



Universidade Federal de Santa Catarina
Centro de Ciências Biológicas
Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia

Identificação e estudo funcional de proteínas relacionadas à resistência ao sistema complemento de mamíferos em *Trypanosoma rangeli*

Carime Lessa Mansur Pontes

Orientadores:

Prof.^ª Dr.^a Patrícia Hermes Stoco

Prof. Dr. Edmundo Carlos Grisard

Florianópolis

2020

Universidade Federal de Santa Catarina
Centro de Ciências Biológicas
Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia

Identificação e estudo funcional de proteínas relacionadas à resistência ao sistema complemento de mamíferos em *Trypanosoma rangeli*

Carime Lessa Mansur Pontes

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

Orientadores:

Prof.^a Dr.^a Patrícia Hermes Stoco
Prof. Dr. Edmundo Carlos Grisard

Florianópolis

2020

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

Pontes, Carime Lessa Mansur

Identificação e estudo funcional de proteínas relacionadas à resistência ao sistema complemento de mamíferos em *Trypanosoma rangeli* / Carime Lessa Mansur Pontes ; orientadora, Patricia Hermes Stoco, coorientador, Edmundo Carlos Grisard, 2020.

135 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós Graduação em Biotecnologia e Biociências, Florianópolis, 2020.

Inclui referências.

1. Biotecnologia e Biociências. 2. Sistema Complemento. 3. *Trypanosoma rangeli*. 4. Proteômica. 5. CRISPR/Cas9. I. Stoco, Patricia Hermes. II. Grisard, Edmundo Carlos. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós Graduação em Biotecnologia e Biociências. IV. Título.

Carime Lessa Mansur Pontes
Título: Identificação e estudo funcional de proteínas relacionadas à resistência ao sistema
complemento de mamíferos em *Trypanosoma rangeli*

O presente trabalho em nível de Doutorado foi avaliado e aprovado por banca examinadora
composta pelos seguintes membros:

Prof. Daniel Santos Mansur, Dr.
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Marcos Horácio Pereira, Dr.
Universidade Federal de Minas Gerais

Francisco Olmo Arévalo, Dr.
London School of Hygiene and Tropical Medicine

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado
adequado para obtenção do título de doutor em Doutor em Biotecnologia e Biociências.

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

Prof^a. Patrícia Hermes Stoco, Dr^a.
Orientadora

Florianópolis, 2020.

Dedico este trabalho aos meus pais, pois,
sem eles, nada disso seria possível.

AGRADECIMENTOS

Acredito que, por mais inacreditável que pareça, escrever os agradecimentos é a parte mais prazerosa porém mais árdua de um trabalho. Trazer a tona memórias de anos de convivência, amizade e amor em poucos parágrafos é emocionalmente desgastante, pois sei que as palavras aqui escritas não serão suficientes para agradecer aqueles que participaram da minha vida nos últimos quatro anos.

Assim sendo, começo agradecendo aqueles que me permitiram estar neste plano e também chegar onde cheguei, meus pais Marina e Jefferson. A minha mãe que nunca poupou esforços para que eu pudesse conquistar meus sonhos, sempre incentivadora e encorajadora. Foi com ela que aprendi que trabalho duro e amor nos levam aonde quisermos. Ao meu pai, que desde minha infância percebeu meu gosto pela ciência e sempre esteve comigo nas buscas em enciclopédias e assistindo documentários sobre o mundo. Obrigada por manter minha curiosidade sempre presente.

A minha irmã Camila, por todo o amor de irmã existente no mundo. Por eu sempre poder contar contigo e você ser a melhor tia que a Meg poderia ter. Pelas piadas e risadas, e por me mostrar que as vezes não se estressar e levar a vida mais leve é o melhor caminho.

Agradeço a minha orientadora Dr^a. Patrícia Hermes Stoco, pelo seu tempo, dedicação e amor pela pesquisa. Amor esse que sempre me serviu de exemplo e inspiração. Não tenho palavras para descrever tua importância no meu desenvolvimento como cientista, mulher e ser humano. Quero aproveitar para agradecer também a minha amiga Pati, que mesmo depois de um longo dia de trabalho, estava lá pronta para dar uma volta com as “meninas” (que também moram no meu coração) e jogar conversa fora.

Agradeço meu orientador, Dr. Edmundo Carlos Grisard, pela oportunidade de estar no laboratório durante esses 9 anos. Por me fazer ver a parasitologia de uma forma diferente e querer sempre buscar mais. Pois corajoso é aquele que busca além da luz do poste.

Ao Professor Dr. John Kelly pela oportunidade de fazer parte do seu grupo durante o período do sanduíche. Obrigada por ter me recebido de braços abertos e me fazer sentir em casa. Aos meus colegas no Kelly's Lab, por sempre serem solícitos e ajudarem em tudo que precisei.

Quero também agradecer especialmente ao Paco Olmo e a Fernanda Costa, vocês além de serem essenciais na realização deste trabalho foram os melhores amigos que alguém poderia ter. Eu não teria sobrevivido a selva de pedra que é Londres sem o carinho de vocês, espero que

possamos nos reunir novamente. Archie Khan e Filip Kotowicz pela amizade, risadas e momentos que vocês me proporcionaram.

A Dr^a. Milene Moraes e a Dr^a. Débora Lückemeyer, que foram essenciais no meu desenvolvimento como cientista. Eu não seria metade da pesquisadora que sou se não fossem vocês. Mas, quero agradecer principalmente pelos momentos de risadas que tivemos, pelas conversas e pela amizade que cultivamos nesses anos.

A Laís Yamanaka e a Thaynara Pereira, por compartilhar comigo todos os momentos desde o início. Mesmo que tenhamos tomado rumos diferentes, nossa amizade permanece.

A Laryssa Liz, com quem divido o laboratório a tanto tempo. Saiba que é um prazer te ver crescer como cientista. Muito obrigada pela tua amizade e companhia.

A Natália Gutierrez, que chegou e ganhou meu coração em pouco tempo. Sabes o quanto és importante para mim. Obrigada por todos os momentos que compartilhamos, bons e ruins.

A Beatriz Pereira, minha amiga de tantos anos, que apesar da distância ainda é sempre presente e essencial. Não vejo a hora de você estar de volta.

A Tatiany Soratto, que entrou há tão pouco tempo na minha vida, mas ocupou um espaço enorme no meu coração.

Ao Abadio Costa Junior pela amizade, por poder contar contigo em todos os momentos, por me ajudar a levantar depois dos tombos. Tua habilidade de pegar no meu pé precisa ser estudada.

