

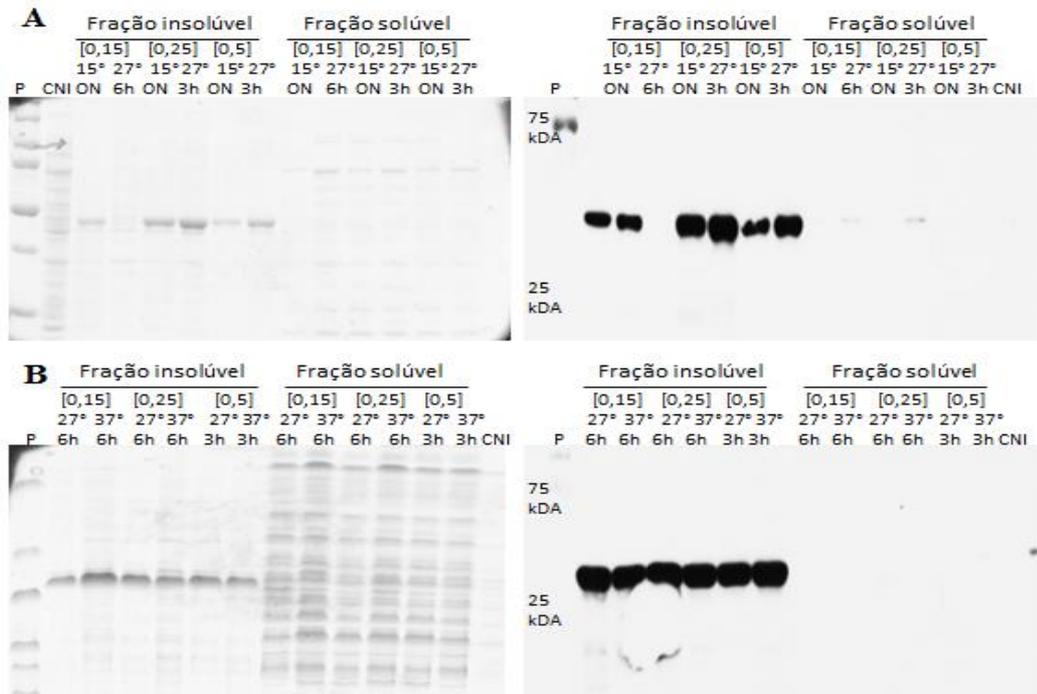
linhagens diferentes de *E. coli* BL21(DE3): pLysS e códon plus (Figura 35). Conforme observado, ocorreu expressão da rTrSc\_Tuzina com tamanho equivalente ao predito de  $\pm 50$  kDa na bactéria BL21(DE3) pLysS em todas as concentrações do indutor IPTG (0,15; 0,25 e 0,5 mM) e em todas as condições de tempo e temperatura pré-estabelecidas. Na concentração de 0,15 mM de IPTG ocorreu uma maior expressão a 27 e 37°C nos tempos 3 e 6 horas. Para as concentrações de IPTG de 0,25 e 0,5 mM, é possível observar a expressão da proteína recombinante, especialmente a 27°C.

A expressão heteróloga da proteína recombinante rTcSc\_Tuzina em *E. coli* BL21(DE3) códon plus ocorreu em todas as concentrações do indutor e em todas as condições pré-estabelecidas. Através das bandas presentes no gel SDS-PAGE e no *Western blot*, verifica-se uma maior expressão quando comparadas à expressão de proteínas da própria bactéria.



**Figura 35:** Teste de expressão da rTrSc\_Tuzina em *Escherichia coli* Bl21(DE3) pLys S (1) e *E. coli* Bl21(DE3) códon plus (2) em diferentes temperaturas e concentrações de IPTG. A e B) [0,15] IPTG; C e D) [0,25] IPTG; E e F) [0,5] IPTG. Em A, C e E são imagens referente à resolução das amostras em SDS-PAGE posteriormente coradas com azul de comassie R250 e B, D e F imagens referentes ao *Western blot* utilizando o anticorpo anti-Histag. P - Padrão de peso molecular: *Protein Precision Plus Dual Color* (Bio-Rad), CNI: controle não induzido e ON: “overnight”.

Foram então selecionadas para as duas linhagens de *E. coli* as condições mais favoráveis de expressão heteróloga para realizar o teste de solubilidade da proteína recombinante. Na Figura 36, encontram-se os testes que permitiram determinar as condições ideais de expressão.

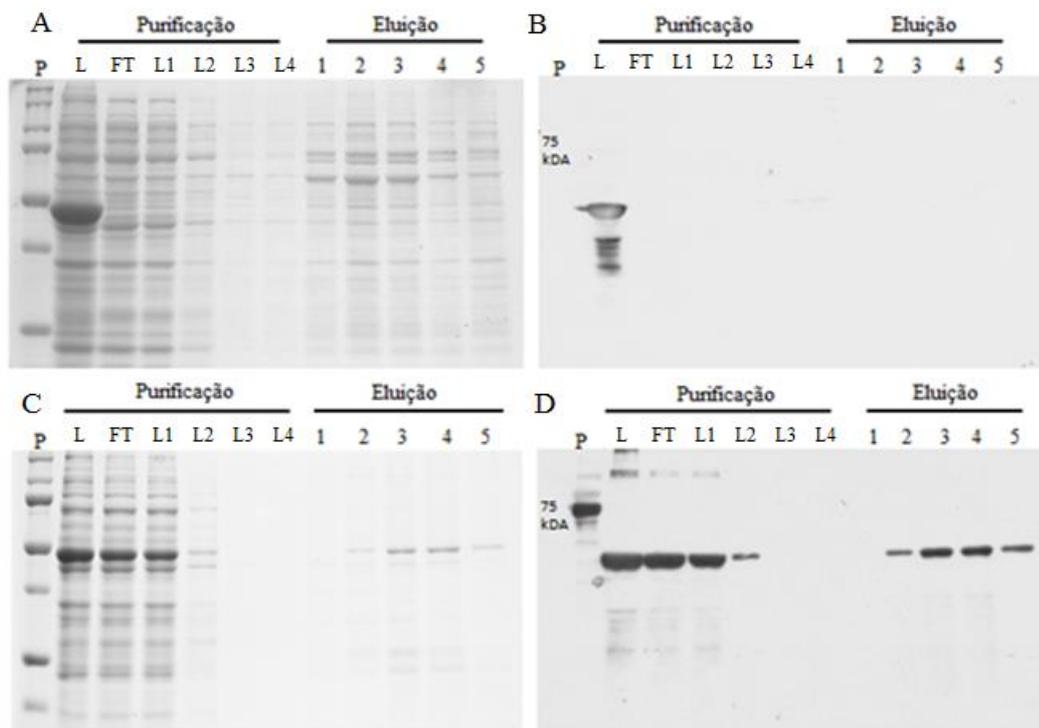


**Figura 36:** Teste de solubilidade da rTrSc\_Tuzina expressa em *Escherichia coli* BL21(DE3) (A) códon plus e (B) *plysS*, em três diferentes concentrações de IPTG [0,15; 0,25 e 0,5 e diferentes temperaturas e tempos de indução. P - Padrão de peso molecular: *Protein Precision Plus Dual Color* (Bio-Rad), CNI: controle não induzido e ON: “overnight”.

Na figura 37, é possível observar que em todas as condições testadas houve uma acentuada expressão da proteína na fração insolúvel. Somente para a linhagem BL21(DE3) códon plus identificou-se visualmente uma pequena quantidade da proteína na fração solúvel da bactéria. Visando a purificação da fração solúvel foi realizada nova expressão da rTrSc\_Tuzina, em um volume maior de cultura nas seguintes condições: indução da expressão com 0,15 mM IPTG, a 27°C por 6 horas em agitação de 150 RPM. Na figura 37A, podemos observar o gel de SDS-PAGE e o *Western blot*, da purificação a partir da fração solúvel da bactéria. Fica evidente na imagem que, durante as etapas da purificação grande quantidade da proteína não se ligou a resina e somente proteínas não relacionadas foram eluídas.

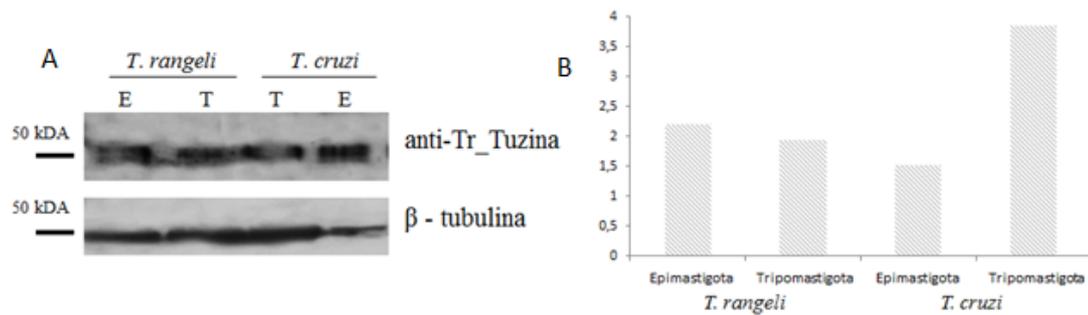
Como a purificação da proteína na fração solúvel não foi possível nessas condições, foi realizado novo crescimento bacteriano, com as mesmas condições para a purificação na fração insolúvel. Na figura 37B estão presentes todas as etapas da segunda purificação realizada e a

eluição final, na qual é possível observar a presença da proteína purificada e pouca presença de proteínas inespecíficas.



**Figura 37:** Etapas da purificação da rTrSc\_Tuzina por cromatografia de afinidade. A e B): Purificação da fração solúvel da bactéria e C e D: Purificação da fração insolúvel da bactéria. Sendo, A e C: Gel de poliacrilamida SDS-PAGE 12 % corado com Coomassie blue. B e D: Western blot utilizando anticorpo monoclonal anti-His•Tag®. P - Padrão de peso molecular: *Protein Precision Plus Dual Color* (Bio-Rad) Lisado bacteriano: L; *Flow Through*: FT – proteínas que não aderiram à resina; Lavagens: L1, L2, L3 e L4; Eluições (E1, E2, E3, E4 e E5).

