



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA

CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA, IMUNOLOGIA E PARASITOLOGIA

Expressão heteróloga de uma trans-sialidase de
Trypanosoma cruzi por *Trypanosoma rangeli*

NINNA GRANUCCI

Florianópolis – SC

Dezembro de 2010



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA

CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA, IMUNOLOGIA E PARASITOLOGIA

Expressão heteróloga de uma trans-sialidase de
Trypanosoma cruzi por *Trypanosoma rangeli*

Trabalho apresentado para o cumprimento da disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso (BIO 7016), como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Santa Catarina.

Acadêmica: Ninna Granucci

Orientadores:

Prof. Dr. Edmundo Carlos Grisard

Dr^a. Patrícia Hermes Stoco

RESUMO

O *Trypanosoma rangeli* é um parasito hemoflagelado, com capacidade de infectar animais incluindo o homem, nas Américas Central e do Sul. Sua distribuição geográfica, reservatórios e vetores são compartilhados com o *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico da doença de Chagas. As Trans-sialidases (TS) de *T. cruzi* estão relacionadas ao processo de interação, penetração do parasito na célula hospedeira e seu escape do vacúolo fagocítico. O *T. rangeli* possui alguns genes da família das TS, não possuindo nenhuma atividade catalítica como perfaz algumas TS de *T. cruzi* (*TcTS*). O objetivo do presente estudo foi realizar a expressão heteróloga da *TcTS* de *T. cruzi* em *T. rangeli* buscando a geração de uma ferramenta para estudos da interação celular patógeno-hospedeiro. Para tanto, a partir da construção plasmidial que possui o gene da *TcTS* de *T. cruzi* foi confirmada a expressão heteróloga da *TcTS* de *T. cruzi* por *T. rangeli* por *western blot* e por microscopia de fluorescência. Ainda que preliminares, foram realizados ensaios de atividade TS nos parasitos transfectados. Os resultados confirmaram a expressão heteróloga da *TcTS* de *T. cruzi* por *T. rangeli*, além de apontar que o parasito transfectado possui uma TS ativa.

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

ABSTRACT

Trypanosoma rangeli is an hemoflagellate parasite, with ability to infect animals including humans, in Central and South America. Geographical distribution, reservoirs and vectors are shared with *Trypanosoma cruzi*, etiological agent of Chagas disease. The trans-sialidases (TS) of *T. cruzi* are related to the processes of interaction, penetration of the parasite in the host cell and its evasion from parasitophorous vacuole. *T. rangeli* revealed to have genes similar to TS family members but with no catalytic activity has been proved so far, as TS of *T. cruzi* (TcTS). The goal of this study was to perform the heterologous expression of TcTS of *T. cruzi* by *T. rangeli* to generate a tool for the study of host-pathogen interaction. Heterologous expression of *TcTS* by *T. rangeli* was confirmed by western blot and by fluorescence microscopy using antibodies directed to the catalytic site and terminal repeats of *TcTS* (SAPA). Although preliminary, TS activity tests in transfected flagellate was performed. The results confirm the heterologous expression of *TcTS* of *T. cruzi* by *T. rangeli*, in addition to pointing out that the transfected parasite has an active TS.

Keywords: *Trypanosoma rangeli*, *Trypanosoma cruzi*, *Trans-sialidase*

LISTA DE ABREVIATURAS

3'-SL – 3'-Sialilactose
µg – micrograma
µl – microlitro
µm – micrômetro
AMP – adenosina monofosfato
BLAST – do inglês *Basic Local Alignment Search Tool*
BSA – soro albumina bovina (do inglês *Bovine Serum Albumin*)
°C – graus Celsius
cm – centímetro
Da – Dalton
DAPI – 4'-6'-diamidino-2-fenilindol
DMEM – do inglês *Dulbecco's Modified Eagle Medium*
DNA – ácido desoxirribonucleico (do inglês *Deoxyribonucleic Acid*)
dNTP – desoxinucleotídeo trifosfatado (do inglês *Deoxynucleotide Triphosphate*)
EDTA – ácido etilendiaminotetracético
ExPaSy – do inglês *Expert Protein Analysis System*
g – força da gravidade
g – grama
GPI – glicosilfosfatidilinositol
IgG – imunoglobulina G
IPTG – isopropil-β-D-tiogalactopiranosídeo
kDa – kilodalton
KV – kilovolt
LB – meio Luria-Bertani
LIT – do inglês *Liver Infusion Tryptose*
M – molar
mA – miliampere
mg – miligrama
ml – mililitro
mM – milimolar
mRNA – RNA mensageiro
MUGal – 4-Metilumbeliferil-β-D-galactopiranosídeo
NCBI – do inglês *National Center for Biotechnology Information*
ng – nanograma
nm – nanômetro
NP-40 – Nonidet 40, nonil fenoxi polietoxietanol
pb – pares de bases
PBS – tampão salina fosfato, pH 7,4 (do inglês *Phosphate Buffered Saline*)
PCR – reação em cadeia da polimerase (do inglês *Polymerase Chain Reaction*)
pH – potencial hidrogeniônico
PIPES – Piperazina-1,4-bis (ácido 2-etanosulfônico)
pmol – picomol
PVDF – fluoreto de polivinilideno (do inglês *Polyvinylidene Fluoride*)
RIFI – Reação de Imunofluorescência Indireta
SBF – soro bovino fetal
SDS-PAGE – do inglês *Sodium Dodecyl Sulfate – Polyacrylamide Gel Electrophoresis*
SL - *spliced leader*
U – unidade
V – Volt
X-gal – 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosídeo
W – Watt

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Microfotografia de formas tripomastigotas de <i>Trypanosoma rangeli</i>	7
Figura 2. Ciclo biológico do <i>Trypanosoma rangeli</i> no hospedeiro invertebrado.....	9
Figura 3. Atividade da TS em formas tripomastigotas.	11
Figura 4. Mapa do plasmídeo base pTEXeGFP, indicando os sítios de enzimas de restrição....	19
Figura 5. Eletroforese em gel de agarose a 1% corado pelo brometo de etídeo, do gene TcTS de <i>T. cruzi</i> e DNA plasmidial.....	26
Figura 6. Representação esquemática do plasmídeo pTEX-TcTSeGFP indicando as posições dos sítios para enzimas de restrição e as posições dos genes da <i>TcTS</i> de <i>Trypanosoma cruzi</i> e da GFP.....	27
Figura 7. Sequência aminoacídica da TcTS de <i>Trypanosoma cruzi</i> presente no plasmídeo pTEX-TcTSeGFP revelando os motivos característicos da proteína.....	28
Figura 8: Alinhamento das sequências de TS de <i>Trypanosoma cruzi</i> e Sialidase de <i>Trypanosoma rangeli</i>	29
Figura 9. <i>Trypanosoma rangeli</i> expressando GFP como indicativo de co-expressão da <i>TcTS</i> de <i>T. cruzi</i> , após 24 horas da adição de 25µg/ml de G418.....	30
Figura 10. Visualização da expressão de GFP por fluorescência direta no <i>Trypanosoma rangeli</i> transfectado com o plasmídeo pTEX-TcTSeGFP.....	31
Figura 11. Eletroforese em gel de agarose a 1% corado pelo brometo de etídeo revelando o resultado da PCR utilizando diferentes pares de iniciadores.....	32
Figura 12. Imunofluorescência utilizando os anticorpos anti- <i>TcTS</i> sítio catalítico (TcTS-Sc), anti- <i>TcTs</i> SAPA e anti-GFP.....	34
Figura 13. Análise da expressão de <i>TcTS</i> , GFP e alfa tubulina em extratos protéicos totais de <i>Trypanosoma rangeli</i> cepa Choachí selvagem, <i>T. cruzi</i> cepa Y e <i>T. rangeli</i> transfectado com os plasmídeos pTEXeGFP e pTEX-TcTSeGFP.....	35
Figura 14. Ensaio de atividade com os valores relativos de fluorescência representativo da quantidade de substrato com ácido siálico incorporado.....	37
Figura 15. Modelo esquemático representando os mecanismos de <i>trans-splicing</i> e poliadenilação do pré-mRNA em <i>Trypanosoma cruzi</i>	42

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	7
1.1	<i>Trypanosoma cruzi</i> e <i>Trypanosoma rangeli</i>	7
1.2	Superfamília das Trans-sialidases	10
2	OBJETIVOS	15
2.1	Objetivo Geral	15
2.2	Objetivos Específicos	15
3	METODOLOGIA.....	16
3.1	Parasitas.....	16
3.2	Obtenção do gene da <i>TcTS</i> e ligação no vetor de expressão	17
3.2.1	Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	17
3.2.2	Clonagem dos insertos de interesse	18
3.2.3	Extração do DNA plasmidial e digestão com enzimas de restrição.....	18
3.2.4	Subclonagem em vetor de expressão	18
3.3	Sequenciamento e análise da <i>TcTS</i>	20
3.3.1	Sequenciamento do inserto.....	20
3.3.2	Análise da sequência.....	20
3.4	Transfecção dos parasitos.....	21
3.5	Deteção dos produtos de expressão plasmidial.....	22
3.5.1	Fluorescência Direta	22
3.5.2	Citocalização por ensaios de imunofluorescência indireta (RIFI).....	22
3.5.3	Avaliação do nível de expressão das proteínas <i>TcTS</i> por <i>western blot</i>	23
3.6	Ensaio de atividade funcional da trans-sialidase de <i>T. rangeli</i> - <i>TcTS</i>	24
3.7	Aspectos éticos e de biossegurança	25
4	RESULTADOS	26
4.1	Construção do plasmídeo, sequenciamento e análises da sequência.....	26
4.2	Transfecção e Expressão Heteróloga.....	29
4.3	Avaliação da presença do DNA plasmidial no <i>T. rangeli</i> transfectado por PCR	31
4.4	Avaliação da expressão e citocalização da GFP e <i>TcTS</i> por imunofluorescência indireta.....	32
4.5	Avaliação da expressão heteróloga da <i>TcTS</i> de <i>T. cruzi</i> por <i>T. rangeli</i> através de <i>western blot</i>	35
4.6	Avaliação da atividade de trans-sialidase nos parasitos transfectados	36
5	DISCUSSÃO	38
6	CONCLUSÕES.....	44
7	PERSPECTIVAS.....	45
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	46

1 INTRODUÇÃO

1.1 *Trypanosoma cruzi* e *Trypanosoma rangeli*

O *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909) e o *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920 (figura 1) 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; 2009). Estas espécies compartilham um grande número de reservatórios e vetores (D'ALESSANDRO *et al.*, 1992; CUBA CUBA, 1998; GRISARD *et al.*, 1999a; GUHL *et al.*, 2003; VASQUEZ *et al.*, 2004), assim como apresentam uma distribuição geográfica sobreposta, sendo comum a ocorrência de infecções mistas em hospedeiros vertebrados e invertebrados (AFCHAIN *et al.*, 1979; GRISARD *et al.*, 1999; MAIA DA SILVA *et al.*, 2004; 2007).



Figura 1. Microfotografia de formas tripomastigotas de *Trypanosoma rangeli*, coradas por Giemsa, em sangue de camundongo experimentalmente infectado. Objetiva de 100. Fonte: STOCO, 2010.

A doença de Chagas ou tripanosomíase americana causada pelo *T. cruzi* afeta mais de 10 milhões de pessoas, causando mais de 10 mil mortes a cada ano (WHO, 2010). O curso clínico da doença se caracteriza por uma fase inicial aguda, com sintomas frequentemente inespecíficos quando presentes, e uma fase crônica que pode ser assintomática (cerca de 60-80% dos casos) ou sintomática, com comprometimento cardíaco (cardiopatia chagásica), e/ou acometimentos digestivos severos (megaesôfago e megacólon) (PRATA, 2001; TEIXEIRA *et al.*, 2006).

O ciclo biológico do *T. cruzi* inicia-se com a infecção do triatomíneo pelo parasito quando esse ingere formas tripomastigotas durante o repasto sanguíneo em hospedeiros mamíferos. O parasito se divide sob a forma epimastigota no tubo digestivo do inseto e se diferencia na ampola retal em formas tripomastigotas metacíclicas que poderão ser transmitidas ao hospedeiro mamífero através da deposição de fezes

infectadas nas mucosas ou em locais próximos ao da lesão tecidual causada pela picada do inseto. No hospedeiro vertebrado, o ciclo do parasito envolve fenômenos de reconhecimento, adesão e interiorização celular. As formas tripomastigotas, uma vez no interior da célula hospedeira, evadem do vacúolo endocítico e se diferenciam em formas amastigotas, onde se multiplicam por sucessivas divisões binárias no citoplasma celular. As formas amastigotas se diferenciam em tripomastigotas e após o rompimento da célula hospedeira essas formas são liberadas para o meio extracelular, sendo que podem permanecer circulantes no sangue ou infectar outras células hospedeiras, iniciando assim um novo ciclo intracelular (BRENER *et al.*, 2000; TYLER *et al.*, 2001).

Diferentemente do que ocorre para o *T. cruzi*, a transmissão do *T. rangeli* ao hospedeiro mamífero, para o qual não é patogênico, ocorre predominantemente através da picada do inseto vetor. As espécies de triatomíneo relacionadas a transmissão deste parasito normalmente pertencem ao gênero *Rhodnius*. Entretanto, a susceptibilidade e o nível de infecção variam conforme a espécie do triatomíneo e a cepa do parasito (GUHL *et al.*, 2003). No hospedeiro invertebrado, o ciclo se inicia com a ingestão de formas tripomastigotas juntamente com o repasto sanguíneo. No intestino, os parasitos se diferenciam em formas epimastigotas que atravessam o epitélio intestinal alcançando a cavidade celômica. Uma vez na hemocele, os parasitos se multiplicam e migram para as glândulas salivares onde penetram e se diferenciam em tripomastigotas metacíclicos, que são transmitidos no momento da picada (figura 2). Alguns estudos em laboratório ainda demonstram que é possível a infecção de camundongos utilizando-se as fezes de triatomíneos infectados com o *T. rangeli* (GRISARD, 2005).

