

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA, IMUNOLOGIA E  
PARASITOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E  
BIOCIÊNCIAS**

**ALINE DAIANE SCHLINDWEIN**

*Estudo das sialidases de Trypanosoma rangeli: caracterização genômica e  
expressão heteróloga de uma trans-sialidase*

**FLORIANÓPOLIS  
2014**

Aline Daiane Schlindwein

**Estudo das sialidases de *Trypanosoma rangeli*: caracterização genômica e expressão heteróloga de uma trans-sialidase**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Biotecnologia e Biociências.

Orientadores: Prof. Dr. Edmundo C. Grisard

Dr<sup>a</sup> Patrícia Hermes

Stoco

FLORIANÓPOLIS  
2014

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

Schindwein, Aline Daiane

Estudo das sialidases de *Trypanosoma rangeli* :  
caracterização genômica e expressão heteróloga de uma trans-  
sialidase / Aline Daiane Schindwein ; orientador, Edmundo  
Carlos Grisard ; coorientador, Patricia Hermes Stoco. -  
Florianópolis, SC, 2014.  
195 p.

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

Inclui referências

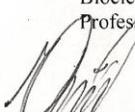
1. Biotecnologia e Biociências. 2. Trans-sialidases. 3.  
gp82. 4. *Trypanosoma rangeli*. 5. *Trypanosoma cruzi*. I.  
Grisard, Edmundo Carlos . II. Stoco, Patricia Hermes. III.  
Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-  
Graduação em Biotecnologia e Biociências. IV. Título.

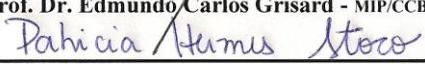
**“Estudo das sialidases de *Trypanosoma rangeli*: caracterização genômica e expressão heteróloga de uma trans-sialidase”.**

por

**ALINE DAIANE SCHLINDWEIN** Tese julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da Banca Examinadora (Port. 012/PPGBTC/2014) do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências - UFSC, composta pelos Professores Doutores:

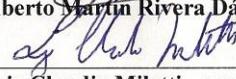
Orientadores:

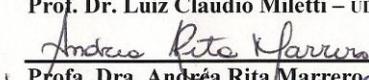
  
\_\_\_\_\_  
**Prof. Dr. Edmundo Carlos Grisard - MIP/CCB/UFSC**

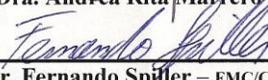
  
\_\_\_\_\_  
**Dra. Patrícia Hermes Stoco - PPGBTC/CCB/UFSC**

Banca Examinadora:

  
\_\_\_\_\_  
**Prof. Dr. Alberto Martín Rivera Dávila - Fiocruz/IOC**

  
\_\_\_\_\_  
**Prof. Dr. Luiz Claudio Miletto - UDESC/CAV**

  
\_\_\_\_\_  
**Profa. Dra. Andréa Rita Marrero - BEG/CCB/UFSC**

  
\_\_\_\_\_  
**Prof. Dr. Fernando Spiller - FMC/CCB/UFSC**

Coordenador:

  
\_\_\_\_\_  
**Prof. Dr. Marcelo Maraschin**

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências

Florianópolis, 30 de maio de 2014.

Ao meu Amor, Welton, pelas alegrias,  
pelo companheirismo em todos os  
momentos, pela paciência, por ter me  
dado meu maior presente, por  
acreditar em mim e por estar sempre  
ao meu lado.

A razão do meu viver, Vicente. Meu  
melhor experimento!

Aos meus pais Romario e Lucia pelo  
amor incondicional, apoio e conselhos.

## AGRADECIMENTOS

No caminho que percorri para a conclusão desta etapa aprendi muitas coisas, mas talvez a mais valiosa delas seja que por trás de um trabalho nunca há uma pessoa só. Como diz o provérbio africano “*Se quiser ir rápido, vá sozinho. Se quiser ir longe, vá em grupo.*” Por isso dedico este espaço a cada uma das pessoas que fizeram parte desta caminhada, tornando esta jornada muito mais produtiva e alegre, meus sinceros agradecimentos:

À Deus, por ter iluminado meu caminho, me dar vida e força para continuar superando os obstáculos e continuar buscando meus objetivos. Agradeço por todas as dificuldades, tristezas e alegrias que hoje me tornaram um ser humano mais forte. Obrigada por orientar meus passos e permitir que eu chegasse hoje até aqui.

Aos meus pais, Romario Schlindwein e Lucia Brixius Schlindwein, por toda a dedicação e carinho com os quais educaram a mim e minhas irmãs (Vanessa e Fernanda). Agradeço pelo amor, apoio, encorajamento em todos os momentos da minha vida e pelos sacrifícios que fizeram para nos dar uma educação de qualidade. E eu bem sei que não foi fácil, abdicando muitas vezes dos sonhos de vocês para viver os nossos. A minha conquista hoje, na verdade é nossa. Amo vocês!

As minhas irmãs, Fernanda Danielle Schlindwein e Vanessa Cristiane Schlindwein, obrigada pela valiosa presença sempre, pela compreensão e pelas críticas. O amor de vocês me sustenta; vocês são meu porto seguro.

Ao meu amor, esposo e companheiro, Welton Pedro D’Ávila Nunes, por ter compartilhado os bons momentos e também os momentos mais difíceis, pela compreensão e amor. Você acreditou em mim mesmo quando eu mesma não acreditava mais... Minhas conquistas certamente trazem muito de ti. Obrigada principalmente pelo maior presente que Deus poderia me dar, o Vicente.

Ao meu amado filho Vicente Schlindwein Nunes. Você me trouxe uma alegria incalculável, importantes lições de vida e uma força interior que, sem sua presença, não teria encontrado. Você tornou minha vida mais leve e deixou os meus dias mais iluminados. Amo-te muito meu anjinho!!!

A todos os demais integrantes desta grande família (cunhados – os dois Andrés, Leandro e Pedro, cunhada – Leliane, sogro- Pedro e sogra- Marli) pelo carinho e compreensão em todos os momentos desta trajetória.

A Professora Patrícia Hermes Stoco primeiramente pela oportunidade de ser sua primeira orientanda de doutorado. Obrigada por todas as ideias, sugestões, críticas, pela incansável paciência e pela imensa ajuda. Sem você esta tese não existiria! Agradeço por tê-la conhecido, você é um exemplo admirável a ser seguido. Obrigada por todo o carinho e amor a mim dispendido e por compartilhar o teu conhecimento comigo.

Ao Professor Edmundo Carlos Grisard pela oportunidade de realizar este trabalho, pela orientação, pelo aprendizado e pelas discussões científicas sempre voltadas a incitar o espírito crítico.

Ao Professor Mário Steindel pelas inúmeras oportunidades de aprendizado e atenção e por me ajudar a trilhar um caminho com muita maturidade e sabedoria.

Ao Álvaro Menin pela ajuda fundamental na realização do ensaio de histopatologia e nas análises.

Aos funcionários do Laboratório Central de Saúde Pública de Santa Catarina (LACEN-SC) (minha nova casa) especialmente aos setores de Biologia Molecular (Sandra Bianchini Fernandes, Mariza Hoffmann Machado, Leila Chirliane Dalmolin Pereira, Adriana da Cruz Machado, Raquel de Souza Rodrigues, Senele Ana de Alcântara Beletini, Everaldo Fiametti, Rosângela Elisabeth Kuhnen e Tatiana Xavier), Tuberculose (Darcita Buerger Rovaris, Ecilda Dutra da Rosa, Pedro Paulo Vieira e Shirley) e Qualidade (Karina Scarduelli Luciano). Obrigada por confiarem e acreditarem em mim. Por me ouvirem e tentarem me ajudar em muitos momentos.

A todos os integrantes e ex-integrantes do Laboratório de Protozoologia: Ingrid Thais Beltrame Botelho, Ibeth Cristina Romero Calderón, Jair Alexander Téllez Meneses, Carolina Marin Rocha Coelho, Celina Noriko Yamanaka, Elisa Beatriz Prestes, Glauber Wagner, Danielle Tocantins Moura Costa, Milene Hoehr de Moraes, Debora Denardin Lückemeyer, Greicy Brisa Malaquias Dias, Vagner Miranda Portes, Ana Paula Gruending, Ana Paula Machado do Nascimento, Carime Lessa

Mansur Pontes, Laís Eiko Yamanaka, Gustavo Daniel Campagnaro, Kamille Duarte Uggioni, Maiko Luis Tonini, Mariel Asbury Marlow, Mayara Thais Fernandes, Ninna Granucci e Thaynara Karoline de Souza Pereira. Obrigada pela amizade, por todas as discussões científicas e “à toa”, pelas ajudas indispensáveis desde o básico até a discussão de experimentos e resultados importantes. Vocês foram como uma família no ambiente de trabalho.

As minhas amigas e também companheiras de laboratório, Carolina Marin Rocha Coelho, Ingrid Thais Beltrame Botelho e Ibeth Cristina Romero Calderón, meu agradecimento especial. Com vocês compartilhei muitos momentos, discutimos e conversamos bastante, vocês me deram muitos conselhos e também compartilharam comigo de uma dádiva, a de ser mãe.

A Celina Noriko Yamanaka. Pelas conversas, pela cumplicidade, pela sensibilidade, pelo carinho e paciência, pelas ajudas e por todos os momentos agradáveis que passamos juntas.

A Danielle Tocantins Moura Costa pelas madrugadas e finais de semana que passou comigo no laboratório não deixando que eu perdesse o “foco” nas fotos de imunofluorescência. Obrigada pelo carinho!

A todos os demais colegas e amigos dos Laboratórios de Virologia Aplicada (LVA), de Imunologia Aplicada (LIA) e de Imunologia e doenças infecciosas (LIDI) pelo companheirismo, paciência, conversas de corredor, ensinamentos, pelos momentos de alegria e amizade. A experiência não teria sido completa sem vocês.

Ao pessoal do LAMEB, Vanessa, Bibiana e Denis, pela aquisição dos dados para alguns experimentos e pela paciência com as minhas correrias com estes.

Aos professores do Programa de Pós graduação em Biotecnologia e Biociências por contribuir para o meu crescimento profissional.

À CAPES pela concessão da bolsa.

A todos os amigos e colegas que não pude mencionar aqui, mas que passaram pela minha vida e que de alguma maneira contribuíram para a minha formação, amadurecimento profissional e pessoal nestes últimos

anos.

À vida, por ser tão maravilhosa, cheia de tantas alegrias e tristezas, tantos momentos especiais, oportunidades, amizades, risadas, tantas noites de trabalhos, tantos finais de semana, tantos acertos e erros, tantos exemplos, tantas flores, tantos sonhos e tantas realidades.

*Aline Daiane Schlindwein*

Não existem erros, apenas lições. O crescimento é um processo de tentativa e erro: experimentação. As experiências que não deram certo fazem parte do processo, assim como as bem-sucedidas. As respostas estão dentro de você. Tudo o que tem a fazer é analisar, ouvir e acreditar.

*Albert Einstein*

## RESUMO

A família das trans-sialidases (TS) é a maior família gênica de *Trypanosoma cruzi*. O grupo II da superfamília TS reúne diversas glicoproteínas (entre elas, a gp82 e a gp85) presentes na superfície das formas tripomastigotas do *T. cruzi*. A gp82 está envolvida no processo de adesão do parasito à célula hospedeira e a gp85 na adesão e penetração. Embora sialidases estejam presentes no *T. rangeli*, a função destas proteínas no ciclo de vida deste parasito ainda não foi esclarecida. Em função disso, o objetivo deste estudo foi estudar os genes de *T. rangeli* relacionados à superfamília das TS e avaliar a expressão heteróloga da gp82 de *T. cruzi* por *T. rangeli* (*T. rangeli*-gp82). Inicialmente, foram identificadas no genoma do *T. rangeli* oito ORFs completas similares a gp82 e gp85 de *T. cruzi*. Por se tratar de várias cópias gênicas, diferentes sequências foram analisadas a partir de amplificação e clonagem destes genes em duas cepas de *T. rangeli*. As sequências avaliadas continham de um a dois motivos Asp, um motivo subterminal, sítio de ancoramento a GPI e um domínio que pertence a superfamília das glucanases/lectina tipo Concanavalina A. Após a obtenção da cepa recombinante *T. rangeli*-gp82, observou-se que a gp82 foi expressa na superfície dos parasitos de forma semelhante ao *T. cruzi*. Além disso, a expressão da gp82 não interferiu nos padrões de crescimento e de diferenciação *in vitro* do *T. rangeli*. Em ensaios de interação destes parasitos com células Vero, verificamos um maior número de parasitos da cepa *T. rangeli*-gp82 nas células hospedeiras em relação à cepa selvagem, além de um maior número de parasitos aderidos às células em relação as demais cepas analisadas. Tanto as formas epimastigotas quanto tripomastigotas de *T. rangeli*-gp82 foram capazes de mobilizar cálcio intracelular. Estes resultados diferem do observado na interação com células THP-1, onde não verificamos diferença significativa entre *T. rangeli*-gp82 e as demais cepas analisadas. Em triatomíneos, verificamos que a cepa *T. rangeli*-gp82 apresenta desenvolvimento semelhante à cepa selvagem, sendo capaz de colonizar a hemolinfa e invadir as glândulas salivares de *R. prolixus*. Em camundongos, tripomastigotas de todas as cepas de *T. rangeli* foram observados na corrente sanguínea de animais C57BL/6 infectados via intraperitoneal, porém não foi observada proliferação, sendo a cinética parasitêmica similar para todas as cepas do *T. rangeli*. Quando estes camundongos foram desafiados com *T. cruzi*, não observamos alteração na parasitemia deste parasito em relação à infecção controle, entretanto houve uma diminuição do parasitismo tecidual por este parasito nos

animais pré-infectados com as três cepas de *T. rangeli*, principalmente *T. rangeli*-selvagem e GFP. Com estes resultados, podemos inferir que a proteína gp82 facilita a adesão e penetração do parasito a célula hospedeira, entretanto a expressão desta proteína pelo *T. rangeli* não promove uma proteção substancial contra a infecção por *T. cruzi*.

**Palavras-chave:** Trans-sialidases, gp82, *Trypanosoma rangeli*, *Trypanosoma cruzi*.

## ABSTRACT

The family of trans- sialidases (TS) gene family is the largest of *Trypanosoma cruzi*. Group II of the TS superfamily comprises several glycoproteins (including gp82 and gp85) on the surface of trypomastigotes of *T. cruzi*. The gp82 is involved in the adhesion of the parasite to the host cell and gp85 in adhesion and penetration process. While sialidases are present in *T. rangeli*, the function of these proteins in the life cycle of this parasite has not yet been clarified. As a result, the objective of this study was to study the genes of *T. rangeli* related superfamily of TS and evaluate the heterologous expression of gp82 from *T.cruzi* by *T. rangeli* (*T. rangeli*-gp82). Initially identified in the *T. rangeli* genome eight ORFs like gp82 and gp85 from *T. cruzi*. Because it is several gene copies, different sequences were analyzed from amplification and cloning of these genes in two strains of *T. rangeli*. The sequences contained one ore two motifs Asp, one subterminal motif, the GPI anchoring site and a motif that belongs to the superfamily of glucanases/type lectin Concanavalin A. After obtaining the recombinant strain *T. rangeli*-gp82, it was observed that gp82 was expressed on the surface of parasites similarly to *T. cruzi*. Furthermore, the expression of gp82 did not affect patterns of growth and differentiation in vitro of *T. rangeli*. In studies of the interaction of these parasites with Vero cells, we observed a greater number of parasites of *T. rangeli*-gp82 in host cells compared to wild type strain, and a greater number of parasites attached to the cells compared with other strains analyzed. Both epimastigotes and trypomastigotes of *T. rangeli* -gp82 were able to mobilize intracellular calcium. These results differ from that observed in the interaction with THP-1 cells, where we find no significant difference between *T. rangeli*-gp82 and the other strains analyzed. In triatomines, we found that the strain *T. rangeli*-gp82 features similar to the wild type strain development, being able to colonize the hemolymph and invade the salivary glands of *R. prolixus*. In mice, all strains trypomastigotes of *T. rangeli* were observed in the bloodstream of C57BL/6 mice infected intraperitoneally but not proliferation was observed, and the parasitemia kinetics similar for all strains of *T. rangeli*. When these mice were challenged with *T. cruzi*, we observed no change in parasitemia of this parasite in relation to infection control, however there was a decrease in tissue parasitism by this parasite in animals pre-infected with three strains of *T. rangeli*, mainly *T. rangeli* wild and *T. rangeli* -GFP. With these results, we can infer that the gp82 protein facilitates parasite adhesion and penetration of the host

cell, however the expression of this protein by *T. rangeli* does not promote substantial protection against infection with *T. cruzi*.

**Keywords:** Trans-sialidases, gp82, *Trypanosoma rangeli*, *Trypanosoma cruzi*.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Microfotografia da forma tripomastigota sanguínea do *Trypanosoma rangeli* em sangue de camundongo experimentalmente infectado (corado por Giemsa) (aumento de 1.000X)..... 28
- Figura 2.** Mapa das Américas mostrando a sobreposição da distribuição da doença de Chagas humana até 1992 (sombreado) e os relatos da presença do *Trypanosoma rangeli* em humanos, triatomíneos ou animais silvestres (•).....29
- Figura 3.** Representação esquemática do ciclo biológico do *Trypanosoma rangeli* no hospedeiro invertebrado. A infecção do triatomíneo ocorre pela ingestão de formas tripomastigotas sanguíneas durante o repasto (A), sendo as formas tripomastigotas e epimastigotas predominantes no intestino médio (B). Formas epimastigotas curtas se dividem no intestino médio e podem invadir a hemocele (C), onde replicam de forma livre como epimastigotas longos. Alguns parasitos podem invadir hemócitos (D), sendo desconhecida a capacidade de multiplicação no interior desta célula. As formas epimastigotas longas aderem e penetram na glândula salivar (E) diferenciando-se em seu interior em tripomastigotas metacíclicos (F) infectantes que são inoculados com a saliva durante o repasto sanguíneo.....32
- Figura 4.** A) Transferência de ácido siálico de glicoconjugados do hospedeiro para unidades  $\beta$ -galactopiranosil de mucinas. A transferência é específica para a posição 3 da unidade  $\beta$ -galactopiranosil terminal. ● Oligossacarídeo ligado ao glicoconjugado mamífero. ● Oligossacarídeo na mucina de *Trypanosoma cruzi*. B) Trans-sialidase de *T. cruzi* (TcTS) ancorada a glicosilfosfatidilinositol (GPI) transfere o ácido siálico de glicoconjugados da célula hospedeira para mucinas ancoradas a GPI na superfície do parasito.....40
- Figura 5.** Representação esquemática do protótipo de cada grupo da superfamília das trans-sialidasas (TS) de *Trypanosoma cruzi*. Em vermelho destaca-se o domínio VTV, a caixa azul simboliza o domínio Asp e a caixa verde simboliza o domínio FRIP. Na região carboxi-terminal destaca-se o sinal para ancoragem por GPI (glicosilfosfatidilinositol) (caixa amarela). O peptídeo sinal está simbolizado pela caixa cinza e as repetições pela caixa preta. Os motivos são apresentados apenas quando eles ocorrem na maioria das proteínas daquele grupo. O número entre parênteses indica o número de ocorrência de cada motivo. O tamanho das proteínas em cada grupo

pode variar.....	42
<b>Figura 6.</b> Alinhamento parcial das sequências aminoacídicas de gp82 de <i>Trypanosoma cruzi</i> oriundas do <i>National Center for Biotechnology Information</i> (2010). Os espaços são indicados por traços. A caixa vermelha aberta indica o motivo ASP (SxDxGxTW) e a caixa azul o motivo subterminal (VTVxNVxLYNR). .....	61
<b>Figura 7.</b> Alinhamento parcial das sequências aminoacídicas de gp85 de <i>Trypanosoma cruzi</i> oriundas do <i>National Center for Biotechnology Information</i> (2010). Os espaços são indicados por traços. A caixa vermelha aberta indica o motivo ASP (SxDxGxTW) e a caixa azul o motivo subterminal (VTVxNVxLYNR).....	61
<b>Figura 8.</b> Alinhamento das sequências nucleotídicas de gp82 (EF154827.1) e gp85 (M64836.1) de <i>Trypanosoma cruzi</i> utilizando o programa <i>Pairwise Sequence Alignment</i> . Os pontos entre as sequencias indicam nucleotídeos diferentes e os traços indicam nucleotídeos iguais.....	63
<b>Figura 9.</b> Sequência nucleotídica e aminoacídica completa da ORF identificada no <i>contig</i> 01808 de <i>Trypanosoma rangeli</i> .....	69
<b>Figura 10.</b> Representação esquemática da distribuição dos iniciadores desenhados para a amplificação das sialidasas do grupo II (similares as glicoproteínas de 82 e/ou 85 kDa de <i>Trypanosoma cruzi</i> ) em <i>Trypanosoma rangeli</i> . A barra azul representa o quadro aberto de leitura da ORF identificada no <i>contig</i> 01808 de <i>T. rangeli</i> . As setas pretas indicam os iniciadores utilizados para a obtenção do fragmento e a barra preta o tamanho do fragmento gerado de acordo com os iniciadores utilizados.....	70
<b>Figura 11.</b> Eletroforese em gel de agarose a 1% corado pelo brometo de etídeo mostrando o produto de amplificação de 1.632 pb correspondente a região central da glicoproteína de <i>Trypanosoma rangeli</i> similar ao grupo II das TS de <i>Trypanosoma cruzi</i> . PPM: Padrão de Tamanho Molecular (fago lambda/ <i>Hind</i> III e <i>Eco</i> RI). 1: amostra positiva referente a cepa Choachí. 2: controle negativo (sem adição de DNA).....	71
<b>Figura 12.</b> Alinhamento das sequências aminoacídicas das sialidasas do grupo II de <i>Trypanosoma rangeli</i> cepa Choachí com a ORF do <i>contig</i> 1808. Os espaços são indicados por traços. A caixa vermelha aberta indica o motivo ASP (SxDxGxTW).....	74
<b>Figura 13.</b> Alinhamento das sequências aminoacídicas das sialidasas do grupo II de <i>Trypanosoma. rangeli</i> cepa SC-58 com a ORF do <i>contig</i> 1808. Os espaços são indicados por traços. A caixa vermelha aberta indica o motivo ASP (SxDxGxTW) e a caixa azul o motivo subterminal (VTVxNVxLYNR).....	76

**Figura 14.** Alinhamento da sequência aminoacídica do contig82 pertencente ao grupo II das sialidases de *Trypanosoma rangeli* (cepa SC-58) com a ORF do contig 01808. Os espaços são indicados por traços. A caixa azul aberta indica o motivo ASP (SxDxGxTW), a caixa vermelha o motivo subterminal (VTVxNVxLYNR), a caixa verde o peptídeo sinal e a caixa laranja o sinal para ancoragem a GPI.....78

**Figura 15.** Representação esquemática do protótipo do grupo II da família das sialidases de *Trypanosoma rangeli* comparada ao grupo II da superfamília das TS de *Trypanosoma cruzi*. Ao longo da sequência são apresentados os motivos ASP (SxDxGxTW) e subterminal (VTVxNVxLYNR). Na região carboxi-terminal destaca-se o sinal para ancoragem por GPI (glicosilfosfatidilinositol) (caixa amarela). O peptídeo sinal está simbolizado pela caixa cinza escura e a ausência de peptídeo sinal pela caixa cinza clara. Os números abaixo das sequências indicam a posição aproximada dos determinados motivos nas sequências. O tamanho das proteínas em cada grupo pode variar.....79

**Figura 16.** (A) Análise da organização dos genes das sialidases do grupo II de *Trypanosoma rangeli* por Southern blot. O DNA genômico das cepas Choachí e SC-58 de *T. rangeli* foi digerido com as enzimas indicadas e hibridizado com sondas correspondentes aos genes das sialidases do grupo II de *T. rangeli*. O marcador de tamanho molecular está em quilobases (DNA ladder 1 kb plus -New England Biolabs). (B) Mapa de restrição dos genes das sialidases do grupo II de *T. rangeli* cepa Choachí apontando os sítios de restrição das enzimas utilizadas. A barra rosa representa o quadro aberto de leitura dos genes das sialidases do grupo II de *T. rangeli* e a barra preta representa a região condizente a sonda. (C) Mapa de restrição dos genes das sialidases do grupo II de *T. rangeli* cepa SC58 apontando os sítios de restrição das enzimas utilizadas. A barra azul representa o quadro aberto de leitura dos genes das sialidases do grupo II de *T. rangeli* e a barra preta representa a região condizente a sonda.....84

**Figura 17.** Representação esquemática do plasmídeo pTEXeGFP indicando as posições dos sítios de enzimas de restrição.....88

**Figura 18.** Representação esquemática do plasmídeo pTEX-8523eGFP indicando as posições dos sítios de enzimas de restrição, do peptídeo sinal da gp85 (gp85 SP) e da região 3' não traduzida da gp82 (gp82 3' UTR) de *Trypanosoma cruzi*.....89

**Figura 19.** Análise comparativa do crescimento das cepas transfectadas de *Trypanosoma rangeli* em relação a cepa selvagem (*T. rangeli* cepa Choachí).....95

**Figura 20.** (A) Formas tripomastigotas de *Trypanosoma rangeli*

selvagem e *T. rangeli*-gp82 obtidos após o processo de diferenciação *in vitro*. Os parasitos foram corados com Giemsa. As barras em preto representam 10 µm. **(B)** Percentual de diferenciação em tripomastigotas *in vitro* de diferentes cepas de *T. rangeli*. Os dados são representativos de três experimentos independentes com duas réplicas técnicas cada.....96

**Figura 21.** Expressão heteróloga das proteínas gp82 e GFP na cepa *Trypanosoma rangeli*-gp82. (A) Resultado da observação da fluorescência direta da GFP na cepa *T. rangeli*-gp82. (B) Resultados dos ensaios de imunofluorescência indireta utilizando os anticorpos primários 3F6 (anti-gp82) ou anti-GFP, e os anticorpos secundários anti-IgG de camundongo conjugado a Alexa-fluor 488 ou Alexa-fluor 594.....97

**Figura 22.** Avaliação da expressão heteróloga das proteínas gp82 e GFP por *western blot* em extratos protéicos totais de formas epimastigotas e tripomastigotas de *Trypanosoma rangeli*-gp82, *T. rangeli*-GFP, *T. rangeli* cepa Choachí e *T. cruzi* cepa Y. Os anticorpos primários utilizados foram 3F6, anti-GFP e anti- $\alpha$ -tubulina. *T. rangeli*-gp82 está apresentado como gp82, *T. rangeli*-GFP como GFP, *T. rangeli* selvagem cepa Choachí está como TrSelv e *Trypanosoma cruzi* cepa Y está como TcSelv.....98

**Figura 23.** Localização celular da glicoproteína de superfície de 82 kDa em formas tripomastigotas (tripo) de *Trypanosoma cruzi* e formas epimastigotas (epi) de *Trypanosoma rangeli*-gp82. (A) Imunofluorescência indireta utilizando o anticorpo primário 3F6 e (B) coloração por DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) .....100

**Figura 24.** Ensaio de Interação parasito-célula hospedeira através de Imunofluorescência indireta. A linhagem celular utilizada foi célula VERO (ATCC: CCL81) originária de fibroblastos de rim do macaco verde Africano- *Cercopithecus aethiops*. Tempo: T0 (após as três horas de interação), T4, T16 e T120, sendo que nestes três últimos, o número representa o número de horas de interação a partir de T0. Tubulina: anticorpo primário anti-TAT-1-alfa-Tubulina. Coloração por DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol). Merge: sobreposição da imagem de tubulina, e DAPI.....111

**Figura 25.** Representação gráfica da porcentagem de células infectadas resultante do ensaio de interação parasito-célula Vero. Tempo: T0 (após as três horas de interação), T4 e T16 (a partir de T0). *Trypanosoma rangeli* selvagem: *T. rangeli* cepa Choachí. *Trypanosoma cruzi*: *T. cruzi* cepa Y.....112

**Figura 26.** Representação gráfica do número de parasitos aderidos/100

células resultante do ensaio de interação parasito-célula hospedeira. A linhagem celular utilizada foi célula Vero (ATCC: CCL81) originária de fibroblastos de rim do macaco verde Africano- *Cercopithecus aethiops*. Tempo: TO (após as três horas de interação), T4 e T16 (a partir de T0). *Trypanosoma rangeli* selvagem: *T. rangeli* cepa Choachí. *Trypanosoma cruzi*: *T. cruzi* cepa Y.....113

**Figura 27.** Ensaio de Interação parasito-célula hospedeira através de Imunofluorescência indireta. A linhagem celular utilizada foi células THP-1 (linhagem humana de origem monocítica, derivada de paciente com leucemia monocítica aguda -ATCC#TIB-202). Tempo: TO (após as três horas de interação), T4, T16 e T42, sendo que nestes três últimos, o número representa o número de horas de interação a partir de T0. Tubulina: anticorpo primário anti-TAT-1-alfa-Tubulina. LAMP1: marcador lisossomal. Coloração por DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol). Merge: sobreposição da imagem de tubulina, LAMP1 e DAPI.....116

**Figura 28.** Ensaio de Interação parasito-célula hospedeira através de Imunofluorescência indireta. A linhagem celular utilizada foi células THP-1 (linhagem humana de origem monocítica, derivada de paciente com leucemia monocítica aguda -ATCC#TIB-202). Tempo: TO (após as três horas de interação), T4, T16 e T42, sendo que nestes três últimos, o número representa o número de horas de interação a partir de T0. Tubulina: anticorpo primário anti-TAT-1-alfa-Tubulina. LAMP2: marcador lisossomal. Coloração por DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol). Merge: sobreposição da imagem de tubulina, LAMP2 e DAPI.....118

**Figura 29.** Representação gráfica do número de parasitos aderidos/100 células resultante do ensaio de interação parasito-célula hospedeira. A linhagem celular utilizada foi THP1. Tempo: TO (após as três horas de interação) e T4 (a partir de T0). *Trypanosoma rangeli* selvagem: *T. rangeli* cepa Choachí. *Trypanosoma cruzi*: *T. cruzi* cepa Y.....121

**Figura 30.** Representação gráfica da porcentagem de células infectadas resultante do ensaio de interação parasito-célula THP1. Tempo: TO (após as três horas de interação), T4/T18 e T42 (a partir de T0). *Trypanosoma rangeli* selvagem: *T. rangeli* cepa Choachí. *Trypanosoma cruzi*: *T. cruzi* cepa Y.....122

**Figura 31.** Representação gráfica do número de parasitos internalizados/100 células resultante do ensaio de interação parasito-célula hospedeira. A linhagem celular utilizada foi THP1 (linhagem humana de origem monocítica, derivada de paciente com leucemia monocítica aguda - ATCC#TIB-202). Tempo: TO (após as três horas de

interação), T4/T18 e T42 (a partir de T0). *Trypanosoma rangeli* selvagem: *T. rangeli* cepa Choachí. *Trypanosoma cruzi*: *T. cruzi* cepa Y.....123

**Figura 32.** Ensaio de interação parasito-célula hospedeira através de coloração pelo Panótico. A linhagem celular utilizada foi THP-1. Tempo: T0 (após as três horas de interação), T4, T16 e T42, sendo que nestes três últimos, o número representa o número de horas de interação a partir de T0. A: *T. rangeli*-gp82. B: *T. cruzi* cepa Y. C: células THP-1 não infectadas. As setas representam as regiões onde observam-se parasitos.....125

**Figura 33.** Ensaio de mobilização de cálcio induzido pelo *T. rangeli* expressando a proteína heteróloga gp82. Resultados expressos em valores relativos de fluorescência. Controle negativo: PBS 1X. Controles positivos: ATP 1M e CI (do inglês *Calcium ionophorium* 5µM). Tc. epi: *T. cruzi* forma epimastigota. Tc. tripo: *T. cruzi* forma tripomastigota. Tr. epi: *T. rangeli* forma epimastigota. Tr. tripo: *T. rangeli* forma tripomastigota. Tr-gp82 epi: *T. rangeli*-gp82 forma epimastigota. Tr-gp82 tripo: *T. rangeli*-gp82 forma tripomastigota. Tr-GFP epi: *T. rangeli*-GFP forma epimastigota. Tr-GFP tripo: *T. rangeli*-GFP forma tripomastigota. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando analisadas através da análise de variância (ANOVA) unifatorial (one-way) ( $p < 0,05$ ) seguida do teste “post-hoc” de Tukey ( $p < 0,05$ ). \*  $p < 0,05$ . \*\*\*  $p < 0,001$ . Foram apresentadas apenas as diferenças estatisticamente significativas quando comparadas ao controle negativo.....127

**Figura 34.** Infecção de *Rhodnius prolixus* com diferentes cepas do *Trypanosoma rangeli* (corado com Giemsa). Imagem da hemolinfa de triatomíneos infectados com as cepas *T. rangeli* selvagem (cepa Choachí), *T. rangeli*-GFP e *T. rangeli*-gp82, em forma epimastigota típica. A barra em preto representa 10 µm.....136

**Figura 35.** Microfotografia da forma tripomastigota sanguínea do *Trypanosoma rangeli*-gp82 e *T. rangeli*-GFP em sangue de camundongos experimentalmente infectados (corado por Giemsa). As barras em preto representam 10 µm.....137

**Figura 36.** Cinética parasitêmica da infecção de *Trypanosoma rangeli* ou *Trypanosoma cruzi* em camundongos C57BL/6. **A)** Camundongos inoculados intraperitonealmente com  $5 \times 10^7$  tripomastigotas sanguíneas das cepas *T. rangeli* selvagem (cepa Choachí), *T. rangeli*-gp82 e *T. rangeli*-GFP ou **B)**  $1 \times 10^3$  tripomastigotas de *T. cruzi* cepa Y. Os valores correspondem à média de parasitemia de seis animais.....138

- Figura 37.** Cinética parasitêmica do ensaio desafio de camundongos infectados cronicamente por diferentes cepas de *Trypanosoma rangeli* e *Trypanosoma cruzi*, foram inoculados com  $10^5$  tripomastigotas de cultura da cepa Y de *T. cruzi*. Os valores correspondem à média de parasitemia de cinco animais.....140
- Figura 38.** Eletroforese em gel de poliacrilamida 8% corado pelo brometo de etídio mostrando os produtos de amplificação utilizando os iniciadores S35 e S36. PPM: Padrão de Peso Molecular (pUC18/*HaeIII*). 1 a 10: órgãos ou sangue coletados 30 dias após o desafio. 1: gp82 1 rim. 2: gp82 1 coração. 3: gp82 1 fígado. 4: gp82 1 sangue. 5: gp82 2 linfonodo. 6: *T. cruzi* 1 coração. 7: gp82 2 fígado. 8: gp82 2 glândula suprarrenal. 9: *T. cruzi* 1 linfonodo. 10: *T. cruzi* 1 músculo. 11: amostra positiva referente a cepa Choachí de *T. rangeli*. 12: amostra positiva referente a cepa Y de *T. cruzi*. 13: controle negativo (sem adição de DNA).....145
- Figura 39.** Representação qualitativa das amostras positivas tanto para *Trypanosoma rangeli* quanto *Trypanosoma cruzi* utilizando os iniciadores S35/S36 e D75/D76 nos camundongos C57BL/6 que foram cronicamente infectados com *T. rangeli* e desafiados com *T. cruzi*. O número de amostras positivas foi separado de acordo com os órgãos/sangue nele encontrado considerando todos os tempos analisados (15 dias pós inoculação (d.p.i. ), 60 d.p.i. e 30 dias pós desafio).....150
- Figura 40.** Análise histopatológica das secções do tecido muscular cardíaco de camundongos C57BL/6 setenta dias após infecção com *T. rangeli*-selvagem (Tr\_selvagem), *T. rangeli*-GFP, *T. rangeli*-gp82 (Tr\_gp82) e *T. cruzi*. As imagens dos tecidos de camundongos infectados com *T. rangeli*-GFP não foram mostradas por não apresentarem diferença em relação a *T. rangeli*-selvagem. Nas imagens identificadas com o aumento de 10X a barra preta representa 100  $\mu$ m e nas imagens com 40X a barra preta representa 50  $\mu$ m. Algumas alterações estão identificadas nas imagens por setas pretas, tais como: (I) Infiltrado inflamatório; (P) Pericardite e (D) Degeneração celular.....155
- Figura 41.** Análise histopatológica das secções do tecido hepático de camundongos C57BL/6 setenta dias após infecção com *T. rangeli*-selvagem (Tr\_selvagem), *T. rangeli*-GFP, *T. rangeli*-gp82 (Tr\_gp82) e *T. cruzi*. As imagens dos tecidos de camundongos infectados com *T. rangeli*-GFP não foram mostradas por não apresentarem diferença em relação a *T. rangeli*-selvagem. Nas imagens identificadas com o aumento de 10X a barra preta representa 100  $\mu$ m e nas imagens com

40X a barra preta representa 50 µm. Algumas alterações estão identificadas nas imagens por setas pretas, tais como: (I) Infiltrado inflamatório; (IP) Infiltrado inflamatório perivascular e (IM) Infiltrado inflamatório misto.....156

**Figura 42.** Análise histopatológica das secções do tecido nervoso de camundongos C57BL/6 setenta dias após infecção com *T. rangeli*-selvagem (Tr\_selvagem), *T. rangeli*-GFP, *T. rangeli*-gp82 (Tr\_gp82) e *T. cruzi*. As imagens dos tecidos de camundongos infectados com *T. rangeli*-GFP não foram mostradas por não apresentarem diferença em relação a *T. rangeli*-selvagem. Nas imagens identificadas com o aumento de 10X a barra preta representa 100 µm e nas imagens com 40X a barra preta representa 50 µm. Algumas alterações estão identificadas nas imagens por setas pretas, tais como: (G) Gliose mononuclear focal.....157

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Relação dos iniciadores utilizados no presente estudo para a amplificação dos genes das sialidasas do grupo II de <i>Trypanosoma rangeli</i> . .....	56
<b>Tabela 2.</b> Comparação dos domínios conservados, presença ou ausência de peptídeo sinal e possíveis sítios de ancoramento a GPI ente as sialidasas do grupo II de <i>Trypanosoma rangeli</i> , gp82 (EF154827.1) e gp85 (M64836.1) de <i>Trypanosoma cruzi</i> . .....	65
<b>Tabela 3.</b> Identidade e similaridade das sequências aminoacídicas das sialidasas do grupo II de <i>Trypanosoma rangeli</i> em relação a gp82 (EF154827.1) e gp85 (M64836.1) de <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	67
<b>Tabela 4.</b> Descrição dos anticorpos utilizados nos ensaios de imunofluorescência indireta e <i>Western blot</i> , considerando sua origem, tamanho das proteínas reconhecidas e diluições utilizadas nas diferentes metodologias. ....	92
<b>Tabela 5.</b> Descrição dos anticorpos utilizados no ensaio de imunofluorescência indireta com células THP-1, considerando sua origem e diluições utilizadas.....	108
<b>Tabela 6.</b> Representação esquemática dos resultados da detecção de <i>Trypanosoma rangeli</i> e <i>Trypanosoma cruzi</i> utilizando os iniciadores S35 e S36 nos camundongos C57BL/6 que foram cronicamente infectados com <i>T. rangeli</i> e desafiados com <i>T. cruzi</i> . ....	143
<b>Tabela 7.</b> Representação esquemática dos resultados da detecção de <i>Trypanosoma rangeli</i> e <i>Trypanosoma cruzi</i> utilizando os iniciadores D75 e D76 nos camundongos C57BL/6 que foram cronicamente infectados com <i>T. rangeli</i> e desafiados com <i>T. cruzi</i> . ....	147
<b>Tabela 8.</b> Representação esquemática dos resultados da detecção de <i>Trypanosoma rangeli</i> e <i>Trypanosoma cruzi</i> utilizando os iniciadores S35/S36 e D75/D76 nos camundongos C57BL/6 que foram cronicamente infectados com <i>T. rangeli</i> e desafiados com <i>T. cruzi</i> .....	148
<b>Tabela 9.</b> Análise histopatológica dos órgãos de camundongos C57BL/6 que foram cronicamente infectados com <i>T. rangeli</i> e desafiados com <i>T. cruzi</i> .....	151
<b>Tabela 10.</b> Classificação semiquantitativa do processo inflamatório nos tecidos dos camundongos C57BL/6 que foram cronicamente infectados com <i>T. rangeli</i> e desafiados com <i>T. cruzi</i> .....	160

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BSA	Albumina de soro bovino
cDNA	DNA complementar
CEA	do inglês <i>Chronic Exo Antigen</i>
CRP	do inglês <i>Complement Regulatory Proteins</i>
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
DMEM	do inglês <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DEPC	dietilpirocarbonato
d.p.d.	dias pós desafio
d.p.i.	dias pós inoculação
ELISA	do inglês <i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>
EST	do inglês <i>Expressed Sequence Tags</i>
H&E	hemotoxilina-eosina
GFP	gene da proteína verde fluorescente
GPI	glicosilfosfatidilinositol
HSP	proteína de choque térmico
kDNA	DNA do cinetoplasto
LIT	do inglês <i>Liver Infusion Tryptose</i>
min	minutos
MOI	do inglês <i>Multiplicity of infection</i>
mRNA	RNA mensageiro
NNN	Neal, Novy e Nicolle
NP-40	Nonidet P-40
nt	nucleotídeos
ORF	do inglês <i>open reading frame</i>
PAGE	do inglês <i>Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>
pb	pares de bases
PBS	do inglês <i>Phosphate Buffered Saline</i>
PMA	Forbol-12-miristato-13-acetato
PVDF	do inglês <i>Polyvinylidene fluoride</i>
RAPD	do inglês <i>random amplification of polymorphic DNA</i>
rDNA	DNA ribossomal
RIFI	Imunofluorescência Indireta
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RT	transcrição reversa
SBF	soro bovino fetal
SDS	dodecil sulfato de sódio
SL	<i>spliced-leader</i>
SP	peptídeo sinal
TS	trans-sialidases

Tween monolaurato de polioxietileno sorbitano  
U unidades  
UTR região não traduzida  
YAC do inglês *yeast artificial chromosome*

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>27</b>
1.1	<i>TRYPANOSOMA RANGELI</i> .....	27
1.1.1	Aspectos epidemiológicos.....	28
1.1.2	Manifestações clínicas e diagnóstico laboratorial.....	29
1.1.3	Ciclo evolutivo.....	31
1.1.4	Abordagens genômicas, transcriptômicas e proteômicas.....	35
1.2	ESTRUTURA E ORGANIZAÇÃO DE GENES QUE CODIFICAM A SUPERFAMÍLIA DAS TRANS-SIALIDASES.....	38
1.2.1	<i>gp82 e gp85</i> .....	45
<b>2</b>	<b>JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>50</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>52</b>
3.1	OBJETIVO GERAL .....	52
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	52
<b>4</b>	<b>CAPÍTULO I.....</b>	<b>53</b>
4.1	MATERIAIS E MÉTODOS .....	54
4.1.1	<i>Parasitas</i> .....	54
4.1.2	<i>Isolamento do DNA total de T. rangeli</i> .....	54
4.1.3	<i>Isolamento do RNA total de T. rangeli</i> .....	54
4.1.4	<i>Dosagem do DNA e RNA</i> .....	55
4.1.5	<i>Amplificação e clonagem dos fragmentos gênicos das sialidases do grupo II de T. rangeli</i> .....	55
4.1.6	<i>Sequenciamento dos genes das sialidases do grupo II de T. rangeli</i> .....	57
4.1.7	<i>Análise das sequências obtidas</i> .....	57
4.1.8	<i>Análises in silico</i> .....	58
4.1.9	<i>Análise da variabilidade gênica</i> .....	58
4.1.10	<i>Caracterização da organização genômica das sialidases do grupo II de T. rangeli por Southern blot</i> .....	59
4.2	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	60
4.2.1	<i>Obtenção e análise comparativa das sequências gênicas</i> .....	60
4.2.2	<i>Análise dos genes das sialidases do grupo II de T. rangeli por Southern blot</i> .....	82
4.3	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	85
<b>5</b>	<b>CAPÍTULO II.....</b>	<b>86</b>
5.1	MATERIAIS E MÉTODOS .....	87
5.1.1	<i>Parasitas</i> .....	87
5.1.1.1	Cultivo .....	87
5.1.1.2	Diferenciação celular <i>in vitro</i> para obtenção das formas tripomastigotas.....	87
5.1.1.2.1	Análise estatística .....	88
5.1.2	<i>Plasmídeos</i> .....	88

5.1.3	<i>Transfecção dos parasitos</i> .....	89
5.1.4	<i>Avaliação comparativa de crescimento in vitro entre as linhagens transfectadas e o controle</i> .....	90
5.1.4.1	Análise estatística .....	90
5.1.5	<i>Detecção dos produtos de expressão plasmidial</i> .....	90
5.1.5.1	Observação direta .....	90
5.1.5.2	Citocalização por ensaios de Imunofluorescência Indireta (RIFI) .....	90
5.1.5.3	<i>Western blot</i> .....	92
5.1.6	<i>Aspectos éticos e de biossegurança</i> .....	93
5.2	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	94
5.2.1	<i>Avaliação comparativa de crescimento in vitro</i> .....	94
5.2.2	<i>Diferenciação de T. rangeli in vitro</i> .....	95
5.2.3	<i>Detecção da expressão de proteínas expressas heterológamente por T. rangeli</i> .....	97
5.2.4	<i>Análise da expressão das proteínas heterológamente expressas pelo T. rangeli através de western blot</i> .....	98
5.2.5	<i>Imunocalização das proteínas expressas heterológamente por T. rangeli</i> .....	100
5.3	CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	103
<b>6</b>	<b>CAPÍTULO III</b> .....	<b>104</b>
6.1	MATERIAIS E MÉTODOS .....	105
6.1.1	<i>Células</i> .....	105
6.1.1.2	Indução da diferenciação de células THP-1 .....	105
6.1.2	<i>Ensaio de interação do T. rangeli-gp82 com células Vero e THP-1</i> .....	105
6.1.2.1	Coloração pelo método de Giemsa .....	106
6.1.2.2	Coloração pelo Panótico .....	106
6.1.2.3	RIFI .....	107
6.1.3	<i>Análise estatística</i> .....	108
6.1.4	<i>Ensaio de mobilização de cálcio do T. rangeli expressando a proteína heteróloga gp82</i> .....	108
6.1.4.1	Análise estatística .....	109
6.2	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	109
6.2.1	<i>Interação in vitro do T. rangeli-gp82 com células Vero</i> .....	109
6.2.2	<i>Interação in vitro do T. rangeli-gp82 com células THP-1</i> .....	114
6.2.3	<i>Avaliação da indução de mobilização de cálcio intracelular pela proteína gp82 expressa de forma heteróloga pelo T. rangeli</i> .....	126
6.3	CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	130
<b>7</b>	<b>CAPÍTULO IV</b> .....	<b>131</b>
7.1	MATERIAIS E MÉTODOS .....	132
7.1.1	<i>Avaliação comparativa da infectividade e do desenvolvimento das linhagens T. rangeli em R. prolixus</i> .....	132
7.1.2	<i>Avaliação comparativa da infectividade e do desenvolvimento</i>	

<i>das linhagens T. rangeli em camundongos C57BL/6</i> .....	132
7.1.2.1 Isolamento do DNA total .....	133
7.1.2.2 Dosagem do DNA.....	133
7.1.2.3 Reação em cadeia da polimerase (PCR).....	133
7.1.2.4 Histopatologia.....	134
7.1.3 <i>Análise estatística</i> .....	135
7.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	135
7.2.1 <i>Avaliação comparativa da infectividade e do desenvolvimento das linhagens T. rangeli em R. prolixus</i> .....	135
7.2.2 <i>Avaliação comparativa da infectividade e do desenvolvimento das linhagens T. rangeli em camundongos C57BL/6</i> .....	136
7.2.3 <i>Avaliação comparativa da infectividade e do desenvolvimento das linhagens T. rangeli em camundongos C57BL/6 cronicamente infectados desafiados com T. cruzi</i> .....	139
7.2.3.1 PCR.....	142
7.2.3.2 Histopatologia.....	150
7.3 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	161
<b>8. CONCLUSÃO</b> .....	<b>163</b>
<b>APÊNDICE A – ATIVIDADES DESENVOLVIDAS DURANTE O DOUTORADO</b> .....	<b>164</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>167</b>

## 1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 1.1 *TRYPANOSOMA RANGELI*

O *Trypanosoma rangeli* (Figura 1) foi descrito por Enrique Tejera em 1920 na Venezuela, o qual observou formas flageladas no conteúdo intestinal de *Rhodnius prolixus* naturalmente infectado (D'ALESSANDRO, 1976).

Do ponto de vista taxonômico, o *T. rangeli* está classificado dentro do subgênero *Herpetosoma*, onde a espécie tipo é o *Trypanosoma lewisi*. Além disso, os tripanosomas são divididos em duas seções relacionadas à forma de transmissão: Salivaria (via anterior através da saliva) ou Stercoraria (via posterior através das fezes). Embora o *T. rangeli* esteja na secção Stercoraria, ele é um caso atípico, pois sua transmissão é preferencialmente inoculativa, sendo realizada pela picada de barbeiros infectados. Entretanto, a transmissão posterior ou contaminativa pelo parasito é possível, porém de menor importância epidemiológica. Considerando muitas destas características biológicas, foi proposto um novo subgênero denominado *Tejeraia*, o qual albergaria exclusivamente o *T. rangeli*, sendo este termo não adotado na atualidade (GRISARD; ROMANHA; STEINDEL, 2011).

Este parasito é capaz de infectar não só triatomíneos, mas também mamíferos silvestres e domésticos, incluindo o homem (D'ALESSANDRO-BACIGALUPO; SARAVIA, 1992). Todavia, diferentemente das demais espécies pertencentes ao Subgênero *Herpetosoma*, o *T. rangeli* não apresenta especificidade de hospedeiros, sendo encontrado em uma extensa variedade de reservatórios mamíferos, correspondentes as Ordens Edentata, Marsupialia, Carnivora, Rodentia e Primata (HOARE, 1972; D'ALESSANDRO, 1976; CUBA-CUBA, 1998; D'ALESSANDRO; SARAVIA, 1999). Experimentalmente diferentes espécies (incluindo ratos, camundongos, hamsters, coelhos, cães, morcegos e primatas) têm sido infectadas com o *T. rangeli*, comprovando sua possível amplitude de hospedeiros (GUHL; VALLEJO, 2003).



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

### 1.1.1 Aspectos epidemiológicos

O primeiro caso de infecção humana pelo *T. rangeli* foi evidenciado na Guatemala durante a realização de estudos sobre a doença de Chagas (DE LEON, 1942). Desde então, mais de 2.700 casos já foram descritos na Venezuela, Guatemala, Panamá, Colômbia, El Salvador, Costa Rica, Peru e Brasil (D’ALESSANDRO-BACIGALUPO; SARAVIA, 1992; COURA et al., 1996; GRISARD et al., 1999; GRISARD; ROMANHA; STEINDEL, 2011).