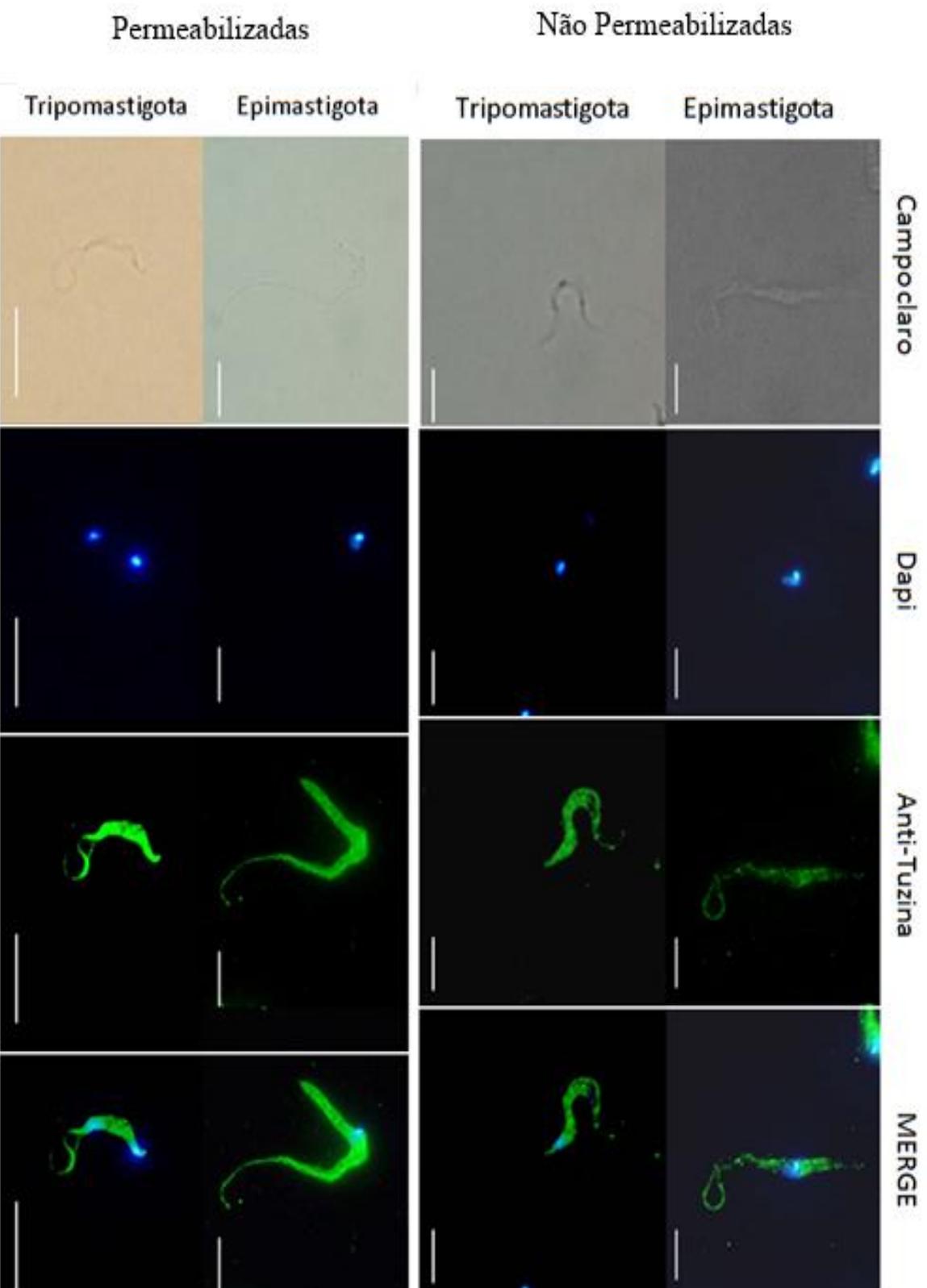
Após a purificação da recombinante foram então imunizados camundongos Balb/C com o objetivo de verificar a expressão da tuzina em epimastigotas e tripomastigotas de cultura de *T. rangeli* e *T. cruzi*. Conforme observa-se na figura 38 o soro anti- rTrSc\_Tuzina revelou uma banda única de aproximadamente 50 kDa (Figura 38A), e não mostrou especificidade para *T. rangeli*, sendo possível observar a detecção de uma proteína de mesmo tamanho nos extratos proteicos de *T. cruzi*. Quando foram avaliados os níveis de transcritos da tuzina nas diferentes formas evolutivas desses parasitos observamos diferenças estatisticamente significativas na abundância de RNAm desses parasitos, entretanto a expressão proteica não foi distinta entre as formas biológicas após quantificação das bandas através do software ImageJ®, e normalização pela expressão da  $\beta$  – tubulina (Figura 38B).



**Figura 38:** (A) *Western blot* utilizando o antissoro anti-TrTuzina em extratos proteicos totais de epimastigotas e tripomastigotas metacíclicos de cultura de *T. rangeli* e *T. cruzi*, e (B) quantificação da expressão da Tr\_TUZINA e Tc\_TUZINA em diferentes formas evolutivas do parasito (ImageJ®). E: epimastigota, T: tripomastigota.

#### 2.4 Ensaio de citolocalização da tuzina de *T. rangeli*.

A avaliação da localização celular da tuzina em formas epimastigotas e tripomastigotas de *T. rangeli* por imunofluorescência indireta utilizando o soro anti-TrTuzina revelou uma fluorescência difusa por todo o corpo celular do parasito, independentemente da forma analisada ter sido permeabilizadas ou não, sugerindo uma localização celular tanto no citoplasma quanto na membrana (Figura 39), não sendo possível confirmar os achados *in silico* que apontavam a citolocalização predita para membrana.



**Figura 39:** Citocalização da tuzina em formas epimastigotas e tripomastigotas *Trypanosoma rangeli* por imunofluorescência utilizando o soro anti-TrTuzina. A barra corresponde a 10 µm.

### 3 – DISCUSSÃO

Diferentes genes de *T. rangeli*, principalmente os que se localizam na superfície do parasito, estão envolvidos na interação destes com as células hospedeiras, tanto no hospedeiro mamífero quanto no vetor. Conforme estudo publicado por Lakshmi *et al.*, (2014), pelo fato de estimular uma resposta imunogênica a tuzina pode exercer um papel importante no ciclo biológico desses parasitos. Entretanto, até o presente momento pouco se sabe sobre o papel delas para os tripanosomatídeos de forma geral, e para *T. rangeli* os dados apresentados neste trabalho são precursores até o presente momento.

Em 2014, Stoco e colaboradores, publicaram um estudo acerca do genoma do *T. rangeli*, onde de forma inédita para este parasito, realizaram uma análise completa e detalhada dos genes presentes. Sabe-se então, com base nesses achados, que os genes que codificam para estas proteínas estão presentes tanto no *T. rangeli* quanto no *T. cruzi*, e com uma quantidade diferente do número de cópias entre eles, sendo que foram identificadas 34 cópias no *T. rangeli* (cepa SC58) e 83 cópias em *T. cruzi* (cepa CL Brener).

Através de novas análises foi identificada uma única ORF correspondente ao gene da tuzina na versão mais atual do genoma do *T. rangeli*. Essa sequência apresenta 92% de identidade com uma tuzina de *T. cruzi* (cepa CL Brener) - XP\_812388. Para confirmar o número de cópias presentes no genoma foi então realizado um ensaio de qPCR utilizando como referência um gene de cópia única. Como resultado final foi então encontrada apenas uma cópia de tuzina no genoma do *T. rangeli*. Este gene, codifica então uma proteína de 447 aa, com ausência de peptídeo sinal e de citolocalização predita como transmembrana.

Em 1995, Teixeira e colaboradores identificaram o gene tuzina de *T. cruzi* e, já neste estudo relacionaram o mesmo com as amastinas. Esta relação foi baseada tanto na localização de ambos os genes no genoma e também com base nos níveis de RNAm produzidos nos diferentes estágios evolutivos do parasito. Em 2005, Rochete e colaboradores, realizaram uma análise aprofundada do genoma de *L. major* e *L. infantum* com o objetivo de iniciar uma identificação das amastinas desses parasitos, e, com isso, observaram a presença de 25 cópias de tuzina em *L. major*, sendo dessas 21 homólogas; e, de forma similar, essas mesmas características foram observadas em *L. infantum*. Assim como no *T. cruzi* as mesmas encontram-se intercaladas com as amastinas, e estão presentes em três diferentes cromossomos. Em 2010, Jackson realizou um estudo acerca da classificação das amastinas em

subfamílias, relacionando a subfamília delta ( $\delta$ -amastinas) com a presença do gene da tuzina intercalado no genoma. Nesse estudo, também foi constatado que tanto para *T. brucei* quanto para *L. brasiliensis* não foi encontrada na análise do genoma a presença de amastinas da subfamília delta, mas que as tuzinas ainda encontravam-se presentes, sugerindo uma possível perda desse gene de amastina.

Com a análise detalhada *in silico* do genoma do *T. rangeli*, observamos que o gene da tuzina também encontra-se intercalado com as  $\delta$ -amastinas, corroborando com a idéia de que as tuzinas estão associadas apenas com essa subfamília de amastinas e que persistiu ao longo de toda a diversificação, o que sugere uma forte ligação entre essas duas famílias de genes.

Conforme constatado neste trabalho, as tuzinas de *T. rangeli* e de *T. cruzi* não apresentam peptídeo sinal e possuem um domínio transmembranar localizado de forma idêntica nas suas sequências aminoacídicas, este que inicia-se na posição 105 e possui comprimento de 22 aminoácidos. Através desta predição é possível observar a semelhança entre a topologia dessas proteínas. Devido à esta grande similaridade de topologia das tuzinas de *T. rangeli* e *T. cruzi*, é possível identificar a região transmembrana e também presença da família ATPase, que está intimamente associada com uma grande variedade de sinais celulares. Essa semelhança entre os genes de tuzina de *T. rangeli* e *T. cruzi* pode ser observada também filogeneticamente, já que encontramos um valor alto de *bootstrap* na divisão com os demais tripanosomatídeos analisados. Os resultados de citolocalização confirmaram os achados encontrados na análise *in silico*: apesar da predição da tuzina ser transmembrana, existe um domínio citoplasmático da mesma, o que explica o fato de ter sido observada fluorescência tanto nos parasitos permeabilizados quanto nos não-permeabilizados.

Teixeira e colaboradores, em 1999, descreveram que a função principal da tuzina seria apenas fornecer sinais de processamento e poliadenilação para as amastinas, e que esta proteína em si então seria apenas um subproduto desnecessário desta função. Apesar de até o presente momento, a função exata da mesma não ter sido estabelecida, supõe-se que a presença desse domínio seja importante para que a mesma possa desempenhar uma função celular característica.

