



Laboratório de
PROTOZOOLOGIA
UFSC

Universidade Federal de Santa Catarina

Centro de Ciências Biológicas

Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DA ENZIMA
CISTATIONINA B-SINTASE (C β S)
EM *Trypanosoma rangeli***

Lais Eiko Yamanaka

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

Orientador: Prof. Dr. Edmundo Carlos Grisard
Coorientadora: Msc. Ibeth Cristina Romero Calderón

Florianópolis
2014

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

Yamanaka, Lais Eiko
CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DA ENZIMA CISTATIONINA B-SINTASE (CBS) EM *Trypanosoma rangeli* / Lais Eiko
Yamanaka ; orientador, Edmundo Carlos Grisard ; co-orientadora, Ibeth Romero. - Florianópolis, SC, 2014.
91 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) -
Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências
Biológicas. Graduação em Ciências Biológicas.

Inclui referências

1. Ciências Biológicas. 2. *Trypanosoma rangeli*. 3. Cistationina B-sintase. 4. Biossíntese da cisteína. I. Grisard, Edmundo Carlos . II. Romero, Ibeth. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Graduação em Ciências Biológicas. IV. Título.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Eiji e Maria que sempre me apoiaram e confiaram nas minhas escolhas. Obrigada pelo carinho e pela educação que tanto priorizaram.

Ao meu irmão e melhor amigo Leonardo, que esteve comigo durante essa caminhada e que sempre será meu porto seguro a vida toda. Sempre segui seus passos e vou continuar seguindo.

Às minhas tias Hideko e Irene que participaram ativamente da nossa educação e nos ensinaram o prazer de estudar através de livros, viagens, museos e teatros. Elas são minha inspiração.

Ao meu orientador, prof. Dr. Edmundo Carlos Grisard, pela oportunidade de estagiar no Laboratório de Protozoologia onde pude ampliar meus conhecimentos adquiridos durante a graduação e dar meus primeiros passos na área científica. Para mim foi o melhor professor do curso e quem eu admiro e me inspiro. Obrigada por sempre estar de portas abertas e principalmente pela paciência e tolerância diante dos meus inúmeros “ops, acho que fiz uma cagadinha”.

Aos meus coorientadores Glauber e Ibeth pelos ensinamentos teóricos e práticos do cotidiano do laboratório e pela oportunidade e confiança de desenvolver ótimos trabalhos.

Às minhas pseudo-orientadoras Patrícia e Débora, que apesar de não oficiais sempre considerei como minhas chefas bombardeando-as de perguntas. Em especial à Débora que apesar das broncas e da cara de brava era quem sempre me salvava das besteiras e loucuras que fazia no laboratório. Foi

atavés das suas broncas e críticas quem mais me ensinou em todos esses anos. Obrigada pela amizade e pelas inúmeras conversas.

Aos meus colegas do Laboratório de Protozoologia, principalmente à Ninna, Thaynara, Elisa, Carime, Milene e Mayara que sempre estavam dispostas a me ajudar e pelas inúmeras conversas e risadas no corredor.

Aos meus colegas da biologia, principalmente à Rafaela, Bruna, Mayara, Camille, Leili, Amanda e Gabi por todos esses anos de muitos esforços, estudos, companheirismo e amizade. Fomos amigas de graduação e agora de profissão para a vida toda.

À banca avaliadora deste trabalho, pela disposição e aceite do convite.

Ao CNPq, pelo incentivo financeiro.

Resumo

Trypanosoma rangeli é um parasito hemoflagelado que infecta insetos e mamíferos. Possui um sistema de resposta antioxidante baseada no ditiol tripanotona ($T[SH]_2$), capaz de neutralizar os radicais livres e peróxidos, além de manter o equilíbrio redox intracelular. A sua biossíntese depende da disponibilidade do aminoácido sulfurado, a cisteína. Tem se descrito duas rotas distintas para a síntese da cisteína, a via de síntese *de novo*, catalisada pela cisteína sintase (CS) e a via de transulfuração reversa catalisada pela cistationina β -sintase (C β S). O presente estudo visou caracterizar molecularmente a C β S de *T. rangeli*, mediante a clonagem e expressão heteróloga do gene. A caracterização molecular, permitiu estabelecer que TrC β S possui uma ORF de 1121pb e codifica para uma proteína de 373 aa (44 kDa), que apresentam todos os domínios catalíticos típicos dessa família de enzimas. Os ensaios de *Southern blot* revelaram que o gene C β S *T. rangeli* aparece como cópia única em seu genoma. O antisoro produzido a partir da proteína recombinante rTcC β S reconheceu a proteína de tamanho esperado (~44kDa) nos extratos proteicos de *T. rangeli* e *T. cruzi* com semelhante intensidade. A avaliação da expressão da C β S nas diferentes formas evolutivas do *T. rangeli* revelou que não é estágio-dependente. Os resultados obtidos neste estudo constituem o primeiro estudo da presença de C β S em *T. rangeli*.

Palavras-chave: *Trypanosoma rangeli*, Cistationina β -sintase, biossíntese da cisteína.

Abstract

Trypanosoma rangeli is a parasite that infects hemoflagellates insects and mammals. Have a system of antioxidant response based on dithiol trypanothione (T[SH]₂), able to neutralize free radicals and peroxides, in addition to maintaining the intracellular redox balance. The biosynthesis depends on the availability of aminoácio sulphide, cysteine. Has two distinct routes described for the synthesis of cysteine, *de novo* pathway, catalyzed by cysteine synthase (CS) and reverse transsulfuration pathway catalyzed by cystathionine β-synthase (CβS). The present study aimed at characterizing the molecular CβS *T. rangeli* by cloning and expression of heterologous gene. The molecular characterization established that TrCβS an ORF 1121pb and encodes a protein of 373 aa (44 kDa), which are all typical catalytic domains of this family of enzymes. Southern blot assays showed that the CβS *T. rangeli* appears as a single copy gene in their genome. The antiserum produced from the recombinant protein recognized the protein rTcCβS esperdado size (~ 44kDa) protein extract from *T. cruzi* and *T. rangeli* similar intensity. The evaluation of the expression of CβS their different developmental forms of *T. rangeli* showed that is not stage-dependent. The results obtained in this study represent the first report of the presence of *T. rangeli* in CβS.

Keywords: *Trypanosoma rangeli*, cystathionine β -synthase, cysteine biosynthesis.

Lista de abreviaturas

μg – micrograma

μl – microlitro

μm – micrômetro

aa - aminoácido

BLAST – do inglês *Basic Local Alignment Search Tool*

BSA – do inglês *Bovine Serum Albumin*

$^{\circ}\text{C}$ – graus Celsius

cm – centímetro

DMEM – do inglês *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

DNA – do inglês *Deoxyribonucleic Acid*

D.O. – densidade óptica

g – força da gravidade

g – grama

h – horas

IPTG – isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo

kDa – kilodalton

LB – meio Luria-Bertani

LIT – do inglês *Liver Infusion Tryptose*

M – molar

mg – miligrama

ml – mililitro

mM – milimolar

NCBI – do inglês *National Center for Biotechnology Information*

ng – nanograma

ORF – do inglês *Open Reading Frame*

pb – pares de bases

PBS – do inglês *Phosphate Buffered Saline*

PCR – do inglês *Polymerase Chain Reaction*

pH – potencial hidrogeniônico

PLP - piridoxal 5- fosfato

SBF – soro bovino fetal

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

SSC – do inglês *Sodium Chloride/Sodium Citrate*

U – unidade

V – Volt

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

Índice de figuras

Figura 1. Distribuição geográfica da doença de Chagas e pontos de ocorrência do <i>Trypanosoma rangeli</i>	18
Figura 2. Forma tripomastigota sanguínea do <i>Trypanosoma rangeli</i>	19
Figura 3. Representação esquemática do ciclo do <i>T. rangeli</i> no hospedeiro invertebrado.....	21
Figura 4. Biossíntese da tripanotiona [T(SH) ₂].....	25
Figura 5. Vias da biossíntese de cisteína em <i>Leishmania major</i>	28
Figura 6. Metabolismo da Cistationina pela atividade catalítica da enzima Cistationina β-Sintase (CβS).....	30
Figura 7. Organização dos domínios catalítico e regulatório das enzimas PLP β-família	32
Figura 8. Montagem da transferência por capilaridade para o <i>Southern blot</i>	40
Figura 9. Sequência de nucleotídeos dos iniciadores específicos usados para amplificar e clonar os genes CβS de <i>T. rangeli</i> e <i>T. cruzi</i>	42
Figura 10. Alinhamento múltiplo das sequências deduzidas de aa da CβS de <i>T. cruzi</i> , <i>T. rangeli</i> e outros organismos relevantes.....	53
Figura 11. Caracterização da organização genômica da CβS de <i>T. rangeli</i>	56

Figura 12. Caracterização da organização genômica da C β S de <i>T. cruzi</i>	57
Figura 13. Gel de agarose 0,8 % da PCR para verificar a especificidade dos iniciadores para o gene C β S de <i>T. rangeli</i> e <i>T. cruzi</i>	60
Figura 14. Gel de agarose 0,8 % da PCR de colônia utilizando os iniciadores específicos para os correspondentes genes <i>TrCS</i> e <i>TcCβS</i>	61
Figura 15. Gel de agarose 0,8 % da digestão enzimática dos insertos (pGEM com o gene C β S de <i>T. rangeli</i> e <i>T. cruzi</i>) e do vetor (pET14b).....	62
Figura 16. Gel de agarose 0,8 % corado com <i>Coomassie blue</i> do teste de PCR de colônia.....	63
Figura 17. Gel de agarose 0,8 % corado com <i>Coomassie blue</i> dos testes de PCR de colônia e <i>PCR-frame</i>	64
Figura 18. Análises da expressão das proteínas C β S recombinantes de <i>T. cruzi</i> cepa Y e <i>T. rangeli</i> cepa SC58.....	66
Figura 19. Gel de poliacrilamida SDS-PAGE 12 % e <i>Western blot</i> utilizando anticorpo monoclonal anti-His•Tag [®] das etapas da purificação por cromatografia de afinidade.....	67
Figura 20. <i>Western blot</i> utilizando soro policlonal anti-rTrC β S (1:1600).....	68

Figura 21. Análise de expressão da proteína C β S em extratos totais dos tripanosomatídeos (*T. rangeli* - T.r, *T. cruzi* - T.c e *L. braziliensis* - L.b) e de macrófagos humanos– mac.....70

Sumário

1.	Introdução	17
	1.1 <i>Trypanosoma rangeli</i>.....	17
	1.1.1 Descrição e ocorrência	17
	1.2 Síntese de glutathiona e tripanotiona na defesa antioxidante.....	23
	1.3 Cisteína.....	25
	1.3.1 Biossíntese da Cisteína	25
	1.3.2 Biossíntese em protozoários	26
	1.4 Características moleculares da Cistationina β-Sintase (CβS)	30
2.	Justificativa	33
3.	Objetivos.....	35
	3.1 Objetivo geral	35
	3.2 Objetivos específicos	35
4.	Material e métodos	37
	4.1 Análises <i>in silico</i> das sequências da C β S dos parasitos.....	37
	4.2 Material Biológico e Cultivos Celulares.....	38
	4.3 Caracterização da organização genômica da C β S..	39
	4.4 Clonagem dos genes de <i>T. rangeli</i> e <i>T. cruzi</i> que codificam para C β S	41
	4.5 Expressão <i>in vitro</i> e purificação de C β S recombinante	44
	4.6 Obtenção e avaliação da especificidade do soro policlonal α -C β S por <i>Western blot</i>	46

5	Resultados e Discussão	51
5.1	Análises <i>in silico</i> das sequências do gene CβS de <i>T. rangeli</i> e <i>T. cruzi</i>	51
5.2	Caracterização da organização genômica da CβS	55
5.3	Amplificação e clonagem dos genes de <i>T. rangeli</i> e <i>T. cruzi</i> que codificam para CβS.	58
5.4	Expressão heteróloga da proteína CβS recombinante .	61
5.5	Avaliação da especificidade do antissoro policlonal (α-CβS).....	67
8.	Anexos.....	89
8.1	Participação em artigos	89

1. Introdução

1.1 *Trypanosoma rangeli*

1.1.1 Descrição e ocorrência

O *Trypanosoma (Herpetosoma) rangeli* (TEJERA, 1920) é um protozoário hemoflagelado, pertencente à Ordem Kinetoplastida. Este parasito possui ciclo de vida heteroxênico, sendo capaz de infectar insetos triatomíneos, mamíferos silvestres e domésticos assim como seres humanos (GRISARD et al., 1999).

A sua distribuição geográfica (Figura 1) sobrepõe a do *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico da Doença de Chagas, e abrange a América Central e do Sul, sendo comum a ocorrência de infecção mista em seus hospedeiros (AFCHAIN et al., 1979; GRISARD et al., 1999). Diferentemente do *T. cruzi*, o *T. rangeli* não é patogênico ao hospedeiro mamífero, entretanto a coexistência desses dois parasitos acarreta em problemas epidemiológicos principalmente por compartilham cerca de 60% da sua constituição antigênica solúvel provocando uma reatividade sorológica cruzada, o que pode levar a diagnósticos falso-positivos (AFCHAIN et al., 1979). A consequência disso seria um tratamento inadequado ao paciente, além de ter um elevado custo social-econômico e provocar estimativas epidemiológicas errôneas.

Embora não seja patogênico para seus hospedeiros mamíferos, o *T. rangeli* apresenta uma série de efeitos patogênicos para o inseto vetor, os quais se manifestam especialmente durante a ecdise, quando os insetos morrem por não conseguirem sair da antiga cutícula (AÑEZ, 1984). Além disso, desencadeiam uma forte resposta imune do inseto quando invade a hemolinfa e glândulas salivares (MELLO et al., 1999) ativando os sistemas de profenoloxidase (proPO), fagocitose, microagregação hemocítica, atividade dos super óxidos e óxido nítrico além da via de biossíntese de eicosanoides (AZAMBUJA et al., 2005), os quais irão atuar contra o parasito. Desta forma, o arsenal de defesa do parasito contra o sistema imune do vetor é vital para a continuação do ciclo biológico do *T. rangeli*.



Figura 1. Distribuição geográfica da doença de Chagas e pontos de ocorrência do *Trypanosoma rangeli*. Mapa das Américas Central e do Sul, mostrando a sobreposição geográfica da doença de Chagas

humana (sombreado) e dos registros de ocorrência comprovada do *T. rangeli* em humanos, triatomíneos ou animais silvestres (●) (GRISARD, STEINDEL, 2005).