Casos de infecção humana pelo *T. rangeli* no Brasil foram descritos somente no Município de Barcelos, Estado do Amazonas, em 1996. No entanto, a presença do parasito em mamíferos e triatomíneos silvestres já foi registrada nas regiões norte (Amazonas, Pará, Tocantins e Rondônia), centro-oeste (Goiás), nordeste (Alagoas, Bahia e Ceará), sudeste (Minas Gerais) e sul do país (Santa Catarina), tornando possível a ocorrência de novos casos de infecção humana pelo *T. rangeli* nestas regiões (GRISARD; ROMANHA; STEINDEL, 2011).

A distribuição geográfica do *T. rangeli* é sobreposta com a do *Trypanosoma cruzi*, com o qual compartilha reservatórios e vetores (Figura 2) (MARINKELLE, 1972; D’ALESSANDRO, 1976; D’ALESSANDRO-BACIGALUPO; SARAVIA, 1992). Desta forma, uma das implicações epidemiológicas da coexistência destes dois parasitos reside na ocorrência de infecções únicas ou mistas, tanto nos hospedeiros invertebrados como nos vertebrados (D’ALESSANDRO-

BACIGALUPO; SARAVIA, 1992; GRISARD et al., 1999; GUHL; VALLEJO, 2003).

Em Florianópolis (Santa Catarina), Steindel e colaboradores descreveram pela primeira vez em 1991 a presença do *T. rangeli*, bem como a ocorrência de infecções mistas com o *T. cruzi* em triatomíneos da espécie *Panstrongylus megistus* naturalmente infectados (STEINDEL et al., 1991; STEINDEL, 1992).



**Figura 2.** Mapa das Américas mostrando a sobreposição da distribuição da doença de Chagas humana até 1992 (sombreado) e os relatos da presença do *Trypanosoma rangeli* em humanos, triatomíneos ou animais silvestres (•). Fonte: Grisard; Romanha; Steindel, 2011.

### 1.1.2 Manifestações clínicas e diagnóstico laboratorial

Embora o *T. rangeli* não seja considerado patogênico para o hospedeiro mamífero, a infecção por este parasito induz uma resposta

imune humoral com elevados títulos de anticorpos, os quais determinam uma reatividade cruzada com antígenos do *T. cruzi* e dificultam o diagnóstico sorológico da doença de Chagas, especialmente em sua fase crônica (AFCHAIN et al., 1979; GRISARD et al., 1999). Afchain e colaboradores (1979) analisando formas epimastigotas de cultura do *T. rangeli*, verificaram que este compartilha cerca de 60% de sua constituição antigênica solúvel com o *T. cruzi*, o que explica a reatividade sorológica cruzada e os possíveis resultados falso-positivos. Wagner (2012), através de ensaios de *immunoblotting* 1-D com proteínas solúveis e antissoros de animais experimentalmente infectados com estes parasitos, verificou que a reatividade sorológica cruzada existente não é recíproca, pois o reconhecimento de proteínas da forma tripomastigota de *T. rangeli* é menos intensa do que o reconhecimento de proteínas da forma tripomastigota de *T. cruzi* pelos antissoros heterólogos.

Devido às dificuldades de distinção entre o *T. rangeli* e o *T. cruzi* com base nos critérios morfológicos, à reatividade sorológica cruzada, à ausência de manifestações clínicas da doença de Chagas indeterminada e à característica não patogênica do *T. rangeli* em seus hospedeiros mamíferos, acredita-se que o número de infecções humanas pelo *T. rangeli* possa estar subestimado e, por conseguinte, uma superestimativa dos casos de infecção pelo *T. cruzi* possa ocorrer em áreas onde estes parasitos coexistem.

Diversos impactos sociais e econômicos podem ser desencadeados por esta sobreposição. Como um possível exemplo, observa-se em bancos de sangue no Brasil um elevado número de descarte de bolsas devido a resultados inconclusivos para o diagnóstico da Doença de Chagas (SILVA et al., 2002). Desta forma, a identificação específica destes dois parasitos, evitando inferências errôneas, torna-se extremamente importante do ponto de vista epidemiológico, terapêutico, econômico e social.

Diferentes métodos podem ser empregados na diferenciação de *T. cruzi* e *T. rangeli*, incluindo métodos biológicos, como a observação do desenvolvimento do parasito nas glândulas salivares ou fezes dos triatomíneos (D'ALESSANDRO, 1976); morfológicos, como a morfologia das formas sanguíneas e de cultivo dos parasitos (VALLEJO et al., 1988); bioquímicos, como a lise das formas de cultura pelo complemento humano, aglutinação dos parasitos com a lectina de germen de trigo (SCHOTTELIUS; MARINKELLE; GOMEZ-LEIVA, 1986) e perfil de izoenzimas (MILES et al., 1983); imunológicos, como a imunofluorescência indireta e ELISA (do inglês *Enzyme Linked*

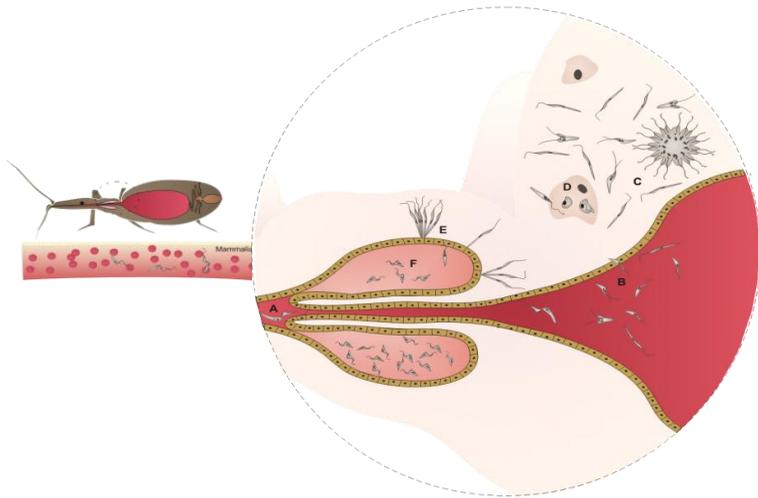
*Immuno Sorbent Assay*) com a utilização de anticorpos monoclonais (ANTHONY; CODY; CONSTANTINE, 1981; ACOSTA et al., 1991) e antígenos recombinantes (UMEZAWA et al., 1999); além da reação em cadeia da polimerase (PCR) (MURTHY; DIBBERN; CAMPBELL, 1992; COURA et al., 1996; SOUTO; VARGAS; ZINGALES, 1999; VALLEJO et al., 1999; MACHADO et al., 2000; VARGAS et al., 2000; QVARNSTROM et al., 2012).

Apesar de alguns métodos apresentarem uma boa especificidade, a sensibilidade depende do nível da parasitemia dos indivíduos infectados, da possível presença de inibidores, bem como do requerimento de recursos humanos e equipamentos especializados tornando os custos elevados (GUHL et al., 2002).

Algumas destas metodologias que permitem a diferenciação entre os dois parasitos levam em consideração o conhecimento existente a respeito do ciclo evolutivo do *T. rangeli* no seu hospedeiro invertebrado. Entre as características mais marcantes e diferenciais em relação ao *T. cruzi* está a capacidade de invasão da hemolinfa e o desenvolvimento das formas infectantes nas glândulas salivares, fazendo com que sua principal via de transmissão seja por inoculação (D'ALESSANDRO; SARAVIA, 1999; MACHADO et al., 2001).

### 1.1.3 Ciclo evolutivo

As formas sanguíneas do *T. rangeli* após serem ingeridas pelo inseto vetor transformam-se em epimastigotas no estômago e intestino médio do vetor onde passam a se multiplicar através de divisão binária. Deste ponto, formas do parasito poderão ser encontradas nas fezes do inseto, ou atravessar a parede intestinal do vetor e alcançar a hemocele do inseto (Figura 3). Esta invasão da hemocele ocorre usualmente entre 20 e 40 dias após a infecção do triatomíneo, quando os flagelados passam a multiplicar-se intensamente na hemolinfa. Embora os parasitos sejam encontrados no interior de hemócitos, não há comprovação de sua multiplicação intracelular. Seguindo o curso normal de infecção, os parasitos migram para as glândulas salivares do vetor onde inicialmente as formas epimastigotas se aderem através do flagelo e do corpo à superfície externa da glândula salivar formando agrupamentos (“clusters”), onde se observa intensa multiplicação dos flagelados. Após atingirem a luz das glândulas, diferenciam-se em tripomastigotas metacíclicos (ou metatripanosomas), podendo alcançar 500 mil parasitos/glândula (GRISARD; ROMANHA; STEINDEL, 2011).



**Figura 3.** Representação esquemática do ciclo biológico do *Trypanosoma rangeli* no hospedeiro invertebrado. A infecção do triatomíneo ocorre pela ingestão de formas tripomastigotas sanguíneas durante o repasto (A), sendo as formas tripomastigotas e epimastigotas predominantes no intestino médio (B). Formas epimastigotas curtas se dividem no intestino médio e podem invadir a hemocele (C), onde replicam de forma livre como epimastigotas longos. Alguns parasitos podem invadir hemócitos (D), sendo desconhecida a capacidade de multiplicação no interior desta célula. As formas epimastigotas longas aderem e penetram na glândula salivar (E) diferenciando-se em seu interior em tripomastigotas metacíclicos (F) infectantes que são inoculados com a saliva durante o repasto sanguíneo. Fonte: Stoco e colaboradores, 2014.

O pleomorfismo do *T. rangeli* dificulta a diferenciação deste parasito em relação a outros tripanosomatídeos baseado na sua morfologia, principalmente a partir de formas epimastigotas. Assim, a descrição de flagelados similares ao *T. rangeli* (*T. rangeli-like*) no intestino de alguns triatomíneos, não implica que estas espécies tenham capacidade vetorial. A evidência definitiva consiste na demonstração de tripomastigotas metacíclicos na saliva ou na glândula salivar e sua infectividade para o vertebrado (GUHL; VALLEJO, 2003). Considerando estes fatos, o gênero *Rhodnius* é particularmente susceptível a infecção pelo *T. rangeli* e a transmissão via inoculação já

foi demonstrada para 12 espécies deste gênero, a partir de insetos naturalmente ou experimentalmente infectados. Embora, com baixas taxas de infecção nas glândulas salivares, a susceptibilidade de *P. megistus*, *Triatoma infestans*, *T. sordida*, *T. braziliensis* e *T. vitticeps* ao *T. rangeli* também foi apontada (DE STEFANI MARQUEZ et al., 2006).

A intensa multiplicação de epimastigotas na hemolinfa e os eventos relacionados à sobreposição de barreiras celulares podem exercer uma ação patogênica para o inseto vetor, que caracteriza-se pela destruição dos hemócitos, dificuldade de muda e desenvolvimento das ninfas, podendo eventualmente ocasionar a morte (VALLEJO; GUHL; SCHAUB, 2009).

Estudos sobre a evasão do intestino das formas epimastigotas têm proposto diferentes padrões para este evento. De Oliveira e De Souza (2001) sugeriram que o parasito atravessa o citoplasma das células intestinais, causando dano celular. Porém, estudo anterior havia demonstrado que apesar de atravessar as células por uma rota intracelular, danos celulares não são observados (HECKER; SCHWARZENBACH; RUDIN, 1990).

Com relação a multiplicação celular, frequentemente se encontra o conceito de divisão intracelular do *T. rangeli* nos hemócitos, porém nenhuma evidência desta situação foi apresentada até o momento. Neste mesmo conceito, ainda não está bem estabelecido se as células de defesa nos insetos possuem a capacidade de realizar a fagocitose e matar os parasitos. De Oliveira e De Souza (2001) utilizando microscopia eletrônica de transmissão, mostraram que plasmatócitos foram capazes de internalizar formas epimastigotas dos parasitos formando um vacúolo, não encontrando evidências de parasitos em divisão.

Diferentemente do que ocorre no hospedeiro invertebrado, pouco se sabe a respeito do curso da infecção por este parasito no hospedeiro mamífero. Os dados da literatura a este respeito são divergentes e controversos, não permitindo a clara compreensão de como ou onde ocorre a multiplicação do parasito. Sabe-se que a infecção ocorre através da inoculação dos tripomastigotas metacíclicos pelo vetor na corrente circulatória do hospedeiro durante o repasto sanguíneo. Em modelo murino, por volta de 24 horas após a infecção, tripomastigotas já podem ser visualizados na corrente sanguínea do mamífero. Embora variável conforme a cepa do parasito, em média, na primeira semana de infecção, observa-se um discreto aumento no número de parasitos

circulantes atingindo o pico de máxima parasitemia no 5º dia pós-infecção e a partir da segunda semana o número de tripomastigotas vai decrescendo e, usualmente após o 15º dia de infecção, a parasitemia torna-se submicroscópica. Após esta curta fase aguda, os parasitos somente podem ser detectados através de métodos indiretos como a hemocultura e o xenodiagnóstico (GRISARD; ROMANHA; STEINDEL, 2011).

Añez, Velandia e Rodriguez (1985) não conseguiram detectar a presença do parasito por xenodiagnóstico ou hemocultura em camundongos e em gambás (*Didelphis marsupialis*) após 50 ou 60 dias de infecção com uma cepa de *T. rangeli* originária da Venezuela. Entretanto, Steindel (1993) conseguiu demonstrar a presença do *T. rangeli* por hemocultura em camundongos, sete meses após a infecção. Parasitos também foram detectados após 13 meses (PAREDES; PAREDES, 1949) e após 18 meses (GROOT; RENJIFO; URIBE, 1950; GROOT, 1954) a partir de infecções humanas naturais e de camundongos experimentalmente infectados, utilizando a mesma técnica.

A capacidade de replicação no hospedeiro mamífero ainda é o ponto mais conflitante nos estudos a respeito do *T. rangeli*. A possível multiplicação intracelular, como ocorre no ciclo do *T. cruzi*, se sobrepõe à possibilidade de proliferação sanguínea extracelular de forma similar ao que ocorre no *T. brucei*. Observações de formas tripomastigotas sanguíneas do *T. rangeli* que pareciam estar em divisão já foram realizadas em seres humanos e roedores (D'ALESSANDRO; SARAVIA, 1999). Entretanto, segundo estes autores, estas formas ainda podem ser provenientes da glândula salivar do inseto infectado e não uma consequência da multiplicação do parasito no hospedeiro mamífero.

Com relação a evidências de multiplicação intracelular, um extenso estudo histopatológico com mais de cem animais infectados não apresentou qualquer resultado de multiplicação intracelular (HERBIG-SANDREUTER, 1955). Contrariamente, De Scorza e colaboradores (1986) e Urdaneta-Morales e Tejero (1986) observaram numerosas formas intracelulares do *T. rangeli*, chamadas de “amastigotas-like”, no coração, fígado e baço de camundongos lactantes, utilizando uma única cepa do parasito, sendo estas as únicas descrições de formas intracelulares do parasito observadas *in vivo*.

Em ensaios de interação *in vitro*, usando promonócitos humanos (U937) infectados com *T. rangeli* (cepas San Agustín e clone Ub66-5b), foi demonstrada a presença de formas intracelulares, mas sem

evidências de multiplicação (OSORIO et al., 1995). Zuñiga e colaboradores (1997) infectaram células Vero e J774 com a cepa colombiana C23 e verificaram um aumento no número de parasitos intracelulares em tempos prolongados de interação.

Entretanto, vários outros estudos demonstraram que a taxa de infectividade de diferentes cepas deste parasito frente a linhagens celulares distintas (fagocíticas e não fagocíticas), incluindo macrófagos peritoneais murinos, células Vero e promonócitos murinos J774, é sempre muito baixa e os parasitos tendem a desaparecer ao longo do tempo de interação, sugerindo a ausência de multiplicação intracelular e sua desintegração, especialmente em macrófagos (MOLYNEUX, 1973; TANOURA et al., 1999; EGER-MANGRICH et al., 2001).

Apesar destes dados ainda controversos na literatura, o isolamento repetido do parasito em animais cronicamente infectados e a detecção de parasitemias mais elevadas que o inóculo realizado sugerem a existência de multiplicação ou de um mecanismo de sobrevivência deste flagelado no hospedeiro vertebrado (URDANETA-MORALES; TEJERO, 1985; D'ALESSANDRO; SARAVIA, 1999).

#### **1.1.4 Abordagens genômicas, transcriptômicas e proteômicas**

Além de estudos biológicos a respeito do seu ciclo evolutivo, vários estudos envolvendo a caracterização antigênica, genética e bioquímica têm sido realizados para o *T. rangeli*. Estudos de genômica, transcriptômica ou proteômica comparativa de diferentes populações de *T. cruzi* e *T. rangeli* têm auxiliado na identificação e caracterização de proteínas que estão envolvidas em pontos chaves do ciclo celular, assim como na indução da resposta imune do hospedeiro, contribuindo diretamente na especificidade do diagnóstico da doença de Chagas bem como no estabelecimento da posição taxonômica do *T. rangeli* (STEVENS et al., 1999).

Outras importantes contribuições foram realizadas com os estudos de algumas sequências conservadas em todos os membros da Ordem Kinetoplastida: o ácido desoxirribonucleico (DNA) do cinetoplasto (kDNA) (STURM et al., 1989; VALLEJO et al., 1994) e o gene do mini-éxon (*spliced-leader* ou SL), que gera uma sequência de 39 nucleotídeos (nt) adicionada a extremidade 5' de todos os mRNA transcritos (GRISARD; CAMPBELL; ROMANHA, 1999).

O kDNA é uma rede composta de milhares de minicírculos e poucas dúzias de maxicírculos concatenados. Sabe-se que os

minicírculos diferem na sequência de nt entre as distintas espécies, porém são homogêneos em tamanho e em alguns casos pode haver hibridização cruzada entre sequências de espécies distintas (VALLEJO et al., 1994). Os maxicírculos são similares ao DNA mitocondrial eucariótico, codificando ácidos ribonucleicos (RNAs) ribossomais e proteínas envolvidas na produção de energia na mitocôndria (SIMPSON, 1987). Interessantemente, em todos os tripanosomatídeos estudados, pelo menos uma cópia de uma região conservada de aproximadamente 100–200 (nt) possui uma sequência não variável de 12 nt (STURM et al., 1989; VALLEJO et al., 1994).

Basicamente, quatro cópias desta região conservada ocorrem nos minicírculos de *T. cruzi*, organizadas a 90° uma da outra (GUHL; VALLEJO, 2003). Entretanto, o *T. rangeli* contém três classes distintas de minicírculos que diferem em tamanho e organização molecular. Os minicírculos KP1 contém uma única região conservada, os KP2 contém duas regiões conservadas localizadas a 180° uma da outra e os KP3 contém quatro regiões conservadas localizadas a 90°, como visto em *T. cruzi* (VALLEJO et al., 1994; GUHL et al., 2002; VALLEJO et al., 2002; VALLEJO et al., 2003).

Vallejo e colaboradores (1994) descreveram iniciadores específicos direcionados a estas regiões conservadas dos minicírculos com alta sensibilidade devido ao alto número de minicírculos existentes, o que possibilitou a amplificação por PCR de todos os tipos de minicírculos existentes para o *T. rangeli*, desencadeando inúmeras pesquisas epidemiológicas baseadas na caracterização das diferentes cepas do parasito.

Utilizando esta ferramenta um estudo conduzido em diferentes países da América Latina determinou que cepas de *T. rangeli* isoladas de *R. prolixus* apresentavam três produtos de amplificação (KP1, KP2 e KP3), enquanto que as isoladas de *R. colombiensis*, *R. pallezensis* ou *P. megistus* apresentavam produtos de amplificação derivados somente dos minicírculos KP2 e KP3 (VALLEJO et al., 2003). Cepas de *T. rangeli* que apresentavam os minicírculos KP1 (KP1+) ou não (KP1-) foram detectadas no intestino de vários exemplares de *R. colombiensis*, mas as cepas KP1(+) não foram capazes de evadir para a hemolinfa e penetrar nas glândulas salivares (VALLEJO et al., 2002). Os mesmos autores observaram uma situação similar em *R. prolixus*, onde também foi possível encontrar *T. rangeli* KP1(-) e KP1(+) no intestino, sendo que somente as células KP1(+) foram observadas na glândula salivar (VALLEJO et al., 2002; URREA et al., 2005). Estes dados sugerem que algumas espécies de *Rhodnius* spp. são preferencialmente susceptíveis a

cepas KP1(+) enquanto outras a cepas KP1(-). Isto posto, cada espécie do gênero *Rhodnius* pode selecionar as subpopulações de parasitos que são capazes de alcançar a glândula salivar e consequentemente ser transmitido pela picada através da saliva (MACHADO et al., 2001; GUHL; VALLEJO, 2003).

Estudos no *T. rangeli* sobre o gene do *spliced-leader* também permitiram dividir as cepas de *T. rangeli* em dois grupos distintos, assim como outros vários marcadores. Entre eles, o gene 5S rDNA (DNA ribossomal), sequências espaçadoras internas transcritas – ITS (do inglês *Internal transcribed spacers*) e RAPD (do inglês *random amplification of polymorphic DNA*) (AKSOY et al., 1992; STEINDEL et al., 1994; GRISARD; CAMPBELL; ROMANHA, 1999; BARNABE; BRISSE; TIBAYRENC, 2003; DA SILVA et al., 2004; BELTRAME-BOTELHO et al., 2005).

Um enfoque funcional surgiu na investigação de genes específicos que codificam para algumas proteínas e enzimas do *T. rangeli*. Dentre estes, destacam-se os trabalhos relacionados a família das trans-sialidasas (TS) (BUSCHIAZZO et al., 1993; PONTES-DE-CARVALHO; TOMLINSON; NUSSENZWEIG, 1993; MEDINA-ACOSTA et al., 1994; BUSCHIAZZO; CAMPETELLA; FRASCH, 1997; SOUSA; LOMBARDO; SALDAÑA, 2005), ao gene da tirosina aminotransferase (BONTEMPI et al., 2000); a proteína de membrana da Ordem Kinetoplastida 11 (KMP-11) (URUENA et al., 2004), a histona H2A (PUERTA et al., 2000; CUERVO; LOPEZ; PUERTA, 2006; PUERTA et al., 2009), o transportador de D-glicose (MILETTI et al., 2006), além do estudo envolvendo os genes que codificam para a beta-tubulina, cisteína proteinase, proteína de choque térmico 70 kDa (HSP 70),  $\beta$ -galactofuranosil transferase (STOCO et al., 2012), tirosina fosfatase (PRESTES et al., 2012) e actina em cepas de *T. rangeli* de distintas regiões geográficas (TOALDO et al., 2001).

O estudos dos genomas dos chamados TriTryps (*T. cruzi*, *Trypanosoma brucei* e *Leishmania major*) identificaram genes onde em torno de 25% das sequências acredita-se que estas sejam de proteínas hipotéticas, de porções divergentes de genes conhecidos ou mesmo novos genes ainda não descritos (GRISARD; ROMANHA; STEINDEL, 2011).

Um estudo detalhado do rol de expressão de RNA mensageiro (mRNA) do *T. rangeli*, o chamado transcriptoma, foi realizado utilizando-se duas cepas e as duas formas distintas do parasito

(epimastigotas e tripomastigotas) com o objetivo de aprofundar o conhecimento existente acerca do genoma e do perfil de expressão do parasito (GRISARD et al., 2010). O estudo foi baseado na geração de etiquetas de sequências expressas (do inglês *Expressed Sequence Tags* ou EST) (SNOEIJER et al., 2004) e de etiquetas de sequências expressas do quadro aberto de leitura (do inglês *Open Reading Frame EST* ou ORESTES) (GRISARD et al., 2010).

A avaliação do transcriptoma do *T. rangeli* aumentou em cerca de 26 vezes o número de sequências conhecidas do parasito e em cerca de 77% o número de genes conhecidos para o táxon. Dentre estes genes, ressalta-se a presença de alguns genes relacionados à virulência em tripanosomatídeos patogênicos como o *T. brucei* e o *T. cruzi* (GRISARD; ROMANHA; STEINDEL, 2011). Entre estes, os resultados revelaram diversas sequências com similaridade à membros da família das TS de *T. cruzi* (GRISARD et al., 2010).

Os genes identificados no *T. rangeli* relacionados à TS, através de análise de similaridade por *blast*, pertencem aos grupos II e III da superfamília das TS (gp82, gp85, gp90 e FL160) (GRISARD et al., 2010).

Atualmente, a Rede Nacional de Sequenciamento de DNA (Rede Genoma Brasileira) sequenciou o genoma do *T. rangeli* (<http://www.rangeli.lncc.br>), estando o mesmo em fase de publicação (STOCO et al., 2014).

## 1.2 ESTRUTURA E ORGANIZAÇÃO DE GENES QUE CODIFICAM A SUPERFAMÍLIA DAS TRANS-SIALIDASES

A interação *T. cruzi*-célula hospedeira envolve inicialmente a adesão do parasito à superfície da célula hospedeira, seguindo-se a invasão propriamente dita (VIEIRA et al., 2002; MORTARA et al., 2005; YOSHIDA, 2006).

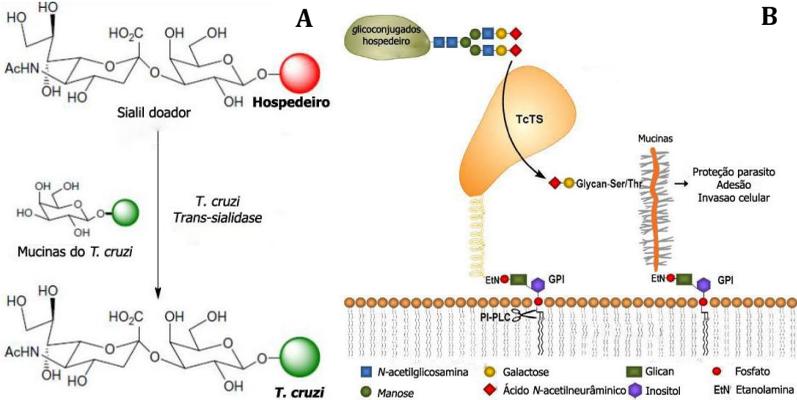
Glicoproteínas presentes na superfície das células de mamíferos podem atuar como receptores do *T. cruzi*, uma vez que o tratamento com proteases (ALCÁNTARA; BRENER, 1980; HENRÍQUEZ; PIRAS; PIRAS, 1981) ou glicosidases (VILLALTA; KIERSZENBAUM, 1983; VILLALTA; KIERSZENBAUM, 1984) inibe a invasão pelo parasito. Além disso, o parasito é capaz de ligar-se aos componentes da matriz extracelular, como fibronectina (OUAISSI et al., 1984), laminina (GIORDANO et al., 1999), heparina, heparan sulfato e colágeno (ORTEGA-BARRIA; PEREIRA, 1991). Também foi demonstrada a participação do ácido siálico no processo de invasão

celular pelos tripomastigotas de *T. cruzi* (SCHENKMAN et al., 1991; SCHENKMAN et al., 1993; PRIOLI; MEJÍA; PEREIRA., 1990).

O parasito expressa na sua superfície uma grande variedade de proteínas e glicoproteínas cujas massas moleculares variam de 70 a 220 kDa (YOSHIDA, 1983; TEIXEIRA; YOSHIDA, 1986; RAMIREZ et al., 1993; SANTORI et al., 1996; 1996a), sendo que algumas delas estão envolvidas nos processos de adesão e penetração do parasito na célula hospedeira. Estudos cinéticos mostraram que o perfil das moléculas de superfície pode variar de acordo com as formas do ciclo evolutivo. Anticorpos monoclonais contra epítomos presentes nestas moléculas reagem preferencialmente com as formas metacíclicas, sugerindo a existência de epítomos estágio-específicos (TEIXEIRA; YOSHIDA, 1986).

Apesar da heterogeneidade encontrada entre os antígenos de superfície presentes nestes parasitos, a maioria deles é codificado por genes relacionados, permitindo o agrupamento dos mesmos em superfamílias, dentre as quais a TS. Esta é a maior família gênica de *T. cruzi* e tem mais de 1.400 genes, dos quais metade é aparentemente funcional (FREITAS et al., 2011). Trata-se de uma família gênica altamente polimórfica onde apenas alguns membros têm os resíduos necessários para atividade catalítica (SCHENKMAN et al., 1994).

As TS catalisam preferencialmente a transferência reversível de ácido siálico ( $\alpha$ 2-3) de glicoconjugados presentes na superfície da célula hospedeira diretamente para moléculas aceptoras contendo o grupo  $\beta$ -galactopiranosil terminal na membrana plasmática do parasito, dando origem a novas ligações glicosídicas ( $\alpha$ 2-3) (VANDEKERCKHOVE et al., 1992; SCHRADER; SCHAUER, 2006; AGUSTI; GIORGI; LEDERKREMER, 2007) (Figura 4).

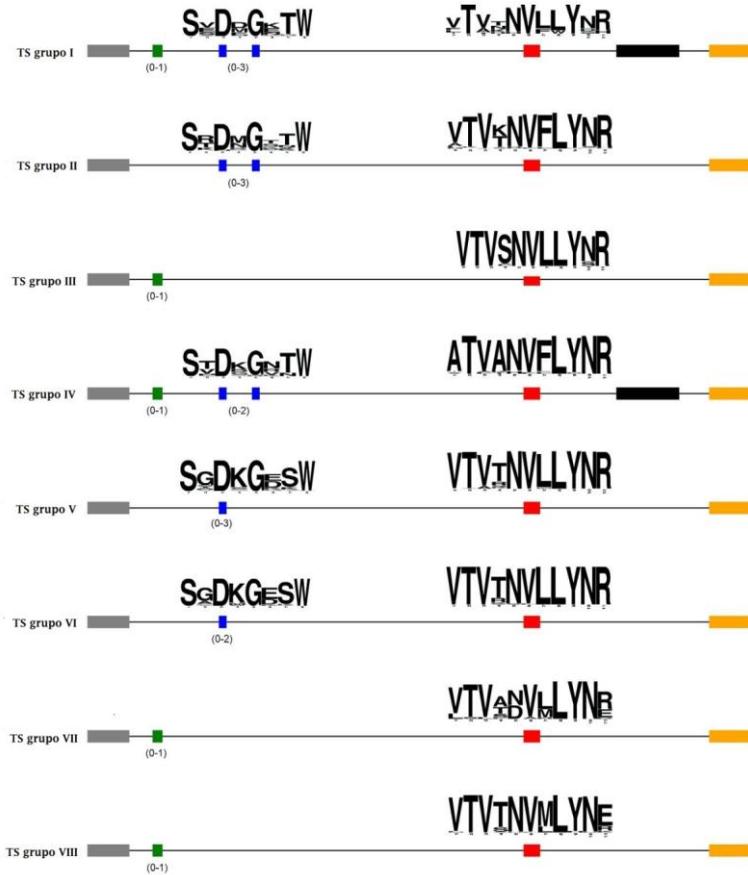


**Figura 4.** A) Transferência de ácido siálico de glicoconjugados do hospedeiro para unidades β-galactopiranosil de mucinas. A transferência é específica para a posição 3 da unidade β-galactopiranosil terminal. ● Oligossacarídeo ligado ao glicoconjugado mamífero. ● Oligossacarídeo na mucina de *Trypanosoma cruzi*. B) Trans-sialidase de *T. cruzi* (TcTS) ancorada a glicosilfosfatidilinositol (GPI) transfere o ácido siálico de glicoconjugados da célula hospedeira para mucinas ancoradas a GPI na superfície do parasito. Fonte: Adaptado de Giorgi e Lederkremer (2011).

A superfamília das TS foi inicialmente subdividida em quatro grupos (CROSS; TAKLE, 1993; FRASCH, 2000; EL-SAYED et al., 2005). Atualmente, de acordo com Freitas e colaboradores (2011), é subdividida em oito grupos. Todos os membros apresentam na região 3' uma sequência que codifica um motivo constituído pelos aminoácidos **VTVxNVxLYNR**, onde “x” representa um resíduo não conservado (Figura 5). Este é o motivo mais conservado na superfamília (FRASCH, 2000; FREITAS et al., 2011). Recentemente, tem sido demonstrado que uma versão deste motivo (**VTVTNVELYNRPLN**), referido como motivo FLY, pode atuar como fator de virulência (MAGDESIAN et al., 2007; TONELLI et al., 2011). Camundongos BALB/c administrados com peptídeo FLY sintético são mais suscetíveis a infecção pelo *T. cruzi*, exibindo um aumento da parasitemia sistêmica e da mortalidade (TONELLI et al., 2011). Além disso, demonstrou-se que o motivo FLY liga-se as células endoteliais do coração, sugerindo que isto possa contribuir para o tropismo do parasito por este órgão (TONELLI et al., 2010).

Dois outros motivos, **FRIP (xRxP)** e **Asp (SxDxGxTW)**,

podem ser encontrados em vários grupos da superfamília das TS (Figura 5). O motivo **FRIP**, mais próximo da região N-terminal, está envolvido na ligação do grupo carboxilato do ácido siálico (GASKELL; CRENNELL; TAYLOR, 1995). Este motivo é encontrado nos grupos I, III, IV, VII e VIII (FREITAS et al., 2011). Embora este motivo esteja envolvido na ligação do ácido siálico, tem sido demonstrado que membros enzimaticamente inativos da família sialidase em *T. cruzi* preservam as propriedades de ligação a carboidratos (CREMONA et al., 1999; TODESCHINI et al., 2002). O motivo **Asp** e o motivo **FRIP** podem se repetir até cinco vezes nas sequências de sialidases virais, bacterianas, de tripanosomatídeos e mamíferos (FREITAS et al., 2011). Embora sua função seja desconhecida, é importante salientar que o motivo **Asp** ocorre em proteínas secretadas e em proteínas que atuam sobre ou interagem com carboidratos (COPLEY; RUSSELL; PONTING, 2001).



**Figura 5.** Representação esquemática do protótipo de cada grupo da superfamília das trans-sialidases (TS) de *Trypanosoma cruzi*. Em vermelho destaca-se o domínio VTV, a caixa azul simboliza o domínio Asp e a caixa verde simboliza o domínio FRIP. Na região carboxi-terminal destaca-se o sinal para ancoragem por GPI (glicosilfosfatidilinositol) (caixa amarela). O peptídeo sinal está simbolizado pela caixa cinza e as repetições pela caixa preta. Os motivos são apresentados apenas quando eles ocorrem na maioria das proteínas daquele grupo. O número entre parênteses indica o número de ocorrência de cada motivo. O tamanho das proteínas em cada grupo pode variar. A representação gráfica não está em escala. Fonte: Adaptado de Freitas e colaboradores (2011).

A família ou grupo I é constituída por proteínas com atividade de neuraminidase e/ou TS, que possuem a capacidade de transferir ácido siálico de glicoproteínas e glicolípídeos presentes na superfície celular do hospedeiro para um aceptor terminal da galactose na membrana plasmática do parasito (FRASCH, 2000; COLLI, 1993; SCHENKMAN et al., 1991; SCHENKMAN et al., 1994; FREITAS et al., 2011). A participação da TS na interação do *T. cruzi* com a célula hospedeira tem sido demonstrada (MING et al., 1993; SCHENKMAN et al., 1994; SCHENKMAN et al., 1994a; TOMLINSON et al., 1994), revelando que a adesão e invasão da célula hospedeira envolvem moléculas da superfície do parasito que contém ácido siálico (HALL et al., 1992). Várias evidências experimentais sugerem que os aceptores de ácido siálico e a enzima TS participam da interação na fase inicial de invasão (LIBBY; ALROY; PEREIRA, 1986; PEREIRA; HOFF, 1986; PRIOLI; MEJÍA; PEREIRA, 1990; SCHENKMAN et al., 1991; SCHENKMAN; PONTES DE CARVALHO; NUSSENZWEIG, 1992; RUIZ et al., 1993). A transferência de resíduos de ácido siálico para a superfície do parasito protege as formas tripomastigotas da lise mediada pela via alternativa do complemento (TOMLINSON et al., 1994). Além destas funções, a TS também está envolvida no escape dos tripomastigotas do fagolisossoma para o citoplasma da célula hospedeira (HALL et al., 1992).

A família ou grupo II da superfamília TS reúne glicoproteínas de massas moleculares de 70-90 kDa (Tc85, gp85, gp82, gp90) presentes na superfície das formas tripomastigotas do *T. cruzi*. Estas proteínas não tem atividade de TS, mas são capazes de se ligar a  $\beta$ -galactose, laminina (GIORDANO et al., 1994), fibronectina (OUAISSI et al., 1988), colágeno (VELGE et al., 1988; SANTANA et al., 1997), citoqueratina (MAGDESIAN et al., 2001) e estão envolvidas na adesão e invasão (FREITAS et al., 2011).

No terceiro grupo da superfamília TS estão incluídas proteínas envolvidas na regulação do sistema complemento (CRP- do inglês *Complement Regulatory Proteins*) (FREITAS et al., 2011). Entre as quais, a FL-160 (VAN VOORHIS; EISEN, 1989), a CEA (do inglês *Chronic Exo Antigen*) e a 160 kDa-CRP localizadas na região da bolsa flagelar das formas tripomastigotas de *T. cruzi* (COLLI, 1993; VAN VOORHIS et al., 1993; JAZIN et al., 1994; NORRIS; SCHRIMPF; SZABO, 1997; FRASCH, 2000). Estas proteínas caracterizam-se pela presença do motivo VTV na região carboxi-terminal e ausência dos

motivos Asp (FREITAS et al., 2011). Estas moléculas ainda compartilham epítomos com proteínas do tecido nervoso do hospedeiro vertebrado (VAN VOORHIS et al., 1993; JAZIN et al., 1994; NORRIS; SCHRIMPF; SZABO, 1997) e segundo alguns autores, a existência de reação cruzada entre estes componentes poderia desencadear reação auto-imune na doença de Chagas. Os antígenos de 160 kDa também estão envolvidos com a resistência das formas tripomastigotas à lise mediada pelo complemento. Um dos membros desta família, a 160 kDa-CRP, parece ser um dos componentes da superfície celular dos tripomastigotas responsável pela inibição da lise mediada pelo complemento, inibindo a formação da C3 convertase (NORRIS; SCHRIMPF; SZABO, 1997).

Utilizando dados do genoma da cepa CL Brener de *T. cruzi*, Beucher e Norris (2008) identificaram parálogos das CRP baseados na similaridade de sequência com uma CRP funcional caracterizada (AAB49414). Além disso, estes autores dividiram as CRP em dois grupos, HSG (grupo com alta similaridade, com mais de 80% de identidade com AAB49414) e LSG (grupo com baixa similaridade, com 54 a 62% de identidade com a sequência AAB49414). Freitas e colaboradores (2011) verificaram que todas as HSG e excluindo apenas dois membros da LSG estão enquadrados no terceiro grupo da superfamília TS. Estes dois membros que não pertenceram ao terceiro grupo, foram agrupados dentro do grupo VII da superfamília das TS (FREITAS et al., 2011). Na verdade, estas duas sequências mais divergentes do subgrupo LSG (BEUCHER; NORRIS, 2008) correspondem a membros do grupo VII que estão mais próximos ao grupo III. Ainda é necessário maiores investigações para verificar se estas duas proteínas, assim como os outros membros do grupo VII tem atividade na regulação do sistema complemento (FREITAS et al., 2011).

O quarto grupo é composto de genes que codificam antígenos de superfície de formas tripomastigotas com repetições de aminoácidos na região carboxi-terminal (FRASCH, 2000; COLLI, 1993; FREITAS et al., 2011). Neste grupo, enquadra-se a família TsTc13, cuja função ainda é desconhecida (FREITAS et al., 2011).

Baseado no padrão de dispersão dos grupos da superfamília das TS na projeção do escalonamento multidimensional e a ocorrência e sequências de motivos principais das TS, verificou-se que os grupos II, V e VI estão mais relacionados entre si quando comparados a outros grupos. O mesmo é válido para os grupos III, VII e VIII da superfamília. Por exemplo, as TS dos grupos II, V e VI são as únicas que não contêm o motivo FRIP e suas sequências do motivo VTVxNVxLYNR são

muito semelhantes (FREITAS et al., 2011).

Yakubu e colaboradores (2011) acreditam que as (trans-)sialidases tem um papel importante na sobrevivência e patogenicidade dos tripanosomas evidenciada pela anemia inicial e contínua na tripanosomíase Africana. Entretanto, a expressão das enzimas ativas trans-sialidases e sialidases não está claramente demonstrada nas formas sanguíneas de *Trypanosoma vivax* e *Trypanosoma congolense* e seu papel nos hospedeiros mamíferos não está totalmente elucidado (COUSTOU et al., 2012; GUEGAN et al., 2013).

No *T. rangeli* foram encontradas sialidases e proteínas similares a sialidases dos grupos I, II e III da superfamília das TS de *T. cruzi* (FREITAS et al., 2011). Várias destas sialidases são expressas nas formas epimastigotas e tripomastigotas do *T. rangeli* (BUSCHIAZZO; CAMPETELLA; FRASCH, 1997; GRISARD et al., 2010). Entretanto, apesar de realizarem a clivagem do ácido siálico da célula hospedeira, as sialidases pertencentes ao grupo I não apresentam a atividade enzimática de transferência para uma molécula aceptora na superfície do parasito (PEREIRA; MOSS, 1985; REUTER et al., 1987; PRIOLI et al., 1988; PONTES-DE CARVALHO; TOMLINSON; NUSSENZWEIG, 1993; MEDINA ACOSTA et al., 1994). A evolução da família das TS no gênero *Trypanosoma* sugere um gene ancestral que codifica para uma TS ativa, expressa durante a interação com o inseto, que depois de várias rodadas de duplicação e diversificação deram origem a TS expressa nas formas que interagem com os hospedeiros mamíferos (BRIONES et al., 1995). Ao longo do processo evolutivo do *T. rangeli*, o parasito teria perdido a atividade *trans*, retendo apenas a atividade de sialidase (FREITAS et al., 2011).

### 1.2.1 gp82 e gp85

A proteína de superfície de 82 kDa é uma glicoproteína (gp82) envolvida no processo de adesão do *T. cruzi* à célula hospedeira (RAMIREZ et al., 1993; SANTORI et al., 1996a; MANQUE et al., 2000), encontrada na superfície dos tripomastigotas metacíclicos, ligando-se à membrana por meio de uma âncora de GPI (CARDOSO DE ALMEIDA; HEISE, 1993).

Esta proteína é sintetizada como um precursor de aproximadamente 70 kDa ao qual adicionam-se resíduos de açúcares *N*-ligados (RAMIREZ et al., 1993, ARAYA et al., 1994). As sequências relacionadas ao gene gp82, pertencentes ao grupo II das TS, estão

distribuídas em vários cromossomos, existindo cerca de 60 cópias por genoma haplóide do *T. cruzi* (ARAYA et al., 1994).

Embora a gp82 não apresente atividade trans-sialidase, em seu estudo funcional observou-se que no tratamento de formas metacíclicas com o anticorpo monoclonal 3F6, que reconhece especificamente a proteína gp82 (TEIXEIRA; YOSHIDA, 1986), tem efeito inibitório na invasão celular. O mesmo efeito é conseguido pela incubação das células com a proteína gp82 nativa ou recombinante (RAMIREZ et al., 1993; SANTORI et al., 1996a). Proteínas recombinantes e peptídeos sintéticos foram utilizados no mapeamento dos domínios da gp82 envolvidos na interação com a célula hospedeira (SANTORI et al., 1996a; MANQUE et al., 2000). A utilização de peptídeos derivados da gp82 em fusão com a proteína lamB de *Escherichia coli* (uma proteína de 421 aminoácidos expressa na membrana externa de *E. coli*) permitiu mostrar que as bactérias eram capazes de aderir às células HeLa (PEREIRA et al., 1999). Além disso, a imunização de camundongos com a gp82 protege os animais contra a infecção aguda provocada pelo *T. cruzi* (SANTORI et al., 1996b).

Além da propriedade de auxiliar no processo de invasão celular, a gp82 tem a capacidade de se ligar a mucina gástrica (NEIRA et al., 2003). Através da interação mediada pela gp82 com a mucina gástrica, um componente da barreira luminal que funciona como primeira linha de defesa contra a invasão de agentes patogênicos, os parasitos podem efetivamente ser direcionados as células alvo. Formas metacíclicas de cepas de *T. cruzi* deficientes na expressão de gp82 são pouco infectivas quando administradas em camundongos por via oral, embora sejam eficientes na invasão das células hospedeiras *in vitro* (CORTEZ et al., 2003). Ao contrário das cepas que expressam gp82, as cepas deficientes (que não expressam esta proteína) têm capacidade reduzida em penetrar nas células epiteliais de cultura na presença de mucina gástrica (CORTEZ et al., 2003), o que reforça a ligação da gp82 a mucina como um requisito importante para os parasitos penetrarem nas células alvo subjacentes. A ligação seletiva da gp82 a mucina pode explicar por que a invasão do parasito não é observada em qualquer lugar da orofaringe ou esôfago (HOFT et al., 1996). Staquicini e colaboradores (2010) mostraram que a ligação seletiva da gp82 a mucina gástrica direciona as formas tripomastigotas metacíclicas de *T. cruzi* ao epitélio mucoso do estômago na infecção oral.

Análises *in silico* de clones de DNA complementar ao mRNA (cDNA) que contêm a região codificante do gene gp82 mostrou que ele possui uma sequência sinal para clivagem/adição de âncora de GPI na

sua extremidade carboxi-terminal (ARAYA et al., 1994). Estes dados estão de acordo com os achados de Cardoso de Almeida e Heise (1993) que mostraram que as moléculas de superfície das formas metacíclicas estão ligadas à superfície celular por meio de âncora de GPI.

A expressão heteróloga da gp82 em células de mamíferos indica que os requisitos para a translocação do polipeptídeo nascente através do retículo endoplasmático e ancoragem a GPI são distintas em mamíferos e em *T. cruzi* (RAMIREZ et al., 1997; RAMIREZ et al., 1999). No domínio carboxi terminal da gp82 foi identificado um sítio adicional (sítio  $\omega$ ) de clivagem/ligação para ancoragem a GPI composto pelos resíduos: aspártico, glicina e serina (RAMIREZ et al., 1999). Além disso, estudos prévios revelaram um incremento na quantidade de mRNA da gp82 com correspondência na quantidade da proteína em si, sendo que a meia vida do mRNA é maior (seis horas) na forma tripomastigota metacíclica do que na forma epimastigota (30 min) de *T. cruzi* (GENTIL et al., 2009).

Segundo Cordero e colaboradores (2008) há um mecanismo coordenado durante a metaciclogênese *in vivo* do *T. cruzi* no inseto vetor *Rhodnius prolixus* ligando a estabilização do mRNA da gp82 e a tradução. Eles observaram que embora o mRNA da gp82 não tenha sido detectado em epimastigotas, os seus níveis no estado estacionário são mais baixos do que em formas metacíclicas e não são traduzidos. Estudos anteriores *in vitro* demonstraram que a expressão gênica em *T. cruzi* é essencialmente regulada ao nível pós-transcricional (AVILA et al., 2001; AVILA et al., 2003). Cordero e colaboradores (2008) sugerem que um mecanismo de regulação pós-transcricional também governa a expressão gênica da gp82 do parasito quando no inseto vetor.

Diferentemente do que ocorre com as moléculas do grupo II em tripomastigotas de cultura tecidual, que tem afinidade por componentes da matriz extracelular como a fibronectina e a laminina (OUAISSI; CORNETTE; CAPRON, 1986; GIORDANO et al., 1994a), a gp82 no estágio metacíclico não se liga a componentes da matriz extracelular (RAMIREZ et al., 1993), ligando-se a célula alvo através de uma forma dependente de receptor e desencadeia a ativação da cascata de sinalização levando a mobilização de  $Ca^{2+}$  (RUIZ et al., 1998), uma propriedade não descrita para TS (grupo I) ou gp85 de tripomastigota de cultura (CORTEZ; ATAYDE; YOSHIDA, 2006). Cortez e colaboradores (2006) sugerem que durante a penetração de formas

metacíclicas mediada pela gp82, o citoesqueleto da célula hospedeira é remodelado.

Além da gp82, a glicoproteína de 85 kDa (gp85) está envolvida na adesão e penetração do *T. cruzi* na célula hospedeira (ANDREWS; KATZIN; COLLI, 1984; OUAISSI; CORNETTE; CAPRON, 1986; ABUIN et al., 1989; LIMA; VILLALTA, 1989; VILLALTA; LIMA; ZHOU, 1990). Segundo Takle e Cross (1991) esta proteína é sintetizada como um precursor de 77,8 kDa, que é aproximadamente 8 kDa menor que o tamanho da glicoproteína nativa identificada por imunoprecipitação (TAKLE et al., 1989). A *N*-glicosilação do polipeptídeo sem dúvida aumenta sua aparente massa molecular (TAKLE; CROSS, 1991).

Segundo Ferrari e colaboradores (1997), os genes da gp82 e da gp85 estão dispersos no genoma de *T. cruzi*. Padrões de hibridização destes genes com bandas cromossômicas de *T. cruzi* separadas por eletroforese em gel de campo pulsado - PFGE (do inglês *pulse field gel electrophoresis*) são muito similares, o que sugere que esses genes podem estar ligados em diferentes loci cromossômicos. Isso foi confirmado pelo isolamento de clones de DNA genômico a partir de bibliotecas de cosmídeos e YAC (do inglês *yeast artificial chromosome*) (FERRARI et al., 1997).

A presença de múltiplas cópias de genes de *T. rangeli* com similaridade à gp82 e à gp85 de *T. cruzi* foi revelado em experimentos de *Southern blot* utilizando hibridizações com alta e moderada estrigência e os genes da gp82 e da gp85 de *T. cruzi* como sondas. Mesmo em condições de elevada estrigência, um padrão múltiplo de hibridização foi obtido, sugerindo que as sequências de *T. rangeli* relacionadas à gp82 e à gp85 estão dispersas no genoma e não em repetições sequenciais (*tandem*). A análise das sequências mostrou que muitos dos fragmentos hibridizados contêm sequências associadas a superfamília das TS, sugerindo que os genes da gp82 e gp85 tenham sido originados de um gene ancestral comum presente em vários membros do gênero *Trypanosoma* (CARMO et al., 1999).

A primeira ORF (do inglês *open reading frame*) semelhante a gp85 descrita em *T. rangeli* (TrGP-1) foi uma cópia telomérica truncada que conserva os motivos que caracterizam a família, mas perde o sítio de ancoragem a GPI e a cauda hidrofóbica C-terminal (CHIURILLO; PERALTA; RAMIREZ, 2002; AÑEZ-ROJAS et al., 2005). Posteriormente, diferentes genes similares a gp82 e gp85 foram identificados. Entre estes encontrou-se uma grande variabilidade sobretudo nos motivos Asp. Enquanto algumas cópias gênicas

apresentavam dois motivos Asp idênticos, outras continham um motivo completo e um segundo degenerado, sem o aminoácido conservado glicina (SKDAKTW). Além disso, entre as sequências de TS obtidas, foi observado uma cópia completa do elemento Fn3 subterminal e um peptídeo sinal parcial localizado na região N-terminal que é necessário para direcionar a proteína para o retículo endoplasmático e permitir o reconhecimento do sítio de ancoragem a GPI (GRISARD et al., 2010).