A Monique Ferrary, Thais Assis, Isadora Cord, Laura Grasel, Sofia Araujo e Carolina Muller que entraram na minha vida por acaso e me fizeram entender que amor e amizade nem sempre precisam de tempo, mas sim de presença.

A Beatriz Figueredo e Ana Paula Bastiani por me ajudarem a ter o último gás e me empolgarem a ensinar com toda a vontade de aprender que vocês tem.

Ao Saulo Carriconde, pelos momentos compartilhados durante estes anos.

A minha psicóloga Amélia Junckes, que foi essencial nos últimos meses, não me deixando cair e me levantando sempre que necessário.

As amigas e amigos do laboratório que fizeram de todos os dias de trabalho mais fáceis e prazerosos. Obrigada pela amizade e ajuda.

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

Ao CNPq, FINEP, CAPES e UFSC pelo incentivo financeiro.

Enfim, agradeço a todos que ajudaram de uma forma ou de outra com a realização deste trabalho.

**Ignorance is a virus. Once it starts spreading,
it can only be cured by reason. For the sake of
humanity, we must be that cure**

- Neil deGrasse Tyson

RESUMO

O sistema complemento (SC) de mamíferos é formado por um grande número de proteínas que interagem em resposta à infecções, principalmente via a opsonização de patógenos e a indução de resposta inflamatória. Para que se estabeleça a infecção, é crucial que os patógenos possuam formas de bloquear a atuação do SC e/ou invadam as células do hospedeiro. Embora tais mecanismos sejam bem conhecidos para o *Trypanosoma cruzi*, o agente etiológico da doença de Chagas, eles não estão claros para o *Trypanosoma rangeli*, um tripanosoma não-virulento para mamíferos e cujo ciclo vital nestes hospedeiros é desconhecido. Diferentemente do *T. cruzi*, as formas epimastigotas do *T. rangeli* são resistentes ao SC, sendo desconhecidos os fatores que mediam essa resistência. O objetivo do presente estudo foi caracterizar a resistência de diferentes formas de *T. rangeli* ao SC de mamíferos e caracterizar as proteínas envolvidas nesse processo. A exposição de formas epimastigotas, tripomastigotas sanguíneas e metacíclicas e de formas tripomastigotas diferenciados *in vitro* do *T. rangeli* (cepa Choachí) a soro fresco de seres humanos ou de camundongos Balb/C revelou que todas são resistentes ao SC. Uma vez que observamos a deposição de C3b de soro humano fresco na membrana de formas epimastigotas (EPI) ou tripomastigotas (TRIPO) de *T. rangeli*, avaliamos se o *T. rangeli*, o *T. cruzi* ou a *L. infantum* são capazes de ativamente alterar, clivar ou degradar as proteínas C3b, C1q, Fator B e Fator H do SC humano, não tendo observado diferenças significativas. Ensaio de co-adsorção utilizando extratos proteicos totais de *T. rangeli* e proteínas iniciais do SC (C1q, C3b e MBL) seguidos de análise por espectrometria de massas (MS) permitiram a identificação de 273 proteínas do parasito potencialmente ligantes às proteínas do SC. Além disso, análises do secretoma de EPI e TRIPO de *T. rangeli* revelaram 322 proteínas que possuem diferentes funções com relação a virulência destes parasitos e que podem estar relacionadas à sua resistência ao SC. As proteínas secretadas foram separadas em 21 categorias de função biológica do Gene Ontology. Na categoria “Interação Parasita-Hospedeiro”, 41% das proteínas foram secretadas pelas duas formas, mas 59% foram secretadas exclusivamente por TRIPO. Dentre estas, selecionamos três proteínas para a continuidade dos nossos estudos: a Calreticulina, a Proteína Reguladora do Complemento (CRP) e a proteína hipotética AGN32887. Para os estudos funcionais destes genes, realizamos a padronização da técnica de CRISPR/Cas9 para *T. rangeli*. O método utilizado foi efetivo para obtenção de linhagens *knockdown* destes genes, no entanto não foi possível obter nenhuma linhagem *knockout*. Ensaio de resistência ao SC foram realizados com as linhagens *knockdown*, não

havendo diferenças na capacidade de sobrevivência em relação ao controle. De forma geral, este trabalho demonstrou a capacidade do *T. rangeli* de subverter o SC, impedindo a formação da C3 convertase na membrana do parasito. Portanto, sugerimos que os tripomastigotas de *T. rangeli*, como observado para o *T. cruzi*, são resistentes à lise pelo SC de mamíferos.

Palavras-chave: Imunidade inata; Sistema Complemento; Análise Proteômica; CRISPR/Cas9.

ABSTRACT

The mammalian complement system (CS) contains a large number of proteins that interact in response to infections, mainly via pathogen opsonization and induction of inflammation. For the establishment of infection, it is crucial that pathogens have ways of blocking CS activation and/or invading host cells. Although such mechanisms are well known for *Trypanosoma cruzi*, the etiologic agent of Chagas' disease, they are unclear for *Trypanosoma rangeli*, for which, the life cycle within mammals is unknown. Unlike *T. cruzi*, *T. rangeli* epimastigotes are resistant to CS, but the factors that mediate this resistance are unknown. The objective of the present study is to characterize the resistance of different forms of *T. rangeli* to CS of mammals and to characterize the proteins involved in this process. Exposure of *T. rangeli* (Choachi strain) epimastigotes, metacyclic and blood trypomastigotes and *in vitro*-derived trypomastigotes to human or fresh Balb/C mouse serum revealed that all forms are resistant to CS. Due to the deposition of C3b on *T. rangeli* epimastigote and trypomastigotes membranes, we have evaluated the ability of *T. rangeli*, *T. cruzi* and *L. infantum* to actively promote alteration, cleavage or degradation of C3b, C1q, Factor B and Factor H of the human CS, not having detected any significant differences. Pull-down assays using *T. rangeli* total protein extracts and initial CS proteins (C1q, C3b and MBL) followed by mass spectrometry (MS) analysis allowed the identification of 273 proteins potentially binding to CS proteins. Preliminary analyzes of the *T. rangeli* secretome generated 322 proteins that have different functions regarding the virulence of these parasites. Among these, we selected three proteins for the continuity of our studies: Calreticulina, Complement Regulatory Protein (CRP) and the hypothetical protein AGN32887. In order to pursue functional studies of these genes, we have implemented the CRISPR/Cas9 deletion system adapted for *T. rangeli*. Although effective on generating *knockdown* lineages, no complete deletion of the genes was obtained so far and the parasites reveal no phenotypic differences from the control group. As a general conclusion, *T. rangeli* is capable to subvert the CS pathways, not allowing the C3 convertase activity on the parasite membrane. Therefore, we suggest that *T. rangeli* trypomastigotes, as observed for *T. cruzi*, are resistant to lysis by mammalian SC.