1.1.2 Aspectos biológicos e ciclo de vida

O *T. rangeli* apresenta duas formas biológicas bem definidas durante o seu ciclo de vida, uma forma epimastigotas proliferativa com 45 a 56 μm de comprimento e a tripomastigota sanguíneas apresentando tamanhos variando entre 26 a 34 μm , com uma membrana ondulante bem desenvolvida, além de apresentar um cinetoplasto pontual e subterminal (GUHL, VALLEJO, 2003) (Figura 2).

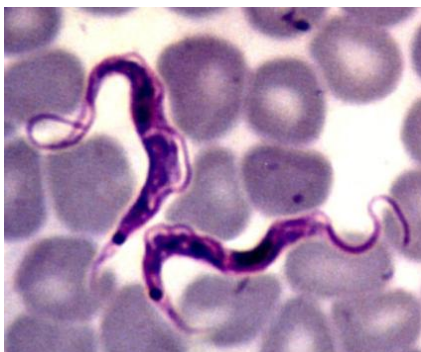


Figura 2. Forma tripomastigota sanguínea do *Trypanosoma rangeli* em sangue de camundongo experimentalmente infectado (aumento de 1.000X). Fonte: STOCO, 2010.

O ciclo biológico do *T. rangeli* inicia quando o inseto vetor ingere as formas tripomastigotas presentes no sangue do

hospedeiro vertebrado durante o repasto sanguíneo. No trato digestivo do inseto, os parasitos diferenciam-se em formas epimastigotas e aderindo ao epitélio do intestino médio conseguem atravessá-lo e alcançam a hemocele. Na hemolinfa, os epimastigotas multiplicam-se livremente e migram para a glândula salivar onde ocorre o processo de metacicloênese que consiste na diferenciação para a forma infectante tripomastigotas metacíclicos (GRISARD; STEINDEL, 2005).

Ainda é muito pouco o que se sabe do curso da infecção do parasito no hospedeiro mamífero, permanecendo controversa a capacidade de multiplicação intracelular do *T. rangeli*. Alguns estudos demonstram que a taxa de infecção deste parasito é muito baixa e os parasitos tendem a desaparecer ao longo do tempo, sugerindo a ausência de multiplicação intracelular e sua desintegração, especialmente observada em macrófagos (MOLYNEUX, 1973; OSORIO et al., 1995; TANOURA et al., 1999; EGER-MANGRICH et al., 2001). Entretanto, Steindel (1993) mostrou a presença de *T. rangeli* por hemocultura em camundongos após sete meses de infecção. Outros autores detectaram o parasito após 13 meses (PAREDES, PAREDES 1949) e após 18 meses de infecção (GROOT et al. 1950) usando as mesmas técnicas. Mesmo o *T. rangeli* apresentando uma parasitemia normalmente baixa e de curta duração em mamíferos, estudos como o de Urdaneta-Morales e Tejero (1985) mostram que em camundongos há níveis de parasitemia até sete

vezes maiores que o inóculo original de parasitos, sugerindo que o *T. rangeli* também se multiplica nesse hospedeiro. Esses resultados controversos revelam a necessidade de ampliar os estudos sobre a biologia básica do *T. rangeli* no hospedeiro mamífero e sua capacidade de sobreviver e multiplicar-se.

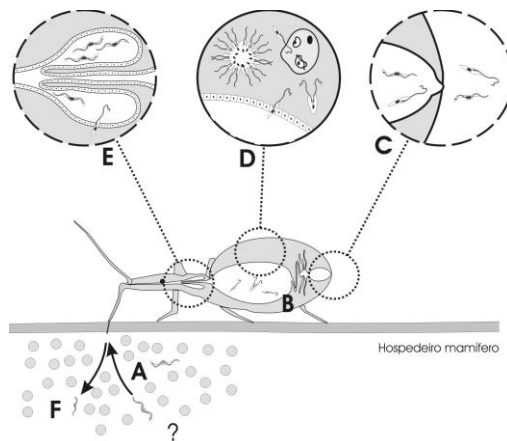


Figura 3. Representação esquemática do ciclo do *T. rangeli* no hospedeiro invertebrado. **A** – Ingestão das formas tripomastigotas durante o repasto sanguíneo do triatomíneo; **B** – Formas epimastigotas no trato intestinal do triatomíneo; **C** – Parasitos alcançam a ampola retal; alguns se diferenciam em tripomastigotas e podem ser excretados junto a fezes e urina; **D** – Adesão de epimastigotas ao epitélio intestinal e migração para a hemocele, onde se multiplicam; **E** – Invasão das glândulas salivares e diferenciação para formas infectivas (tripomastigotas metacíclicos), as quais são inoculadas com a saliva (**F**) durante o repasto sanguíneo. Fonte: GRISARD, STEINDEL, 2005.

Entre as características do *T. rangeli* mais marcantes e diferenciais em relação ao *T. cruzi* está no seu desenvolvimento

no inseto vetor, sobretudo com relação à capacidade de invasão da hemolinfa e o desenvolvimento das formas infectantes nas glândulas salivares, possibilitando transmissão do parasito pela picada, e não através das fezes de triatomíneos infectados, como ocorre para o *T. cruzi* (D'ALESSANDRO, SARAIVIA, 1999; MACHADO et al., 2001). Dessa maneira, a sobrevivência do *T. rangeli* nas glândulas salivares é vital para dar continuidade ao seu ciclo de vida.

O estabelecimento do parasita nas glândulas salivares depende principalmente da sua capacidade em combater o sistema de defesa imunológico e celular do inseto vetor que inclui e a geração de moléculas tóxicas como o superóxido e o óxido nítrico (NO) (WHITTEN et al. 2001).

Em vários modelos experimentais observou-se que o NO além de atuar como vasodilatador e inibidor da agregação de plaquetas durante o repasto sanguíneo do inseto, também atua na resposta imune do inseto, sendo capaz de formar espécies reativas e servir como molécula sinalizadora. Dessa maneira, foi observado que durante a infecção o *T. rangeli* provoca a diminuição do NO para que consiga se estabelecer nas glândulas salivares. Além disso, quando a síntese de NO é bloqueada há aumento da parasitemia no inseto, confirmando a atuação dessa molécula como agente da resposta imune do inseto contra o parasito (GAZO-LOPEZ et al., 2012; PAIM et al., 2013).

Apresentando um ciclo biológico complexo, os parasitos

sofrem diversas alterações metabólicas e morfológicas as quais estão relacionadas à ativação ou repressão de importantes vias metabólicas. Tais alterações são cruciais à sobrevivência do parasito em função das alterações físico-químicas dos ambientes distintos nos quais pode se encontrar (VICKERMAN, 1985). Dentre estas alterações, destaca-se o metabolismo dos aminoácidos sulfurados relacionados à defesa antioxidante do parasito, como a cisteína precursor da TSH₂.

1.2 Síntese de glutathiona e tripanotona na defesa antioxidante

A glutathiona (GSH) é o principal antioxidante intracelular dos mamíferos que atua protegendo as suas células contra espécies reativas derivadas do oxigênio e nitrogênio (WANG et al., 1998). Além disso, desempenha papel importante em plantas na detoxificação de xenobióticos e herbicidas (REA et al., 1998). Para cumprir essas funções, a glutathiona conta com moléculas-chaves na sua composição, entre elas estão a cisteína, o glutamato e a glicina, sendo que esses derivados têm uma função crítica de neutralizar as espécies nocivas de oxigênio incluindo o peróxido de hidrogênio (MEISTER, ANDERSON, 1983).

Da mesma forma, os parasitos possuem um sistema de defesa adaptado à sobrevivência nos distintos ambientes oxidativos aos quais estão expostos durante a infecção nos

hospedeiros. Dentre as diferentes moléculas-chave que estão envolvidas nesse processo destacamos a cisteína e a glutatona, as quais são cruciais na resposta antioxidante de diferentes parasitos como *Entamoeba histolytica*, *Trichomonas vaginalis*, *Giardia lamblia* e *Plasmodium falciparum* (Krauth-Siegel, Leroux 2012).

Ainda que possuam glutatona livre, falta aos tripanosomatídeos a enzima glutatona redutase que é essencial para manter a glutatona reduzida. Em compensação, possuem um sistema único baseado no ditiol tripanotiona [$T(SH)_2$, N^1, N^8 -bisglutationilespermidina] e na tripanotiona redutase (TR) (FAIRLAMB et al., 1985). Apesar de a glutatona ser mais nucleófilo que a tripanotiona, esta última consegue ser um agente redutor mais eficiente devido a alta capacidade ionização em uma larga faixa de pH (FAIRLAMB, CERAMI, 1992; MOUTIEZ et al, 1994).

Entretanto a glutatona continua sendo essencial para os tripanosomatídeos, pois participa na síntese da tripanotiona. A formação da $T(SH)_2$ se dá com a ligação covalente entre o grupo glicina carboxilato da glutatona (GSH) com o grupo amino terminal da espermidina, esse processo consome dois ATPs e é catalisado pela enzima tripanotiona sintetase (TryS) (FAIRLAMB et al., 1985) (Figura 4). A cisteína contida na molécula de glutatona é de fundamental importância para o funcionamento da tripanotiona, pois, confere a esta molécula um grande poder de

doar ou receber elétrons que são utilizados para neutralizar as espécies reativas de oxigênio e manter o equilíbrio redox intracelular (MEISTER, ANDERSON, 1983).

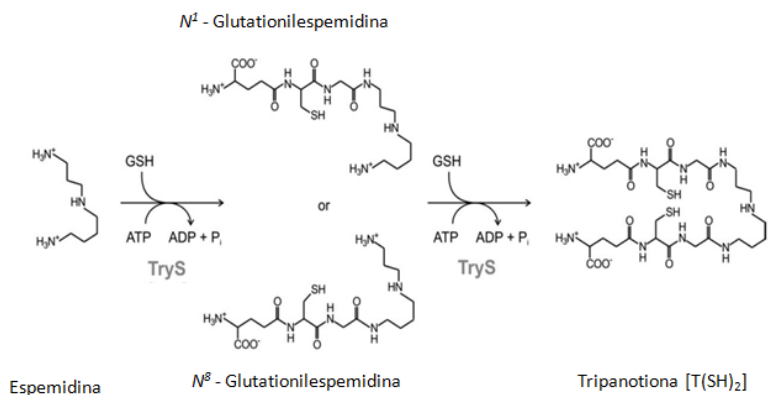


Figura 4. Biossíntese da tripanotonia [T(SH)₂]. Fonte: adaptada de IRIGOÍN et al., 2008

O emprego da glutatona e da tripanotonia no sistema de defesa antioxidante dos mamíferos e tripanosomatídeos, respectivamente, faz com que haja diferenças suficientes para que esse sistema seja considerado um possível alvo terapêutico.

1.3 Cisteína

1.3.1 Biossíntese da Cisteína

A cisteína é um aminoácido sulfurado, presente em todos os seres vivos, que desempenha um papel importante na

estabilidade, estrutura, atividade catalítica e regulação da expressão de inúmeras proteínas. Além de isso, a cisteína está envolvida na síntese da glutatona que tem papel fundamental na proteção contra o estresse oxidativo celular (NOZAKI et al., 2005).

São conhecidas duas vias para a sua síntese: a via de transulfuração reversa e a via *de novo*. Na primeira ocorre à conversão a homocisteína em cisteína em duas etapas: a primeira catalisada pela cistationina β -sintase (C β S), a qual condensa a homocisteína com serina para gerar cistationina que é convertida em cisteína pela ação da cistationina γ -liase (CGL). Essa via foi demonstrada em mamíferos e fungos (WALKER, BARRET, 1997).

Já na via *de novo* também conhecida como via assimiladora ocorre à formação de O-acetilserina (OAS) a partir de L-serina e acetil coenzima-A catalizada pela serina acetiltransferase (SAT). Posteriormente ocorre a condensação de OAS com sulfeto para gerar cisteína sendo esta reação catalisada pela cisteína sintase (CS). A via assimiladora ou *de novo* é descrita principalmente em plantas, bactérias e alguns protozoários, sendo ausente em mamíferos (WILLIAMS et al., 2009; NOZAKI et al., 2005).

1.3.2 Biossíntese em protozoários

Os parasitos desenvolveram vários mecanismos para

atender a demanda necessária de cisteína. Enquanto uns dependem exclusivamente da captação direta de seu hospedeiro mamífero, outros conseguem sintetizar a cisteína através da via *de novo* e/ou transulfuração reversa. *Plasmodium falciparum* e *Giardia duodenalis* são exemplos de parasitos que dependem exclusivamente de cisteína exógena para seu crescimento e defesa contra agentes oxidativos. A ausência dos genes para ambas as vias de síntese para cisteína corroboram com esta condição passiva de obtenção da cisteína (NOZAKI et al., 2005).

Alguns parasitas são capazes de sintetizar a cisteína por uma das vias como no caso da *Entamoeba histolytica* e *Trichomonas vaginalis* que utilizam a via *de novo*, entretanto a sua biossíntese não é suficiente sendo essencial a obtenção de cisteína exógena (WESTROP et al., 2009; HUSAIN et al., 2011). Estudos indicam que a cisteína extracelular é importante não apenas como fonte de aminoácidos, mas, principalmente no controle redox (GILLIN, DIAMOND, 1980).

Outro exemplo é o do *Trypanosoma brucei* que, mesmo na presença das enzimas da via de transulfuração reversa (C β S e CGL), também requer cisteína exógena como um nutriente essencial, sugerindo que apenas essa via de síntese não satisfaz a necessidade do parasito (DUSZENKO et al., 1992; BACCHI et al., 1995).

Interessantemente, *T. cruzi* foi o primeiro parasita que encontraram além da transulfuração reversa, enzimas para a via

de novo (SAT e CS) (NOZAKI et al., 2001). Posteriormente as enzimas de ambas as vias também foram descritas para *L. major* (WILLIAMS et al., 2009) (Figura 5).

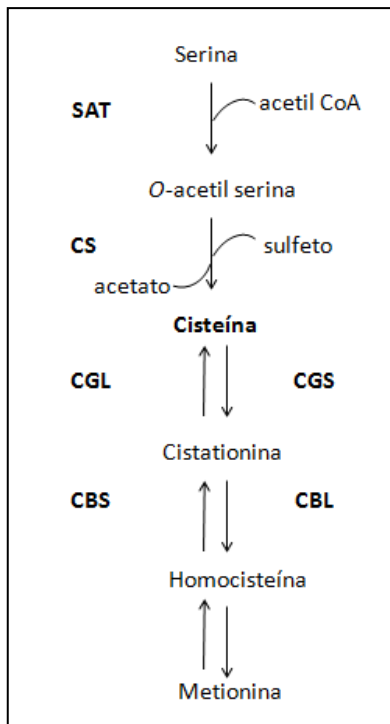


Figura 5. Vias da biossíntese de cisteína em *Leishmania major*. Via *de novo* contendo as enzimas serina acetiltransferase (SAT) e cisteína sintase (CS) e via de transsulfuração contendo as enzimas cistationina γ -liase (CGL), cistationina β -sintase (C β S), via contrária a de transsulfuração contendo cistationina β -liase (CBL) e cistationina γ -sintase (CGS). Fonte: adaptada de WILLIAMS et al., 2009.