Muito pouco ainda se sabe sobre o curso da infecção por este parasito no hospedeiro mamífero, sendo que vários estudos demonstram que a taxa de infecção de diferentes cepas deste parasito frente a linhagens celulares distintas (fagocíticas e não fagocíticas) é sempre muito baixa e de curta duração. Os dados a respeito da existência ou não de formas em divisão nos tecidos e no sangue são escassos e controversos (MENESES *et al.*, 2004). Em relação a esse fenômeno, foram realizadas extensivas análises histopatológicas em camundongos infectados com *T. rangeli*, que não apresentaram qualquer indício de multiplicação intracelular (HERBIG-SANDREUTER, 1955). Em outros estudos *in vitro*, observou-se que os parasitos tendem a desaparecer ao longo do tempo de interação, como a evidente desintegração especialmente observada em macrófagos, igualmente sugerindo a ausência de multiplicação intracelular, (OSORIO *et al.*, 1995; TANOURA *et al.*, 1999; EGER-MANGRICH *et al.*, 2001).

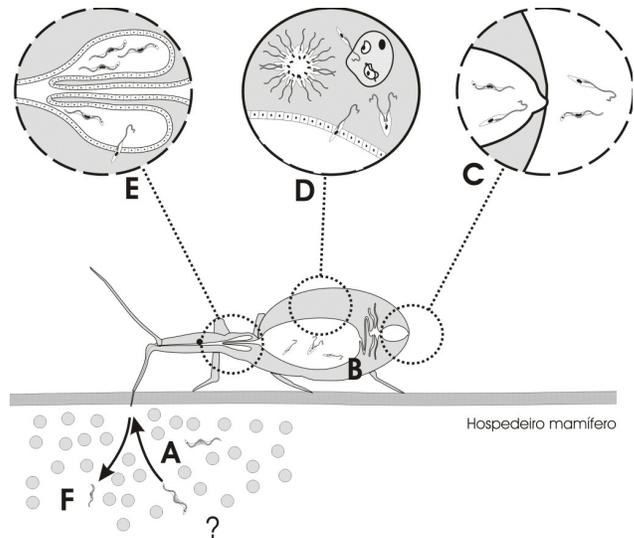


Figura 2. Ciclo biológico do *Trypanosoma rangeli* no hospedeiro invertebrado. (A) Ingestão das formas tripomastigotas durante o repasto sanguíneo do triatomíneo; (B) Formas epimastigotas no trato intestinal do triatomíneo; (C) Parasitos alcançando a ampola retal, onde alguns se diferenciam em tripomastigotas e podem ser excretados junto a fezes e urina; (D) Adesão de epimastigotas ao epitélio intestinal e passagem para a hemocele, onde ocorre sua multiplicação; (E) Invasão pelos parasitos das glândulas salivares e diferenciação para formas infectantes (tripomastigotas metacíclicas), as quais são inoculadas com a saliva durante o repasto sanguíneo (F). Fonte: GRISARD *et al.*, 2005.

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, sendo estas as únicas descrições de formas intracelulares do parasito observadas *in vivo*.

Com relação à replicação no hospedeiro mamífero, existem evidências de que haja um mecanismo de sobrevivência deste flagelado no hospedeiro mamífero ou mesmo multiplicação, como o isolamento repetido do parasito em animais cronicamente infectados, como demonstrado por Steindel (1993), e estudos como o de Urdaneta-Morales e Tejero (1985) que, em camundongos, mostram níveis de parasitemia até sete vezes maiores que o inóculo original de parasitos.

O *T. rangeli* é a outra espécie do gênero *Trypanosoma* envolvida em infecções em seres humanos nos países da América Latina (GUHL, 2003). Apesar de não patogênico, o parasito é capaz de induzir uma resposta imune humoral com elevados títulos de anticorpos, os quais determinam uma elevada reatividade cruzada com

antígenos do *T. cruzi*, dificultando o diagnóstico sorológico da doença de Chagas, especialmente em sua fase crônica (SCHOTTELIUS, 1987; GRISARD *et al.*, 1999). Ao analisar formas epimastigotas de cultura do *T. rangeli*, Afchain e colaboradores (1979) verificaram que este compartilha cerca de 60% de sua constituição antigênica solúvel com o *T. cruzi*, o que pode explicar a reatividade sorológica cruzada e os possíveis resultados falso-positivos que incorrem em um elevado custo sócio-econômico. Recentemente, estes dados foram confirmados em um estudo que utilizou diferentes cepas e formas do *T. rangeli* e *T. cruzi* com soros de pacientes apresentando distintas formas clínicas da doença de Chagas (MORAES *et al.*, 2008).

No estabelecimento da infecção do hospedeiro mamífero por *T. cruzi*, a interação, invasão da célula hospedeira e fuga do vacúolo fagocítico, são alguns dos pontos cruciais e por isso tem sido extensivamente estudados *in vitro*, utilizando diferentes cepas do parasito e linhagens celulares. Já para o *T. rangeli*, os poucos trabalhos existentes mantêm inconclusivas as informações relacionadas ao ciclo de vida no hospedeiro mamífero, perpetuando-se desta forma uma lacuna de informação sobre um organismo extritamente relacionado ao flagelado patogênico.

1.2 Superfamília das Trans-sialidases

A interiorização do *T. cruzi* nas células hospedeiras e o escape do vacúolo fagocítico envolvem uma série de eventos, incluindo interações de moléculas na superfície do parasito com componentes do hospedeiro, não somente através de adesão celular via receptores de membrana, mas também a partir de interações com componentes da matriz extracelular (YOSHIDA, 2006).

Dentre estes componentes encontra-se o ácido siálico, sendo que o mais comum é o ácido N-acetil-neuramínico (Neu5Ac), considerado o precursor dos outros membros da família. Geralmente é encontrado em glicoproteínas e glicolipídeos, formando ligações, α -2,3- e α -2,6- com a galactose e N-acetil-D-galactosamina, através da atividade de sialiltransferases. Estas últimas estão presentes no complexo de Golgi da maioria dos organismos eucariotos e utilizam a citidina monofosfato-Neu5Ac (CMP-Neu5Ac) como substrato doador (SCHENKMAN, 1994). Como o ácido siálico confere carga negativa à superfície das moléculas em que está presente, é capaz de mudar drasticamente as propriedades das mesmas e desencadear efeitos biológicos, como nos processos de reconhecimento celular, na meia vida de células e proteínas plasmáticas,

na modulação do sistema imune e apoptose (TRIBULATTI *et al.*, 2005). Estes resíduos podem ainda ter um papel importante na interação parasito-hospedeiro, uma vez que são ligantes para moléculas de adesão como selectinas ou sialoadesinas, mediando adesão celular ou transdução de sinais (SCHENKMAN *et al.*, 1994; TRIBULATTI *et al.*, 2005) (figura 3).

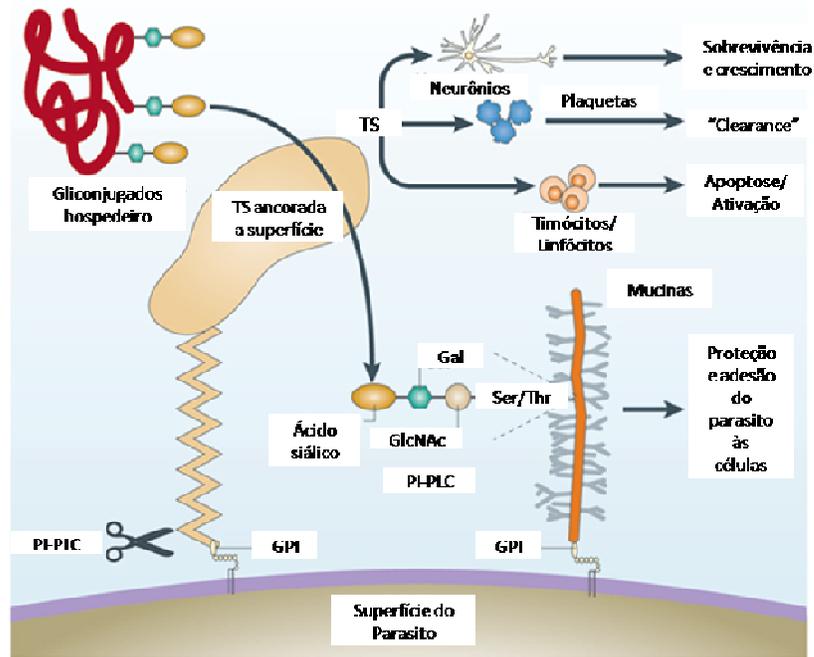


Figura 3. Atividade da TS em formas tripomastigotas. O diagrama mostra esquematicamente a sialilação de um *O*-oligossacarídeo de uma mucina ancorada por GPI, mediada por uma TS associada a membrana do parasito. Após a clivagem da âncora de glicosilfosfatidilinositol (GPI) pela ação da fosfatilinositol-fosfolipase C (PI-PLC), a TS é solta na corrente sanguínea e causa vários efeitos biológicos em diversos tipos celulares, provavelmente, alterando o perfil de sialidação em suas superfícies. Gal, galactose; GlcNAc, *N*-acetylglucosamina; Ser/Thr, resíduo de serina ou treonina. Fonte: BUSCAGLIA, 2006.

Tripanosomas são incapazes de sintetizar o ácido siálico, entretanto, alguns tripanosomas africanos e o *T. cruzi* na América, conseguem incorporar o ácido siálico derivado do hospedeiro, através de proteínas de sua membrana (FRASCH, 2000). O *T. cruzi* expressa na sua superfície uma grande variedade de proteínas e glicoproteínas cujas massas moleculares variam de 70 a 220 kDa, sendo que algumas delas sabidamente estão envolvidas nos processos de adesão e penetração do parasito na célula hospedeira. Estudos cinéticos revelam ainda que o perfil destas moléculas de superfície podem variar de acordo com as formas do ciclo biológico (KATZIN *et al.*, 1983; BARRY *et al.*, 1990; MANQUE *et al.*, 2000), sendo preferencialmente expressos

na forma tripomastigota, que é a forma infectante do parasito (YOSHIDA, 1983; COLLI, 1993).

Os membros das superfamílias das mucinas e das trans-sialidasas (TS) são, provavelmente, as proteínas mais abundantes na superfície e, seus genes somados, correspondem a cerca de 5% do genoma de *T. cruzi*. As mucinas estão envolvidas na incorporação do ácido siálico proveniente do hospedeiro, que foi transferido pela atividade das TS (FRASCH, 2000) (figura 3). A superfamília das TS pode ser subdividida em quatro famílias ou grupos (COLLI, 1993; CROSS *et al.*, 1993; FRASCH, 2000; EL-SAYED *et al.*, 2005), sendo que os membros de uma dada família ou grupo apresentam $\geq 60\%$ de similaridade entre si, enquanto que a similaridade encontrada entre os membros de diferentes famílias ou grupos pode variar entre 20-40%.

De maneira geral, as sequências deduzidas de aminoácidos indicam a existência de três domínios principais. O primeiro, na extremidade C-terminal, não é necessário para a atividade de TS da molécula, e é formado por uma repetição de 12 aminoácidos, denominada **SAPA**. Este domínio é imuno-dominante e está relacionado a modulação da produção prematura de anticorpos contra a região catalítica, resultando assim na manutenção da atividade da proteína (FRASCH, 2000). Os outros dois domínios estão presentes na porção N-terminal, que é a responsável pela atividade catalítica, e são denominados domínio **Asp** e o domínio **VTV**. O domínio Asp (SxDxGxTW), no qual x representa um resíduo não conservado, foi primeiramente descrito para neuroaminidases de bactérias e pode ser completo ou parcialmente conservado (SCHENKMAN *et al.*, 1994). Já o domínio VTV constituído pelos aminoácidos VTVxNVLYNR tem homologia com o módulo III da fibronectina (Fn3) e está presente em todos os quatro grupos da superfamília (SCHENKMAN *et al.*, 1994).

Na grande variedade de genes que codificam para proteínas da superfamília das TS em *T. cruzi*, aproximadamente 70% dos membros, codificam um produto enzimaticamente ativo, os quais são agrupados na Família ou grupo I. O segundo grupo, que abrange cerca de 70 genes, codifica produtos que, mesmo possuindo uma similaridade de 95% com as TS ativas, são enzimaticamente inativos. Isso se deve, principalmente, a uma mutação (Tyr342-His) na qual um resíduo de Tirosina, pertencente a um dos sítios catalíticos, foi substituído por uma Histidina, resultando em perda total da atividade. Apesar de não possuírem atividade catalítica, essas proteínas ainda são capazes de ligarem-se ao ácido siálico e a terminais de resíduos de galactose,

o que poderia apontar para um papel de ancoragem aos substratos ou à superfícies celulares (FRASCH, 2000), além de desencadear a transdução de sinais celulares, podendo exacerbar as reações imunopatológicas na doença de Chagas (TRIBULATTI *et al.*, 2005). O terceiro grupo, que contém centenas de genes e homologia de 30% com as TS ativas, codifica para proteínas que possuem o motivo VTVxNVFLYNR na região C-terminal e ausência do motivo Asp. O quarto e último grupo é composto por genes que codificam antígenos de superfície de formas tripomastigotas, cujas propriedades biológicas são desconhecidas. Entretanto, apresentam as repetições de aminoácidos na região C-terminal (SAPA) características e o motivo VTVxNVFLYNR que permitem incluí-los na superfamília das TS (FRASCH, 2000).

O foco deste trabalho é na família ou grupo I, o qual é constituído por proteínas com atividade de neuraminidase e/ou TS. Este grupo de enzimas catalisa a transferência do ácido siálico dos glicoconjugados da célula hospedeira, preferencialmente os resíduos da posição 2-3 de cadeias polissacarídicas, para um acceptor terminal de galactose, normalmente, mucinas ancoradas na membrana plasmática do parasita (SCHENKMAN *et al.*, 1994). A presença de vários genes que codificam para TS do grupo I foi observada em *T. rangeli* e *T. cruzi*, embora a atividade catalítica seja exclusivamente encontrada em *T. cruzi*. A atividade de TS nos parasitos é única, uma vez que não utiliza ácido-sialico-CMP como doador de monossacarídeo, como ocorre com as neuroaminidases ou sialittransferases presentes no complexo de Golgi dos organismos eucariontes (FRASCH, 2000). Este fato representa uma vantagem para sua utilização como potencial alvo terapêutico e diagnóstico.