## 2 JUSTIFICATIVA

O *Trypanosoma cruzi* Chagas, 1909 e o *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920 são protozoários hemoflagelados, pertencentes à Ordem Kinetoplastida, capazes de infectar triatomíneos, mamíferos silvestres e domésticos, bem como o homem nas Américas Central e do Sul (GRISARD et al., 1999; VALLEJO et al., 2003). Estas espécies compartilham um grande número de reservatórios e vetores (MARINKELLE, 1972; D´ALESSANDRO, 1976; D´ALESSANDRO-BACIGALUPO; SARAVIA, 1992), assim como apresentam uma distribuição geográfica sobreposta, sendo comum a ocorrência de infecções mistas em hospedeiros vertebrados e invertebrados (D´ALESSANDRO-BACIGALUPO; SARAVIA, 1992; GRISARD et al., 1999; GUHL; VALLEJO, 2003).

Devido aos fatos apresentados, o *T. rangeli* possui elevada relevância epidemiológica (GRISARD et al., 1999), podendo levar a um diagnóstico equivocado com elevado custo social e econômico. Estudos acerca dos diferentes aspectos da biologia do *T. rangeli* se justificam não só pela íntima relação com o *T. cruzi*, mas também para a geração de informações do próprio parasito, o qual ainda é muito pouco estudado. Além disso, a utilização em estudos funcionais pode fazer do *T. rangeli* um modelo interessante dentro do grupo evolutivo que pertence, incluindo as interações parasito-hospedeiro e a investigação de potenciais alvos antiparasitários.

No projeto transcriptoma do *T. rangeli* foram geradas milhares de seqüências de formas epimastigotas e tripomastigotas de duas cepas do parasito (SC-58 e Choachí). O primeiro relato deste projeto descreve a geração de 656 seqüências de alta qualidade, das quais somente 386 (58,84%) apresentaram similaridade com outros tripanosomatídeos (SNOEIJER et al., 2004).

Na continuidade, o projeto revelou interessantes achados dentre o rol de genes expressos por diferentes formas evolutivas deste parasito, tendo gerado 4.208 seqüências não redundantes de alta qualidade (*Phred*  $\geq 20$ ). Dentre estas seqüências, são inúmeras as que revelaram similaridade com antígenos de superfície, destacando-se genes e/ou pseudo-genes da superfamília das TS de diferentes organismos, incluindo o *T. cruzi* (GRISARD et al., 2010). Por mais que tenha sido demonstrada a presença do gene da gp85 e a expressão desta proteína por formas epimastigotas do *T. rangeli* (CHIURILLO; PERALTA; RAMIREZ, 2002; AÑEZ-ROJAS et al., 2005) e a descrição da estrutura do cristal da sialidase de *T. rangeli* com elevada identidade (70%) com o cerne da região globular da TS de *T. cruzi* (HARRISON et al., 2001), o

parasito não apresenta atividade de TS (PONTES DE CARVALHO; TOMLINSON; NUSSENZWEIG, 1993) e a função das sialidases no ciclo de vida deste parasito ainda não foi esclarecida.

Uma vez que não se sabe a função destes genes em *T. rangeli* e que estes apresentam inúmeras diferenças em relação as sequências descritas para *T. cruzi*, o presente estudo visa utilizar diferentes abordagens para caracterizar os genes da gp82 e da gp85 de *T. rangeli*. Além disso, considerando a característica apatogênica do *T. rangeli* para hospedeiros mamíferos e a baixa capacidade de invasão celular, propomos avaliar a expressão heteróloga da gp82 de *T. cruzi* pelo *T. rangeli* e, comparativamente, analisar as alterações estruturais e biológicas do parasito recombinante.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Estudar os genes de *Trypanosoma rangeli* relacionados à superfamília das trans-sialidases e avaliar as implicações biológicas e moleculares da expressão heteróloga da gp82 de *Trypanosoma cruzi* por *Trypanosoma rangeli*.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar e caracterizar comparativamente as sequências do *T. rangeli* que apresentam similaridade com os genes do grupo II da superfamília das trans-sialidases, incluindo a análise intra- e interespecífica com genes similares de espécies filogeneticamente relacionadas;
- Obter uma linhagem de *T. rangeli* expressando a gp82 de *T. cruzi* (*T. rangeli*-gp82) e avaliar os sítios e os níveis da expressão heteróloga da gp82 nas formas epimastigotas e tripomastigotas de *T. rangeli*-gp82;
- Analisar comparativamente a interação *in vitro* do *T. rangeli*-gp82 com células Vero e THP-1;
- Avaliar comparativamente a infectividade e o desenvolvimento do *T. rangeli*-gp82 em camundongos e em triatomíneos.

A fim de facilitar a apresentação e a compreensão deste trabalho, os resultados são apresentados em capítulos que correspondem a cada um dos objetivos.

#### **4 CAPÍTULO I**

Identificação e caracterização das sequências de *T. rangeli* similares a genes do grupo II da superfamília das trans-sialidases

## 4.1 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1.1 Parasitos

Foram utilizadas formas epimastigotas de duas diferentes cepas de *T. rangeli*: cepa SC-58, isolada de *Echimyis dasytrhix* naturalmente infectado capturado em Florianópolis, Brasil (STEINDEL et al., 1991) e Choachí, isolada de glândulas salivares de *R. prolixus* naturalmente infectado, capturado na Colômbia (SCHOTTELIUS, 1987). Previamente, as cepas de *T. rangeli* foram submetidas a passagens cíclicas camundongo-triatomíneo-camundongo.

Os epimastigotas de *T. rangeli* foram cultivados a 27°C através de repiques semanais em meio LIT (do inglês *Liver Infusion Tryptose*), suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF), 50 unidades/ml de penicilina e 50 µg/ml de estreptomicina (Cultilab, Campinas).

### 4.1.2 Isolamento do DNA total de *T. rangeli*

Formas epimastigotas foram cultivadas até a densidade de  $3 \times 10^7$  parasitos/ml, sendo coletadas ( $1 \times 10^{10}$ ) por centrifugação a  $1.270 \times g$  por 10 min e, posteriormente, lavados duas vezes por centrifugação ( $880 \times g$  por 10 min) em PBS (do inglês *Phosphate Buffered Saline*) pH 7,2. As células foram adicionadas de 500 µl de tampão de lise (10 mM Tris-HCl pH 7,4; 10 mM NaCl; 25 mM EDTA pH 8,0; 1% SDS - dodecil sulfato de sódio) e 100 µg/ml de proteinase K (Sigma-Aldrich, Saint Louis) por 12 horas a 56°C. O DNA foi então extraído pelo método de fenol/clorofórmio de acordo com Sambrook e Russell (2001) com algumas modificações.

### 4.1.3 Isolamento do RNA total de *T. rangeli*

Formas epimastigotas foram cultivadas até a densidade de  $5 \times 10^8$  parasitos/ml e centrifugadas a ( $1.270 \times g$  por 10 min) e, posteriormente, lavados duas vezes por centrifugação ( $1.270 \times g$  por 10 min) em PBS pH 7,2. Após, os parasitos foram homogeneizados vigorosamente em 1 ml do reagente Trizol (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad) e nele mantidos por cinco minutos a temperatura ambiente. Em seguida, foram adicionados 200 µl de clorofórmio 98% (Merck, Darmstadt), sendo as amostras agitadas e centrifugadas a  $12.000 \times g$  por 15 min a 4°C. A fase aquosa resultante foi transferida para um novo tubo onde foram adicionados 500 µl de isopropanol (Merck). As amostras foram centrifugadas por 20 min a  $12.000 \times g$ , sendo então o sobrenadante descartado e o precipitado lavado com 1 ml de etanol 70% a partir de centrifugação a  $7.500 \times g$  por

5 min. O sobrenadante foi novamente descartado e o precipitado contendo o RNA total foi seco, invertendo-se os tubos sobre papel filtro por aproximadamente 10 min. O RNA foi então adicionado de 30 µl de água ultra pura livre de RNAses. Todas as etapas foram realizadas em banho de gelo a fim de evitar a degradação do RNA.

Para a obtenção de materiais e soluções livres de RNAses, os mesmos foram tratados com água contendo 0,1% de dietilpirocarbonato (DEPC) por 30 min, sendo posteriormente autoclavados para esterilização e inativação do DEPC.

#### 4.1.4 Dosagem do DNA e RNA

As amostras de DNA e RNA obtidas foram dosadas e avaliadas quanto a sua pureza em um espectrofotômetro *BioPhotometer*<sup>®</sup> (Eppendorf, Hamburg), observando-se a absorbância a 260 e 280 nm, além das relações 260/280 nm e 260/230 nm. Além disso, as amostras de DNA extraídas foram visualizadas em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio (1 µg/ml) para comparação com padrões de DNA de concentração conhecida.

#### 4.1.5 Amplificação e clonagem dos fragmentos gênicos das sialidases do grupo II de *T. rangeli*

Os ácidos nucléicos extraídos foram utilizados como moldes para amplificar os genes das sialidases do grupo II de *T. rangeli* através de PCR e RT (transcrição reversa)-PCR.

Para tal, foram testados distintos iniciadores, incluindo alguns já descritos na literatura, além de novos iniciadores desenhados a partir de regiões conservadas, detectadas por alinhamentos das sequências do genoma do *T. rangeli* similares ao grupo II das TS de *T. cruzi* (mais especificamente gp82 e gp85) (Tabela 1).

Estes iniciadores foram combinados em pares (ilustração apresentada posteriormente) em reações de PCR contendo: 50 ng do DNA total das cepas SC-58 e Choachí de *T. rangeli*, 10 pmol de cada um dos dois iniciadores, 200 µM de dNTP e 1 unidade de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen Life Technologies) em tampão fornecido pelo fabricante. As reações iniciaram-se com uma etapa de desnaturação do DNA a 94°C durante cinco min. Subsequentemente foram realizados 35 ciclos com as etapas de desnaturação (94°C por 45 segundos), ligação dos iniciadores a sequência alvo (55°C por 45 segundos) e alongamento da cadeia de DNA pela polimerase (72°C por dois min), sendo estes passos realizados em um termociclador *Mastercycler Gradient* (Eppendorf).

Alguns iniciadores descritos foram utilizados em reações de RT-PCR a fim de obter o fragmento necessário a partir do RNA mensageiro (mRNA). Para isto, amostras de RNA total foram submetidas à RT a 37°C por 50 min, seguindo-se 70°C por 15 min para inativação da enzima. Cada reação ocorreu na presença de 200 unidades (U) da enzima transcriptase reversa M-MLV (Invitrogen Life Technologies), 2mM de dNTP, 10 pmol/μl do iniciador reverso, 3μg de RNA total na presença de tampão específico.

Após a síntese de cDNA pela RT-PCR, procedeu-se para a amplificação pela reação de PCR. A reação ocorreu utilizando-se como molde 1 μl de cDNA, sob as mesmas condições descritas anteriormente.

**Tabela 1.** Relação dos iniciadores utilizados no presente estudo para a amplificação dos genes das sialidasas do grupo II de *Trypanosoma rangeli*. S-Iniciador Senso; AS- Iniciador Anti-Senso.

Iniciadores		
F1.4	S	5` TCYATGATCATTTATTCGAAGGACGR 3`
F8.2	S	5` AMGTTTGTGGGGCTGTCG 3`
F9.1	S	5` GGCGGCAAAGACRGCAGYGT 3`
1808F1	S	5` TCCCTTCCCTCGCCAGTGC 3`
ME-L	S	5`CCCGAATTCTGTACTATATTGGT 3`
R1.3	AS	5` CGYCGTCCTTCGAATAAATGAT 3`
R8.1	AS	5` GTACGACAGCCCCACAAACK 3`
R9.1	AS	5` ACRCTGCGYGTCTTTGCCGC 3`
1808R1	AS	5` GCACTGGCGAGGGAAGGGA 3`
OligodT- Anchor	AS	5`GACCACGCGTATCGATGTCGAC(T) <sub>16</sub> V 3`
Anchor	AS	5' GACCACGCGTATCGATGTCGAC 3'

Todos os produtos de PCR obtidos foram resolvidos em géis de agarose corados pelo brometo de etídio (1 μg/ml). Alguns produtos resultantes da RT-PCR precisaram ser excisados do gel de agarose e purificados utilizando o kit *Illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification* (GE Healthcare, Buckinghamshire) de acordo com as

especificações do fabricante. Posteriormente, entre 4-7  $\mu$ l das amostras foram clonados no plasmídeo *pGEM-T Easy Vector*<sup>®</sup> (Promega, Madison), conforme instruções do fabricante. Os produtos de ligação foram utilizados na transformação de células competentes DH5- $\alpha$  (*E. coli*). A comprovação da presença dos insertos nos clones recombinantes foi realizada através da amplificação dos fragmentos esperados diretamente da colônia de bactérias. Os clones positivos tiveram seu DNA plasmidial extraído por lise alcalina (SAMBROOK; RUSSEL, 2001) para posterior sequenciamento dos insertos.

#### **4.1.6 Sequenciamento dos genes das sialidasas do grupo II de *T. rangeli***

O sequenciamento de todos os clones correspondentes aos genes das sialidasas do grupo II de *T. rangeli* foi realizado em um equipamento *MegaBace 1000*<sup>®</sup> *DNA Analysis System* (GE Healthcare), sendo a reação de sequenciamento preparada a partir do kit *DYEnamic*<sup>®</sup> *ET Dye Terminator* (GE Healthcare), de acordo com as instruções do fabricante.

As reações foram realizadas na presença de 5 pmol dos iniciadores universais M13-F e M13-R e/ou dos iniciadores desenhados anteriormente citados e aproximadamente 800 ng de DNA plasmidial, nas seguintes condições térmicas: 95°C por 25 segundos, seguidos de 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 segundos, ligação dos iniciadores a 55°C por 30 segundos e extensão a 60°C por 80 segundos. Posteriormente, os produtos marcados foram precipitados utilizando-se isopropanol 70% e etanol absoluto, para retirada dos nucleotídeos e iniciadores não incorporados. Os produtos purificados foram eletroinjetados a 2 KV por 120 segundos e eletroeluídos por 150 min a 9 KV.

#### **4.1.7 Análise das sequências obtidas**

As análises das sequências obtidas foram analisadas com o apoio do Laboratório de Bioinformática do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia - MIP, Centro de Ciências Biológicas – CCB da UFSC.

As sequências geradas foram analisadas quanto à sua qualidade utilizando-se o pacote *Phred/Phrap/Consed* (<http://www.phrap.org>) (EWING et al., 1998; EWING; GREEN, 1998). Neste, 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 (EWING; GREEN,

1998). As sequências nucleotídicas que não apresentaram um valor mínimo de qualidade ( $Phred \geq 50$ ) foram novamente sequenciadas.

A confirmação da identidade dos fragmentos foi realizada através do algoritmo *BLAST* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) (ALTSCHUL et al., 1997) e com as sequências dos clones obtidos para um mesmo gene foram agrupadas utilizando-se o programa *CAP3* para formação de uma sequência consenso.

#### 4.1.8 Análises *in silico*

Com o objetivo de encontrar as ORFs nas sequências selecionadas, utilizamos o programa *ORF Finder* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>). As sequências preditas de aminoácidos foram obtidas a partir do programa *Translate* do pacote *ExpASY* ([www.expasy.org](http://www.expasy.org)). Para a análise da estrutura dos genes foi utilizado o programa *Conserved Domain Search Service* (MARCHLER-BAUER; BRYANT, 2004; MARCHLER-BAUER et al., 2011). Utilizou-se o programa *SignalP 4.1* (PETERSON et al., 2011) para a predição de peptídeos sinais e sítios de clivagem. Enquanto que para a predição de sítios de ancoramento a GPI foram utilizados os programas *FragAnchor* (POISSON et al., 2007) e *GPI-SOM* (FRANKHAUSER; MÄSER, 2005).

Na tentativa de identificar regiões de similaridade que possam indicar relações funcionais, estruturais e/ou evolucionárias entre duas sequências biológicas utilizou-se o programa *Pairwise Sequence Alignment* (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/>).

Para obter a representação gráfica do alinhamento múltiplo das sequências aminoacídicas utilizamos o programa *WebLogo* (<http://weblogo.berkeley.edu/>) (CROOKS et al., 2004).

#### 4.1.9 Análise da variabilidade gênica

A avaliação da variabilidade intraespecífica foi realizada através do alinhamento múltiplo das sequências obtidas das diferentes cepas de *T. rangeli* utilizando-se o programa *CLUSTAL W* (THOMPSON et al., 1994), sendo as sequências posteriormente visualizadas através do programa *Bioedit*<sup>®</sup> (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>). Foram incluídas para comparação interespecífica sequências de *T. cruzi* depositadas no *GenBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), utilizando-se a mesma metodologia descrita anteriormente para avaliação da variabilidade intraespecífica.

#### 4.1.10 Caracterização da organização genômica das sialidases do grupo II de *T. rangeli* por *Southern blot*

O DNA genômico das cepas SC-58 e Choachí de *T. rangeli* (10 µg) foi digerido com diferentes enzimas de restrição (*AvaI*, *BamHI*, *EcoRI*, *SacI*, *SpeI*) em reações contendo 50 unidades das respectivas enzimas e seus tampões em um volume final de 35 µl. As reações foram mantidas a 37°C por 12 horas.

Após a digestão, os fragmentos resultantes foram precipitados com isopropanol 100% por 30 min, lavados com etanol 70% e centrifugados por cinco min a 14.000 x g. O sobrenadante foi descartado, o precipitado foi seco a 37°C por 30 min e, posteriormente, hidratado com 15 µl de água ultra pura. Os DNAs genômicos digeridos foram resolvidos em eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TBE (89 mM Tris base, 89 mM Ácido bórico e 2mM EDTA) a 5 volts/cm.

Após a eletroforese, o gel foi submetido a incubações em soluções depurinizante (HCl 250mM) por 10 min, desnaturante (NaCl 1,5M e NaOH 0,5M) por 25 min e neutralizante (NaCl 1,5M e Tri-HCl 0,5M; pH ajustado para 7,5) por 30 min, intercalando-se lavagens com água ultra pura em cada etapa, visando facilitar a transferência do material para a membrana. O DNA foi transferido por capilaridade para uma membrana de *nylon* conforme protocolo padrão (SAMBROOK; RUSSEL, 2001). Após, a membrana foi fixada através de luz ultravioleta (Energia 1.200J) em um aparato *UV Cross Linker*<sup>®</sup> (GE Healthcare) e mantida durante 1 hora a 42°C em tampão de hibridização (0,5 M NaCl, 5% agente bloqueador diluído em *ECL Gold Hybridization Buffer*<sup>®</sup>) (GE Healthcare).

A sonda correspondente ao maior fragmento amplificado para sialidase de cada cepa, foi marcada através do kit *ECL Direct Nucleic Acid Labelling and Detection System*<sup>®</sup> (GE Healthcare) conforme especificações do fabricante e adicionada à membrana, permanecendo 16 horas a 42°C sob agitação suave. As membranas foram então lavadas três vezes por 20 min em solução de lavagem primária a 42°C (SSC 0,5X, 0,4% SDS, 6 M Uréia) e duas vezes de cinco min em solução de lavagem secundária (SSC 2X). Em seguida, a detecção foi realizada através da adição do reagente *ECL* sobre a membrana durante 1 min seguido de exposição a um filme radiográfico para detecção de quimioluminescência, utilizando o processador de filmes SRX-101A (Konica Minolta Medical & Graphic, INC).

## 4.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.2.1 Obtenção e análise comparativa das sequências gênicas

Utilizamos dados oriundos do *National Center for Biotechnology Information* (2010) para obter as sequências gênicas correspondentes a gp82 e a gp85 de *T. cruzi*, bem como as sequências relacionadas (sequências com alta similaridade a gp82 e/ou gp85 e que estão anotadas como TS). Foram obtidas 21 sequências anotadas como gp82 de *T. cruzi* e 125 sequências relacionadas não redundantes. Com relação a gp85, obteve-se 17 sequências especificamente anotadas e 320 sequências relacionadas não redundantes.

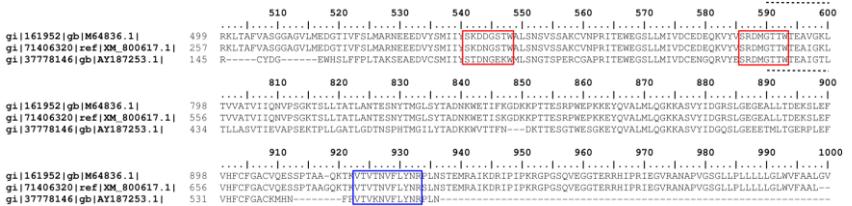
Apesar dos grupos da superfamília das TS serem bem caracterizados (COLLI, 1993; CROSS; TAKLE, 1993; SCHENKMAN et al., 1994) e somente um dos grupos corresponde a proteínas TS ativas, a maioria dos membros desta família gênica esta anotada no banco de dados público como TS (FREITAS et al., 2011). Isso conseqüentemente dificulta a caracterização adequada das glicoproteínas.

As sequências de *T. cruzi* obtidas foram traduzidas na fase correta de leitura, sendo realizado um alinhamento através do programa *CLUSTAL W* visualizado através do programa *Bioedit*<sup>®</sup>. Inicialmente, buscou-se nas sequências os domínios característicos do grupo II da superfamília das TS de *T. cruzi*. Além disso, procuramos pela presença ou ausência de peptídeo sinal e sítios de ancoramento a GPI.

As sequências que não apresentavam os domínios e/ou eram muito divergentes foram excluídas. Os resultados dos alinhamentos e da caracterização de algumas das sequências analisadas referentes ao grupo II da superfamília das TS de *T. cruzi*, mais especificamente a gp82 e gp85, encontram-se nas Figuras 6 e 7, respectivamente. Existem diferentes genes que codificam para estas proteínas e eles apresentam variações em suas sequências. Esta variabilidade e a ausência de regiões exclusivamente conservadas dificultam o processo de anotação destes genes em gp82 ou gp85.



**Figura 6.** Alinhamento parcial das sequências aminoacídicas de gp82 de *Trypanosoma cruzi* oriundas do *National Center for Biotechnology Information* (2010). Os espaços são indicados por traços. A caixa vermelha aberta indica o motivo ASP (SxTxGxTW) e a caixa azul o motivo subterminal (VTVxNVxLYNR). As sequências estão apresentadas apenas em partes para uma melhor visualização.



**Figura 7.** Alinhamento parcial das sequências aminoacídicas de gp85 de *Trypanosoma cruzi* oriundas do *National Center for Biotechnology Information* (2010). Os espaços são indicados por traços. A caixa vermelha aberta indica o motivo ASP (SxTxGxTW) e a caixa azul o motivo subterminal (VTVxNVxLYNR). As sequências estão apresentadas apenas em partes para uma melhor visualização.

A similaridade entre gp82 e gp85 de *T. cruzi* pode ser também visualizada a partir do alinhamento de sequências nucleotídicas (Figura 8), com 71,8% de similaridade. Devido a esta alta similaridade entre as sequências, resolvemos analisá-las conjuntamente em relação ao *T. rangeli*, uma vez que as principais modificações com relação a estas ocorrem nas regiões não traduzidas (UTR) 3' e 5', sendo as regiões

centrais muito similares. Para realizar a comparação com o banco de dados genômico da cepa SC-58 do *T. rangeli* (<http://www.rangeli.lncc.br>), selecionou-se apenas uma sequência representativa de gp82 (EF154827.1) e uma de gp85 (M64836.1) de *T. cruzi*.

Inúmeros *contigs* (junção de vários *reads*) foram identificados com alta similaridade às sequências de gp82 e/ou gp85 de *T. cruzi*. As sequências nucleotídicas obtidas foram organizadas de acordo com as ORFs e em orientação +1. Todas as sequências foram então alinhadas, incluindo nas análises as sequências representativas das gp82 e gp85 de *T. cruzi*, bem como as sequências descritas por Penã e colaboradores (2009). Eles descreveram uma cópia gênica truncada em *T. rangeli* que pertence ao grupo II da superfamília das TS, que nomearam como TrGP. Neste trabalho, também confirmaram que a TrGP é uma família multigênica que compartilha muitas das características com a gp85/TS de *T. cruzi*.





Quando comparamos cada uma das sequências com relação aos dados de *T. rangeli*, observa-se que na maioria das vezes os mesmos *contigs* apresentavam similaridade com as duas glicoproteínas de *T. cruzi* - gp82 e gp85. Cerca de 84,62% das sequências similares a gp82 de *T. cruzi* eram também similares à gp85 de *T. cruzi*. Assim como, entre as sequências similares a gp85 de *T. cruzi*, 68,75% eram também similares a gp82 de *T. cruzi*, reforçando a dificuldade de distinção entre as duas glicoproteínas, como ocorre na anotação nos bancos de dados.

Nas sequências aminoacídicas identificadas em *T. rangeli* buscou-se domínios conservados característicos do grupo II das TS, presença ou ausência de peptídeo sinal e possíveis sítios de ancoramento a GPI. Após as análises, descartamos as sequências que não se enquadravam nos requisitos acima (presença dos domínios conservados - Asp e subterminal). No final, foram identificadas oito ORFs referentes a sequências de *T. rangeli* similares as glicoproteínas do grupo II das TS de *T. cruzi*. Os resultados encontram-se na Tabela 2.

**Tabela 2.** Comparação dos domínios conservados, presença ou ausência de peptídeo sinal e possíveis sítios de ancoramento a GPI entre as sialidases do grupo II de *Trypanosoma rangeli*, gp82 (EF154827.1) e gp85 (M64836.1) de *Trypanosoma cruzi*. P: presença. A: ausência.

Sequências aminoacídicas <i>T. rangeli</i> e <i>T. cruzi</i>	Domínio Asp		Domínio subterminal		Peptídeo sinal	Ancoramento a GPI
	Conservado	Degenerado	Conservado	Degenerado		
<i>Tr_Contig00819</i>	2	-	1	-	A	P
<i>Tr_Contig03914</i>	-	1	-	-	A	A
<i>Tr_Contig01808</i>	1	1	-	1	P	P
<i>Tr_Contig00323</i>	-	2	-	-	P	A
<i>Tr_Contig00118</i>	1	1	-	1	P	A
<i>Tr_Contig03988</i>	1	1	-	-	A	A
<i>Tr_Contig01543</i>	-	1	-	1	P	P
TrGP-4*	1	1	-	1	P	P
<i>Tc_gp82</i>	1	1	1	-	A	P
<i>Tc_gp85</i>	2	-	1	-	P	P

\* Sequência descrita por Penã et al., 2009.

Como podemos observar, há alguns *contigs* que não apresentam o domínio subterminal característico desta família gênica. Este domínio é uma assinatura da família das TS. No estudo descrito por Freitas e colaboradores (2011), o motivo VTV<sub>x</sub>NV<sub>x</sub>LYNR foi encontrado em apenas 328 das 508 sequências de TS utilizadas. Eles verificaram que 159 destas sequências tinham uma versão degenerada deste motivo.

Além disso, eles concluíram que 487 (96%) dos membros da superfamília das TS tem a forma canônica ou degenerada do motivo VTVxNVxLYNR. As sequências restantes não contêm este motivo pois tem uma região C-terminal truncada resultante de códons de terminação prematuros e/ou alteração da fase de leitura.

Em relação aos domínios Asp (**SxDxGxTW**), algumas sequências de *T. rangeli* apresentaram degenerações, com a troca do aminoácido Treonina (T) por Asparagina (N) e/ou Lisina (K). Nos *contigs* 03914, 01808, 03988, na TrGP-4 e na sequência da gp82, o domínio Asp degenerado teve a substituição de Treonina por Asparagina. No *contig* 00118, a Treonina foi substituída por Lisina e no *contig* 323 observamos os dois domínios Asp degenerados. Em um deles, a Treonina foi substituída por Asparagina e em outro por Lisina.

De maneira geral, verificamos que as substituições no domínio Asp ocorreram no aminoácido Treonina, o qual é classificado como polar neutro. O grupo R desse aminoácido é mais solúvel em água ou mais hidrofílico do que os aminoácidos não polares, pois contem um grupo funcional que forma pontes de hidrogênio com a água. O grupamento hidroxil da Treonina contribui para sua polaridade (LEHNINGER; NELSON; COX, 2005). Quanto aos possíveis substituintes encontrados, verificamos que a Asparagina enquadra-se no mesmo grupo da Treonina, ou seja, é um aminoácido polar neutro, o qual difere da Lisina, que é classificada como sendo um aminoácido com grupo R carregado positivamente (básico). Os grupamentos R mais hidrofílicos são dos carregados positivamente ou negativamente. A Lisina tem um segundo grupamento amino primário na posição  $\epsilon$  de sua cadeia alifática (LEHNINGER; NELSON; COX, 2005). Nos *contigs* onde ocorreram as substituições de Treonina por Asparagina, acreditamos que não haja modificações significativas na funcionalidade da proteína. Nos que ocorreram substituição de Treonina por Lisina podem ocorrer modificações. Porém, em virtude de ambos serem aminoácidos hidrofílicos, talvez essas modificações não incorram em alterações de funcionalidade.

Quanto às sequências onde observou-se o domínio subterminal degenerado (**VTVxNVxLYNR**), verificamos que na sequência TrGP-4, a primeira Valina (V) foi substituída por Alanina (A). No *contig* 00118, a Treonina foi substituída por ácido glutâmico (E). Nos *contigs* 01808 e 01543, ocorreu a substituição da primeira Asparagina por Lisina e Serina (S), respectivamente.

A Valina tem um grupo R alifático, apolar. Este é um aminoácido hidrofóbico. A cadeia lateral da Valina tende a se agrupar

dentro da proteína, estabilizando a estrutura proteica por meio de interações hidrofóbicas (LEHNINGER; NELSON; COX, 2005). O substituinte encontrado, Alanina, pertence ao mesmo grupo. Portanto, acreditamos que esta substituição não acarrete em modificações significativas. No *contig* 00118, temos um aminoácido polar neutro sendo substituído por um aminoácido com grupo R carregado negativamente (ácido). O que pode acarretar em modificação de função. No *contig* 01808, ocorreu a substituição de Asparagina por Lisina. A Asparagina é um aminoácido polar neutro e a Lisina é um aminoácido com grupo R carregado positivamente (básico). Quanto a substituição de Asparagina por Serina, no *contig* 1543, ambos são aminoácidos pertencentes ao mesmo grupo.

Além das análises apresentadas, resolvemos analisar cada uma das sequências aminoácídicas referentes aos *contigs* com relação a identidade e similaridade com as sequências de gp82 e gp85 de *T. cruzi*. Os resultados encontrados são apresentados na Tabela 3.

**Tabela 3.** Identidade e similaridade das sequências aminoácídicas das sialidases do grupo II de *Trypanosoma rangeli* em relação a gp82 (EF154827.1) e gp85 (M64836.1) de *Trypanosoma cruzi*.

Sequências aminoácídicas de <i>T. rangeli</i>	<i>T. cruzi</i>				Tamanho da proteína (aminoácidos)
	gp82 (726 aminoácidos)		gp85 (714 aminoácidos)		
	Identidade (%)	Similaridade (%)	Identidade (%)	Similaridade (%)	
<i>Contig</i> 00819	51,5	62,7	43,7	58,9	516
<i>Contig</i> 03914	52,3	66,4	49,0	63,1	336
<i>Contig</i> 01808	47,4	58,6	42,7	56,5	691
<i>Contig</i> 00323	46,8	58,4	42,1	57,0	733
<i>Contig</i> 00118	49,5	61,1	44,6	58,8	782
<i>Contig</i> 03988	46,4	57,9	43,0	58,2	491
<i>Contig</i> 01543	46,7	58,9	41,5	55,0	681
TrGP-4*	46,6	58,9	40,5	56,7	760

\* Sequência descrita por Penã et al., 2009.

Os resultados de identidade e similaridade com relação as sequências de *T. cruzi* corroboram com os resultados de Penã e

colaboradores (2009) que verificaram 43-48% de identidade e 57-63% (TrGP-3 e TrGP-4) de similaridade em relação aos membros do grupo II da superfamília das TS de *T. cruzi*.

Uma vez que o genoma do *T. rangeli* ainda não está disponível, a análise por estratégias de sequenciamento pode gerar informações valiosas sobre as famílias multigênicas que codificam antígenos de superfície (PENÃ et al., 2009). Assim, para tentar identificar um número maior de sequências do grupo II das TS em *T. rangeli* uma nova estratégia foi baseada em PCR. Como já citado anteriormente, devido a alta similaridade entre a gp82 e a gp85 de *T. cruzi* e devido a dificuldade em identificar corretamente cada uma das sialidases do grupo II em *T. rangeli*, decidimos desenhar iniciadores conservados que fossem capazes de identificar ambos os genes em *T. rangeli*. Para tal, utilizamos a sequência do *contig* 01808 de *T. rangeli* como modelo para o desenho dos iniciadores (Figura 9). Os iniciadores desenhados foram então comparados as outras sequências e nos locais onde havia algum nucleotídeo diferente foram adicionadas degenerações. Os iniciadores desenhados encontram-se na Figura 10.

1 ATGAGAAACAGCGACACATGCCAACATGTGCCCTCATCCGTTTTCTTCTCAGTGTCTCATTCTCTCGGTCTTTTATGATGCTGGCGGGTATGC  
M R E Q R H M P N M C R H P P S F S V L L L I L C V L L I C C G G M

101 CTGTCCACGCCAAGGGGAATGAACCAAGGAGGTGCAACTTCCAGAGGCTGTGATCTTTTTGTGTGCATCGAACGATGTTGAAGAACAGGTCAAGC  
A V H A K C N E P K E V Q L P E A V D L F V L H R T S V E R Q Q C H

201 TCAAACGATGGATTCCTTGCCTTCCTCCCTGCCAGTGGTGGTGAAGTGTGGTGCATTCGCCAGGCTCACACCTTCAACACGTAAATCAGAA  
Q T M D S F P A P S L R A S A G E V L V A L E G H I T F Q H V N Q K

301 CAAGATTTTGTCACTGACCGGATGTTGTGGCGGGTACATTTGACTCGGGAGAGCTGCTGCTCTTTTGTCCGCAAGCTCCCTGCAAAACAGTTCAAGC  
Q D F V Y T D A D V V A G Y I D S A E S W S S F V A K V R A N K L K

401 CGTACAGCATCTTTAACACGACATTCAAGAGGGGCATATGTCCTCGTGGATATGCCGCCGACCCACAACAATGCAAAGGCCAACACTGTTCTCT  
A Y S I F N T T I Q E G H M S L V R Y A P R P T T I A K G N T V L L

501 TTTTGTGGGAGCTCAATCAAAATATGATTCATCGAAGAAGTGGATTAGTCTCAGAGGCTTGATTTGTTCGTGGGTGAAGCCAGCGAGAT  
F V G G H Q S K Y D S S S K K W I R S S E G L D D L F V G E A T Q D

601 AAAGTCATCGATGGCGGACCCACCTCGCTTTGGCAACGATCAAACCATCTGCTAAACACCTGGTGGACGAGTTGTTGGAGCTGGTCTCAC  
K V I Q W G E E F E S L W Q Q I K F S A K Q R L D D Q F V G G S G S

701 CCCTAGTATGGAGGATGACACGCTTGTGTTTTCCGTGACGGCGAGGGGGGAGAAAGACACTGCTCTATGATCATTTATCGAAGGACGGCGCAA  
G V V M B D D T L V F P V T A R C G G E K D T V S M I I Y S K D G G G K

801 AAATGGGTGCTTCCACAGGGGATGCTCCCTCGGTGGTGCAGTCAACCCCTCATGCTCGAGTGGGAGCAGGGGCGACTTCTCATGGTGCCAAATGCCAT  
N W V L P Q G M L P A W C T D P L I V E W E Q Q L L M V A K C H

901 TCTGTTCCAGGTTTTGAGTGCAGAGACATGGGGCAACGCTGGACGGAGGGGTGAGGACGCTCACACGGCTGCAGCCCATGTTTACCAAACTT  
S G S R V F E S R D M G A I W I E A V R I L I R V Q P M L L P N I

1001 TCGCAACAGCTGAGGACTGGATTCCTTCCCTCAGCCGCGACCATGCTGGAAGAGGCTCATGCTCAACCCAGAAAGGATCCCCCTGGGAGAGAGT  
L R T A E G V E S L T T A T I A C K K V M L Y T Q K G I P P C B R V

1101 GCAAGCCACCGGCTTTACCTTTGGTCACTGACAACAGCCCGCACGTTTCGGGTGGGCCCATTTCCATGGACAGAAAGCCGATCTTATCCAACACCCCTC  
Q A T A L Y L W V T D N S R T F R V G P I S M D T K P I L S N T L

1201 CTGTACTCGAAGCATGGCTGTACTCTTTTACAAGAGGGGCGTTTTACGGGCAAGCAGCTGGCTTGTCTCACTAACGGGCGAGCTGAAGCAGATTA  
L Y S N D A L Y L L Q E R G V F R A S S L A L A H L T A Q L K T I

1301 GTCGCTCTGGAGACTGGGCAAACTGGAGGCTCCCTCTCCAATCGTCTGTGCCACGGCGGCTGGTGGATTTCTTGGATGGATCGGGCGA  
I S V L B E T W A K L D A S L S N S S V P T A G L V G P L S D A S G D

1401 TGGAACTGGACCGACCGTACCCTTCGCTGGATCCAATCTGGCAATGCAAAAGATGCTCGAAGATGGCTTTAACTTACGGGCTCCGAGTCAAC  
G T W S D A Y R C V D A T V A N A K K M V E D G F K F T G S E S Y

1501 GCCATGTGGCCGTAACATGCGGAAGTATCAAAATGTCACGGCTTTGTGGATTACTCGTTCACCGTGTGGGACGGTGATTATCGATGAAGTCCGA  
A M W P V N M R K Y H N V H G F V D Y S F T L V A T V I I D E V P

1601 ACGGGACGCTTCTTGTGGTGGTGGGCGCTGGAGGACAATAAAAACAGCAGCTTTGTGGGGCTGTCTACAGCAGGGAACAAGTGGAGGCAGTCTT  
H G S A S L L G A G L E D N K N I T F V G L S Y T T E R Q W E A V F

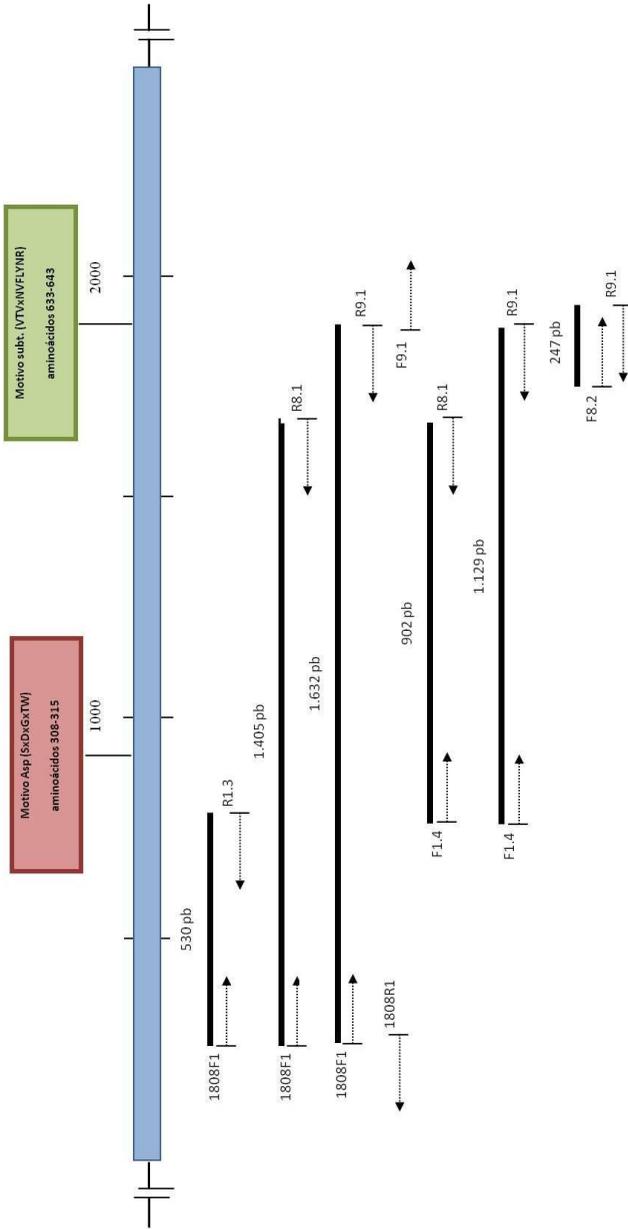
1701 CAAGGGACCGCAACAAGCAGATCGCTTGGCAGGTGGGAAGGACTACGAGCTGGCGCTGCTGCGAGGCAACAAGGCTCCCTGCTAGCTGAC  
K G T P T R S K A I A W E V G K E Y V A L V L Q G N K G S V Y V D

1801 GCGCTGCTCTGGGGAGTCCGACACACTACGAGCCCTGAGGCACGGGGCAACAACTCACTCACTTCTACTTTGGCGGCGTGA AAAACAGCAGCGTGA  
G V L V G S S D T L P A L E A R G H Q I T H F Y F G G G E N S S V

1901 CAGTAAGGAAGGTTTTTTGTACAACCCGCCACTGACTCAAGAGGAACCTCAAAAGCTTACGAGCTCAATGTTTTTTGGAAATATACATTTGACAGCTC  
I V R K V F L Y N R P L S Q E E L K K L D D S N V F W K Y I F D S S

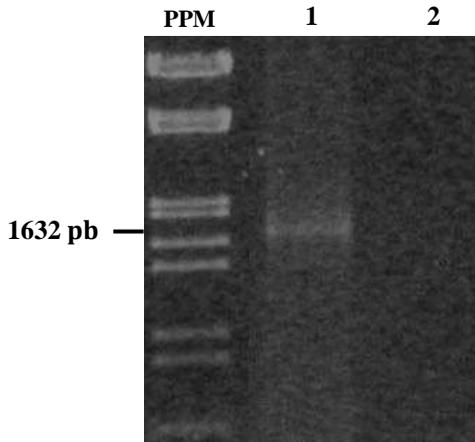
2001 CACGGCTGAGATGTGTCAGGTGTAATCTGCTACTGCTGGGCTATGGGGTTTTGGCGCCTGTGCTGA  
T R A D V F P Q V L I L L L L G G L W C P A A L C A

**Figura 9.** Sequência nucleotídica e aminoácídica completa da ORF identificada no *contig* 01808 de *Trypanosoma rangeli*.



**Figura 10.** Representação esquemática da distribuição dos iniciadores desenhados para a amplificação das sialidases do grupo II (similares as glicoproteínas de 82 e/ou 85 kDa de *Trypanosoma cruzi*) em *Trypanosoma rangeli*. A barra azul representa o quadro aberto de leitura da ORF identificada no *comig* 01808 de *T. rangeli*. As setas pretas indicam os iniciadores utilizados para a obtenção do fragmento e a barra preta o tamanho do fragmento gerado de acordo com os iniciadores utilizados. pb: pares de bases, sub.: subterminal.

Foram testadas diferentes combinações de oito iniciadores para a amplificação das sialidasas do grupo II a partir de duas cepas distintas de *T. rangeli* (Choachí e SC-58). Como todas as combinações resultaram em amplificação de tamanho compatível com o esperado teórico, optou-se por tentar amplificar apenas o fragmento de maior tamanho que englobaria todas as combinações. A reação contendo os iniciadores 1808F1 e R9.1, resultou na amplificação de um fragmento com aproximadamente 1.632 pb tanto para a cepa Choachí (Figura 11) quanto para a SC-58.



**Figura 11.** Eletroforese em gel de agarose a 1% corado pelo brometo de etídeo mostrando o produto de amplificação de 1.632 pb correspondente a região central da glicoproteína de *Trypanosoma rangeli* similar ao grupo II das TS de *Trypanosoma cruzi*. PPM: Padrão de Tamanho Molecular (fago lambda/*HindIII* e *EcoRI*). 1: amostra positiva referente a cepa Choachí. 2: controle negativo (sem adição de DNA).

Após clonagem, foram sequenciados 36 clones referentes a região central para a cepa Choachí e 49 clones para a cepa SC-58. Ao final, 20 sequências não redundantes referentes a região central de 1.632 pb foram obtidas para a cepa Choachí e 21 sequências para a cepa SC-58.

A partir da análise do alinhamento das sequências de *T. cruzi* e *T. rangeli*, verificamos que as regiões 3' e 5' dos genes das sialidasas do

grupo II eram muito divergentes. Desta forma, decidimos amplificá-las através de RT-PCR. A PCR com a combinação dos iniciadores anchor e F9.1, anchor e F8.2 e anchor e F1.4 resultou em fragmentos de aproximadamente 300-500 pb, 550-750 pb, 1400-1900 pb, respectivamente. Estes foram excisados do gel de agarose, purificados, clonados e posteriormente sequenciados. Foram obtidas quatro seqüências referentes a cepa Choachí e duas seqüências referentes a cepa SC-58 que apresentaram similaridade com a porção 3' da ORF do *contig* 01808. As demais seqüências obtidas apresentaram similaridade com outros genes e não constam neste estudo.

No intuito de obter seqüências similares às da porção 5' da ORF do *contig* 01808, o mesmo procedimento citado acima foi realizado, com algumas modificações. Na RT utilizamos o iniciador OligodT-Anchor, R8.1 ou R9.1. Na PCR utilizamos os seguintes pares de iniciadores: ME-L e 1808R1 ou ME-L e R1.3, os quais geraram fragmentos de 400-600 pb e 930-1.200 pb, respectivamente. Foram obtidas 15 seqüências referentes a cepa Choachí e 16 seqüências referentes a cepa SC-58 que apresentaram similaridade com a porção 5' da ORF do *contig* 1808.

Após obtenção de todas estas seqüências, analisamos todas conjuntamente (de acordo com as respectivas cepas) através do pacote *Phred/Phrap/Consed* (<http://www.phrap.org>) (EWING et al., 1998; EWING; GREEN, 1998). Além disso, as seqüências obtidas também foram agrupadas utilizando-se o programa *CAP3* no intuito de obter seqüências consensos referentes a ORFs completas. Por fim, realizamos a análise das seqüências deduzidas de aminoácidos dos genes das sialidases do grupo II de *T. rangeli*.

Após o agrupamento das seqüências obtidas para as sialidases do grupo II de *T. rangeli* cepa Choachí foi possível encontrar seqüências de aproximadamente 1.680 nucleotídeos e inúmeras outras seqüências com tamanhos menores. As seqüências menores eram basicamente correspondentes as regiões 3' e 5' da ORF. Todas as seqüências foram alinhadas com o *contig* 01808 (Figura 12).

O mesmo foi realizado com as seqüências da cepa SC-58, sendo que para esta encontramos um agrupamento com 2.365 pb correspondente a um gene completo de TS. Foram realizadas as mesmas análises reportadas para a cepa Choachí e os resultados encontram-se na Figura 13.

Noventa por cento das seqüências referentes a cepa Choachí apresentaram dois motivos Asp, sendo que apenas uma seqüência (10%) apresentou apenas um motivo. Em relação as seqüências da cepa SC-58

verificou-se que todas apresentavam dois motivos Asp. Estes dados estão de acordo com os apresentados por Freitas e colaboradores (2011) para *T. cruzi*, quando apontam que as TS do grupo II podem apresentar de nenhum a três motivos Asp.

Com relação a sequência completa obtida para a cepa SC-58 (Figura 14) verificou-se que esta apresenta um único motivo Asp e um motivo subterminal. O motivo Asp é denegerado nesta cepa, havendo ausência do aminoácido glicina (G). Estes dados corroboram os descritos por Grisard e colaboradores (2010) que apontaram variabilidade nos motivos Asp nos genes com similaridade a gp82 e a gp85 de *T. cruzi*, incluindo-se a ausência de glicina no motivo degenerado (SKDAKTW). Além disso, entre as sequências de TS obtidas, foi observado uma cópia completa do elemento Fn3 subterminal.