Assim, esses tripanosomatídeos parecem ser os únicos organismos que possuem as duas vias metabólicas da cisteína. Essa aparente redundância torna-se intrigante, pois muitas células lidam muito bem com apenas uma única fonte de cisteína e seria um gasto energético excessivo manter as duas vias ativas.

Uma possível explicação seria para abastecer o aumento da síntese de T[SH]₂ e outros tióis que são necessários para sobreviver no ambiente oxidativo que parasito é exposto nos diferentes hospedeiros. Desde que os tripanosomatídeos requerem cisteína não só para a biosínteses de proteínas, mas também para formação de glutathiona e tripanotiona, que estão presentes em quantidades elevadas, os tripanosomas podem requerer múltiplas vias da aquisição de cisteína para garantir que esteja disponível para satisfazer essas necessidades (NOZAKI et al., 2001).

Outra possibilidade é pela disponibilidade de nutrientes exógenos, a qual difere consideravelmente entre os ambientes do parasita, no inseto e seus hospedeiros mamíferos, por exemplo, nos mamíferos os aminoácidos de enxofre e seus intermediários estão facilmente disponíveis para o parasito, enquanto que esses compostos são escassos no trato digestivo do inseto, talvez isso leve ao regulamento estágio-específico da síntese de cisteína; onde a via *de novo* dependente da enzima CS ocorra em um estágio e via de transulfuração reversa

dependente da enzima CBS ocorra em outro (WILLIAMS et al., 2009).

1.4 Características moleculares da Cistationina β -Sintase (C β S)

A C β S, enzima chave na via de transulfuração reversa, catalisa a condensação da serina com homocisteína para formar a cistationina (Figura 6). Esta enzima pertence à família de enzimas piridoxal 5- fosfato (PLP)-dependentes (β -família) (MILES; KRAUS, 2004). Seu domínio catalítico (PXXSVKDR) e alguns resíduos de lisina são altamente conservados entre as diferentes C β S e é homóloga de outros membros da β -família, tais como *O*-acetilserina sulfidrilase (ALEXANDER et al., 1994; GRISHIN et al., 1995).

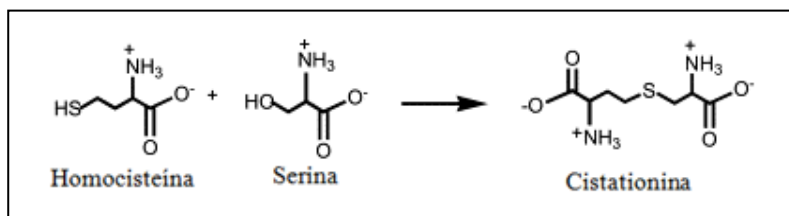


Figura 6. Metabolismo da Cistationina pela atividade catalítica da enzima Cistationina β -Sintase (C β S). Fonte: adaptada de BANERJEE, ZOU, 2005.

Existem duas classes distintas de Cistationina β -Sintase, uma encontrada em mamíferos, tais como o rato (OMURA et al., 1984) e seres humanos (KERY et al., 1994) e outra encontrada em *Saccharomyces cerevisiae* (JHEE et al., 2000), *Leishmania major* (WILLIAMS et al., 2009) e *T. cruzi* (NOZAKI et al., 2001) que difere da primeira pela ausência do domínio heme na região N-terminal e motivo oxidoreductase (CysXXCys). Embora o papel do domínio heme na C β S de seres humanos seja desconhecido, a catálise pela C β S pode ser explicada unicamente pela participação de PLP no mecanismo de reação (BATEMAN, 1997).

A região C-terminal da enzima de mamíferos contém um domínio alostérico para S-adenosil-L-metionina (AdoMet), um efetor positivo que se liga nesta região (SCOTT et al., 2004). Diferentemente, a C β S dos parasitos *T. cruzi* e *Leishmania* spp. não possui essa região C-terminal e não apresenta a participação da AdoMet em sua atividade. Esta região estaria relacionada com a estrutura homotetrâmera da enzima C β S humana, entretanto, mesmo na ausência da região C-terminal a C β S de *T. cruzi* mantém a estrutura homotetramera, sugerindo que não seja uma função exclusiva da região C-terminal (NOZAKI et al., 2001).

O alinhamento das sequências de C β S revela que os membros da β -família possuem homologia significativa na região central (centro catalítico) e pouca similaridade nas extensões N-

e C- terminais (Figura 7) (MILES, KRAUS, 2004). A ausência da região N- e C- terminal da C β S de *T. cruzi* faz com que tenha a menor seqüência em comparação com as demais e uma acentuada diferença com a enzima humana, constituindo um interessante alvo terapêutico.

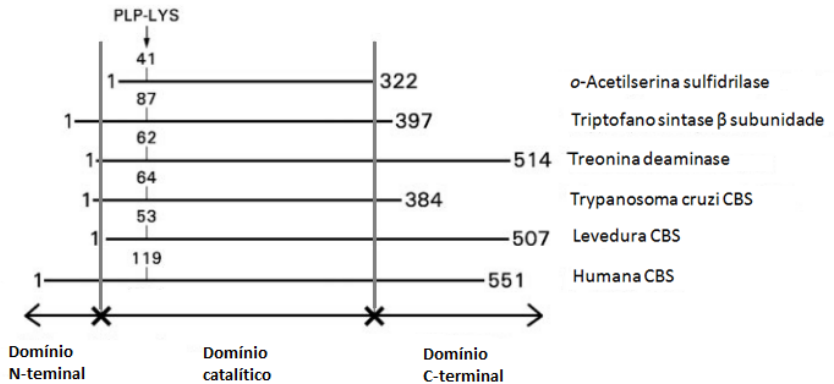


Figura 7. Organização dos domínios catalíticos e terminais das enzimas da β -família. As seqüências proteicas estão alinhadas a partir do resíduo de lisina. Fonte: adaptado de MILES, KRAUS, 2004.

2. Justificativa

Para todos os organismos vivos, a cisteína é de vital importância como aminoácido para a biossíntese de proteínas e como precursora para glutathione e como fonte de sulfeto para síntese de complexos sulfurados. Além disso, é uma molécula chave para o funcionamento da tripanotona na defesa antioxidante de tripanosomatídeos, permitindo sua sobrevivência no inseto vetor e, em especial, nos hospedeiros mamíferos. O metabolismo da cisteína difere entre alguns tripanosomatídeos, destacando-se o *T. cruzi* e *Leishmania* spp., os quais parecem ser os únicos a possuir dois caminhos para a geração da cisteína, a via *de novo* e a via de transulfuração reversa. Esta estratégia redundante deve prover o necessário aumento da síntese de T[SH]₂, permitindo a sua sobrevivência frente ao estresse a que estão expostos nos diferentes ambientes intracelulares e/ou extracelulares no hospedeiro mamífero e no vetor. Sendo assim, estudos mais aprofundados dessas vias são fundamentais para tentar compreender essa aparente redundância.

Desta forma, o presente trabalho teve como enfoque a enzima chave para a via de transulfuração reversa, a cistationina β-sintase do *Trypanosoma rangeli*, visando fornecer conhecimento sobre o papel desta enzima na defesa antioxidante do parasito. Estudos da biologia desse parasito são importantes

devido ao fato: i) do *T. rangeli* possuir várias semelhanças tanto morfológicas quanto moleculares e fisiológicas com *T. cruzi*, ii) que o *T. rangeli* é um modelo biológico com o qual são possíveis estudos comparativos com o *T. cruzi*, em relação à patogenicidade e a identificação de moléculas para alvos terapêuticos podem ser feitos, ainda que não seja patogênico ao ser humano e; iii) não haver relatos na literatura sobre a enzima C β S de *T. rangeli* e tampouco sobre a biossíntese de cisteína neste parasito. Entretanto, esta enzima já está bem caracterizada nos tripanosomatídeos patogênicos *T. cruzi* e *Leishmania major* que foram utilizados como referências para embasar a caracterização enzima C β S de *T. rangeli*.

Os resultados desse trabalho poderão auxiliar nos futuros estudos sobre o potencial da via biossintética da cisteína na sobrevivência dos tripanosomatídeos.

3. Objetivos

3.1 Objetivo geral

Caracteriza molecularmente a enzima Cistationina β -Sintase (C β S) de *Trypanosoma rangeli*.

3.2 Objetivos específicos

- Determinar a sequência do gene que codifica para a Cistationina β -Sintase (C β S) de *T. rangeli* e de *T. cruzi*, assim como o número de cópias do gene em cada genoma, mediante análises *in silico* e *in vitro*;
- Determinar a variabilidade interespecífica do gene da C β S entre os parasitos estudados;
- Expressar, de forma heteróloga, a enzima C β S dos parasitos *T. rangeli* e *T. cruzi*;
- Gerar soro policlonal α -C β S e avaliar a especificidade do mesmo por *Western blot*.

4. Material e métodos

4.1 Análises *in silico* das sequências da C β S dos parasitos

As análises *in silico* foram realizadas através da busca das sequências dos genes C β S e seus ortólogos nas bases de dados dos projetos transcriptoma (GRISARD et al., 2010), genoma de *T. rangeli* (<http://www.rangeli.incc.br>), projetos genoma de *T. cruzi* (<http://tritrypdb.org>) e na base de dados públicos GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). A sequência do gene C β S de *T. rangeli* foi obtido utilizando inicialmente as sequências do gene de *T. cruzi* (GenBank: EAN99137.1) para a busca através de análise comparativa utilizando-se o algoritmo *BLASTN*. Para a determinação das janelas abertas de leitura (*ORF*) utilizou-se o programa *ORFinder* do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>).

A partir das sequências de nucleotídeos dos genes, foi realizada a predição da sequência aminoacídica das proteínas as quais foram comparadas com as proteínas ortólogas de outros organismos como *T. brucei*, *Leishmania major*, *L. infantum* e *Homo sapiens* mediante o programa *ClustalW* (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>). A identificação dos domínios conservados nesta família de proteínas foi realizada pelo programa *Conserved Domains* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cddsrv.cgi>).

4.2 Material Biológico e Cultivos Celulares

Foram utilizadas neste estudo formas epimastigotas das cepas SC58 e Choachí de *T. rangeli* e Y de *T. cruzi* e formas tripomastigotas da cepa Choachí de *T. rangeli*.

Os procedimentos relacionados ao cultivo dos parasitos tanto de *T. rangeli* como de *T. cruzi* foram conduzidos de acordo com os procedimentos padrões do Laboratório de Protozoologia do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC. Em suma, formas epimastigotas dos parasitos foram cultivadas a 27°C através de repiques semanais em meio LIT (do inglês *Liver Infusion Tryptose*), suplementado com 10 % de soro bovino fetal (SBF), 50 unidades/ml de penicilina e 50 µg/ml de estreptomicina.

Formas tripomastigotas de cultura de *T. rangeli* foram obtidas segundo o protocolo descrito por Koerich et al. (2002) com algumas modificações. Inicialmente, 12×10^7 epimastigotas em fase exponencial de crescimento em meio LIT foram lavados duas vezes com PBS 1X (tampão salina fosfato, pH 7,4) e transferidos para garrafas de cultura celular de 25 cm² contendo 15 ml de meio DMEM pH 8,0 (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) suplementado com 1 g/l glicose, 5 mM L-glutamina e 5 % SBF. O processo de diferenciação foi acompanhado através

da visualização em microscópio óptico após a coloração dos parasitos com *Giemsa*. Os tripomastigotas foram coletados por centrifugação no 7º dia de cultivo, com uma taxa de diferenciação de aproximadamente 93 % de tripomastigotas.

4.3 Caracterização da organização genômica da CβS

A caracterização foi feita através do *Southern blot* e para tal o DNA genômico de *T. rangeli* e o de *T. cruzi* foram digeridos com enzimas de restrição. A escolha das enzimas foi realizada através do programa *NEBcutter* V2.0 (<http://tools.neb.com/NEBcutter2/>) e selecionadas aquelas que clivavam somente uma vez dentro do gene CβS: *AvaI*, *AvaII* e *EcoRV* para *T. rangeli* e *BamHI*, *EcoRI* e *HindIII* para *T. cruzi*. Utilizamos ainda como controle uma enzima verificada pelo mesmo programa que não possuía sítio de restrição dentro do gene CβS de *T. rangeli* (*HaeIII*) e *T. cruzi* (*AvaI*). As reações de digestão foram realizadas a 37 °C por 12 horas em tampões próprios dos fabricantes e os fragmentos resultantes resolvidos em eletroforese em gel de agarose 0,8 % corado em brometo de etídeo e digitalmente fotografado sob luz ultravioleta.

O gel foi processado antes da transferência para a membrana de nitrocelulose no qual foi adicionado a solução de depuração (HCl 250 mM) por 10 minutos em agitação, em seguida foi lavado com água ultrapura e transferido na solução de desnaturação (NaCl 1,5 M; NaOH 0,5 M) por 25 minutos em

agitação. Após uma segunda lavagem em água, adicionou-se a solução neutralizante (NaCl 1,5 M; Tris-HCl 0,5 M; pH 7,5), mantendo-se o gel em agitação por 30 minutos.

Após o processamento do gel, o DNA foi transferido para uma membrana de nitrocelulose por capilaridade (Figura 8). Esse processo ocorre em um recipiente de vidro onde foi adicionado 20X SSC (do inglês *Sodium Chloride/Sodium Citrate*) e contém um suporte onde será colocada a coluna de transferência. Para a montagem desta, foram colocados 3 folhas de papel filtro *Whatman* 3 mm saturados com 20X SSC, sobre estes papéis foi colocado o gel, a membrana de nitrocelulose saturada com 20X SSC e outras 3 folhas de papel filtro *Whatman* 3 mm saturadas com 10X SSC. Então foi colocada uma coluna de 5 cm de papel absorvente, uma placa de vidro e um peso de aproximadamente 750g.

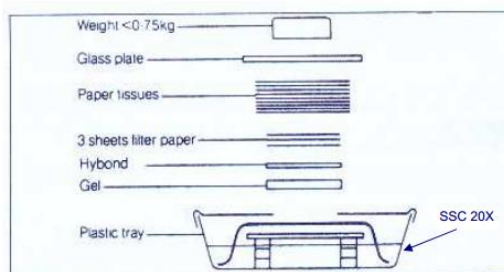


Figura 8. Montagem da transferência por capilaridade para o *Southern blot*. FONTE: *Amersham ECL Direct Nucleic Acid Labelling And Detection Systems* (GE Healthcare).