Conforme descrito previamente na literatura, os níveis de transcritos de RNAm para a tuzina variam de acordo com a forma evolutiva em que o parasito se encontra (TEIXEIRA *et al.*, 1999). Para isso, foram então analisados os dois estágios evolutivos do *T. rangeli* (epimastigotas e tripomastigotas) e foram observadas diferenças nos

níveis de RNAm produzidos entre as duas formas evolutivas analisadas, sendo possível observar uma produção de aproximadamente quatro vezes maior de transcritos em tripomastigotas do que epimastigotas.

Teixeira e colaboradores (1995), avaliaram os níveis de transcritos de tuzina nos três estágios evolutivos de *T. cruzi*: epimastigota, amastigota e tripomastigota e constatou que esses níveis de transcritos eram até 40 vezes maiores para as formas amastigotas do que para as demais. Quando analisamos os níveis de transcritos de tuzina em *T. cruzi*, observamos que na forma amastigota os mesmos estavam em maior quantidade do que em epimastigotas e tripomastigotas, sendo observada uma diferença estatisticamente significativa entre as formas evolutivas amastigotas e epimastigotas.

É bem definido que para os tripanosomatídeos não existe uma relação direta dos níveis de transcritos com níveis de expressão proteica, isso ocorre devido à ausência de um controle específico durante a transcrição nestes organismos. Sabe-se que a transcrição vai formar um RNA policistrônico, este que contém informações de diferentes genes, sem qualquer função e expressão relacionadas entre si e que podem, ou não, seguirem para edição, ou seja, futuramente serem expressos (TEIXEIRA, 1998, TEIXEIRA, DAROCHA, 2003). Este tipo de regulação ocorre provavelmente por causa da necessidade de uma rápida adaptação dos tripanosomatídeos a diferentes ambientes tanto em seus hospedeiros mamíferos (migra da corrente sanguínea para o tecido) quanto nos triatomíneos (parasitos transitam por diferentes estágios do sistema gástrico).

Para entender melhor como funciona realmente a expressão da tuzina em *T. rangeli* e constatar se essa diferença de níveis de transcritos em epimastigotas e tripomastigotas está relacionado com os níveis de expressão final dessa proteína, foram realizados ensaios de *Western blot* utilizando um soro policlonal anti-Tr\_tuzina obtido em nosso laboratório. Tanto para *T. rangeli* quanto para os demais tripanosomatídeos esses são os primeiros dados referente à expressão proteica da tuzina. Como o soro policlonal anti-Tr\_Tuzina gerado não foi específico para a proteína de *T. rangeli*, ou seja, quanto testado o mesmo em extratos de *T. cruzi* foi observado resultado positivo quanto à ligação do soro policlonal anti-Tr\_Tuzina. Essa falta de especificidade nos proporcionou elucidar tanto para *T. rangeli* quanto para *T. cruzi*, se os níveis de produção de RNAm para tuzina nas diferentes formas evolutivas destes parasitos é diretamente proporcional aos níveis de expressão proteica final da tuzina.

Previamente, em parasitos na forma evolutiva de amastigotas, através de um inibidor de síntese proteica, a cicloheximida, Teixeira e

colaboradores (1995), observaram que ao mesmo tempo em que os níveis de transcritos de tuzina aumentaram cerca de sete vezes, os níveis de transcritos de amastinas sofreram uma diminuição em aproximadamente três vezes, o que já sugeria uma regulação independente da produção de níveis de transcritos desses dois genes. Resultados de um estudo publicado por Teixeira e colaboradores, em 1999, sugerem que a expressão do gene de tuzina seja postranscricionalmente suprimida por um processamento ineficiente de RNA ou por uma dificuldade em iniciar a tradução, resultando em baixo nível de expressão das tuzinas.

Com base no ensaio de *Western blot* realizado podemos constatar que não houveram diferenças de níveis de expressão proteica para tuzina, tanto de *T. rangeli* quanto de *T. cruzi* para epimastigotas e tripomastigotas. Diferente do que anteriormente havia sido encontrado para os níveis de produção de transcritos da tuzina, onde foi possível observar diferença entre os diferentes estágios evolutivos do parasito. Ainda são necessários estudos acerca da expressão dessa proteína, tanto em *T. rangeli* quanto em *T. cruzi*, principalmente para elucidar se as mesmas estão intimamente relacionadas com as  $\delta$ -amastinas, e se o nível de expressão proteica desses dois genes funciona de forma semelhante ou independente, e também se funcionalmente as tuzinas trabalham apenas para fornecer sinais de processamento e poliadenilação para as amastinas, ou se desempenham algum papel importante de sinalização celular.

## 4 – CONCLUSÕES

- O *Trypanosoma rangeli* possui uma cópia do gene que codifica para proteína tuzina em seu genoma e possui todos os domínios conservados característicos, e, assim como nos demais tripanosomatídeos encontra-se intercaladas com amastinas da subfamília delta ( $\delta$ -amastinas);
- O gene da tuzina possui 1429 pares de bases e codifica uma proteína de 447 aminoácidos, de peso molecular de aproximadamente 50 kDa, sendo possível observar presença do domínio ATPase, assim como para tuzina de *T. cruzi*;
- A citolocalização predita indicou a posição de região transmembrana pra proteína tuzina de *T. rangeli*, através da identificação da presença de domínios de região transmembrana;
- Através da análise dos níveis de transcritos da tuzina de *T. rangeli* foi maior para tripomastigotas que para epimastigotas, quando foi observado o nível de expressão proteica não foi verificada diferença entre as formas evolutivas epimastigotas e tripomastigotas de *T. rangeli*, sendo assim, não é possível relacionar que a produção de níveis de transcritos e de expressão proteica da tuzina de *T. rangeli* seja estágio específica;
- Com base nos dados preliminares gerados por este trabalho, podemos constatar também que não existe relação entre quantidade de transcritos e proteína expressa entre os genes de amastinas e tuzina para *T. rangeli*.

## 5- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, M.J.; MORTARA, R.A. A century of research: what have we learned about the interaction of *Trypanosoma cruzi* with host cells? **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v: 104 (Suppl. I), p: 76-88, 2009.

AÑEZ, N. Early invasion of *Trypanosoma rangeli* into the haemolymph of *Rhodnius prolixus*. **T Roy Soc Trop Med Hyg**, n: 74, p: 422-423, 1980.

AÑEZ, N. Studies on *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920. 1. Deposition, migration and growth of *T. rangeli* in two mammals. **Canning Parasitological Topics. Special Publication of the Society of Protozoologists**, p: 19-25, 1981.

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**, n: 80, p: 149-153, 1985.

AÑEZ, N.; NIEVES, E.; CAZORLA, D. Studies on *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920. IX. Course of infection in different stages of *Rhodnius prolixus*. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, n: 82, p: 1-6, 1987.

ARAÚJO, P.; TEIXEIRA, S. Regulatory elements involved in the post-transcriptional control of stage-specific gene expression in *Trypanosoma cruzi*: a review. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v: 106, p: 257-266, 2011.

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.

BRENER, Z. Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. **Rev Inst Med Trop São Paulo**, n: 4, p: 389-96, 1962.

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**, n: 72, p: 248-254, 1976.

BUDAGIAN, V.; BULANOVA, E.; PAUS, R.; BUFONE-PAUS, S. IL-15/IL-15 receptor biology: a guided tour through an expanding universe. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, n: 17, p: 259–280, 2006.

BUSCAGLIA, C.A.; CAMPO, V.A.; ACC, F.; DI NOIA, J.M. *Trypanosoma cruzi* surface mucins: host-dependent coat diversity. **Nat Rev Microbiol**. v: 4, p: 229–236, 2006.

COUGHLIN, B.C.; TEIXEIRA, S.M.R.; KIRCHHOFF, L.V.; DONELSON, J.E. Amastin mRNA abundance in *Trypanosoma cruzi* is controlled by a 3'UTR untranslated region position-dependent cis-element and an untranslated region binding protein. **J Biol Chem**, v: 275, n:18, p:12051-12060, 2000.

CUBA, C.A.C. Review of biological and diagnostic aspects of *Trypanosoma (Herpetosoma) rangeli*. **Rev Soc Bras Med Trop São Paulo**, v: 31, p: 207-220, 1998.

CUBA, C.A.C. Estudo de uma cepa peruana de *Trypanosoma rangeli*. VI – Observações sobre sua evolução e morfogênese na hemocele e nas glândulas salivares de *Rhodnius ecuadoriensis*. **Rev Inst Med Trop São Paulo**, v: 17, p: 283-297, 1975.

CRUZ, M.C.; SOUZA-MELO, N.; VIEIRA-DA-SILVA, C.; DAROCHA, W.D.; BAHIA, D.; ARAÚJO, P.R.; TEIXEIRA, S.M.R.; MORTARA, R.A. *Trypanosoma cruzi*: role of delta amastin on extracellular amastigote cell invasion and differentiation. **PLoS One**, v: 7, e: 51804, 2012.

D'ALESSANDRO, A. Biology of *Trypanosoma (Herpetosoma) rangeli* Tejera, 1920, in: LUMSDEN, W.H.R. E EVANS, D.A. **Biology of Kinetoplastida: Academic Press**, London, v: 1, p: 328-403, 1976.

D'ALESSANDRO, A.; SARAVIA, N.G. *Trypanosoma rangeli*. In: KREIRER, J. P. & BAKER, **J P Parasitic Protozoa**, Academic Press, London, v: 2, p:1-54. 1992.

D'ALESSANDRO, A.; SARAVIA, N. G. *Trypanosoma rangeli*. In: HM, G. (Ed.). **In Protozoal Diseases**. London: Arnold. *Trypanosoma rangeli*, p: 398-412, 1999.

DE LEON, J. R. Trypanosomiasis humana por el *Trypanosoma rangeli* en Guatemala. **Publicaciones del Instituto de Investigaciones Científicas**, Universidad de San Carlos de Guatemala, v: 8, p: 12, 1952.

ENGVALL, E.; PEARLMANN, P. Enzyme-linked immunosorbent assay, Elisa. Quantitation of specific antibodies by enzyme-labeled antiimmunoglobulin in antigen-coated tubes. **J Immuno**, v: 109, n: 1, p: 129-135, 1972.

EGER-MANGRICH, I.; DE OLIVEIRA, M.A.; GRISARD, E.C.; DE SOUZA, W.; STEINDEL, M. Interaction of *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920 with different cell lines in vitro. **Parasitol Res**, v: 87, n: 6, p: 505-9, 2001.