Key-words: Innate immunity; Complement system; Proteomic analysis; CRISPR/Cas9.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. As três vias de ativação do complemento: alternativa, clássica e das lectinas. Fatores de inibição estão indicados nas caixas. DAF: Fator de Aceleração de Decaimento; CR1: Receptor do Complemento 1; C4BP: proteína de ligação à C4; C1-INH: inibidor de C1..... 17
- Figura 2. Comutação de VSG resulta em variação antigênica cíclica. Combinado com respostas imunes sucessivas, isso pode gerar uma parasitemia recidivante. As infecções naturais são mais complexas do que este esquema altamente simplificado.....21
- Figura 3. Evasão do Sistema Complemento pelas formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*. TcCRT bloqueia a VC e a VL se ligando a C1q, MBL e Ficolina-2; T-DAF e gp160/TcCRP bloqueiam a VA e a montagem da C3 convertase da VC; TcCRIT bloqueia a VC e a VL se ligando a C2; gp58/68 bloqueia a montagem da C3 convertase da VA a partir da ligação ao Fator B; e as Microvesículas (MV) inibem a montagem da C3 convertase da VC e VL. VC- Via Clássica; VL- Via das Lectinas; VA- Via Alternativa.22
- Figura 4. *Leishmania* emprega várias vias mediadas por receptores para invadir macrófagos e células dendríticas. A gp63 é altamente expressa em promastigotas, converte as opsoninas C3 em C3b, o ligante natural para o CR1. O CR1, com o fator I, cliva o C3b em iC3b, facilitando a ligação ao CR3. O CR3 pode também mediar a ligação direta a promastigotas a partir de um epítipo de superfície ainda desconhecido. A gp63 também se liga à fibronectina, que então liga o parasito às FnRs.....26
- Figura 5. Microfotografia de formas epimastigota (A) e tripomastigota sanguínea (B) de *Trypanosoma rangeli*, coradas por Giemsa. As barras representam 10 µm.....28
- Figura 6. Representação esquemática do ciclo biológico do *Trypanosoma rangeli* no hospedeiro invertebrado. A infecção do triatomíneo ocorre pela ingestão de formas tripomastigotas sanguíneas durante o repasto (A), sendo as formas tripomastigotas e epimastigotas predominantes no intestino médio (B). Formas epimastigotas curtas se dividem no intestino médio e podem invadir a hemocele (C), onde dividem-se de forma livre como epimastigotas longos. Alguns parasitos podem invadir hemócitos (D), sendo desconhecida a capacidade de multiplicação no interior desta célula. As formas epimastigotas longas aderem e penetram na glândula salivar (E) diferenciando-se em seu interior em tripomastigotas metacíclicos (F) infectantes que são inoculados com a saliva durante o repasto sanguíneo.....29
- Figura 7. Estratégia de Gates para a análise do ensaio de resistência ao SC por citometria de fluxo..... 38
- Figura 8. Estratégia de Gates para a análise do ensaio de deposição de C3b por citometria de fluxo..... 39
- Figura 9. *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania infantum* e *Trypanosoma rangeli* apresentam diferentes padrões de deposição de C3b. Dot plots demonstrando a ligação do anticorpo anti-C3b humano na membrana e incorporação de iodeto de propídeo para avaliação de viabilidade celular em formas epimastigotas e tripomastigotas de *T. cruzi* e *T. rangeli* e promastigotas de *L. infantum* após incubação com soro humano fresco..... 46
- Figura 10. Análise da presença e perfil de ligação de C3b na membrana de *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania infantum* e *Trypanosoma rangeli*. Western blot utilizando o anticorpo anti-C3b humano em extratos totais de epimastigotas e tripomastigotas de *T. cruzi* e *T. rangeli* e promastigotas de *L. infantum* e amostras de soro fresco e inativado antes da incubação dos parasitos e proteína C3b purificada. C3b: Proteína C3b purificada; -: Não tratado; HS: Soro humano fresco; HIHS: Soro humano inativado..... 48
- Figura 11. *Trypanosoma rangeli*, *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania infantum* não são capazes de degradar as proteínas C3b, Fator B, Fator H e C1q presentes no soro humano fresco. Western blot revelando proteínas do sistema complemento presentes no soro humano fresco e inativado exposto a tripomastigotas de *T. rangeli* e *T. cruzi* e promastigotas de *L. infantum*. A) Western

blot utilizando antissoro anti-C3 humano; B) anti-Fator B humano; C) anti-Fator H humano; D) anti-C1q humano; E) Controle de concentração das amostras. TR – *T. rangeli*; TC – *T. cruzi*; LI – *L. infantum*; HS – Soro humano normal; HIHS – Soro humano inativado. 49

Figura 12. Análise dos extratos proteicos das diferentes formas do *Trypanosoma rangeli* submetidas ao ensaio de co-adsorção demonstrando um diferente padrão de bandas utilizando as proteínas C1q, C3b e MBL do sistema complemento humano como isca. A) Epimastigotas; B) Tripomastigotas diferenciados *in vitro*; C) Tripomastigotas metacíclicos; C) Tripomastigotas sanguíneos. As linhas em destaque representam os fragmentos de gel contendo as proteínas (25) analisadas por espectrometria de massas. Aliquotas de 50 µg de proteínas foram resolvidas em SDS-PAGE 10 % e o gel corado com Azul de Comassie R-250. PM: Padrão de Tamanho Molecular (Precision plus Protein Standards, BIORAD); C1q: amostras obtidas através da utilização da proteína C1q como isca; C3b: amostras obtidas através da utilização da proteína C3b como isca; MBL: amostras obtidas através da utilização da proteína MBL como isca. .. 50

Figura 13. Diagrama de Venn apontando o número de proteínas de diferentes formas de *Trypanosoma rangeli* identificadas por meio das diferentes abordagens de espectrometria de massas. Solução: análise da abordagem sem uso de eletroforese SDS-PAGE; Epi: análise da abordagem com uso de eletroforese SDS-PAGE das formas epimastigotas de cultura; Tripo *In vitro*: Formas tripomastigotas diferenciadas *in vitro*. Tripo Meta: Formas tripomastigotas metacíclicas; Tripo Sg: Formas tripomastigotas sanguíneas. 51