Decorrida a transferência, a membrana foi fixada através de luz ultravioleta (Energia 1.200 J) no aparelho *UV Cross Linker*[®] e mantida durante 1 hora a 42 °C em tampão de hibridização (0,5 M NaCl, 5 % agente bloqueador diluído em *ECL Gold Hybridization Buffer*[®]). As sondas correspondentes ao gene foram obtidas através de amplificação por PCR, sendo então marcadas pelo kit *ECL Direct Nucleic Acid Labelling and Detection System*[®] conforme especificações do fabricante. As sondas marcadas foram então incubadas com as membranas por 16 horas a 42°C sob agitação suave. Após a hibridação, as membranas foram lavadas três vezes com tampão de lavagem primário (SSC 0,5X, 0,4 % SDS, 6 M uréia) a 42°C e duas vezes em tampão de lavagem secundário (SSC 2X). A detecção da quimiluminescência foi realizada através da adição do reagente ECL sobre as membranas durante um minuto seguido da exposição a um filme radiográfico por 30 minutos para a membrana de *T. cruzi* e duas horas para a de *T. rangeli*. Para revelação dos filmes foi utilizando o processador de filmes SRX-101A (*Konica Minolta Medical & Graphic, INC - China*).

4.4 Clonagem dos genes de *T. rangeli* e *T. cruzi* que codificam para C β S

A purificação do DNA genômico, a amplificação via PCR e todos os procedimentos de clonagem e subclonagem, foram

realizados de acordo com os protocolos padrão já estabelecidos no Laboratório de Protozoologia, UFSC (SAMBROOK, RUSSELL, 2001).

A clonagem do gene C β S foi realizada mediante a amplificação da sequência codificante a partir de DNA genômico de formas epimastigotas de *T. rangeli* e *T. cruzi*, cultivadas *in vitro*. Usando iniciadores específicos dos genes destes parasitos contendo os sítios de restrição para as enzimas *XhoI* e *BamHI* em *T. rangeli* e *NdeI* e *XhoI* em *T. cruzi* (Figura 9).

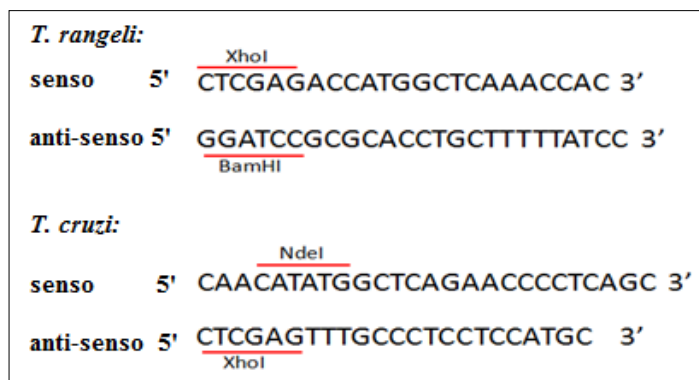


Figura 9. Sequência de nucleotídeos dos iniciadores específicos usados para amplificar e clonar os genes C β S de *T. rangeli* e *T. cruzi*. As barras vermelhas indicam os sítios para as enzimas de restrição.

Os produtos de PCR obtidos foram clonados utilizando-se o kit *pGEM-T Easy Vector*[®], sendo os produtos de ligação utilizados na transformação de células competentes DH5- α (*Escherichia coli*). Os clones recombinantes foram selecionados com base na seleção de cor azul/branco das colônias crescidas em meio LB ágar suplementado com ampicilina (100 $\mu\text{g/ml}$), X-Gal (20 $\mu\text{g/ml}$) e IPTG (40 $\mu\text{g/ml}$). A comprovação da presença dos insertos e o tamanho dos mesmos (~1.100 pb) foram realizadas através da amplificação do inserto por PCR diretamente da colônia de bactérias, utilizando-se os iniciadores específicos desenhados para cada gene. Os clones positivos contendo o gene C β S de *T. rangeli* (TrC β S), foram selecionados para sequenciamento. Para tanto, os clones positivos foram crescidos a 37 °C sob agitação por 16 horas em 5 ml de meio LB contendo ampicilina (100 $\mu\text{g/ml}$) e a extração do DNA plasmidial foi realizada mediante procedimento padrão de lise alcalina (*mini-prep*), conforme descrito por Sambrook e Russell (2001).

O sequenciamento foi realizado no equipamento *MegaBace 1000*[®] *DNA Analysis System* (GE/Amersham Biosciences, Buckinghamshire). A reação de sequenciamento foi preparada a partir do DNA plasmidial e o kit *DYEnamic*[®] *ET Dye Terminator* (GE/Amersham Biosciences) conforme especificações do fabricante. As sequências obtidas foram analisadas quanto à sua qualidade utilizando-se o pacote *Phred/Phrap/Consed* (<http://www.phrap.org>). A confirmação da

identidade dos fragmentos foi realizada utilizando o programa BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) e as sequências obtidas foram alinhadas utilizando-se o programa *ClustalW*.

4.5 Expressão *in vitro* e purificação de C β S recombinante

Para a expressão heteróloga dos genes C β S, o DNA plasmidial obtido dos clones positivos foi submetido à digestão com as enzimas de restrição específicas para a liberação dos insertos (*Xho*I / *Bam*HI para *TrC β S* e *Nde*I / *Xho*I para *TcC β S*) durante 12 h a 37 °C. Após a digestão, os produtos foram visualizados através de eletroforese em gel de agarose 0,8 %, sendo as bandas com o tamanho de interesse (~1.100pb) 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.

Após a purificação, esses insertos foram ligados ao vetor de expressão pET-14b (Novagen, Darmstadt) e utilizados na transformação de células competentes *E. coli* TOP10 e *E. coli* BL21 (DE3) permitindo a expressão das proteínas recombinantes contendo uma cauda de seis histidinas (*His-Tag 6x*) o que facilita a purificação utilizando cromatografia de afinidade. A transformação das bactérias foi feita por choque térmico e após uma hora de crescimento em 1 ml de meio SOC (*Super Optimal*

broth with Catabolite repression) as bactérias foram semeadas em placas LB ágar (100 µg/ml ampicilina) e mantidas a 37 °C por 18 horas. A seleção dos clones recombinantes foi feita a partir de PCR diretamente das colônias (PCR de colônia) e confirmação da orientação do inserto nos clones positivos foi feita mediante *PCR-frame*, usando o iniciador senso T7, desenhado a partir de promotor T7 do plasmídeo e os iniciadores anti-senso específicos para o gene CβS de cada parasito.

Para a expressão heteróloga, uma colônia positiva de cada gene foi utilizada em um pré-inóculo em 10 ml de meio LB suplementado com 100 µg/ml de ampicilina e mantido a 37 °C por 18 h sob agitação. Uma diluição de 1:100 em 100 ml do mesmo meio foi mantida sob agitação constante a 37 °C até atingir uma densidade óptica de 0,6. Neste momento, foi retirada uma alíquota da cultura como controle não induzido e no restante foi adicionado isopropil-β-D-tiogalactopiranosídeo (IPTG), na concentração final de 1 mM, prosseguindo-se por 1 h ou 2 h a 37 °C sob agitação. Após o tempo da indução, as bactérias foram coletadas por centrifugação a 4.000 x g por 10 min a 4 °C. O sedimento foi submetido à lise por ultrassom 10 vezes por 30 segundos cada após adição do tampão A (fosfato de sódio 50 mM; cloreto de sódio 0,3 M pH 8,0; piridoxal fosfato- PLP 25 µM). As frações coletadas foram analisadas mediante a SDS-PAGE, seguidas de *Western blot* usando um anticorpo monoclonal contra a cauda de histidinas (*α-His-Tag*).

As proteínas recombinantes de *T. rangeli* (rTrCβS) e de *T. cruzi* (rTcCβS) foram purificadas por cromatografia de afinidade a partir da fração insolúvel usando uma resina de níquel (Ni-NTA, Qiagen) conforme os protocolos estabelecidos pelo Laboratório de Protozoologia e as instruções do fabricante. Para as lavagens e eluição das proteínas foi utilizado o tampão B (100 mM NaH₂PO₄, 8 M Uréia, 10 mM Tris- HCl) em diferentes pH (lavagens: pH 6,0 e eluição: pH 4,0). Uma vez eluída a proteína foi dialisada duas vezes a 4 °C em tampão de diálise (100 mM Tris-HCl, pH 8,5; 500 mM NaCl, 0,5 mM EDTA, 20% glicerol, 5 mM DTT), sendo que a última diálise foi feita no mesmo tampão contendo glicerol 40%. Posteriormente, as proteínas purificadas e as etapas de purificação foram avaliadas em géis SDS-PAGE 12 % seguido de *Western blot*.

4.6 Obtenção e avaliação da especificidade do soro policlonal α-CβS por *Western blot*

O soro α-rTrCBS foi produzindo a partir da imunização de quatro camundongos fêmeas BALB/c com aproximadamente 50 µg da proteína rTrCBS purificada e emulsificada em Alu-Gel S (hidróxido de alumínio 1,3 %). Foram realizadas quatro inoculações pela via subcutânea com intervalo de 15 dias. O soro policlonal foi obtido através da coleta de sangue dos camundongos por punção cardíaca. O sangue coletado foi

refrigerado por 30 minutos para formação de coágulo e, em seguida, centrifugado a 800 x g por 10 minutos, soro foi armazenado a -20 °C. Os procedimentos para obtenção do soro contaram com a ajuda do aluno de doutorado do Laboratório de Protozoologia, Jair Téllez.

Para determinar a titulação dos soros, provenientes dos quatro camundongos, foi realizado teste de ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) indireto. Resumidamente, foram utilizados 50 ng da proteína recombinante rTrCβS diluída em tampão carbonato 0,05 M (0,5 M Na₂CO₃, 0,5 M NaHCO₃) para sensibilizar uma microplaca descartável de poliestireno com 96 cavidades durante 3 h a 37 °C. Após a sensibilização, a placa foi lavada três vezes com 200 ml de tampão de lavagem (PBS-Tween 0,05 %) e adicionada a solução de bloqueio (PBS 1 X, 0,05 % Tween, 5 % de leite em pó) por 12 h a 4 °C. Após novas lavagens (cinco vezes) a placa foi incubada por 1 h a 37 °C com o soro α-rTrCβS, sendo que para os soros foram realizadas diluições seriadas em PBS-Tween, iniciando-se com uma diluição de 1:400. Além disso, controles positivos (anticorpo anti-HisTag e extratos de *T. rangeli* e *T. cruzi*) e negativos (soro de camundongo não imunizado e somente PBS-Tween) foram adicionados a cada placa. Decorrido o tempo, a placa foi novamente lavada (cinco vezes) com tampão de lavagem e incubado com 100 µl de anticorpo anti-imunoglobulina total conjugado com peroxidase diluído 1:7500 em PBS-BSA 3 %

durante 1h a 37 °C. A revelação ocorreu através da adição de 100 µl de solução substrato-cromógeno [0,4 % OPD, 30 % H₂O₂, 25 ml tampão citrato (0,45 M citrato tri-sódico, 0,01 M ácido cítrico mono-hidratado, pH 5,6)] por cinco minutos no escuro e adicionado 50 µl de solução de parada (ácido sulfúrico 4N). Os ensaios foram realizados em triplicata para o conjunto dos soros dos camundongos imunizados com a proteína recombinante rTrCβS e a leitura foi realizada a 492 nm na leitora de placa Infinite M200 (TECAN), e o limite de reatividade adotado foi correspondente a uma absorbância três vezes maior que a média dos controles negativos.

A avaliação do soro α-rTrCβS foi realizada através do ensaio de *Western blot* utilizando extratos proteicos de *T. rangeli* (formas epimastigota e tripomastigota), de *T. cruzi* (forma epimastigota), de *L. braziliensis* (forma promastigota), além de macrófagos derivados de monócitos humanos e a proteína CβS recombinante de *T. rangeli* (rTrCβS) como controles. Os extratos proteicos foram produzidos segundo o protocolo de Decuyper et al. (2012). Resumidamente, os parasitos e as células coletadas foram ressuspensas em tampão de lise (0,25 M sucrose, 0,25 % triton X-100, 10 mM EDTA) contendo o inibidor de proteasas (10 mM E-64, 2 mM 1,10- fenantrolina, 4 mM pepstatina A, 1 mM fenilmetilsulfonilfluoreto) e lisados pela aspiração repetida usando uma seringa de insulina com agulha 0,33 mm de diâmetro. Os detritos celulares foram removidos por

centrifugação a $14.000 \times g$ por 20 minutos a 4°C , os sobrenadantes foram coletados e suas concentrações estimadas através da dosagem pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976).

Para o ensaio de *Western blot* foi realizada a separação eletroforética dos extratos proteicos (50 e $100 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) e da proteína C β S recombinante - rTrC β S ($8 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) aquecidos a 95°C durante 5 minutos e resolvidas em eletroforese em gel SDS-PAGE 12 %. Após a resolução, as amostras foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose através da transferência molhada utilizando o tampão de transferência (tris 25 mM, glicina 192 mM, 20 % metanol) dentro da cuba de eletroforese por 2 horas a 100 V em gelo. Após a transferência, a membrana foi bloqueada em solução contendo 5% de leite em pó dissolvido em tampão de *blotting* (150 mM NaCl, 25 mM Tris-HCl pH 7,4, 1% Tween 20) por 12h. Decorrido este tempo, a membrana foi lavada (5 vezes) por cinco minutos com o tampão de *blotting* e incubado por 90 minutos em temperatura ambiente com o soro policlonal anti α -rTrC β S diluído 1:1000 (v/v) em tampão de *blotting*, contendo 2 % de leite em pó. A detecção foi realizada utilizando-se um anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado à peroxidase.

A revelação foi realizada utilizando-se o reagente *Pierce*[®] *ECL Western Blotting Substrate* (Thermo Fisher Scientific, Rockford), expondo-se a mesma a um filme radiográfico. Após a

exposição, o filme foi revelado utilizando o processador automatizado de filmes SRX-101A (*Konica Minolta Medical & Graphic, INC – China*).

5 Resultados e Discussão

5.1 Análises *in silico* das sequências do gene C β S de *T. rangeli* e *T. cruzi*

A busca do gene C β S do *T. rangeli*, baseada nas sequências da C β S de *T. cruzi* e realizada nas bases de dados do genoma e do transcriptoma de *T. rangeli*, revelou que o gene *TrC β S* possui uma ORF com 1.121 pb que codifica para uma proteína de 373 aminoácidos com uma massa de aproximadamente 44 kDa. Esta proteína predita revelou alta similaridade de sequência com a C β S de *T. cruzi* (84%), de *T. brucei* (78%) e de *L. major* (75%), porém apresentou baixa similaridade com a C β S humana (50%).