Capítulo I 76

Contig65 -----  
 Contig75 -----  
 1808 MREQRHMPNMCRHPF SFSVLLICVLLICCGMAVHA-KGNEPEKVQLPEAVDLVFLHRT 59  
 Contig89 -----  
 Contig94 -----  
 Contig96 -----  
 Contig46 -----  
 Contig87 -----  
 Contig78 -----  
 Contig90 -----  
 Contig82 MSEQRHMNMCRHPFFS VLLLLCVLLICFGGTAHAHEEGNSPKQRSTAEAVDLVPHRT 60

Contig65 -----FP LSLASAGGVLVALAEGSDYMDPRK-YALPNYNEIVAGYVDSA 44  
 Contig75 -----  
 1808 SVERQGGQTMDSFAFP LSLASAGEVLVALAEG-HTFQHVNQK-QDFVTDADVWAGYIDSA 117  
 Contig89 -----FP LSLASAGGVLVALAEGNIFFPPTHQK-QTWVTYADVWAGYIDSA 44  
 Contig94 -----TYADVWAGYIDSA 13  
 Contig96 -----FP LSLASAGGVLVALAEG-HTFQRVDQK-EDLVTDDVVVTGYIDSA 44  
 Contig46 -----FP LSLASAGGVLVALAEG-HTFQRVDQK-EDLVTDDVVVTGYIDSA 43  
 Contig87 -----FP LSLASAGGVLVALAEG-HTFQRVDQK-EDLVTDDVVVTGYIDSA 43  
 Contig78 -----FP LSLASAGGVLVALAEGHDYTDNLQRGSDWLNFDVWAGHIKAA 45  
 Contig90 -----ASAGGVLVALAEGHDYTDNLQRGSDWLNFDVWAGHIKAA 41  
 Contig82 IVEAQAESQTRDYFVSTSLASAGGVLVALAEG-GTFNGTEHP--ATSDYDVIAGYIDPA 117

Contig65 ESWSFVAKARANESKAYSIFSTTIQEEHETHVRYALRPTTVA KGNKVFLLGGYYRMYD 104  
 Contig75 -----RANESKAYSIFSTTIQEEHETHVRYALGPTTVA KGNKVFLLGGYYRMYD 50  
 1808 ESWSFVAKVRANKLKAYSIFNTTIQEGHMSLVRYAPRPTTIA KGNVTLLVFGGHQSKYD 177  
 Contig89 ESWSFVAKVRANVWKAHSIINTIMQEQHM SRVGRVLPKPTTIS KGDVLLVGVSYQRYD 104  
 Contig94 ESWSFVAKVRANLKVYINVRITTIQEEHNRVRYVPRPTTVA KGNK-ALFVGYSHHYD 72  
 Contig96 ESWSFVAKVRANERVRHSILNTIMQEQRMLPVRYASRPTTIA KGNKVFLLGGYYQRYN 104  
 Contig46 ESWSFVAKVRANERVRHSIYSTVMRQERMLPVRYASLPTTIA KDNKVFLLVGGYQRYD 103  
 Contig87 ESWSFVAKVRANERVRHSILNTIMQEQRMLPVRYASRPTTIA KGNKVFLLVGGYQRYN 103  
 Contig78 ESWSLVAKVNATWTKVIRGVFSRTNOVD---HVGIASFP TTTIAKDKRKFLLVGSYDRTFK 102  
 Contig90 ESWSLVAEVNATWTKVIRGVFSRTNOVN---RVGIASFPTT IAKDKRKFLLVGSYDRTFK 98  
 Contig82 ESWSFVAEYVNAKWKANSIFNTTMOEQDSAPVKHTAQPTA TARSNKVFLLVGGDHLSQA 177  
 \* . . . . . : \* . \*\* : : : . . \* : : \*

Contig65 SS-KRWIKHFHGLDLLVGEATQDKVITQWGEPTSLLPQIEPTAKQRGLKKEFVGGGSGVVM 163  
 Contig75 SSSQNWIKSSYGLDLLVGEATQDKVIQWGEPTSLWPQIEPSAKQRGLKKEFVGGGSGVVM 110  
 1808 SSSKKWIRSEGLDLFVGEATQDKVIQWGEPTSLWQQKPSAKQRGLDQFVGGGSGVVM 237  
 Contig89 SSSKKWIAPSEGLDLLVGEATQDKVIQWGEPTSLVLPQIEPSAKQRGLKKEFVGGGSGVVM 164  
 Contig94 PLLKKWTSSRDFDLLVGEATQDKVIQWGEPTSLWPQIEPSAKQRGLKKEFVGGGSGVVM 132  
 Contig96 SSSRKKWFSQGLDLLVGEATQDKVIQWGEPTSLVLPQIEPSAKQRGLKKEFVGGGSGVVM 164  
 Contig46 SSSKKWVSSQGFDLLVGEATQDKVIQWGEPTSLVLPQIEPTAKQRGLKKEFVGGGSGVVM 163  
 Contig87 SSSRKKWFSQGLDLLVGEATQDKVIQWGEPTSLVLPQIEPSAKQRGLKKEFVGGGSGVVM 163  
 Contig78 EHEGYWATDGWDLQLVGEATQDKVQWGEPTSLLSQIEPSARQGVKDFLGC GSGVVM 162  
 Contig90 EHEGYWAADGWDLQLVGEATQDKAIQWGEPTSLLSQIEPSARQGVKDFLGC GSGVVM 158  
 Contig82 SSGKEQAAPFYIDLLVGEATKDKAIQWGPSTLSSQFEPYAKKQKGFVTRGSGVVM 237  
 : : \* . \* : : \* . \* : : \* : : \* : : \* : : \* : : \* : : \* : : \* : : \*

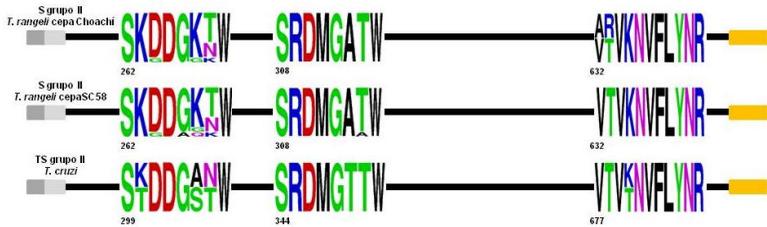
Contig65 EDGTLVFPVTARKTEENDVTMIY SKDDGQNWVLAQGMLPAWCDPLIVEWERGOQLLM 223  
 Contig75 EDGTLVFPVTARRGEEDIVSMIY SKDDGKNWVLAQGLMPAGCTDPLIVEWERGOQLLM 170  
 1808 EDDTLVFPVTARGGEK-DTVSMIY SKDDGKNWVLPQGMLPAWCTDPLIVEWERGOQLLM 296  
 Contig89 GDGTLVFPVTARKTDVIFKVSIT IY SKDDGKTWVLPQGMLPTGCTDPLIVEWERGOQLLM 224  
 Contig94 EDGTLVFPVTARETGVNNFVSMIY SKDDGKTWVLPQGMLPTGCTDPLIVEWERGOQLLM 192  
 Contig96 GDGTLVFPVTARKTDVIFKVSIT IY SKDDGKTWVLPQGMLPTGCTDPLIVEWERGOQLLM 224  
 Contig46 EDGTLVFPVTARETGVNNFVSMIY SKDDGKTWVLAQGLMPAGCTDPLIVEWERGOQLLM 223  
 Contig78 EDGTLVFPVTARSAAENDIVSMIY SKDDGKNWVLAQGLMPAGCTDPLIVEWERGOQLLM 223  
 Contig87 KDGTLVFPVTVRRGNG-DTVSMIY SKDDGKTWVLPQGMLPTGCTDPLIVEWERGOQLLM 217  
 Contig90 EDGTLVFPVARRGED-DLASTIMY SKDDGKNWVLAQGLMPAGTGFPLIVEWERGOQLMI 221  
 Contig82 EDGTLVFPVTAMKGEN-TIVPVIY SKDA-KTWVFPMTGDFACVDFPLIVEWERGOQIVMI 295  
 \* . \* : : \* . \* : : \* : : \* : : \* : : \* : : \* : : \* : : \* : : \* : : \*

Contig65 AKCPSGKVFVSRDMGATWTEAARTLTVRVRPMLPNTLRIAEGVGSLLTAS IAGKK-VML 282  
 Contig75 AKCPSGKVFVSRDMGATWTEAVRITLTVRVRPMLLPNYQNDWRMGSLLTAS IAGKK-VML 229  
 1808 AKCHSGSKVFSRDMGATWTEAVRITLTVRVPMLPNTLRTAEGVESLTTAT IAGKK-VML 355  
 Contig89 AKCHSLSKVFSRDMGATWTEAVTTLTVRRLMLPNTLRTAEGVESLTTAS IAGKK-VML 283  
 Contig94 AKCHSLSKVFSRDMGATWTEAVTTLTVRRLMLPNTLRTAEGVESLTTAS IAGKK-VML 251  
 Contig96 AKCHSLSKVFSRDMGATWTEAVTTLTVRRLMLPNTLRTAEGVESLTTAS IAGKK-VML 283  
 Contig46 AKCNFGSKVFSRDMGATWTEAARTLTVRVPMLPNTLRTAEGVGVPHHCHECWKE-GHA 282  
 Contig87 AKCHSGSKVFSRDMGATWTEAARTLTVRVPMLPNTLRTAEGVGSLLTAS IAGKK-VML 282  
 Contig78 AKCHSGSKVFSRDMGAAMTEAARTLTVRVRPMLPNTLRTAEGVGSLLTAS IAGKK-VML 280  
 Contig90 AHCLHARKVFSRDMGATWTEAARTLTVRASFLSSPSHRDRVTSLTTAT IAGKK-VML 276  
 Contig82 TRCKDDLKVVESKMDKGRGSLGNFACAD--TFGQTLRTSIGCDILHCEHCCKGEGHAV 353  
 : : \* \* : : \* : : \* : : \* : : \* : : \* : : \* : : \* : : \* : : \* : : \*





Posteriormente comparou-se com os resultados encontrados para o grupo II das TS em *T. cruzi*, mais precisamente com relação as duas glicoproteínas que utilizamos como modelo (gp82 e gp85). Para expressar o resultado sinteticamente, utilizamos o programa *Weblogo* (CROOKS et al., 2004) que nos dá uma representação gráfica do alinhamento múltiplo das sequências aminoacídicas (Figura 15).



**Figura 15.** Representação esquemática do protótipo do grupo II da família das sialidasas de *Trypanosoma rangeli* comparada ao grupo II da superfamília das TS de *Trypanosoma cruzi*. Ao longo da sequência são apresentados os motivos ASP (SxDxGxTW) e subterminal (VTVxNVxLYNR). Na região carboxi-terminal destaca-se o sinal para ancoragem por GPI (glicosilfosfatidilinositol) (caixa amarela). O peptídeo sinal está simbolizado pela caixa cinza escura e a ausência de peptídeo sinal pela caixa cinza clara. Os números abaixo das sequências indicam a posição aproximada dos determinados motivos nas sequências. O tamanho das proteínas em cada grupo pode variar. A representação gráfica não está em escala.

Os resultados encontrados para as sialidasas do grupo II de *T. rangeli* tanto para a cepa Choachí quanto para a SC-58 corroboram os resultados descritos por Freitas e colaboradores (2011). Segundo estes autores nas TS do grupo II pode-se observar de nenhum até três motivos Asp, um motivo subterminal (VTVxNVxLYNR), peptídeo sinal e sítio de ancoramento a GPI.

Embora a função do motivo Asp seja desconhecida, é importante salientar que este ocorre em proteínas secretadas e em proteínas que atuam sobre ou interagem com carboidratos (COFFEY; RUSSELL; PONTING, 2001). Recentemente, demonstrou-se que algumas das TS inativas atuam como proteínas do tipo lectina *like* que são capazes de interagir com a porção carboidrato de glicoconjugados,

se forem sializados (OPPEZZO et al., 2011). Os autores levantaram a hipótese de que as proteínas TS inativas podem se ligar a superfície do hospedeiro que sejam ricas em glicoconjugados doadores de sialil (funcionando como âncoras), facilitando que a enzima ativa possua maior eficiência na transferência de sialil.

Em quase todas as sequências obtidas, tanto para a cepa Choachí quanto para a cepa SC-58 de *T. rangeli*, observa-se a presença de um domínio que pertence a superfamília das glucanases/ lectina tipo Concanavalina A. Apenas 30% das sequências obtidas (*contig* 60, 72 e 76) para a cepa Choachí não apresentaram este domínio e 10% (96) para a cepa SC-58. Nas sequências de gp82 e gp85 de *T. cruzi* obtidas do banco de dados também foi encontrado o referido domínio.

As lectinas e as glucanases apresentam uma propriedade em comum que é a de se ligar reversivelmente a carboidratos complexos específicos. Domínios tipo Concanavalina A também desempenham um papel no reconhecimento celular em eucariotos. Proteínas contendo o domínio tipo Concanavalina A incluem as globulinas que se ligam aos hormônios sexuais que transportam os esteroides sexuais no sangue e regulam o acesso aos tecidos alvo (GRISHKOVSKAYA et al., 2000); lamininas que são grandes glicoproteínas heterotriméricas envolvidas na arquitetura e função da membrana (TISI et al., 2000); neurexinas que são expressas em centenas de isoformas na superfície da célula neuronal, que podem funcionar como moléculas de reconhecimento celular (RUDENKO et al., 1999) e sialidases que são encontradas em microorganismos e animais e funcionam na adesão celular e transdução de sinal (BUSCHIAZZO et al., 2002).

Como citado anteriormente, tem sido demonstrado que uma versão do motivo VTVxNVxLYNR, referido como motivo FLY (**VTVTNVFLYNRPLN**) pode atuar como fator de virulência (MAGDESIAN et al., 2007; TONELLI et al., 2011). O que observamos tanto para a gp82 e gp85 de *T. cruzi* quanto para as sialidades do grupo II de *T. rangeli*, é que ambos apresentam o motivo FLY.

A ancoragem através de GPI é utilizada por parasitas protozoários como *T. cruzi*, *Leishmania* spp., *Plasmodium* spp. e *Toxoplasma gondii* para expressar suas proteínas na superfície celular (ENGLUND, 1993; McCONVILLE; FERGUSON, 1993). Este tipo de ancoramento outorga às proteínas uma mobilidade maior que aquelas fixadas por meio de sequências peptídicas transmembrânicas (UDENFRIEND; KODUKULA, 1995). As proteínas a serem ancoradas por meio de GPI apresentam na extremidade amino-terminal um peptídeo sinal hidrofóbico que direciona a proteína nascente ao interior

do retículo endoplasmático onde logo pode ou não ser clivado (HOWELL et al., 1994). Dentro do retículo endoplasmático uma transamidase catalisa a remoção de um segundo sinal carboxi-terminal e a adição do resíduo de GPI (SHARMA et al., 1999).

Nas sequências analisadas, todas apresentavam sítio de ancoramento a GPI. Já nas sequências referentes a região 5' UTR dos genes das sialidases do grupo II de *T. rangeli* observamos que 50% destas apresentavam peptídeo sinal e as outras 50% não. Com relação as sequências de gp82 e gp85 de *T. cruzi*, somente a sequência de gp82 não apresenta o peptídeo sinal. O peptídeo sinal é necessário para direcionar a proteína para o retículo endoplasmático e permitir o reconhecimento do sítio de ancoragem a GPI (GRISARD et al., 2010).

Uma variabilidade significativa das sequências sugere uma forte pressão seletiva sobre os genes da família das TS. Esta pressão pode ser em parte devido a resposta imune do hospedeiro mamífero, porque as TS são alvos da resposta imune humoral e mediada por células (FRASCH, 2000). A família das TS é muito menor em *T. brucei* (BERRIMAN et al., 2005) e ausente em *L. major* (IVENS et al., 2005).

O *T. brucei* e o *Plasmodium falciparum* têm estratégias sofisticadas para evasão do sistema imune, incluindo a variação antigênica, que permite que os parasitos se adaptem ao ambiente do hospedeiro através da exposição e modificação de proteínas de superfície antigênicas variáveis específicas (CANO, 2001; SCHERF; FIGUEIREDO; FREITAS-JUNIOR, 2001; CHIURILLO; PERALTA; RAMIREZ, 2002; HORN; BARRY, 2005; KIM et al., 2005; SCHERF; LOPEZ-RUBIO; RIVIERI, 2008). Nestes parasitos, os genes que codificam para proteínas de superfície que estão envolvidas na variação antigênica são localizados preferencialmente nas regiões subteloméricas porque estas são favoráveis a genômica ambiental que facilita a troca, expressão, expansão e geração de novas variantes gênicas (HORN; BARRY, 2005; SCHERF; LOPEZ-RUBIO; RIVIERI, 2008). O *T. cruzi* não sofre variação antigênica mas ao invés disso, ele co-expressa várias proteínas de superfície variáveis, entre as quais as TS (ATWOOD et al., 2005). Freitas e colaboradores confirmaram que as proteínas do grupo II das TS estão localizadas nas regiões subteloméricas. Esta localização pode facilitar a geração de novas variantes. De fato, simulações *in silico* sugerem que tanto mutações quanto conversão gênica podem contribuir para a geração da diversidade na família das TS (AZUAJE; RAMIREZ; DA SILVEIRA, 2007; AZUAJE; RAMIREZ; DA SILVEIRA, 2007a).

A conversão gênica pode ser frequente nas regiões subtelméricas e portanto, pode promover uma rápida diversificação das TS do grupo II. Este cenário pode ser particularmente importante para esse grupo pois vários de seus membros estão associados a adesão/invasão na célula hospedeira e o *T. cruzi* tem a capacidade de infectar uma grande variedade de células hospedeiras. Portanto, é possível que o vasto repertório de peptídeos derivados das TS do grupo II possam contribuir para este fenômeno (FREITAS et al., 2011).

#### **4.2.2 Análise dos genes das sialidases do grupo II de *T. rangeli* por Southern blot**

A análise do número de cópias dos genes das sialidases do genoma do *T. rangeli* revelou que estes apresentam múltiplas cópias gênicas (Figura 16). Utilizamos como sondas fragmentos de aproximadamente 1.632 nt para a cepa Choachí e de aproximadamente 1.129 nt para a cepa SC-58, ambos correspondentes a região central da ORF das sialidases do grupo II de *T. rangeli*.

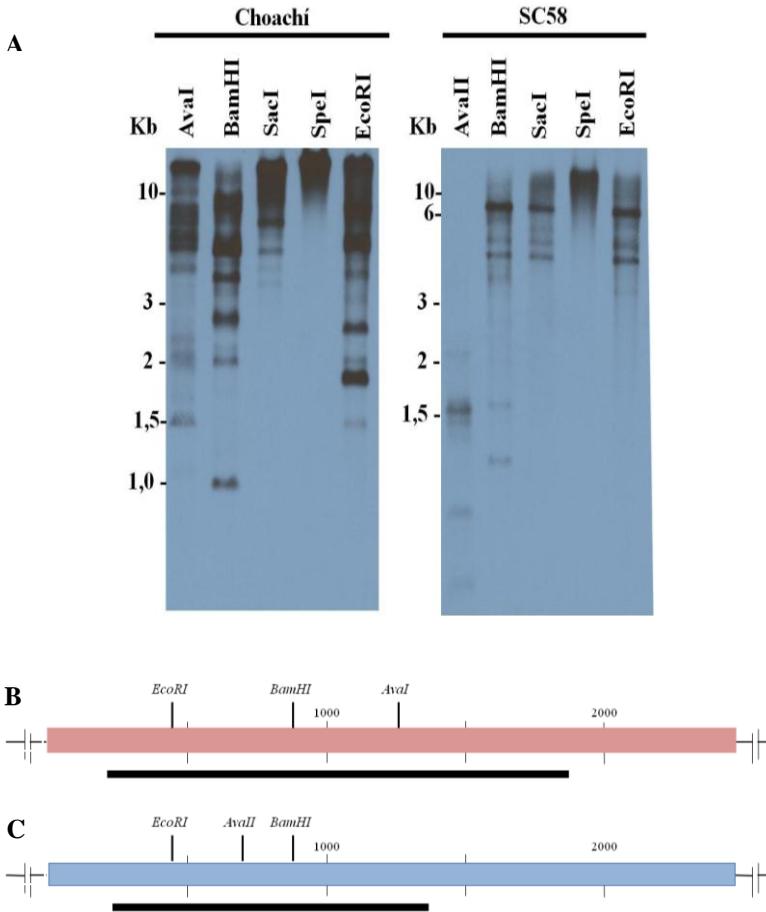
A digestão com a enzima *SpeI*, que não possui o sítio de clivagem dentro da sonda, revelou um perfil de uma única banda tanto para a cepa Choachí quanto para a SC-58. Isso pode ser devido ao fato da complexidade de clivagem desta enzima ser maior. Ou seja, há poucos sítios de clivagem no genoma e os fragmentos gerados são maiores, o que não nos permite definir quantas cópias têm naquele suposto fragmento reconhecido.

Com relação as demais enzimas, verificamos inúmeros fragmentos reconhecidos pela sonda na hibridização, sugerindo que estes genes apresentam um padrão multicópia e que há sequências relacionadas dispersas por todo o genoma.

Os dados apresentados acima corroboram os observados por Añez-Rojas e colaboradores (2005), os quais encontraram muitas cópias de sequências relacionadas as TrGP (TS do grupo II) no genoma do *T. rangeli*. Além disso, os dados condizem com os apresentados por Carmo e colaboradores (1999) onde a presença de múltiplas cópias de genes em *T. rangeli* relacionados a gp82 e gp85 de *T. cruzi* foi revelado quando o DNA genômico de *T. rangeli* foi hibridizado com alta e moderada estringência com os genes gp82 e gp85. Mesmo em condições de elevada estringência, a hibridização das sondas com vários fragmentos genômicos sugerem que as sequências relacionadas a gp82 e gp85 são intercaladas no genoma ao invés de dispostas em repetições em *tandem*. A análise das sequências mostrou que muitos dos fragmentos hibridizados contêm sequências associadas a superfamília das TS, o que

sugere que os genes da gp82 e gp85 tenham sido originados de um gene ancestral comum presente em vários membros do gênero *Trypanosoma* (CARMO et al., 1999).

Arraya e colaboradores (1994) verificaram que as sequências relacionadas ao gene gp82 de *T. cruzi* estão distribuídas em vários cromossomos, existindo cerca de 60 cópias por genoma haplóide. O que corrobora o descrito por Ferrari e colaboradores (1997) que afirmam que os genes da gp82 e da gp85 estão dispersos no genoma de *T. cruzi*.



**Figura16.** (A) Análise da organização dos genes das sialidasas do grupo II de *Trypanosoma rangeli* por *Southern blot*. O DNA genômico das cepas Choachí e SC-58 de *T. rangeli* foi digerido com as enzimas indicadas e hibridizado com sondas correspondentes aos genes das sialidasas do grupo II de *T. rangeli*. O marcador de tamanho molecular está em quilobases (DNA ladder 1 kb plus -New England Biolabs). (B) Mapa de restrição dos genes das sialidasas do grupo II de *T. rangeli* cepa Choachí apontando os sítios de restrição das enzimas utilizadas. A barra rosa representa o quadro aberto de leitura dos genes das sialidasas do grupo II de *T. rangeli* e a barra preta representa a região condizente a sonda. (C) Mapa de restrição dos genes das sialidasas do grupo II de *T. rangeli* cepa SC58 apontando os sítios de restrição das enzimas utilizadas. A barra azul representa o quadro aberto de leitura dos genes das sialidasas do grupo II de *T. rangeli* e a barra preta representa a região condizente a sonda.

### 4.3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com base nos resultados obtidos no presente capítulo, podemos concluir que:

- ✓ Após comparar as sequências de *T. cruzi* com as sequências oriundas do banco de dados genômicos da cepa SC-58 do *T. rangeli*, foram identificadas oito ORFs referentes a sequências de *T. rangeli* que guardam similaridade com as glicoproteínas do grupo II das TS de *T. cruzi*;
- ✓ Após clonagem e sequenciamento, obtivemos 20 sequências não redundantes referentes a região central de 1.632 pb para a cepa Choachí e 21 sequências para a cepa SC-58. Para a cepa SC-58 foi ainda obtida uma sequência com 2.365 nucleotídeos correspondendo a um gene completo de TS;
- ✓ As sequências obtidas apresentavam motivo Asp, sítio de ancoramento a GPI e em quase todas, observa-se a presença de um domínio que pertence a superfamília das glucanases/ lectina tipo Concanavalina A. Além disso, com relação à sequência completa obtida para a cepa SC-58 verificou-se que esta apresenta um motivo Asp e um motivo subterminal;
- ✓ A análise dos genes das sialidasas de *T. rangeli* corroborou que estes apresentam várias cópias gênicas.

## 5 CAPÍTULO II

Obtenção de uma linhagem de *T. rangeli* expressando a gp82 de *T. cruzi* (*T. rangeli*-gp82) e avaliação dos sítios e dos níveis da expressão heteróloga da gp82 nas formas epimastigotas e tripomastigotas de *T. rangeli*-gp82

## 5.1 MATERIAIS E MÉTODOS

### 5.1.1 Parasitos

As metodologias descritas nos itens 5.1.1.1. e 5.1.1.2 citadas a seguir, foram utilizadas também nos capítulos III e IV do presente estudo.

#### 5.1.1.1 Cultivo

As formas epimastigotas da cepa Choachí de *T. rangeli* (SCHOTTELIUS, 1987) (transfectadas ou não) e da cepa Y de *T. cruzi* (PEREIRA DA SILVA; NUSSENZWEIG, 1953) foram cultivadas conforme descrito no item 4.1.1. Após a seleção, os parasitos transfectados com os plasmídeos pTEX-8523eGFP ou pTEXeGFP foram acrescidas de 100 µg/ml e 500 µg/ml de Geneticin<sup>®</sup> (G-418), respectivamente.

#### 5.1.1.2 Diferenciação celular *in vitro* para obtenção das formas tripomastigotas

Formas tripomastigotas de cultura de *T. rangeli* foram obtidas a partir de algumas modificações no protocolo descrito por Koerich e colaboradores (2002). Inicialmente  $12 \times 10^7$  epimastigotas em fase exponencial de crescimento em meio LIT foram lavados duas vezes com PBS pH 7,2 e transferidos para garrafas de cultura celular de 25 cm<sup>2</sup> contendo 15 ml de meio DMEM (do inglês *Dulbecco's Modified Eagle Medium*) pH 8,0 (Sigma-Aldrich) (1 g/l glicose, 6 mM L-glutamina e 5% SBF). O processo de diferenciação foi acompanhado através da quantificação dos parasitos por contagem direta em câmara de Neubauer e da visualização em microscópio óptico após a coloração dos parasitos com Giemsa (Merck). Os tripomastigotas foram obtidos entre o sétimo e oitavo dia de cultivo, sendo coletados por centrifugação quando taxas maiores que 90% de tripomastigotas foram encontradas.

Para obtenção de tripomastigotas de cultura de *T. cruzi*, monocamadas de células Vero (fibroblastos de rim do macaco verde Africano- *Cercopithecus aethiops*) foram infectadas com tripomastigotas da cepa Y. Inicialmente, as células foram cultivadas em garrafas de cultura celular de 25 cm<sup>2</sup> contendo meio DMEM suplementado com 5% de SBF a 37°C com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. As monocamadas celulares foram infectadas com a cepa Y de *T. cruzi* e as formas tripomastigotas foram obtidas do sobrenadante das culturas após 72 horas de infecção (EGER-MANGRICH et al., 2001).

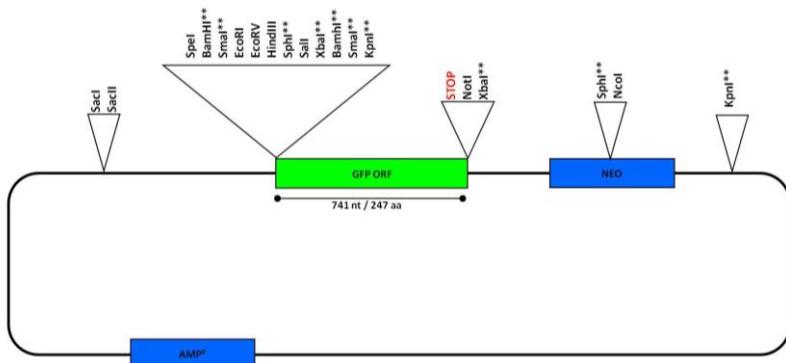
### 5.1.1.2.1 Análise estatística

A diferenciação celular *in vitro* para obtenção das formas tripomastigotas de *T. rangeli* foi realizada com duas replicas técnicas e em triplicata, sendo as médias analisadas pela análise de variância (ANOVA) unifatorial (*one-way*). Este foi utilizado para determinação de diferenças estatísticas entre os grupos e o nível de significância adotado foi  $p < 0,05$ . As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa *GraphPad Prism 2007*, versão 5.0 para Windows (MOTULSKY, 2007).

### 5.1.2 Plasmídeos

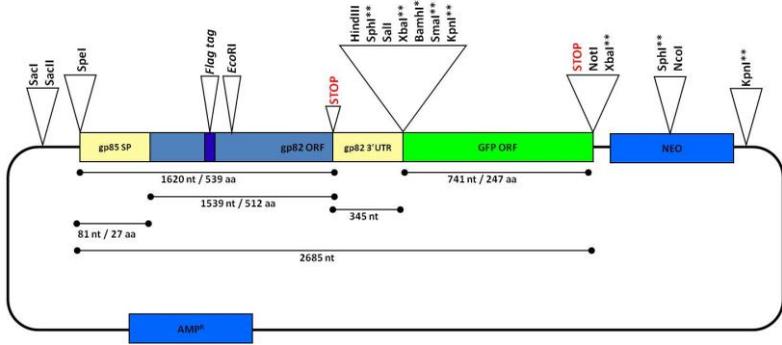
Utilizou-se o plasmídeo denominado pTEXeGFP (Figura 17), o qual é derivado do plasmídeo pTEX (KELLY et al., 1992), tendo sido gentilmente cedido pelo Dr. John Kelly da *London School of Hygiene and Tropical Medicine* (Reino Unido). Este plasmídeo possui como gene repórter a proteína verde fluorescente (GFP) de *Aequoria victoria*.

Com base no plasmídeo pTEX (KELLY et al., 1992) foi construído o plasmídeo denominado pTEX-8523, gentilmente cedido pelo Dr. José Franco da Silveira Filho (UNIFESP). Este plasmídeo contém o gene da gp82 e o peptídeo sinal (SP) da gp85 de *T. cruzi*. Nesta construção foi inserido, após a região do sítio múltiplo de clonagem, pelo Dr. Edmundo Carlos Grisard (UFSC) o gene da GFP. O plasmídeo foi então denominado pTEX-8523eGFP (Figura 18).



**Figura 17.** Representação esquemática do plasmídeo pTEXeGFP indicando as posições dos sítios de enzimas de restrição.

## pTEX-8523 eGFP



**Figura 18.** Representação esquemática do plasmídeo pTEX-8523eGFP indicando as posições dos sítios de enzimas de restrição, do peptídeo sinal da gp85 (gp85 SP) e da região 3' não traduzida da gp82 (gp82 3' UTR) de *Trypanosoma cruzi*.

### 5.1.3 Transfecção dos parasitos

Os ensaios de transfecção foram realizados em um eletroporador *Nucleofector*<sup>®</sup> II utilizando o kit *Basic Parasite Starter Nucleofector* (Amaxa Biosystems, Cologne) conforme as instruções do fabricante.  $2 \times 10^6$  parasitos foram lavados duas vezes em PBS pH 7,4, adicionados de 100  $\mu$ l do tampão de eletroporação do kit e 10  $\mu$ g do DNA plasmidial. Todo o volume desta suspensão foi transferido para cubetas de eletroporação de 0,4 cm de abertura e submetido à eletroporação em condições elétricas estabelecidas pelo programa U-33 (SCAHILLA; PASTAR; CROSS, 2008). Após um único pulso, os parasitos foram transferidos para tubos de cultura contendo 2 ml de meio NNN (Neal, Novy e Nicolle) -LIT. Após 48 horas a 27°C, a seleção dos parasitos transfectados foi realizada pelo acréscimo de G418 (Sigma-Aldrich) em uma concentração inicial de 25  $\mu$ g/ml. Os parasitos foram então mantidos conforme o item 4.1.1 e com concentrações crescentes de G418.

Nestes experimentos foram utilizados como controles parasitos da cepa Choachí de *T. rangeli* transfectados com o plasmídeo pTEXeGFP e parasitos das cepas Choachí de *T. rangeli* e Y de *T. cruzi* eletroporados sem DNA plasmidial. O parasito *T. rangeli* transfectado com o plasmídeo pTEX-8523eGFP foi nomeado como *T. rangeli*-gp82 e

o parasito *T. rangeli* transfectado com o plasmídeo pTEXeGFP foi nomeado como *T. rangeli*-GFP. Estes parasitos transfectados também foram utilizados nos experimentos relativos ao Capítulo III e IV.

Paralelamente ao desenvolvimento da atividade proposta, foi realizado o cultivo das linhagens transfectadas e selvagens na presença e ausência de pressão seletiva (G418) visando verificar a estabilidade da transfecção obtida e a manutenção das características de crescimento *in vitro* do parasito.

#### **5.1.4 Avaliação comparativa de crescimento *in vitro* entre as linhagens transfectadas e o controle**

Com o intuito de avaliar comparativamente o crescimento *in vitro* dos parasitos transfectados e não transfectados, formas epimastigotas de culturas em fase exponencial de crescimento foram ajustadas para uma concentração de  $2 \times 10^6$  parasitos/ml em três ml meio LIT e o número de parasitos foi determinado diariamente em Câmara de Neubauer durante 22 dias .

##### **5.1.4.1 Análise estatística**

O experimento foi realizado utilizando-se triplicata técnica e biológica, sendo as médias analisadas comparativamente de acordo com o descrito no item 5.1.1.2.1.

#### **5.1.5 Detecção dos produtos de expressão plasmidial**

A fim de confirmar e avaliar o nível de expressão das proteínas heterólogas em *T. rangeli* além da observação direta dos parasitos transfectados, foram realizados ensaios de Imunofluorescência Indireta (RIFI) e de *Western blot*.

##### **5.1.5.1 Observação direta**

A detecção dos produtos de expressão plasmidial foi realizada nos parasitos transfectados através da observação de fluorescência da GFP em um microscópio óptico de fluorescência Olympus – Bx40–FL (Olympus, Tóquio), sendo as imagens digitalizadas com câmera DP72 e analisadas pelo programa Cell<sup>P</sup> (Olympus).

##### **5.1.5.2 Citolocalização por ensaios de Imunofluorescência Indireta (RIFI)**

A RIFI foi realizada pela MSc. Carolina Marin Rocha Coelho com formas epimastigotas e tripomastigotas de *T. cruzi* e *T. rangeli* (selvagem e transfectado) conforme o preconizado por Haynes, Russel e

Cross (1996) com modificações. Os parasitos foram coletados por centrifugação a  $1.300 \times g$  por 10 min e lavados duas vezes com PBS pH 7,4 e novamente centrifugados nas mesmas condições. A concentração celular foi ajustada para  $1 \times 10^6$  células/ml, e aproximadamente 50  $\mu$ l da suspensão celular foi depositada sobre uma lamínula circular (13 x 13 cm) em placas de poliestireno de 24 cavidades. Os parasitos ficaram aderindo por um período de 20 min, e posteriormente foi realizada a fixação dos mesmos com paraformaldeído 4% diluído em PBS 1X durante cinco min. As lamínulas foram submetidas a três lavagens de 5 min com PBS pH 7,4. Todas as etapas subsequentes foram intercaladas com lavagens nessas mesmas condições. A permeabilização dos parasitos, quando necessária, foi realizada com o detergente Nonidet P-40 (octilfenoxipolietoxietanol) (NP-40) a 0,5% durante cinco min. O bloqueio dos sítios de ligação inespecíficos foi realizado durante 16 horas a 4°C com solução de leite desnatado a 5% diluído em PBS pH 7,4-Tween 0,1% (monolaurato de polioxietileno sorbitano).

Os diferentes anticorpos primários, 3F6 (TEIXEIRA; YOSHIDA, 1986) e anti-GFP, foram diluídos conforme a Tabela 4, em solução de leite desnatado a 2%, sendo mantidos sobre as lamínulas durante 90 min a temperatura ambiente. O anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado a Alexa-fluor 488 ou Alexa-fluor 594 (Molecular Probes, Eugene) foi diluído 1:1.000 em solução de leite desnatado em PBS pH 7,4 a 0,5%, e mantido sobre a lamínula por 15 min protegido da luz. Após três lavagens de cinco min em PBS-Tween 0,1%, as lamínulas foram coradas com 1  $\mu$ g/ml de 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) por cinco min, e após lavagens montadas com o reagente Hydromount (National Diagnostics, Atlanta) sobre lâminas de vidro. As análises foram realizadas em microscópio óptico de fluorescência Olympus – Bx40-FL (Olympus) e os resultados digitalmente registrados.

**Tabela 4.** Descrição dos anticorpos utilizados nos ensaios de imunofluorescência indireta e *Western blot*, considerando sua origem, tamanho das proteínas reconhecidas e diluições utilizadas nas diferentes metodologias. (-): não se aplica.

Anticorpo	Tipo	Tamanho	Diluição RIFI	Diluição <i>Western blot</i>
3F6	Monoclonal de camundongo direcionado ao domínio central do gene gp82 de <i>T. cruzi</i>	82kDa	1:50	1:250
anti-GFP	Monoclonal de camundongo anti-GFP 11E5 (isotipo IgG <sub>1</sub> ) Santa Cruz Biothecnology	26kDa	1:150	1:1000
TAT-1 - Alfa Tubulina	Monoclonal IgG-camundongo	55kDa	-	1:10.000

#### 5.1.5.3 *Western blot*

Nos ensaios de *western blot* foram utilizados os extratos protéicos de formas epimastigotas e tripomastigotas de *T. rangeli* selvagem, *T. cruzi* selvagem, *T. rangeli* transfectados com os plasmídeos pTEX-8523eGFP ou pTEXeGFP. Estes também foram realizados pela MSc. Carolina Marin Rocha Coelho. As culturas de parasitos foram lavadas duas vezes com PBS pH 7,4 e centrifugadas a 1.300 x g por 10 min. Extratos protéicos totais foram obtidos através da adição de tampão de lise (50 mM NaCl, 200 mM Tris-HCl pH 8,0, 1% de NP-40) previamente aquecido a 90 °C e um coquetel de inibidores de proteases (1 µg/µl) (Sigma-Aldrich), sendo as amostras homogeneizadas e posteriormente centrifugadas a 14.000 x g durante 25 min a 4°C. O

sobrenadante foi coletado e a concentração dos extratos protéicos foi estimada através de microdosagem pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976). Cerca de 30 µg de cada extrato foram misturados com tampão de amostra (20% glicerol, 0,5% azul de bromofenol, 0,5 M Tris-HCl pH 6,8, 4,4% SDS e 2% β-24 mercaptoetanol), aquecidos a 95°C por cinco min e submetidos à separação eletroforética em gel SDS-PAGE (do inglês *Polyacrylamide Gel Electrophoresis*) 10%, a 100 volts durante aproximadamente duas horas. As proteínas foram transferidas para membranas de PVDF (do inglês *Polyvinylidene fluoride*) (Bio-Rad, Alfragide) durante 30 min a 25 volts em módulo de transferência TE 77 PWR *Semi-Dry Transfer Unit*® (GE Healthcare). O procedimento ocorreu de acordo com a técnica descrita por Towbin, Staehelin e Gordon (1979) com algumas modificações. Após confirmação da transferência das proteínas pela coloração com Ponceau 1%, as membranas foram bloqueadas com solução de bloqueio (5% leite desnatado diluído em PBS-Tween 0,1%) por 16 horas. As membranas foram mantidas em solução contendo o anticorpo primário (diluídos conforme Tabela 4) por 90 min sob agitação branda a temperatura ambiente. A ligação ao anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado à peroxidase (diluição 1: 10.000) (Sigma-Aldrich) ocorreu durante 60 min. Entre cada etapa as membranas foram lavadas cinco vezes por 5 min com tampão de *blotting* (25 mM Tris HCl pH 7,4; 150 mM NaCl; 0,1% Tween 20), sob agitação branda. Como substrato utilizamos o reagente ECL (GE Healthcare) e exposição por 5 min a temperatura ambiente. Utilizou-se o processador de filmes SRX-101A (Konica Minolta Medical & Graphic) para a revelação.

### **5.1.6 Aspectos éticos e de biossegurança**

Uma vez que na presente proposta realizamos a geração e a manipulação de organismos geneticamente modificados (OGM), salienta-se que o Laboratório de Protozoologia da UFSC está incluído no Certificado de Qualidade em Biossegurança da UFSC (Número 101/99) expedido pela Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio), estando apto a trabalhar com OGM em regime de contenção.

## 5.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

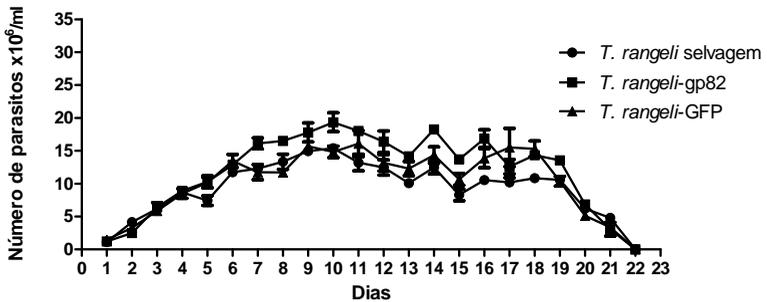
### 5.2.1 Avaliação comparativa de crescimento *in vitro*

Toda população apresenta, no decurso de sua existência, variações em seu número ou densidade que se traduzem graficamente pelo que se convencionou chamar de curva de crescimento (REY, 2011).

Uma curva de crescimento típica, observada nas condições de laboratório, quando os organismos de uma espécie crescem em um meio de cultura confinado, apresenta três fases. Nos primeiros dias, a população aumenta lentamente, para logo acelerar seu crescimento. Numa segunda fase, a taxa de crescimento reduz-se cada vez mais, até que a população se estabilize numericamente (período de equilíbrio). A fase de equilíbrio é geralmente substituída por um período de oscilações ou flutuações da numerosidade. A terceira fase corresponde a um período de decréscimo populacional que pode mantê-la em nível muito baixo ou terminar por extinção (desaparecimento da população) (REY, 2011).

O crescimento comparativo *in vitro* das cepas *T. rangeli*-gp82 e *T. rangeli*-GFP em relação a cepa selvagem (Figura 19) resultou em uma curva de crescimento semelhante, não tendo sido observadas diferenças estatisticamente significativas, o que nos permite inferir que a expressão de gp82 e GFP não alterou os padrões de crescimento *in vitro* do parasito.

A observação da curva de crescimento de ambas as cepas estendeu-se por 22 dias, apresentando o número máximo de parasitos entre o 10º e o 11º dia, com cerca de  $1,93 \times 10^7$  parasitos/ml para a cepa *T. rangeli*-gp82 (pico no 10º dia),  $1,68 \times 10^7$  parasitos/ml para a cepa *T. rangeli*-GFP (pico no 11º dia) e  $1,54 \times 10^7$  parasitos/ml para *T. rangeli* selvagem (pico no 10º dia).



**Figura 19.** Análise comparativa do crescimento das cepas transfectadas de *Trypanosoma rangeli* em relação a cepa selvagem (*T. rangeli* cepa Choachí). O número inicial de parasitos foi de  $0,67 \times 10^6$ . As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando analisadas através da análise de variância (ANOVA) unifatorial (*one-way*) ( $p < 0,05$ ).

### 5.2.2 Diferenciação de *T. rangeli in vitro*

Os parasitos transfectados foram analisados quanto a sua capacidade de diferenciação em tripomastigotas metacíclicos. Após os parasitos terem completado a diferenciação *in vitro*, os mesmos foram quantificados por contagem direta em câmara de Neubauer e visualização em microscópio óptico após a coloração dos parasitos com Giemsa (Figura 20 A).

A diferenciação *in vitro* das cepas de *T. rangeli*-gp82, *T. rangeli*-GFP e da cepa selvagem (Figura 20 B) resultou em taxas de diferenciação semelhantes entre as cepas, não tendo sido observadas diferenças estatisticamente significativas, permitindo afirmar que a transfecção não incorreu em alterações morfológicas e nem no padrão de diferenciação *in vitro* do parasito. Segundo estudos anteriormente

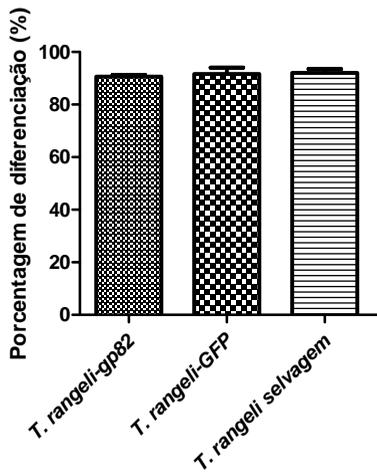
realizados com o marcador fluorescente GFP, este não causa alterações no crescimento e infectividade dos parasitos transfectados com a GFP (PIRES et al, 2008; FLORENCIO-MARTÍNEZ et al., 2010).

**A** *T. rangeli* selvagem

*T. rangeli-gp82*



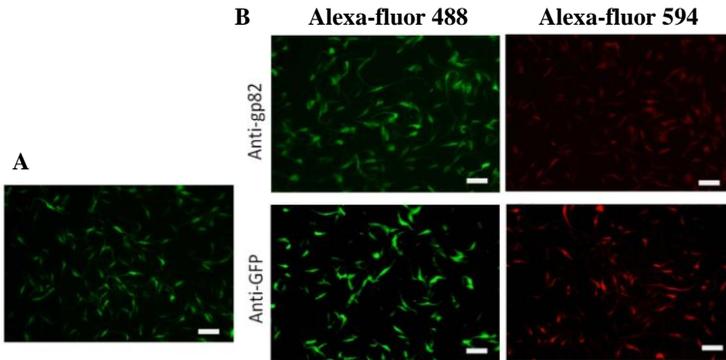
**B**



**Figura 20.** (A) Formas tripomastigotas de *Trypanosoma rangeli* selvagem e *T. rangeli-gp82* obtidos após o processo de diferenciação *in vitro*. Os parasitos foram corados com Giemsa. As barras em preto representam 10  $\mu$ m. (B) Percentual de diferenciação em tripomastigotas *in vitro* de diferentes cepas de *T. rangeli*. Os dados são representativos de três experimentos independentes com duas réplicas técnicas cada.

### 5.2.3 Detecção da expressão de proteínas expressas heterológamente por *T. rangeli*

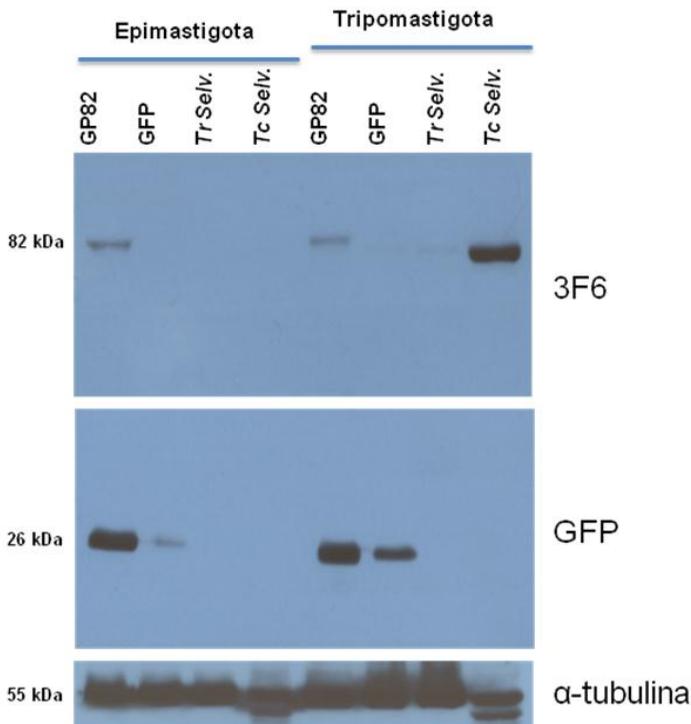
A avaliação dos produtos de expressão plasmidial nos parasitos transfectados foi realizada primeiramente através de observação direta da expressão da GFP em microscópio de fluorescência (Figura 21 A). Utilizando anticorpos específicos, tanto a expressão da gp82 (Figura 21 B) , quanto a expressão da GFP foram confirmadas na cepa *T. rangeli-gp82*. Além disso, foram realizados ensaios controles apenas com anticorpo secundário ou utilizando outro anticorpo não relevante para o estudo em questão. Estes não apresentaram nenhum nível de fluorescência (dados não mostrados). Inicialmente, utilizou-se o anticorpo secundário conjugado a Alexa-fluor 488. No entanto, para evitar que houvesse sobreposição desta fluorescência com a naturalmente emitida pelo parasito devido a expressão da GFP, o anticorpo secundário conjugado com Alexa-fluor 594 também foi utilizado, apresentando resultados semelhantes.



**Figura 21.** Expressão heteróloga das proteínas gp82 e GFP na cepa *Trypanosoma rangeli-gp82*. (A) Resultado da observação da fluorescência direta da GFP na cepa *T. rangeli-gp82*. (B) Resultados dos ensaios de imunofluorescência indireta utilizando os anticorpos primários 3F6 (anti-gp82) ou anti-GFP, e os anticorpos secundários anti-IgG de camundongo conjugado a Alexa-fluor 488 ou Alexa-fluor 594. As barras em branco representam 10  $\mu\text{m}$ .

### 5.2.4 Análise da expressão das proteínas heterológamente expressas pelo *T. rangeli* através de *western blot*

A expressão das proteínas heterólogas nos parasitos transfectados também foi confirmada pela realização de um ensaio de *western blot* (Figura 22) com extratos protéicos de formas epimastigotas e tripomastigotas das cepas *T. rangeli*-gp82, *T. rangeli*-GFP, *T. rangeli* selvagem e *T. cruzi* (cepa Y).



**Figura 22.** Avaliação da expressão heteróloga das proteínas gp82 e GFP por *western blot* em extratos protéicos totais de formas epimastigotas e tripomastigotas de *Trypanosoma rangeli*-gp82, *T. rangeli*-GFP, *T. rangeli* cepa Choachí e *T. cruzi* cepa Y. Os anticorpos primários utilizados foram 3F6, anti-GFP e anti- $\alpha$ -tubulina. *T. rangeli*-gp82 está apresentado como gp82, *T. rangeli*-GFP como GFP, *T. rangeli* selvagem cepa Choachí está como TrSelv e *Trypanosoma cruzi* cepa Y está como TcSelv.

Conforme o esperado, o anticorpo anti-GFP reconheceu uma proteína de aproximadamente 26 kDa apenas nos extratos protéicos provenientes de parasitos transfectados com o plasmídeo pTEX-8523eGFP (*T. rangeli*-gp82) e com o plasmídeo pTEXeGFP (*T. rangeli*-GFP). Além disso, o anticorpo 3F6 foi capaz de reconhecer um polipeptídeo de 82 kDa nos extratos protéicos totais de formas tripomastigotas de *T. cruzi*. Ainda que com intensidade menor do que o observado para *T. cruzi*, o ensaio revelou a expressão equivalente da gp82 por formas epimastigotas e tripomastigotas da cepa *T. rangeli*-gp82 (Figura 22).

O resultado de expressão equivalente referente a *T. rangeli*-gp82 já era esperado pois o gene da gp82 está inserido em um vetor episomal e sua expressão está relacionada apenas com a pressão do agente seletor. Neste sentido, tanto a cultura de epimastigotas quanto os parasitos diferenciados foram mantidos sobre a mesma pressão de G-418, sendo este resultado bastante plausível.

É possível observar um fraco reconhecimento de um polipeptídeo de 82 kDa em formas tripomastigotas de *T. rangeli*-GFP e *T. rangeli* selvagem. Esse reconhecimento pode estar relacionado ao fato de que o anticorpo 3F6 é direcionado ao domínio central do gene gp82 de *T. cruzi*. Como este apresenta similaridade com as sialidases do grupo II de *T. rangeli* (capítulo 1 desta tese) e o anticorpo pode reconhecer, ainda que de forma não específica, algum epítopo relacionado nestes parasitos.

A atividade de sialidase é regulada em *T. cruzi* (PEREIRA, 1983). As sialidases e TS são maximamente expressas na forma tripomastigotas de *T. cruzi* onde a atividade é de 10 a 20 vezes maior do que a encontrada em formas epimastigotas (PEREIRA, 1983; ZINGALES et al., 1987; HARTH; HAIDARIS; SO, 1987). Estes dados corroboram os observados para as formas epimastigotas e tripomastigotas de *T. cruzi*, sendo o anticorpo 3F6 direcionado para a gp82 expressa nas formas tripomastigotas metacíclicas de *T. cruzi* (TEIXEIRA; YOSHIDA, 1986).