Figura 14. Diferentes padrões de bandas são encontrados para as amostras de epimastigotas e tripomastigotas de *Trypanosoma rangeli* incubadas com a proteína C3b. A) Gel de poliacrilamida de extratos proteicos obtidos a partir de parasitos vivos incubados com a proteína C3b; B) Gel de poliacrilamida de extratos proteicos obtidos a partir de parasitos vivos incubados com a proteína C1q; C) *western blot* utilizando antissoro anti-C3 humano, quadros em vermelho demonstrando bandas excisadas para espectrometria de massas. 52

Figura 15. Diagrama de Venn demonstrando proteínas identificadas no secretoma das diferentes formas de *Trypanosoma rangeli* por espectrometria de massas. (A) Número de proteínas identificadas nas formas epimastigota, tripomastigota e em ambas as formas e (B) número de proteínas distintas detectadas nas diferentes formas de *T. rangeli* cultivadas em diferentes temperaturas. 54

Figura 16. Categorização das proteínas secretadas pelo *Trypanosoma rangeli* de acordo com o Gene Ontology. 55

Figura 17. As formas de tripomastigotas do *Trypanosoma rangeli* secretam mais proteínas relacionadas à interação parasito-hospedeiro, enquanto as epimastigotas secretam mais proteínas relacionadas ao metabolismo de carboidratos. A) Porcentagens de proteínas identificadas por MS secretadas por *T. rangeli* categorizadas como interação hospedeiro-parasito; B) Porcentagens de proteínas identificadas por MS secretadas por *T. rangeli* categorizadas como metabolismo de carboidratos. 56

Figura 18. Esquema de ligação dos sgRNA (verde) e iniciadores utilizados para a construção dos cassetes de homologia nos genes de *T. rangeli*. 70

Figura 19. Representação dos plasmídeos contendo os genes de resistência a Blastocidina e Puromicina. A) pTCBLAST; B) pTPURO_v1. Fonte: (COSTA et al., 2018). 71

Figura 20. Representação do plasmídeo pLEWCas9. Fonte: (COSTA et al., 2018). 72

Figura 21. Amplificação dos templates de DNA para os sgRNA. Eletroforese em gel de agarose a 2% corado por brometo de etídio revelando os produtos de amplificação de 124 pb dos guias de DNA para a porção 5'e 3'dos genes CRT, AGN, CRP, e Fla1BP de *Trypanosoma rangeli*. PM – Padrão de peso molecular em pares de bases (pb) (pUC18 digerido com *HaeIII*); 5sg: sgRNA direcionado a porção 5'do gene; 3sg: sgRNA direcionado a porção 3'do gene. 75

Figura 22. Amplificação dos templates de de homologia. Eletroforese em gel de agarose a 1% corado pelo brometo de etídio revelando o produto de amplificação de 1.700 e 1.800 pb dos

cassetes de homologia contendo os genes de resistência à Blastocidina (B) e à Puromicina (P) dos genes CRT, AGN, CRP e Fla1BP. PM – Padrão de peso molecular em pares de bases (pb) (Fago Lambda digerido com *Pst*I); B: cassete de homologia contendo o gene da blastocidina; P: cassete de homologia contendo o gene da puromicina; -: Controle negativo (sem adição de DNA). 76

Figura 23. Amplificação dos genes alvo após 90 dias de seleção. Eletroforese em gel de agarose a 1% corado pelo brometo de etídeo revelando os produtos de amplificação de 1.262 pb, 975 pb, 2.829 pb, 2.214 pb e 715 pb dos fragmentos dos genes *Tr*CRT, *Tr*AGN e *Tr*CRP e *Tr*Fla1BP de *Trypanosoma rangeli*, respectivamente, submetidos a transfeção e seleção com blastocidina e puromicina em diferentes concentrações. PM – padrão de peso molecular em pares de bases (pb)(Fago Lambda digerido com *Pst*I); -: Controle negativo (sem adição de DNA); WT: parasito selvagem; +++: pressão seletiva com 4 µg/ml de blastocidina e 2 µg/ml de puromicina. 77

Figura 24. Amplificação dos genes alvo após 90 dias de seleção utilizando PCR convencional semi-quantitativa. Eletroforese em gel de agarose a 1% corado pelo brometo de etídeo revelando os produtos de amplificação de 2.829 pb, 1.262 pb e 975 pb dos fragmentos dos genes *Tr*CRP, *Tr*AGN e *Tr*CRT de *Trypanosoma rangeli*, respectivamente, submetidos a uma PCR convencional semi-quantitativa. PM – Padrão de peso molecular em pares de bases (pb) (Fago Lambda digerido com *Pst*I); -: Controle negativo (Sem adição de DNA); WT: parasito selvagem; +++: pressão seletiva com 4 µg/ml de blastocidina e 2 µg/ml de puromicina..... 78

Figura 25. Análise da expressão da Fla1BP em epimastigotas selvagens e da linhagem modificada para o gene da Fla1BP de *Trypanosoma rangeli*. A) Níveis proteicos de Fla1BP em extratos proteicos totais de *T. rangeli*; B) Densidade óptica relativa dos níveis de Fla1BP, normalizados a partir da expressão de β-tubulina. WT: parasito selvagem; ++: pressão seletiva com 4 µg/ml de blastocidina e 2 µg/ml de puromicina. 79

Figura 27. Análise dos fenótipos obtidos nas linhagens modificadas através de coloração por Giemsa. Formas epimastigotas de cultura selvagem e das linhagens modificadas. As barras de aumentam representam 10 µm. Setas verdes: núcleo; Setas azuis: cinetoplasto; Setas vermelhas: flagelos destacados. 80

Figura 28. Análise dos fenótipos obtidos nas linhagens modificadas através de coloração por Giemsa. Formas tripomastigotas de cultura selvagem e das linhagens modificadas. As barras de aumentam representam 10 µm..... 81

Figura 29. Box plot da contagem dos transcritos dos genes CRT e CRP nas diferentes formas evolutivas de *Trypanosoma rangeli*. *Box plot* do log₂ das contagens por milhão (eixo y) pelos diferentes grupos (eixo x). As contagens estão representadas pelas médias (losango) mais os intervalos interquartis. Em rosa estão representados os transcritos de tripomastigotas metacíclicos, em verde de epimastigotas e, em azul, de tripomastigotas sanguíneos. 83