ESHAGHI, M.; TAN, W.S.; CHIN, W.K.; YUSOFF, K. Purification of the extra-cellular domain of Nipah virus glycoprotein produced in *Escherichia coli* and possible application in diagnosis. **J Biotechnol**, v: 116, n: 3, p: 221-6, 2005.

FRANZÉN, O.; ARNER, E.; FERRELLA, M.; NILSSON, D.; RESPUELA, P.; CARNINCI, P.; HAYASHIZAKI, Y.; ÅSLUND, L.; ANDERSSON, B.; DAUB, C.O. The short non-coding transcriptome of the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*. **PLoS Negl Trop Dis**. v: 5(8), e: 1283, 2011.

FEDER, D.; GOMES, S.A.O.; GARCIA, E.S.; AZAMBUJA, P. Metalloproteases in *Trypanosoma rangeli*-infected *Rhodnius prolixus*. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, n: 94, p: 771-777, 1999.

FERREIRA, L.L.; LORENZO, M.G.; ELLIOT, S.L.; GUARNERI, A.A. A standardizable protocol for infection of *Rhodnius prolixus* with *Trypanosoma rangeli*, which mimics natural infections and reveals physiological effects of infection upon the insect. **J Invert Pathol**, n: 105, p: 91-97, 2010.

FONSECA, S.G.; REIS, M.M.; COELHO, V.; NOGUEIRA, L.G.; MONTEIRO, S.M.; MAICARENA, E.C.; BACAL, F.; BOCCHI, E.; GUILHERME, L.; ZHENG, X.X.; LIEW, F.Y.; HIGUCHI, M.L.; KALIL, J.; CUNHA-NETO, E. Locally produced survival cytokines IL-15 and IL-7 may be associated to the predominance of CD8+ T cells at heart lesions of human chronic Chagas disease cardiomyopathy. **Scandinavian Journal of Immunology**, n: 66, p: 362-371, 2007.

GARCIA, E.S.; MACHADO, E.M.M.; AZAMBUJA, P. Inhibition of hemocyte microaggregation reactions in *Rhodnius prolixus* larvae orally infected with *Trypanosoma rangeli*. **Exp Parasitol**, n: 107, p: 31-38, 2004.

GARCIA, E.S.; MELLO, C.B.; AZAMBUJA, P.; RIBEIRO, J.M. *Rhodnius prolixus*: Salivary antihemostatic components decrease with *Trypanosoma rangeli* infection. **Exp Parasitol**, n: 78, p: 287-293, 1994.

GAZOS-LOPES, F.; MESQUITA, R.D.; SILVA-CARDOSO, L.; SENNA, R.; SILVEIRA, A.B.; JABLONKA, W.; CUDISCHEVITCH, C.O.; CARNEIRO, A.B.; MACHADO, E. A.; LIMA, L. G.; MONTEIRO, R.Q.; NUSSENZVEIG, R. H.; FOLLY, E.; ROMEIRO, A.; PREVIATO, L.; OSWALDO-PREVIATO, J.; VALENZUELA, J.; RIBEIRO, J.M.C.; ATELLA, G.C.; SILVA-NETO, M.A.C. Glycoinositolphospholipids from trypanosomatids subvert nitric oxide production in bug salivary glands. **Plos One**, n: 7, v:10, e47285, 2012.

GOMES, S.A.O.; FEDER, D.; THOMAS, N.E.S.; GARCIA, E.S.; AZAMBUJA, P. *Rhodnius prolixus* infected with *Trypanosoma rangeli*: *in vivo* and *in vitro* experiments. **J Invertebr Pathol**, n: 73, p:289-293, 1999.

GOMES, S.A.O.; GRACIANO, G.L.; NOGUEIRA, N.F.S.; SOUZA, W.; GARCIA, E.S.; AZAMBUJA, P. Effects of gamma irradiation on the development of *Trypanosoma rangeli* in the vector *Rhodnius prolixus*. **J Invertebr Pathol**, n: 79, p: 86-92, 2002.

GOUY, M.; GUINDON, S.; GASCUEL, O. SeaView version 4: A multiplatform graphical user interface for sequence alignment and

- phylogenetic tree building. **Mol Biol Evol**, v: 27, p. 221-224, 2010.
- GREWAL, M.S. Pathogenicity of *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920 in the invertebrate host. **Exp Parasitol**, v: 6, p: 123-130, 1957.
- GRISARD, E.C.; CAMPBELL, D.A.; ROMANHA, A. J. Mini-exon gene sequence polymorphism among *Trypanosoma rangeli* strains isolated from distinct geographical regions. **Parasitology**, n: 118, p: 375-382, 1999.
- GROOT, H. Estudios sobre los trypanosomas humanos (*T. rangeli* y *T. ariarii*). **Ann Soc biol Bogotá**, n: 6, p: 109-126, 1954.
- GUEVARA, P.; DIAS, M.; ROJAS, A. *et al.* Expression of fluorescent genes in *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae): its application to parasite-vector biology. **J Med Entomol**, v: 42, p: 48-56, 2005.
- GUHL, F.; VALLEJO, G. A. *Trypanosoma* (Herpetosoma) *rangeli* Tejera, 1920: an updated review. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, n: 98, v: 4, p: 435-42, 2003.
- HECKER, H., SCHWARZENBACH, M. RUDIN, W. Development and interactions of *Trypanosoma rangeli* in and with the reduviid bug *Rhodnius prolixus*. **Parasitol Res**, n: 76, p: 311-318, 1990.
- HERBIG-SANDREUTER, A. Experimental study of the life cycle of *Trypanosoma rangeli* Tejera 1920 in warm-blooded animals and in *Rhodnius prolixus*. **Acta Trop**, n: 12, p: 261-264, 1955.
- JACKSON, P.A. The evolution of amastin surface glycoproteins in trypanosomatid parasites. **Mol Biol Evo**, n: 27, v: 1, p: 33-45, 2010.
- KANGUSSU-MARCOLINO, M.M.; PAIVA, R.M.C.; ARAÚJO, P.R.; MENDONÇA- NETO, R.P.; LEMOS, L.; BARTHOLOMEU, D.C.; MORTARA, R.A.; DAROCHA, W.D.; TEIXEIRA, S.M.R. Distinct genomic organization, mRNA expression and cellular localization of members of two amastin sub-families present in *Trypanosoma cruzi*. **BMC Microbiology**, n: 13, v: 10, 2013.

KANGUSSU-MARCOLINO, M. M. **Caracterização das novas subfamílias de amastinas e desenvolvimento de tecnologia para geração de nocautes condicionais em *Trypanosoma cruzi***. 151 f. Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Paraná, 2014.

KELLY, J. *et al.* A shuttle vector that facilitates the expression of transfected genes in *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania*. **Nucleic Acids Res.** v: 343, p: 153 - 161, 2005.

KIMA, P.E.; BURLEIGH, B.; ANDREWS, N.W. Surface-targeted lysosomal membrane glycoprotein-1 (Lamp-1) enhances lysosome exocytosis and cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. **Cell Microbiol**, n: 2, v: 6, p: 477-86, 2000.

KO, Y.G.; THOMPSON, G.A. Purification of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins by modified triton X-114 partitioning and preparative gel electrophoresis. **Anal Biochem**, n: 224, v: 1, p: 166-72, 1995.

KOERICH, L.B.; EMMANUELLE-MACHADO, P.; SANTOS, K.; GRISARD, E.C.; STEINDEL, M. Differentiation of *Trypanosoma rangeli*: high production of infective trypomastigote forms in vitro. **Parasitol Res**, n: 88, v: 1, p: 21-25, 2002.

LAKSHMI, B.S.; WANG, R.; MADHUBALA, R. Leishmania genome analysis and high-throughput immunological screening identifies tuzin as a novel vaccine candidate against visceral leishmaniasis. **Vaccine**. v: 24, n: 32(30), p: 3816-22. 2014.

Laibida, L.A.; FRAGOSO, S. P.; DAROCHA, W. D. Functional characterization of tuzin protein from *Trypanosoma cruzi*. **XXX Annual Meeting of the Society of Protozoology**, p: 192, 2014.

LEMOS, L.; KANGUSSO MARCOLINO, M. M.; TEIXEIRA, S. R. M.; DAROCHA, W. D. Identification and characterization of two alpha-amastins in *Trypanosoma cruzi*. **XXX Annual Meeting of the Society of Protozoology**, p: 166, 2014.

Livak KJ, Schmittgen TD: Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 2001, 25: 402–408.

LUCAST, L.J.; BATEY, R.T.; DOUDNA, J.A. Large-scale purification of a stable form of recombinant tobacco etch virus protease. **BioTechniques**, n: 30, p: 544-554, 2001.

LÜCKEMEYER, D. D. **Avaliação do perfil proteico de *Trypanosoma rangeli* durante o processo de diferenciação celular *in vitro***. 263 f. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Santa Catarina, 2014.

MAIA DA SILVA, F.; NAIFF, R.D.; MARCILI, A.; GORDOC, M.; D’AFFONSECA NETO, J.A.; NAIFF, M.F.; FRANCO, A.M.R.; CAMPANER, M.; VALENTE, V.; VALENTE, S.A.; CAMARGO, E.P.; TEIXEIRA, M.M.G.; MILES, M.A. Infection rates and genotypes of *Trypanosoma rangeli* and *T. cruzi* infecting free-ranging *Saguinus bicolor* (*Callitrichidae*), a critically endangered primate of the Amazon Rainforest. **Acta Trop**, n: 107, p: 168–173, 2008.

MARINI, V.; MORETTI1, E.; BERMEJO, D.; BASSO, B. Vaccination with *Trypanosoma rangeli* modulates the profiles of immunoglobulins and IL-6 at local and systemic levels in the early phase of *Trypanosoma cruzi* experimental infection. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, n: 106, v: 1, p: 32-37, 2011.

MARINKELLE, C.J. Pathogenicity of *Trypanosoma rangeli* for *Rhodnius prolixus* Stal in nature (Hemiptera: Reduviidae) (Kinetoplastida: Trypanosomatidae). **J Med Entomol**, n: 5, p: 497-499, 1968.

MARTÍNEZ-CALVILLO, S.; VIZUET-DE-RUEDA, J.C.; FLORENCIO-MARTÍNEZ, L.E.; MANNING-CELA, R.G.; FIGUEROA-ANGULO, E.E. Gene Expression in Trypanosomatid Parasites. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**. 2010.