Os alinhamentos múltiplos confirmaram que a C β S de *T. rangeli* (*TrC β S*), apresenta o motivo de ligação ao cofator piridoxal fosfato (PLP) altamente conservado (PXXSVKDR) e três dos quatro resíduos de lisina (Lis⁵³, Lis⁶⁴ e Lis²¹³) que são importantes na atividade catalítica e que já foram descritos nas C β S de outros tripanosomatídeos relacionados (WILLIAMS et al., 2009) e de outros organismos, incluindo o homem (GRISHIN et al., 1995).

Nossas análises em relação ao gene C β S de *T. cruzi* revelou que possui uma ORF com 1.206 pb que codifica para uma proteína de 401 aa com massa aproximado de 41 kDa e que apresentou alta similaridade com C β S de *L. major* e *L. infantum*

(72%). Esses resultados foram semelhantes ao encontrado por NOZAKI et al. (2001) quem primeiramente caracterizou esta enzima em *T. cruzi*.

As análises comparativas mostraram que a *TtCβS* assim como as *CβS* em *T. cruzi* (NOZAKI et al., 2001), e em *L. major* (WILLIAMS et al., 2009), difere da *CβS* humana por não apresentar no N-terminal o domínio de ligação heme e tampouco o domínio regulatório C-terminal (Figura 10).

foram de *T. cruzi* (TcCBS) GenBank: EAN99137.1; *T. rangeli* (TrCBS); *T. brucei* (TbCBS); *Leishmania major* (LmjCBS) GenBank: XP_001682279.1; e humano (CBSHUMAN1) GenBank: AAP35818.1. Retângulo indica a sequência consenso do motivo de união ao cofator piridoxal fosfato (PXXSVKDR). (▽) Resíduos de lisina importantes na atividade catalítica. (◇) Substituição da 4ª lisina. (▲) Resíduos de união a HEME da CBS do humano.

Em humanos, o domínio regulatório C-terminal está diretamente relacionado com a ligação do ativador alostérico S-adenosilmetionina (AdoMet) e a ativação da atividade enzimática (IGNOUL, EGGERMONT, 2005) sugerindo assim que nesses tripanosomatídeos a CβS não seja ativada pela AdoMet e a sua atividade não dependa desses domínios (MEIER, et al., 2001)

Em relação ao domínio de ligação heme ainda não se conhece exatamente o seu papel na CβS de humanos, contudo, estudos indicam que a eliminação desse grupo provoca a perda da sensibilidade redox, levantando a hipótese que o domínio de ligação heme seja um sensor redox (YAMANISHI et al., 2006). Apesar disso, a perda desse domínio não é exclusiva dos tripanosomatídeos, já foi descrita na CβS de leveduras e verificou-se que essa redução é acompanhada por um significativo aumento da sua atividade específica, sendo que o núcleo ativo da enzima é cerca de duas vezes mais ativo quanto à enzima com o comprimento total.

A divergência entre as CβS dos humanos e desses parasitos revela essa enzima como um potencial alvo terapêutico a ser estudado. Apesar do *T. rangeli* não ser patogênico ao

homem, os estudos de caracterização e funcionalidade dessa enzima podem ser utilizadas como modelo experimental e auxiliar no desenvolvimento de um novo medicamento para a Doença de Chagas e Leishmanioses.

5.2 Caracterização da organização genômica da C β S

A análise do gene *TrC β S* por *Southern blot* (Figura 11A), utilizando como sonda o fragmento correspondente ao gene, revelou um padrão de cópia única. Para a digestão do DNA genômico de *T. rangeli* com as enzimas *AvaI*, *AvaII* que possuem um sítio de clivagem dentro da sonda, foram observadas duas bandas para cada enzima, entretanto com a enzima *EcoRV* que também possui sítio de clivagem dentro da sonda, foi observado apenas uma fraca banda bem acima do tamanho esperado, provavelmente a digestão neste caso não foi bem sucedida.

Para a digestão com a enzima *HaeIII*, que não possui o sítio de clivagem dentro da sonda, foi observada uma única banda positiva, confirmando que o gene C β S de *T. rangeli* está presente no genoma como cópia única (Figura 11B). Esta análise *in vitro* confirmaram as análises *in silico*, onde encontramos a sequência de apenas um gene correspondente à enzima C β S em seu genoma.

Esse resultado é compatível com outros tripanosomatídeos em que o gene C β S também se apresenta

como cópia única entre eles estão: *L. major*, *L. infantum*, *L. braziliensis* e *T. brucei* (WILLIAMS et al., 2009).

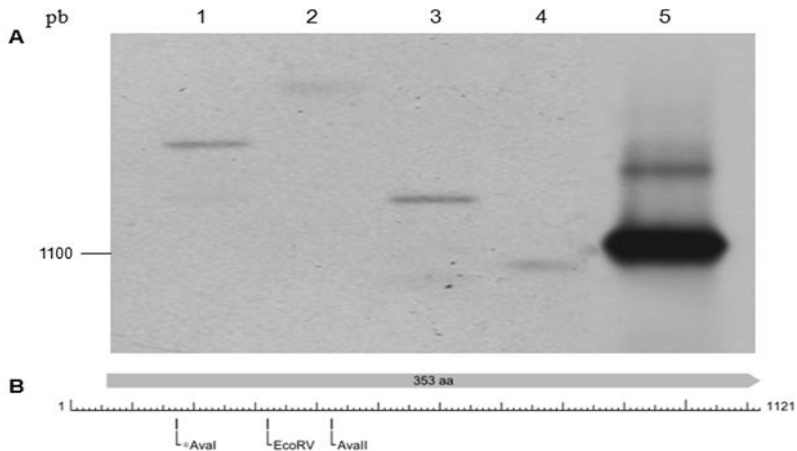


Figura 11. Caracterização da organização genômica da CβS de *T. rangeli*. (A) Análise por Southern blot. Digestão do DNA genômico de *T. rangeli* com as enzimas de digestão interna no gene: Aval (1), EcoRV (2), Avall (3) e digestão externa: HaeIII (4); sonda de DNA plasmidial *TrCβS* (5). **(B) Mapa de restrição do gene identificando os sítios de restrição das enzimas utilizadas.**

A análise do gene CβS de *T. cruzi* realizada através da digestão do DNA genômico com enzimas de restrição e utilizando como sonda o fragmento correspondente ao gene revelou um perfil multicópias (Figura 12). Para as enzimas de restrição *HindIII*, *BamHI* e *EcoRV*, que clivam uma vez dentro do gene, foram observadas várias bandas igualmente espaçadas sugerindo que o gene *TcCβS* está presente no genoma deste parasito como multicópias e em repetições sequenciais (*tandem*).

A enzima *Aval* que não tem sítio de clivagem dentro do

gene também apresentou várias bandas confirmando que gene de C β S aparece em diferentes locais no genoma de *T. cruzi* (Figura 12). Esse perfil foi semelhante ao encontrado por NOZAKI et al. (2001) e corroborou com as suas análises *in silico* onde indicou que o gene da C β S de *T. cruzi* possui ao menos quinze cópias dispersas no genoma.

O fato de um gene ser multicópia pode estar revelando uma estratégia para garantir ou mesmo aumentar a expressão da proteína, o que está ligado à necessidade vital do parasito em sobreviver aos diversos ambientes oxidativos e com variável disponibilidade de nutrientes.

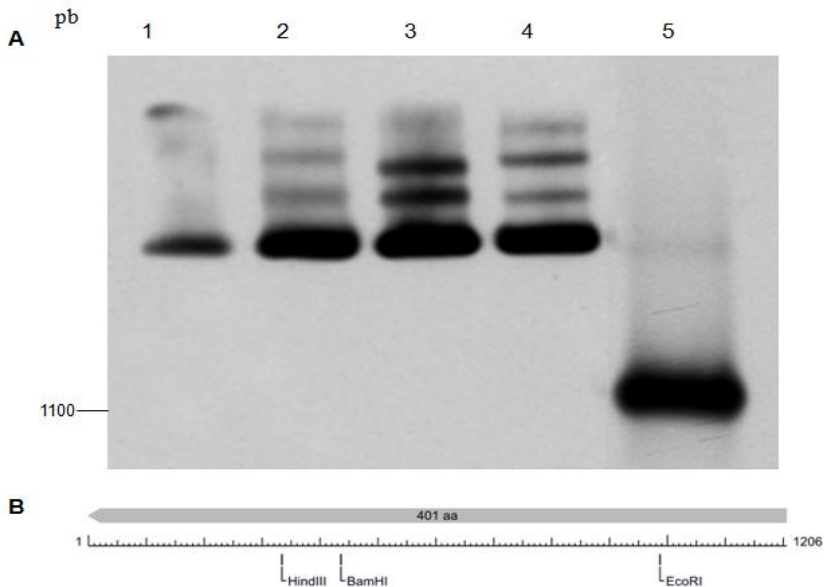


Figura 12. Caracterização da organização genômica da C β S de *T.*

***cruzi* (A). Análise por Southern blot.** Digestão do DNA genômico de *T. cruzi* com as enzimas de digestão interna no gene: HindIII (1), BamHI (2), EcoRI (3) e digestão externa: Aval (4); sonda de DNA plasmidial *TcCβS* (5). **(B) Mapa de restrição do gene identificando os sítios de restrição das enzimas utilizadas.**

5.3 Amplificação e clonagem dos genes de *T. rangeli* e *T. cruzi* que codificam para CβS.

Com base na sequência codificante dos genes CβS tanto de *T. rangeli* quanto de *T. cruzi*, foram desenhados os iniciadores específicos os quais permitiram a amplificação de um fragmento de tamanho esperado para cada gene de aproximadamente 1.100 pb usando os parâmetros padronizados para a amplificação por PCR (Quadro 1).

Quadro 1 – Padrão da amplificação por PCR dos genes *TrCβS* e *TcCβS*

Ciclo	Temperatura (°C)	Tempo
Desnaturação	94	1 minuto
Ligação dos iniciadores	62	45 segundos
Extensão	72	30 segundos

Tendo determinado que os iniciadores desenhados amplificam o gene do tamanho esperado, procedeu-se a

realização do teste de especificidade. Para tal, foram realizadas reações de PCR utilizando os DNA genômico de *T. rangeli* cepas SC58 e Choachí, *T. cruzi* cepa Y e *L. braziliensis* cepa M2904 (Figura 13). As reações resolvidas em gel de agarose 0,8 % mostraram alta especificidade dos iniciadores entre as diferentes espécies analisadas.

Os iniciadores para *T. rangeli* amplificam somente o gene das amostras de DNA deste parasito (poços 2 e 3) e com igual intensidade. Sendo assim, a cepa SC58 foi escolhida para os experimentos subsequentes. Da mesma forma, os iniciadores para *T. cruzi* revelaram-se ser específicos para este parasito (poço 9).

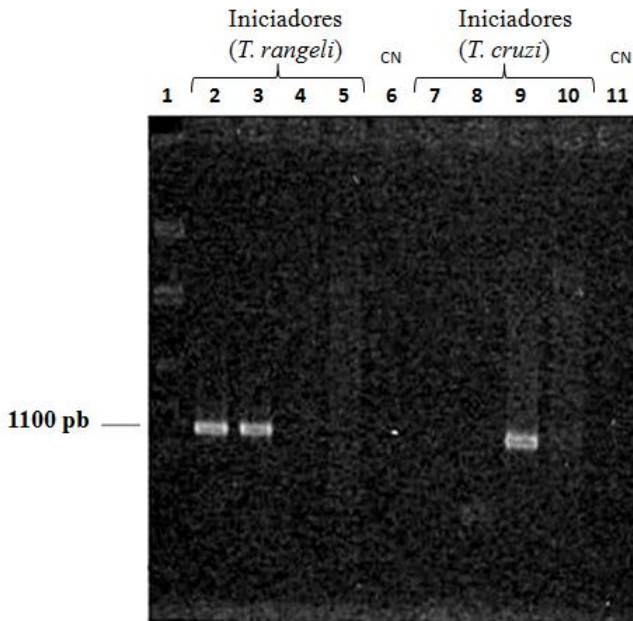


Figura 13. Gel de agarose 0,8 % da PCR para verificar a especificidade dos iniciadores para o gene C β S de *T. rangeli* e *T. cruzi* comparando com DNA genômico de outros tripanosomatídeos. Padrão de peso molecular (fago lambda digerido com as enzimas HindIII e EcoR)(1). Iniciadores para o gene C β S de *T. rangeli* (2-5) e de *T. cruzi* (7-10). DNA genômico de *T. rangeli* SC58 (2 e 7) e Choachí (3 e 8), *T. cruzi* Y (4 e 9) e *L. braziliensis* (5 e 10). Controle negativo (11).

Os produtos obtidos da PCR foram clonados em vetor *pGEM T-easy* e usados para a transformação em células DH5-alfa (*E. coli*). A seleção das colônias foi feita pela coloração azul/branco baseada na α -complementação do gene β -galactosidase, dessa maneira algumas colônias brancas foram selecionadas ao

acaso e avaliadas pela técnica PCR de colônia seguida da eletroforese em gel de agarose 0.8%.

Das nove colônias brancas avaliadas para *T. rangeli*, sete foram positivas contendo o gene C β S, para *T. cruzi* cinco das seis colônias testadas (Figura 14). O sequenciamento do DNA, feito para um dos clones positivos, confirmou a identidade dos genes C β S.

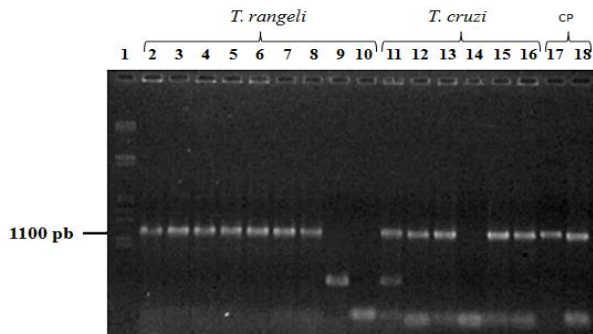


Figura 14. Gel de agarose 0,8% da PCR de colônia utilizando os iniciadores específicos para os correspondentes genes *TrC β S* e *TcC β S*. Padrão de peso molecular (fago lambda digerido com as enzimas HindIII e EcoR) (1). Colônias referentes à *T. rangeli* (2 à 10). Colônias referentes à *T. cruzi* (11 à 16). Controles positivos: DNA genômico de *T. cruzi* (17) e DNA genômico *T. rangeli* (18).