A participação das TS ativas na interação do *T. cruzi* com a célula hospedeira já foi bastante investigada (MING *et al.*, 1993, SCHENKMAN *et al.*, 1994; 1994a; TOMLINSON *et al.*, 1994), revelando que a adesão e invasão da célula hospedeira envolvem moléculas da superfície da célula que contém ácido siálico (HALL *et al.*, 1992). A transferência destes 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). Mais recentemente foi demonstrado que a maior expressão da TS em tripomastigotas de cultura de células favoreceu a liberação mais rápida dessas formas do parasito do vacúolo parasitóforo para o citoplasma da célula hospedeira, pela de-sialilação de sialoglicoproteínas da membrana do fagolissoma (HALL *et al.*, 1992) e a sua subsequente diferenciação em amastigotas (SCHENKMAN, 2006). Este grupo de proteínas também apresenta relação na diminuição da resposta antígeno-específica dos

linfócitos T citotóxicos, através da adição de ácidos siálicos (“*Resialylation*”) na membrana plasmática dessas células (FREIRE-DE-LIMA *et al.*, 2010).

Considerando o reconhecimento, adesão, entrada do parasito na célula, saída do vacúolo fagocítico e escape do sistema imune do organismo, como momentos cruciais durante o estabelecimento da infecção pelo *T. cruzi* no hospedeiro mamífero, pouco se sabe sobre a ocorrência destes eventos em *T. rangeli*. Desta forma, é de extrema importância compreender os mecanismos diferenciais envolvidos durante todo o processo de infecção, uma vez que esses podem ser responsáveis pela diferença existente entre a patogenicidade destes dois parasitos.

Através da possibilidade de transfectar um modelo não patogênico para mamíferos (*T. rangeli*) com o gene que codifica uma enzima funcional relacionada à virulência de um organismo de mesmo gênero, porém patogênico (*T. cruzi*), será possível realizar um estudo detalhado desta enzima e do seu efeito biológico. Neste sentido a utilização do *T. rangeli* transfectado em estudos de interação, permitirá o estabelecimento de um modelo de estudo de alta relevância. Assim ampliar as vertentes de pesquisa dos processos envolvidos nos diferentes estágios de vida do *T. rangeli*, com a possibilidade de vislumbrar o esclarecimento dos mecanismos envolvidos em todas as etapas da infecção para este parasito.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a expressão heteróloga de uma trans-sialidase de *T. cruzi* por *T. rangeli* como ferramenta para estudos da interação celular patógeno-hospedeiro.

2.2 Objetivos Específicos

- Construir o plasmídeo para transfecção contendo o gene que codifica para uma trans-sialidase ativa (*TcTS*) de *T. cruzi*;
- Realizar a transfecção da cepa Choachí *T. rangeli* com o plasmídeo pTEX-TcTSeGFP;
- Avaliar no *T. rangeli* transfectado a presença de DNA que codifica para trans-sialidase (*TcTS*).
- Avaliar os níveis de expressão da trans-sialidase (*TcTS*) na cepa transfectada de *T. rangeli*;
- Determinar a citolocalização da trans-sialidase de *T. cruzi* (*TcTS*) expressa por *T. rangeli*;
- Avaliar a atividade de trans-sialidase no extrato protéico na cepa transfectada de *T. rangeli*.

3 METODOLOGIA

Em síntese, a amplificação do gene da trans-sialidase ativa (*TcTS*) de *T. cruzi* foi realizada via reação em cadeia da polimerase (PCR) a partir de um plasmídeo que contém a região codificante para este gene, excetuando-se as repetições C-terminais (SAPA). O produto dessa reação foi clonado, sequenciado e, posteriormente, utilizado para inserção em vetor de expressão seguida da transfecção dos parasitos *T. rangeli* da cepa Choachí. A presença do plasmídeo foi verificada através da realização de PCR utilizando o DNA extraído dos parasitos transfectados. A expressão plasmidial da *TcTS* foi confirmada através da observação direta da fluorescência da proteína verde fluorescente (GFP), ensaios de *western blot* e imunofluorescência indireta com anticorpos específicos. A atividade da proteína *TcTS* também foi avaliada, ainda que preliminarmente, utilizando método não radioativo, baseado na utilização de 3'-Sialilactose (3'SL) como doador e como acceptor, o 4-Metilumbeliferil- β -D-galactopiranoside (MUGal).

3.1 Parasitos

Neste trabalho a cepa base para as transfecções foi a Choachí de *T. rangeli*. Esta cepa foi originalmente isolada de glândulas salivares de *Rhodnius prolixus* naturalmente infectado capturado na Colômbia (SCHOTTELIUS, 1987). Os epimastigotas da cepa Choachí selvagem (não transfectada), bem como da cepa Choachí transfectada com os plasmídeos pTEXeGFP e pTEX-TcTSeGFP foram cultivados a 27 graus Celsius (°C) em meio LIT (do inglês *Liver Infusion Tryptose*) suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF), 50 U/ml de penicilina e 50 μ g/ml de estreptomicina (Cultilab, Campinas) através de repiques semanais. Salienta-se que a cepa original foi previamente submetida à passagem em triatomíneos e camundongos.

Formas epimastigotas da cepa Y de *T. cruzi* também foram cultivadas em meio LIT suplementado com 10% de SBF a 27°C através de passagens semanais. Todas as cepas utilizadas no presente estudo estão criopreservadas no laboratório de Protozoologia (MIP/CCB/UFSC).

Para a recuperação dos parasitos pós-transfecção utilizou-se o meio McNeal, Novy & Nicolle + LIT (NNN+LIT), também chamado Ágar-sangue.

Tripomastigotas de cultura de *T. rangeli* foram obtidos no sétimo dia de cultivo em meio DMEM (do inglês *Dulbecco's Modified Eagle Medium*) pH 8,0 (Sigma-

Aldrich, Saint Louis) a partir de modificações da técnica descrita por Koerich *et al.* (2002). Inicialmente, 12×10^7 epimastigotas em fase exponencial de crescimento, em meio LIT, foram lavados duas vezes com PBS (Tampão salina fosfato) pH 7,4 e transferidos para garrafas de cultura celular de 25 cm² contendo 15 ml de meio DMEM pH 8,0 suplementado com 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 determinação da porcentagem de formas tripomastigotas em microscópio óptico após a coloração dos parasitos com Giemsa (Merck, Darmstadt). Os tripomastigotas foram obtidos entre o sétimo e oitavo dia de cultivo, sendo coletados por centrifugação quando taxas maiores que 95% de tripomastigotas foram observadas.

Para obtenção de tripomastigotas de cultura de *T. cruzi* foram utilizadas células Vero (célula epitelial derivada de rim de macaco verde africano). As células foram cultivadas em meio DMEM, com 5% de SBF a 37°C em 5% de CO₂ através de passagens semanais ou quando atingiram confluência celular. As monocamadas de células foram infectadas com a cepa Y de *T. cruzi* e as formas tripomastigotas foram obtidas do sobrenadante das culturas após 72 horas de infecção (EGER-MANGRICH *et al.*, 2001), sendo lavadas em PBS pH 7,4 antes dos ensaios, conforme o descrito acima.

3.2 Obtenção do gene da *TcTS* e ligação no vetor de expressão

3.2.1 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

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

As reações foram padronizadas na presença de uma unidade da enzima *Taq* DNA polimerase no tampão do fabricante (Invitrogen, Carlsbad), 1,5 mM de MgCl₂, 2 mM de dNTP (desoxinucleotídeo trifosfatado) (Invitrogen, Carlsbad), 10 pmol de cada

iniciador e 50 ng de DNA molde. A amplificação foi realizada em um termociclador *Mastercycler® Gradient* (Eppendorf, Hamburg), iniciando com uma etapa de desnaturação a 94°C por dois minutos, seguida por 35 ciclos contendo uma etapa de desnaturação (94°C por 30 segundos), uma etapa de ligação dos iniciadores (58°C por 45 segundos) e uma etapa de alongação do DNA pela polimerase (72°C por dois minutos). Ao término destes ciclos, as amostras foram submetidas a uma extensão final da cadeia de DNA a 72°C por 5 minutos. O resultado da PCR foi observado em eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio (1 µg/ml), sendo os resultados registrados digitalmente.

3.2.2 Clonagem dos insertos de interesse

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

3.2.3 Extração do DNA plasmidial e digestão com enzimas de restrição

Os clones contendo o gene da *TcTS* foram crescidos a 37°C sob agitação por 15 horas em 5 ml de meio LB contendo ampicilina (100µg/ml). Decorrido o tempo de crescimento, os plasmídeos recombinantes foram extraídos através do procedimento padrão de lise alcalina (“*mini-prep*”), conforme descrito por Sambrook e colaboradores (2001).

3.2.4 Subclonagem em vetor de expressão

A construção do plasmídeo para expressão heteróloga foi realizada utilizando como base o plasmídeo pTEXeGFP (KELLY *et al.*, 1992) (figura 4), o qual foi

gentilmente cedido pelo Dr. John Kelly da *London School of Tropical Medicine and Hygiene*, Reino Unido. Este plasmídeo possui ligado ao sítio múltiplo de clonagem o gene da GFP de *Aequoria victoria*.

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

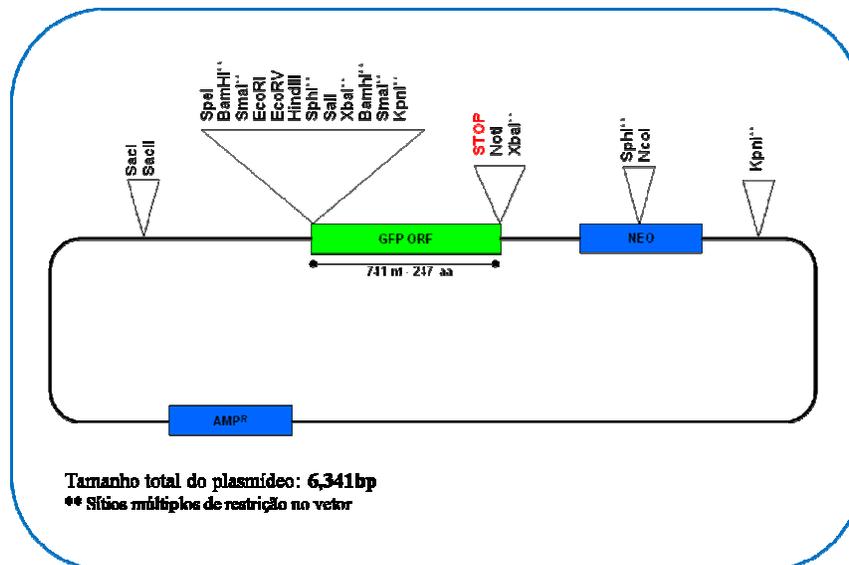


Figura 4. Mapa do plasmídeo base pTEXeGFP, indicando os sítios de enzimas de restrição.

O gene da *TcTS* pode ser inserido no vetor pTEXeGFP devido às extremidades coesivas de ambas as sequências, decorrentes da digestão com a mesma enzima de restrição. A ligação ocorreu na presença de 3 unidades da enzima T4 DNA ligase (BioLabs, Ipswich), no tampão do fabricante durante 16 horas a 16°C. Os produtos de ligação foram utilizados para transformação de células eletrocompetentes *E. coli* DH5- α , nas mesmas condições descritas no item 3.2.2. Após a seleção dos clones contendo os insertos desejados, através de PCR diretamente das colônias, os clones positivos foram crescidos em meio LB suplementados com ampicilina 100 μ g/ml, durante 16 horas a

37°C também submetidos a extração do DNA plasmidial através de *mini-prep* (SAMBROOK *et al.*, 2001).

3.3 Sequenciamento e análise da *TcTS*

3.3.1 Sequenciamento do inserto

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

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

3.3.2 Análise da sequência

Todas as análises foram realizadas com o apoio do Laboratório de Bioinformática (MIP/CCB/UFSC). Primeiramente, as sequências geradas foram analisadas quanto à sua qualidade utilizando-se o pacote *Phred/Phrap/Consed* (<http://www.phrap.org>). Neste pacote cada nucleotídeo sequenciado recebe um valor de qualidade dado pela fórmula $q = -10 \log_{10}(p)$ onde q e p são respectivamente o valor de qualidade e a probabilidade de erro de uma determinada base. As sequências nucleotídicas que não apresentaram um valor mínimo de qualidade ($Phred \geq 20 = <1$ erro a cada 100 bases) foram descartadas e novamente sequenciadas. A confirmação da identidade dos fragmentos e sua comparação com outros organismos foi realizada através da ferramenta *blastx* do programa BLAST utilizando-se a base de dados não redundante, disponível no GenBank (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

A partir do programa *ProtParam* do pacote ExPASy (*Expert Protein Analysis System*) (<http://expasy.org>), foi possível prever a massa da proteína *TcTS* e, utilizando-se o programa *Conserved Domains Search Service* - NCBI

(<http://ncbi.nlm.nih.gov/structure/cdd/wrpsb.cgi>), foi possível identificar os domínios conservados (motivos e sítios catalíticos) presentes na sequência aminoacídica. As análises de identidade e similaridade entre as sequências de TS de organismos filogeneticamente relacionados foram realizadas através dos programas *ClustalW* e *EMBOSS pairwise* (<http://ebi.ac.uk>), sendo as sequências obtidas nas bases de dados do GenBank e também do *Kinetoplastid Genomics Resource* – TriTrypDB (<http://tritrypdb.org>).

3.4 Transfecção dos parasitos

Os ensaios de transfecção foram realizados utilizando os kits *Basic Parasite Starter Nucleofector* ou o *Human Dendritic Cell Nucleofector* (Lonza, Basel) conforme as instruções do fabricante. Basicamente, 2×10^6 parasitos foram lavados duas vezes em PBS pH 7,4, adicionados de 100 µl do tampão de eletroporação do kit e 10 µg do DNA plasmidial. Todo o volume desta suspensão foi transferido para cubetas de eletroporação de 0,4 centímetros (cm) de abertura e submetido à eletroporação no aparelho *Nucleofector*[®] (Lonza, Basel) em condições elétricas estabelecidas pelos programas U-33 e U-002, para os kits *Basic Parasite Starter Nucleofector* e *Human Dendritic Cell Nucleofector*, respectivamente. Após um único pulso, os parasitos foram transferidos para tubos contendo 2 ml de meio NNN-LIT. Após 48 horas a 27°C, as culturas foram acrescidas de G418 (Geneticin) (Sigma-Aldrich, Saint Louis) em uma concentração inicial de 25 µg/ml. Os parasitos foram então mantidos em fase exponencial de crescimento a 27°C através de repiques semanais em meio LIT suplementado com 10% SBF e crescentes concentrações de G418 (50, 100, 200, 300, 500 e 1.000 µg/ml).