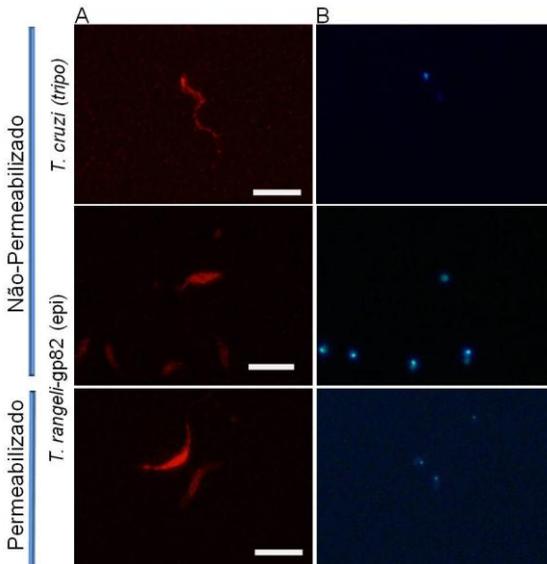
Análises de densitometria permitiram a quantificação comparativa da expressão das proteínas identificadas no *western blot*. A quantificação da gp82 mostrou que o nível de expressão nas formas epimastigotas e tripomastigotas de *T. rangeli*-gp82 foi respectivamente, 70,6% e 82,3% menores do que a expressão em tripomastigotas de *T. cruzi*. Além da expressão da gp82 em *T. rangeli* ser induzida, esta diferença pode ser decorrente do número de cópias do gene que codifica para a gp82 presente no *T. cruzi*, uma vez que neste parasito este gene é

encontrado em vários cromossomos deste parasito e tem cerca de 60 cópias por genoma haplóide (ARRAYA et al., 1994).

### 5.2.5 Imunolocalização das proteínas expressas heterológamente por *T. rangeli*

Buscando avaliar a localização celular da gp82 e da GFP nas formas epimastigotas de *T. rangeli*-gp82, os anticorpos descritos na Tabela 4 foram utilizados em ensaios de RIFI utilizando parasitos permeabilizados e não-permeabilizados. Como controles, também foram realizados ensaios apenas com anticorpo secundário ou utilizando outro anticorpo não relacionado para o estudo em questão. Estes não apresentaram nenhum nível de fluorescência (dados não mostrados).

A localização celular da gp82 em *T. rangeli*-gp82 e em *T. cruzi* (Figura 23) utilizando parasitos não-permeabilizados foi bastante similar, evidenciando-se uma fluorescência uniforme associada a superfície do parasito. Nos parasitos *T. rangeli*-gp82 permeabilizados, o anticorpo 3F6 também revelou uma fluorescência associada a superfície do parasito, porém mais concentrada.



**Figura 23.** Localização celular da glicoproteína de superfície de 82 kDa em formas tripomastigotas (tripo) de *Trypanosoma cruzi* e formas epimastigotas (epi) de *Trypanosoma rangeli*-gp82. (A) Imunofluorescência indireta utilizando o anticorpo primário 3F6 e (B) coloração por DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol). As barras em branco representam 10 µm.

Atayde e colaboradores (2007) ao estudarem a localização celular da gp82 em formas tripomastigotas de *T. cruzi* verificaram que a mesma está distribuída por todo o corpo celular, tanto em parasitos permeabilizados como não-permeabilizados. Nas cepas de *T. cruzi* que penetram nas células hospedeiras de forma mediada pela gp82, moléculas reativas ao anticorpo 3F6 contribuem para o processo de invasão (RAMIREZ et al., 1993), principalmente por se ligar a moléculas de superfície da célula hospedeira e desencadear a ativação de vias de transdução de sinal no parasito e na célula alvo (YOSHIDA, 2006).

Ramirez e colaboradores (1999) construíram uma proteína gp82 de *T. cruzi* quimérica e expressaram em células Vero transfectadas com o plasmídeo pcDNA3 que continha o gene da gp82 de *T. cruzi*. Eles determinaram a localização celular por imunofluorescência e verificaram que as células Vero transfectadas com essa construção não expressavam gp82 na superfície celular. Em virtude disso, eles decidiram detectar a gp82 em células Vero permeabilizadas e concluíram que a gp82 é transportada para fora do retículo endoplasmático e complexo de golgi e acumula-se perto da superfície da célula.

Há vários fatores que corroboram o fato da gp82 em *T. rangeli*-gp82 estar realmente localizada na superfície do parasito. Estruturalmente a gp82 é uma glicoproteína de superfície que contém oligosacarídeos *N*-ligados as cadeias laterais e ancorados a membrana por meio de uma âncora de GPI (CARDOSO DE ALMEIDA: HEISE, 1993). Cardoso de Almeida e Heise (1993) mostraram que as moléculas de superfície das formas metacíclicas estão ligadas à superfície celular por meio de âncora de GPI, região também identificada na glicoproteína em questão. Além disso, a análise da hidrofobicidade da gp82 indica a presença de uma região apolar de 15 aminoácidos na extremidade carboxi-terminal que é característica de proteínas ancoradas à superfície celular por uma GPI (RAMIREZ et al., 1999).

As proteínas a serem ancoradas por meio de GPI apresentam na extremidade amino-terminal um peptídeo sinal hidrofóbico que direciona a proteína nascente ao interior do retículo endoplasmático onde logo pode ou não ser clivado (HOWELL et al., 1994). A gp82 presente em *T. rangeli*-gp82 não apresenta peptídeo sinal, porém o peptídeo sinal da gp85 de *T. cruzi* foi inserido no plasmídeo pTEX-8523eGFP, o que reforça a hipótese de que esta proteína está localizada na superfície do parasito. Esses resultados também nos indicam que provavelmente o processamento em *T. rangeli* encaminhe esta proteína

para a superfície por utilizar vias parecidas com *T. cruzi*.

### 5.3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com base nos resultados obtidos no presente capítulo, podemos concluir que:

- ✓ As cepas *T. rangeli*-gp82 e *T. rangeli*-GFP apresentaram crescimento e padrão de diferenciação *in vitro* que não diferiu da cepa selvagem.
- ✓ As proteínas heterólogas gp82 e eGFP continuam sendo expressas em *T. rangeli*-gp82 mesmo após a diferenciação *in vitro* em formas tripomastigotas;
- ✓ A localização celular da gp82 em *T. rangeli*-gp82 está associada a superfície do parasito.

## **6 CAPÍTULO III**

Análise comparativa da interação *in vitro* de células Vero e de células THP-1 com a cepa do *T. rangeli*-gp82

## 6.1 MATERIAIS E MÉTODOS

### 6.1.1 Células

Células Vero (ATCC: CCL81) foram mantidas em garrafas de 75cm<sup>2</sup> em meio DMEM suplementado com 5% de SBF a 37°C com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>.

As células THP-1 (linhagem humana de origem monocítica, derivada de paciente com leucemia monocítica aguda - ATCC#TIB-202) foram cultivadas em garrafas de cultura de 75cm<sup>2</sup> em meio *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI)-1640 (HiMedia Laboratories) pH 7,4 suplementado com 10% de SBF, 12,5 mM de HEPES (Gibco), 100 U/mL penicilina, 100 µg/mL estreptomicina (Gibco), 2 mM de Glutamax<sup>®</sup>, (Gibco), 1mM de Piruvato de Sódio (Gibco) (aqui definido como RPMI completo) e mantidas a 37°C com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. As células foram mantidas através de repiques semanais na densidade de 3x 10<sup>5</sup> células/mL. Para tal, após uma lavagem em PBS, o número de células viáveis foi determinado pelo teste de exclusão do azul de trypan (0,02%), quantificado em Câmara de Neubauer e ajustado a concentração desejada em meio RPMI completo. Para os experimentos aqui descritos utilizou-se células com, no máximo, 15 passagens.

#### 6.1.1.2 Indução da diferenciação de células THP-1

Células THP-1 coletadas no 3º ou 4º dia de crescimento foram quantificadas conforme descrito no item 6.1.1 e induzidas à diferenciação em fagócitos aderentes semelhantes a macrófagos conforme descrito por Schwende e colaboradores (1996). Em placas de 24 cavidades, foram cultivadas 1,5x 10<sup>5</sup> células/ml em meio RMPI completo acrescido de Forbol-12-miristato-13-acetato (PMA) (Sigma-Aldrich) na concentração de 50 µg/ml a 37°C com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> por 72 horas.

Após este período, as células foram utilizadas para os ensaios de interação conforme descrito no item 6.1.3.

### 6.1.2 Ensaio de interação do *T. rangeli*-gp82 com células Vero e THP-1

Os ensaios cinéticos de interação de formas tripomastigotas das cepas *T. rangeli*-gp82, Y de *T. cruzi*, *T. rangeli*-selvagem e *T. rangeli*-GFP foram conduzidos em triplicata, utilizando-se duplicatas técnicas em cada experimento. O cultivo de monocamadas celulares não confluentes da linhagem Vero ou THP-1 sobre lamínulas de vidro (22 x 22 cm) foi realizado conforme descrito por Croxford e colaboradores

(2005) com pequenas modificações. Formas tripomastigotas das duas espécies foram adicionadas sobre as monocamadas celulares ( $5 \times 10^4$  células/ml para Vero e  $1,5 \times 10^5$  células/ml para THP-1) a um MOI (do inglês *Multiplicity of infection*-razão parasito: célula) de 30:1 para Vero e 10:1 para THP-1 e mantidas em placas de 24 cavidades a 37°C com atmosfera de 5% CO<sub>2</sub> por três horas. Transcorrido este tempo de interação, as células foram lavadas duas vezes com PBS e novamente mantidas em meio DMEM acrescido de 5% de SBF quando se trata de células Vero e RPMI completo para THP-1 até o momento de serem processadas segundo os períodos determinados para o experimento.

Os tempos escolhidos na interação com células Vero foram T0 (após as 3 horas de interação), T4, T16 e T120, sendo que nestes três últimos, o número representa o número de horas de interação a partir de T0. Para THP-1, utilizamos T0, T4, T16 e T42. Decorrido estes períodos, duas amostras referentes a cada um dos parasitos em cada tempo do experimento foram coradas pelo método de Giemsa (Vero) (item 6.1.2.1) ou Panótico (THP-1) (6.1.2.2) e as outras duas submetidas a ensaios de RIFI (item 6.1.2.3).

Para a determinação do número de parasitos aderidos e internalizados foram contadas, de maneira aleatória, 200 células por lâmina para cada um dos tempos e cepas utilizadas.

#### 6.1.2.1 Coloração pelo método de Giemsa

Após o período de interação, os poços foram lavados três vezes com PBS pH 7,4 e subsequentemente fixados com metanol. Após a coloração com uma solução de Giemsa (Merck) durante 15 min, as lâminas de vidro foram lavadas com água deionizada e secas ao ar.

#### 6.1.2.2 Coloração pelo Panótico

Após o período de interação, os poços foram lavados três vezes com PBS pH 7,4 e subsequentemente submetidos a coloração por Panótico (HemaDiff Bioanalytic GmbH D-79224- Germany) de acordo com as instruções do fabricante com algumas modificações. Basicamente, fixou-se a amostra por 2 min na solução do Frasco A (triarilmetano a 0,1%). Escorreu-se a lâmina e esta foi submetida a coloração na solução do frasco B (xantenos a 0,1%) por 5 min e posteriormente o mesmo processo foi repetido com a solução do frasco C (tiazinas a 0,1%). Após a coloração, a lâmina foi lavada em uma solução contendo 20% de álcool etílico absoluto em água deionizada por 1 min. Em seguida, lavou-se a lâmina em água deionizada e esta foi seca ao ar. As lâminas foram montadas com o reagente *Entellan*<sup>®</sup>

(Merck) sobre lâminas de microscopia.

### 6.1.2.3 RIFI

Após o período de interação, os poços foram lavados três vezes com PBS pH 7,4, e subsequentemente fixados com paraformaldeído 4% diluído em PBS durante cinco min. Após três lavagens de cinco minutos com PBS, foi feita a permeabilização dos parasitos com 0,5% NP-40 (interação com células Vero) ou Triton X-100 (interação com células THP-1) durante 5 min. Foi realizado novamente três lavagens de cinco min. cada em PBS 1X. Os sítios inespecíficos foram bloqueados em solução de bloqueio (5% leite desnatado diluído em PBS-Tween 0,1% na interação com células Vero e Albumina de soro bovino- BSA a 2% na interação com células THP-1) durante 1 hora a temperatura ambiente.

Na interação com células Vero, o anticorpo primário, anti-TAT-1-alfa-Tubulina foi diluído 1:400 em solução de bloqueio 0,5%, sendo então adicionado sobre as lamínulas permanecendo em contato com o antígeno durante 90 min a temperatura ambiente. Após novas lavagens (PBS-Tween 0,1%), o anticorpo secundário anti-IgG de amundongo conjugado a Alexa-fluor 488 (Molecular Probes) foi diluído 1:1000 em solução de bloqueio 0,5% e mantido sobre as lamínulas por 15 min protegido da luz.

Já para células THP-1, os diferentes anticorpos primários (anti-TAT-1-alfa-Tubulina e LAMP1 ou LAMP2) foram diluídos conforme a Tabela 5, em solução de bloqueio a 2%, sendo mantidos sobre as lamínulas durante 90 min a temperatura ambiente. Após novas lavagens (PBS pH 7,2), os anticorpos secundários (descritos na Tabela 5) foram diluídos em solução de bloqueio a 2% e mantidos sobre as lamínulas por 15 min protegidos da luz.

Após três lavagens de cinco min em PBS-Tween 0,1%, as lamínulas foram coradas com 1 µg/ml de DAPI por cinco min, lavadas novamente e montadas com o reagente *Hydromount* (National Diagnostics) sobre lâminas de microscopia. As análises foram realizadas em microscópio óptico de fluorescência Olympus – Bx40-FL (Olympus) e digitalmente registradas.

**Tabela 5.** Descrição dos anticorpos utilizados no ensaio de imunofluorescência indireta com células THP-1, considerando sua origem e diluições utilizadas.

Anticorpo	Tipo	Diluição RIFI
TAT-1 - Alfa	Monoclonal	1:1000
Tubulina	IgG-camundongo	
LAMP2 (marcador lisossomal)	Monoclonal IgG-rato	1:75
LAMP1 (marcador lisossomal)	Policlonal IgG-coelho	1:30
Alexa fluor 488	IgG anti-rato	1:1000
Alexa fluor 488	IgG anti-coelho	1:1000
Alexa fluor 594	IgG anti-camundongo	1:1000

### 6.1.3 Análise estatística

Para a determinação do número de parasitos aderidos e internalizados foram contadas, de maneira aleatória, 200 células por lamínula para cada um dos tempos e cepas utilizadas. Estes experimentos foram realizados com duas replicas técnicas e em triplicatas, sendo as médias analisadas pela análise de variância (ANOVA) de dois fatores (two-way) seguida do teste “post-hoc” de Bonferroni. Estes foram utilizados para determinação de diferenças estatísticas entre os grupos e o nível de significância adotado foi  $p < 0,05$ . As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa *GraphPad Prism* 2007, versão 5.0 para Windows (MOTULSKY, 2007).

### 6.1.4 Ensaio de mobilização de cálcio do *T. rangeli* expressando a proteína heteróloga gp82

O fluxo de  $\text{Ca}^{2+}$  da célula hospedeira mobilizada pelo parasito pode ser mensurado utilizando-se um indicador que acusa a mobilização pelo aumento de fluorescência, o Fluo-3 (Invitrogen *Life Technologies*). Para este ensaio,  $2,5 \times 10^4$  células Vero/poço foram mantidas a  $37^\circ\text{C}$  com atmosfera de 5%  $\text{CO}_2$  durante 20 horas em placa de 96 cavidades. Após duas lavagens com PBS pH 7,2 contendo 0,5 mM de Probenecid (PBS/Probenecida), foi adicionada às células uma solução contendo 5  $\mu\text{M}$  de Fluo-3, 0,05% de ácido plurônico F-127 e 0,5 mM de Probenecida. As células foram mantidas nesta solução por 60 min a temperatura ambiente e protegidas da luz. Foi realizada mais uma lavagem com PBS/Probenecida e posteriormente as células foram mantidas por 30 min em PBS/Probenecida protegidas da luz. Decorrido

este tempo, o extrato solúvel dos parasitos (5µg) foi acrescentado. Para preparação dos extratos, aos precipitados de parasitos foram adicionados 150 µl de tampão de lise (50mM NaCl, 200mM Tris-HCl pH 8.0, 1% Triton X-100) aquecido a 100°C e estes foram homogeneizados intensamente duas vezes durante 30 segundos. As amostras foram então centrifugadas a 14.000 x g por 30 min a 4°C obtendo assim um extrato de proteínas solúveis no sobrenadante. A leitura da fluorescência foi realizada durante 110 segundos (10 segundos antes da adição dos extratos e 100 segundos depois) a 37°C no equipamento TECAN *Infinite*<sup>®</sup> M200 (Invitrogen *Life Technologies*). O comprimento de onda (λ) de excitação utilizado para a leitura da fluorescência foi de 485 nm e o de emissão 525 nm, sendo os resultados expressos em valores relativos de fluorescência. Este experimento foi realizado em triplicata com duas réplicas técnicas cada.

#### 6.1.4.1 Análise estatística

As médias obtidas foram submetidas a análise de variância (ANOVA) unifatorial (one-way) seguida do teste “post-hoc” de Tukey, apontando diferenças estatisticamente significativas entre os grupos a nível de significância de  $p < 0,05$ . Estas análises foram realizadas utilizando o programa GraphPad Prism 2007, versão 5.0 para Windows (MOTULSKY, 2007).

## 6.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 6.2.1 Interação *in vitro* do *T. rangeli*-gp82 com células Vero

Os resultados da RIFI em todos os tempos e com todas as cepas utilizadas encontram-se sumarizados na Figura 24. No tempo zero (T0) foi possível observar parasitos aderidos às células, além de alguns internalizados, caracterizados por uma estrutura mais arredondada, que ocorreu para todas as cepas de parasitos avaliados (*T. rangeli*-GFP, *T. rangeli*-gp82, *T. rangeli* selvagem e *T. cruzi*). No T4 observamos os parasitos internalizados caracterizados por uma estrutura totalmente arredondada, e uma menor frequência de parasitos para as cepas *T. rangeli* selvagem e *T. rangeli*-GFP. Para as demais cepas (*T. rangeli*-gp82 e *T. cruzi*), a frequência de parasitos internalizados se manteve, sendo que resultados semelhantes foram igualmente observados no T16 (Figura 24).

Após 120 horas de interação, observam-se raros parasitos aderidos ou internalizados correspondentes as cepas *T. rangeli* selvagem e *T. rangeli*-GFP. Para *T. cruzi*, uma grande quantidade de amastigotas

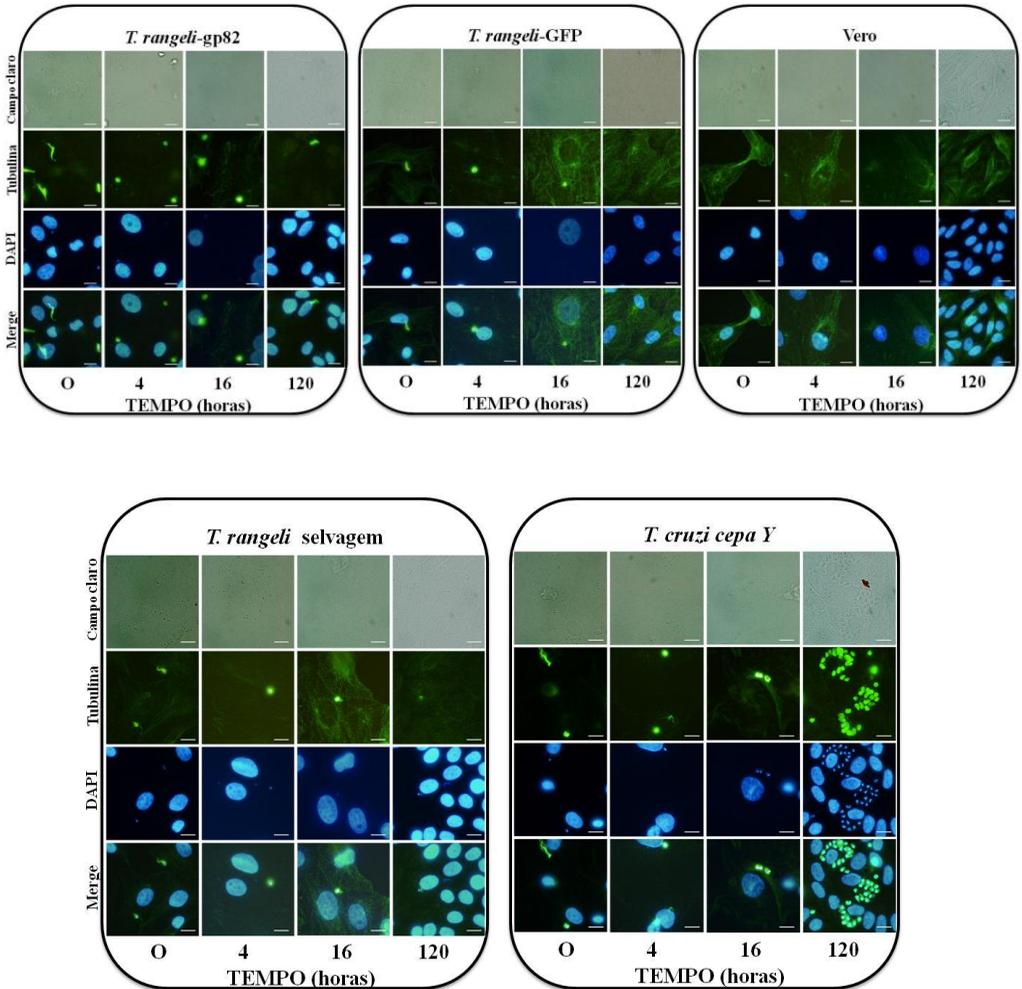
no interior das células é observada, sendo resultante da multiplicação intracelular. Quando comparamos a cepa *T. rangeli*-gp82 às outras cepas de *T. rangeli*, observa-se que nesta ainda há parasitos internalizados. Estes encontram-se em formato arredondado, entretanto não há qualquer indicativo de estejam realizando multiplicação intracelular. Esses dados corroboram os observados por D'Alessandro-Bacigalupo e Saravia (1992) onde nenhum sítio de multiplicação do *T. rangeli* em células de mamíferos foi convincentemente demonstrado.

No intuito de verificar a porcentagem de células infectadas resultante do ensaio de interação parasito-célula Vero, foi realizada a contagem de 400 células nos tempos T0, T4 e T16 (Figura 25). Verificamos que a infecção celular nos diferentes tempos foi significativamente maior para o *T. cruzi* do que para o *T. rangeli* selvagem ( $p < 0.001$ ). Não foram encontradas diferenças ( $p > 0.05$ ) entre a infecção pelas cepas *T. rangeli*-GFP e *T. rangeli* selvagem, sendo esse resultado também já esperado pois a cepa *T. rangeli*-GFP foi utilizada como um controle negativo, por possuir exatamente o mesmo plasmídeo da cepa *T. rangeli*-gp82, somente diferindo quanto a presença do gene gp82 e peptídeo sinal da gp85.

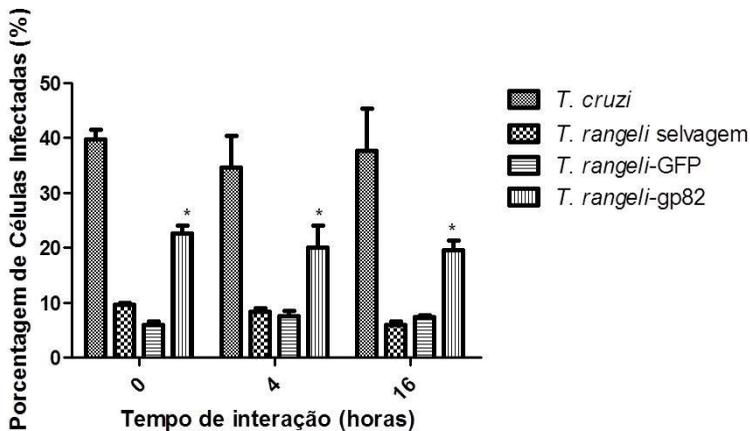
Com relação a cepa *T. rangeli*-gp82, verificamos que esta foi capaz de infectar um maior número de células ( $p < 0,05$ ) do que a cepa *T. rangeli* selvagem (Figura 25) nos três diferentes tempos de interação. Resultados similares foram observados quando comparamos a cepa *T. rangeli*-gp82 com a cepa *T. rangeli*-GFP.

Ao compararmos a porcentagem de células infectadas pela cepa *T. rangeli*-gp82 em relação ao *T. cruzi* (Figura 25) verificamos que a infecção foi significativamente maior para *T. cruzi* nos diferentes tempos analisados (T0 e T4-  $p < 0,01$ ; T16  $p < 0.001$ ). Contudo, esta diferença foi inferior a observada quando comparamos *T. rangeli* selvagem e *T. cruzi*. Em virtude disso, podemos concluir que ocorreu um número maior de parasitos intracelulares para *T. rangeli* gp82 em relação a *T. rangeli* selvagem, porém inferior ao observado para *T. cruzi*, indicando que a expressão da gp82 de *T. cruzi* pelo *T. rangeli* altera o padrão de interação deste com células não fagocíticas.

O *T. rangeli* possui sialidases do grupo II, mas não sabemos se elas são capazes de exercer este mesmo papel da gp82, assim este efeito de aumento na infecção pode estar relacionado a presença da gp82 como citado ou ainda a um aumento da sua quantidade (sialidases grupo II) na superfície dos parasitos transfectados.

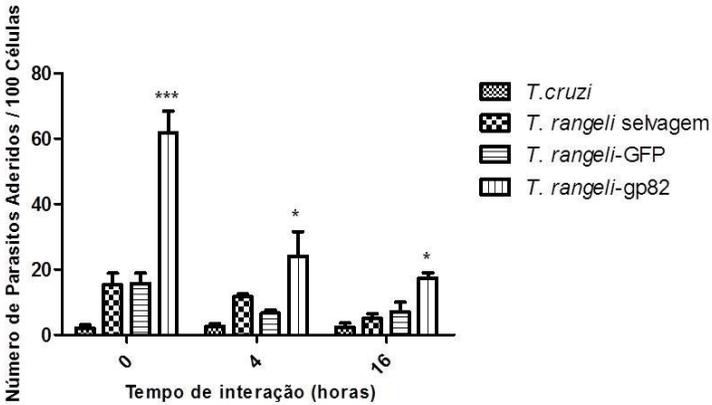


**Figura 24.** Ensaio de Interação parasito-célula hospedeira através de Imunofluorescência indireta. A linhagem celular utilizada foi célula VERO (ATCC: CCL81) originária de fibroblastos de rim do macaco verde Africano- *Cercopithecus aethiops*. Tempo: T0 (após as três horas de interação), T4, T16 e T120, sendo que nestes três últimos, o número representa o número de horas de interação a partir de T0. Tubulina: anticorpo primário anti-TAT-1-alfa-Tubulina. Coloração por DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol). Merge: sobreposição da imagem de tubulina, e DAPI. As barras em branco representam 10  $\mu$ m.



**Figura 25.** Representação gráfica da porcentagem de células infectadas resultante do ensaio de interação parasito-célula Vero. Tempo: T0 (após as três horas de interação), T4 e T16 (a partir de T0). *Trypanosoma rangeli* selvagem: *T. rangeli* cepa Choachí. *Trypanosoma cruzi*: *T. cruzi* cepa Y. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando analisadas através da análise de variância (ANOVA) dois fatores (two-way) seguida do teste “post-hoc” de Bonferroni ( $p < 0,05$ ). \*  $p < 0,05$ . Foram apresentadas apenas as diferenças estatisticamente significativas entre a cepa *T. rangeli*-gp82 e *T. rangeli* selvagem.

Com relação ao número de parasitos aderidos nos três diferentes tempos (T0, T4 e T16) (Figura 26), verificamos que não ocorreu diferença significativa entre a adesão das cepas *T. rangeli* selvagem e *T. rangeli*-GFP ( $p > 0,05$ ). Porém, ao comparar a quantidade de parasitos aderidos às células entre as cepas *T. rangeli* selvagem e *T. rangeli*-gp82, verificamos que há uma maior quantidade de parasitos da cepa *T. rangeli*-gp82 aderido às células nos três diferentes tempos. O mesmo ocorreu quando comparamos *T. rangeli*-gp82 e *T. cruzi* no T0 e T4 ( $p < 0,001$ ) e em T16 ( $p < 0,01$ ). De maneira geral, podemos afirmar que o número de parasitos da cepa *T. rangeli*-gp82 aderidos às células foi significativamente maior com relação as demais cepas analisadas. Observamos um menor número de parasitos de *T. cruzi* aderidos às células Vero em relação ao *T. rangeli*, fato que pode estar relacionado à uma maior capacidade e/ou velocidade de internalização dos mesmos nestes tipos celulares (Figura 26).



**Figura 26.** Representação gráfica do número de parasitos aderidos/100 células resultante do ensaio de interação parasito-célula hospedeira. A linhagem celular utilizada foi célula Vero (ATCC: CCL81) originária de fibroblastos de rim do macaco verde Africano- *Cercopithecus aethiops*. Tempo: T0 (após as três horas de interação), T4 e T16 (a partir de T0). *Trypanosoma rangeli* selvagem: *T. rangeli* cepa Choachí. *Trypanosoma cruzi*: *T. cruzi* cepa Y. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando analisadas através da análise de variância (ANOVA) dois fatores (two-way) seguida do teste “post-hoc” de Bonferroni ( $p < 0,05$ ). \*  $p < 0,05$ . \*\*\*  $p < 0,001$ . Foram apresentadas apenas as diferenças estatisticamente significativas entre a cepa *T. rangeli*-gp82 e *T. rangeli* selvagem.

Observações *in vitro* usando videomicroscopia mostram claramente que nem todos os parasitos que interagem com a superfície da célula permanecem aderidos. Nos casos em que a adesão ocorre, esta é suficientemente intensa para resistir a sucessivas lavagens da cultura. Todas as formas do ciclo evolutivo de *T. cruzi* aderem à célula hospedeira. O grau de adesão, no entanto, varia de acordo com a cepa do parasito, com a forma evolutiva e com a célula hospedeira (DE SOUZA, 2000).

Diversos estudos de interação parasito-hospedeiro já foram realizados com cepas de *T. rangeli* isoladas de diferentes regiões geográficas e distintas linhagens celulares, buscando elucidar o ciclo de vida deste parasito. Osorio e colaboradores (1995) revelaram que o clone Ub66-5b da cepa San Agustín de *T. rangeli*, proveniente de cultura e de glândula salivar de *Rhodnius prolixus*, foi capaz de infectar

a linhagem celular U937 (promonócito) em baixas proporções. O mesmo acontece com as cepas SC-58, Macias e Choachí ao interagirem com células Vero e promonócitos J774G.8, em que apenas uma ou duas formas intracelulares foram observadas por célula infectada 72 horas após a interação (EGER-MAGRICH et al., 2001). Entretanto, ambos os autores constatam que, apesar de os parasitos se manterem viáveis no interior das células por um tempo prolongado, superior a 144 horas (EGER-MAGRICH et al., 2001) e mais de 25 dias (OSORIO et al., 1995), não há evidência de multiplicação intracelular destes parasitos.

Em contrapartida, Zuñiga e colaboradores (1997), utilizando a cepa C23 de *T. rangeli* com as linhagens celulares Vero e J774, mostrou um grande número de parasitos aderidos e alguns internalizados após quatro horas de interação parasito-célula. Transcorridos seis dias, 50% das células Vero e 47% das células J774 estavam infectadas com um número maior de parasitos internalizados, apresentando ainda, no oitavo dia, o começo de um segundo ciclo de infecção. No entanto, estes resultados precisam ser melhor investigados, uma vez que os parasitos encontrados no interior das células e, também, o aumento no número de parasitos internalizados podem ser decorrentes de uma possível contaminação da cultura da cepa C23 com *T. cruzi*. Estes resultados podem ser um indicativo de que a capacidade de o *T. rangeli* se reproduzir no hospedeiro mamífero esteja relacionada ou dependa das características da cepa utilizada, ou mesmo que não sejam tipos celulares compatíveis com a divisão parasitária.

Manque e colaboradores (2003) examinaram a capacidade de formas epimastigotas de *T. cruzi* transfectadas com o gene da gp82 em se ligar a células HeLa. Estes autores encontraram um aumento de três vezes no número de parasitos aderidos para as formas epimastigotas que expressavam a gp82 quando comparado com as formas epimastigotas selvagens e transfectadas com o vetor sem o gene de interesse.

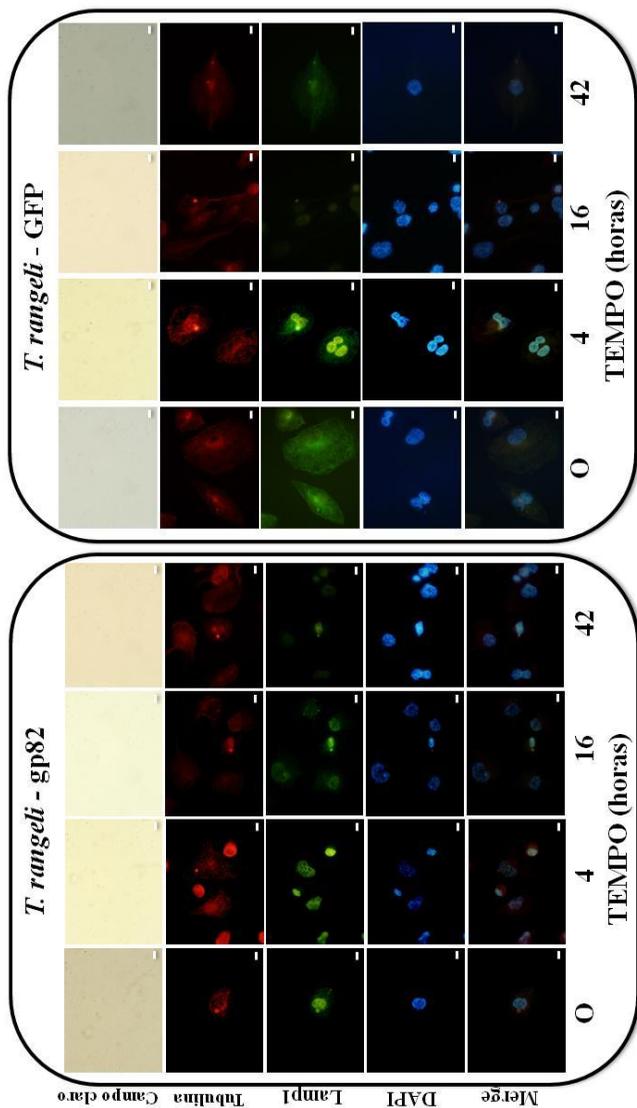
### **6.2.2 Interação *in vitro* do *T. rangeli*-gp82 com células THP-1**

Considerando os resultados apresentados da interação *in vitro* do *T. rangeli*-gp82 com células Vero (células não fagocíticas), decidimos realizar um outro ensaio utilizando células fagocíticas (THP-1). Neste além do anticorpo primário anti-TAT-1-alfa-Tubulina, utilizamos dois tipos de anticorpos lisossomais -LAMP1 e LAMP2. Estima-se que as proteínas de membrana lisossomais LAMP1 e LAMP2 contribuam com aproximadamente 50% de todas as proteínas da membrana do lisossomo (ESKELINEN, 2006). Elas são proteínas altamente glicosiladas, ricas em ácido siálico e estima-se que cubram

aproximadamente 80% da superfície luminal do lisossomo (HOWE et al., 1988; ESKELINEN; TANAKA; SAFTIG, 2003).

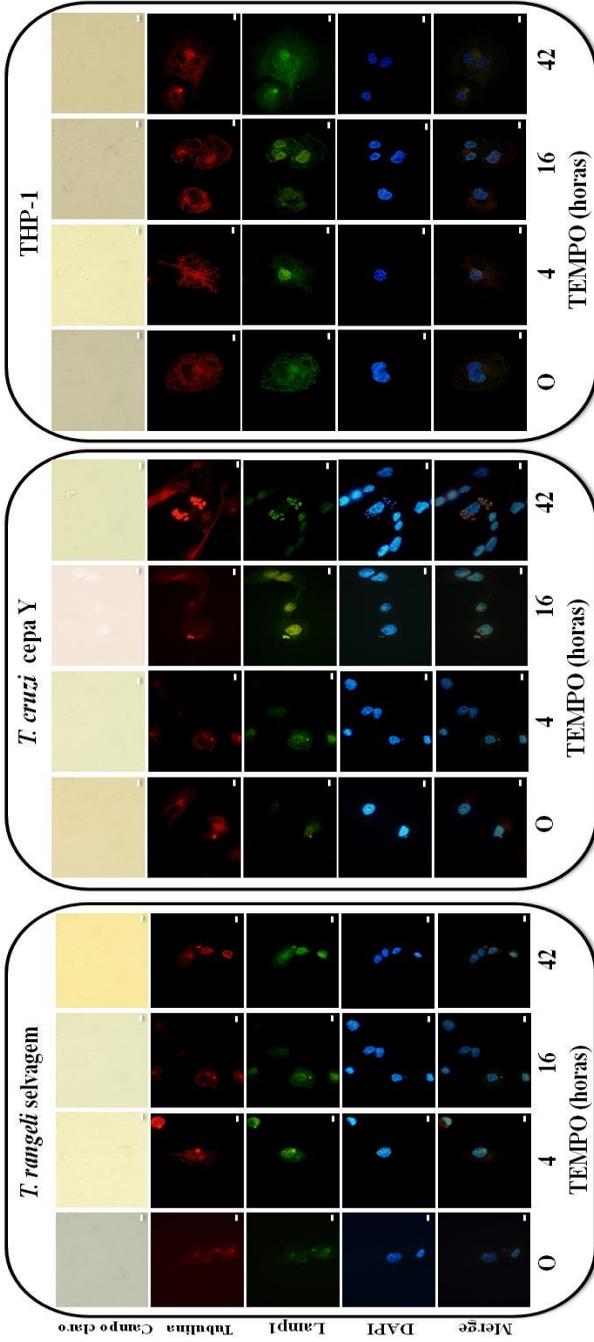
Os resultados da RIFI em todos os tempos e com todas as cepas utilizadas encontra-se nas Figuras 27 e 28. No T0 foi possível observar parasitos aderidos às células, além de alguns internalizados, caracterizados por uma estrutura mais arredondada, que ocorreu para todos os parasitos avaliados (*T. rangeli*-GFP, *T. rangeli*-gp82, *T. rangeli* selvagem e *T. cruzi*). No T4 observamos os parasitos totalmente arredondados e resultados semelhantes foram igualmente observados no T16.

Após 42 horas de interação, observam-se poucos parasitos aderidos ou internalizados correspondentes as cepas *T. rangeli* selvagem, *T. rangeli*-GFP e *T. rangeli*-gp82. Para *T. cruzi*, uma grande quantidade de amastigotas no interior das células foi observada, sendo resultante da multiplicação intracelular.



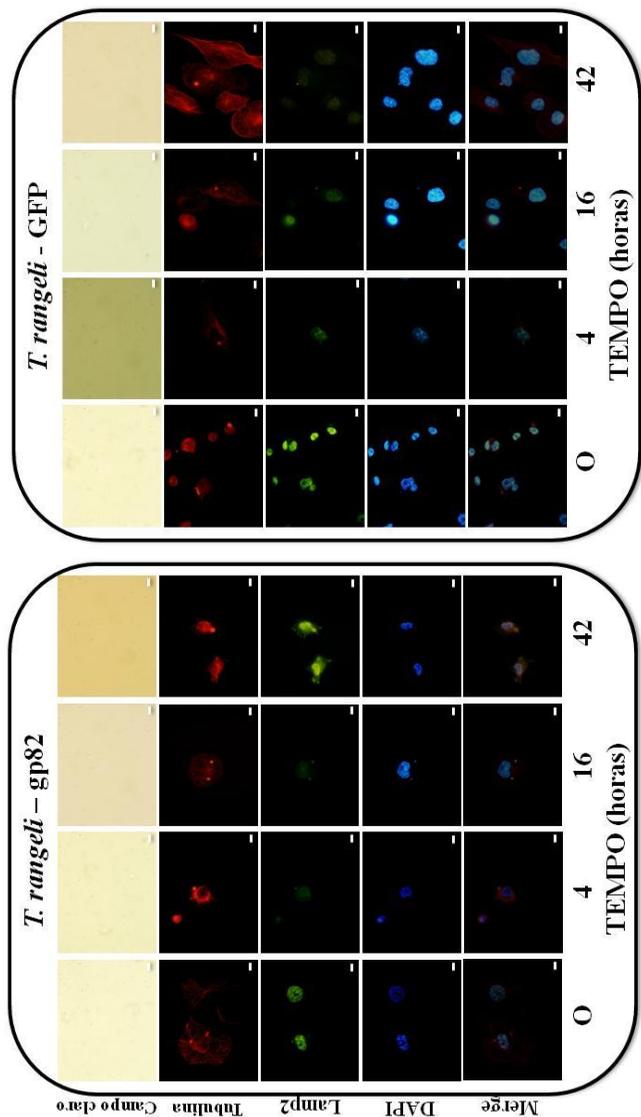
**Figura 27.** Ensaio de Interação parasito-célula hospedeira através de Imunofluorescência indireta. A linhagem celular utilizada foi células THP-1 (linhagem humana de origem monocítica, derivada de paciente com leucemia monocítica aguda -ATCC#TIB-202). Tempo: T0 (após as três horas de interação), T4, T16 e T42, sendo que nestes três últimos, o número representa o número de horas de interação a partir de T0. Tubulina: anticorpo primário anti-TAT-1-alfa-Tubulina. LAMP1: marcador lisossomal. Coloração por DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindo). Merge: sobreposição da imagem de tubulina, LAMP1 e DAPI. As barras em branco representam 10  $\mu$ m.

continua



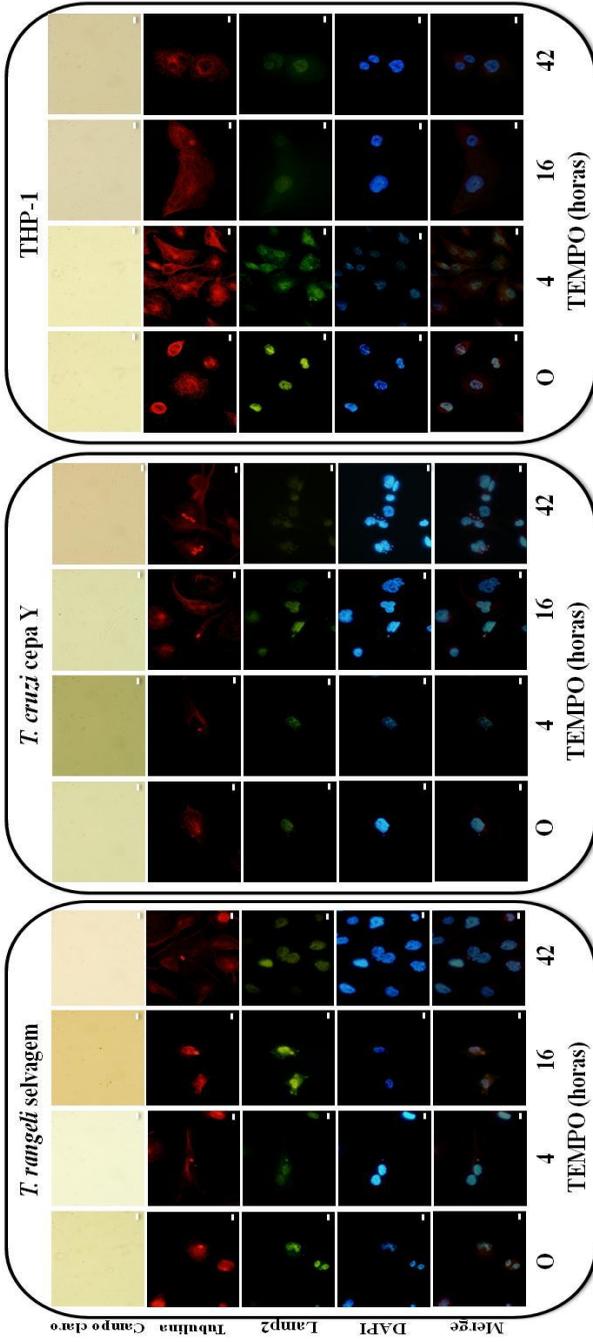
**Figura 27.** Ensaio de Interação parasito-célula hospedeira através de Imunofluorescência indireta..

continuação



**Figura 28.** Ensaio de Interação parasito-célula hospedeira através de Imunofluorescência indireta. A linhagem celular utilizada foi células THP-1 (linhagem humana de origem monocítica, derivada de paciente com leucemia monocítica aguda - ATCC#TIB-202). Tempo: T0 (após as três horas de interação), T4, T16 e T42, sendo que nestes três últimos, o número representa o número de horas de interação a partir de T0. Tubulina: anticorpo primário anti-TAT-1-alfa-Tubulina. LAMP2: marcador lisossomal. Coloração por DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol). Merge: sobreposição da imagem de tubulina, LAMP2 e DAPI. As barras em branco representam 10  $\mu$ m.

continua



**Figura 28.** Ensaio de Interação parasito-célula hospedeira através de Imunofluorescência indireta.

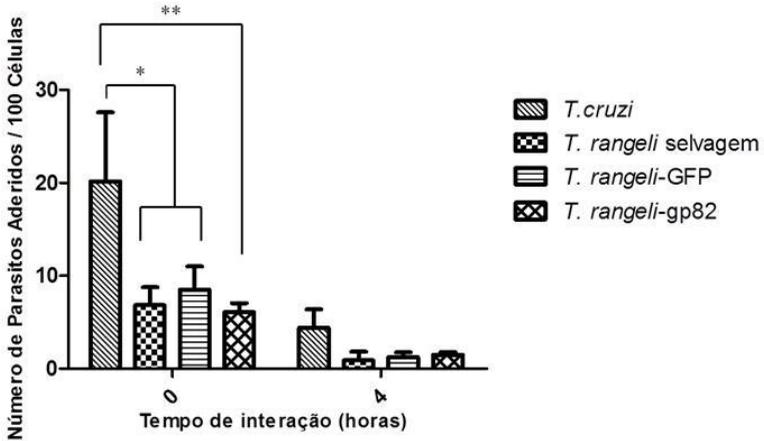
continuação

A marcação lisossomal com os anticorpos LAMP1 e LAMP2 só foi detectada nos T0 e T4 para todas as cepas analisadas (Figuras 27 e 28). Trata-se de uma marcação perinuclear e verificamos uma intensidade maior de marcação para o LAMP1 do que o LAMP2. Esses resultados estão de acordo com os observados por Chen e colaboradores (1985). Eles identificaram estas duas glicoproteínas de membrana lisossomais e verificaram que sua marcação é perinuclear e através de imuno-histoquímica notaram uma maior intensidade de coloração nos tecidos para LAMP1 em comparação com LAMP2.

De acordo com Andrews (1995), a resposta a mobilização de  $\text{Ca}^{2+}$  na célula hospedeira induz o recrutamento de lisossomos para o sítio de penetração do *T. cruzi*. Neste local, marcadores lisossomais são imediatamente incorporados no vacúolo parasitóforo sem acúmulo de actina polimerizada em torno dos parasitos recentemente internalizados e a invasão é facilitada pela ruptura dos microfilamentos (TARDIEX et al., 1992). Jaiswal, Andrews e Simon (2002) relataram que lisossomos que se fundiram foram predominantemente pré-encaixados na membrana plasmática e que o  $\text{Ca}^{2+}$  pode ser o principal responsável pela fusão e não o recrutamento de lisossomos à superfície celular. Ao se fundir com a membrana plasmática, os lisossomos podem contribuir para a formação do vacúolo parasitóforo (ANDREWS, 1995).

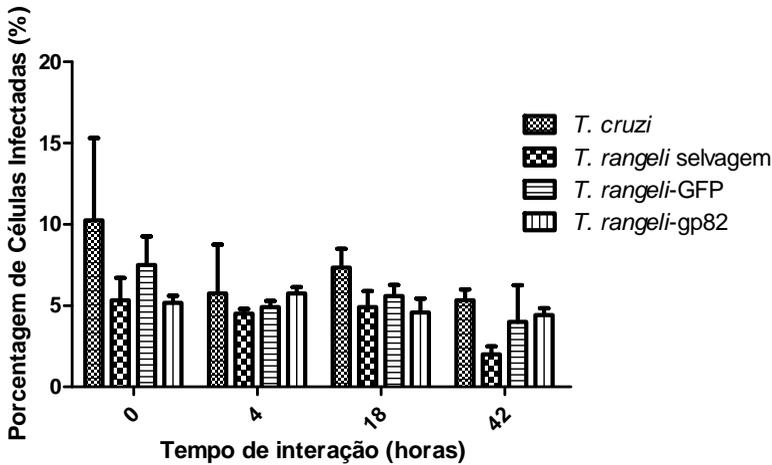
Com relação ao número de parasitos aderidos, encontramos parasitos apenas nos tempos zero e quatro. Verificamos que ocorreu diferença significativa entre a adesão das cepas *T. rangeli* selvagem ( $p < 0,05$ ), *T. rangeli*-GFP ( $p < 0,05$ ) e *T. rangeli*-gp82 ( $p < 0,01$ ) quando comparada ao número de parasitos aderidos de *T. cruzi* (Figura 29). Diferença não mais observada para todas as cepas no T4 (Figura 29).

Estes resultados diferem do observado para as células Vero, onde nos tempos analisados (zero, quatro e dezesseis) verificamos um número maior de parasitos aderidos na cepa *T. rangeli*-gp82 do que nas demais cepas. Não podemos deixar de considerar que o grau de adesão celular varia de acordo não só com relação a cepa do parasito, forma evolutiva, como também com relação a célula hospedeira (DE SOUZA, 2000).