5.4 Expressão heteróloga da proteína C β S recombinante

Para a expressão heteróloga os genes da C β S, tanto de *T. rangeli* quanto de *T. cruzi*, foram isolados a partir das colônias

positivas pela extração plasmidial (*mini-prep*) e posterior digestão enzimática do plasmídeo contendo os insertos de interesse (C β S). Após a resolução em gel de agarose, obtivemos bandas com tamanho aproximadamente de 1.100 pb referentes aos insertos (C β S de *T. rangeli* e *T. cruzi*) e de 3.646 pb referente ao vetor digerido (pET14b) que foram recortados do gel e purificadas para posterior ligação entre eles (Figura 15).

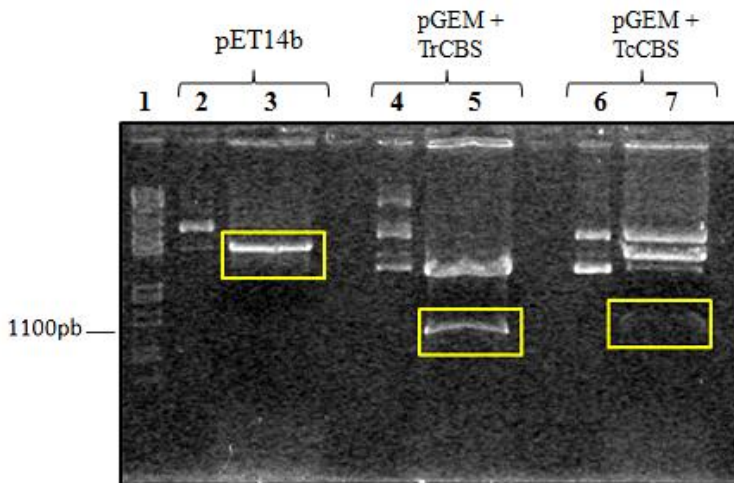


Figura 15. Gel de agarose 0,8% da digestão enzimática dos insertos (pGEM com o gene C β S de *T. rangeli* e *T. cruzi*) e do vetor (pET14b). Tanto os vetores que contêm os insertos TrC β S e TcC β S quanto o pET14b foram digeridos com as enzimas BamHI/ XhoI e XhoI/NdeI, respectivamente. Padrão de peso molecular (fago lambda digerido com as enzimas HindIII e EcoR) (1); Vetor não digerido (2); vetor digerido (3); pGEM com o gene C β S de *T. rangeli* não digerido (4) e digerido (5); pGEM com o gene C β S de *T. cruzi* não digerido (6) e digerido. Os retângulos indicam: o vetor digerido (3) e os insertos de *T. rangeli* e *T. cruzi* (5 e 7 respectivamente).

A subclonagem do inserto contendo o gene *TrC β S* no vetor pET14b propagada em *E. coli* TOP10 e a avaliada por PCR de colônia revelou positividade em todas as seis colônias selecionadas, pois, apresentaram bandas do tamanho esperado de 1.100 pb, sendo que em três delas a banda teve grande intensidade (Figura 16A). Em uma dessas três colônias positivas foi realizada a extração do DNA plasmidial, que foi utilizado para transformação em *E. coli* BL21 (DE3). Entre as colônias crescidas foram escolhidas quatro e foi verificado por PCR de colônia que todas estas continham o inserto (Figura 16B).

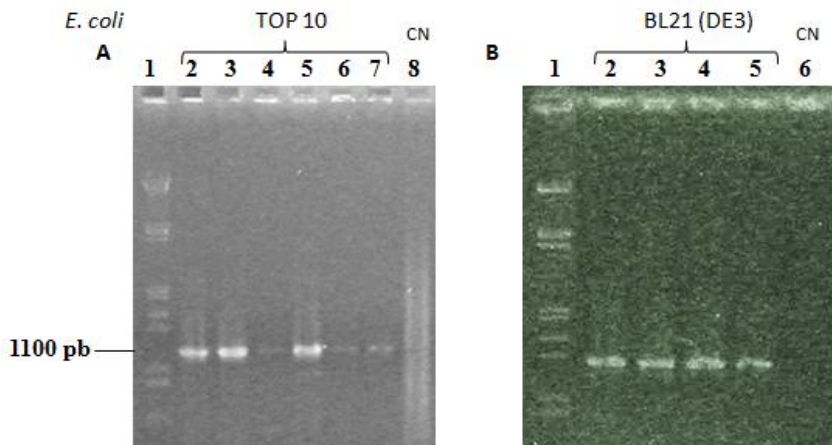


Figura 16. Gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídio do teste de PCR de colônia. (A) Colônias transformadas com o plasmídeo pET14b + *TrC β S* em *E. coli* TOP10 (2 à 7) e **(B)** em *E. coli* BL21 (DE3) (2 à 5), controles negativos (8 e 6). Padrão de peso molecular (fago lambda digerido com as enzimas *Hind*III e *Eco*R) (1).

O inserto contendo o gene *TcC β S* também foi subclonado em pET14 e foram propagadas em *E. coli* TOP10 e *E. coli* BL21 (DE3), cujas colônias foram avaliadas por PCR de colônia e *PCR-frame*.

Na resolução em gel de agarose 0,8 % apenas uma colônia foi positiva para ambos os testes (poço 7 e 17) referente a uma colônia de *E. coli* TOP10 (figura 17A). Desta colônia foi realizada a extração plasmidial para isolar o gene e transformado em *E. coli* BL21 (DE3). Das colônias crescidas, quatro foram selecionadas ao acaso para avaliação por PCR de colônia e *PCR-frame*, sendo que todas foram positivas para ambos os testes pois apresentaram uma forte banda do tamanho esperado de 1.100 pb (figura 17B).

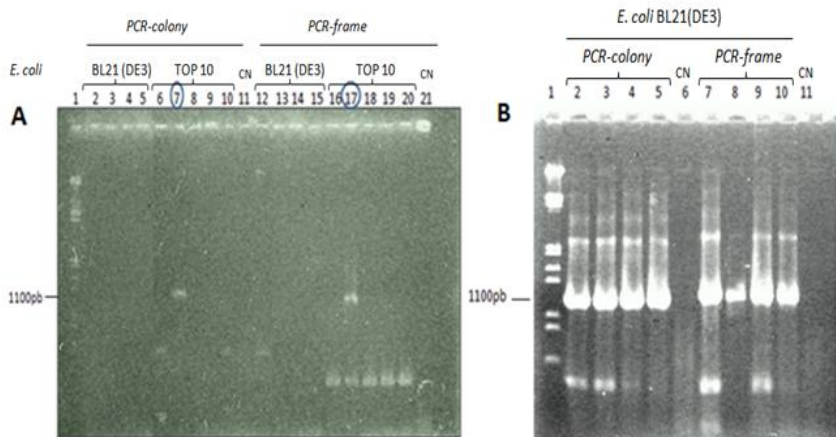


Figura 17. Gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídio dos testes de PCR de colônia e *PCR-frame*. (A) Transformação com o

plasmídeo pET14b+TcC β S em *E. coli* TOP10 (2 à 5) e *E. coli* BL21 (DE3) (6 a 10), teste *PCR-frame* das respectivas colônias (12 à 21). Círculo indica a única colônia positiva para ambos os testes. **(B)** Transformação em *E. coli* BL21 (DE3), PCR de colônia (2 à 5), *PCR-frame* (7 à 10), controles negativos (6 e 11). Padrão de peso molecular (fago lambda digerido com as enzimas *HindIII* e *EcoR*) (1).

A expressão das proteínas recombinantes foi realizada utilizando uma colônia de *E. coli* BL21(DE3) positiva contendo o gene em fase de leitura correta. Nos ensaios preliminares de expressão foram avaliados dois tempos diferentes de indução (1-2h). Os extratos de proteínas dos clones induzidos com 1 mM de IPTG foram analisados mediante SDS-PAGE, nos quais foram observadas bandas do tamanho esperado das proteínas recombinantes de aproximadamente 44 kDa em todas as colunas, sendo bem proeminentes nas frações insolúveis tanto para os clones contendo o inserto da C β S de *T. cruzi* quanto para os clones contendo o inserto de *T. rangeli* (Figura 18A).

Estes mesmos extratos foram então analisados através de *Western blot* utilizando anticorpo anti-HisTag, que confirmou a expressão de proteínas recombinantes (Figura 18B), sendo melhor a 1 hora para rTcC β S e 2h para rTrC β S.

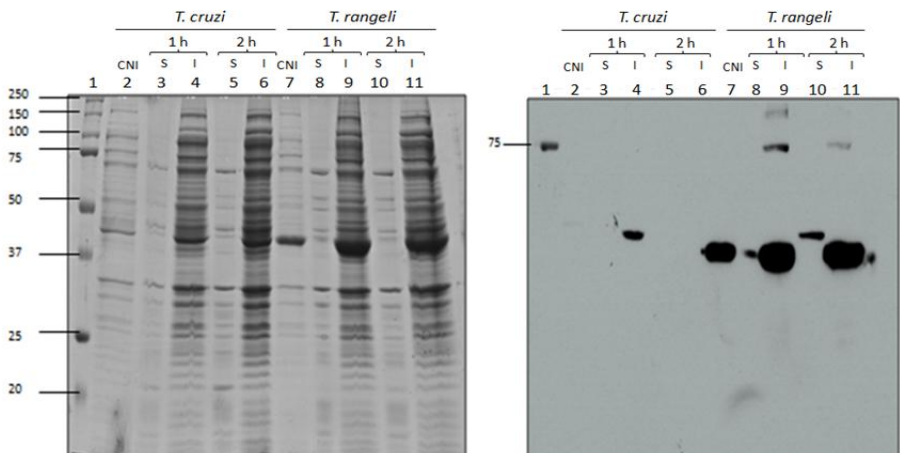


Figura 18. Análises da expressão das proteínas C β S recombinantes de *T. cruzi* cepa Y e *T. rangeli* cepa SC58. (A) Gel de poliacrilamida SDS-PAGE 12% corado com *Coomassie blue*. Padrão de peso molecular *Precision Plus Protein™* (1); rTcC β S (2-6); rTrC β S (7-11); controle não induzido - CNI (2 e 7); 1h de indução na fração solúvel -S (3 e 8) e na fração insolúvel - I (4 e 9); 2h de indução na fração S (5 e 10) e na fração I (6 e 11). (B) *Western blot* do gel A utilizando anticorpo monoclonal anti-His•Tag®.

Padronizadas e selecionadas as melhores condições de expressão, foi possível obter as proteínas recombinantes em quantidade suficiente para as análises previstas a partir da fração insolúvel, as quais foram purificadas por cromatografia de afinidade e quantificadas usando o método de *Bradford*. A partir de 120 ml de cultura foram obtidos 3 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de rTcC β S e 3,8 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de rTrC β S. As análises de *Western blot* usando o anticorpo monoclonal anti-His•Tag

confirmaram a presença das proteínas recombinantes nas frações eluídas (Figura 19).

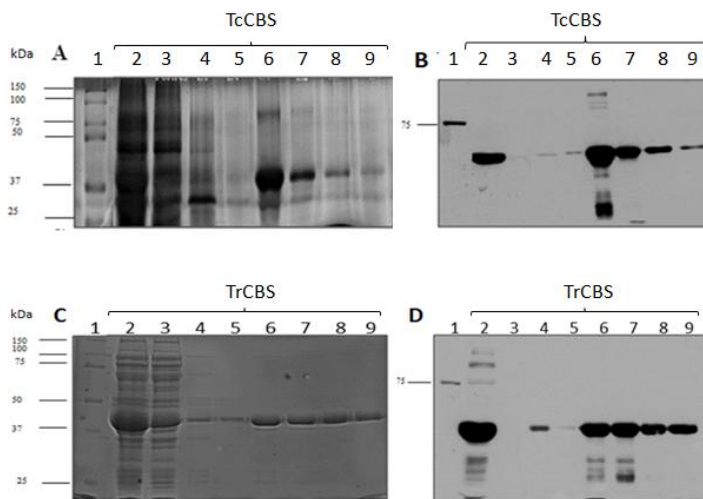


Figura 19. Gel de poliacrilamida SDS-PAGE 12% e *Western blot* utilizando anticorpo monoclonal anti-His•Tag® das etapas da purificação por cromatografia de afinidade. (A e B) *rTcCBS* e (C e D) *rTrCBS*. Padrão de peso molecular *Precision Plus Protein™* (1), fração insolúvel total (2), Flow throug (3), 1ª lavagem (4), 4ª lavagem (5), eluições (6, 7, 8 e 9).

5.5 Avaliação da especificidade do antissoro policlonal (α -C β S)

O teste de ELISA indireto mostrou que o antissoro α -C β S, produzido a partir da proteína recombinantes *rTrCBS*, alcançou uma boa titulação de 1:1600 que foi utilizado para os ensaios de *Western blot*.

O ensaio inicial de *Western blot* confirmou que antissoro

α -C β S produzido foi capaz de reconhecer bandas do tamanho esperado de aproximadamente 44 kDa nos extratos proteicos totais (8 mg/mL) dos três parasitos avaliados. Entretanto, observamos que o antissoro apresenta alta especificidade no reconhecimento do gene C β S nas formas epimastigotas de *T. cruzi* e de *T. rangeli* o qual pode ser justificado pela alta identidade (84%) entre as sequências deste gene. Já em *L. braziliensis*, que possui uma identidade menor entre as sequências (75%), o reconhecimento ocorreu com intensidade muito menor daquelas observadas para *T. cruzi* e *T. rangeli* (Figura 20).

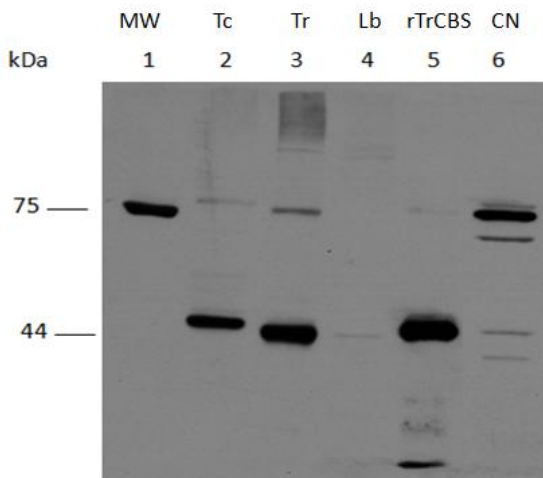


Figura 20. Western blot utilizando soro policlonal anti-rTrC β S (1:1600). Padrão de peso molecular *Precision Plus Protein*TM (1); Extrato de proteínas de *T. cruzi* na forma de epimastigota - Tc (2); Extrato de proteínas de *T. rangeli* na forma epimastigota - Tr (3); Extrato de

proteínas de *L. braziliensis* na forma promastigota - Lb (4); Controle positivo - rTrC β S (0,8 mg/mL) (5); Controle negativo extrato de bactéria BL21 com pET14b - CN(6).