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

e todos os produtos de PCR obtidos foram visualizados em géis de agarose corados pelo brometo de etídio (1 µg/ml) e registrados digitalmente.

3.5 Detecção dos produtos de expressão plasmidial

Com o intuito de confirmar e avaliar o nível de expressão da proteína heteróloga em *T. rangeli* foi realizada a observação direta da fluorescência da GFP, ensaios de imunofluorescência indireta e de *western blot* com anticorpos específicos (tabela 1).

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

Anticorpo	Tipo	Tamanho	Diluição Western blot	Diluição RIFI
TcTS sítio catalítico (mAb39) <i>T. cruzi</i>	Policlonal IgG coelho	100-200kDa	1:500	1:500
TcTS SAPA <i>T. cruzi</i>	Antissoro IgG camundongo	100-200kDa	1:750	1:100
GFP <i>A. victoria</i>	Monoclonal IgG camundongo	26 kDa	1:200	1:50
TAT-1 Alfa Tubulina <i>T. brucei</i>	Monoclonal IgG camundongo	55 kDa	1:10.000	----

3.5.1 Fluorescência Direta

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

3.5.2 Citolocalização por ensaios de imunofluorescência indireta (RIFI)

Para os ensaios de RIFI foram utilizadas formas epimastigotas de *T. rangeli* da cepa Choachí selvagem e transfectada, assim como formas epimastigotas e tripomastigotas de *T. cruzi*. Os parasitos foram coletados após centrifugação a 3.000 x g (10 minutos) e duas lavagens com PBS pH 7,4, tendo sua concentração ajustada para 1

x 10⁶ células/ml. Dessa suspensão, 50 µl foram depositados sobre uma lamínula circular (diâmetro de 13 mm) em placa de poliestireno de 24 cavidades. Foram utilizados 20 minutos para a adesão dos parasitos, seguidos da fixação com paraformaldeído a 4% diluído em PBS pH 7,4 durante cinco minutos. As lamínulas foram, então, submetidas a três lavagens de cinco minutos cada em PBS pH 7,4, sob leve agitação, sendo que as etapas subsequentes foram também intercaladas com lavagens nessas condições. A permeabilização dos parasitos, quando necessária, foi realizada com o detergente Nonidet 40 (NP-40) a 0,5% durante cinco minutos. O bloqueio de sítios de ligação inespecíficos foi feito durante 1 hora à temperatura ambiente com solução de leite desnatado a 5% diluído em PBS pH 7,4. Os diferentes anticorpos primários, anti-*TcTS* sítio catalítico e anti-*TcTS* SAPA, gentilmente cedidos pelo Dr. Sérgio Schenkman da Universidade Federal de São Paulo, anti-GFP (Santa Cruz, Biothecnology) e anti-TAT-1-Tubulina foram diluídos em solução de leite desnatado em PBS pH 7,4 a 2%, sendo então mantidos sobre a lamínula durante 90 minutos a temperatura ambiente. Após novas lavagens, os anticorpos secundários anti-IgG de camundongo ou anti-IgG de coelho, ambos conjugados a Alexa-fluor 488 ou Alexa-fluor 594 (Molecular Probes, Carlsbad) foram diluído (1:1.000) em solução de leite desnatado em PBS pH 7,4 a 2%, e mantidos sobre as lamínulas por 15 minutos protegido da luz. As lamínulas foram coradas com 1 µg/ml de 4',6-diamidino-2-fenilindole (DAPI) por cinco minutos, lavadas novamente e montadas com o reagente *Hydromount* (National Diagnostics, Atlanta) em lâminas de vidro. As análises foram realizadas em microscópio óptico de fluorescência Olympus – Bx40–FL (Olympus, Tóquio) e digitalmente registradas.

3.5.3 Avaliação do nível de expressão das proteínas *TcTS* por *western blot*

Para os ensaios de *western blot* foram utilizados os extratos protéicos de formas epimastigotas e tripomastigotas de *T. rangeli* e de *T. cruzi* selvagem e epimastigotas de *T. rangeli* transfectados (pTEXeGFP, pTEX-TcTSeGFP).

Extratos protéicos totais foram obtidos através da adição de tampão de lise (50mM NaCl, 200mM Tris-HCl pH 8,0, 1% Triton X-100) previamente aquecido a 90°C. Após homogeneização e centrifugação a 12.500 x *g* por 20 minutos 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 foi misturado com tampão de amostra (20% glicerol, 0,5% azul de bromofenol, 0,5 M Tris-HCl pH 6,8, 4,4% SDS e 2% β-

mercaptoetanol), aquecidos a 95°C por cinco minutos e submetidos à separação eletroforética em gel SDS-PAGE (do inglês *Sodium Dodecyl Sulfate – Polyacrylamide Gel Electrophoresis*) 12%, a 100 volts (V). As proteínas foram então transferidas para membranas de nitrocelulose *Hybond-ECL*[®] (GE Healthcare, Buckinghamshire) durante 3 horas a 100 V, com modificações da técnica descrita por Towbin e colaboradores (1979). Após confirmação da transferência das proteínas pela coloração com Ponceau 1%, as membranas foram bloqueadas com leite desnatado 5% diluído em tampão de transferência (25 mM Tris-HCl, pH 7,4; 150 mM NaCl e 0,1% Tween 20) durante 1 hora a temperatura ambiente. As membranas foram mantidas em solução de leite desnatado a 2% em tampão de transferência contendo o anticorpo primário por 90 minutos sob agitação branda a temperatura ambiente e obedeceu a diferentes condições conforme o indicado na tabela 1. O anticorpo secundário (1:10.000) anti-IgG de camundongo/coelho conjugado à peroxidase (Sigma-Aldrich, Saint Louis) foi utilizado para os ensaios com incubação de uma hora. Entre cada etapa as membranas foram lavadas por cinco minutos, cinco vezes cada, com tampão de transferência sob agitação branda.

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

3.6 Ensaios de atividade funcional da trans-sialidase de *T. rangeli*- TcTS

A metodologia utilizada para o experimento foi proposta por Schrader *et al.* (2003). Um único ensaio foi realizado em um volume final de 25 µl contendo 7,5 µl extrato protéico total dos parasitos, 100mM PIPES (Piperazina-1,4-bis (ácido 2-etanosulfônico)/NaOH (pH 7.0); 0,55 mM 3'-Sialilactose (3'-SL, doador) (Sigma-Aldrich, Saint Louis) e 0,5 mM do acceptor MUGal (Sigma-Aldrich, Saint Louis), sendo mantidos por 45 minutos a 20°C. A reação foi interrompida através da transferência de todo o volume de reação para um microtubo contendo 1 ml de água ultrapura gelada. Durante este período foram preparadas as colunas de separação com 0,3 ml *Q-Sepharose Fast Flow* (GE Healthcare, Buckinghamshire), sendo estas lavadas inicialmente com água ultrapura. A reação foi adicionada no centro da coluna equilibrada e mantida a temperatura ambiente por 1 minuto. Em seguida, as colunas

foram centrifugadas a 150 x g, e o excesso de MUGal da coluna foi retirado através de três lavagens com 1 ml de água ultrapura e uma com 75 µl de 1M HCl.

O produto ligado a coluna, substrato com ácido siálico incorporado, foi eluído com 450 µl de 1M HCl, e este foi mantido por 45 minutos a 95°C. Após este período as amostras foram neutralizadas pela adição de 150 µl de 2M NaOH e 300 µl 1M glicina/NaOH pH 10 e misturadas vigorosamente. A reação foi transferida para uma placa de 24 poços e a fluorescência foi avaliada a 365nm (excitação) e 450nm (emissão) em aparelho *Infinite 200 PRO multimode reader* (Tecan), sendo os resultados expressos em valores relativos de fluorescência.

3.7 Biossegurança

Tendo gerado e manipulado organismos geneticamente modificados (OGM), o presente estudo foi inteiramente realizado no Laboratório de Protozoologia da UFSC, o qual está incluído no Certificado de Qualidade em Biossegurança da UFSC (Número 101/99) expedido pela Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio).

4 RESULTADOS

4.1 Construção do plasmídeo, sequenciamento e análises da sequência

Após a reação de PCR (figura 5A), um único produto de aproximadamente 2 Kb foi obtido para o gene da *TcTS*. Este foi clonado utilizando-se o *kit* pGEM-T-Easy[®]. Dos clones recombinantes contendo o inserto de interesse, os plasmídeos foram extraídos através de um procedimento padrão de lise alcalina. Para a expressão heteróloga da *TcTS* de *T. cruzi* por *T. rangeli*, uma nova construção plasmidial foi gerada a partir da ligação dos produtos da digestão dos plasmídeos pGEM-TcTS e pTEXeGFP com a enzima de restrição *SalI* (figura 5B). Após a transformação, oito clones positivos foram obtidos, submetidos à extração de DNA plasmidial (figura 5C) e posteriormente a quantificação do DNA através de espectrofotometria.

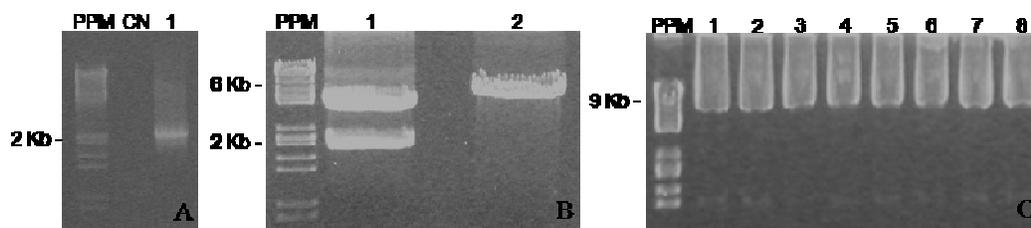


Figura 5. Eletroforese em gel de agarose a 1% corado pelo brometo de etídeo revelando (A) o controle negativo da reação (CN) e produto de amplificação de 2 Kb do fragmento do gene *TcTS* de *Trypanosoma cruzi* (1); (B) os produtos de digestão dos plasmídeos pGEM-TcTS (1) e pTEXeGFP (2) com a enzima *SalI*; (C) a extração de DNA plasmidial dos clones obtidos correspondentes ao pTEX-TcTSeGFP (1-8). PPM- Padrão de Peso Molecular (DNA de Fago lambda digerido com *HindIII*).

Todos os plasmídeos obtidos foram sequenciados e as sequências obtidas foram primeiramente analisadas quanto à sua qualidade utilizando-se o pacote *Phred/Phrap/Consed*. Para todos os plasmídeos obtidos foi possível confirmar a identidade do gene da *TcTS* de *T. cruzi* através do programa BLAST. Entretanto, dentre os diferentes clones sequenciados, somente um apresentava o gene da *TcTS* na fase correta de leitura e foi o utilizado para as transfecções posteriores, sendo o plasmídeo denominado pTEX-TcTSeGFP, contendo os genes da *TcTS* e GFP como indicado na figura 6.

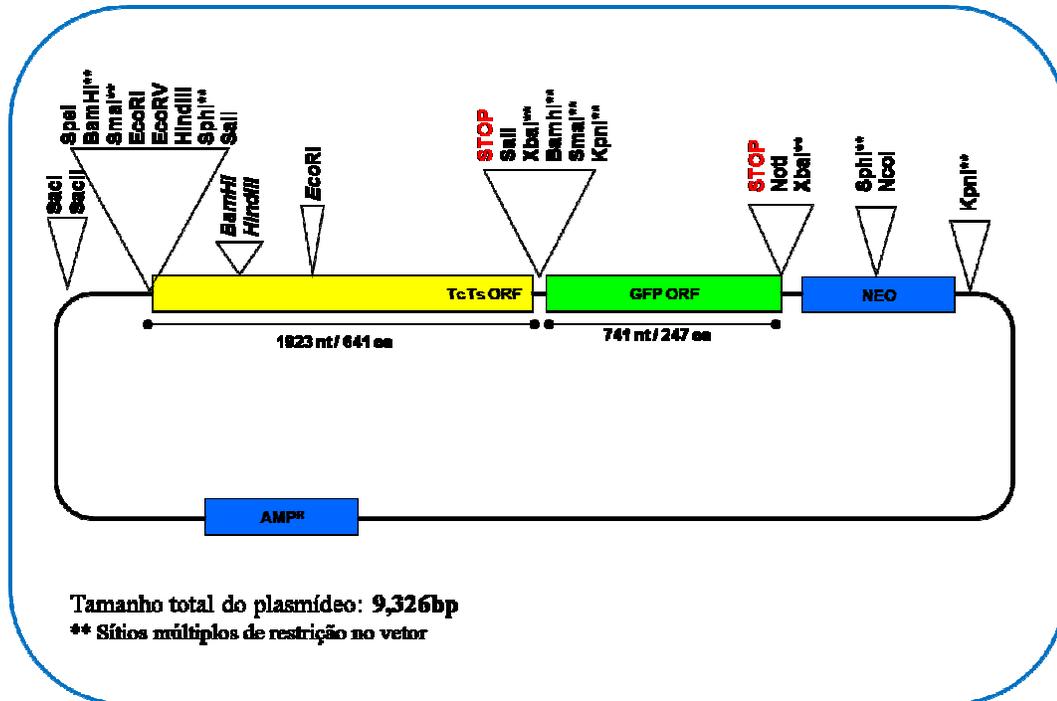


Figura 6. Representação esquemática do plasmídeo pTEX-TcTSeGFP indicando as posições dos sítios para enzimas de restrição e as posições dos genes da *TcTs* de *Trypanosoma cruzi* e da GFP.