MEDZHITOV, R.; JANEWAY, C.JR. Innate immune recognition: mechanisms and pathways. **Immunol Rev**, n: 173, p: 89–97, 2000.

- MEIRELLES, R.M.S.; HENRIQUES-PONS, A.; SOARES, M.J.; STEINDEL, M. Penetration of the salivary glands of *Rhodnius domesticus* Neiva & Pinto, 1923 (Hemiptera: Reduviidae) by *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920 (Protozoa: Kinetoplastida). **Parasitol Res**, n: 97, p: 259-269, 2005.
- MELLO, C.B.; NIGAM, GARCIA, E.S.; AZAMBUJA, P.; NEWTON, R.P.; RATCLIFFE, N.A. Studies on a Haemolymph Lectin Isolated from *Rhodnius prolixus* and Its Interaction with *Trypanosoma rangeli*. **Exp Parasitol**, n: 91, p: 289–296, 1999.
- MELLO, C.B.; GARCIA, E.S.; RATCLIFFE, N.A.; AZAMBUJA, P. *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli*: Interplay with hemolymph components of *Rhodnius prolixus*. **J Inverteb Pathol**, n: 65, p: 261-268, 1995.
- MINNING, T. A.; WEATHERLY, D. B.; ATWOOD, J., 3RD, ORLANDO, R.; TARLETON, R.L. The steady-state transcriptome of the four major life-cycle stages of *Trypanosoma cruzi*. **BMC Genomics**, v: 10, p: 370, 2009.
- MOLYNEUX, D. Division of the human trypanosome, *Trypanosoma* (Herpetosoma) *rangeli*. **Ann Trop Med Parasitol**, n: 67, p: 371-2, 1973.
- MORTARA, R.A.; ANDREOLI, W.K.; TANIWAKI, N.N.; FERNANDES, A.B.; SILVA, C.V.; *et al.* Mammalian cell invasion and intracellular trafficking by *Trypanosoma cruzi* infective forms. **An Acad Bras Cienc**, n: 77, p: 77–94, 2005.
- MYLER, P.J. Molecular variation in trypanosomes. **Acta Trop**, n: 53, p: 205-225, 1993.
- NOTREDAME, C.; HIGGINS, D.G.; HERINGA, J. T-Coffee: a novel method for fast and accurate multiple sequence alignment. **J. Mol. Biol.** v: 302, p: 205–217, 2000.
- OLIVEIRA, M.A.; SOUZA, W. An electron microscopic study of penetration by *Trypanosoma rangeli* into midgut cells of *Rhodnius prolixus*. **J Invertebrate Pathol**, n: 77, p: 22-26, 2001.

OSORIO, Y.; TRAVI, B.; PALMA, G.I.; SARAVIA, N.G. Infectivity of *Trypanosoma rangeli* in a promonocytic mammalian cell line. **J Parasito**, n: 81, p: 687-693, 1995.

DE PAIVA, R.M.; GRAZIELLE-SILVA, V.; CARDOSO, M.S.; NAKAGAKI, B.N.; MENDONCA-NETO, R.P.; CANAVACI, A.M.; SOUZA MELO, N.; MARTINELLI, P.M.; FERNANDES, A.P.; DAROCHA, W.D.; TEIXEIRA, S.M. Amastin knockdown in *Leishmania braziliensis* affects parasite-macrophage interaction and results in impaired viability of intracellular amastigotes. **PLoS Pathog**. v: 11, 2015.

PFÄFFL, M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Res**. v: 29, e: 45, 2001.

PIFANO, C.F.; MAYER, M.; MEDINA, R.; BENAÏM PINTO, E. Primera comprobacion de *Trypanosoma rangeli* en el organismo humano por cultivo de sangre periferica. **Arc Ven Patol Trop Parasitol Méd**, n: 1, p: 1-31, 1948.

QUANQUIN, N.M.; GALAVIZ, C.; FOUTS, D.L.; WRIGHTSMAN, R.A.; MANNING, J.E. Immunization of Mice with a ToLA-Like Surface Protein of *Trypanosoma cruzi* Generates CD41 T-Cell-Dependent Parasiticidal Activity. **Infection and Immunity**, n: 67, v: 9, p: 4603–4612, 1999.

REIS, A.B.; CARNEIRO, C.M.; CARVALHO, M.G.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; GIUNCHETTI, R.C.; MAYRINK, W.; GENARO, O.; CORRÊA-OLIVEIRA, R.; MARTINS-FILHO, O.A. Establishment of a microplate assay for flow cytometric assessment and its use for the evaluation of age-related phenotypic changes in canine whole blood leukocytes. **Vet Immunol Immunopathol**, n: 103, p: 173-185, 2005.

RAFATI, S.; HASSANI, N.; TASLIMI, Y.; MOVASSAGH, H.; ROCHETTE, A.; PAPADOPOULOU, B. Amastin peptide-binding antibodies as biomarkers of active human visceral Leishmaniasis. **Clin Vaccine Immunol**, n: 13, p: 1104–1110, 2006.

RAMIREZ, L.E.; LAGES-SILVA, E.; ALVARENGA-FRANCO, F.; MATOS, A.; VARGAS, N.; FERNANDES, O.; ZINGALES, B. High prevalence of *Trypanosoma rangeli* and *Trypanosoma cruzi* in opossums and triatomids in a formerly-endemic area of Chagas disease in Southeast Brazil. **Acta Trop**, n: 84, p: 189–198, 2002.

RENTIFO, S.; GROOT, H.; URIBE, C. Contribución al estudio de tripanosomas humanos y de animales en Colombia. **Rev Hyg**, n: 24, p: 4-12, 1950.

REY, L. *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. In: REY, L. **Parasitologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, Cap.11, p.138-152, 2001.

ROCHETTE, A.; MCNICOLL, F.; GIRARD, J. *et al.* Characterization and developmental gene regulation of a large gene family encoding amastin surface proteins in *Leishmania* spp. **Mol Biochem Parasitol**, v: 140, p: 205- 220, 2005.

RODRÍGUEZ, I.B.; BOTERO, A.; MEJÍA-JARAMILLO, A.M.; MARQUEZ, E.J.; ORTIZ, S.; SOLARI, A.; TRIANA-CHÁVEZ, O. Transmission dynamics of *Trypanosoma cruzi* determined by low-stringency single primer polymerase chain reaction and southern blot analyses in four indigenous communities of the Sierra Nevada de Santa Marta, Colombia. **Am J Trop Med Hyg**, n: 81, p: 396–403, 2009.

ROMERO, I.; TÉLLEZ, J.; ROMANHA, A.J.; STEINDEL, M.; GRISARD, E.C. Upregulation of cysteine synthase and cystathionine  $\beta$ -synthase contributes to *Leishmania braziliensis* survival under oxidative stress. **Antimicrob Agents Chemother**. v: 59(8), p: 4770-81, 2015.

SILVA, L.H.P.; NUSSENZWEIG, V. Sobre uma cepa de *Trypanosoma cruzi* altamente virulenta para o camundongo branco. **Folia Clin Biol**. v:20, p: 191-208, 1953.

SIEVERS, F., HIGGINS, D. G. . Clustal Omega. **Curr Protoc Bioinform**. v: 48, p:1.25.1- 1.25.33, 2014.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D.W. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. New York: Cold Spring Harbor. 2001.

SOUTO-PADRÓN, T. The surface charge of trypanosomatids. **An Acad Bras Cienc.** v: 74(4), p: 649-75, 2002

SOUSA, O.E.; JOHNSON, C.M. Frequency and distribution of *Trypanosoma rangeli* and *Trypanosoma cruzi* in the Republic of Panamá. **Am J Trop Med Hyg**, n: 20, v: 3, p: 405-410, 1971.

SOUSA, M.A.; FONSECA, T.S.; SANTOS, B.N.; PEREIRA, S.P.S.; CARVALHAL, C.; MORENO, A.M.H. *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920, in chronic Chagas' disease patients under ambulatory care at the Evandro Chagas Clinical Research Institute (IPEC-FIOCRUZ, Brazil). **Parasitol Res**, n: 103, p: 697-703, 2008.

SOUZA, W.; CARVALHO, T.M.U.; BARRIAS, E.S. Review on *Trypanosoma cruzi* host-cell interaction. **Int J Cell Biol**, n: 295394. 2010.

SCORZA, C.; URDANETA-MORALES, S.; TEJERO, F. *Trypanosoma* (Herpetosoma) *rangeli* Tejera, 1920. Preliminary report on histopathology in experimentally infected mice. **Rev Inst Med Trop**, n: 28, p: 371-378, 1986.

SCHLINDWEIN, A.D. **Estudo das sialidases de *Trypanosoma rangeli*: caracterização genômica e expressão heteróloga de uma trans-sialidase.** 197 f. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Santa Catarina, 2014.

SCHOTTELIUS, J. Neuraminidase fluorescent test for differentiation of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli*. **Tropical Medicine and Parasitology.** v: 38, p: 323-327, 1987.

STEINDEL, M.; PINTO, J. C.; TOMA, H. K.; MANGIA, R. H.; RIBEIRO- RODRIGUES, R.; ROMANHA, A. J. *Trypanosoma rangeli* (Tejera, 1920) isolated from a sylvatic rodent (*Echimyis dasythrix*) in Santa Catarina Island, Santa Catarina State: first report of this trypanosome in southern Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, n: 86, p: 73-9, 1991.

STEINDEL, M. Caracterização de cepas de *Trypanosoma cruzi* e *Trypanosoma rangeli* isoladas de reservatórios e vetores naturalmente

infectados de Santa Catarina, **Tese de Doutorado**, Belo Horizonte, UFMG. 1993.

STOBER, C.B.; LANGUE, U.G.; ROBERTS, M.T.; GILMARTIN, B.; FRANCIS, R.; ALMEIDA, R.; PEACOCK, C.S.; MCCANN, S.; BLACKWELL, J.M.; From genome to vaccines for Leishmaniasis: screening 100 novel vaccine candidates against murine *Leishmania major* infection. **Vaccine**, n: 24, p: 2602–2616, 2006.

STOCO, P.H. **Caracterização das DNA Topoisomerasas II de *Trypanosoma rangeli***. 163 f. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Santa Catarina, 2010.

STOCO, P. H.; WAGNER, G.; GERBER, A. *et al.*, Genome of the avirulent human- infective Trypanosome - *Trypanosoma rangeli*. **PLoS Negl Trop Dis**, n: 8, v: 9, e: 3176, 2014.