Com o objetivo de verificar se a expressão da C β S é diferencial nos estágios evolutivos de *T. rangeli*, extratos totais de proteínas de tripomastigotas e epimastigotas deste parasito foram submetidos a ensaios de *Western blot*. Os resultados da comparação entre os extratos proteico dos parasitos nas mesmas concentrações mostram que C β S é expressa nos dois estágios evolutivos do *T. rangeli* sem diferenças aparentes na sua expressão.

O extrato proteico da forma epimastigota de *T. cruzi* foi utilizado neste experimento apenas para a comparação com a expressão da enzima de *T. rangeli*, isso porque, a expressão da C β S de *T. cruzi* já foi descrita no trabalho de Nozaki et al. (2001). Em seu trabalho, revelou que a expressão da C β S é estágio-dependente e que a forma epimastigota apresenta maior expressão em relação à forma tripomastigota. Os nossos resultados mostraram semelhante expressão entre às formas epimastigota de *T. cruzi* e ambas as formas de *T. rangeli*.

Para a forma promastigota de *L. braziliensis* o antissoro α -C β S apresentou um reconhecimento reduzido do gene em comparação ao de *T. rangeli* e *T. cruzi*, confirmando a especificidade do antissoro entre os tripanosomas quando comparado com *L. braziliensis*.

Essa especificidade se manteve ao avaliar o extrato proteico a partir de macrófagos derivados de monócitos humanos, no qual não houve nenhum reconhecimento. Sendo assim, este resultado confirma as análises *in silico* que mostraram diferenças nas sequências da C β S de humanos e de tripanosomatídeos (Figura 21).

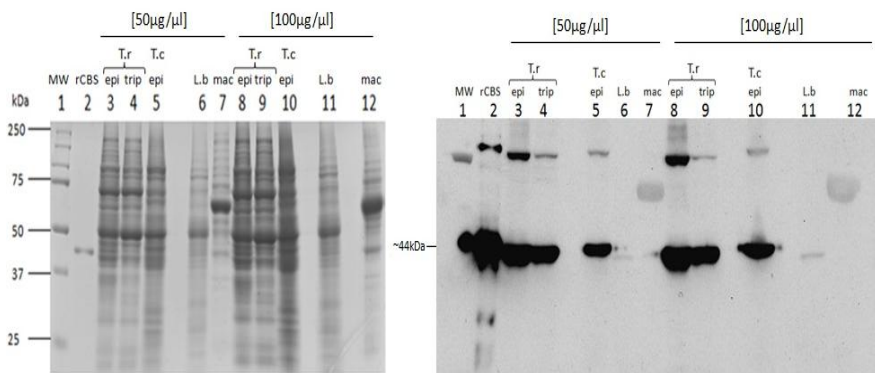


Figura 21. Análise de expressão da proteína C β S em extratos totais dos tripanosomatídeos (*T. rangeli* - T.r, *T. cruzi* - T.c e *L. braziliensis* - L.b) e de macrófagos humanos – mac. (A) Gel SDS-PAGE 12% corado com *Coomassie Brilliant Blue*. Padrão de peso molecular *Precision Plus Protein*TM (1), C β S recombinante [8µg/µl] (2), extrato proteico total [50µg/µl] de: *T. rangeli* nas formas epimastigota (3) e tripomastigota (4), de *T. cruzi* na forma epimastigota (5), de *L. braziliensis* forma promastigota (6) e de macrófagos humano (7); extrato proteico total [100µg/µl] das amostras na mesma ordem (8-12). (B) *Western blot* utilizando o soro policlonal contra rTrC β S (1:1600).

Os resultados sugerem que a expressão da C β S não é estágio-específica, pois, é aparentemente expressa com igual

intensidade tanto na forma epimastigota quanto na tripomastigota de *T. rangeli*. Estes dados foram corroborados no nosso laboratório pelos achados de Romero et al. (2014), onde a relativa abundância da C β S não apresentou diferenças significativas entre epimastigotas e tripomastigotas de *T. rangeli*, mas, diferem com os resultados de Marciano et al. (2012), os quais apresentaram que a C β S de *T. cruzi* é mais abundante nas formas epimastigotas, presentes no inseto vetor, do que em amastigotas e tripomastigotas no hospedeiro vertebrado.

Sendo a C β S, a enzima chave da via de transulfuração reversa para a síntese de cisteína a confirmação da sua funcionalidade é fundamental. Nesse sentido o estudo de Romero et al. (2014) aponta que a C β S é ativa tanto em epimastigotas quanto em tripomastigotas de *T. rangeli* e da mesma forma que sua expressão, sua atividade não difere entre estes estágios do parasito. Esta observação é justamente o oposto do relatado para *T. cruzi*, no qual a atividade da C β S é estágio dependente, sendo que em lisados de formas epimastigotas a atividade é 8-9 vezes maior do que em amastigotas e tripomastigotas (NOZAKI et al., 2001).

Esses resultados em conjunto revelam que no *T. rangeli* a via de transulfuração reversa é ativa e importante na biossíntese de cisteína visto que é a única via presente neste parasito, como demonstrado por Romero et al. (2014) e difere do *T. cruzi* e *L. major* os quais utilizam as duas vias: transulfuração

reversa e assimiladora ou *de novo* (NOZAKI et al., 2001; WILLIAMS et al., 2009). Entretanto, esta observação do *T. rangeli* é similar ao descrito para *T. brucei*, no qual a C β S e outras enzimas envolvidas na via de transulfuração estão presentes na forma tripomastigota sanguínea (DUSZENKO et al., 1992).

Marciano et al. (2012) demonstrou que em *T. cruzi* a enzima cisteína sintase (CS), presente na *via de novo*, é mais abundante nas formas amastigotas intracelulares do que em epimastigotas e que a enzima C β S prevalece nas formas epimastigotas. Desta forma, sugere que a utilização da via *de novo* durante o ciclo no hospedeiro mamífero e a via de transulfuração reversa no inseto vetor. Portanto a presença exclusiva da via de transulfuração reversa para síntese de cisteína pode estar relacionada ao ciclo de vida extracelular que ocorre em *T. brucei* e reforça a hipótese de que o *T. rangeli* não tenha um ciclo intracelular no hospedeiro mamífero. Além disso, os parasitos helmintos que também são extracelulares possuem a C β S ativa e utilizam apenas a via de transulfuração reversa (WALTER, BARRET, 1991).

Em suporte a esse raciocínio, e considerando que o *T. rangeli* não seja um parasito intracelular em seus hospedeiros mamíferos, a redundância para obter a cisteína visando à síntese da tripanotiona (principal defesa antioxidante dos parasitos) não seria necessária para *T. rangeli* e *T. brucei*, já que não são

expostos ao estresse oxidativo intracelular do hospedeiro mamífero. Entretanto a presença da via de transulfuração reversa seria fundamental e aparentemente suficiente para garantir a sobrevivência destes parasitos aos estresses oxidativo e nitrosoativo que ocorrem na glândula salivar do inseto vetor. Além disso, no hospedeiro mamífero há maior disponibilidade dos aminoácidos sulfurados que no trato intestinal do inseto (NOZAKI et al., 2001) e, desta forma, o *T. rangeli* pode captá-los diretamente do meio, assim como faz o *T. brucei* (DUSZENKO et al., 1992) para serem utilizados nas demais funções exercidas pela cisteína.

6 Conclusões

- Os resultados obtidos neste estudo constituem o primeiro estudo da presença de Cistationina β -Sintase (C β S) em *T. rangeli*.
- As análises de bioinformática permitiram estabelecer que a C β S de *T. rangeli* possui uma janela aberta de leitura de 1.121 pb e traduz uma proteína de 373 aminoácidos (~44 kDa). Em *T. cruzi*, a C β S possui 1.206 pb e traduz uma proteína de 401 aminoácidos (~41kDa). Ambos possuem domínio catalítico típico dessa família de enzimas.
- A C β S de *T. rangeli* e *T. cruzi* apresenta uma clara diferença com a C β S de humano, pois, não apresentam o domínio de união ao grupo heme e o motivo regulatório C-terminal presente nas enzimas de mamíferos.
- Os ensaios de *Southern blot* revelaram que o gene C β S de *T. rangeli* aparece como cópia única em seu genoma e confirmou um padrão de multicópias do gene C β S de *T. cruzi*.

- Os ensaios de *Western blot* confirmaram que as proteínas heterólogas possuem aproximadamente 44 kDa.
- O soro policlonal produzido contra a proteína rTrCβS reconheceu uma proteína do tamanho esperado nos extratos de proteínas totais de *T. cruzi*, *T. rangeli* e um discreto reconhecimento em *L. braziliensis*. O extrato proteico de macrófagos humanos, utilizado como controle negativo não foi reconhecimento pelo soro.
- Os ensaios de *Western blot* utilizando o antisoro α-CβS revelou que a expressão da CβS de *T. rangeli* não é estágio-dependente, diferentemente da expressão dessa enzima em *T. cruzi*.
- Os resultados obtidos neste trabalho em conjunto com os de ROMERO et al. 2014 sugerem que o *T. rangeli* utiliza apenas a via de transulfuração reversa para a biossíntese da cisteína. Sendo que esta via parece estar envolvida diretamente com a sobrevivência do parasito contra os ataques de estresse oxidativo e nitrosoativo que ocorrem na

glândula salivar do inseto vetor. Dispensando a outra via de obtenção da cisteína, via *de novo*, encontrada em outros tripanosomatídeos como *T. cruzi* e *L. major* que estaria relacionada na defesa contra os antioxidantes intracelular nos hospedeiros mamíferos.

7. Referências

AFCHAIN, D.; LE RAY, D.; FRUIT, J.; CAPRON, A. Antigenic make-up of *Trypanosoma cruzi* culture forms: Identification of a specific component. **J Parasitol**, v. 65, n. 4, p. 507-514, 1979.

ALEXANDER, F. W.; SANDMEIER, E.; MEHTA, P. K.; CHRISTEN, P. Evolutionary relationships among pyridoxal-5'-phosphate-dependent enzymes. Regio-specific alpha, beta and gamma families. **Eur J Biochem**. v. 219, n. 3, p. 953-60, 1994.

AÑEZ, N.; EAST, J. S. Studies in *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920.II. Its effects on the feeding behavior in triatomine bugs. **Acta Trop**. v. 41, p. 93-95, 1984.

AZAMBUJA, P.; RATCLIFFE, N. A.; GARCIA, E. S. Towards an understanding of the interactions of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* within the reduviid insect host *Rhodnius prolixus*. **An. Acad. Bras. Ciênc**. v. 77, n. 3, p. 397-404, 2005.

BACCHI, C. J.; GOLDBERG, B.; GAROFALO-HANNAN, J.; RATTENDI, D.; LYTE, P.; YARLETT, N. Fate of soluble methionine in African trypanosomes: effects of metabolic inhibitors. **J. Biochem**. v, 309, p. 737-743, 1995.

BATEMAN, A. The structure of a domain common to archaeobacteria and the homocystinuria disease protein. **Trends Biochem Sci**. v. 22, n. 1, p. 12-3, 1997.

BANERJEE, R.; ZOU, C. G. Redox regulation and reaction mechanism of human cystathionine-beta-synthase: a PLP-dependent hemesensor protein. **Arch Biochem Biophys**. v. 433, n. 1, p. 144-56, 2005.

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.

D'ALESSANDRO, A.; SARA VIA, N. G. *Trypanosoma rangeli*. **Protozoal Diseases**. Edited by Gilles HM. Arnold Press. p. 398-412, 1999.

DECUYPERE, S.; VANAERSCHOT, M.; BRUNKER, K.; IMAMURA, H.; MÜLLER, S.; KHANAL, B.; RIJAL, S.; DUJARDIN, J. C.; COOMBS, G. H. Molecular mechanisms of drug resistance in natural Leishmania populations vary with genetic background. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 6, n. 2, e1514, 2012.

DUSZENKO, M.; MUHLSTADT, K.; BRODER, A. Cysteine is an essential growth factor for *Trypanosoma brucei* bloodstream forms. **Mol. Biochem. Parasitol.** v. 50, n. 2, p. 269–273, 1992.

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

FAIRLAMB, A. H.; BLACKBURN, P.; ULRICH, P.; CHAIT, B. T.; CERAMI, A. Trypanothione: a novel bis (glutathionyl) spermidine cofactor for glutathione reductase in trypanosomatids. **Science.** v. 227, n. 4693, p. 1485-7, 1985.

FAIRLAMB, A. H.; CERAMI, A. Metabolism and functions of trypanothione in the Kinetoplastida. **Annu Rev Microbiol.** v. 46, p. 695-729, 1992.

GAZOS-LOPES, F.; MESQUITA, R. D.; SILVA-CARDOSO, L.; SENNA, R.; SILVEIRA, A. B.; JABLONKA, W.; CUDISCHEVITCH, C. O.; CARNEIRO, A. B.; MACHADO, E. A.; LIMA, L. G.; MONTEIRO, R. Q.; NUSSENZVEIG, R. H.; FOLLY, E.; ROMEIRO, A.; VANBESELAERE, J.; MENDONÇA-PREVIATO, L.; PREVIATO, J. O.; VALENZUELA, J. G.; RIBEIRO, J. M. C.; ATELLA, G. C.; SILVA-NETO, M. A. C. Glycoinositolphospholipids from trypanosomatids subvert nitric oxide production in *Rhodnius prolixus* salivary glands. **PLoS ONE**. v. 7, n. 10, p. 47285, 2012.

GILLIN, F. D.; DIAMOND, L. S. Attachment of *Entamoeba histolytica* to glass in a defined maintenance medium: specific requirement for cysteine and ascorbic acid. **J Protozool**. v. 27, n. 4, p. 474-8, 1980.

GRISARD, E. C.; STEINDEL, M.; GUARNERI, A. A.; EGER-MANGRICH, I.; CAMPBELL, D.A.; ROMANHA A. J. Characterization of *Trypanosoma rangeli* strains isolated in Central and South America: an overview. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. v. 94, n. 2, p. 203-9, 1999.

GRISARD, E. C.; STOCO, P. H.; WAGNER, G.; SINCERO, T. C.; ROTAVA, G.; RODRIGUES, J. B.; SNOEIJER, C.Q.; KOERICH, L. B.; SPERANDIO, M. M.; BAYER-SANTOS, E.; FRAGOSO, S. P.; GOLDENBERG, S.; TRIANA, O.; VALLEJO, G. A.; TYLER, K. M.; DÁVILA, A. M.; STEINDEL, M. Transcriptomic analyses of the avirulent protozoan parasite *Trypanosoma rangeli*. **Mol Biochem Parasitol**. v. 174, n. 1, p. 18-25, 2010.