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Taxa de mortalidade das formas epimastigotas e tripomastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i> e <i>Trypanosoma rangeli</i> ao Sistema Complemento de mamíferos. Resultados normalizados a partir dos valores encontrados para o controle com PBS. NO – Não observado.	45
Tabela 2. Taxas de deposição de C3b e mortalidade em <i>Trypanosoma cruzi</i> , <i>Leishmania infantum</i> e <i>Trypanosoma rangeli</i> expostos a soro humano fresco. Resultados normalizados a partir dos valores encontrados para o controle com PBS. NO – Não observado.	46
Tabela 3. Proteínas identificadas na análise do secretoma de <i>Trypanosoma rangeli</i> relacionadas à interação parasita-hospedeiro.	56
Tabela 4. Lista de iniciadores para a amplificação dos sgRNA e cassete de homologia.	70
Tabela 5. Sequência dos iniciadores escolhidos para PCR para os genes alvo e tamanho dos produtos amplificados com cada par de iniciadores.	73
Tabela 6. Taxa de mortalidade das formas epimastigotas de <i>Trypanosoma rangeli</i> selvagem (WT) e linhagens <i>knockdown</i> ao sistema complemento de seres humanos. Resultados normalizados a partir dos valores encontrados para o controle com PBS.	82

LISTA DE ABREVIATURAS

DMEM – *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

DNA – ácido desoxiribonucleico

dNTP – desoxinucleotídeos trifosfatados

g – força da gravidade

IgG – anticorpo do tipo Imunoglobulina G

l – litro

LIT – do inglês *Liver Infusion Tryptose*

ml – mililitro

mM – milimolar

ng – nanograma

nm - nanômetro

PCR – do inglês *Polymerase Chain Reaction*

pmol – picomol

RNA – ácido ribonucleico

SBF – Soro Bovino Fetal

SC – Sistema Complemento

VA – Via Alternativa

VC – Via Clássica

VL – Via das Lectinas

TA – Temperatura Ambiente

Taq – *Thermus aquaticus*

U – Unidade de atividade

V – Volt

µg – micrograma

µl – microlitro

W – Watt

WT – Selvagem (do inglês *Wild Type*)

SUMÁRIO

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
1. O SISTEMA COMPLEMENTO.....	15
2. <i>TRYPANOSOMA RANGELI</i>	28
OBJETIVO.....	33
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	33
CAPÍTULO 1: ANÁLISE DA CAPACIDADE DE RESISTÊNCIA DO <i>TRYPANOSOMA RANGELI</i> AO SISTEMA COMPLEMENTO DE MAMÍFEROS E IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS RELACIONADAS A ESTA RESISTÊNCIA.	34
1 METODOLOGIA.....	35
1.1 PARASITOS	35
1.1.1 <i>Cultivo in vitro das formas epimastigotas de T. rangeli e T. cruzi</i>	35
1.1.2 <i>Cultivo in vitro das formas promastigotas de Leishmania infantum</i>	35
1.1.3 <i>Diferenciação in vitro de formas tripomastigotas de T. rangeli</i>	35
1.1.4 <i>Obtenção de formas tripomastigotas sanguíneas de T. rangeli</i>	36
1.1.5 <i>Obtenção de formas tripomastigotas metacíclicas de T. rangeli a partir de glândulas salivares de Rhodnius prolixus</i>	36
1.1.6 <i>Obtenção de formas tripomastigotas de T. cruzi</i>	36
1.1.7 <i>Aspectos éticos e de biossegurança</i>	37
1.2 ENSAIO DE MORTALIDADE DE <i>T. CRUZI</i> E <i>T. RANGELI</i> AO SISTEMA COMPLEMENTO (SC) DE MAMÍFEROS	37
1.2.1 <i>Preparação do soro</i>	37
1.2.2 <i>Ensaio de resistência ao Sistema Complemento</i>	38
1.3 ENSAIO DE DEPOSIÇÃO DE C3B.....	38
1.3.1 <i>Citometria de Fluxo</i>	38
1.3.2 <i>Western blot</i>	39
1.3.3 <i>Análises Estatísticas</i>	39
1.4 IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS ASSOCIADAS COM A CAPACIDADE DE RESISTÊNCIA DO <i>TRYPANOSOMA RANGELI</i> AO SC.....	40
1.4.1 <i>Co-adsorção</i>	40
1.4.2 <i>Ensaio de Gel-Shift</i>	41
1.4.3 <i>Análise do Secretoma in vitro de T. rangeli</i>	41
1.5 ESPECTROMETRIA DE MASSAS	42
1.5.1 <i>Digestão das proteínas em gel</i>	42
1.5.2 <i>Digestão das proteínas em solução</i>	42
1.5.3 <i>Análise por LC-ESI-MS/MS</i>	42
1.5.4 <i>Identificação das proteínas</i>	43
1.6 <i>WESTERN BLOT</i>	43
2 RESULTADOS.....	45
2.1 ENSAIO DE MORTALIDADE DO <i>TRYPANOSOMA RANGELI</i> AO SISTEMA COMPLEMENTO DE MAMÍFEROS	45
2.2 ENSAIO DE DEPOSIÇÃO DE C3B NA MEMBRANA DO <i>TRYPANOSOMA RANGELI</i>	46