TANOURA, K.; YANAGI, T.; DE GARCIA, V. M.; KANBARA, H. *Trypanosoma rangeli*-in vitro metacyclogenesis and fate of metacyclic trypomastigotes after infection to mice and fibroblast cultures. **J Eukaryot Microbiol**, n: 46, p: 43-8, 1999.

TEIXEIRA, S.R.M.; KIRCHHOFF, L.V.; DONELSON, J. E. *Trypanosoma cruzi*: Suppression of Tuzin Gene Expression by Its 58-UTR and Spliced Leader Addition Site. **Exp Parasitology**, v: 93, p: 143–151, 1999.

TEIXEIRA, S.M.R.; KIRCHHOFF, L.V.; DONELSON, J.E. Pos-transcriptional elements regulating expression of mRNA of the amastin/tuzin gene cluster of *Trypanosoma cruzi*. **J Biol Chem**, v: 270, n: 38, p: 22586-22594, 1995.

TEIXEIRA, S.M.R.; RUSSELL, D.G.; KIRCHHOFF, L.V.; DONELSON, J.E. A differentially expressed gene family encoding “amastin”, a surface protein of *Trypanosoma cruzi* amastigotes. **J Biol Chem**, n: 269, v: 32, p: 20509-20516, 1994.

TEIXEIRA, S.M.; DAROCHA, W.D. Control of gene expression and genetic manipulation in the *Trypanosomatidae*. **Genet Mol Res** v: 2, p: 148-158, 2003.

TOBIE, E.J. Biological factors influencing transmission of *Trypanosoma rangeli* by *Rhodnius prolixus*. **J Parasitol**, n: 51, p: 837-841, 1965.

URDANETA-MORALES, S.; TEJERO, F. *Trypanosoma* (Herpetosoma) *rangeli* Tejera, 1920: mouse model for high, sustained parasitemia. **J Parasitol**, n: 71, p: 409-414, 1985.

VAZQUEZ, M.P.; LEVIN, M.J. Functional analysis of the regions of the TcP2 $\beta$  gene loci allow the construction of an improved *Trypanosoma cruzi* expression vector. *Gene*. v: 239, p: 217-225, 1999.

VALLEJO, G.A.; GUHL, F.; SCHAUB, G.A. Triatomine-*Trypanosoma cruzi/rangeli*: vector-parasite interactions. **Acta Trop**, n: 110, p: 137-147, 2009.

WU, Y.; FAKHRY, Y.E.; SERENO, D.; TAMAR, S.; PAPADOPOULOU, B. A new developmentally regulated gene family in *Leishmania* amastigotes encoding a homolog of amastin surface proteins. **Mol And Biochem Parasitology**, n: 110, p: 345-357, 2000.

YOSHIDA, N. Molecular basis of mammalian cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. **An Acad Bras Cienc**, n: 78, v: 1, p: 87-111, 2006.

ZUNIGA, C.; PALAU, T.; PENIN, P.; GAMALLO, C.; DE DIEGO, J. A. Characterization of a *Trypanosoma rangeli* strain of Colombian origin. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v: 92, n: 4, p: 523-530, 1997.



```

TrAma1_3  IHWGYRSDCD SPIWLNRTSIF IT-CEPVRKG IGVSAAFGMM TIIIVLFFALV CCGLLRHGL S-----
TrAma1_4  IHWGYRSDCD SPIWLNRTSIF IT-CEPVRKG IGVSAABSMM TIIIVLFFAAV CCGLLRHDL S-----
TrAma1_5  IHWGYRSDCD SPIWLNRTSIF IT-CEPVRKG IGVSAABSMM TIIIVLFFAAV CCGLLRHDL S-----
TrAma1_6  IHWGYRSDCD SPIWLNRTSIF IT-CEPVRKG IGVSAABSMM TIIIVLFFAAV CCGLLRHDL S-----
TrAma4_1  IHWGYRNRCD TVSSNRTQL LA-ONELGQL IGVGAABSIL SIMIMTAAVF FSLKALMDGR TEGRKRR--- -YDETPSRGE ERGQQQSRV
TrAma4_2  IHWGYRNRCD TVSSNRTQL LA-ONELGQL IGVGAABSIL SIMIMTAAVF FSLKALMDGR TEGRKRR--- -YDETPSRGE ERGQQQSRV
TrAma4_3  IHWGYRNRCD TVSSNRTQL LA-ONELGQL IGVGAABSIF SIMIMTAVLF FSLKALMDGR TEGRKRR--- -YDETPSRGE ERGQQQSRV
TrAma4_4  IHWGYRNRCD MVSNSNRTQL LA-NDLGQR IGVGAABSIF SIMIMTAVLF FSLKALMDGR TEGRKRR--- -YDETPSRGE ERGQQQSRV
TrAma4_5  IHWGYRNRCD MVSNSNRTQL LA-NDLGQR IGVGAABSIF SIMIMTAVLF FSLKALMDGR TEGRKRR--- -YDETPSRGE ERGQQQSRV
TrAma4_6  IHWGYRNRCD MVSNSNRTQL LA-NDLGQR IGVGAABSIF SIMIMTAVLF FSLKALMDGR TEGRKRR--- -YDETPSRGE ERGQQQSRV
tb11.01.0110 IHWGYRNRCD SVSFLTRQL LP-SAPRGR IGVGAABSII SICLLASIIY LTRISALAKY MSQYNAEG-- -QTPARRME SRSGILPAED
tb11.01.0100 IHWGYRNRCD KSYTYTNSL LK-SVGLRRV IGVGAABSII ATILAAALIG CCLIFKRDV FH-----
LmjF..281400 IHWGYSDNCD NSTYTRERLP YP-TPYIRRH IGVGAABSIV TLIVLIVNFA AAVIAVCCLT QAPHTIS--
LmjF.28.1390 IHWGYRNRCD TVSSNRTQL LQSRVRSI IGVGAABSII SVLASAATLV SSWVLCCLR EADRHVRSFS RYANMGEVAL AQEPDCNDGI ENGRQADAPV
LinJ.28.1500 IHWGYRNRCD TVSSNRTQL LQSRVRSI IGVGAABSII SVLASAATLV TSWVLCCLR EADRHVRSFS GYANMDEVAL AQEPDCNDGI ENGRQADAPV
Crithidia_ama28.2 IHWGYRSDCD SATYTYTRPL YP-SSNIRSR IGVGAABSII TLIVLYIINFV AVVIVICCLK SAPHKIS--

```

```

510 520 530 540 550 560 570 580
TrAma1_1  ----KLRIFA ALIHLIAFLF QMISPAVAS IFGSRHCEDA RUP-RRTANG VAFGMTLTSN FLIIGGGLAC ALLCVY----
TrAma1_2  ----KLRIFA ALIHLIAFLF QMISPAVAS IFGSRHCEDA RUP-RRTANG VAFGMTLTSN FLIIGGGLAC ALLCVY----
TrAma1_3  ----KLRIFA ALIHLIAFLF QMISPAVAS IFGSRHCEDA RUP-RRTANG VAFGMTLTSN FLIIGGGLAC ALLCVY----
TrAma1_4  ----KLRIFA ALIHLIAFAP QMISPAVAS IFEGRYCGDA RUP-RRTANG VAFGMTLTSN FFIIGGGLAC ALLCAC----
TrAma1_5  ----KLRIFA ALIHLIAFAP QMISPAVAS IFEGRYCGDA RUP-RRTANG VAFGMTLTSN FFIIGGGLAC ALLCAC----
TrAma1_6  ----KLRIFA ALIHLIAFAP QMISPAVAS IFEGRYCGDA RUP-RRTANG VAFGMTLTSN FFIIGGGLAC ALLCAC----
TrAma4_1  AVSSTSKWRI VGLAAALLC ETVCHMSAD TYASRYCNK APP-RRTTNG VAFGLLMSGN TAGLIALVLF VLVV-----
TrAma4_2  AVSSTSKWRI VGLAAALLC ETVCHMSAD TYASRYCNK APP-RRTTNG VAFGLLMSGN TAGLIALVLF VLVV-----
TrAma4_3  AVSSTSKWRI VGLAAALLC ETVCHMSAD TYASRYCNK APP-RRTTNG VAFGLLMSGN TAGLIALVLF VLVV-----
TrAma4_4  VVPSTSKWCI VGLAAALLC ETVCHMSAD TYASRYCNK APP-RRTTNG VAFGLLMSGN TAGLIALVLF VLVV-----
TrAma4_5  VVPSTSKWCI VGLAAALLC ETVCHMSAD TYASRYCNK APP-RRTTNG VAFGLLMSGN TAGLIALVLF VLVV-----
TrAma4_6  VVPSTSKWCI VGLAAALLC ETVCHMSAD TYASRYCNK APP-RRTTNG VAFGLLMSGN TAGLIALVLF VLVV-----
tb11.01.0110 SIVASNKWTI VAVGVVVVLC EVISPAVAS TVVSRFCEDA SLD-RNKVNG PEGALLVGT LFLFIMALVVF ALRA-----
tb11.01.0100 ----KWNLVV FVILCLTALV QLVSHMLVVT MFLLEFCEDT KOP-RRTANG VAFGMTLTSN ILVFLVSLVM KVFPKG----
LmjF..281400 ----LNSRVLV GTLGCVGALT QLVSHMLVVT IYNSG-HYAA GEL----AGV PEGMLNLSN VMHLLGVALV FAAPSHFVNR RQQRG
LmjF.28.1390 YDAGNLRKVI MIVVAFSLAC ELTCHALIFA IITERYCDEI YWSTTANG VAFGLLMSGN FAELIAYIGF VTVV-----
LinJ.28.1500 YDAGNLRKVI MIVVAFSLAC ELTCHALIFA IITERYCDEI YWSTTANG VAFGLLMSGN LAELIAYIGF VTVV-----
Crithidia_ama28.2 ----LTSRIVV GVIQFFIVVT QLVSHMLVVT IHSSHYCLEK GVL----AFV VAFGLNLSN IMNLLGIVLV TAIPLSDFVNR HQRS-

```

**Anexo 2:** Alinhamento múltiplo das sequências aminoacídicas das  $\beta$ 1/2 - amastinas de tripanosomatídeos. Em preto estão destacados os aminoácidos idênticos presentes na maioria das sequências listadas. Os aminoácidos similares estão representados em cinza. Em vermelho encontra-se a região de assinatura das amastinas. A identificação das sequências é pelo número de acesso no TriTrypDB ou descritas no trabalho de Jacson, 2010. *Crithidia*- *Crithidia fasciculata*; *LmjF*- *Leishmania major*; *LinJ*- *Leishmania infantum*; *TcCLB*- *Trypanosoma cruzi* CL Brener; *Tr* – *Trypanosoma rangeli*.