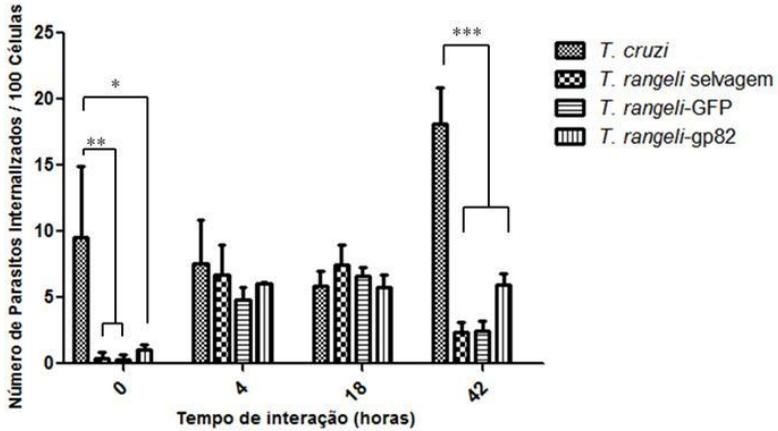
**Figura 29.** Representação gráfica do número de parasitos aderidos/100 células resultante do ensaio de interação parasito-célula hospedeira. A linhagem celular utilizada foi THP1. Tempo: T0 (após as três horas de interação) e T4 (a partir de T0). *Trypanosoma rangeli* selvagem: *T. rangeli* cepa Choachí. *Trypanosoma cruzi*: *T. cruzi* cepa Y. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando analisadas através da análise de variância (ANOVA) dois fatores (two-way) seguida do teste “post-hoc” de Bonferroni ( $p < 0,05$ ). \*  $p < 0,05$ . \*\*  $p < 0,01$ .

No intuito de verificar a porcentagem de células infectadas resultante do ensaio de interação parasito-célula THP-1, foi realizada a contagem de 400 células nos tempos T0, T4, T16 e T42 (Figura 30). Não foram encontradas diferenças ( $p > 0,05$ ) na infecção pelas cepas analisadas (*T. cruzi*, *T. rangeli*-gp82, *T. rangeli*-GFP, *T. rangeli* selvagem) nos quatro diferentes tempos.



**Figura 30.** Representação gráfica da porcentagem de células infectadas resultante do ensaio de interação parasito-célula THP1. Tempo: TO (após as três horas de interação), T4/T18 e T42 (a partir de T0). *Trypanosoma rangeli* selvagem: *T. rangeli* cepa Choachí. *Trypanosoma cruzi*: *T. cruzi* cepa Y. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando analisadas através da análise de variância (ANOVA) dois fatores (two-way) seguida do teste “post-hoc” de Bonferroni ( $p < 0,05$ ).

Contudo, quando analisados o número de parasitos internalizados nos quatro diferentes tempos, notamos diferenças significativas apenas no TO e no T42 (Figura 31). Foram encontradas diferenças significativas entre o número de parasitos internalizados de *T. rangeli* selvagem e *T. rangeli*-GFP ( $p < 0,01$ ), bem como para *T. rangeli*-gp82 ( $p < 0,05$ ) quando comparados ao número de parasitos internalizados de *T. cruzi*. No T42, notamos que há um número muito maior de parasitos internalizados de *T. cruzi* quando comparado as demais cepas de *T. rangeli* (*T. rangeli*-gp82, *T. rangeli*-GFP e *T. rangeli* selvagem) (Figura 31).



**Figura 31.** Representação gráfica do número de parasitos internalizados/100 células resultante do ensaio de interação parasito-célula hospedeira. A linhagem celular utilizada foi THP1 (linhagem humana de origem monocítica, derivada de paciente com leucemia monocítica aguda - ATCC#TIB-202). Tempo: T0 (após as três horas de interação), T4/T18 e T42 (a partir de T0). *Trypanosoma rangeli* selvagem: *T. rangeli* cepa Choachí. *Trypanosoma cruzi*: *T. cruzi* cepa Y. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando analisadas através da análise de variância (ANOVA) dois fatores (two-way) seguida do teste “post-hoc” de Bonferroni ( $p < 0,05$ ). \*\*  $p < 0,01$ . \*\*\*  $p < 0,001$ .

Na infecção celular com células Vero, o *T. cruzi* foi capaz de infectar um número maior de células do que as cepas de *T. rangeli* em todos os tempos analisados. Estes resultados diferem dos encontrados para as células THP-1, onde a porcentagem de células infectadas não difere estatisticamente entre o *T. cruzi* e as cepas de *T. rangeli* analisadas em todos os tempos.

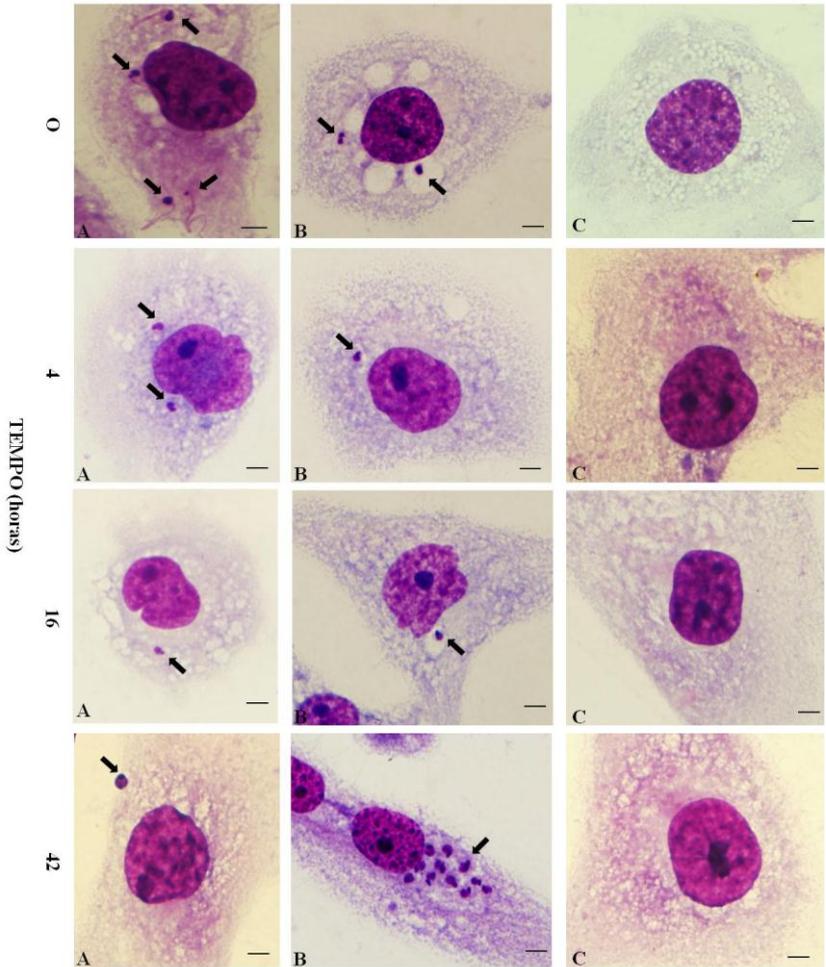
Tripomastigotas de *T. cruzi* utilizam dois modos distintos de invadir a célula hospedeira através do qual acessam o ambiente intracelular das células de mamíferos: uma rota dependente de lisossoma e uma rota independente de lisossoma (BURLEIGH, 2005; EPTING; COATES; ENGMAN, 2010). No primeiro caso, e reorganização dos microtúbulos, bem como a fusão dos lisossomos pré-formados com a membrana plasmática (SCHENKMAN et al., 1991; TARDIEX et al., 1992; TARDIEX; NATHANSON; ANDREWS, 1994; TYLER;

ENGMAN, 2001). A segunda rota envolve a invaginação mediada pela membrana plasmática e sinalizada por fosfoinositídeo 3 quinase mas é independente da polimerização de actina (WOOLSEY et al., 2003; ANDRADE. ANDREWS, 2005; BURLEIGH, 2005; EPTING; COATES; ENGMAN, 2010)

Em fagócitos profissionais (como os macrófagos), a ativação de proteínas tirosina quinase foi observada seguida do recrutamento de fosfoinositídeo 3 quinase e filamentos de actina (este processo tem sido associado com o mecanismo de fagocitose) no ponto de entrada do tripomastigota (VIEIRA et al., 2002), que mostra a fagocitose como principal mecanismo de entrada do *T. cruzi* em macrófagos.

Estas informações corroboram os resultados apresentados anteriormente. No caso da interação da forma tripomastigota com macrófagos, a maior parte dos parasitas é interiorizada via mecanismo do tipo fagocítico (DE SOUZA, 2000). Fato que ocorreu na interação dos parasitos com as células THP-1 e em virtude disto não há diferença na porcentagem de células infectadas entre o *T. cruzi* e as cepas de *T. rangeli* analisadas em todos os tempos. Já para as células Vero (linhagem não fagocítica) o parasito induz um aumento na concentração de cálcio intracelular ( $Ca^{2+}$ ) quando interage com a célula hospedeira, o que leva à polimerização da actina. Como a gp82 é uma glicoproteína muito importante para mobilização de cálcio intracelular, tanto no parasito quanto na célula hospedeira, é sabido que o *T. cruzi* infecta um número maior de células do que as cepas de *T. rangeli* (que não apresentam esta glicoproteína ativa).

A contagem do número de parasitos aderidos e internalizados e o cálculo da porcentagem de células infectadas ocorreu através da leitura do ensaio de interação com coloração pelo Panótico. Na Figura 32, vemos um exemplo do que foi encontrado para as cepas de *T. cruzi* e *T. rangeli*-gp82 nos quatro diferentes tempos. Como controle negativo, apresentamos também os resultados para as células THP-1 não infectadas. No T0, a seta aponta parasitos aderidos para *T. rangeli*-gp82 e internalizados para *T. cruzi*. Nos demais tempos, encontramos parasitos com formato arredondado na cepa *T. rangeli*-gp82. Já para *T. cruzi*, encontramos amastigotas no interior das células nos três últimos tempos. Sendo que no T42, já verificamos uma intensa multiplicação intracelular.

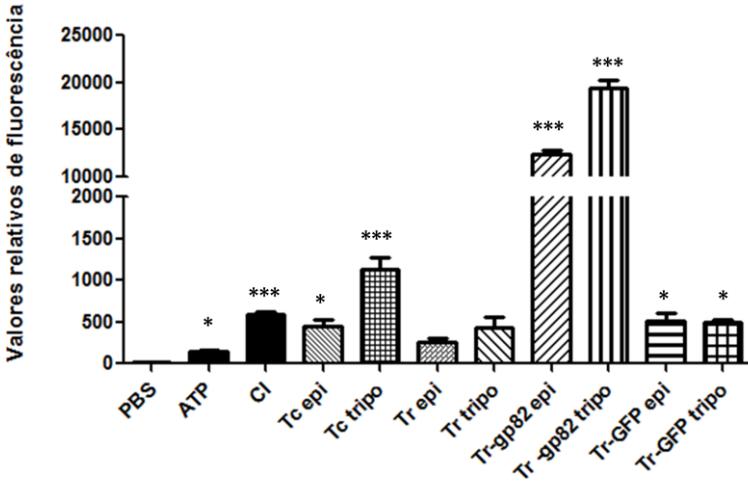


**Figura 32.** Ensaio de interação parasito-célula hospedeira através de coloração pelo Panótico. A linhagem celular utilizada foi THP-1. Tempo: T0 (após as três horas de interação), T4, T16 e T42, sendo que nestes três últimos, o número representa o número de horas de interação a partir de T0. A: *T. rangeli-gp82*. B: *T. cruzi* cepa Y. C: células THP-1 não infectadas. As setas representam as regiões onde observam-se parasitos. As barras em branco representam 10  $\mu\text{m}$ .

### 6.2.3 Avaliação da indução de mobilização de cálcio intracelular pela proteína gp82 expressa de forma heteróloga pelo *T. rangeli*

Inicialmente, com o intuito de verificar se o ensaio de mobilização de cálcio intracelular é efetivo utilizamos como controles positivos o *Calcium ionophorium* (CI) e o ATP a 1M que sabidamente mobilizam cálcio. CI é altamente seletivo para  $\text{Ca}^{2+}$  e é comumente utilizado para aumentar os níveis de  $\text{Ca}^{2+}$  em células intactas (MARTINA; KILIC; CHERUBINI, 1994; WANG et al., 1994). Em cultura celular, ele estimula a produção de óxido nítrico pela óxido nítrico sintase constitutiva dependente de calmodulina (KNOWLES; MONCADA, 1992). Ele também atua como um desacoplador da fosforilação oxidativa e um inibidor da atividade ATPase mitocondrial (REED; LARDY, 1972).

Verificamos uma diferença estatisticamente significativa nos valores relativos de fluorescência do CI ( $p < 0,001$ ) e do ATP ( $p < 0,05$ ) quando comparado ao controle negativo (PBS pH 7,2) (Figura 33). Posteriormente analisamos extratos solúveis de parasitos das diferentes cepas em suas formas epimastigota e tripomastigota. Um aumento significativo nos valores relativos de fluorescência que indica que há mobilização do fluxo de  $\text{Ca}^{2+}$  da célula hospedeira foi observado tanto nas formas epimastigotas quanto tripomastigotas das cepas *T. cruzi*, *T. rangeli*-gp82 e *T. rangeli*-GFP quando comparado ao controle negativo. A forma epimastigota de *T. cruzi* e as formas epimastigota e tripomastigota de *T. rangeli*-GFP apresentaram uma diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) quando comparada ao controle negativo, porém estas foram inferiores as diferenças observadas para as formas epimastigota e tripomastigota de *T. rangeli*-gp82 e a forma tripomastigota de *T. cruzi* ( $p < 0,001$ ).



**Figura 33.** Ensaio de mobilização de cálcio induzido pelo *T. rangeli* expressando a proteína heteróloga gp82. Resultados expressos em valores relativos de fluorescência. Controle negativo: PBS 1X. Controles positivos: ATP 1M e CI (do inglês *Calcium ionophorium* 5 $\mu$ M). Tc. epi: *T. cruzi* forma epimastigota. Tc. tripo: *T. cruzi* forma tripomastigota. Tr. epi: *T. rangeli* forma epimastigota. Tr. tripo: *T. rangeli* forma tripomastigota. Tr-gp82 epi: *T. rangeli*-gp82 forma epimastigota. Tr-gp82 tripo: *T. rangeli*-gp82 forma tripomastigota. Tr-GFP epi: *T. rangeli*-GFP forma epimastigota. Tr-GFP tripo: *T. rangeli*-GFP forma tripomastigota. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando analisadas através da análise de variância (ANOVA) unifatorial (one-way) ( $p < 0,05$ ) seguida do teste “post-hoc” de Tukey ( $p < 0,05$ ). \*  $p < 0,05$ . \*\*\*  $p < 0,001$ . Foram apresentadas apenas as diferenças estatisticamente significativas quando comparadas ao controle negativo.

A invasão celular é um passo essencial para o estabelecimento da infecção por agentes patogênicos intracelulares em hospedeiros suscetíveis. Evidências indicam que em muitos casos, a característica chave para o processo de invasão envolve a sinalização entre o patógeno e a célula hospedeira (CALER et al., 1998). O conhecimento da complexidade dos eventos iniciais da transdução de sinal desencadeado em células do hospedeiro mamífero pela interação patógeno-célula hospedeira vieram principalmente a partir de estudos com patógenos bacterianos entéricos (GALAN; BLISKA, 1996; FALKOW, 1997;

FINLAY; FALKOW, 1997). No entanto, muitos trabalhos indicam que a sinalização também desempenha um papel muito importante na interação de parasitos protozoários com suas células hospedeiras (MORENO et al., 1994; MING; EWEN; PEREIRA, 1995; SCHOFIELD; TACHADO, 1996; GAZZINELLI et al., 1997; BURLEIGH; ANDREWS, 1998).

Evidências indicam que um aumento na concentração intracelular de cálcio livre ( $\text{Ca}^{2+}$ ) na célula hospedeira é necessário para a invasão do *T. cruzi* mediada por lisosomos (TARDIEUX; NATHANSON; ANDREWS, 1994; RODRIGUEZ et al., 1995; RODRIGUEZ et al., 1997). A atividade de sinalização de  $\text{Ca}^{2+}$  estimulada pelas formas tripomastigotas de *T. cruzi* é solúvel e está ligada a atividade de uma serina hidrolase do parasito, a oligopeptidase B (BURLEIGH; ANDREWS, 1995; BURLEIGH et al., 1997). A inibição da atividade da oligopeptidase B em extratos de tripomastigotas solúveis utilizando inibidores de protease (BURLEIGH; ANDREWS, 1995) ou anticorpos específicos para a oligopeptidase B recombinante (BURLEIGH et al., 1997) resulta em inibição da atividade de sinalização de  $\text{Ca}^{2+}$ . A oligopeptidase B purificada sozinha é incapaz de desencadear aumento nas concentrações transitórias de  $\text{Ca}^{2+}$  nas células de mamíferos, indicando que há outros componentes adicionais do parasito necessários para reconstituir a atividade de sinalização de  $\text{Ca}^{2+}$  (CALER et al., 1998).

Durante a interação do *T. cruzi* com a célula hospedeira, uma elevação na concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  é induzida não somente pela célula hospedeira como também nos parasitos e isto também contribui para o processo de invasão do parasito (MORENO et al., 1994; YAKUBU; MAJUMDER; KIERSZENBAUM, 1994). A forma tripomastigota infectiva de *T. cruzi* provoca aumentos transitórios na concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  em uma variedade de células, e nenhum efeito é observado com os estágios epimastigotas não infectantes (MORENO et al., 1994; TARDIEUX; NATHANSON; ANDREWS, 1994; BURLEIGH; ANDREWS, 1995; DORTA et al., 1995). Porém, no presente trabalho, observamos uma diferença significativa nos valores relativos de fluorescência tanto na forma epimastigota quanto tripomastigota de *T. cruzi*. A forma epimastigota também foi capaz de mobilizar cálcio, porém em menor grau ao observado para a forma tripomastigota deste parasito. Estes resultados corroboram com o descrito por Mangue e colaboradores (2003). Eles verificaram um aumento na concentração intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  (em células HeLa) quando em contato com extratos epimastigotas de *T. cruzi* transfectados com um vetor contendo o gene

da gp82 similares aos observados para as formas tripomastigotas metacíclicas. O mesmo resultado não foi observado nas formas epimastigotas selvagens e nas formas epimastigotas transfectadas somente com o plasmídeo pTEX.

A gp82 está envolvida no processo de internalização do parasito na célula hospedeira (RAMIREZ et al., 1993; NEIRA et al., 2003) e este processo mobiliza cálcio na célula hospedeira. Os resultados encontrados para as formas epimastigota e tripomastigota de *T. rangeli*-gp82 corroboram com a informação acima. Tanto na forma epimastigota quanto na forma tripomastigota de *T. rangeli*-gp82 temos a expressão desta proteína que é essencial para o processo.

Observamos um aumento significativo nos valores relativos de fluorescência para as formas epimastigota e tripomastigota de *T. rangeli*-GFP, entretanto a explicação para este efeito precisa ser investigada.

### 6.3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com base nos resultados obtidos no presente capítulo, podemos concluir que:

- ✓ Os parasitos transfectados *T. rangeli*-gp82 e *T. rangeli*-GFP assim como a cepa selvagem foram capazes de penetrar em células Vero e em células THP-1 *in vitro*;
- ✓ A cepa *T. rangeli*-gp82 revelou ser mais infectiva para células Vero que as cepas *T. rangeli* selvagem e *T. rangeli*-GFP, o que mostra que a expressão da gp82 altera o padrão de interação do *T. rangeli* com células não fagocíticas;
- ✓ O número de parasitos internalizados no T0 e no T42 foi muito maior e estatisticamente significativo na cepa *T. cruzi* do que nas demais cepas analisadas na interação com células THP-1. No tempo 4 e 16 não foram encontradas diferenças significativas entre as cepas analisadas;
- ✓ O número de parasitos aderidos foi maior para cepa *T. rangeli*-gp82 com relação as demais cepas analisadas quando a interação ocorreu com células Vero. O mesmo não foi observado quando a interação ocorreu com células THP-1;
- ✓ Nenhuma das cepas de *T. rangeli* apresentou capacidade de multiplicação intracelular até 120 horas pós interação com células Vero e até 42 horas pós interação com células THP-1;
- ✓ Houve um aumento significativo na mobilização de  $\text{Ca}^{2+}$  nas células Vero induzida tanto pelas formas epimastigotas quanto tripomastigotas das cepas *T. cruzi*, *T. rangeli*-gp82 e *T. rangeli*-GFP quando comparado ao controle negativo.

## **7 CAPÍTULO IV**

Avaliação da infectividade e desenvolvimento do *T. rangeli* expressando a gp82 de *T. cruzi* em camundongos e em triatomíneos

## 7.1 MATERIAIS E MÉTODOS

### 7.1.1 Avaliação comparativa da infectividade e do desenvolvimento das linhagens *T. rangeli* em *R. prolixus*

Grupos de 60 ninfas de 4<sup>o</sup> e/ou 5<sup>o</sup> estágios de *R. prolixus* foram infectados por inoculação intracelômica de aproximadamente 10<sup>4</sup> formas epimastigotas de cultura de *T. rangeli*-gp82, *T. rangeli*- selvagem e *T. rangeli*-GFP. Todas as culturas de parasitos foram previamente lavadas com PBS pH 7,2 para retirada do G-418. Estes insetos foram mantidos em condições controladas de temperatura (27 ± 2°C) e umidade relativa do ar (60 ± 10%) e examinados para a presença de parasitos na hemolinfa e glândulas salivares.

A avaliação comparativa da infectividade para estes triatomíneos foi realizada, semanalmente, através da observação direta da hemolinfa e das glândulas salivares de cinco triatomíneos. Os insetos de cada grupo experimental foram sacrificados por decapitação e tiveram suas glândulas salivares dissecadas e a hemolinfa coletada para a preparação de esfregaços corados com Giemsa, visando a observação da presença e da morfologia dos parasitos.

### 7.1.2 Avaliação comparativa da infectividade e do desenvolvimento das linhagens *T. rangeli* em camundongos C57BL/6

Para estes ensaios, cinco grupos de seis/sete camundongos C57BL/6 de quatro a seis semanas de vida foram infectados por inoculação intraperitoneal de 5x10<sup>7</sup> tripomastigotas sanguíneos de *T. rangeli*-gp82, *T. rangeli* selvagem, *T. rangeli*-GFP ou com 1x10<sup>3</sup> tripomastigotas sanguíneos de *T. cruzi* ou não foram infectados, grupo controle (*naive*).

Todos os procedimentos foram realizados na 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 (Protocolo CEUA: PP00822).

O sangue destes camundongos foi obtido por punção da extremidade da cauda e analisado a fresco a cada 24 horas para pesquisa da presença de parasitos, sendo a curva de parasitemia determinada seguindo o método de Brener (1962).

O sangue dos camundongos positivos para *T. rangeli*-gp82 e *T. rangeli*-GFP foi também utilizado na preparação de esfregaços sanguíneos e corados pelo método de Giemsa para observação da morfologia dos parasitos.

O soro dos camundongos de cada grupo foi coletado 5 dias pós inoculação (d.p.i.) e 15 d.p.i. Aos quinze d.p.i., um camundongo dos grupos *T. rangeli* selvagem, *T. rangeli*-gp82 e controle foram sacrificados e foram coletados para ensaios posteriores o sangue e os seguintes órgãos: coração, fígado, baço, músculo esquelético, cérebro, tecido adiposo, glândula suprarenal, rim e linfonodos mesentéricos.

Após 70 d.p.i. um camundongo de cada grupo (*T. rangeli* selvagem, *T. rangeli*-gp82, *T. rangeli*-GFP, *T. cruzi* e controle) foi sacrificado e os órgãos coletados. Os cinco camundongos restantes em cada grupo apresentavam uma infecção prévia crônica e um ensaio desafio com o *T. cruzi* foi realizado. Este ensaio iniciou pela inoculação de  $10^5$  tripomastigotas sanguíneos da cepa Y de *T. cruzi* nos camundongos sadios e crônicos para a infecção por *T. rangeli* selvagem, *T. rangeli*-GFP, *T. rangeli*-gp82 e *T. cruzi* sendo a curva de parasitemia determinada como o anteriormente descrito. Neste ensaio, foi inserido um segundo grupo que não apresentava infecção prévia que foi desafiado com *T. cruzi* (*T. cruzi* controle), sendo mantido o grupo controle. O sangue dos camundongos de cada grupo foi coletado 5, 15 e 30 d.p.d. (dias pós desafio).

Trinta d.p.d., os camundongos de todos os grupos experimentais foram sacrificados por deslocamento cervical, sendo extraídos os mesmos órgãos supracitados para realização de exames histopatológicos e extração de ácidos nucleicos.

#### 7.1.2.1 Isolamento do DNA total

O sangue e/ou os fragmentos dos órgãos coletados e preservados em etanol a  $-20^{\circ}\text{C}$  foram macerados e ressuspensos em tampão de lise (10 mM Tris-HCl pH 7,4; 10 mM NaCl; 25 mM EDTA pH 8,0; 1% SDS - dodecil sulfato de sódio) e proteinase K 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (Sigma-Aldrich) por 12 horas a  $37^{\circ}\text{C}$ . O DNA foi então extraído pelo método de fenol/clorofórmio de acordo com Sambrook e Russell (2001) com algumas modificações.

#### 7.1.2.2 Dosagem do DNA

As amostras de DNA foram processadas conforme descrito no item 4.1.4.

#### 7.1.2.3 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

No intuito de detectar a presença do parasito no sangue e/ou nos fragmentos dos órgãos coletados, foram utilizados os iniciadores S35 (5'-AAATAATGTACGGGTGGAGATGCATGA-3') e S36 (5'-

GGGTTTCGATTGGGGTTGGTGT-3') dirigidos aos minicírculos de kDNA de *T. cruzi* e de *T. rangeli* (VALLEJO et al., 1999).

Além disso, para as amostras negativas na PCR com estes iniciadores, foram testados ainda os iniciadores D75 (5'-GCAGATCTTGGTTGGCGTAG-3') e D76 (5'-GGTTCTCTGTTGCCCTTTT-3') que são complementares às sequências flanqueadoras conservadas no domínio divergente D7a da subunidade maior do gene do RNA ribossomal - rDNA (SOUTO; VARGAS; ZINGALES, 1999).

Os iniciadores S35 e S36 foram utilizados em reações de PCR contendo o DNA a ser analisado em diluições 1:10 e 1:100, 10 pmol de cada um dos dois iniciadores, 200 µM de dNTP e 1 unidade de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen Life Technologies) em tampão fornecido pelo fabricante. As reações iniciaram-se com uma etapa de desnaturação do DNA a 94°C durante cinco min. Subsequentemente foram realizados 34 ciclos com as etapas de desnaturação (94°C por 1 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 estes passos realizados em um termociclador *Mastercycler Gradient* (Eppendorf).

Para a PCR com os iniciadores D75 e D76, a reação foi preparada como o acima descrito, adicionando-se 2,5 µg de BSA ao tampão fornecido pelo fabricante. As reações iniciaram-se com uma etapa de desnaturação do DNA a 94°C durante três min. Seguidos de quatro rodadas de três ciclos cada um: 94°C por um min, 60°C por um min e 72°C por um minuto; 94°C por um min, 58°C por um min e 72°C por um minuto; 94°C por um min, 56°C por um min e 72°C por um minuto; 94°C por um min, 54°C por um min e 72°C por um minuto. Subsequentemente foram realizados 35 ciclos com as etapas de desnaturação (94°C por 1 min), ligação dos iniciadores a sequência alvo (52°C por um min) e alongamento da cadeia de DNA pela polimerase (72°C por um min), sendo estes passos realizados em um termociclador *Mastercycler Gradient* (Eppendorf).

Todos os produtos de PCR obtidos com os iniciadores S35 e S36 foram resolvidos em géis de poliacrilamida 8% corados pelo brometo de etídio (1 µg/ml). Já os produtos gerados com os iniciadores D75 e D76 foram resolvidos em géis de agarose 2% corados pelo brometo de etídio (1 µg/ml).

#### 7.1.2.4 Histopatologia

A avaliação histopatológica foi realizada pelo Dr. Álvaro Menin. Para tal, fragmentos dos órgãos (coração, fígado, baço, músculo

esquelético, cérebro, tecido adiposo, glândula suprarrenal, rim e linfonodos mesentéricos) foram fixados em solução formalina 10% tamponada com PBS pH 7,4 por 72 horas. Após desidratação em etanol, as amostras foram embebidas e incluídas em parafina líquida a 64°C. Os tecidos parafinizados foram submetidos a cortes histológicos seriados de 4 µm, corados com hemotoxilina-eosina (H&E) e examinados em microscópio óptico, visando à pesquisa do número de células no processo inflamatório, a distribuição das mesmas (classificadas aqui como local, difuso ou multifocal); classificação semiquantitativa do processo inflamatório nos tecidos que foi realizada a partir da análise de 50 campos utilizando a leitura em objetiva de 100x. Foram considerados focos inflamatórios, agrupamento celulares com  $\geq 15$  leucócitos. A intensidade da inflamação foi definida com ausente (ausência de focos inflamatórios), leve ( $\leq 25$  focos) moderado (26-50 focos) e intenso ( $> 50$  focos).

### 7.1.3 Análise estatística

As médias obtidas no experimento foram analisadas pela análise de variância (ANOVA) unifatorial (one-way) seguida do teste “post-hoc” de Bonferroni. Estes foram utilizados para determinação de diferenças estatísticas entre os grupos e o nível de significância adotado foi  $p < 0,05$ . As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa GraphPad Prism 2007, versão 5.0 para Windows (MOTULSKY, 2007).

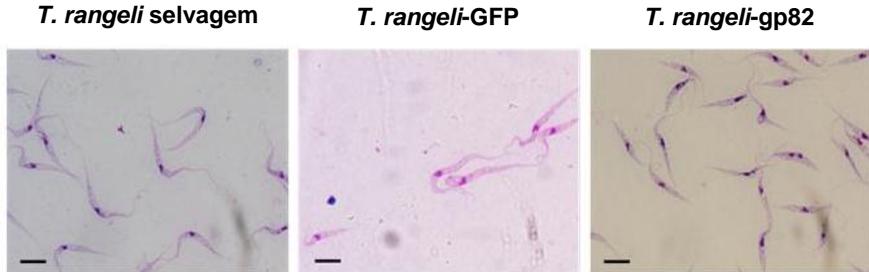
## 7.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 7.2.1 Avaliação comparativa da infectividade e do desenvolvimento das linhagens *T. rangeli* em *R. prolixus*

O *T. rangeli* se desenvolve no intestino dos triatomíneos, mas ao contrário do *T. cruzi*, pode invadir a hemocele, bem como as glândulas salivares, onde grande número de formas metacíclicas infectivas são formadas (D’ALESSANDRO, 1976; HECKER; SCHWARZENBACH; RUDIN, 1990).

Na tentativa de verificar a capacidade de manutenção do ciclo de vida das cepas transfectadas em hospedeiro invertebrado, ninfas de 4° e 5° estágio de *R. prolixus* foram infectadas intracelomicamente com uma suspensão dos parasitos. Uma semana pós-inoculação, a hemolinfa já estava densamente colonizada por formas epimastigotas de *T. rangeli* das três cepas analisadas (Figura 34). Após aproximadamente três semanas, já se encontravam tripomastigotas metacíclicos na glândula

salivar de *R. prolixus* infectado com *T. rangeli* selvagem bem como nos infectados com *T. rangeli*-gp82 (dados não mostrados). Para os infectados com *T. rangeli*-GFP, a infecção ocorreu na décima semana. Desta forma, os parasitos transfectados mantiveram a capacidade de evasão do trato intestinal, colonização da hemocele, invasão das glândulas salivares e diferenciação em tripomastigotas metacíclicas.



**Figura 34.** Infecção de *Rhodnius prolixus* com diferentes cepas do *Trypanosoma rangeli* (corado com Giemsa). Imagem da hemolinfa de triatomíneos infectados com as cepas *T. rangeli* selvagem (cepa Choachí), *T. rangeli*-GFP e *T. rangeli*-gp82, em forma epimastigota típica. A barra em preto representa 10  $\mu\text{m}$ .

### 7.2.2 Avaliação comparativa da infectividade e do desenvolvimento das linhagens de *T. rangeli* em camundongos C57BL/6

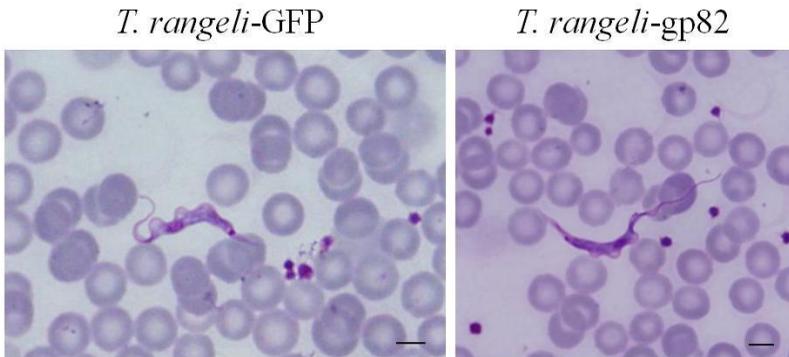
Após a inoculação dos animais com as formas tripomastigotas de cultura de *T. rangeli*-GFP, *T. rangeli*-gp82, *T. rangeli* selvagem e *T. cruzi*, a parasitemia foi monitorada diariamente. No dia seguinte a inoculação, foram observados tripomastigotas de todas as cepas de *T. rangeli* na corrente sanguínea de animais C57BL/6 infectados (Figura 35). O mesmo havia sido observado para camundongos BALB/c (dados não mostrados). O pico da parasitemia foi atingido 5 d.p.i. ( $8,5 \times 10^5$  tripomastigotas/ml de sangue para *T. rangeli*-GFP,  $1,7 \times 10^6$  para *T. rangeli*-gp82 e  $3,9 \times 10^5$  tripomastigotas/ml de sangue para *T. rangeli* selvagem), não sendo mais detectados parasitos 11 d.p.i. (Figura 36 A). Não é possível inferir se ocorre multiplicação do *T. rangeli* nestes animais, uma vez que o número de parasitos no inóculo inicial foi superior ao observado no pico de parasitemia. Com relação as cepas de *T. rangeli* transfectadas e selvagens, foi observado uma diferença estatisticamente significativa entre o número de tripomastigotas/ml de sangue encontrado para a cepa *T. rangeli*-gp82 com relação a cepa *T.*

*rangeli* selvagem ( $p < 0.001$ ) e *T. rangeli*-GFP ( $p < 0.01$ ).

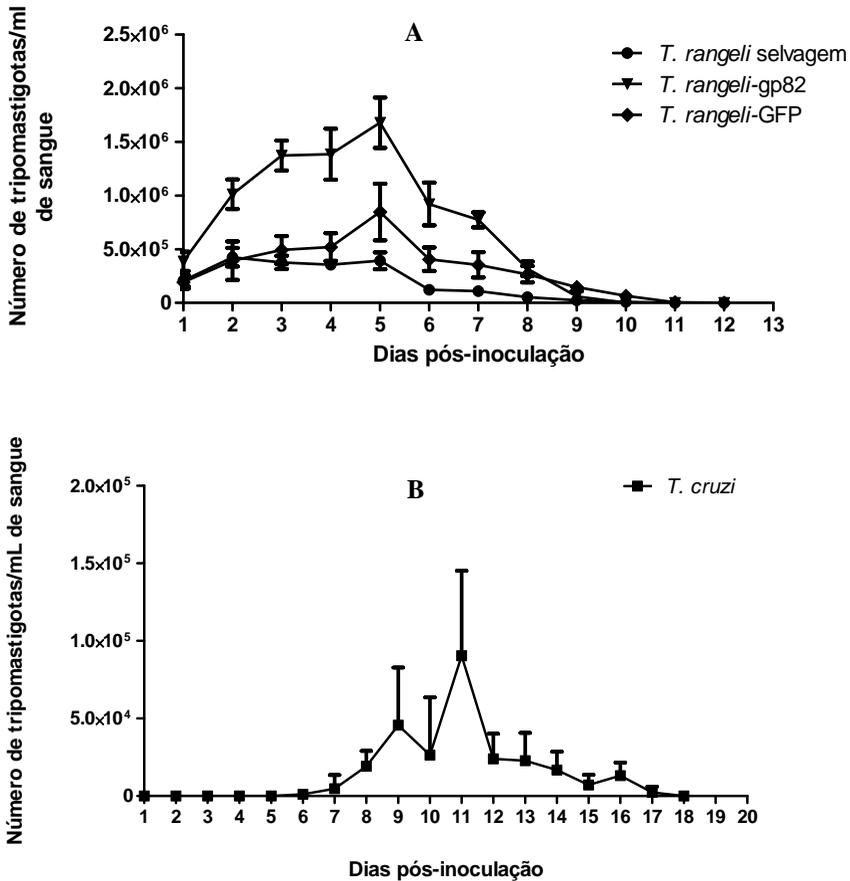
Como pode ser observado no pico parasitêmico, o *T. rangeli*-gp82 apresentou um número de parasitos tripomastigotas/ml superior as demais cepas de *T. rangeli*. Uma das possíveis causas é a subestimação da quantidade de parasitos utilizada no inóculo inicial.

Grisard, Romanha e Steindel (2011) descreveram que em modelo murino, por volta de 24 horas após a infecção, tripomastigotas de *T. rangeli* já podem ser visualizados na corrente sanguínea do mamífero. Embora variável conforme a cepa do parasito, em média, na primeira semana de infecção, observa-se um discreto aumento no número de parasitos circulantes atingindo o pico de máxima parasitemia no 5º dia pós-infecção e a partir da segunda semana o número de tripomastigotas vai decrescendo e, usualmente após o 15º dia de infecção, a parasitemia torna-se subpatente.

Em animais infectados com *T. cruzi* (Figura 36 B), parasitos só foram detectados a partir do sexto d.p.i.. A cinética parasitêmica destes animais revelou dois picos distintos, sendo o primeiro atingido no 9º ( $4,6 \times 10^4$  tripomastigotas/ml de sangue) e o segundo e mais expressivo no 11º ( $8,2 \times 10^4$  tripomastigotas/ml de sangue) d.p.i. Através desta parasitemia, também foi possível detectar a proliferação de *T. cruzi*, uma vez que nestes animais foram detectados 82 vezes mais parasitos do que no inóculo inicial.



**Figura 35.** Microfotografia da forma tripomastigota sanguínea do *Trypanosoma rangeli*-gp82 e *T. rangeli*-GFP em sangue de camundongos experimentalmente infectados (corado por Giemsa). As barras em preto representam 10  $\mu\text{m}$ .



**Figura 36.** Cinética parasitêmica da infecção de *Trypanosoma rangeli* ou *Trypanosoma cruzi* em camundongos C57BL/6. **A)** Camundongos inoculados intraperitonealmente com  $5 \times 10^7$  tripomastigotas sanguíneos das cepas *T. rangeli* selvagem (cepa Choachí), *T. rangeli*-gp82 e *T. rangeli*-GFP ou **B)**  $1 \times 10^3$  tripomastigotas de *T. cruzi* cepa Y. Os valores correspondem à média de parasitemia de seis animais. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando analisadas através da análise de variância (ANOVA) unifatorial (one-way) ( $p < 0,05$ ).

Estudos clínicos indicam que a infecção por *T. cruzi* resulta em um estado de resistência do hospedeiro que controla a carga parasitária depois de um a três meses. Os níveis de parasitemia são altos durante as

primeiras semanas de infecção mas diminuem depois a níveis quase indetectáveis, como indicado pelas detecções parasitárias utilizando sangue fresco, hemoculturas, xenodiagnóstico ou PCR (PARODI; PADILLA; BASOMBRI, 2009).

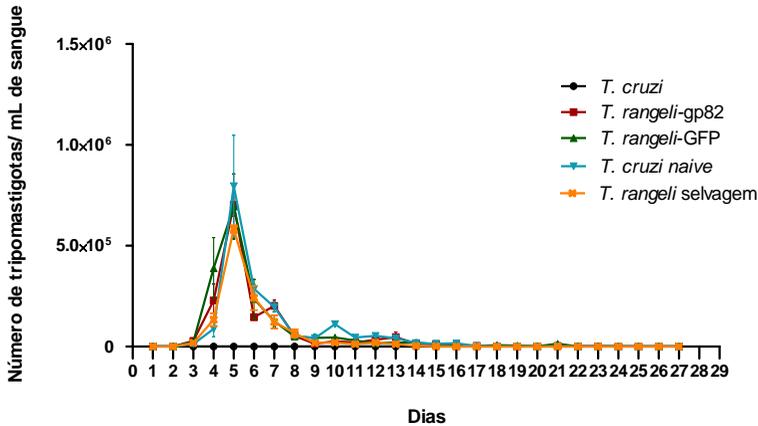
### **7.2.3 Avaliação comparativa da infectividade e do desenvolvimento das linhagens *T. rangeli* em camundongos C57BL/6 cronicamente infectados desafiados com *T. cruzi***

Os camundongos de todos os grupos cronicamente infectados e desafiados com *T. cruzi* foram utilizados para a determinação da cinética parasitária (Figura 37). Além disso, um novo grupo que não apresentava infecção prévia e foi inoculado com *T. cruzi* (*T. cruzi* controle).

Os parasitos foram detectados a partir de três d.p.i. em todos os animais pré-infectados com cepas de *T. rangeli* e no grupo *T. cruzi* controle. Nos animais pré-infectados com *T. cruzi* não foi detectado nenhum parasito ao longo dos 27 dias avaliados.

A cinética parasitêmica dos animais desafiados revelou um perfil de curva similar para todas as cepas. O pico parasitêmico principal ocorreu no 5º dia e os valores de parasitemia observados expressos como número de tripomastigotas/ml de sangue foi de:  $7,9 \times 10^5$  para *T. cruzi* controle,  $7,0 \times 10^5$  para *T. rangeli*-gp82,  $6,9 \times 10^5$  para *T. rangeli*-GFP e  $5,8 \times 10^5$  para *T. rangeli* selvagem. Os animais do grupo *T. cruzi* controle apresentaram um segundo pico, menos expressivo, no 10º dia ( $1,1 \times 10^5$  tripomastigotas/ml de sangue).

Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre o número de tripomastigotas/ml de sangue dos animais pré-infectados com as cepas de *T. rangeli* e no grupo *T. cruzi* controle.



**Figura 37.** Cinética parasitêmica do ensaio desafio de camundongos infectados cronicamente por diferentes cepas de *Trypanosoma rangeli* e *Trypanosoma cruzi*, foram inoculados com  $10^5$  tripomastigotas de cultura da cepa Y de *T. cruzi*. Os valores correspondem à média de parasitemia de cinco animais. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando analisadas através da análise de variância (ANOVA) unifatorial (one-way) ( $p < 0,05$ ).

Estes resultados são divergentes dos observados por Avila e Rojas (1990) e Introini, Basso e Moretti (1998). Estes autores relatam que quando camundongos BALB/c previamente infectados com formas epimastigotas fixadas de *T. rangeli* são desafiados com cepas de *T. cruzi*, a mortalidade diminui e a parasitemia é mais controlada sugerindo que o *T. rangeli* é capaz de induzir uma forte resposta imune específica controlando a multiplicação parasitêmica em indivíduos infectados.

Estudos prévios realizados por Marini e colaboradores (2011) revelaram que camundongos imunizados com epimastigotas fixadas de *T. rangeli* cepa Colombiana 2378 apresentaram uma proteção substancial contra a infecção com *T. cruzi* cepa Tulahuen acompanhada por uma produção balanceada de citocinas Th1 e Th2. Entretanto, eles também demonstraram que camundongos BALB/c inoculados com diferentes adjuvantes e formas epimastigotas fixadas de *T. rangeli* cepa Colombiana 2378 apresentaram um curso similar de infecção e padrão de citocinas quando comparados a camundongos do grupo controle que foram inoculados somente com PBS. Os níveis de parasitemia nos camundongos vacinados foi significativamente reduzido quando comparado a carga parasitária dos animais não vacinados (MARINI et

al., 2011).

Basso e colaboradores (2007) imunizaram cães sem raça definida com epimastigotas fixados de *T. rangeli* e verificaram que ocorreu uma resposta imune humoral contra *T. cruzi* cepa Tulahuen nos cachorros. Isto foi associado com uma fase de parasitemia aguda mais curta e de baixa amplitude.

Segundo Basso, Moretti e Fretes (2008) a imunização de camundongos BALB/c com formas epimastigotas vivas ou fixadas de *T. rangeli* cepas SC-58 e Choachí é suficiente para proteger os camundongos contra a cepa virulenta Tulahuen. Eles enfatizam também que o nível de proteção nos camundongos depende do número de *T. rangeli* utilizado para imunização.

Apesar da característica não patogênica para o hospedeiro vertebrado, a infecção pelo *T. rangeli* induz uma resposta imune humoral que resulta em altos níveis de reatividade cruzada de anticorpos com o *T. cruzi*, devido a similaridade entre seus antígenos de superfície (GRISARD et al., 1999). Por outro lado, camundongos imunizados com epimastigotas fixados de *T. rangeli* tiveram parasitemias significativamente mais baixas e maior sobrevivência do que os controles quando infectados com tripomastigotas de *T. cruzi* (BASSO; MORETTI; VOTTERO-CIMA, 1991; INTROINI; BASSO; MORETTI, 1998).

Até o presente momento, não sabemos se a infecção com *T. rangeli* pode mudar o curso da infecção com *T. cruzi* em humanos. Isso não exclui a possibilidade que uma exposição ao *T. rangeli* possa eliciar uma resposta imune humoral e/ou celular que confira algum grau de proteção contra infecções subsequentes com *T. cruzi* (PALAU et al., 2003; CABALLERO et al., 2007).

Ressalta-se que todos os estudos realizados até o momento utilizaram formas epimastigotas fixadas ou vivas e nenhum destes utilizou formas tripomastigotas deste parasito que foi o objeto deste estudo. Wagner (2012) utilizou antissoros de camundongos infectados com *T. rangeli* ou com *T. cruzi* e verificou um forte reconhecimento de proteínas nas regiões entre 75-100 kDa da forma epimastigota de *T. cruzi* pelo antissoro heterólogo (antissoro de animais infectados com o *T. rangeli*). Além disso, um fraco reconhecimento de bandas de 25 a 40 kDa foi observado. Este padrão não foi observado quando ele utilizou proteínas solúveis da forma tripomastigota, apesar de haver um fraco reconhecimento de proteínas de aproximadamente 40, 47, 75, 120 e 150 kDa, demonstrando que o reconhecimento sorológico cruzado é menor quando utilizado antígenos da forma tripomastigota de *T. cruzi* em

ensaios.

### 7.2.3.1 PCR

No intuito de detectar a presença do *T. cruzi* e do *T. rangeli* no sangue e/ou nos fragmentos dos órgãos coletados dos camundongos que foram cronicamente infectados com *T. rangeli* e posteriormente desafiados com *T. cruzi*, utilizamos os iniciadores S35 e S36. De acordo com Vallejo e colaboradores (1999) é possível diferenciar a infecção única ou mista de *T. cruzi* e *T. rangeli* com estes iniciadores devido ao perfil de amplificação apresentado.

Foram analisados todos os órgãos e sangues coletados e os resultados encontram-se agrupados na Tabela 6. O *T. rangeli*-gp82 foi detectado 15 d.p.i. no coração, tecido adiposo e fígado do camundongo C57BL/6. Setenta d.p.i. só foi detectado na glândula suprarrenal. O *T. rangeli*-selvagem foi detectado apenas no cérebro 15 d.p.i. e nenhuma amostra foi positiva 70 d.p.i. *T. rangeli*-GFP apresentou-se positiva no tecido adiposo do camundongo 70 d.p.i. Não conseguimos detectar *T. cruzi* em nenhum dos órgãos/sangue analisados 70 d.p.i. Como esperado, nenhum camundongo controle foi positivo nos períodos analisados (Tabela 6).

Órgão/sangue	15 d.p.i.		70 d.p.i.				30 d.p.d.					
	<i>T. rangeli</i> -gp82	Native	<i>T. rangeli</i> selvagem	<i>T. rangeli</i> -gp82	<i>T. rangeli</i> -GFP	Native	<i>T. rangeli</i> selvagem 1	<i>T. rangeli</i> selvagem 2	<i>T. cruzi</i> 1	<i>T. cruzi</i> 2	<i>T. cruzi</i> native 1	<i>T. cruzi</i> native 2
Baço												
Linfonodo mesentérico							X	X	3L			
Rim						X						
Cérebro			Tr					X	Tc		Tc	
Músculo esquelético									Tc			
Coração							X		Tc			
Tecido adiposo	Tr			Tr				X				
Fígado	Tr						X	X			Tc	Tc
Glandula suprarrenal				Tr			X	X				Tc
Sangue							X	X				

**Tabela 6.** Representação esquemática dos resultados da detecção de *Trypanosoma rangeli* e *Trypanosoma cruzi* utilizando os iniciadores S35 e S36 nos camundongos C57BL/6 que foram cronicamente infectados com *T. rangeli* e desafiados com *T. cruzi*. d.p.i: dias pós inoculação intraperitoneal de  $5 \times 10^7$  tripomastigotas sanguíneos de *T. rangeli*. d.p.d: dias pós desafio com inoculação intraperitoneal de  $10^5$  tripomastigotas sanguíneos de *T. cruzi*. *T. rangeli* selvagem (cepa Choachi). *T. cruzi* cepa Y. Tr: amostra positiva para *T. rangeli*. Tc: amostra positiva para *T. cruzi*. X: representa os órgãos/sangue positivos onde não há certeza de infecção única ou mista.

Vallejo e colaboradores (1999) desenvolveram um trabalho onde detectaram tanto *T. cruzi* quanto *T. rangeli* em amostras de DNA da glândula salivar e das fezes de *R. prolixus* infectados com ambos os parasitos, porém apenas *T. cruzi* foi observado na ampola retal destes mesmos triatomíneos. Segundo os mesmos uma explicação para este fato é que os minicírculos de *T. cruzi* são muito mais abundantes do que os de *T. rangeli* e eles provavelmente competiram mais fortemente para o anelamento com os iniciadores S35 e S36.

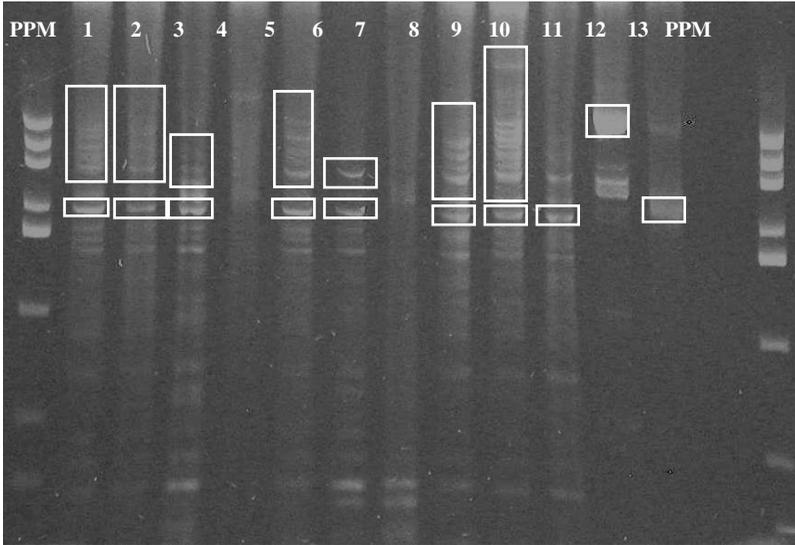
A fim de determinar se a capacidade de diferenciar os parasitos seria independente da cepa utilizada, eles analisaram os produtos dos minicírculos por PCR de seis cepas diferentes de *T. rangeli* isoladas de regiões geográficas distintas. Em todas as cepas analisadas o perfil de amplificação apresentou um “espaço livre” entre os fragmentos de DNA de 300 e 320 pb. Nos perfis de amplificação de infecções mistas, este espaço livre é coberto por uma forte banda de 330 pb derivada da amplificação do kDNA de *T. cruzi*, que, segundo eles, permite diferenciar infecções únicas de mistas (VALLEJO et al., 1999).