2.3	AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE ALTERAR, CLIVAR OU DEGRADAR COMPONENTES DO SC DO <i>T. RANGELI</i> , <i>T. CRUZI</i> E <i>L. INFANTUM</i>	48
2.4	IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS ASSOCIADAS COM A CAPACIDADE DE SOBREVIVÊNCIA DO PARASITO AO SISTEMA COMPLEMENTO.....	50
2.4.1	<i>Co-Adsorção</i>	50
2.4.2	<i>Ensaio de Gel-Shift</i>	52
2.4.3	<i>Análise do Secretoma in vitro de T. rangeli</i>	53
3.	DISCUSSÃO	60
4.	RESUMO DOS RESULTADOS	67
	CAPÍTULO 2: APLICAÇÃO DA TÉCNICA DE CRISPR/CAS9 PARA DELEÇÃO DE GENES DE <i>TRYPANOSOMA RANGELI</i>	68
1	METODOLOGIA	69
1.1	DELEÇÃO DE GENES ENDÓGENOS VIA CRISPR/Cas9.....	69
1.1.1	<i>Desenho dos cassetes de transcrição dos sgRNA e homologia</i>	69
1.1.2	<i>Preparo e transfeção dos cassetes de transcrição dos sgRNA e de homologia e plasmídeo contendo o gene da Cas9</i>	71
1.1.3	<i>Verificação de deleção de genes endógenos</i>	72
1.2	BUSCA E AVALIAÇÃO DOS TRANSCRITOS REFERENTES AOS GENES CRT, CRP E AGN NO TRANSCRITOMA DE <i>T. RANGELI</i>	74
2	RESULTADOS	75
2.1	AVALIAÇÃO DA DELEÇÃO DE GENES ENDÓGENOS.....	75
2.2	AVALIAÇÃO DA MORTALIDADE DAS LINHAGENS <i>KNOCKDOWN</i> AO SC.....	82
2.3	BUSCA E AVALIAÇÃO DOS TRANSCRITOS REFERENTES AOS GENES CRT, CRP E AGN NO TRANSCRITOMA DE <i>T. RANGELI</i>	82
3	DISCUSSÃO	84
4	RESUMO DOS RESULTADOS	90
	CONCLUSÃO	91
	PERSPECTIVAS	92
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	93
	APÊNDICE A - TABELA DE PROTEÍNAS IDENTIFICADAS POR MS NA ANÁLISE EM SOLUÇÃO DAS FORMAS EPIMASTIGOTAS, TRIPOMASTIGOTAS DIFERENCIADOS <i>IN VITRO</i>, METACÍCLICOS E SANGUÍNEOS DE <i>TRYPANOSOMA RANGELI</i> OBTIDOS A PARTIR DO ENSAIO DE CO-ADSORÇÃO, COM SUAS RESPECTIVAS MASSAS MOLECULARES RELATIVAS (MW) TEÓRICAS E POTENCIAIS ISOELÉTRICOS (PI)	102
	APÊNDICE B - TABELA DE PROTEÍNAS IDENTIFICADAS POR MS NA ANÁLISE EM GEL DAS FORMAS EPIMASTIGOTAS DE <i>TRYPANOSOMA RANGELI</i> OBTIDOS A PARTIR DO ENSAIO DE CO-ADSORÇÃO, COM SUAS RESPECTIVAS MASSAS MOLECULARES RELATIVAS (MW) TEÓRICAS E POTENCIAIS ISOELÉTRICOS (PI)	104
	APÊNDICE C- TABELA DE PROTEÍNAS IDENTIFICADAS POR MS NA ANÁLISE EM GEL DAS FORMAS TRIPOMASTIGOTAS DIFERENCIADOS <i>IN VITRO</i> DE	

<i>TRYPANOSOMA RANGELI</i> OBTIDOS A PARTIR DO ENSAIO DE CO-ADSORÇÃO, COM SUAS RESPECTIVAS MASSAS MOLECULARES RELATIVAS (MW) TEÓRICAS E POTENCIAIS ISOELÉTRICOS (PI).....	106
APÊNDICE D - TABELA DE PROTEÍNAS IDENTIFICADAS POR MS NA ANÁLISE EM GEL DAS FORMAS TRIPOMASTIGOTAS METACÍCLICOS DE <i>TRYPANOSOMA RANGELI</i> OBTIDOS A PARTIR DO ENSAIO DE CO-ADSORÇÃO, COM SUAS RESPECTIVAS MASSAS MOLECULARES RELATIVAS (MW) TEÓRICAS E POTENCIAIS ISOELÉTRICOS (PI).....	108
APÊNDICE E -TABELA DE PROTEÍNAS IDENTIFICADAS POR MS NA ANÁLISE EM GEL DAS FORMAS TRIPOMASTIGOTAS SANGUÍNEOS DE <i>TRYPANOSOMA RANGELI</i> OBTIDOS A PARTIR DO ENSAIO DE CO-ADSORÇÃO, COM SUAS RESPECTIVAS MASSAS MOLECULARES RELATIVAS (MW) TEÓRICAS E POTENCIAIS ISOELÉTRICOS (PI).	111
APÊNDICE F -TABELA DE PROTEÍNAS IDENTIFICADAS POR MS NA ANÁLISE EM GEL DAS BANDAS EXCISADAS DO ENSAIO DE GEL-SHIFT EM FORMASEPIMASTIGOTAS, TRIPOMASTIGOTAS DIFERENCIADAS IN VITRO E TRIPOMASTIGOTAS SANGUÍNEOS DE <i>TRYPANOSOMA RANGELI</i>, COM SUAS RESPECTIVAS MASSAS MOLECULARES RELATIVAS (MW) TEÓRICAS.....	116
APÊNDICE G -TABELA DE PROTEÍNAS IDENTIFICADAS POR MS NA ANÁLISE EM SOLUÇÃO DO SECRETOMA DE FORMAS EPIMASTIGOTAS E TRIPOMASTIGOTAS DIFERENCIADOS IN VITRO DE <i>TRYPANOSOMA RANGELI</i>, COM SUAS RESPECTIVAS MASSAS MOLECULARES RELATIVAS (MW) TEÓRICAS.	117

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. O Sistema complemento

O sistema imune de mamíferos é altamente complexo e eficiente quanto à proteção contra agentes infecciosos como bactérias, vírus e patógenos eucarióticos, possuindo a capacidade de distinção de sinais próprios e não-próprios. O sistema imune é subdividido em dois sistemas interconectados, definidos como sistema imune inato e sistema imune adaptativo (FRIEC; KEMPER, 2009). A imunidade inata provê a primeira linha de defesa contra patógenos, sendo mediada por receptores que reconhecem padrões celulares que são comuns a muitos agentes infecciosos. A ativação deste sistema objetiva a eliminação do patógeno, porém, não confere uma memória imunológica contra novas infecções. Esta memória é provida pelo sistema imune adaptativo, a qual é efetivada por linfócitos B e T e utiliza uma memória antígeno específica (MEDZHITOV; JANEWAY, 2000).

Em conjunto com os componentes celulares o sistema complemento (SC) é parte do sistema imune inato, possuindo papel fundamental na defesa contra patógenos e na homeostase do hospedeiro (MERLE et al., 2015). O SC é composto por uma rede proteica que participa de processos da imunidade inata, agindo desde a opsonização de patógenos e quimiotaxia até a remoção de células apoptóticas e necróticas (SARMA; WARD, 2011).

O SC é formado por mais de 30 proteínas, dentre as quais, 20 são fatores solúveis no plasma e as demais são proteínas de membrana que atuam como receptores ou proteínas regulatórias. Estas proteínas são ativadas de forma sequencial que quando se ligam a superfície dos patógenos formam um complexo de ataque à membrana do mesmo, determinando a sua morte por lise celular (LAMBRIS; RICKLIN; GEISBRECHT, 2008).