A partir desta sequência de nucleotídeos também foi realizada a predição da sequência aminoacídica da proteína para análises subsequentes. Inicialmente, os motivos característicos das proteínas pertencentes ao grupo I da superfamília das TS presentes na porção N-terminal para as proteínas de *T. cruzi* foram encontrados na sequência obtida. Dentre estes, estão evidenciados na figura 7 o motivo Asp, o motivo VTV, e sete aminoácidos relacionados ao sítio catalítico. Além disso, através da sequência aminoacídica do gene da *TcTs* de *T. cruzi* foi possível prever que o tamanho esperado da proteína a ser expressa está em torno de 70,4 kDa.

```

      10      20      30      40      50      60      70      80      90     100
TcTS_aa  MAPGSSRVLEFKRQSSKVPFEKDGKVTERRVHFRLLPALNVNVDGVNVAIADARVETSUNSLIDTVAKYSVDDGETWETQIAIKNSRASVSRRVVDPTVI
      110     120     130     140     150     160     170     180     190     200
TcTS_aa  VKGNKLYLVVGSYNSRSYNTSHGDARDWDILLAVGEVTKSTAGGKITASIKWGSVSLKEFFPAEMEGFMHTNQFLGGAGVAIVASNGNLVVEVQVTHKK
      210     220     230     240     250     260     270     280     290     300
TcTS_aa  KQVFSKIEYSEDEGKTNKFGEGRSDFGCSSEPVALEWEGKLIINTRVDYRRRLVYESSDMGHSWVEAVGTLSRVVNGPSPKSNQPGSQSSFTAVTIEGHEVM
      310     320     330     340     350     360     370     380     390     400
TcTS_aa  LFTHPLNFKGRWLRDRLNLWLTDNQRIYNYGQVSI GDENSATYSSVLYKDDRLYCLHEINSNEVYSLVFARLVGELRIIKSVLQSWNWDSSLSSICTPAD
      410     420     430     440     450     460     470     480     490     500
TcTS_aa  PAASSSERGCGPAVTVGLVGFLSHSATKTEWEDAYRCVNASTANAERVPNGLKEAGVGGALWPVVSQGGQNRVHFANHAFTLVASVTIHEVFSVASPL
      510     520     530     540     550     560     570     580     590     600
TcTS_aa  LGASLDSSGGKLLGLSYDEKIQWQPIYGSTPVTPTGSEWEMGRYHVLTNANKIGSVYIDGEPLEGSQTTVVPDERTPDISHFYVGGYGRSDMPTISIV
      610     620     630     640
TcTS_aa  TVNIVLLYNRLNAEEIRTLFLSQDLIGTEAHHGSSSSSER*

```

Figura 7. Sequência aminoacídica da TcTS de *Trypanosoma cruzi* presente no plasmídeo pTEX-TcTSeGFP com diferentes motivos identificados: aminoácidos relacionados ao sítio catalítico (*); domínio Asp (*) e domínio VTV (*).

A sequência da *TcTS* utilizada na construção do plasmídeo pTEX-TcTSeGFP foi alinhada de duas diferentes maneiras com a sequência de uma TS de *T. cruzi* (acesso: BAA09334.1). No primeiro caso, um alinhamento com 99% de similaridade foi encontrado utilizando-se somente uma parte da sequência existente no banco de dados retirando-se a porção C-terminal relacionada às repetições SAPA. No segundo caso, utilizando ambas as sequências completas a similaridade encontrada foi reduzida a 60,2%, indicando a ausência das repetições SAPA na sequência da *TcTS* presente no vetor de expressão.

Quando a sequência completa da TS de *T. cruzi*, foi usada na comparação com sequências correspondentes a sialidases presentes nos bancos de dados foi possível observar uma similaridade de: 46,7%, com a sialidase de *T. rangeli* (AAC47213.1) (Figura 8), 33,7% com a sialidase de *T. brucei* (Tb927_08_v4-6-2109233-2106987), 35,6% com *T. congolense* (T.congo_bin_contig_1422-5-22549-20174) e de somente 13,5% com uma neuroaminidase humana (CAB41449.1).

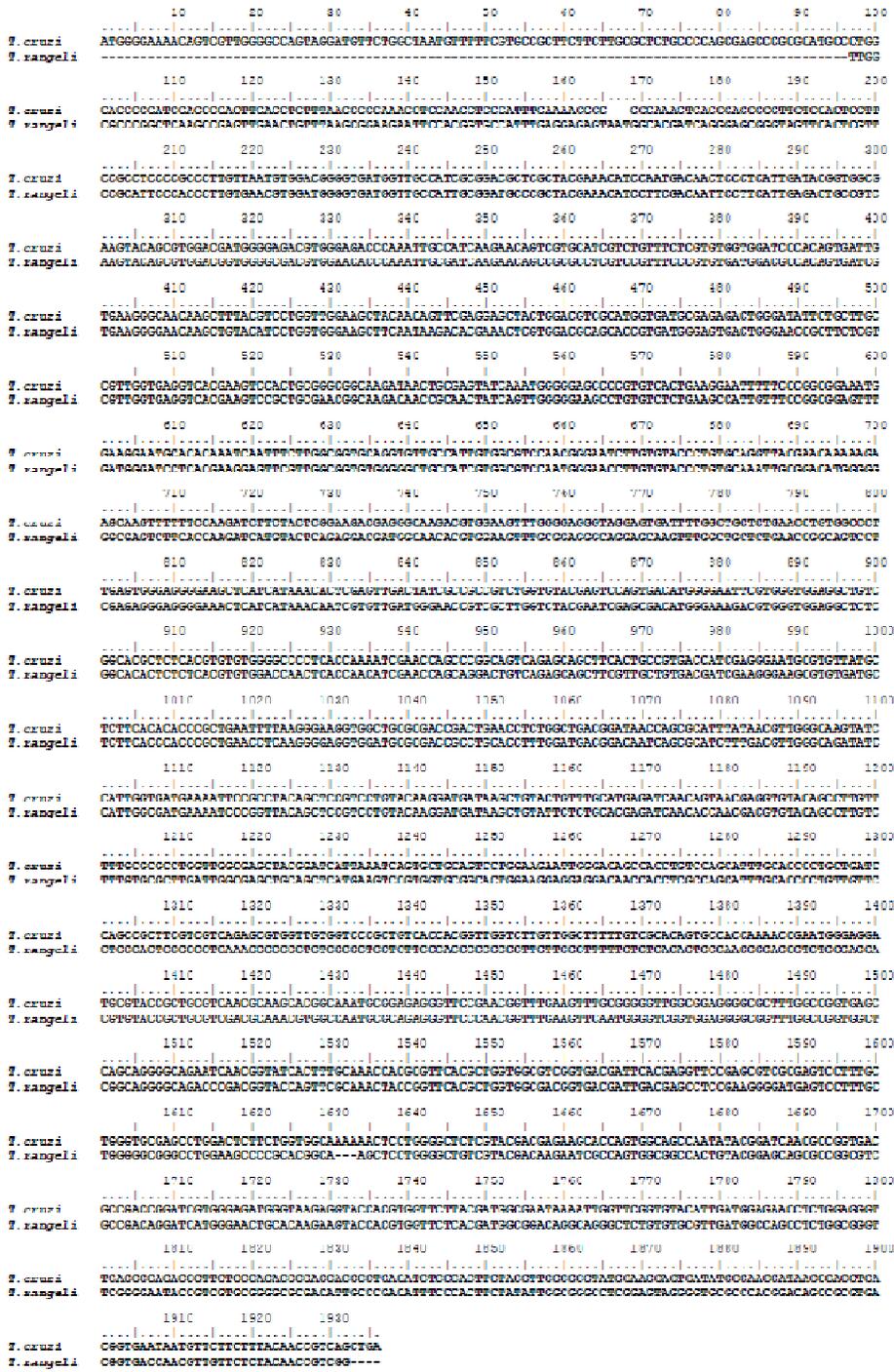


Figura 8: Alinhamento das sequências de TS de *Trypanosoma cruzi* e Sialidase de *Trypanosoma rangeli*.

4.2 Transfecção e Expressão Heteróloga

Após a construção e caracterização do plasmídeo, os ensaios de transfecção dos parasitos foram realizados utilizando dois kits distintos. O primeiro kit utilizado era

destinado a transfecção de protozoários parasitos (*Basic Parasite Nucleofector Kit*) e o segundo para a transfecção de células dendríticas humanas (*Human Dendritic Cell Nucleofector Kit*). A transfecção foi realizada de acordo com as instruções do fabricante sendo a seleção iniciada após 24 horas. Transcorridas 24 horas após a primeira dose de G418 (25 µg/ml) a detecção dos produtos de expressão plasmidial foi realizada em microscópio de fluorescência, onde parasitos emitindo fluorescência foram observados, evidenciando o sucesso da transfecção e a expressão da GFP pelo parasito (figura 9). As linhagens transfectadas a partir deste momento passaram a ser tratadas como “*T. rangeli*-TcTS”.

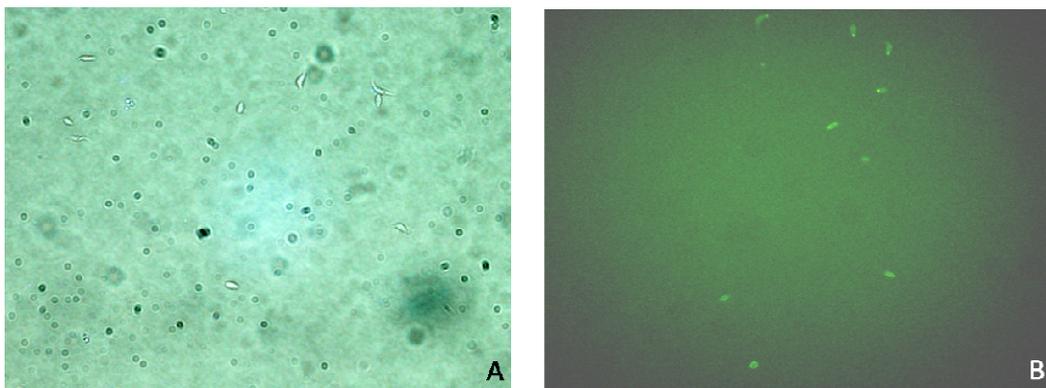


Figura 9. *Trypanosoma rangeli* expressando GFP como indicativo de co-expressão da TcTS de *T. cruzi*, após 24 horas da adição de 25µg/ml de G418. (A) Campo claro; (B) Fluorescência a 490nm. Objetiva de 40.

Para selecionar os parasitos que possuam maior expressão, doses crescentes de G418 passaram a ser utilizadas, incluindo concentrações de 50; 100; 200; 300; 500 até 1.000 µg/ml. Os parasitos transfectados através do kit de parasitos, assim como aqueles obtidos pelo kit de células dendríticas apresentaram resultados semelhantes quando consideradas a intensidade da fluorescência direta e a sobrevivência aos acréscimos de G418. Além disso, a intensidade da fluorescência foi, em ambos os casos, diretamente proporcional a concentração de G418 utilizada, como pode ser observado comparativamente entre os parasitos mantidos na presença de 300 µg/ml (figuras 10A e 10C) e 1.000 µg/ml (figuras 10B e 10D). A distribuição da fluorescência também foi diferenciada conforme a concentração de G418, onde uma localização pontual na extremidade posterior é majoritariamente presente na concentração de 300 µg/ml em comparação a uma localização dispersa na concentração de 1.000 µg/ml. Considerando estes resultados, pode-se inferir que a pressão exercida pela presença crescente de G418

resultou na seleção dos parasitos que possuem maior número de cópias do plasmídeo e/ou que apresentam maior expressão de produtos plasmidiais.

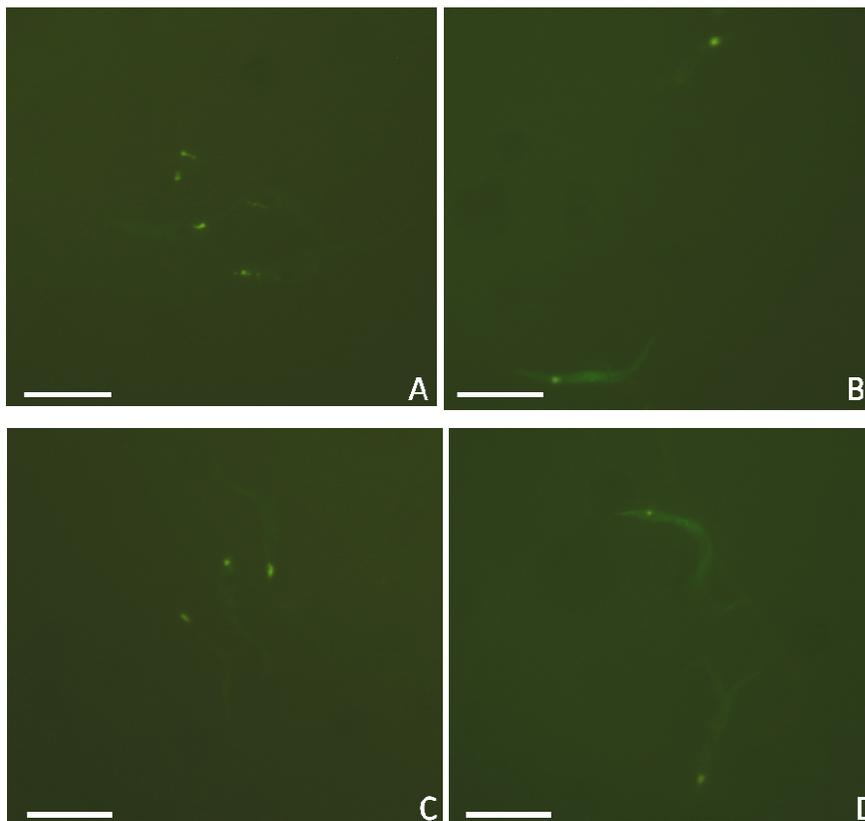


Figura 10. Visualização da expressão de GFP por fluorescência direta no *Trypanosoma rangeli* transfectado com o plasmídeo pTEX-TcTSeGFP : (A) – Kit Parasito: 300 µg/ml; (B) - Kit Parasito:1000 µg/ml; (C) – Kit Célula dendrítica: 300 µg/ml e (D) - Kit Célula dendrítica: 1000 µg/ml. Objetiva de 100. A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

4.3 Avaliação da presença do DNA plasmidial no *T. rangeli* transfectado por PCR

Com o intuito de verificar a presença de DNA codificante para a *TcTS* nas cepas de *T. rangeli* transfectadas foram realizadas reações de amplificação via PCR. Para tanto, dois pares diferentes de iniciadores, TcTS-F2/ TcTS-R2nt e pTEX-F/GFP-R foram utilizados. O primeiro par de iniciadores amplifica a região codificante do gene da *TcTS* de *T. cruzi*, sendo que um produto de aproximadamente 1,9 Kb é esperado nas amostras contendo o DNA dos transfectantes, o DNA plasmidial e o DNA genômico de *T. cruzi* (figura 11A). Já o segundo par de iniciadores se liga ao plasmídeo pTEXeGFP, amplificando o inserto contido entre a região regulatória e o gene da GFP. Neste caso, um produto de aproximadamente 2,1 Kb é esperado para as amostras contendo o DNA dos transfectantes e o DNA plasmidial controle (figura 11B). Para ambos os pares de iniciadores foi observado o padrão de amplificação de acordo com o esperado, sendo

que todas as amostras correspondentes aos parasitos transfectados foram positivas para a presença de DNA correspondente ao plasmídeo utilizado na transfecção. A amostra contendo DNA de *T. cruzi* na amplificação com o segundo par de iniciadores apresentou uma banda inespecífica de tamanho inferior ao esperado, não sendo considerada como positiva para a presença do fragmento esperado. Vale ressaltar que não se observou diferença entre o padrão de amplificação para as amostras obtidas com os distintos kits de transfecção utilizados, para ambos os pares de iniciadores.