	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
TrAma6_1	.....MAFE	ALAGKVTSL	YMLCVCFYV	LVYVGTPEAQ	FGSMVYLG--	---GANMPKL	SCVALDMAK	GSIDGDLH	LGDVFCPTSA	SCLQQVQAR
TcCLB.509965.394	-----MGFE	TLAGRVGPEA	YMWACISFV	FAVSTPEAQ	FRGKGYLD--	---GGRESKL	SCVPLMGVKN	QETSNDLH	SSEIKCEGND	KRLHQLPQT
TcCLB.511497.19	-----MGFE	TLAGRVGPEA	YMWACISFV	FAVSTPEAQ	FRGKGYLD--	---GGKVSKL	SCVPLMGVKN	QETSNDLH	SSEINCNDND	KSLHQLPQT
LmjF.300860	-----MGFE	ALRGRMDVAL	SMLCSCIVFM	ELVTSAPISQ	FRGRGMN---	---VGGASKL	SCVPLWGLKN	DCANNNDYR	PTSIGCARSK	----QLBOVS
LmjF.30.0850	-----MGFE	ALRGRMDVAL	SMLCSCIVFM	ELVTSAPISQ	FRGRGMN---	---VGGASKL	SCVPLWGLKN	DCANNNDYR	PTSIGCARSK	----QLBOVS
LinJ.30.0920	-----MGFE	ALRGRMDVAL	SMLCSCIVFM	ELVTSAPISQ	FRGRGINASA	---TGGASKL	SCVPLWGLKN	DCANNNDYR	PTSIGCARSK	----QLBOVS
Crithidia_ama30.2	-----MGFE	TLRGLDVAL	NVLCSCVVEL	ELVTSAPVQ	FRGKGLKVA	DGTVSGGSKL	ACHVWGLKN	DCSKNNDYR	PADMACKKAA	----DLKQVS
TrAma7_1	MTTKKGFPPC	ECNKRIGATV	VLVACILSFV	ELVIGTPEAQ	LQPK-----	-----KESN	VCHLWTR-	KCNTPNDWC	V---NFDICT	-AMQSKFA
TcCLB.509051.20	MSKKKNFFVR	EYGRKGGATG	LLVACMVSFI	ELVIGTPEAQ	LQPK-----	-----LSSG	TCHLWTR-	PCNSPNDWC	V---NWDTC	-ARLRGQFG
TcCLB.509965.390	MSKKKNFFVR	EYGRKGGATG	LLVACMVSFI	ELVIGTPEAQ	LQPK-----	-----LSSG	TCHLWTR-	PCNSPNDWC	V---NWDTC	-ARLRGQFG
LmjF.30.0870	MANKKSFYNQ	EYSKHVAVI	LFIVSFTVAT	ELVCGTPEAQ	LMIRSWGEDL	SGSSAELELN	PCVPLWGLHS	DCSKPDYSIR	ITDSPIVNCS	-DMHVRGEAA
LinJ.30.0930	MANKKSFYNQ	EYSKHVAVI	LFIVSFTVAT	ELVCGTPEAQ	LMIRSWGEDL	SGSSAELELN	PCVPLWGLHS	DCSKPDYSIR	ITDSPIVNCS	-DMHVRGEAA
Crithidia_ama30.3	MAKKSIFYQQ	DYASHIGATI	LCVTSFLAVT	ELACGTEAQ	LMIRSWETS	PEYPGVTFDR	PCVPLWGLRN	NCWNAVTR	V-DPAIAQCG	-DIRSRGEAA

	110	120	130	140	150	160	170	180	190	200
TrAma6_1	QAPSHISICV	FLVSIITV-M	IFAPSSSQ-V	SMMIFAITGV	VTVLLEWACM	AVVHNRKMRV	-----	-----LDIRT	NWNQWKYGG	AERVVYAGWC
TcCLB.509965.394	QAPSHISIFL	TFASIIIVGM	LFNCRSTR-R	LTLLLAVASV	AALLLEWACM	AAVYKGSFQ	-----	-----TVFHD	NWRDWKYSS	AFGLFLGGWL
TcCLB.511497.19	QAPSHIS---	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
LmjF.300860	BAPSHVAVIV	SFLSCLMSGL	YFMCHKAK-V	LLVLLAVLEV	GFALHFWCM	TAVWHGNYCG	GSTVKINTSS	GKADGVPLGS	VLRESFKASA	GYGLTVAAWC
LmjF.30.0850	BAPSHVAVIV	SFLSCLMSGL	YFMCHKAK-V	LLVLLAVLEV	GFALHFWCM	TAVWHGNYCG	GSTVKINTSS	GKADGVPLGS	VLRESFKASA	GYGLTVAAWC
LinJ.30.0920	BAPSHVAVIV	SFLSCLMSGL	YFMCHKAK-V	LLVLLAVLEV	MFALHFWCM	TAVWHGNYCG	GSTVKINTSS	GKADGVPHGS	VLRESFKASA	GYGLTVAAWC
Crithidia_ama30.2	BAPSHVAVAVC	TCLSTVLGGL	FFIHKTK-I	ALYVLSALNV	VFTLHFWACM	TAVWYQNYCG	GSTVVISSTET	GSAAGIAYGK	QLRDNKYSSA	AYGLTVAAWC
TrAma7_1	BAPSTVAMLF	TVLFDIPFRY	CISGFNAKWW	AVVLLAVVSI	TSSLVWWSGV	SAHYSSYCG	-----	-----SDI	YHTYTKYGP	GFALFLTGLA
TcCLB.509051.20	BAPSTCALYF	AVVAGIGSWY	VLSSGSKK-W	LTVLSAIST	VSGLVWWSMV	ASIHNVKLCG	-----	-----SDT	YTSANTKYGP	GFALFVTGEV
TcCLB.509965.390	BAPSTCALYF	AVVAGIGSWY	VLSSGSKK-W	LTVLSAIST	VSGLVWWSMV	ASIHNVKLCG	-----	-----SDT	YTSANTKYGP	GFALFVTGEV
LmjF.30.0870	BAPSHVAIFPS	LVGLFGASWY	MICSKRIK-K	AVMLLAVFAI	GSTTVVVAIV	TAFYITPFQ	-----	-----LDF	LTNTHTRFGA	GYALLVTSFV
LinJ.30.0930	BAPSHVAIFPS	LVGLFGASWY	MICSKRIK-K	AVMLLAVFAI	GSTTVVVAIV	TAFYITPFQ	-----	-----LDF	LTNTHTRFGA	GYALLVTSFV
Crithidia_ama30.3	BAPSVVALFSS	LLFVLGASWY	KLCSNRIK-T	VVTLAAFTL	GSTTVVFAVV	TSFYITAFQ	-----	-----LDF	LTRNTRRYGA	GYALLVTSFSS

	210	220	230	240
TrAma6_1	IWVIGLWCLF	AIC-----	-----	-----
TcCLB.509965.394	VQLVGLVFL	AL-----	-----	-----
TcCLB.511497.19	-----	-----	-----	-----
LmjF.300860	TQVIGLWLLI	IM-----	-----	-----
LmjF.30.0850	TQVIGLWLLI	AM-----	-----	-----
LinJ.30.0920	TQVIGLWLLI	IM-----	-----	-----
Crithidia_ama30.2	IQVIGLWLLC	AM-----	-----	-----
TrAma7_1	VEFCGLVYFF	VLEYKHIYIT	-----GDKGR	RSRE-----
TcCLB.509051.20	VQFCGLLGLI	VLE-----	-----	-----
TcCLB.509965.390	VQFCGLLGLI	VLE-----	-----	-----
LmjF.30.0870	LQIVGLLFLV	IFEPNTSKK-	---LEENAKG	AASEVWSSTA SALR
LinJ.30.0930	LQIVGLLFLV	IFEPNTSKK-	---FEENEKR	AASEVWSSTA SALR
Crithidia_ama30.3	IQAVGLLFL	FLEPEIVEKK	TNKLEDAEKK	TASDAASSHS SN--

**Anexo 3:** Alinhamento múltiplo das sequências aminoacídicas das pδ - amastinas de tripanosomatídeos. Em preto estão destacados os aminoácidos idênticos presentes na maioria das sequências listadas. Os aminoácidos similares estão representados em cinza. Em vermelho encontra-se a região de assinatura das amastinas. A identificação das sequências é pelo número de acesso no TriTrypDB ou descritas no trabalho de Jacson, 2010. *Crithidia fasciculata*; LmjF- *Leishmania major*; LinJ- *Leishmania infantum*; TcCLB- *Trypanosoma cruzi* CL Brener; Tr – *Trypanosoma rangeli*.