Sabe-se que a ativação do SC pode ocorrer através de três vias envolvendo proteínas que são sequencialmente clivadas e ativadas. Todas as vias convergem em C3, sendo esta a proteína mais abundante do SC no sangue, resultando na formação dos produtos de ativação C3a, C3b, C5a e do complexo de ataque à membrana (C5b-9) (SARMA; WARD, 2011). O SC, enquanto sistema de defesa central, é imediatamente ativado após o reconhecimento de um patógeno pelo organismo hospedeiro. A ativação desta cascata gera produtos de ativação altamente reativos, possuindo ação quimiotática, inflamatória e citotóxica (ZIPFEL, 2009).

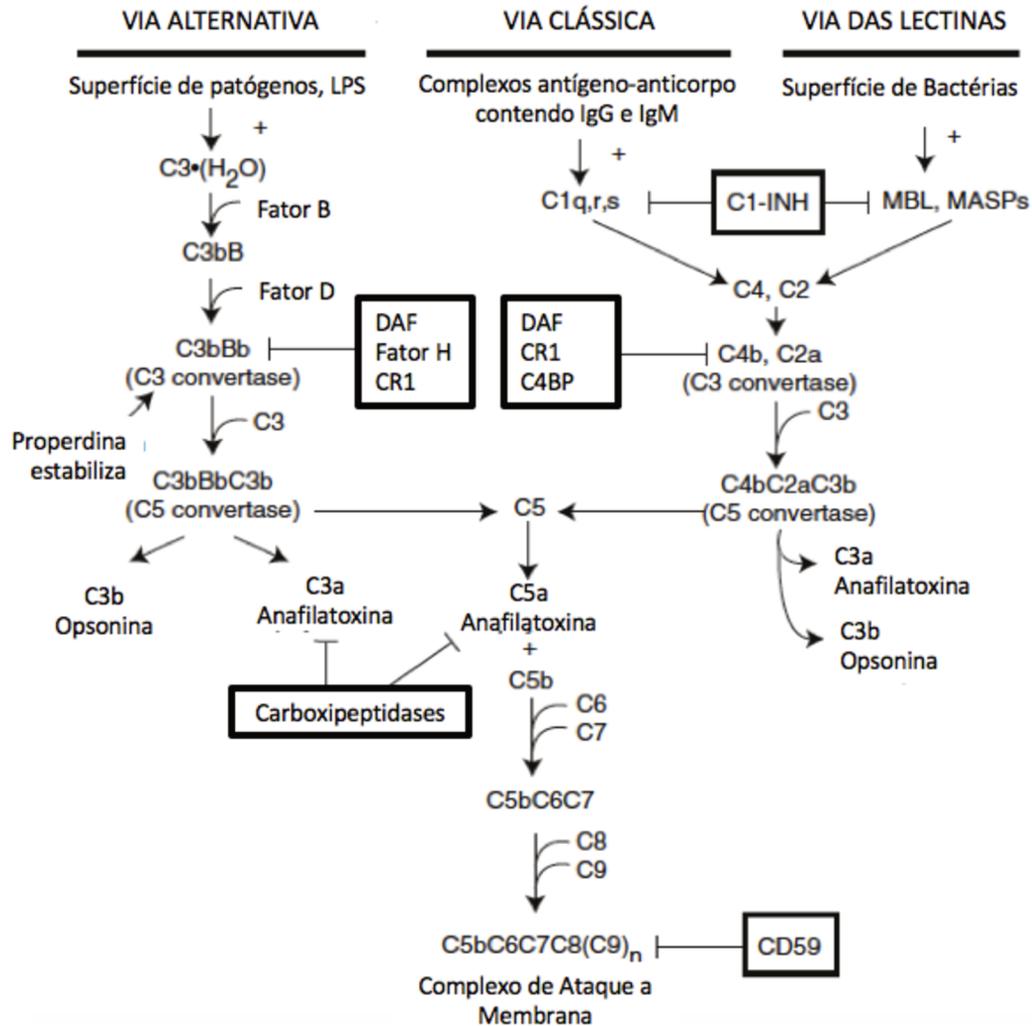
A ativação do SC ocorre por mudanças conformacionais nas proteínas relacionadas ao reconhecimento de moléculas complexas quando ocorre o reconhecimento de proteínas, carboidratos e outras moléculas não-próprias. A cascata de reações enzimáticas subsequentes é

finamente regulada para garantir que o SC seja ativado somente em locais específicos, agindo na defesa contra patógenos e evitando danos ao tecido do hospedeiro (MERLE et al., 2015).

O SC pode atuar, dependendo do tipo de estímulo, por três vias distintas: a via clássica (VC), a via das lectinas (VL) ou a via alternativa (VA), cada uma levando a uma via de terminação comum, as C3 convertases. Essas convertases clivam a C3, proteína central do SC, que além de determinar a lise do patógeno pela formação do complexo de ataque à membrana, também ativa e potencializa a opsonização, quimiotaxia e o processo inflamatório que auxiliam na eliminação do patógeno do organismo hospedeiro (Figura 1) (LAMBRIS; RICKLIN; GEISBRECHT, 2008).

Em um estado de homeostase, a VA em seres humanos está permanentemente ativa em níveis baixos, no entanto as células sadias do hospedeiro não são afetadas por esses baixos níveis de ativação. As três vias do SC são ativadas na superfície de células apoptóticas que são constantemente geradas durante a homeostase celular normal. O SC apenas é plenamente ativado na presença de antígenos não-próprios. Durante uma infecção, o SC gera a inflamação, opsonização, fagocitose e destruição do patógeno e, em últimos casos, resulta em uma ativação do sistema imune adaptativo. Tanto a ineficiência quanto a estimulação excessiva do SC podem ser prejudiciais para o hospedeiro e estão associadas à maior suscetibilidade a infecções ou a doenças não infecciosas, incluindo doenças autoimunes, inflamação crônica, microangiopatia trombótica, rejeição de enxerto e câncer (MERLE et al., 2015).

Figura 1. As três vias de ativação do complemento: alternativa, clássica e das lectinas. Fatores de inibição estão indicados nas caixas. DAF: Fator de Aceleração de Decaimento; CR1: Receptor do Complemento 1; C4BP: proteína de ligação à C4; C1-INH: inibidor de C1.



Fonte: Adaptado de SARMA; WARD, 2011.