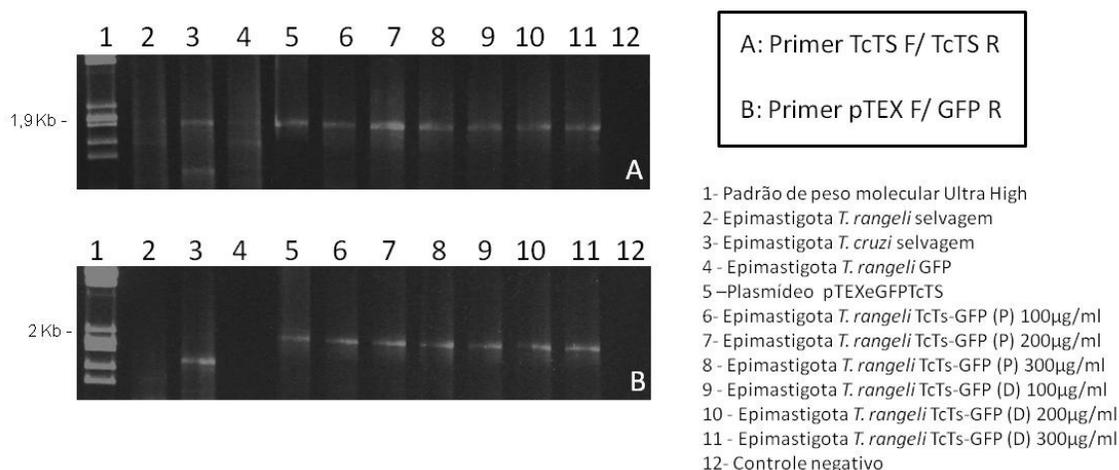


Figura 11. Eletroforese em gel de agarose a 1% corado pelo brometo de etídeo revelando o resultado da PCR utilizando diferentes pares de iniciadores. (A) uma banda de aproximadamente 1,9 Kb referente ao gene da *TcTS* e (B) banda de cerca de 2,1 Kb resultante da amplificação referente ao plasmídeo.

4.4 Avaliação da expressão e citolocalização da GFP e *TcTS* por imunofluorescência indireta

No intuito de avaliar os locais de expressão das proteínas heterólogas, foram realizados ensaios de imunofluorescência indireta utilizando os anticorpos dirigidos ao sítio catalítico e às repetições SAPA da *TcTS*, assim como um anticorpo anti-GFP (figura 12). Vale ressaltar que para os todos os anticorpos foram testadas duas condições, com e sem a utilização prévia de agente permeabilizante. Para o anticorpo anti-*TcTS* sítio catalítico, uma maior intensidade de fluorescência foi detectada para as amostras permeabilizadas em comparação às não tratadas. Uma fluorescência variável em intensidade foi observada para as amostras de *T. rangeli* GFP, formas epimastigotas e tripomastigotas de *T. cruzi* e para os parasitos transfectados cultivados em diferentes concentrações de G418. As formas tripomastigotas de *T. cruzi* apresentaram uma maior

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

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

O reconhecimento relacionado ao anticorpo anti-GFP foi positivo para as amostras de *T. rangeli* transfectado com o plasmídeo pTEXeGFP e para as transfectadas com pTEX-TcTSeGFP. Evidenciou-se a tendência de aumento da intensidade da fluorescência proporcional ao aumento a concentração de G418 utilizada no cultivo, conforme o já descrito na literatura. Também é possível observar que distribuição da proteína é preferencialmente pontual nas amostras transfectadas com o plasmídeo pTEX-TcTSeGFP, enquanto que para os parasitos transfectados com o plasmídeo pTEXeGFP a fluorescência está dispersa uniformemente pelo citoplasma.

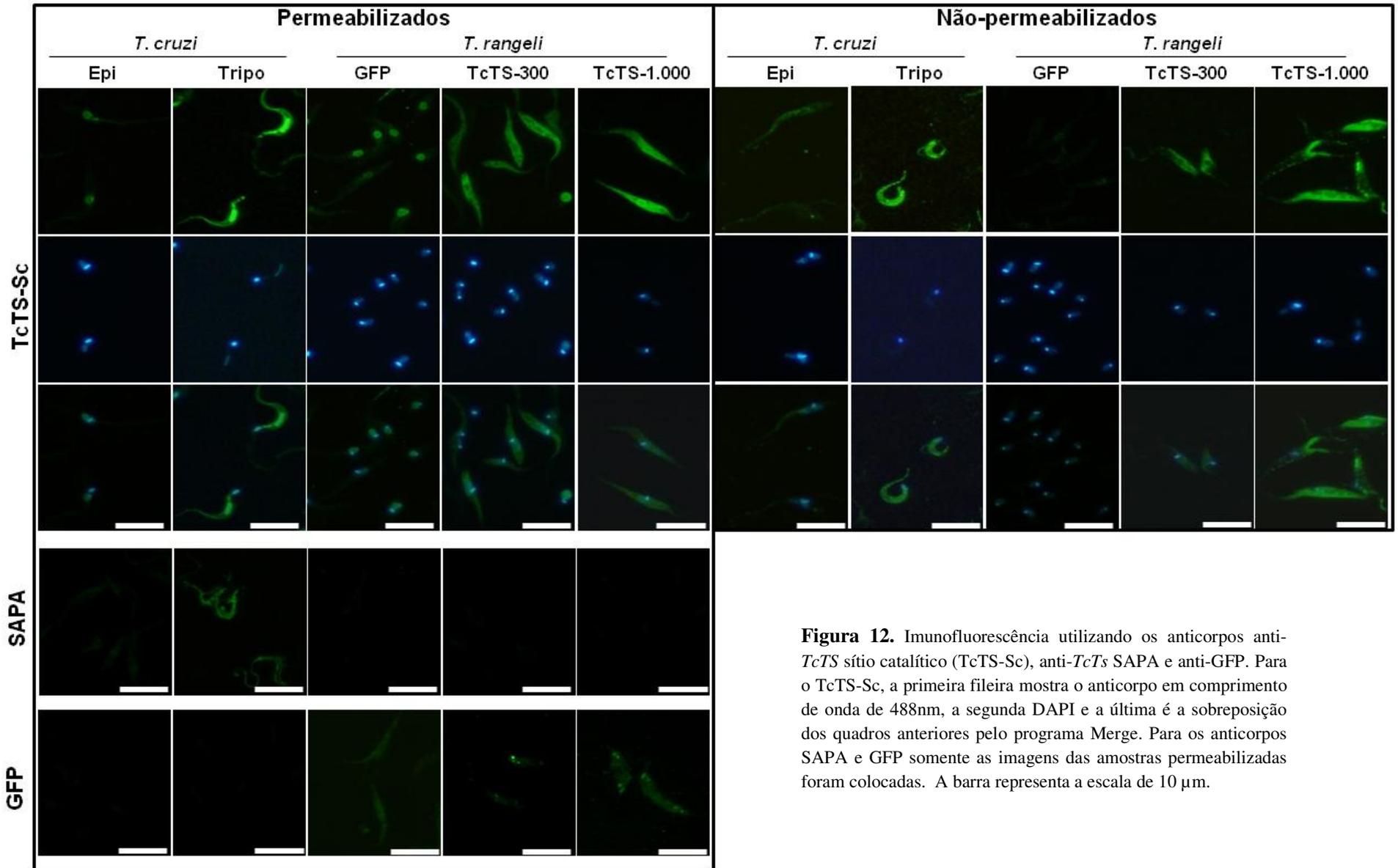


Figura 12. Imunofluorescência utilizando os anticorpos anti-*TcTS* sítio catalítico (TcTS-Sc), anti-*TcTs* SAPA e anti-GFP. Para o TcTS-Sc, a primeira fileira mostra o anticorpo em comprimento de onda de 488nm, a segunda DAPI e a última é a sobreposição dos quadros anteriores pelo programa Merge. Para os anticorpos SAPA e GFP somente as imagens das amostras permeabilizadas foram colocadas. A barra representa a escala de 10 μ m.

4.5 Avaliação da expressão heteróloga da *TcTS* de *T. cruzi* por *T. rangeli* através de *western blot*

Os mesmos anticorpos utilizados nos ensaios de imunofluorescência foram avaliados em ensaios de *western blot* (figura 13).

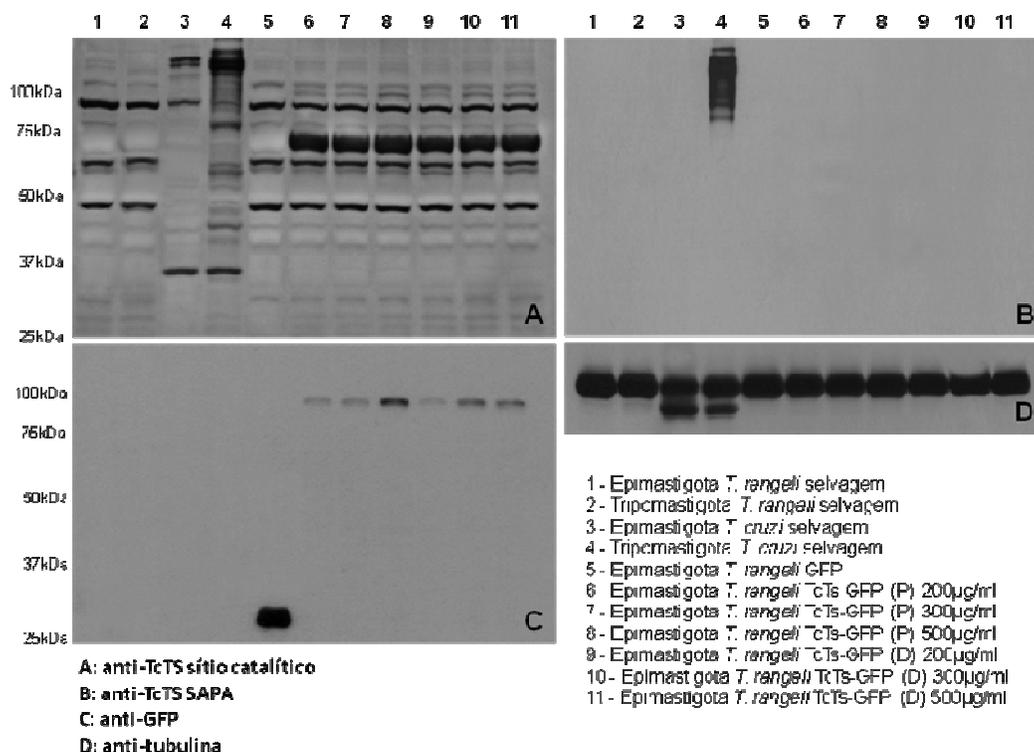


Figura 13. Análise da expressão de *TcTS* (A e B), GFP (C) e alfa tubulina (D) em extratos protéicos totais de *Trypanosoma rangeli* cepa Choachí selvagem, *T. cruzi* cepa Y e *T. rangeli* transfectado com os plasmídeos pTEXeGFP e pTEX-TcTSeGFP sob diferentes concentrações de G418, através de ensaios de *western blot* utilizando os anticorpos contra *TcTS* sítio ativo, *TcTS* SAPA, GFP e alfa tubulina.

O soro policlonal anti-*TcTS* sítio catalítico (figura 13A) foi capaz de reconhecer um polipeptídeo de aproximadamente 70 kDa somente nas amostras de *T. rangeli* transfectadas com o plasmídeo pTEX-TcTSeGFP. Nos extratos protéicos de *T. cruzi*, o tamanho das proteínas identificadas é bastante amplo, entretanto um grupo entre 120 e 200 kDa encontra-se dentro do esperado teórico para TS em *T. cruzi*. Provavelmente, o uso de um soro policlonal e não de um anticorpo monoclonal permitiu o reconhecimento de bandas inespecíficas encontradas para este painel.

O anticorpo anti-*TcTS* SAPA (figura 13B) reconheceu somente um grupo de polipeptídeos de 120 a 200 kDa no extrato protéico total de formas tripomastigotas de *T. cruzi*, evidenciando a ausência da porção C-terminal nas proteínas provenientes dos parasitos transfectados, nas formas epimastigotas de *T. cruzi*, bem como nas formas

epimastigotas e tripomastigotas de *T. rangeli* selvagem e transfectada com o plasmídeo pTEXeGFP.

Para o anticorpo anti-GFP (figura 13C) o polipeptídeo de tamanho esperado, 26 kDa, foi encontrado somente no extrato protéico do *T. rangeli* transfectado com o plasmídeo pTEXeGFP. Nos extratos protéicos dos parasitos transfectados com pTEX-TcTSeGFP uma banda de aproximadamente 100 kDa foi observada, com uma tendência de aumento da expressão da proteína proporcional ao aumento da concentração de G418 nos parasitos transfectados. Esta mesma banda de 100 kDa pode ser visualizada no painel correspondente ao anticorpo anti-*TcTS* sítio catalítico somente nos extratos dos parasitos *T. rangeli*-TcTS.

A figura 13D apresenta o resultados do teste de normalização da quantidade de proteína utilizada, evidenciando-se um padrão bastante similar de concentração protéica revelado pelo anticorpo anti- alfa tubulina.

4.6 Avaliação da atividade de trans-sialidase nos parasitos transfectados

Apesar da comprovação da expressão da *TcTS* de *T. cruzi* por *T. rangeli* indicada pelo ensaios anteriores, buscamos realizar ensaios visando determinar a atividade enzimática desta proteína heterologamente expressa. Em um ensaio preliminar utilizando a metodologia descrita por Schrader *et al.* (2003), os resultados obtidos em duplicata confirmaram a ausência da atividade TS em extratos protéicos totais de *T. rangeli*, selvagem e transfectado com o plasmídeo pTEXeGFP, e confirmaram a presença de atividade para formas epimastigotas, tripomastigotas de *T. cruzi* e para *T. rangeli*-TcTS (figura 14). O gráfico mostra os dados deduzidos do valor obtido para o controle (somente tampão). Os valores revelam que a proteína *TcTS* expressa de maneira heteróloga por *T. rangeli* apresenta atividade de trans-sialidase.