Além dos triatomíneos eles investigaram a possibilidade de diagnóstico espécie-específico de *T. cruzi* e *T. rangeli* no sangue de camundongos infectados com ambos os parasitos simultaneamente. Durante os primeiros sete dias de infecção, quando o *T. rangeli* foi mais abundante que o *T. cruzi*, uma banda de 760 pb foi detectada para o *T. rangeli*, mas depois esta banda desapareceu e somente uma banda de 330 pb característica de *T. cruzi* permaneceu. Nesta fase, eles justificam que embora o *T. cruzi* esteja presente desde o início da infecção, eles não foram capazes de detectar uma banda específica (330 pb) até o terceiro dia pós inoculação e que isto se deve, provavelmente, ao número maior de tripomastigotas de *T. rangeli* presentes no inóculo (VALLEJO et al., 1999).

Em virtude do exposto, decidimos analisar os órgãos/sangue obtidos 30 d.p.d.. Um dos resultados pode ser visualizado na Figura 38. Como pode ser observado, não temos como ter certeza de que se trata de uma infecção por *T. cruzi* ou *T. rangeli* ou ambos. Por isso, o resultado foi apresentado na Tabela 6 apenas como positivo.

Após o desafio, amostras positivas foram detectadas no linfonodo mesentérico, rim, coração, fígado, glândula suprarrenal e sangue nos camundongos infectados cronicamente com *T. rangeli*-gp82 e desafiados com *T. cruzi*. Nos camundongos infectados com *T. rangeli*-GFP e desafiados com *T. cruzi*, amostras positivas foram detectadas no linfonodo mesentérico, músculo esquelético, coração, glândula suprarrenal e sangue. Para *T. rangeli* selvagem, tivemos amostras

positivas no cérebro, coração, tecido adiposo, fígado e glândula suprarenal. Para *T. cruzi*, apenas linfonodo mesentérico, músculo esquelético e coração foram positivos (Tabela 6).



**Figura 38.** Eletroforese em gel de poliacrilamida 8% corado pelo brometo de etídio mostrando os produtos de amplificação utilizando os iniciadores S35 e S36. PPM: Padrão de Peso Molecular (pUC18/*Hae*III). 1 a 10: órgãos ou sangue coletados 30 dias após o desafio. 1: gp82 1 rim. 2: gp82 1 coração. 3: gp82 1 fígado. 4: gp82 1 sangue. 5: gp82 2 linfonodo. 6: *T. cruzi* 1 coração. 7: gp82 2 fígado. 8: gp82 2 glândula suprarenal. 9: *T. cruzi* 1 linfonodo. 10: *T. cruzi* 1 músculo. 11: amostra positiva referente a cepa Choachí de *T. rangeli*. 12: amostra positiva referente a cepa Y de *T. cruzi*. 13: controle negativo (sem adição de DNA).

Deteção para *T. cruzi* foi verificada no músculo esquelético, fígado e glândula suprarenal dos camundongos C57BL/6 infectados com *T. cruzi* (*T. cruzi* *naive*) (Tabela 6).

Como já exposto não conseguimos diferenciar a infecção por *T. cruzi* e/ou *T. rangeli* nos animais desafiados. Uma das possíveis causas está no fato que Vallejo e colaboradores (1999) quando analisaram seis diferentes cepas de *T. rangeli* não incluíram a cepa Choachí. Talvez esta apresente um perfil diferenciado das demais. Outro ponto a ser levantado é que neste mesmo trabalho, nos camundongos infectados

simultaneamente com os dois parasitos, inicialmente só observou-se detecção de *T. rangeli* e posteriormente somente de *T. cruzi*.

As amostras analisadas que foram negativas com os iniciadores S35 e S36 foram testadas para os iniciadores D75 e D76. Os resultados encontrados estão apresentados na Tabela 7.

Órgão/sangue	15 d.p.i.				70 d.p.i.				30 d.p.d.												
	<i>T. rangeli</i> -gp82	Native	<i>T. rangeli</i> -selvagem	<i>T. rangeli</i> -gp82	<i>T. rangeli</i> -GFP	Native	<i>T. rangeli</i> -selvagem	<i>T. cruzi</i>	<i>T. rangeli</i> -gp82 1	<i>T. rangeli</i> -gp82 2	<i>T. rangeli</i> -GFP 1	<i>T. rangeli</i> -GFP2	Native 1	Native 2	<i>T. rangeli</i> -selvagem 1	<i>T. rangeli</i> -selvagem 2	<i>T. cruzi</i> 1	<i>T. cruzi</i> 2	<i>T. cruzi</i> native 1	<i>T. cruzi</i> native 2	
Baço								X										Tc			
Linfonodo mesentérico								X													
Rim																					
Cérebro																					
Músculo esquelético																			Tc		
Coração																					
Tecido adiposo								X								X					
Fígado																			Tc		
Glândula suprarrenal								X											Tc		
Sangue																X					

**Tabela 7.** Representação esquemática dos resultados da detecção de *Trypanosoma rangeli* e *Trypanosoma cruzi* utilizando os iniciadores D75 e D76 nos camundongos C57BL/6 que foram cronicamente infectados com *T. rangeli* e desafiados com *T. cruzi*. d.p.i.: dias pós inoculação intraperitoneal de  $5 \times 10^7$  tripomastigotas sanguíneos de *T. rangeli*. d.p.d.: dias pós desafio com inoculação intraperitoneal de  $10^5$  tripomastigotas sanguíneos de *T. cruzi*. *T. rangeli* selvagem (cepa Choachi). *T. cruzi* cepa Y: amostra positiva para *T. cruzi*. X: representa os órgãos/sangue positivos.

Órgão/sangue	15 d.p.i.		70 d.p.i.				30 d.p.d.												
	<i>T. rangeli</i> -gp82	Nave	<i>T. rangeli</i> -gp82	<i>T. rangeli</i> -GFP	Nave	<i>T. rangeli</i> selvagem	<i>T. cruzi</i>	<i>T. rangeli</i> -gp82 1	<i>T. rangeli</i> -gp82 2	<i>T. rangeli</i> -GFP 1	<i>T. rangeli</i> -GFP 2	Nave 1	Nave 2	<i>T. rangeli</i> selvagem 1	<i>T. rangeli</i> selvagem 2	<i>T. cruzi</i> 1	<i>T. cruzi</i> 2	<i>T. cruzi</i> nave 1	<i>T. cruzi</i> nave 2
Baço							X	X	X							Tc			
Linfonodo mesentérico							X	X	X	X						Tc			
Rim							X												
Cérebro			Tr											X					
Músculo esquelético									X							Tc	Tc		
Coração	Tr						X	X		X					X	Tc			
Tecido adiposo	Tr			Tr			X	X						X	X	Tc			
Fígado	Tr						X	X							X			Tc	Tc
Glândula suprarrenal			Tr				X	X		X					X	Tc	Tc		
Sangue							X	X		X					X				

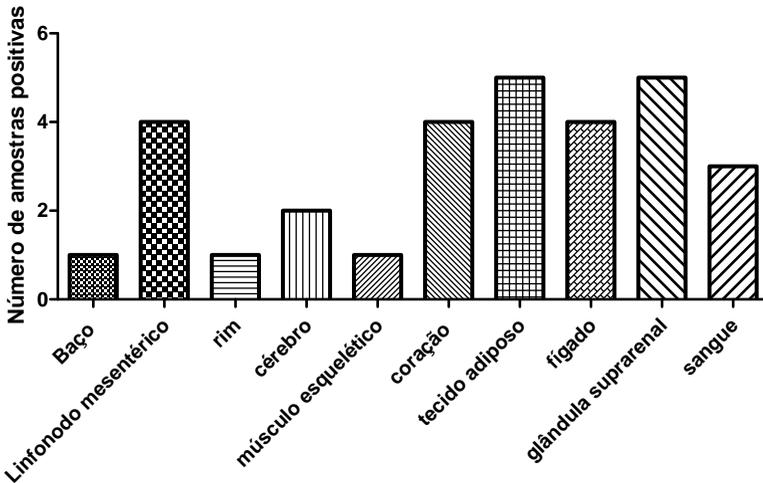
**Tabela 8.** Representação esquemática dos resultados da detecção de *Trypanosoma rangeli* e *Trypanosoma cruzi* utilizando os iniciadores S35/S36 e D75/D76 nos camundongos C57BL/6 que foram cronicamente infectados com *T. rangeli* e desafiados com *T. cruzi*. d.p.i: dias pós inoculação intraperitoneal de  $5 \times 10^7$  tripomastigotas sanguíneos de *T. rangeli*. d.p.d: dias pós desafio com inoculação intraperitoneal de  $10^5$  tripomastigotas sanguíneos de *T. cruzi*. *T. rangeli* selvagem (cepa Choachf). *T. cruzi* cepa Y. Tr: amostra positiva para *T. rangeli*. Tc: amostra positiva para *T. cruzi*. X: representa os órgãos/sangue positivos onde não há certeza de infecção única ou mista.

Após o desafio, amostras positivas foram detectadas no baço, linfonodo mesentérico, tecido adiposo e glândula suprarenal nos camundongos infectados cronicamente com *T. rangeli*-gp82 e desafiados com *T. cruzi*. Nos camundongos infectados com *T. rangeli* selvagem e desafiados com *T. cruzi*, amostras positivas foram detectadas no tecido adiposo e sangue. Para *T. cruzi*, baço, músculo esquelético, fígado e glândula suprarenal foram positivos (Tabela 7).

Souto, Vargas e Zingales (1999) analisaram 14 cepas de *T. rangeli* oriundas da América Central e América do Sul obtidas de humanos, triatomíneos e mamíferos silvestres e após amplificação com os iniciadores D75 e D76, estas originaram fragmentos de DNA de 239 pb. Para a cepa Y de *T. cruzi*, a amplificação com estes iniciadores gera um fragmento de DNA de 265 pb. Nas nossas análises, não foi possível ter certeza se tínhamos infecção única ou mista em virtude do tamanho dos fragmentos gerados pois notamos a presença de três bandas nas amostras de 30 d.p.d. (dados não mostrados).

Na Tabela 8 apresentamos os resultados de diagnóstico com ambos os iniciadores.

Na Figura 39, podemos visualizar de maneira geral o número de amostras positivas apenas nas cepas de *T. rangeli* (transfectados e selvagem) para os diferentes órgãos/sangue em todos os tempos analisados. Para a glândula suprarenal e o tecido adiposo obtivemos quatro amostras positivas, seguidas posteriormente pelo linfonodo mesentérico, coração e fígado e tecido adiposo com três amostras positivas.



**Figura 39.** Representação qualitativa das amostras positivas tanto para *Trypanosoma rangeli* quanto *Trypanosoma cruzi* utilizando os iniciadores S35/S36 e D75/D76 nos camundongos C57BL/6 que foram cronicamente infectados com *T. rangeli* e desafiados com *T. cruzi*. O número de amostras positivas foi separado de acordo com os órgãos/sangue nele encontrado considerando todos os tempos analisados (15 dias pós inoculação (d.p.i. ), 60 d.p.i. e 30 dias pós desafio).

Considerando todos os pontos observados da detecção da infecção por *T. rangeli* e/ou *T. cruzi* e sabendo que a metodologia de PCR em tempo real é muito mais sensível e específica, decidimos desenhar iniciadores específicos para o diagnóstico de *T. cruzi* e *T. rangeli*. Este experimento encontra-se em andamento e em virtude disso, não foi inserido nesta tese.

### 7.2.3.2 Histopatologia

Cortes histológicos de diferentes órgãos foram analisados, sendo as alterações histomorfológicas mais representativas descritas na Tabela 9.

Cepa	Avaliação histológica do tecido	Característica do infiltrado
<i>T. rangeli</i> selvagem 15 d.p.i.	Músculo esquelético: degeneração individual de fibras musculares e edema leve.	Ausente
<i>T. rangeli-gp82</i> 70 d.p.i.	Coração: degeneração individual de fibras musculares leve e pericardite	Multifocal
	Fígado: infiltrado inflamatório mononuclear perivascular.	Multifocal
	Músculo esquelético: degeneração individual de fibras musculares leve.	Ausente
	Cérebro: gliose focal leve	Multifocal
<i>T. cruzi</i> 70 d.p.i.	Coração: pericardite	Difuso
	Fígado: infiltrado inflamatório mononuclear multifocal	Multifocal
<i>T. rangeli-gp82</i> Camundongo1 30 d.p.d.	Músculo esquelético: degeneração individual de fibras. Infiltrado inflamatório mononuclear multifocal.	Multifocal
	Cérebro: infiltrado inflamatório mononuclear perivascular.	Multifocal
<i>T. rangeli-gp82</i> Camundongo 2 30 d.p.d.	Coração: infiltrado inflamatório mononuclear multifocal.	Multifocal
	Fígado: infiltrado inflamatório mononuclear multifocal.	Multifocal
	Músculo esquelético: degeneração individual de fibras. Infiltrado inflamatório mononuclear multifocal.	Multifocal
	Cérebro: infiltrado inflamatório mononuclear perivascular e meningite.	Multifocal
<i>T. rangeli-GFP</i> Camundongo 1 30 d.p.d.	Coração: infiltrado inflamatório mononuclear multifocal com tendência perivascular.	Multifocal
	Fígado: infiltrado inflamatório mononuclear multifocal com tendência perivascular.	Multifocal
	Músculo esquelético: infiltrado inflamatório mononuclear multifocal com tendência perivascular.	Multifocal
<i>T. rangeli-GFP</i> Camundongo 2 30 d.p.d.	Coração: infiltrado inflamatório mononuclear multifocal.	Multifocal
	Fígado: infiltrado inflamatório mononuclear multifocal.	Multifocal
	Músculo esquelético: infiltrado inflamatório mononuclear multifocal.	Multifocal

**Tabela 9.** Análise histopatológica dos órgãos de camundongos C57BL/6 que foram cronicamente infectados com *T. rangeli* e desafiados com *T. cruzi*. d.p.i: dias pós inoculação. d.p.d: dias pós desafio.  
continua

Cepa	Avaliação histológica do tecido	Característica do infiltrado
<i>T. rangeli</i> selvagem Camundongo 1 30 d.p.d.	Fígado: infiltrado inflamatório mononuclear multifocal.	Multifocal
<i>T. rangeli</i> selvagem Camundongo 2 30 d.p.d.	Cérebro: infiltrado inflamatório mononuclear perivascular leve.	Local
	Fígado: infiltrado inflamatório mononuclear multifocal.	Multifocal
<i>T. cruzi</i> Camundongo 1 30 d.p.d.	Fígado: infiltrado inflamatório mononuclear multifocal.	Multifocal
<i>T. cruzi</i> Camundongo 2 30 d.p.d.	Coração: infiltrado inflamatório mononuclear multifocal extenso. Presença de áreas de fibrose.	Multifocal
	Fígado: infiltrado inflamatório mononuclear multifocal.	Multifocal
	Músculo esquelético: degeneração individual de fibras	Ausente
<i>T. cruzi</i> naïve Camundongo 1 30 d.p.d.	Coração: Fibrose focal. Infiltrado inflamatório mononuclear multifocal.	Multifocal
	Fígado: infiltrado inflamatório mononuclear multifocal.	Multifocal
	Músculo esquelético: Infiltrado inflamatório mononuclear multifocal.	Multifocal
	Cérebro: infiltrado inflamatório mononuclear perivascular. Formação de manguito.	Multifocal
<i>T. cruzi</i> naïve Camundongo 2 30 d.p.d.	Coração: infiltrado inflamatório mononuclear multifocal localizado principalmente no pericárdio	Multifocal
	Músculo esquelético: Infiltrado inflamatório mononuclear multifocal.	Multifocal
	Cérebro: gliose multifocal leve	Multifocal

**Tabela 9.** Análise histopatológica dos órgãos de camundongos C57BL/6 que foram cronicamente infectados com *T. rangeli* e desafiados com *T. cruzi*. d.p.i: dias pós inoculação. d.p.d: dias pós desafio. continuação

Quinze d.p.i. verificamos apenas alterações histopatológicas no camundongo infectado com *T. rangeli* selvagem no músculo esquelético. Resultado diferente foi observado nos camundongos infectados após setenta dias de inoculação. No músculo esquelético dos camundongos infectados com *T. rangeli*-gp82 observamos degeneração individual das fibras musculares (Tabela 9), o que também foi observado no coração (Figura 40). Além disso, no coração notamos uma pericardite associada (Figura 40). Está só foi notada também nos animais infectados com *T. cruzi*. Em ambos os grupos encontramos infiltrado inflamatório mononuclear no fígado (Figura 41). Porém nos camundongos infectados com *T. rangeli*-gp82 sua característica era perivascular e nos infectados com *T. cruzi* era multifocal.

Andrade (2000a) mostrou em um estudo histopatológico do miocárdio, infiltrados inflamatórios difusos e focais, constituídos por macrófagos, linfócitos e plasmócitos, cuja intensidade era variável de caso para caso. Mesmo na fase aguda da infecção, aparece no miocárdio, ao lado das lesões focais, um componente inflamatório difuso e denso. Não se trata simplesmente de confluência de lesões focais (ANDRADE, 2000b).

A resposta imune induzida pela infecção do *T. rangeli*-gp82 foi similar a observada na infecção pelo *T. cruzi*. Considerando que os demais grupos de *T. rangeli* (selvagem e transfectado com a GFP) não apresentaram este perfil de indução, acreditamos que a resposta deva-se a expressão da gp82 que única ou associada as demais sialidases presentes no *T. rangeli* provoque.

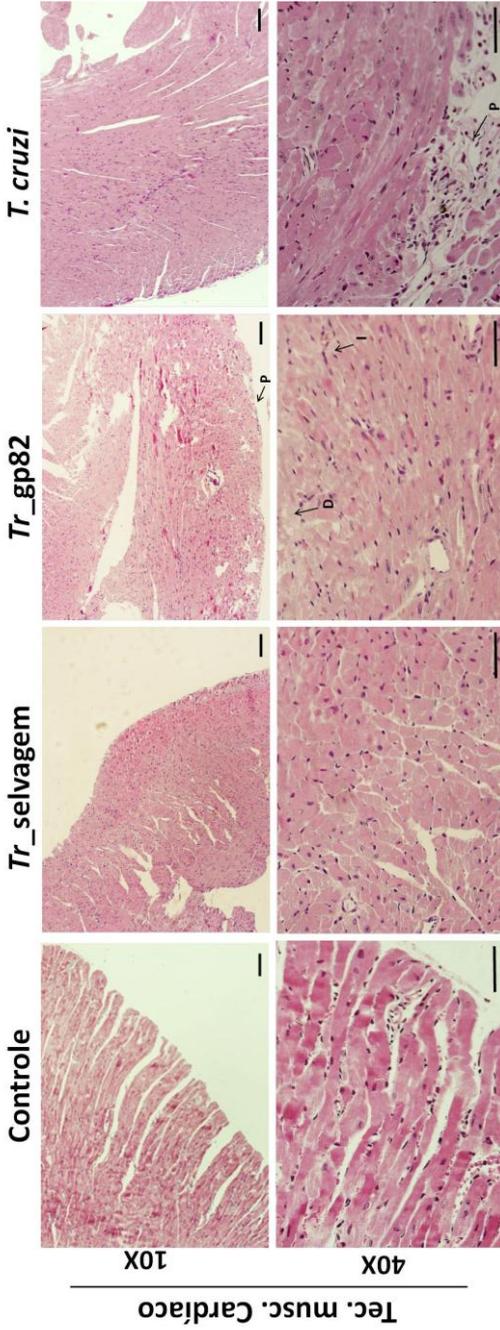
Diferente dos demais grupos analisados, no cérebro dos camundongos infectados com *T. rangeli*-gp82 notamos uma gliose focal leve (Figura 42).

Após o desafio com *T. cruzi*, verificamos alterações em todos os camundongos infectados em pelo menos um órgão (Tabela 9). Estas alterações só não foram vistas nos camundongos controle, o que já era esperado, tendo em vista que estes camundongos são o nosso controle. As alterações observadas notadamente devem-se a infecção pelo *T. cruzi*.

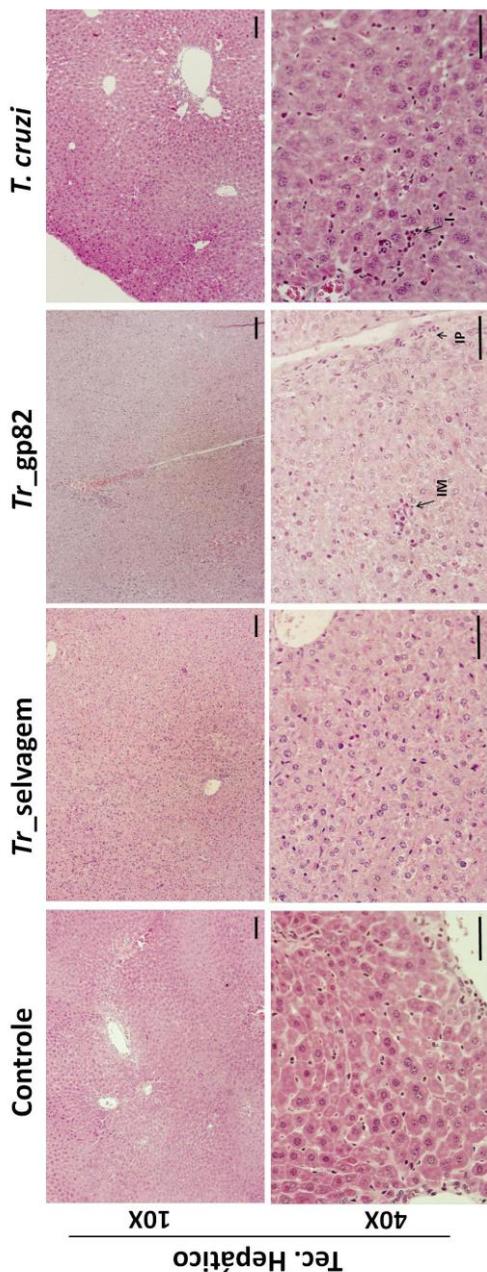
Sabe-se que as alterações parasito/hospedeiro, na infecção de vertebrados pelo *T. cruzi*, são caracterizadas pela multiplicação intracelular e evolução das fomas parasitárias, pelas alterações das células parasitadas e pela resposta imunológica, com o seu componente inflamatório (ANDRADE, 2000a).

A inflamação é o processo patológico básico da doença de Chagas. Ocorrem dois tipos de reação inflamatória associada com o *T.*

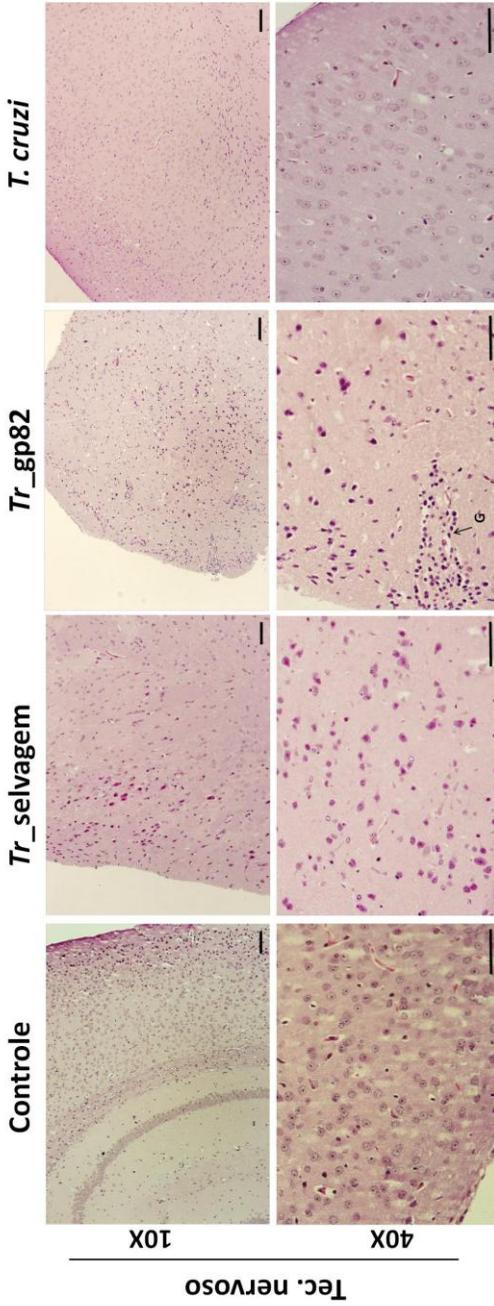
*cruzi*: uma reação focal, parasito-dependente, que surge onde quer que o parasita se multiplique e cause rotura da célula parasitada; e uma reação difusa, que ocorre apenas no miocárdio, durante as fases aguda e crônica (cardíaca) da infecção (ANDRADE, 2000b).



**Figura 40.** Análise histopatológica das seções do tecido muscular cardíaco de camundongos C57BL/6 setenta dias após infecção com *T. rangeli*-selvagem (Tr\_selvagem), *T. rangeli*-GFP, *T. rangeli*-gp82 (Tr\_gp82) e *T. cruzi*. As imagens dos tecidos de camundongos infectados com *T. rangeli*-GFP não foram mostradas por não apresentarem diferença em relação a *T. rangeli*-selvagem. Nas imagens identificadas com o aumento de 10X a barra preta representa 100 µm e nas imagens com 40X a barra preta representa 50 µm. Algumas alterações estão identificadas nas imagens por setas pretas, tais como: (I) Infiltrado inflamatório; (P) Pericardite e (D) Degeneração celular.



**Figura 41.** Análise histopatológica das seções do tecido hepático de camundongos C57BL/6 setenta dias após infecção com *T. rangeli-selvagem* (Tr\_selvagem), *T. rangeli-GFP*, *T. rangeli-gp82* (Tr\_gp82) e *T. cruzi*. As imagens dos tecidos de camundongos infectados com *T. rangeli-GFP* não foram mostradas por não apresentarem diferença em relação a *T. rangeli-selvagem*. Nas imagens identificadas com o aumento de 10X a barra preta representa 100 µm e nas imagens com 40X a barra preta representa 50 µm. Algumas alterações estão identificadas nas imagens por setas pretas, tais como: (I) Infiltrado inflamatório; (IP) Infiltrado inflamatório perivascular e (IM) Infiltrado inflamatório misto.



**Figura 42.** Análise histopatológica das secções do tecido nervoso de camundongos C57BL/6 setenta dias após infecção com *T. rangeli*-selvagem (Tr\_selvagem), *T. rangeli*-GFP, *T. rangeli*-gp82 (Tr\_gp82) e *T. cruzi*. As imagens dos tecidos de camundongos infectados com *T. rangeli*-GFP não foram mostradas por não apresentarem diferença em relação a *T. rangeli*-selvagem. Nas imagens identificadas com o aumento de 10X a barra preta representa 100 µm e nas imagens com 40X a barra preta representa 50 µm. Algumas alterações estão identificadas nas imagens por setas pretas, tais como: (G) Gliose mononuclear focal.

A depender da intensidade do parasitismo tissular, a reação que se forma em torno da célula parasitada pode se intensificar e confluir, atingindo áreas mais ou menos extensas, mas o seu caráter focal e a sua relação com a presença de parasitos persistem. A depender também do tropismo da cepa parasitária e da fase da infecção, a reação focal pode envolver preferencialmente tecidos ricos em macrófagos, fibras musculares esqueléticas, miocardiócitos, entre outros. Sabe-se que a reação focal pode ser destrutiva não só para as células parasitadas, mas também para células vizinhas não parasitadas. Ela se faz inicialmente à custa de células mononucleares, mas, logo, depois de uns poucos dias, amplia-se com a presença de polimorfonucleares neutrófilos e eosinófilos, bem como pela acentuação de congestão e edema (ANDRADE, 2000b).

A confluência das lesões focais pode ocorrer, dando por vezes a impressão de um processo difuso, mas a presença de parasitos intra- e extracelulares sempre é bem evidente. Esse aspecto é quase sempre visto nas infecções maciças, em material experimental, geralmente nos músculos esqueléticos. Passada a fase aguda, os parasitos tornam-se raros, mas, nos seus sítios de multiplicação em vários órgãos, a reação focal continua. Embora, nesses casos, nem sempre a presença dos parasitos possa ser demonstrada nas seções histopatológicas, presume-se que a inflamação focal derive também da rotura da célula parasitada. Essa inflamação se torna cada vez mais discreta, fazendo-se a custos de células mononucleares, como linfócitos, macrófagos e, por vezes, plasmócitos (ANDRADE, 2000b).

Foi considerado foco inflamatório infiltrados com 15 ou mais leucócitos. A avaliação ocorreu em 50 campos e a leitura em objetiva de 100x. O número de focos inflamatórios foi avaliado no fígado, coração e músculo esquelético e classificado semiquantitativamente como ausente (ausência de focos inflamatórios), discreto/leve ( $\leq 25$  focos), moderado (26-50 focos) e severo ( $> 50$  focos).

Um processo inflamatório discreto foi observado após 70 dias de infecção no fígado e coração dos camundongos infectados com *T. rangeli*-gp82 e apenas no fígado dos infectados com a forma selvagem. Já para os infectados com *T. cruzi*, o processo inflamatório foi leve no coração e músculo esquelético; porém foi severo no fígado (Tabela 10). Após o desafio com *T. cruzi*, os focos inflamatórios foram verificados em todos os camundongos desafiados (exceto nos controles) em menor ou maior grau conforme mostra a Tabela 10.

Não foi observada diferença nos focos inflamatórios entre os camundongos infectados com as cepas de *T. rangeli* e *T. cruzi* após o

desafio. Além disso, não foram identificados ninhos de amastigotas em nenhum dos animais infectados. Talvez isso deva-se ao baixo número de cortes realizado no ensaio.

		Número de focos inflamatórios										
Cepas	15 d.p.i.			70 d.p.i.			30 d.p.d.					
	Fígado	Coração	Músculo esquelético	Fígado	Coração	Músculo esquelético	Fígado	Coração	Músculo esquelético	Fígado	Coração	Músculo esquelético
<i>T. rangeli</i> - gp82	A	A	A	+	+	A	+	A	+	+	A	++
<i>T. rangeli</i> -GFP	NA	NA	NA	A	A	A	++	+	+	++	+	+++
<i>T. rangeli</i> selvagem	A	A	A	+	A	A	++	+	++	++	++	+++
<i>T. cruzi</i>	NA	NA	NA	+++	+	+	+++	+	+++	+++	+	++
<i>T. cruzi</i> controle	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	+	+	++

**Tabela 10.** Classificação semiquantitativa do processo inflamatório nos tecidos dos camundongos C57BL/6 que foram cronicamente infectados com *T. rangeli* e desafiados com *T. cruzi*. d.p.i: dias pós inoculação. d.p.d: dias pós desafio. NA: não se aplica. Ausente (ausência de focos inflamatórios-A), discreto/leve ( $\leq 25$  focos, +), moderado (26-50 focos, ++) e severo ( $> 50$  focos, +++).

### 7.3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com base nos resultados obtidos no presente capítulo, podemos concluir que:

- ✓ A cepa *T. rangeli*-gp82 apresentou desenvolvimento semelhante à cepa selvagem no triatomíneo vetor, sendo capaz de colonizar a hemolinfa e invadir as glândulas salivares de *R. prolixus* infectados por inoculação intracelômica;
- ✓ Foram observados tripomastigotas de todas as cepas de *T. rangeli* na corrente sanguínea de animais C57BL/6;
- ✓ Não foram observados sinais de proliferação das cepas de *T. rangeli* (transfectadas e selvagens) em camundongos C57BL/6;
- ✓ Foi observado uma diferença estatisticamente significativa entre o número de tripomastigotas/ml de sangue encontrado para a cepa *T. rangeli*-gp82 com relação as demais cepas de *T. rangeli* em camundongos C57BL/6;
- ✓ A cinética parasitêmica dos animais desafiados com *T. cruzi* revelou um perfil de curva similar para todas as cepas onde o pico parasitêmico principal ocorreu no 5º dia;
- ✓ Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre o número de tripomastigotas/ml de sangue encontrado entre as cepas de *T. rangeli* selvagem e transfectadas e a cepa *T. cruzi* controle nos camundongos C57BL/6 desafiados com *T. cruzi*;
- ✓ *T. rangeli*-gp82 foi detectado 15 d.p.i. no coração, tecido adiposo e fígado do camundongo C57BL/6. Setenta d.p.i., o mesmo só foi detectado na glândula suprarenal;
- ✓ Nos camundongos cronicamente infectados e desafiados com *T. cruzi*, amostras positivas foram detectadas no baço, linfonodo mesentérico, rim, coração, tecido adiposo, fígado, glândula suprarenal e sangue nos camundongos infectados com *T. rangeli*-gp82. Para *T. cruzi*, baço, linfonodo mesentérico, músculo esquelético, coração, fígado e glândula suprarenal foram positivos;
- ✓ Quinze d.p.i. verificamos apenas alterações histopatológicas nos camundongos infectados com *T. rangeli* selvagem. Já setenta d.p.i., alterações foram vistas apenas nos camundongos infectados com *T. rangeli*-gp82 e *T. cruzi*;
- ✓ Após o desafio com *T. cruzi*, verificamos alterações histopatológicas em todos os camundongos infectados em pelo menos um órgão;
- ✓ Processo inflamatório moderado foi observado em alguns órgãos dos camundongos infectados com *T. cruzi* 15 d.p.i.. Após 70 dias de infecção foi verificado um discreto processo inflamatório no fígado e

coração dos camundongos infectados com *T. rangeli*-gp82. Após o desafio com *T. cruzi*, focos inflamatórios foram verificados em todos os camundongos desafiados (exceto os controles) em menor ou maior grau;

- ✓ Verificamos que os camundongos cronicamente infectados com *T. rangeli* (selvagem e transfectados) e desafiados com *T. cruzi* provocaram um menor grau de processo infeccioso quando comparado aos infectados com *T. cruzi* e desafiados com os mesmos;
- ✓ Não observamos ninhos de amastigotas em nenhum dos animais infectados, talvez devido ao reduzido número de cortes utilizado no ensaio.

## 8. CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos na presente tese, podemos concluir que:

Foram identificadas oito ORFs similares as glicoproteínas do grupo II das TS de *T. cruzi* no genoma do *T. rangeli*, além de 85 sequências parciais e uma ORF completa. A análise dos genes das sialidas de *T. rangeli* corroborou que estes apresentam várias cópias gênicas.

A cepa *T. rangeli*-gp82 apresentou crescimento e padrão de diferenciação *in vitro* que não diferiu da cepa selvagem. A proteína gp82 é expressa de forma heteróloga tanto por formas epimastigotas quanto tripomastigotas de *T. rangeli*-gp82 sendo que a localização celular da gp82 em *T. rangeli*-gp82 está associada a superfície do parasito.

Os parasitos transfectados *T. rangeli*-gp82 foram capazes de penetrar em células Vero e em células THP-1 *in vitro*. A cepa *T. rangeli*-gp82 foi mais infectiva na interação com células Vero que as cepas *T. rangeli* selvagem e *T. rangeli*-GFP, o que mostra que a expressão da gp82 altera o padrão de interação do *T. rangeli* com células não fagocíticas. Diferente do observado para células THP-1, onde não houve diferença. Formas epimastigotas e tripomastigotas de *T. rangeli*-gp82 foram capazes de mobilizar  $\text{Ca}^{2+}$  nas células Vero.

A cepa *T. rangeli*-gp82 foi capaz de colonizar a hemolinfa e invadir as glândulas salivares de *R. prolixus* infectados por inoculação intracelômica. Em camundongos C57BL/6 não foram observados sinais de proliferação das cepas de *T. rangeli* (transfectadas e selvagens). A cinética parasitêmica dos animais desafiados com *T. cruzi* revelou um perfil de curva similar para todas as cepas.

Verificamos um processo inflamatório similar ao observado para *T. cruzi* 70 d.p.i. nos camundongos infectados com *T. rangeli*-gp82. Tanto camundongos infectados com *T. rangeli*-gp82 quanto *T. rangeli* selvagem não foram capazes de alterar o curso da infecção posterior pelo *T. cruzi*.

## APÊNDICE A – Atividades desenvolvidas durante o doutorado

### ➤ *Artigos publicados*

WILDNER, L. M.; BAZZO, M. L.; LIEDKE, S. C.; NOGUEIRA, C. L.; SEGAT, G.; SENNA, S. G.; **SCHLINDWEIN, A. D.**; OLIVEIRA, J. G.; ROVARIS, D. B.; BONJARDIM, C. A.; KROON, E. G.; FERREIRA, P. C. P. Mycobacteria mobility shift assay: a method for the rapid identification of Mycobacterium tuberculosis and nontuberculous mycobacteria. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* (Online), v. 109, p. 1-6, 2014.

MARINOTTI, O.; CERQUEIRA, G. C.; DE ALMEIDA, L. G.; FERRO, M. I.; LORETO, E. L.; ZAHA A.; TEIXEIRA, S. M.; WESPISER, A. R.; ALMEIDA E SILVA, A.; **SCHLINDWEIN, A. D.**; PACHECO, A. C.; SILVA, A. L.; GRAVELEY, B. R.; WALENZ, B. P.; LIMA, B. D. E. A.; RIBEIRO, C. A.; NUNES-SILVA, C. G.; DE CARVALHO, C. R.; SOARES, C. M.; DE MENEZES, C. B.; MATIOLLI, C.; CAFFREY, D.; ARAÚJO, D. A.; DE OLIVEIRA, D. M.; GOLENBOCK, D.; GRISARD, E. C.; FANTINATTI-GARBOGGINI, F.; DE CARVALHO, F. M.; BARCELLOS, F. G.; PROSDOCIMI, F.; MAY, G.; AZEVEDO JUNIOR, G. M.; GUIMARÃES, G. M.; GOLDMAN, G. H.; PADILHA, I. Q.; BATISTA, J. D. A. S.; FERRO, J. A.; RIBEIRO, J. M.; FIETTO, J. L.; DABBAS, K. M.; CERDEIRA, L.; AGNEZ-LIMA, L. F.; BROCCHI, M.; DE CARVALHO, M. O.; TEIXEIRA, M. D. E. M.; DINIZ MAIA, M. D. E. M.; GOLDMAN, M. H.; CRUZ SCHNEIDER, M. P.; FELIPE, M. S.; HUNGRIA, M.; NICOLÁS, M. F.; PEREIRA, M.; MONTES, M. A.; CANTÃO, M. E.; VINCENTZ, M.; RAFAEL, M. S.; SILVERMAN, N.; STOCO, P. H.; SOUZA, R. C.; VICENTINI, R.; GAZZINELLI, R. T.; NEVES, R. D. E. O.; SILVA, R.; ASTOLFI-FILHO, S.; MACIEL, T. E.; URMÉNYI, T. P.; TADEI, W. P.; CAMARGO, E. P.; DE VASCONCELOS, A.T. The Genome of *Anopheles darlingi*, the main neotropical malaria vector. **Nucleic Acids Research** (Online), v. 41, n. 15, p. 7387-7400, 2013.

WAGNER, G.; YAMANAKA, L. E.; MOURA, H.; LÜCKEMEYER, D. D.; **SCHLINDWEIN, A. D.**; STOCO, P. H.; FERREIRA, H. B.; BARR, J. R.; STEINDEL, M.; GRISARD, E. C. The *Trypanosoma rangeli* trypomastigote surfaceome reveals novel proteins and targets for specific diagnosis. **Journal of Proteomics**, v. 82, p. 52-63, 2013.

QUEIROGA, F. R.; MARQUES-SANTOS, L. F.; HÉGARET, H.; SOUDANT, P.; FARIAS, N. D.; **SCHLINDWEIN, A. D.**; SILVA, P. M. Immunological responses of the mangrove oysters *Crassostrea gasar* naturally infected by *Perkinsus* sp. in the Mamanguape Estuary, Paraíba state (Northeastern, Brazil). **Fish & Shellfish Immunology** (Print), v. 35, p. 319-327, 2013.

NAZARENO, A. G.; ANGELO, P. C. S.; MUSCHNER, V. C.; SANTOS, J.; **SCHLINDWEIN, A. D.**; REIS, M. S. Microsatellite markers designed for tree-fern species *Dicksonia sellowiana*. **Biologia Plantarum**, v. 57, p. 563-566, 2013.

GONÇALVES-SOARES, D.; SEIFFERT, W. Q.; **SCHLINDWEIN, A. D.**; TOLEDO-SILVA, G.; ZANETTE, J.; MARQUES, M. R. F.; BAINY, A.C. D. Identification of differentially transcribed genes in shrimp *Litopenaeus vannamei* exposed to osmotic stress and challenged with WSSV virus. **Comp. Biochem. Physiol. Part D Genomics Proteomics**, v. 7, n. 1, p. 73-81, 2012.

➤ *Trabalhos publicados em anais de eventos*

**SCHLINDWEIN, A. D.** ; COELHO, C. M. R. ; GRANUCCI, N. ; GRISARD, E. C.; STOCO, P. H. Estudo das sialidases de *Trypanosoma rangeli*: caracterização genômica e expressão heteróloga de uma transsialidase. In: XXIII Congresso Brasileiro de Parasitologia e III Encontro de Parasitologia do Mercosul, 2013.

COELHO, C. M. R.; GRANUCCI, N.; LÜCKEMEYER, D. D.; **SCHLINDWEIN, A. D.**; STOCO, P. H.; TYLER, K. M.; GRISARD, E. C. *Trypanosoma rangeli* is a model system for the functional complementation of trypanosome virulence. In: 50th British Society for Parasitology Spring Meeting and Trypanosomiasis & Leishmaniasis Seminar, 2012. p. 236-236.

WAGNER, G.; MOURA, H.; YAMANAKA, L. E.; LÜCKEMEYER, D. D.; **SCHLINDWEIN, A. D.**; CALDERON, I. R.; STOCO, P. H.; BARR, J. R.; GRISARD, E. C. Applying high-throughput proteomic analysis to determine differences between *Trypanosoma rangeli* and *Trypanosoma cruzi* surface proteins. In: 50th British Society for Parasitology Spring Meeting and Trypanosomiasis & Leishmaniasis Seminar, 2012. p. 237-237.

**SCHLINDWEIN, A. D.**; STOCO, P. H.; WAGNER, G.; GRISARD, E. C.. Comparative characterization of *Trypanosoma rangeli* gp82 and gp85 glycoprotein genes. In: XXVII Annual Meeting of the Brazilian Society of Protozoology/XXXVIII Annual Meeting on Basic Research in Chagas' Disease, 2011, Foz do Iguaçu-PR. XXVII. p. 104-104.

PINTO, A. R.; GRAF, T. ; PASSAES, C. P. B. ; BATTISTI NETO, A. ; STOCO, P. H.; **SCHLINDWEIN, A. D.**; MEIRELLES, I. A. K. ; FERREIRA, L. G. E. ; MORGADO, M. G.; BELLO, G. HIV-1 genetic diversity and drug resistance among treatment naive patients from Southern Brazil: an association of HIV-1 subtypes with exposure categories. In: 6th IAS Conference on HIV Pathogenesis, Treatment and prevention, 2011, Roma. IAS 2011.

TAVARES, K. C. S.; DUARTE, D. P.; LAZZAROTTO, C. R.; KOMATI, L. K. O.; ELY, C. S.; **SCHLINDWEIN, A. D.**; STOCO, P. H.; GRISARD, E. C.; MILETTI, L. C.. Identification of *Trypanosoma evansi* SELB and SELD genes. In: XXVI Annual Meeting of the Brazilian Society of Protozoology and XXXVII Annual Meeting on Basic Research in Chagas' Disease, 2010, Foz do Iguaçu. p. 116-116.

COELHO, C. M. R.; STEINDEL, M.; STOCO, P. H.; UGGIONI, K. D.; FERNANDES, M. T.; SINCERO, T. C. M.; Lückemeyer, D. D.; GOMES, R. P.; **SCHLINDWEIN, A. D.**; PRESTES, E. B.; GRISARD, E. C.. CARACTERIZAÇÃO INTRA E INTERESPECÍFICA DO GENE DA GLICOPROTEÍNA DE SUPERFÍCIE DE 82KDa (gp82) DE CEPAS DE *Trypanosoma rangeli* ISOLADAS DE DIFERENTES REGIÕES GEOGRÁFICAS. In: 19º Seminário de Iniciação Científica, 2009, Florianópolis. 2009.

UGGIONI, K. D.; STOCO, P. H.; SINCERO, T. C. M.; **SCHLINDWEIN, A. D.**; GRISARD, E. C. CARACTERIZAÇÃO INTRAESPECÍFICA DAS SIALIDASES DE CEPAS DE *Trypanosoma rangeli* ISOLADAS DE DIFERENTES REGIÕES GEOGRÁFICAS. In: 19º Seminário de Iniciação Científica, 2009, Florianópolis. 2009.

## REFERÊNCIAS

- ABUIN, G., et al. A surface antigen of *Trypanosoma cruzi* involved in cell invasion (Tc-85) is heterogeneous in expression and molecular constitution. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 35, n. 3, p. 229-237, jul. 1989.
- ACOSTA, L., et al. Trypanosomatid isolates from Honduras: differentiation between *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 44, n. 6, p. 676-683, jun. 1991.
- AFCHAIN, D. et al. A. Antigenic make-up of *Trypanosoma cruzi* culture forms: identification of a specific component. **J. Parasitol.**, v. v65, n. 4, p.507-514, aug. 1979.
- AGUSTI, R.; GIORGI, M. E.; LEDERKREMER, R. M. The trans-sialidase from *Trypanosoma cruzi* efficiently transfers alpha-(2→3)-linked N-glycolylneuraminic acid to terminal beta-galactosyl units. **Carbohydr. Res.**, v. 342, p. 2465–2469, 2007.
- AKSOY, S., et al. Spliced leader RNA sequences of *Trypanosoma rangeli* are organized within the 5S rRNA-encoding genes. **Gene**, v. 113, n. 2, p. 239-243, apr. 15 1992.
- ALCANTARA, A.; BRENER, Z. *Trypanosoma cruzi*: role of macrophage membrane components in the phagocytosis of bloodstream forms. **Exp. Parasitol.**, v. 50, p. 1-6, 1980.
- ALTSCHUL, S. F., et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Res.**, v. 25, n. 17, p. 3389-3402, sep. 1 1997.
- ANDRADE, S. G.. Patologia experimental da doença de chagas. In: BRENER, Z.; ANDRADE, Z. A.; BARRAL-NETO, M. ***Trypanosoma cruzi e doença de chagas***. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000a. p. 177-200.
- ANDRADE, Z. A.. Patologia da doença de chagas. In: BRENER, Z.; ANDRADE, Z. A.; BARRAL-NETO, M. ***Trypanosoma cruzi e doença de chagas***. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000b. p. 201-230.

ANDRADE, L. O.; ANDREWS, N. W. The *Trypanosoma cruzi*-host-cell interplay: location, invasion, retention. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 3, p. 819-823, 2005.

ANDREWS, N. W.; KATZIN, A. M.; COLLI, W. Mapping of surface glycoproteins of *Trypanosoma cruzi* by two-dimensional electrophoresis. A correlation with the cell invasion capacity. **Eur. J. Biochem.**, v. 140, n. 3, p. 599-604, may 2 1984.

ANDREWS, N. W. Lysosome recruitment during host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. **Trends Cell Biol.**, v. 5, p. 133-137, 1995.

AÑEZ, N.; VELANDIA, J.; RODRIGUEZ, A. M. *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920. VIII. Response to reinfections in 2 mammals. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 80, n. 2, p. 149-153, apr-jun. 1985.

AÑEZ-ROJAS, N., et al. *Trypanosoma rangeli* expresses a gene of the group II trans-sialidase superfamily. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 142, n. 1, p. 133-136, 2005.

ANTHONY, R. L.; CODY, T. S.; CONSTANTINE, N. T. Antigenic differentiation of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* by means of monoclonal-hybridoma antibodies. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 30, n. 6, p. 1192-1197, nov. 1981.

ARAYA, J. E., et al. Cloning and characterization of a gene for the stage-specific 82 kDa surface antigen of metacyclic trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 65, p. 161-169, 1994.

ATAYDE, V. D., et al. Expression and cellular localization of molecules of the gp82 family in *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigotes. **Infect. Immu.**, v.75, n. 7, p. 3264-3270, 2007.

ATWOOD, J. A., et al. The *Trypanosoma cruzi* proteome. **Science**, v. 309, p. 473-476, 2005.

AVILA, J. L.; ROJAS, M. Elevated cerebroside antibody levels in human visceral and cutaneous leishmaniasis, *Trypanosoma rangeli* infection and chronic Chagas disease. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 43, p. 52-60, 1990.

AVILA, A. R., et al. Cloning and characterization of the metacylogenin gene, which is specifically expressed during *Trypanosoma cruzi* metacylogenesis. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 117, p. 169–177, 2001.

AVILA, A. R., et al. Stage-specific gene expression during *Trypanosoma cruzi* metacylogenesis. **Genet. Mol. Res.**, v. 2, p. 159–168, 2003.

AZUAJE, F. J.; RAMIREZ, J. L.; DA SILVEIRA, J. F. *In silico*, biologically-inspired modelling of genomic variation generation in surface proteins of *Trypanosoma cruzi*. **Kinetoplastid Biol. Dis.**, v. 6, p. 6–17, 2007.

AZUAJE, F. J.; RAMIREZ, J. L.; DA SILVEIRA, J. F. An exploration of the genetic robustness landscape of surface protein families in the human protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*. **IEEE Trans. Nanobioscience**, v. 6, p. 223–228, 2007a.

BARNABE, C.; BRISSE, S.; TIBAYRENC, M. Phylogenetic diversity of bat trypanosomes of subgenus *Schizotrypanum* based on multilocus enzyme electrophoresis, random amplified polymorphic DNA, and cytochrome b nucleotide sequence analyses. **Infect. Genet. Evol.**, v. 2, n. 3, p. 201–208, feb. 2003.

BASSO, B.; MORETTI, E.; VOTTERO-CIMA, E. Immune response and *Trypanosoma cruzi* infection in *Trypanosoma rangeli* immunized mice. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 44, p. 413–419, 1991.

BASSO, B., et al. Vaccination with *Trypanosoma rangeli* reduces the infectiousness of dogs experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. **Vaccine**, v. 25, p. 3855–3858, 2007.