	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
TrAma_1	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
TrAma_2	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----
TcCLB.507485.150	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----
TcCLB.507485.130	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----
TcCLB.507739.120	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----
TcCLB.511903.50	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----
TcCLB.511071.40	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----
TcCLB.506437.10	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----
TcCLB.506437.30	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----
TcCLB.509289.10	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----
LmjF.34.0970	MSSH	FCRV	GH	AV	CL	QL	LA	PI	FL	VG
LmjF.34.1050	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----
LmjF.34.0980	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----
Crithidia_ama34B.1	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----
Crithidia_ama34B.2	MCNA	FCRV	GH	AV	CL	QL	LA	PI	FL	VG
Crithidia_ama34B.3	MCNA	FCRV	GH	AV	CL	QL	LA	PI	FL	VG
	110	120	130	140	150	160	170	180	190	200
TrAma_1	FFFL	VTC	CC	KCEV	FAAM	SALG	VT	VM	VW	MA
TrAma_2	FFFL	VTC	CC	KCEV	FAAM	SALG	VT	VM	VW	MA
TcCLB.507485.150	ILG	VAAH	FYL	KSLK	IFAT	L	L	L	L	L
TcCLB.507485.130	ILG	VAAH	FYL	KSLK	IFAT	L	L	L	L	L
TcCLB.507739.120	ALG	VAAH	FCL	KSLK	IFAT	L	L	L	L	L
TcCLB.511903.50	ILG	VLSH	IYN	KSLR	TLTN	VL	VS	GM	VT	VG
TcCLB.511071.40	ILG	VLSH	IYN	KSLR	TLTN	VL	VS	GM	VT	VG
TcCLB.506437.10	ALG	VAAH	FCL	KSLK	IFAT	L	L	L	L	L
TcCLB.506437.30	ALG	VAAH	FCL	KSLK	IFAT	L	L	L	L	L
TcCLB.509289.10	ILG	VAAH	FCL	KSLK	IFAT	L	L	L	L	L
LmjF.34.0970	LIG	VML	CC	RCLR	WL	CL	LH	NLLA	TF	CG
LmjF.34.1050	LGSE	FLD	ACC	CYIK	V	CV	VL	NLLA	LA	LL
LmjF.34.0980	LGSE	FLD	ACC	CYIK	V	CV	VL	NLLA	LA	LL
Crithidia_ama34B.1	VLS	F	M	S	C	C	C	C	C	C
Crithidia_ama34B.2	IFG	F	M	S	C	C	C	C	C	C
Crithidia_ama34B.3	IFG	F	M	S	C	C	C	C	C	C
	210	220								
TrAma_1	VIVF	F	S	V	L	Q	V	L	R	L
TrAma_2	VIVF	F	S	V	L	Q	V	L	R	L
TcCLB.507485.150	AVV	L	R	L	R	V	L	---	---	---
TcCLB.507485.130	AVV	L	R	L	R	V	L	---	---	---
TcCLB.507739.120	AVV	L	R	L	R	V	L	---	---	---
TcCLB.511903.50	AVV	F	L	M	L	P	Y	S	R	L
TcCLB.511071.40	AVV	F	L	M	L	P	Y	S	R	L
TcCLB.506437.10	AVV	L	R	L	R	V	L	---	---	---
TcCLB.506437.30	AVV	L	R	L	R	V	L	---	---	---
TcCLB.509289.10	AVV	L	R	L	R	V	L	---	---	---
LmjF.34.0970	NIF	F	M	L	P	C	---	---	---	---
LinJ.34.1050	NIF	F	M	L	P	C	---	---	---	---
LmjF.34.0980	NIF	F	M	L	P	C	---	---	---	---
Crithidia_ama34B.1	NIF	F	M	L	P	C	---	---	---	---
Crithidia_ama34B.2	NIF	F	M	L	P	C	---	---	---	---
Crithidia_ama34B.3	NIF	F	M	L	P	C	---	---	---	---





TrAma3_3	AFDASGVCA	LLVYGMKGY	QND-TSLSS	VYAPFKDQNY	KFAESFYIIS	VACGLEFLISS	LFECFT----	-----
TrAma3_4	AFDASGVCA	LLVYGMKGY	QND-TSLSS	VYAPFKDQNY	KFAESFYIIS	VACGLEFLISS	LFECFLV----	-----
TcCLB.507159.60	AFVACVVCIA	LIVYGMRGY	QSD-AVLSS	QYGFPKDQY	KFSEAFYIIC	AAVCVFFVSS	FFQCCA----	-----
TcCLB.507159.80	AFVACVVCIA	LIVYGMRGY	QSD-AVLSS	QYGFPKDQY	KFSEAFYIIC	AAVCVFFVSS	FFQCCA----	-----
TcCLB.507485.45	AFBFCGVCA	VIVYGMKGF	QGG-GPISL	KFAPFKDQY	DFGVSFYIIC	AAVCVFFVSS	FFQCCA----	-----
TcCLB.507485.40	AFVACVVCIA	LIVYGMRGY	QSD-AVLSS	QYGFPKDQY	KFSEAFYIIC	AAVCVFFVSS	FFQCCA----	-----
TcCLB.507485.30	AFDASGVCA	LLVYGMKGY	QND-AVLSP	QYGFPKDQY	KFSEAFYIIC	AAVCVFFVSS	FFQCCA----	-----
TcCLB.507485.20	AFVACVVCIA	LIVYGMRGY	QSD-AVLSS	QYGFPKDQY	KFSEAFYIIC	AAVCVFFVSS	FFQCCA----	-----
TcCLB.507485.10	AFDASGVCA	LLVYGMKGY	QSD-AVLSP	QYGFPKDQY	KFSEAFYIIC	AAVCVFFVSS	FFQCCA----	-----
TcCLB.507673.60	AFDASGVCA	LLVYGMKGY	QSD-AVLSP	QYGFPKDQY	KFSEAFYIIC	AAVCVFFVSS	FFQCCA----	-----
TcCLB.507673.50	AFVACVVCIA	LIVYGMRGY	QSD-AVLSS	QYGFPKDQY	KFSEAFYIIC	AAVCVFFVSS	FFQCCA----	-----
TcCLB.507159.41	AFBFCGVCA	VIVYGMKGF	QGG-GPISL	KFAPFKDQY	DFGVSFYIIC	AAVCVFFVSS	FFQCCA----	-----
TcCLB.507159.50	AFDASGVCA	LLVYGMKGY	QSD-AVLSS	QYGFPKDQY	KFSEAFYIIC	AAVCVFFVSS	FFQCCA----	-----
TcCLB.507159.70	AFDASGVCA	LLVYGMKGY	QSD-AVLSS	QYGFPKDQY	KFSEAFYIIC	AAVCVFFVSS	FFQCCA----	-----
TcCLB.506199.10	AFDASGVCA	LLVYGMKGY	QSD-AVLSS	QYGFPKDQY	KFSEAFYIIC	AAVCVFFVSS	FFQCCA----	-----
TcCLB.506199.20	AFDASGVCA	LLVYGMKGY	QSD-AVLSS	QYGFPKDQY	KFSEAFYIIC	AAVCVFFVSS	FFQCCA----	-----
TcCLB.507673.70	AFVACVVCIA	LIVYGMRGY	QSD-AVLSS	QYGFPKDQY	KFSEAFYIIC	AAVCVFFVSS	FFQCCA----	-----
Tc MARK 2663	AFBFCGVCA	VIVYGMKGF	QGG-GPISL	KFAPFKDQY	DFGVSFYIIC	AAVCVFFVSS	FFQCCA----	-----
DQ04_01081110	AFVCGGCVG	LLVYGMKGY	QND-DLSLR	AYAPFKDQY	EFVEGFYIIC	AAVCVFFVSS	FFQCCA----	-----
AFBACVVCIA	LLVYGMKGY	QND-DLSLR	AYAPFKDQY	EFVEGFYIIC	AAVCVFFVSS	FFQCCA----	-----	
DQ04_09851020	AFBACVVCIA	LLVYGMKGY	QND-DLSLR	AYAPFKDQY	EFVEGFYIIC	AAVCVFFVSS	FFQCCA----	-----
DQ04_13341000	AFDASGVCA	LLVYGMKGY	QND-DLSLR	AYAPFKDQY	EFVEGFYIIC	AAVCVFFVSS	FFQCCA----	-----
DQ04_13341020	AFDASGVCA	LLVYGMKGY	QND-DLSLR	AYAPFKDQY	EFVEGFYIIC	AAVCVFFVSS	FFQCCA----	-----
DQ04_13341030	AFDASGVCA	LLVYGMKGY	QND-DLSLR	AYAPFKDQY	EFVEGFYIIC	AAVCVFFVSS	FFQCCA----	-----
DQ04_24521000	AFDASGVCA	LLVYGMKGY	QND-DLSLR	AYAPFKDQY	EFVEGFYIIC	AAVCVFFVSS	FFQCCA----	-----
TvY486_0403290	AVIASGCVG	LLVYGMKGY	QND-DALSG	QYAPFKDQY	TFDFGFYIIC	AAVCVFFVSS	FFQCCA----	-----
Tb427_04_3520	SLLGATTCIG	LIVYGMKGY	QSD-PKLRD	KYAPFKDQY	KIDVGSFYIIC	AAVCVFFVSS	FFQCCA----	-----
Tb927_4_3520	SLLGATTCIG	LIVYGMKGY	QSD-PKLRD	KYAPFKDQY	KIDVGSFYIIC	AAVCVFFVSS	FFQCCA----	-----
Tb972_4_3520	SLLGATTCIG	LIVYGMKGY	QSD-PKLRD	KYAPFKDQY	KIDVGSFYIIC	AAVCVFFVSS	FFQCCA----	-----
TcIL3000_0_03260	AFDASGVCA	LLVYGMKGY	QND-KSLSE	KYAPFKDQY	KIDVGSFYIIC	AAVCVFFVSS	FFQCCA----	-----
TeVST1805_4_3610	SLLGATTCIG	LIVYGMKGY	QSD-PKLRD	KYAPFKDQY	KIDVGSFYIIC	AAVCVFFVSS	FFQCCA----	-----
CFAC1_120011400	TBALFVAVA	TVVVFVADT	QND-AV-	SMSSYNDQY	KIVEGFYIIC	VAGGFYIIT	FLEICS----	-----
CFAC1_120011700	AFACCGVALA	LSAYSFKDQY	QSGT-DT--	----FESACF	KIVEGFYIIC	VAGGFYIIT	FLEICS----	-----
CFAC1_120012700	AFACVYVVA	MMANVMKGS	QTS--SSV	AALKDDAPY	SLVEGFYIIC	VAGGFYIIT	FLEICS----	-----
EMOLV88_160009500	AFACCGVALA	LSAYSFKDQY	QSGT-DT--	----FESACF	KIVEGFYIIC	VAGGFYIIT	FLEICS----	-----
EMOLV88_160009600	AFACCGVALA	LSAYSFKDQY	QSGT-DT--	----FESACF	KIVEGFYIIC	VAGGFYIIT	FLEICS----	-----
LAEL147_000010700	TBALFVAVA	TVVVFVADT	QND-NAT-	RVALRHQY	IFVEGFYIIC	VAFGFLIAM	FLEVCS----	-----
LinJ.16.0480	TBALFVAVA	TVVVFVADT	QND-NAT-	RVALRHQY	IFVEGFYIIC	VAFGFLIAM	FLEVCS----	-----
LinJ.16.0500	SLACCGATLG	LIVYGMKGY	QSD-KT--	QIPAKEDQY	QIAEGFYIIC	VAFGFLIAM	FLEVCS----	-----
LinJ.16.0470	TBALFVAVA	TVVVFVADT	QND-DAT-	RVALRHQY	IFVEGFYIIC	VAFGFLIAM	FLEVCS----	-----
LinJ.16.0490	SLACCGATLG	LIVYGMKGY	QSD-KT--	QIPAKEDQY	QIAEGFYIIC	VAFGFLIAM	FLEVCS----	-----
LpyrH10_15_0520	AFBFCGVCA	VIVYGMKGF	QGG-GPISL	KFAPFKDQY	DFGVSFYIIC	AAVCVFFVSS	FFQCCA----	-----