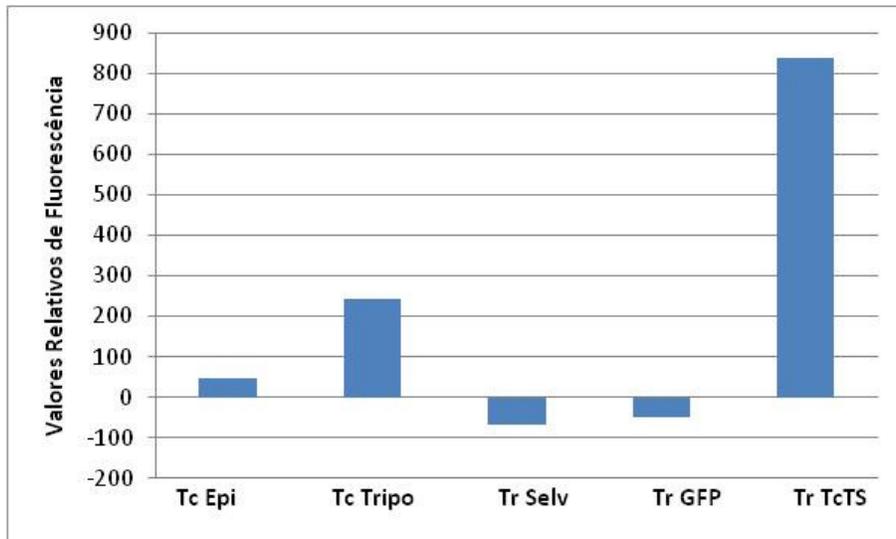


Figura 14. Ensaio de atividade com os valores relativos de fluorescência representativo da quantidade de substrato com ácido siálico incorporado. Foram usadas as amostras de *T. cruzi* das formas epimastigota (Tc Epi) e tripomastigota (Tc Tripo), *T. rangeli* selvagem (Tr Selv) e GFP (Tr GFP) e *T. rangeli* TcTS (Tr TcTS).

5 DISCUSSÃO

Diferentes proteínas do *T. cruzi* estão envolvidas na interação do parasito com as células hospedeiras e podem ser alvos da resposta imune do hospedeiro vertebrado. Alguns protozoários pertencentes ao gênero *Trypanosoma* possuem uma enzima singular expressa na superfície do parasito e capaz de metabolizar o ácido siálico, a trans-sialidase, realizando a transferência do ácido siálico para proteínas tipo mucinas, abundantes na sua membrana celular (SCHENKMAN, 1994). A importância desse processo é indicada pela existência de centenas de genes que codificam para as TS e mucinas no genoma de *T. cruzi* (FRASCH, 2000). Para o *T. rangeli* ainda não foram descritas proteínas com atividade enzimática, apesar deste possuir genes similares às TS e mucinas, o que pode apontar um aspecto chave para explicar o fato deste organismo não ser patogênico para humanos. Desta maneira, a transfecção eficiente e funcional deste parasito com a TS ativa de *T. cruzi* serve como importante ferramenta para maior conhecimento da contribuição desta proteína no processo de infecção.

A sequência nucleotídica obtida para o gene da TS de *T. cruzi* possui quadro aberto de leitura com 1.923pb (641 aminoácidos). A TcTS possui uma massa molecular estimada de 70,4 kDa, cujo grau de identidade com a sequência aminoacídica encontrada no GenBank de *T. cruzi* é de 99%. A presença de motivos característicos da família das TS (Asp e VTV) e a ausência do domínio SAPA confirmam que a porção transfectada realmente se trata da N-terminal, que é a região que contém os sete aminoácidos formadores do sítio catalítico da enzima nativa, e, portanto, responsável pela atividade de TS. A falta da porção final, C-terminal, na construção da TcTS do plasmídeo, explica a menor similaridade (68%) encontrada no alinhamento global com a mesma proteína de *T. cruzi*.

O alinhamento da sequência aminoacídica de TS de *T. cruzi* com sequências de outros organismos (*T. brucei*, *T. congolense*, *T. rangeli* e *Homo sapiens*), revelou uma maior proximidade entre as sialidases de *T. rangeli* e *T. cruzi*, seguido por proteínas de tripanosomatídeos africanos e por último, a uma distância considerável, com a neuroaminidase humana. Neste sentido, se reafirma a potencial utilização desta proteína como alvo terapêutico para a doença de Chagas, uma vez que a maior distância entre as proteínas de *Homo sapiens* e tripanosomatídeos permitiria um endereçamento específico dos agentes terapêuticos.

A separação entre o grupo composto por *T. brucei*/*T. congolense* com *T. cruzi* pode ser compreendida se considerarmos que os dois primeiros organismos são,

diferentemente de *T. cruzi*, parasitos extracelulares no hospedeiro mamífero. Como para o *T. cruzi* a TS possui função fundamental na entrada e no escape do vacúolo fagocítico, essa proteína pode ser modificada para os tripanosomatídeos extracelulares, possivelmente, para atender outras demandas metabólicas que não a infecção celular no hospedeiro mamífero. Essa idéia é corroborada com o fato de que a enzima TS ativa foi encontrada em tripanosomatídeos africanos somente nas formas que se desenvolvem no inseto vetor (SCHENKMAN, 1994).

A maior similaridade encontrada entre as sequências de *T. cruzi* e *T. congolense*, causador da tripanosomíase em ruminantes africanos, é resultante da existência de resíduos conservados correspondentes ao sítio ativo da proteína (TIRALONGO *et al.*, 2003). Já a similaridade observada entre *T. cruzi* e *T. rangeli* pode estar relacionada a características particulares de cada um dos parasitos em relação seus ciclo no hospedeiro mamífero, já que para o *T. rangeli* permanece a controvérsia da multiplicação intracelular e sua subsistência neste hospedeiro (MENESES *et al.*, 2004).

Dessa forma, o estabelecimento de uma linhagem de *T. rangeli*, expressando de maneira heteróloga a TS de *T. cruzi*, torna-se atrativa para elucidar alguns pontos ainda não esclarecidos para estes parasitos e, portanto, com o plasmídeo devidamente construído, procedeu-se a transfecção. Para tanto, foram utilizados dois kits diferentes, o primeiro (*Amaxa Basic Protocol for Parasitic Protozoa*, Lonza) é recomendado para protozoários parasitos (*Plasmodium berghei*, *Plasmodium yoelii*, *T. brucei*, *Toxoplasma gondii*, *Eimeria tenella*, *Leishmania* sp. e *Perkinsus marinus*), sendo que o protocolo faz uma ressalva na qual coloca que o resultado pode variar muito de acordo com a espécie e a forma evolutiva utilizada na transfecção. O segundo é específico para células dentríticas humanas maduras e imaturas (*Amaxa Optimized Protocol for Human Dendritic Cells*, Lonza). Como ainda não havia testes comprovando a eficiência de transfecção utilizando estes kits para o *T. rangeli*, ambos foram utilizados devido a sua disponibilidade no laboratório. Após as transfecções, dentre os resultados obtidos por fluorescência direta, imunofluorescência, PCR e *western blot*, não foram observadas diferenças na eficiência das transfecções comparando os dois kits utilizados. Como os reagentes e condições da transfecção não são especificados para nenhum dos kits, não se pode inferir qual seria o motivo para obtenção destes resultados.

Em relação à expressão das proteínas heterólogas, os ensaios de *western blot* revelaram que, com o uso do anticorpo anti-TcTS sítio catalítico, houve o aparecimento de inúmeras bandas inespecíficas, o que já era esperado por se tratar de um soro

policlonal. Estas bandas reconhecidas em quase todos os extratos de *T. rangeli* independentemente da cepa utilizada podem ser explicadas teoricamente pela presença de diversas sialidases em *T. rangeli* que possuem cerca de 46% de similaridade com a TS de *T. cruzi*. Apesar destas bandas inespecíficas, uma mais intensa na altura de aproximadamente 70 kDa, que está de acordo com o tamanho da *TcTS* predito pelo programa *Protparam*, estava presente nas amostras de parasitos transfectados com pTEX-TcTS eGFP. Além disso, foram observadas algumas bandas entre 100 e 200 kDa para as amostras de epimastigotas e tripomastigotas de *T. cruzi*, que correspondem aos tamanhos encontrados na literatura referentes a região do sítio catalítico de ~70kDa somada a região das repetições C-terminais SAPA que podem estar presentes em número variável entre as proteínas da família das TS (COLLI, 1993; SCHENKMAN, 1994; FRASCH, 2000).

Para reforçar os dados acima, bem como certificar que a cepa *T. rangeli*-TcTS não possui as repetições C-terminais, também utilizou-se o anticorpo anti-TcTS SAPA, que reconhece de maneira específica as repetições de 12 aminoácidos na porção C-terminal desta proteína, denominadas SAPA. Como esperado, as únicas bandas reconhecidas estão no extrato protéico de tripomastigotas de *T. cruzi*, com uma faixa de tamanho correspondente ao observado para o primeiro anticorpo, referente à TS com número variável de repetições na porção C-terminal (BUSCAGLIA, 2006). Outro dado que pode ser visualizado é a expressão estágio-específica da TS para *T. cruzi*, já que as bandas, reconhecidas em epimastigotas deste parasito com o anticorpo anti-TcTS sítio catalítico, são menos expressivas do que as encontradas para formas tripomastigotas, além do que, com a utilização do anticorpo anti-TcTS SAPA, não houve reconhecimento para esta forma evolutiva de *T. cruzi*. Este dado está de acordo com o descrito por Schenkman e colaboradores (1994), em que a proteína TS é expressa de forma mais abundante e em sua conformação completa (oligomerizada e contendo a região responsável pela âncora de GPI e repetições SAPA), somente em tripomastigotas de *T. cruzi*, que é a forma infectante do parasito.

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

O anticorpo anti-GFP reconheceu uma banda de aproximadamente 26 kDa no o *T. rangeli* transfectado com o plasmídeo pTEXeGFP e uma banda de cerca de 100 kDa nas cepas transfectadas com o plasmídeo pTEX-TcTSeGFP. A hipótese formulada é de que houve a fusão da *TcTS* e da GFP expressas pelo *T. rangeli*-TcTS, uma vez que o tamanho encontrado é próximo a soma das massas teóricas das duas proteínas. Outro resultado que corrobora com esta hipótese é o reconhecimento pelo anticorpo anti-TcTS sítio catalítico de uma banda de intensidade semelhante, de cerca de 100 kDa, apenas nos extratos *T. rangeli*-TcTS, que poderia ser advinda do reconhecimento do produto da fusão das duas proteínas por este segundo anticorpo.

Em tripanosomatídeos, quase todos os genes estão organizados em grupos que são coordenadamente transcritos em precursores de mRNA policistrônicos (VANHAMME *et al.*, 1995). Uma vez que, em *T. cruzi*, como nos demais eucariotos, somente mRNAs monocistrônicos são traduzidos, os precursores de RNA mensageiro (mRNA) policistrônicos devem ser processados até mRNA individuais. Este processamento é feito através de uma combinação de *trans-splicing* 5', clivagem e poliadenilação 3' (URMENYI, 2010)

O *trans-splicing* consiste na adição, *in trans*, de um exon não codificante capeado chamado *spliced leader* (SL), ou mini-exon, à extremidade 5' de cada região codificante presente no pré-mRNA, com tamanho aproximado de 40 nucleotídeos (CLAYTON, 2002), como ilustrado na figura 15. Este processo soluciona o problema da criação de vários mRNA individualmente capeados a partir de um único transcrito policistrônico. Para que o processamento do RNA policistrônico seja efetivo, ambos os eventos, *trans-splicing* e a poliadenilação, devem ocorrer. A sinalização para o *trans-splicing* é, geralmente, sequências ricas em uracila com sítio acceptor AG (CLAYTON, 2002). Já para a poliadenilação, não existe uma sinalização específica, ao contrário, esta ocorre a uma distância fixa (± 100 -400 nucleotídeos, dependendo da espécie), no sentido a montante em relação ao sinal do *splicing* (MATTHEWS *et al.*, 1994).

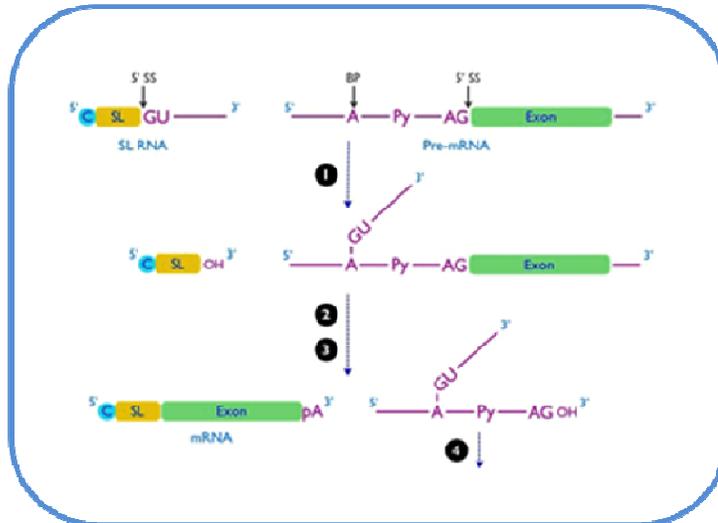


Figura 15. Modelo esquemático representando os mecanismos de *trans-splicing* e poliadenilação do pré-mRNA em *Trypanosoma cruzi*. Representação esquemática do processamento do pré-mRNA. O sítio acceptor de *splicing* 5' (5' SS), o sítio acceptor 3' (3' SS) e o ponto de ramificação (BP) estão indicados. C, cap 5'; SL, *spliced leader*; Py, região de polipirimidina; pA, cauda poli(A). 1, primeira reação de transesterificação; 2, segunda reação de transesterificação; 3, clivagem e poliadenilação; 4, desramificação e degradação do intermediário em Y. Representação não está em escala. **Adaptado de:** Liang *et al.*, 2003.