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**, vol 103, n. 4, p. 370–374, jun. 2008.

BELTRAME-BOTELHO, I. T., et al. Internal transcribed spacers (ITS) of *Trypanosoma rangeli* ribosomal DNA (rDNA): a useful marker for inter-specific differentiation. **Infect. Genet. Evol.**, v. 5, n. 1, p. 17–28, jan. 2005.

- BERRIMAN, M., et al. The genome of the African trypanosome *Trypanosoma brucei*. **Science**, v. 309, n. 5733, p. 416-422, jul 2005.
- BEUCHER, M.; NORRIS, K. A. Sequence diversity of the *Trypanosoma cruzi* complement regulatory protein family. **Infect. Immun.**, v. 76, p. 750–758, 2008.
- BONTEMPI, E. J., et al. The tyrosine aminotransferase from *Trypanosoma rangeli*: sequence and genomic characterization. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 189, n. 2, p. 253-257, aug. 15 2000.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem.**, v. 72, p. 248-254, may 1976.
- BRENER, Z. Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 4, p. 389-396, 1962.
- BRIONES, M. R., et al. Trans-sialidase genes expressed in mammalian forms of *Trypanosoma cruzi* evolved from ancestor genes expressed in insect forms of the parasite. **J. Mol. Evol.**, v. 41, p. 120–131, 1995.
- BURLEIGH, B.; ANDREWS, N. W. A 120 kDa alkaline peptidase from *Trypanosoma cruzi* is involved in the generation of a novel  $\text{Ca}^{2+}$ -signaling factor for mammalian cells. **J. Biol. Chem.**, v. 270, p. 5172–5180, 1995.
- BURLEIGH, B. A., et al. A cytosolic serine endopeptidase from *Trypanosoma cruzi* is required for the generation of  $\text{Ca}^{2+}$ -signaling in mammalian cells. **J. Cell Biol.**, v. 136, p. 609–620, 1997.
- BURLEIGH, B.; ANDREWS, N.W. Signaling and host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. **Curr. Opin. Microbiol.**, v. 1, p. 461–465, 1998.
- BURLEIGH, B. A. Host cell signaling and *Trypanosoma cruzi* invasion: do all roads lead to lysosomes? **Sci. STKE.**, v. 293, p. 36, 2005.
- BUSCHIAZZO, A., et al. Sequence of a *Trypanosoma rangeli* gene closely related to *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 62, n. 1, p. 115-116, nov. 1993.

- BUSCHIAZZO, A.; CAMPETELLA, O.; FRASCH, A. C. *Trypanosoma rangeli* sialidase: cloning, expression and similarity to *T. cruzi* trans-sialidase. **Glycobiology**, v. 7, n. 8, p. 1167-1173, dec. 1997.
- BUSCHIAZZO, A., et al. The crystal structure and mode of action of trans-sialidase, a key enzyme in *Trypanosoma cruzi* pathogenesis. **Mol. Cell.**, v. 10, n. 4, p. 757-768, oct. 2002.
- CABALLERO, Z. C., et al. Evaluation of Serological Tests To Identify *Trypanosoma cruzi* Infection in Humans and Determine Cross-Reactivity with *Trypanosoma rangeli* and *Leishmania spp.* **Clin. Vaccine Immunol.**, v. 14, n. 8, p. 1045-1049, aug. 2007.
- CALER, E. V., et al. Oligopeptidase B-dependent signaling mediates host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. **EMBO J.**, v. 17, n. 17, p. 4975-4986, sep. 1998.
- CANO, M. I. Telomere biology of trypanosomatids: more questions than answers. **Trends Parasitol.**, v. 17, p. 425-429, 2001.
- CARDOSO DE ALMEIDA, M. L.; HEISE, N. Proteins anchored via glycosylphosphatidylinositol and solubilizing phospholipases in *Trypanosoma cruzi*. **Biol. Research**, v. 26, p. 285-312, 1993.
- CARMO, M. S., et al. Organization and expression of a multigene family encoding the surface glycoproteins of *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigotes involved in the cell invasion. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, vol 94, suppl. I, p. 169-171, 1999.
- CHAGAS, C. Nova tripanozomiaze humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do Schizotrypanum cruzi n. gen., n. sp., agente etiologico de nova entidade mórbida do homem. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, vol 1, n. 2, p. 159-218, 1909.
- CHEN, J. W., et al. Identification of Two Lysosomal Membrane Glycoproteins. **J. Cell. Biol.**, v. 101, n. 1, p. 85-95, 1985.
- CHIURILLO, M. A.; PERALTA, A.; RAMIREZ, J. L. Comparative study of *Trypanosoma rangeli* and *t. cruzi* telomeres. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 120, p. 305-308, 2002.

- COLLI, W. Trans-sialidase: a unique enzyme activity discovered in the protozoan *Trypanosoma cruzi*. **FASEB J.**, v. 7, p. 1257-1264, 1993.
- COPLEY, R. R.; RUSSELL, R. B.; PONTING, C. P. Sialidase-like Asp-boxes: sequence similar structures within different protein folds. **Protein Sci.**, v. 10, p. 285–292, 2001.
- CORDERO, E. M., et al. Expression of *GP82* and *GP90* surface glycoprotein genes of *Trypanosoma cruzi* during *in vivo* metacyclogenesis in the insect vector *Rhodnius prolixus*. **Acta Trop.**, v. 105, n. 1, p. 87-91, jan. 2008.
- CORTEZ, M., et al. Infection by *Trypanosoma cruzi* metacyclic forms deficient in gp82 but expressing a related surface molecule gp30. **Infect. Immun.**, v. 71, p. 6184–6191, nov. 2003.
- CORTEZ, M.; ATAYDE, V.; YOSHIDA, N. Host cell invasion mediated by *Trypanosoma cruzi* surface molecule gp82 is associated with F-actin disassembly and is inhibited by enteroinvasive *Escherichia coli*. **Microbes Infect.**, v. 8, p. 1502-1512, 2006.
- COURA, J. R., et al. Human infection by *Trypanosoma rangeli* in the Brazilian Amazon. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 90, n. 3, p. 278-279, may-jun. 1996.
- COUSTOU, V., et al. Sialidases play a key role in infection and anaemia in *Trypanosoma congolense* animal trypanosomiasis. **Cell Microbiol.**, v. 14, n. 3, p. 431–445, 2012.
- CREMONA, M. L., et al. Enzymically inactive members of the trans-sialidase family from *Trypanosoma cruzi* display beta-galactose binding activity. **Glycobiology**, v. 9, p. 581–587, 1999.
- CROOKS, G. E., et al. WebLogo: A Sequence Logo Generator. **Genome Res.**, v. 14, n. 6, p. 1188-1190, jun. 2004.
- CROSS, G. A.; TAKLE, G. B. The surface trans-sialidase family of *Trypanosoma cruzi*. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 47, p. 385-411, 1993.
- CROXFORD, J. L., et al. Effects of cannabinoid treatment on Chagas disease pathogenesis: balancing inhibition of parasite invasion and immunosuppression. **Cell. Microbiol.**, v. 7, n. 11, p. 1592-1602, 2005.

CUBA-CUBA, C. Revisión de los aspectos biológicos y diagnósticos del *Trypanosoma* (Herpetosoma) *rangeli*. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 31, p. 207-220, 1998.

CUERVO, C.; LOPEZ, M. C.; PUERTA, C. The *Trypanosoma rangeli* histone H2A gene sequence serves as a differential marker for KP1 strains. **Infect. Genet. Evol.**, v. 6, n. 5, p. 401-409, sep. 2006.

D'ALESSANDRO, A. Biology of *Trypanosoma* (Herpetosoma) *rangeli* Tejera, 1920. In: LUMSDEN, W. H. R.; EVANS, D. A. (ed.). **Biology of Kinetoplastida**. London: Academic Press, 1976. v.1, p. 328-493.

D'ALESSANDRO-BACIGALUPO, A.; SARAVIA, N. G. *Trypanosoma rangeli*. In: KREIER, J. P.; BAKER, E. J. R. (ed.). **Parasitic Protozoa**. London: Academic Press, 1992. p. 1-54.

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

DA SILVA, F. M., et al. Phylogeny, taxonomy and grouping of *Trypanosoma rangeli* isolates from man, triatomines and sylvatic mammals from widespread geographical origin based on SSU and ITS ribosomal sequences. **Parasitology**, v. 129, n. 5, p. 549-561, nov. 2004.

DE LEON, J. R. Nota preliminar acerca de la enfermedad de Chagas em Guatemala. Casos encontrados em el Oriente de la Republica y probable existencia de un nuevo tripanosoma humano. **Rev. Cruz Roja Guatemalteca**, n. 9, p. 2, 1942.

DE OLIVEIRA, M. A.; DE SOUZA, W. An electron microscopic study of penetration by *Trypanosoma rangeli* into midgut cells of *Rhodnius prolixus*. **J. Invertebr. Pathol.**, v. 77, n. 1, p. 22-26, jan. 2001.

DE SCORZA, C., et al. *Trypanosoma* (Herpetosoma) *rangeli* Tejera, 1920: preliminary report on histopathology in experimentally infected mice. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 28, n. 5, p. 371-378, 1986.

DE SOUZA, W. O parasito e sua interação com os hospedeiros. In: BRENER, Z.; ANDRADE, Z. A.; BARRAL-NETO, M. ***Trypanosoma cruzi e doença de chagas***. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p. 88-126.

DE STEFANI MARQUEZ, D., et al. Susceptibility of different triatomine species to *Trypanosoma rangeli* experimental infection. **Vector Borne Zoonotic Dis.**, v. 6, n. 1, p. 50-56, 2006.

DORTA, M. L., et al. Ca<sup>2+</sup> signal induced by *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigote surface molecules implicated in mammalian cell invasion. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 73, p. 285–289, 1995.

EGER-MANGRICH, I., et al. Interaction of *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920 with different cell lines in vitro. **Parasitol. Res.**, v. 87, n. 6, p. 505-509, jun. 2001.

EL-SAYED, N. M., et al. Comparative genomics of Trypanosomatid parasitic protozoa. **Science**, v. 309, n. 5733, p. 404-415, jul. 15 2005.

ENGLUND, P. T. The structure and biosynthesis of glycosyl phosphatidylinositol protein anchors. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 62, p. 121-138, 1993.

EPTING, C. L.; COATES, B. M.; ENGMAN, D. M. Molecular mechanisms of host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. **Exp. Parasitol.**, v. 126, p. 283-291, 2010.

ESKELINEN, E. L.; TANAKA, Y.; SAFTIG, P. At the acidic edge: emerging functions for lysosomal membrane proteins. **Trends Cell Biol.**, V. 13, P. 137–145, 2003.

ESKELINEN, E-L. Roles of LAMP-1 and LAMP-2 in lysosome biogenesis and autophagy. **Mol. Aspects Med.**, v. 27, p. 495-502, 2006.

EWING, B., et al. Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. **Genome Research**, v. 8, n. 3, p. 175-185, 1998.

EWING, B.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. **Genome Research**, v. 8, n. 3, p. 186-194, 1998.

FALKOW, S. Perspectives series: host/pathogen interactions. Invasion and intracellular sorting of bacteria: searching for bacterial genes expressed during host/pathogen interactions. **J. Clin. Invest.**, v. 100, p. 239–243, 1997.

FERRARI, I., et al. Towards the physical map of *Trypanosoma cruzi* nuclear genome: construction of YAC and BAC libraries of the reference clone *T. cruzi* CL Brener. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 92, p. 843-858, 1997.

FINLAY, B. B.; FALKOW, S. Common themes in microbial pathogenicity revisited. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, v. 61, p. 136–69, 1997.

FLORENCIO-MARTÍNEZ L., et al. Cellular analysis of host cell infection by different developmental stages of *Trypanosoma cruzi*. **Exp. Parasitol.**, v. 126, n. 3, p. 332–336, 2010.

FRANKHAUSER, N.; MÄSER, P. Identification of GPI anchor attachment signals by a Kohonen self-organizing map. **Bioinformatics**, v. 21, n. 9, p. 1846-1852, may 1 2005.

FRASCH, A. C. Functional diversity in the trans-sialidase and mucin families in *Trypanosoma cruzi*. **Parasitol. Today**, v. 16, n. 7, p. 282-286, 2000.

FREITAS, L. M., et al. Genomic Analyses, Gene Expression and Antigenic Profile of the Trans-Sialidase Superfamily of *Trypanosoma cruzi* Reveal an Undetected Level of Complexity. **PloS ONE**, v. 6, n. 10, e25914, oct. 19, 2011.

GALAN, J. E.; BLISKA, J. B. Cross-talk between bacterial pathogens and their host cells. **Annu. Rev. Cell Dev. Biol.**, v. 12, p. 221–255, 1996.

GASKELL, A.; CRENNELL, S.; TAYLOR, G. The three domains of a bacterial sialidase: a beta-propeller, an immunoglobulin module and a galactose-binding jelly-roll. **Structure**, v. 3, p. 1197–1205, 1995.

GAZZINELLI, R. T., et al. Identification and characterization of protozoan products that trigger the synthesis of IL-12 by inflammatory macrophages. **Chem. Immunol.**, v. 68, p. 136–152, 1997.

GENTIL, L.G., et al. Posttranscriptional mechanisms involved in the control of expression of the stage-specific GP82 surface glycoprotein in *Trypanosoma cruzi*. **Acta Tropica**, v. 109, p. 152–158, 2009.

GIORDANO, R., et al. *Trypanosoma cruzi* binds to laminin in a carbohydrate-independent way. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 27, p. 2315–2318, 1994.

GIORDANO, R., et al. An acidic component of the heterogeneous Tc-85 protein family from the surface of *Trypanosoma cruzi* is a laminin binding glycoprotein. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 65, p. 85-94, 1994a.

GIORDANO, R., et al. Cloning of a surface membrane glycoprotein specific for the infective form of *Trypanosoma cruzi* having adhesive properties to laminin. **J. Biol. Chem.**, v. 274, p. 3461-3468, 1999.

GIORGI, M. E.; LEDERKREMER, R. M. de. Trans-sialidase and mucins of *Trypanosoma cruzi*: an important interplay for the parasite. **Carbohydr. Res.**, v. 346, n. 12, p. 1389-1393, sep. 2011.

GRISARD, E. C.; CAMPBELL, D. A.; ROMANHA, A. J. Mini-exon gene sequence polymorphism among *Trypanosoma rangeli* strains isolated from distinct geographical regions. **Parasitology**, v. 118 ( Pt 4), p. 375-382, apr. 1999.

GRISARD, E. C., et al. Characterization of *Trypanosoma rangeli* strains isolated in Central and South America: an overview. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.94, n.2, p.203-209, mar-apr. 1999.

GRISARD, E. C., et al. Transcriptomic analyses of the avirulent protozoan parasite *Trypanosoma rangeli*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 174, p. 18-25, 2010.

GRISARD, E. C.; ROMANHA, A. J.; STEINDEL, M. *Trypanosoma (Herpetosoma) rangeli*. In: NEVES, D. P. **Parasitologia Humana**. 12<sup>a</sup> ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2011. p. 115-120.

GRISHKOVSKAYA, I., et al. Crystal structure of human sex hormone-binding globulin: steroid transport by a laminin G-like domain. **Embo J.**, v. 19, n. 4, p. 504-512, feb. 2000.

GROOT, H.; RENJIFO, S.; URIBE, C. Nota preliminar sobre inoculación a um voluntario humano con *Trypanosoma* sp. (ariari). **Ann. Soc. Biol. Bog.**, n. 4, p. 99-103, 1950.

GROOT, H. Estudios sobre los tripanosomas humanos (*T. rangeli* y *T. ariari*). **Ann. Soc. Biol. Bog.**, n. 6, p. 109-126, 1954.

GUEGAN, F., et al. Erythrophagocytosis of desialylated red blood cells is responsible for anaemia during *Trypanosoma vivax* infection. **Cell Microbiol.**, v. 15, n. 8, p. 1285-1303, 2013.

GUHL, F., et al. Molecular characterization and diagnosis of *Trypanosoma cruzi* and *T. rangeli*. **Arch. Med. Res.**, v. 33, n. 4, p. 362-370, jul-aug. 2002.

GUHL, F.; VALLEJO, G. A. *Trypanosoma* (Herpetosoma) *rangeli* Tejera, 1920: an updated review. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.98, n.4, p.435-442, jun. 2003.

HALL, B. F., et al. Desialylation of lysosomal membrane glycoproteins by *Trypanosoma cruzi*: a role for the surface neuraminidase in facilitating parasite entry into the host cell cytoplasm. **J. Exp. Med.**, v. 176, n. 2, p. 313-325, 1992.

HARRISON, J. A., et al. Hydrolase and sialyltransferase activities of *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase Towards NeuAc-alpha-2,3-Gal-beta-O-PNP. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, v. 11, n. 2, p. 141-144, 2001.

HARTH, G.; HAIDARIS, C. G.; SO, M. Neuraminidase from *Trypanosoma cruzi*: analysis of enhanced expression of the enzyme in infectious forms. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 84, p. 8320-8324, 1987.

HAYNES, P. A.; RUSSELL, D.G.; CROSS, G.A. Subcellular localization of *Trypanosoma cruzi* glycoprotein Gp72. **J. Cell. Sci.**, v. 109, n. 13, p. 2979-2988, 1996.

HECKER, H.; SCHWARZENBACH, M.; RUDIN, W. Development and interactions of *Trypanosoma rangeli* in and with the reduviid bug *Rhodnius prolixus*. **Parasitol. Res.**, v. 76, n. 4, p. 311-318, 1990.

HENRIQUEZ, D.; PIRAS, R; PIRAS, M. M. The effect of surface membrane modifications of fibroblastic cells on the entry process of *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 2, p. 359-366, 1981.

HERBIG-SANDREUTER, A. Experimental study of the life cycle of *Trypanosoma rangeli* Tejera 1920 in warm-blooded animals and in *Rhodnius prolixus*. **Acta Trop.**, v. 12, n. 3, p. 261-264, 1955.

HOARE, C. A. **The Trypanosomes of Mammal**. Oxford: Blackwell, 1972.

HOFT, D. F., et al. Gastric invasion by *Trypanosoma cruzi* and induction of protective mucosal immune responses. **Infect. Immun.**, v. 64, p. 3800-3810, 1996.

HORN, D.; BARRY, J. D. The central roles of telomeres and subtelomeres in antigenic variation in African trypanosomes. **Chromosome Res.**, v. 13, p. 525-533, 2005.

HOWE, C., et al. Derived protein sequence, oligosaccharides, and membrane insertion of the 120 kDa lysosomal membrane glycoprotein (lgp120): identification of a highly conserved family of lysosomal membrane glycoproteins. **Proc. Nat.l Acad. Sci. U.S.A.**, v. 85, n. 20, p. 7577-7581, 1988.

HOWELL, S., et al. A cleavable N-terminal signal peptide is not a prerequisite for the biosynthesis of glycosylphosphatidylinositolanchored proteins. **J. Biol. Chem.**, v. 269, p. 16993-16996, 1994.

INTROINI, M. V.; BASSO, B.; MORETTI, E. Experimental Chagas disease. I Study of different immunization conditions in the infection course. **Bol. Chil. Parasitol.**, v. 53, p. 45-51, 1998.

IVENS, A. C., et al. The genome of the kinetoplastid parasite, *Leishmania major*. **Science**, v. 309, n. 5733, p. 436-442, jul 2005.

JAISWAL, J. K.; ANDREWS, N.W.; SIMON, S. M. Membrane proximal lysosomes are the major vesicles responsible for calcium-dependent exocytosis in nonsecretory cells. **J. Cell. Biol.**, v. 159, n. 4, p. 625-635, 2002.

JAZIN, E., et al. *Trypanosoma cruzi* exoantigens is a member of 160-kDa gene family. **Parasitology**, v. 110, p. 61-69, 1994.

KELLY, J., et al. A shuttle vector which facilitates the expression of transfected genes in *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania*. **Nucleic Acids Res.**, v. 20, n. 15, p. 3963-3969, aug. 1992.

KIM, D., et al. Telomere and subtelomere of *Trypanosoma cruzi* chromosomes are enriched in (pseudo)genes of retrotransposon hot spot and trans-sialidase-like gene families: the origins of *T. cruzi* telomeres. **Gene**, v. 346, p. 153-161, 2005.

KNOWLES, R. G.; MONCADA, S. Nitric oxide as a signal in blood vessels. **Trends Biochem. Sci.**, v. 17, n. 10, p. 399-402, oct. 1992.

KOERICH, L. B. et al. Differentiation of *Trypanosoma rangeli*: high production of infective trypomastigote forms in vitro. **Parasitol. Res.**, v. 88, n. 1, p. 21-25, jan. 2002.

LEHNINGER, A.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger principles of biochemistry**. 4 ed. New York: W. H. Freeman, 2005. P.75-106.

LIBBY, P.; ALROY, J.; PEREIRA, M. E. A neuraminidase from *Trypanosoma cruzi* removes sialic acid from the surface of mammalian myocardial and endothelial cells. **J. Clin. Invest.**, v. 77, p. 127-135, 1986.

LIMA, M. F.; VILLALTA, F. *Trypanosoma cruzi* trypomastigote clones differentially Express a parasite cell adhesion molecule. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 33, n. 2, p. 159-170, mar. 1 1989.

MACHADO, E. M., et al. A simplified method for sample collection and DNA isolation for polymerase chain reaction detection of *Trypanosoma rangeli* and *Trypanosoma cruzi* in triatomine vectors. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 95, n. 6, p. 863-866, nov-dec. 2000.

MACHADO, P. E., et al. Differential susceptibility of triatomines of the genus *Rhodnius* to *Trypanosoma rangeli* strains from different geographical origins. **Int. J. Parasitol.**, v. 31, n. 5-6, p. 632-634, may 1 2001.

MAGDESIAN, M. H., et al. Infection by *Trypanosoma cruzi*. Identification of a parasite ligand and its host cell receptor. **J. Biol. Chem.**, v. 276, p. 19382-19389, 2001.

MAGDESIAN, M. H., et al. A conserved domain of the gp85/trans-sialidase family activates host cell extracellular signal-regulated kinase and facilitates *Trypanosoma cruzi* infection. **Exp. Cell Res.**, v. 313, p. 210-218, jan. 1, 2007.

MANQUE, P. M., et al. Characterization of the cell adhesion site of *Trypanosoma cruzi* metacyclic stage surface glycoprotein gp82. **Infect. Immun.**, v. 68, p. 478-484, 2000.

MANQUE, P. M., et al. Cell adhesion and Ca<sup>2+</sup> signaling activity in stably transfected *Trypanosoma cruzi* epimastigotes expressing the metacyclic stage-specific surface molecule gp82. **Infect. Immun.**, v.71, n.3, p.1561-1565, 2003.

MARCHLER-BAUER, A.; BRYANT, S. H. CD-Search: protein domain annotations on the fly. **Nucleic Acids Res.**, v. 32, n. web server issue, p. W327-31, jul. 1 2004.

MARCHLER-BAUER, A., et al. CDD: a Conserved Domain Database for the functional annotation of proteins. **Nucleic Acids Res.**, v. 39, D225-229, jan. 2011.

MARINI, V., et al. 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**, v. 106, n. 1, p. 32-37, feb. 2011.

MARINKELLE, C. J. Colombian *triatominae* and their infestation with trypanosomatid flagellates. Mitt-Inst Colombo-Alemán. **Invest. Cient.**, v. 6, p. 11-30, 1972.

MARTINA, M.; KILIC, G.; CHERUBINI, E. The effect of intracellular  $Ca^{2+}$  on GABA-activated currents in cerebellar granule cells in culture. **J. Membr. Biol.**, v. 142, p. 209-216, 1994.

McCONVILLE, M. J. ; FERGUSON, M. A. The structure, biosynthesis and function of glycosylated phosphatidylinositols in the parasitic protozoa and higher eukaryotes. **Biochem. J.**, v. 294, p. 305-324, 1993.

MEDINA-ACOSTA, E., et al. Trans-sialidase and sialidase activities discriminate between morphologically indistinguishable Trypanosomatids. **Eur. J. Biochem.**, v. 225, n. 1, p. 333-339, oct. 1 1994.

MILES, M. A., et al. Vertebrate hosts and vectors of *Trypanosoma rangeli* in the Amazon Basin of Brazil. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 32, n. 6, p. 1251-1259, nov. 1983.

MILETTI, L. C., et al. Characterization of D-glucose transport in *Trypanosoma rangeli*. **Parasitology**, v. 133, n. Pt 6, p. 721-727, dec. 2006.

MING, M., et al. Mediation of *Trypanosoma cruzi* invasion by sialic acid on the host cell and trans-sialidase on the trypanosome. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 59, n. 2, p. 243-252, 1993.

MING, M.; EWEN, M. E.; PEREIRA, M. E. A. Trypanosome invasion of mammalian cells requires activation of the TGF $\beta$  signaling pathway. **Cell**, v. 82, p. 287-296, 1995.

MOLYNEUX, D. Division of the human trypanosome, *Trypanosoma* (Herpetosoma) *rangeli*. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, v. 67, n. 3, p. 371-372, sep. 1973.

MORENO, S. N. J., et al. Cytosolic-free calcium elevation in *Trypanosoma cruzi* is required for cell invasion. **J. Exp. Med.**, v. 180, p. 1535-1540, 1994.

MORTARA, R. A., et al, Mammalian cell invasion and intracellular trafficking by *Trypanosoma cruzi* infective forms. **An. Acad. Bras.Cienc.**, v. 77, p. 77-94, 2005.

MOTULSKY, H. J. **Prism 5 Statistics Guide, 2007**. GraphPad Software Inc., San Diego CA. Disponível em: < [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)>. Acesso em: julho 2012 a janeiro 2013.

MURTHY, V. K.; DIBBERN, K. M.; CAMPBELL, D. A. PCR amplification of mini-exon genes differentiates *Trypanosoma cruzi* from *Trypanosoma rangeli*. **Mol. Cell. Probes**, v. 6, n. 3, p. 237-243, jun. 1992.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. **US National Library of Medicine National Institutes of Health**. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>>. Acesso em: setembro 2010.

NEIRA, I., et al. Involvement of *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigote surface molecule gp82 in adhesion to gastric mucin and invasion of epithelial cells. **Infect. Immun.**, v. 71, p. 557–561, jan. 2003.

NORRIS, K. A.; SCHRIMPF, J. E.; SZABO, M. J. Identification of the gene family encoding the 160 kilodalton *Trypanosoma cruzi* complement regulatory protein. **Infect. Immun.**, v. 65, n. 2, p. 349-357, 1997.

OPPEZZO, P., et al. Crystal structure of an enzymatically inactive trans-sialidase-like lectin from *Trypanosoma cruzi*: The carbohydrate binding mechanism involves residual sialidase activity. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1814, p. 1154–1161, 2011.

ORTEGA-BARRIA, E.; PEREIRA, M. E. A novel *T. cruzi* heparin-binding protein promotes fibroblast adhesion and penetration of engineered bacteria and trypanosomes into mammalian cells. **Cell**, v. 67, p. 411-421, 1991.

OSORIO, Y., et al. Infectivity of *Trypanosoma rangeli* in a promonocytic mammalian cell line. **J. Parasitol.**, v. 81, n. 5, p. 687-693, oct. 1995.

OUAISSI, M. A., et al. Fibronectin receptors on *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes and their biological function. **Nature**, v. 308, p. 380-382, 1984.

OUAISSI, M. A.; CORNETTE, J.; CAPRON, A. Identification and isolation of *Trypanosoma cruzi* trypomastigote cell surface protein with properties expected of a fibronectin receptor. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 19, n. 3, p. 201-211, 1986.

OUAISSI, A., et al. Major surface immunogens of *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 83, suppl 1, p. 502, 1988.

PALAU, M. T., et al. Action of *Trypanosoma rangeli* in infections with virulent **Trypanosoma cruzi** populations. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 98, n. 4, p. 543-548, jun. 2003.

PAREDES, C. H.; PAREDES, R. Um caso de infecção humana por *Trypanosoma rangeli*. **Rev. Fac. Med. Bog.**, n. 18, p. 343-375, 1949.

PARODI, C.; PADILLA, A. M.; BASOMBRIO, M. A. Protective immunity against *Trypanosoma cruzi*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 104, suppl 1, p. 288-294, 2009.

PENÃ, C. P., et al. Molecular analysis of surface glycoprotein multigene family *TrGP* expressed on the plasma membrane of *Trypanosoma rangeli* epimastigotes forms. **Acta Trop.**, v. 111, n. 3, p. 255-262, sep. 2009.

PEREIRA, M. E. A. A developmentally regulated neuraminidase activity in *Trypanosoma cruzi*. **Science**, v. 219, p. 1444-1446, 1983.

PEREIRA, M. E. A.; MOSS, D. Neuraminidase activity in *Trypanosoma rangeli*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 15, p. 95-103, 1985.

PEREIRA, M. E.; HOFF, R. Heterogeneous distribution of neuraminidase activity in strains and clones of *Trypanosoma cruzi* and its possible association with parasite myotropism. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 20, p. 183-189, 1986.

PEREIRA, C. M., et al. Adhesion of *Escherichia coli* to HeLa cells mediated by *Trypanosoma cruzi* surface glycoprotein-derived peptides inserted in the outer membrane protein LamB. **Infect. Immun.**, v. 67, p. 4908-4911, 1999.

PEREIRA DA SILVA, L. H.; NUSSENZWEIG, V. Sobre uma cepa de *Trypanosoma cruzi* altamente virulenta para o camundongo branco. **Folia Clin. et Biol.**, v. 20, p. 191-207, 1953.

PETERSON, T. N.; et al. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. **Nat. Methods**, v. 8, n. 10, p. 785-786, sep. 2011.

PIRES, S. F., et al. Cell culture and animal infection with distinct *Trypanosoma cruzi* strains expressing red and green fluorescent proteins. **Int. J. Parasitol.**, v. 38, n. 3-4, p. 289-297, 2008.

POISSON, G., et al. FragAnchor: a large-scale predictor of glycosylphosphatidylinositol anchors in eukaryote protein sequences by qualitative scoring. **Genomics Proteomics Bioinformatics**, v. 5, n.2, p. 121-130, may 2007.

PONTES-DE-CARVALHO, L. C.; TOMLINSON, S.; NUSSENZWEIG, V. *Trypanosoma rangeli* sialidase lacks trans-sialidase activity. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 62, n. 1, p. 19-25, nov. 1993.

PRESTES, E. B., et al. *Trypanosoma rangeli* protein tyrosine phosphatase is associated with the parasite's flagellum. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 107, n. 6, p. 713-719, 2012.

PRIOLI, R. P., et al. Specific binding of human plasma high density lipoprotein (cruzin) to *Trypanosoma cruzi*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 28, p. 257-264, 1988.

PRIOLI, R. P.; MEJÍA, J. S.; PEREIRA, M. E. Monoclonal antibodies against *Trypanosoma cruzi* neuraminidase reveal enzyme polymorphism, recognize a subset of trypomastigotes, and enhance infection *in vitro*. **J. Immunol.**, v. 144, p. 4384- 4391, 1990.

- PUERTA, C., et al. Molecular characterization of the histone H2A gene from the parasite *Trypanosoma rangeli*. **Parasitol. Res.**, v. 86, n. 11, p. 916-922, nov. 2000.
- PUERTA, C. J., et al. Comparative Analysis of *Trypanosoma rangeli* Histone H2A Gene Intergenic Region with Distinct Intraspecific Lineage Markers. **Vector Borne Zoonotic Dis.**, mar. 13 2009.
- QVARNSTROM, Y., et al. Sensitive and Specific Detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in Clinical Specimens Using a Multi-Target Real-Time PCR Approach. **Plos Netgl. Trop. Dis.**, v. 6, n. 7, e1689, jul. 2012.
- RAMIREZ, M. I., et al. Involvement of the stage-specific 82-kilodalton adhesion molecule of *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigotes in host cell invasion. **Infect. Immun.**, v. 61, n. 9, p. 3636-3641, 1993.
- RAMIREZ, M. I., et al. Expression, processing and cellular trafficking of a *Trypanosoma cruzi* Surface Glycoprotein (gp82) in mammalian background. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 93, suppl. II, p. 53-54, 1997.
- RAMIREZ, M. I., et al. Heterologous expression of a *Trypanosoma cruzi* surface glycoprotein (gp82) indicates that requirements for glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchoring are different in mammalian cells and this trypanosome. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 94, n. 4, p. 527-530, jul-aug. 1999.
- REED, P. W.; LARDY, H. A. A23187: A Divalent Cation Ionophore. **J. Biol. Chem.**, v. 247, n. 21, p. 6970-6977, 1972.
- REY, L. **Parasitologia: parasitas e doenças parasitárias do homem nos trópicos ocidentais**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011. v. 1, p. 557-594. 351 p.
- REUTER, G., et al. Isolation and properties of a sialidase from *Trypanosoma rangeli*. **Glycoconjugate**, v. 4, p. 339-348, 1987.
- RODRIGUEZ, A., et al. A trypanosome soluble factor induces IP3 formation, intracellular Ca<sup>2+</sup> mobilization and microfilament rearrangement in host cells. **J. Cell Biol.**, v. 129, p. 1263-1273, 1995.

RODRIGUEZ, A., et al. Lysosomes behave as  $\text{Ca}^{2+}$ -regulated exocytic vesicles in fibroblasts and epithelial cells. **J. Cell Biol.**, v. 137, p. 93–104, 1997.

RUDENKO, G., et al. The structure of the ligand-binding domain of neurexin Ibeta: regulation of LNS domain function by alternative splicing. **Cell**, v. 99, n.1, p. 93-101, oct. 1999.

RUIZ, R. C., et al. The 35/50 kDa antigen of *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigotes and adhesion molecule involved in host cell invasion. **Parasite Immunol.**, v. 15, p. 121-125, 1993.

RUIZ, R. C., et al. Infectivity of *Trypanosoma cruzi* strains is associated with differential expression of surface glycoproteins with differential  $\text{Ca}^{2+}$  signaling activity. **Biochem. J.**, v. 330, p. 505-511, 1998.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. (eds). 2. ed. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. 372 p, v.1-3.

SANTANA, J. M., et al. A *Trypanosoma cruzi* secreted 80 kDa proteinase with specificity for human collagen types I and IV. **Biochem. J.**, v. 325, pt 1, p. 129–137, 1997.

SANTORI, F. R., et al. A recombinant protein based on the *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigote 82-kilodalton antigen that induces an effective immune response to acute infection. **Infect. Immun.**, v. 64, n. 4, p. 1093-1099, 1996.

SANTORI, F. R., et al. Identification of a domain of *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigote surface molecule gp82 required for attachment and invasion of mammalian cells. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 78, n. 1-2, p. 209-216, 1996a.

SANTORI, F., et al. A recombinant protein based on the *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigote 82-kilodalton antigen that induces an effective immune response to acute infection. **Infect. Immun.**, v. 64, p. 1093-1099, 1996b.

SCAHILLA, M. D.; PASTAR, I.; CROSS, G. A. M. CRE recombinase-based positive-negative selection systems for genetic manipulation in *Trypanosoma brucei*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 157, n. 1, p. 73-82, 2008.

SHARMA, D. K., et al. A cell-free assay for glycosylphosphatidylinositol anchoring in African trypanosomes. Demonstration of a transamidation reaction mechanism. **J. Biol. Chem.**, v. 274, p. 16479-16486, 1999.

SCHENKMAN, S., et al. A novel cell surface trans-sialidase of *Trypanosoma cruzi* generates a stage-specific epitope required for invasion of mammalian cells. **Cell**, v. 65, p. 1117-1125, 1991.

SCHENKMAN, S.; PONTES DE CARVALHO, L.; NUSSENZWEIG, V. *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase and neuraminidase activities can be mediated by the same enzymes. **J. Exp. Med.**, v. 175, p. 567-575, 1992.

SCHENKMAN, S., et al. Mucin-like glycoproteins linked to membrane by glycosylphosphatidylinositol anchor are the major acceptor of sialic acid in a reaction catalyzed by transialidase in metacyclic forms of *Trypanosoma cruzi*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 59, p. 293-303, 1993.

SCHENKMAN, S., et al. Structural and functional properties of *Trypanosoma* trans-sialidase. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 48, p. 499-523, 1994.

SCHENKMAN, S., et al. *Trypanosoma cruzi* transialidase and cell invasion. **P. Today**, v. 9, p. 218-221, 1994a.

SCHERF, A.; LOPEZ-RUBIO, J. J.; RIVIERE, L. Antigenic variation in *Plasmodium falciparum*. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 62, p. 445-470, 2008.

SCHERF, A.; FIGUEIREDO, L. M.; FREITAS-JUNIOR, L. H. Plasmodium telomeres: a pathogen's perspective. **Curr. Opin. Microbiol.**, v. 4, p. 409-414, 2001.

SCHOFIELD, L.; TACHADO, S. D. Regulation of host cell function by glycosylphosphatidylinositols of the parasitic protozoa. **Immunol. Cell Biol.**, v. 74, p. 555-563, 1996.

SCHOTTELIUS, J.; MARINKELLE, C. J.; GOMEZ-LEIVA, M. A. Comparative investigations of Latin American trypanosomes with lectins and complement lysis test. **Trop. Med. Parasitol.**, v. 37, n. 1, p. 54-58, mar. 1986.

SCHOTTELIUS, J. Neuraminidase fluorescence test for the differentiation of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli*. **Trop. Med. Parasitol.**, v. 38, n. 4, p. 323-327, dec. 1987.

SCHRADER, S.; SCHAUERR, R. Nonradioactive trans-sialidase screening assay. In: BROCKHAUSEN, I. (ed). **Glycobiology Protocols**. Totowa: Humana Press Inc, 2006. p. 93-107.

SCHWENDE, H., et al. Differences in the state of differentiation of THP-1 cells induced by phorbol ester and 1,25-dihydroxyvitamin D3. **J. Leukoc. Biol.**, v. 59, n. 4, p. 555-561, 1996.

SILVA, E. D., et al. Use of the EIE-recombinant-Chagas-biomanguinhos kit to monitor cure of human Chagas' disease. **J. Clin. Lab .Anal.**, v. 16, n. 3, p. 132-136, 2002.

SIMPSON, L. The mitochondrial genome of kinetoplast protozoa: genomic organization, transcription, replication, and evolution. **Ann. Rev. Microbiol.**, v. 41, p. 363-382, 1987.

SNOEIJER, C. Q., et al. *Trypanosoma rangeli* Transcriptome Project: Generation and analysis of expressed sequence tags. **Kinetoplastid Biol. Dis.**, v. 3, n. 1, p. 1, may 13 2004.

SOUSA, O. E.; LOMBARDO, M.; SALDAÑA, A. *Trypanosoma rangeli* sialidase: lack of activity in stocks from Panama and other regions. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 3, p. 241-243, may 2005.

- SOUTO, R. P.; VARGAS, N.; ZINGALES, B. *Trypanosoma rangeli*: discrimination from *Trypanosoma cruzi* based on a variable domain from the large subunit ribosomal RNA gene. **Exp. Parasitol.**, v. 91, n. 4, p. 306-314, 1999.
- STAQUICINI, D. I., et al. Role of GP82 in the Selective Binding to Gastric Mucin during Oral Infection with *Trypanosoma cruzi*. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 4, n. 3, e613, 2010.
- STEINDEL, M., et al. *Trypanosoma rangeli* (Tejera, 1920) isolated from a sylvatic rodent (*Echimyus dasythrix*) in Santa Catarina Island, Santa Catarina State: first report of this trypanosome in southern Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 86, n.1, p. 73-79, jan-mar. 1991.
- STEINDEL, M. Presence of *Trypanosoma cruzi* - *Trypanosoma rangeli* mixed infection in naturally infected *Panstrongylus megistus* from Florianópolis, State of Santa Catarina. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 87, n. 99. 1992.
- STEINDEL, M. **Caracterização de cepas de *Trypanosoma rangeli* e *Trypanosoma cruzi* isoladas de reservatórios e vetores silvestres em Santa Catarina.** 1993. 165 f. Tese de Doutorado (Parasitologia)- Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1993.
- STEINDEL, M., et al. Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) and isoenzyme analysis of *Trypanosoma rangeli* strains. **J. Eukaryot. Microbiol.**, v. 41, n. 3, p. 261-267, may-jun. 1994.
- STEVENS, J. R., et al. The taxonomic position and evolutionary relationships of *Trypanosoma rangeli*. **Int. J. Parasitol.**, v. 29, n. 5, p. 749-77, may 1999.
- STOCO, P. H. **Caracterização das DNA topoisomerases II de *Trypanosoma rangeli*.** 2010. 163 p. Tese (Doutorado em Biotecnologia)- Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2010.

STOCO, P. H., et al. *Trypanosoma rangeli* expresses a  $\beta$ -galactofuranosyl transferase. **Exp. Parasitol.**, v. 130, n. 3, p. 246-252, mar. 2012.

STOCO, P. H., et al. Genome of the Avirulent Human-infective Trypanosome – *Trypanosoma rangeli*. **Plos Netgl. Trop. Dis.**, submetido, 2014.

STURM, N. R., et al. Sensitive detection and schizodeme classification of *Trypanosoma cruzi* cells by amplification of kinetoplast minicircle DNA sequences: use in diagnosis of Chagas' disease. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 33, n. 3, p. 205-214, mar. 15 1989.

TAKLE, G. B., et al. Cloning and expression of a trypanomastigote-specific 85-kilodalton surface antigen gene from *Trypanosoma cruzi*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 37, p. 57-64, 1989.

TAKLE, G. B.; CROSS, G. A. An 85-kilodalton surface antigen gene family of *Trypanosoma cruzi* encodes polypeptides homologous to bacterial neuraminidases. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 48, n. 2., p. 185-198, oct. 1991.

TANOURA, K., et al. *Trypanosoma rangeli*--in vitro metacyclogenesis and fate of metacyclic trypomastigotes after infection to mice and fibroblast cultures. **J. Eukaryot. Microbiol.**, v. 46, n. 1, p. 43-48, jan-feb. 1999.

TARDIEUX, I., et al. Lysosome recruitment and fusion are early events required for *Trypanosoma* invasion of mammalian cells. **Cell**, v. 71, p. 1117–1130, 1992.

TARDIEUX, I.; NATHANSON, M. H.; ANDREWS, N. W. Role in host cell invasion of *Trypanosoma cruzi*-induced cytosolic free  $Ca^{2+}$  transients. **J. Exp. Med.**, v. 179, p. 1017-1022, 1994.

TEIXEIRA, M. M.; YOSHIDA, N. Stage-specific surface antigens of metacyclic trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi* identified by monoclonal antibodies. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 18, n. 3, p. 271-282, 1986.

THOMPSON, J.D., et al. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Res.**, v. 22, n. 22, p. 4673-4680, nov. 11 1994.

TISI, D., et al. Structure of the C-terminal laminin G-like domain pair of the laminin alpha2 chain harbouring binding sites for alpha-dystroglycan and heparin. **Embo J.**, v. 19, n. 7, p. 1432-1440, apr. 2000.

TOALDO, C. B., et al. Molecular karyotype and chromosomal localization of genes encoding beta-tubulin, cysteine proteinase, hsp 70 and actin in *Trypanosoma rangeli*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 96, n. 1, p. 113-121, jan. 2001.

TODESCHINI, A. R., et al. Costimulation of host T lymphocytes by a trypanosomal trans-sialidase: Involvement of CD43 signaling. **J. Immunol.**, v. 168, p. 5192-5198, 2002.

TOMLINSON, S., et al. Role of sialic acid in the resistance of *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes to complement. **J. Immunol.**, v. 153, n. 7, p. 3141-3147, 1994.

TONELLI, R. R., et al. Role of the gp85/trans-sialidases in *Trypanosoma cruzi* tissue tropism: preferential binding of a conserved peptide motif to the vasculature in vivo. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 4, e864, 2010.

TONELLI, R. R., et al. In vivo infection by *Trypanosoma cruzi*: the conserved FLY domain of the gp85/trans-sialidase family potentiates host infection. **Parasitology**, v. 138, n. 4, p. 481-492, apr. 2011.

TOWBIN, H.; STAHELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, v. 76, n. 9, p. 4350-4354, sep. 1979

TYLER, K. M.; ENGMAN, D. M. The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. **Int. J. Parasitol.**, v. 31, p. 472-481, 2001.

UDENFRIEND, S.; KODUKULA, K. Prediction of omega site in nascent precursor of glycosylphosphatidylinositol protein. **Methods Enzymol.**, v. 250, p. 571-582, 1995.

UMEZAWA, E. S., et al. Evaluation of recombinant antigens for serodiagnosis of Chagas' disease in South and Central America. **J. Clin. Microbiol.**, v. 37, n. 5, p. 1554-1560, may 1999.

URDANETA-MORALES, S.; TEJERO, F. *Trypanosoma* (Herpetosoma) *rangeli* Tejera, 1920: mouse model for high, sustained parasitemia. **J. Parasitol.**, v. 71, n. 4, p. 409-414, aug. 1985.

URDANETA-MORALES, S.; TEJERO, F. *Trypanosoma* (Herpetosoma) *rangeli* Tejera, 1920. Intracellular amastigote stages of reproduction in white mice. **Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo**, v. 28, n. 3, p. 166-169, may-jun. 1986.

URREA, D. A., et al. Molecular characterisation of *Trypanosoma rangeli* strains isolated from *Rhodnius ecuadoriensis* in Peru, *R. colombiensis* in Colombia and *R. pallescens* in Panama, supports a co-evolutionary association between parasites and vectors. **Infect. Genet. Evol.**, v. 5, n. 2, p. 123-129, mar. 2005.

URUENA, C., et al. Chromosomal localization of the KMP-11 genes in the KP1(+) and KP1(-) strains of *Trypanosoma rangeli*. **Biomedica**, v. 24, n. 2, p. 200-203, jun. 2004.

VALLEJO, G. A., et al. Behavior of the infection and morphologic differentiation of *Trypanosoma cruzi* and *T. rangeli* in the intestine of the vector *Rhodnius prolixus*. **Rev. Bras. Biol.**, v. 48, n. 3, p. 577-587, aug. 1988.

VALLEJO, G. A., et al. Kinetoplast DNA from *Trypanosoma rangeli* contains two distinct classes of minicircles with different size and molecular organization. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 67, n. 2, p. 245-253, oct. 1994.

VALLEJO, G. A., et al. Species specific detection of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* in vector and mammalian hosts by polymerase chain reaction amplification of kinetoplast minicircle DNA. **Acta Trop.**, v. 72, n. 2, p. 203-212, mar. 15 1999.

- VALLEJO, G. A., et al. kDNA markers define two major *Trypanosoma rangeli* lineages in Latin-America. **Acta Trop.**, v. 81, p.77-82, 2002.
- VALLEJO, G. A., et al. Parity between kinetoplast: DNA and miniexon gene sequences supports either clonal evolution or speciation in *Trypanosoma rangeli* strains isolated from *Rhodnius colombiensis*, *R. pallescens* and *R. prolixus* in Colombia. **Infec. Gen. Evol.**, v. 3, p. 39-45, 2003.
- VALLEJO, G. A.; GUHL, F.; SCHAUB, G. A. Triatominae-*Trypanosoma cruzi*/*T. rangeli*: Vector-parasite interactions. **Acta Trop.**, v. 110, n. 2-3, p. 137-147, may-jun. 2009.
- VAN VOORHIS, W. C.; EISEN, H. Fl-160. A surface antigen of *Trypanosoma cruzi* that mimics mammalian nervous tissue. **J. Exp. Med.**, v. 169, p. 641-652, 1989.
- VAN VOORHIS, W., et al. FL-160 proteins of *Trypanosoma cruzi* are expressed from a multigene family and contains two distinct epitopes that mimic nervous tissues. **J. Exp. Med.**, v. 178, p. 681-694, 1993.
- VANDEKERCKHOVE, F., et al. Substrate specificity of the *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase. **Glycobiology**, v. 2, p. 541-548, 1992.
- VARGAS, N., et al. Amplification of a specific repetitive DNA sequence for *Trypanosoma rangeli* identification and its potential application in epidemiological investigations. **Exp. Parasitol.**, v. 96, n. 3, p. 147-159, nov. 2000.
- VELGE, P., et al. Identification and isolation of *Trypanosoma cruzi* trypomastigote collagen-binding proteins: possible role in cell-parasite interaction. **Parasitology**, v. 97, pt 2, p. 255-268, 1988.
- VIEIRA, M., et al. Cellular signaling during the macrophage invasion by *Trypanosoma cruzi*. **Histochem. Cell. Biol.**, v. 118, p. 491-500, 2002.
- VILLALTA, F.; KIERSZENBAUM, F. Role of cell surface mannose residues in host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 736, p. 39-44, 1983.

- VILLALTA, F.; KIERSZENBAUM, F. Host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*: role of cell surface galactose residues. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 119, p. 228-235, 1984.
- VILLALTA, F.; LIMA, M. F.; ZHOU, L. Purification of *Trypanosoma cruzi* surface proteins involved in adhesion to host cells. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 172, n. 2, p. 925-931, oct. 30 1990.
- WAGNER, G. **Análise proteômica de formas tripomastigotas diferenciadas *in vitro* do *Trypanosoma rangeli* e caracterização de antígenos diferenciais ao *Trypanosoma cruzi*.** 2012. 134 p. Tese (Doutorado em Biotecnologia e Biociências)- Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2012.
- WANG, X., et al. Intracellular calcium dependent activation of p72syk in platelets. **J Biochem.**, v. 116, n. 4, p. 858-861, oct. 1994.
- WOOLSEY, A. M., et al. Novel PI 3-kinasedependent mechanisms of trypanosome invasion and vacuole maturation. **J. Cell Sci.**, v. 116, p.3611-3622, 2003.
- YAKUBU, M. A.; MAJUMDER, S.; KIERSZENBAUM, F. Changes in *Trypanosoma cruzi* infectivity by treatments that affect calcium ion levels. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 66, n.1, p. 119-125, 1994.
- YAKUBU, B., et al. Trans-sialidase-like gene from the bloodstream form of *Trypanosoma evansi* conserves most of the active site residues and motifs found in Trypanosomal sialidases and trans-sialidases. **African J. Biotech.**, v. 10, n. 13, p. 2388-2398, 2011.
- YOSHIDA, N. Surface antigens of metacyclic trypomastigotes of *T. cruzi*. **Infect. Immun.**, v. 40, p. 836-839, 1983.
- YOSHIDA, N. Molecular basis of mammalian cell invasion of *Trypanosoma cruzi*. **An. Acad. Bras. Cienc.**, v. 78, p. 87-111, 2006.
- ZINGALES, B., et al. Direct sialic acid transfer from a protein donor to glycolipids of trypomastigote forms of *Trypanosoma cruzi*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 26, p. 135-144, 1987.

ZUNIGA, C., et al. Characterization of a *Trypanosoma rangeli* strain of Colombian origin. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 92, n. 4, p. 523-530, jul-aug. 1997.