GRISARD, E. C.; STEINDEL, M. *Trypanosoma (Herpetosoma) rangeli*. Parasitologia Humana. NEVES, D.P. (editor). 11a edição, **Editora Atheneu**. p. 109-113, 2005

GRISHIN, N. V.; PHILLIPS, M. A.; GOLDSMITH, E. J. Modeling of the spatial structure of eukaryotic ornithine decarboxylases. **Protein Sci.** v. 4, n. 7, p. 1291–1304, 1995.

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

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

HUSAIN, A.; JEELANI, G.; SATO, D.; NOZAKI, T. Global analysis of gene expression in response to L-Cysteine deprivation in the anaerobic protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. **BMC Genomics.** v. 12, p. 275, 2011.

Romero, I.; Téllez, J.; Yamanaka, L. E.; Steindel, M.; Romanha A. J.; Grisard, E. C. Transsulfuration is the only pathway for cysteine biosynthesis in *Trypanosoma rangeli*. Submitting in **Parasit Vectors.** 2013.

IGNOUL, S.; EGGERMONT, J. CBS domains: structure, function, and pathology in human proteins. **Am J Physiol Cell Physiol.** v. 289, n. 6, p. 1369-78, 2005.

IRIGOÍN, F.; CIBILS, L.; COMINI, M. A.; WILKINSON, S. R.; FLOHÉ, L.; RADI, R. Insights into the redox biology of *Trypanosoma cruzi*: Trypanothione metabolism and oxidant detoxification. **Free Radic Biol Med.** v. 45, n. 6, p. 733-42, 2008.

JHEE, K. H.; MCPHIE, P.; MILES, E. W. Yeast cystathionine beta-synthase is a pyridoxal phosphate enzyme but, unlike the

human enzyme, is not a heme protein. **J Biol Chem.** v. 275, n. 16, p. 11541-4, 2000.

KERY, V.; BUKOVSKA, G.; KRAUS, J. P. Transsulfuration depends on heme in addition to pyridoxal 5'-phosphate. Cystathionine beta-synthase is a heme protein. **J Biol Chem.** v. 269, n. 41, p. 25283-8, 1994.

KOERICH, L. B.; EMMANUELLE-MACHADO, P.; SANTOS, K.; GRISARD, E. C.; STEINDEL, M. Differentiation of *Trypanosoma rangeli*: high production of infective Trypomastigote forms *in vitro*. **Parasitol Res.** v. 88 n. 1, p. 21-5, 2002.

KRAUTH-SIEGEL, R. L.; LEROUX, A. E. Low-molecular-mass antioxidants in parasites. **Antioxid Redox Signal.** v.17, n. 4, p. 583-607, 2012.

MACHADO, P. E.; EGER-MANGRICH, I.; ROSA, G.; KOERICH, L. B.; GRISARD, E. C.; STEINDEL, M. Differential susceptibility of triatomines of the genus *Rhodnius* to *Trypanosoma rangeli* strains from different geographical origins. **Int J Parasitol**, v. 31, n. 5-6, p. 632-4, 2001.

MARCIANO, D.; SANTANA, M.; MANTILLA, B. S.; SILBER, A. M.; MARINO-BUSLJE, C.; NOWICKI, C. Biochemical characterization of serine acetyltransferase and cysteine desulhydrase from *Leishmania major*. **Mol Biochem Parasitol.** v. 173, n. 2, p. 170-4, 2010.

MELLO, C. B.; NIGAM, Y.; GARCIA, E. S.; AZAMBUJA, P.; NEWTON, R. P.; RATCLIFFE, N. A. Studies on a haemolymph lectin isolated from *Rhodnius prolixus* and its interaction with *Trypanosoma rangeli*. **Exp Parasitol.** v. 91, p. 289 – 296, 1999.

MEIER, M.; JANOSIK, M., KERY, V., KRAUS, J. P.; BURKHARD, P. Structure of human cystathionine beta-synthase: a unique pyridoxal 5'-phosphate-dependent heme protein. **EMBO J.** v. 20, n. 15, p. 3910-6, 2001.

MEISTER, A.; ANDERSON, M. E. Glutathione. **Annu. Rev. Biochem.** v. 52, p.711–760, 1983.

MILES, E. W.; KRAUS, J. P. Cystathionine-synthase: structure, function, regulation and location of homocystinuria-causing mutations. **J Biol Chem.** v. 279, p. 29871–29874, 2004.

MOLYNEUX, D. Division of the human trypanosome, *Trypanosoma (Herpetosoma) rangeli*. **Ann Trop Med Parasitol.** v. 67, n. 3, p. 371-2, 1973.

MOUTIEZ, M.; MEZIENE-CHERIF, D.; AUMERCIER, M.; SERGHERAERT, C.; TARTAR, A. Compared reactivities of trypanothione and glutathione in conjugation reactions. **Chem Pharm Bull.** v. 42, n. 12, p. 2641-2644, 1994)

NOZAKI, T.; ALI, V.; TOKORO, M. Sulfur-containing amino acid metabolism in parasitic protozoa. **Adv Parasitol.** v. 60, p. 1-99, 2005.

NOZAKI, T.; SHIGETA, Y.; SAITO-NAKANO, Y.; IMADA, M.; KRUGER, W. D. Characterization of transsulfuration and cysteine biosynthetic pathways in the protozoan hemoflagellate, *Trypanosoma cruzi*. Isolation and molecular characterization of cystathionine beta-synthase and serine acetyltransferase from *Trypanosoma*. **J Biol Chem.** v. 276, n. 9, p. 6516-23, 2001.

OMURA, T.; SADANO, H.; HASEGAWA, T.; YOSHIDA, Y.; KOMINAMI, S. Hemoprotein H-450 identified as a form of

cytochrome P-450 having an endogenous ligand at the 6th coordination position of the heme. **J Biochem.** v. 96, n. 5, p. 1491-500, 1984.

OSORIO, Y.; TRAVI, B. L.; PALMA, G. I.; SARAIVIA, N. G. Infectivity of *Trypanosoma rangeli* in a promonocytic mammalian cell line. **J Parasitol.** v. 81, n. 5, p. 687-93, 1995.

PAIM, R. M.; PEREIRA, M. H.; ARAÚJO, R. N.; GONTIJO, N. F.; GUARNERI, A. A. The interaction between *Trypanosoma rangeli* and the nitrophorins in the salivary glands of the triatomine *Rhodnius prolixus* (Hemiptera; Reduviidae). **Insect Biochem Mol Biol.** v. 43, n. 3, p. 229-36, 2013

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

REA, P. A.; LI, Z. S.; LU, Y. P.; DROZDOWICZ, Y. M.; MARTINOIA, E. From vacuolar Gs-X pumps to multispecific Abc transporters. **Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.** n. 49, p. 727-760, 1998.

ROMERO, I.; TÉLLEZ, J.; YAMANAKA, L. E.; STEINDEL, M.; ROMANHA, A. J.; GRISARD, E. C. **Parasit Vectors.** Submitted in Dec. 2013.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. Molecular cloning: a laboratory manual. 3ed. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

SCOTT, J. W.; HAWLEY, S. A.; GREEN, K. A.; ANIS, M.; STEWART, G.; SCULLION, G. A.; NORMAN, D. G.; HARDIE, D. G. CBS domains form energy-sensing modules whose binding of

adenosine ligands is disrupted by disease mutations. **J Clin Invest.** v. 113, n. 2, p. 274-84, 2004.

STEINDEL, M. Caracterização de cepas de *Trypanosoma rangeli* e *Trypanosoma cruzi* isoladas de reservatórios e vetores silvestres em Santa Catarina. **Tese de Doutorado.** Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1993.

STOCO, P.H. Caracterização das DNA topoisomerases II de *Trypanosoma rangeli*. **Tese de Doutorado.** Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2010.

TANOURA, K.; YANAGI, T.; DE GARCIA, V. M.; KANBARA, H. *Trypanosoma rangeli*-*in vitro* metacyclogenesis and fate of metacyclic trypomastigotes after infection to mice and fibroblast cultures. **J Eukaryot Microbiol.** v. 46, n. 1, p. 43-8, 1999.

URDANETA-MORALES, S.; TEJERO, F. *Trypanosoma (Herpetosoma) rangeli* Tejera, 1920: mouse model for high, sustained parasitemia. **J Parasitol,** v. 71, n. 4, p. 409-14, 1985.

VICKERMAN, K. Developmental cycles and biology of pathogenic trypanosomes. **Br Med Bull,** v. 41, p. 105-114, 1985.

WANG, W.; BALLATORI, N. Endogenous glutathione conjugates: occurrence and biological functions. **Pharmacol. Rev.** v. 50, n. 3, p. 335–356, 1998

WALKER, J.; BARRETT, J. Parasite sulphur amino acid metabolism. **Int J Parasitol.** v. 27, n. 8, p. 883-897, 1997.

WESTROP, G. D.; GEORG, I.; COOMBS, G. H. The mercapto-pyruvate sulfurtransferase of *Trichomonas vaginalis* links cysteine

catabolism to the production of thioredoxin persulfide. **J Biol Chem.** v. 284, n. 48, p. 33485–33494, 2009.

WILLIAMS, R. A.; WESTROP, G. D.; COOMBS, G. H. Two pathways for cysteine biosynthesis in *Leishmania major*. **Biochem J.** v. 420, n. 3, p. 451-62, 2009.

WHITTEN, M. M.; MELLO, C. B.; GOMES, S. A.; NIGAM, Y.; AZAMBUJA, P.; GARCIA E. S.; RATCLIFFE N, A. Role of superoxide and reactive nitrogen intermediates in *Rhodnius prolixus* (Reduviidae)/*Trypanosoma rangeli* interactions. **Exp Parasitol.** v. 98, n. 1, p. 44-57, 2001.

YAMANISHI, M.; KABIL, O., SEM, S.; BANERJEE, R. Structural insights into pathogenic mutations in heme-dependent cystathionine-beta-synthase. **J Inorg Biochem.** v. 100, n. 12, p. 1988-95, 2006.

8. Anexos

8.1 Participação em artigos científicos

**TRANSULFURATION IS THE ONLY PATHWAY FOR CYSTEINE
BIOSYNTHESIS IN *Trypanosoma rangeli***

Ibeth Romero^{1*}, Jair Téllez¹, Lais Eiko Yamanaka¹, Mario Steindel¹, Alvaro José Romanha^{1,2}, Edmundo Carlos Grisard¹

¹ Laboratórios de Protozoologia e de Bioinformática, Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brasil.

² Centro de Pesquisas René Rachou, Fiocruz, Belo Horizonte, MG, Brasil.

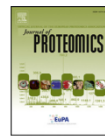
Mail address: Laboratórios de Protozoologia e de Bioinformática, Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, 88040-970, Brasil.

E-mail addresses: Ibeth Romero, ibicris@gmail.com, Jair Téllez, jaircinio@gmail.com, LaisEikoYamanaka, laisyamanaka@gmail.com, Mário Steindel, mario.steindel@ufsc.br, Alvaro José Romanha, alvaro.romanha@ufsc.br, Edmundo Carlos Grisard, edmundo.grisard@ufsc.br

* Corresponding author: ibicris@gmail.com

Available online at www.sciencedirect.com

SciVerse ScienceDirect

www.elsevier.com/locate/jprot

The *Trypanosoma rangeli* trypomastigote surfaceome reveals novel proteins and targets for specific diagnosis

Glauber Wagner^{a,b,c}, Lais Eiko Yamanaka^a, Hércules Moura^c,
 Débora Denardin Lückemeyer^d, Aline Daiane Schlindwein^d, Patricia Hermes Stoco^d,
 Henrique Bunselmeyer Ferreira^d, John Robert Bar^e,
 Mario Steindel^a, Edmundo Carlos Grisard^{a,*}

^aLaboratórios de Protozoologia e de Bioinformática, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brazil

^bLaboratório de Doenças Infecciosas e Parasitárias, Universidade do Oeste de Santa Catarina, Joaçaba, Brazil

^cBiological Mass Spectrometry Laboratory, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, USA

^dLaboratório de Genômica Estrutural e Funcional, Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 6 November 2012

Accepted 13 February 2013

Keywords:

Trypanosoma rangeli
 Proteomic
 Surface proteins
 Antigens
 GPI-anchored proteins

ABSTRACT

Sympatric distribution and sharing of hosts and antigens by *Trypanosoma rangeli* and *Trypanosoma cruzi*, the etiological agent of Chagas' disease, often incur in misdiagnosis and improper epidemiological inferences. Many secreted and surface proteins (SP) have been described as important antigens shared by these species. This work describes the *T. rangeli* surfaceome obtained by gel-free (LC-ESI-MS/MS) and gel-based (GeLC-ESI-MS/MS) proteomic approaches, and immunoblotting analyses and the comparison of these SP with *T. cruzi*. A total of 138 *T. rangeli* proteins and 343 *T. cruzi* proteins were obtained, among which, 42 and 157 proteins were exclusively identified in *T. rangeli* or *T. cruzi* trypomastigotes, respectively. Immunoblotting assays using sera from experimentally infected mice revealed a distinct band pattern for each species. MS/MS analysis of *T. rangeli* exclusive bands revealed two unique GP63-related proteins and flagellar calcium-binding protein. Also, a ~32 kDa band composed of 12 distinct proteins was exclusively recognized by anti-*T. cruzi* serum. This highly sensitive proteomic assessment of surface proteins characterized the *T. rangeli* surfaceome, revealing several differences and similarities between these two parasites. The study reports new *T. rangeli*-specific proteins with promising use in differential diagnosis from *T. cruzi*.

Biological significance

In this manuscript, we report the first proteomic analysis of the *T. rangeli* surface (surfaceome), a non-pathogenic parasite occurring in sympatry with *T. cruzi*, the etiological agent of Chagas disease. This comparative proteomic analysis was performed using high-throughput in-gel and gel-free proteomic approaches combined with immunoblotting, allowing us to identify new *T. rangeli*-specific proteins with promising use in differential serodiagnosis, among several other protein not previously reported for this taxon. Additionally, cross-recognition assays showed that *T. cruzi* surface proteins were recognized by heterologous serum (anti-*T. rangeli*) that strengthens the possibility of misdiagnosis of Chagas disease in humans and other mammals. Thus, this work provides new insights to

understand the serological cross-reactivity between *T. cruzi* and *T. rangeli*, as well as, the

* Corresponding author at: Laboratório de Protozoologia, Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Setor F, Bloco A, Caixa Postal 476, Trindade, Florianópolis, SC 88040-970, Brazil. Tel.: +55 48 3721 2955; fax: +55 48 3721 9258.

E-mail address: edmundo.grisard@ufsc.br (E.C. Grisard).

1874-3919/\$ – see front matter © 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2013.02.011>