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

A menor intensidade das bandas para o anticorpo anti-GFP para as amostras de *T. rangeli* transfectadas com pTEX-TcTSeGFP, pode ser resultante da maior dificuldade no processamento da GFP, já que esta, está situada posteriormente na construção do plasmídeo. Desta maneira, a proteína com processamento comprometido está sendo degradada com maior frequência. A hipótese de fusão pode ser embasada com os resultados encontrados para a fluorescência direta. Esta mostra, com maior frequência, um padrão pontual de fluorescência do que as amostras transfectadas somente com

pTEXeGFP. Isso poderia ser o resultado da internalização da proteína “defeituosa” por vacúolos para sua degradação ou ainda, sua deposição em corpos de inclusão.

Os resultados das imunofluorescências também evidenciaram que, apesar da TS ser uma proteína de superfície em tripomastigota de *T. cruzi*, a maior fluorescência na amostra permeabilizada, para os anticorpos anti-*TcTS* sítio catalítico e SAPA, pode ser atribuída ao reconhecimento de proteínas que estão sendo produzidas no citosol e ainda não foram endereçadas para a membrana. Para as formas epimastigotas de *T. cruzi* e *T. rangeli* selvagem, o aumento na fluorescência seria decorrente do fato de que a permeabilização permitiu maior reconhecimento inespecífico de proteínas citosólicas.

Para as amostras transfectadas com pTEX-TcTSeGFP, o aumento significativo na intensidade da fluorescência nas amostras permeabilizadas, já era esperado, uma vez que, a construção utilizada não possui sequência que faz a ligação a âncora GPI e direciona a proteína heteróloga para a membrana, desta forma esta permanece mais abundantemente no citosol. Entretanto, observa-se que uma parte dessas proteínas está sendo exposta na superfície celular, quando comparada com o grupo controle (*T. rangeli*-GFP), para as amostras não permeabilizadas. O reconhecimento exclusivo de formas tripomastigotas de *T. cruzi* pelo anti-*TcTS* SAPA também na imunofluorescência está de acordo com o esperado teórico (SCHENKMAN, 1994), no qual, somente, essa forma do flagelado expressa a proteína em sua conformação completa, oligomerizada e contendo o sítio de ligação à âncora de GPI e as repetições C-terminais (SAPA).

A proteína nativa de *T. cruzi* está formada por dois domínios separados, o segmento N-terminal que é conservado e contém os sítios catalíticos da enzima, e uma região heterogênia, na porção C-terminal, que é responsável pela oligomerização ou agregação da enzima (SCHENKMAN, 1994; CREMONA, 1995; FRASCH, 2000). Como a construção plasmidial abrangia o domínio N-terminal, a atividade de TS era esperada para os parasitos *T. rangeli*-TcTS. Os ensaios preliminares mostraram que a proteína TcTS expressa de maneira heteróloga possui atividade, e que esta, é maior do que a encontrada para tripomastigotas de *T. cruzi*. Esse fenômeno pode ser causado pela presença de múltiplos plasmídeos por célula e pela alta pressão seletiva exercida pelo G-418, que força a transcrição do plasmídeo em altas taxas, e que dessa maneira poderia superar a transcrição do gene da TS em formas tripomastigotas de *T. cruzi*. Vale ressaltar que novos ensaios de atividade para a *TcTS* devem ser feitos em condições e com grupos diversos para obtenção de maiores informações a respeito da atividade da enzima.

6 CONCLUSÕES

- A construção do plasmídeo foi realizada com sucesso e o sequenciamento do mesmo revelou que o gene da *TcTS* nele inserido possui uma janela aberta de leitura de 1.923 pb e traduz uma proteína de 641 aminoácidos (70,4 kDa), correspondente a porção N-terminal da proteína trans-sialidase nativa de *T. cruzi*.
- Os resultados utilizando dois kits de transfecção foram similares, embora maiores suposições da razão pelo qual foi obtido esse resultado se torna impossível, visto que, as informações do fabricante sobre os reagentes e condições de eletroporação são inexistentes nos protocolos.
- Através de PCR foi possível confirmar a existência do DNA que codifica para a proteína *TcTS* nos parasitos transfectados com o plasmídeo pTEX-TcTSeGFP.
- A cepa de *T. rangeli*-TcTS está expressando de maneira eficiente a *TcTS* na presença de diferentes concentrações de G-418 (200, 300, 500 e 1.000 µg/ml).
- Os resultados de *western blot* confirmaram que a proteína heteróloga *TcTS* possui cerca de 70 kDa e está sendo traduzida em altos níveis em *T. rangeli*-TcTS. Também evidencia que no processo de tradução das proteínas, a GFP está sendo, em alguns momentos, traduzida fusionada à proteína *TcTS*, apesar desta última possuir um códon de parada.
- Os ensaios de imunofluorescência revelaram que a *TcTS* heteróloga está localizada em maior quantidade no citosol celular, embora uma pequena quantidade seja direcionada para a membrana.
- A atividade trans-sialidase foi confirmada na cepa *T. rangeli*-TcTS, e supera os valores da atividade encontrada para tripomastigota de *T. cruzi*.

7 PERSPECTIVAS

A partir dos resultados obtidos neste trabalho podem-se vislumbrar distintos desdobramentos. Dentre estes, primeiramente será realizada a repetição dos ensaios de atividade enzimática para estabelecer os níveis de atividades alcançados pela enzima heteróloga. Outras possibilidades que se tornam atrativas neste momento é a padronização de um protocolo de transfecção a partir de um já utilizado para *Leishmania* sp. e o estabelecimento de uma linhagem transfectada de *T. rangeli* com a *TcTS* inativa (*TcTS2VØ*) de *T. cruzi*, estando este plasmídeo já disponível em nosso laboratório. Além disso, elaborar novas construções plasmidiais que contenham as repetições terminais SAPA permitiriam compreender o envolvimento das mesmas no processo de interação e, com a disponibilidade de um anticorpo monoclonal, pontuar sítios e níveis de expressão.

Com base nisto, espera-se poder avaliar comparativamente a capacidade de infecção do *T. rangeli* expressando *TcTS* e *TcTS2VØ* em cultura de células, como também traçar e comparar o perfil de parasitemia desses parasitos. Dessa forma, a ferramenta criada seria utilizada para evidenciar a importância das trans-sialidases de *T. cruzi* no processo de adesão, penetração celular e fuga do vacúolo fagocítico durante o processo de infecção celular.

8 REFERÊNCIAS

AFCHAIN, D., et al. Antigenic make-up of *Trypanosoma cruzi* culture forms: Identification of a specific component. **J. Parasitol.**, v. 65, p. 507-514, 1979.

BARRY, J. D., et al. Specific mechanisms for activation and expression of variant surface glycoprotein genes in *Trypanosoma brucei*. **Biochem. Soc. Trans.**, v. 18, n. 5, p. 708-10, 1990.

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, 1976.

BRENER, Z., et al. *Trypanosoma cruzi e doença de Chagas*. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000, 431 p.

BUSCAGLIA, C. A., et al. *Trypanosoma cruzi* surface mucins: host-dependent coat diversity, **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 4, p. 229–236, 2006.

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

COLLI, W. Trans-sialidase: a unique enzyme activity discovered in the protozoan *Trypanosoma cruzi*. **FASEB J.**, v. 7, p. 1257-1264, 1993.

CREMONA, M. L., et al. A single tyrosine differentiates active and inactive *Trypanosoma cruzi* trans-sialidases. **Gene**, v. 160, p. 123-128, 1995.

CROSS, G. A. M., et al. The surface trans-sialidase family of *Trypanosoma cruzi*. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 46, p. 385-411, 1993.

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.

D'ALESSANDRO, A., et al. *Trypanosoma rangeli*. In: KREIER, J. P.; BAKER, J. P. **Parasitic Protozoa**, 2. ed. London: Academic Press, 1992, p. 1 – 54.

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

EGER-MANGRICH, I., et al. Interaction of *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920 with different cells line in vitro. **Parasitol. Res.**, v. 87, p. 505-509, 2001.

EL-SAYED, N., et al. The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. **Science**, v. 309, n. 5733, p. 409-415, 2005.

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

FREIRE-DE-LIMA, L., et al. *T. cruzi*-mediated CD8-T Cell Resialylation. **J. Bio. Chemistry**, v. 18, p. 13388–13396, 2010.

GRISARD, E. C., et al. Characterization of *Trypanosoma rangeli* strains isolated in Central and South America: An overview. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 94, p. 203-209, 1999.

GRISARD, E. C., et al. Mini-exon gene polymorphism among *Trypanosoma rangeli* strains isolated from distinct geographical regions. **Parasitology**, v. 118, p. 375-382, 1999a.

GRISARD, E. C., et al. *Trypanosoma* (*Herpetosoma*) *rangeli*. In: NEVES, D. P. **Parasitologia Humana**. Ed. Atheneu, 2005.

GUHL, F., et al. *Trypanosoma* (*Herpetosoma*) *rangeli* Tejera, 1920: an updated review. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 98, n. 4, p. 435-442, 2003.

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

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

KATZIN, A. M., et al. Lectin receptors in *Trypanosoma cruzi*: an N-acetyl-glucosamine containing surface glycoprotein specific for the trypomastigote stage. **Biochim Biophys Acta.**, v. 727, p. 403-411, 1983.

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

KOERICH, L. B., et al. Differentiation of *Trypanosoma rangeli*: High production of infective trypomastigote forms *in vitro*. **P. Research**, v. 88, p. 21-25, 2002.

LIANG, X. H., et al. *trans* and *cis* Splicing in Trypanosomatids: Mechanism, Factors, and Regulation. **Eucaryot. Cell**, v. 2, p. 830-840, 2003.

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

MAIA DA SILVA, F., et al. Comparative phylogeography of *Trypanosoma rangeli* and *Rhodnius* (Hemiptera: Reduviidae) supports a long coexistence of parasite lineages and their sympatric vectors. **Mol. Ecol.**, v. 16, p. 3361-3373, 2007.

MANQUE, P. M., et al. Characterization of the cell adhesion site of *Trypanosoma cruzi* metacyclic stage surface glycoprotein gp82. **Infect. Immun.**, v. 68, n. 2, p. 478-84, 2000.

MATTHEWS, et al. A common pyrimidine-rich motif governs trans-splicing and polyadenylation of tubulin polycistronic pre-mRNA in trypanosomes. **Genes Dev.**, v. 8, p. 491-501, 1994.

MENESES, A. J. M., et al. *Trypanosoma rangeli*: Lo que se conoce y el impacto de su presencia. **MedUNAB**, v. 7, p. 166-171, 2004.

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

MORAES, M. H., et al. Serological cross-reactivity between distinct evolutive forms of *Trypanosoma rangeli* and *Trypanosoma cruzi*. **Parasite and Vectors**, v. 1, p. 20, 2008.

- OSORIO, Y., et al. Infectivity of *Trypanosoma rangeli* in a promonocytic mammalian cell line. **J. Parasitol.**, v. 81, p. 687-693, 1995.
- PRATA, A. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. **Lancet Infect. Dis.**, v. 1, p. 92-100, 2001.
- SAMBROOK, J., et al. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. New York: Cold Spring Harbor, 2001.
- SCHENKMAN, S., et al. Structural and functional properties of *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 48, p. 499-523, 1994.
- SCHENKMAN, S., et al. *Trypanosoma cruzi* transialidase and cell invasion. **P. Today**, v. 9, p. 218-221, 1994a.
- SCHENKMAN, S., et al. Expression of trypomastigote *trans*-sialidase in metacyclic forms of *Trypanosoma cruzi* increases parasite escape from its parasitophorous vacuole. **Cell Microbiol.**, v. 8, p. 1888–1898, 2006.
- SCHOTTELIUS, J. Neuraminidase fluorescent test for differentiation of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli*. **Trop. Med. Parasit.**, v. 38, p. 323-327, 1987.
- SCHRADER, S., et al. A nonradioactive 96-well plate assay for screening of trans-sialidase activity. **Anal Biochem.**, v. 322, p. 139-147, 2003.
- STEINDEL, M. **Caracterização de cepas de *Trypanosoma rangeli* e *Trypanosoma cruzi* isoladas de reservatórios e vetores silvestres em Santa Catarina**. 1993. Tese de Doutorado - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1993.
- STOCO, P. H. **Caracterização das DNA topoisomerasas II de *Trypanosoma rangeli***. 2010, 162 p. Tese de doutorado (Biotecnologia) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2010.
- 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, p. 43-48, 1999.
- TEIXEIRA, A. R. L., et al. Evolution and pathology in Chagas disease – A Review. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 101, p. 460-491, 2006.

TIRALONGO, et al. Trans-sialidase-like sequences from *Trypanosoma congolense* conserve most of the critical active site residues found in other trans-sialidasases. **Biol Chem.**, v. 384, p. 1203-1213. 2003.

TOMLINSON, S., et al. Role of sialic acid in resistance of *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes to complement. **J. Immunol.**, v. 153, p. 3141-3148, 1994.

TOWBIN, H., et al. 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, 1979.

TRIBULATTI, M. V., et al. The trans-sialidase from *Trypanosoma cruzi* induces thrombocytopenia during acute Chagas disease by reducing the platelet sialic acid contents. **Infect Immun.**, v. 73, p. 201–207, 2005.

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

URDANETA-MORALES, S, et al. *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, 1986.

URMENYI, T. P. **Processamento do RNA**. Disponível em:
<<http://www.fiocruz.br/chagas/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=76>>. Acesso em:
15/11/2010.

VALLEJO, G. A., et al. Clonal population structure of *Trypanosoma rangeli* is supported by analysis of kDNA and mini-exon gene sequences from strains isolated from *Rhodnius colombiensis*, *R. pallescens* and *R. prolixus* in Colombia. **Infect. Gen. Evolution**, v. 3, p. 39-45, 2003.

VALLEJO, G. A., et al. Triatominae-*Trypanosoma cruzi*/T. *rangeli*: Vector-parasite interactions. **Acta Tropica**, v. 110, p. 137-147, 2009.

VANHAMME, L., et al. Control of gene expression in trypanosomes. **Microbiological Reviews**, v. 59, p. 223-240. 1995.

VASQUEZ, A. M., et al. Eco-epidemiological aspects of *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma rangeli* and their vector (*Rhodnius pallescens*) in Panama. **Rev. Inst. Med. trop. São Paulo**, v. 46, p. 217-222, 2004.

WHO. First WHO report on neglected tropical diseases 2010: working to overcome the global impact of neglected tropical diseases. **Technical Report Series**, Geneva, 27, 2010.

YOSHIDA, N. Surface antigens of metacyclic trypomastigotes of *T. cruzi*. **Infect. Immun.**, v. 40, p. 836-839, 1983.

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