1.1 Via Clássica

A VC é ativada quando complexos imunes são formados após a ligação de IgG ou IgM a patógenos ou a outros antígenos não-próprios. O complexo proteico C1, complexo multimérico constituído de C1s, C1r e C1s, ligam-se à porção Fc dos anticorpos IgG ou IgM. A ativação de C1s e C1r ocorre como consequência da ligação de C1q à porção Fc exposta de IgG ou IgM. C1s então cliva C4 e C2 para formar a C3 convertase C4bC2a. Além disso, as pentraxinas (PTX) podem reconhecer patógenos e eliminá-los ligando-se diretamente a C1q (BOTTAZZI et al., 2010; SJÖBERG; TROUW; BLOM, 2009). As PTX são sintetizadas em resposta a uma infecção (BOTTAZZI et al., 2010). As C3 convertases formadas em todas as vias atuam clivando ainda mais C3 gerando C3a e C3b. A C3b atua como uma opsonina e ajuda

a amplificar a ativação do complemento, auxiliando também na fagocitose do patógeno. Além disso, os complexos C3b com as C3 convertases formam as C5 convertases: C3bBbC3b e C4bC2aC3b. Estas C5 convertases clivam C5 para formar C5a e C5b. O complexo de ataque à membrana (C5b-9, MAC), também chamado de complexo do complemento terminal (TCC), é então iniciado por C6 e C7 ligando-se a C5b e depois a C8 e múltiplas moléculas de C9 se ligam ao complexo C5bC6C7. O complexo MAC forma um poro inserindo-se nas membranas celulares, resultando em lise celular (SARMA; WARD, 2011).

1.2 Via das Lectinas

A VL é ativada quando as Lectinas Ligantes de Manose (MBL) ou Ficolinas se ligam a porções de carboidratos na superfície de patógenos incluindo leveduras, bactérias, parasitos e vírus. Tanto a MBL quanto a Ficolina circulam no soro em complexos com as proteínas associadas a MBL (MASP) (SARMA; WARD, 2011; WALLIS, 2007). A ligação a patógenos induz alterações conformacionais resultando na auto ativação da proteína MASP2 que cliva C4 para formar C4a e C4b. C4b liga-se à superfície dos patógenos e induz C2 a se ligar, sendo este clivado por MASP2 para formar C2b e C2a. C4b juntamente com o C2a ligado adquirem atividade enzimática e formam a C3 convertase C4bC2a da VL. O papel exato das outras MASP é atualmente desconhecido, embora a MASP1 possa clivar C2, mas não C4 (SARMA; WARD, 2011; WALLIS, 2007).

1.3 Via alternativa

A VA é ativada por carboidratos, lipídios e proteínas encontrados em superfícies não-próprias (QU; RICKLIN; LAMBRIS, 2009). A proteína C3 é constantemente hidrolisada em um nível baixo formando C3b, que se liga a alguns alvos como bactérias. O Fator B é então recrutado para o C3b que já está ligado à superfície do patógeno, seguido pelo Fator D que cliva o Fator B para formar o complexo proteico denominado C3 convertase C3bBb, o qual é estabilizado pela presença da proteína properdina plasmática (KEMPER; ATKINSON; HOURCADE, 2010). A properdina é uma proteína liberada por neutrófilos ativados, sendo também encontrada em macrófagos e células T, a qual estabiliza a convertase pela ligação a C3b e impede sua clivagem pelos Fatores H e I. Estudos recentes sugerem que a properdina pode se ligar diretamente a células em apoptose e necrose e iniciar a ativação do complemento (KEMPER; ATKINSON; HOURCADE, 2010; SARMA; WARD, 2011).

1.4 Inibição das vias do SC

Dada a multiplicidade de efeitos que o SC pode exercer, existem mecanismos para delimitar o sítio e o momento de ativação. Por exemplo, o potencial de ligação de C3a e C5a é rapidamente reduzido pelas carboxipeptidases plasmáticas que clivam a arginina C-terminal destas proteínas, resultando em C3a des-Arg e C5a des-Arg, o que reduz cerca de 90% de suas atividades enzimáticas ótimas. Acredita-se que a C3a des-Arg, a qual é também conhecida como proteína aciladora de estimulação (ASP), induz a síntese de triglicérides nos adipócitos (KALANT et al., 2005).

C3b e C4b também são rapidamente inativadas por clivagem proteolítica. O Fator H e o Fator I, quando na presença da Proteína Cofator de Membrana (MCP) e Receptor do Complemento 1 (CR1), clivam C3b e C4b resultando nos fragmentos iC3b, C3dg, C3c, C4c e C4d. O CR1 promove também a fagocitose, ajudando a eliminar complexos imunes pela ligação ao C3b.

A falta de remoção desses complexos leva à deposição de complexos nos tecidos e ativação via receptores Fc, resultando em lesão tecidual. O CR2 (CD21) liga-se a iC3b, C3dg e C3d (HOLERS; KULIK, 2007). Além disso, o inibidor de C1 (C1-INH) inativa C1r, C1s e MASP2 (DAVIS; MEJIA; LU, 2008). A ativação do complemento também é regulada pela prevenção da montagem da C3 convertase ou, uma vez formada, pela inibição de sua atividade devido às ações do Fator de Aceleração de Decaimento (DAF, CD55), proteína de ligação à C4 (C4BP) e Fator H. Além disso, a formação do complexo MAC na superfície celular pode ser negativamente regulada pela proteína S (uma glicoproteína plasmática sintetizada pelas células endoteliais), vimentina (uma proteína do citoesqueleto) e CD59 (HUANG et al., 2006).

Em suma, o SC de mamíferos é composto por uma rede de proteínas que desempenham um papel importante na imunidade inata e adaptativa, desde a opsonização de patógenos e quimioatração à remoção de células apoptóticas e necróticas (SARMA; WARD, 2011).

A coexistência de patógenos e hospedeiros gera uma interação de mecanismos que tendem a manter o equilíbrio entre infecção, defesa e evasão. Para muitas doenças infecciosas, no entanto, esse equilíbrio é modulado pelos patógenos e permitem o estabelecimento da infecção. Juntamente com muitos outros fatores, como adesão celular e eficiência de entrada ou colonização, evitar os ataques do sistema imunológico é determinante para a sobrevivência do patógeno dentro de um ambiente hostil. A compreensão sobre os mecanismos de evasão do SC por patógenos, combinados com o maior conhecimento das funções de cada componente deste sistema na defesa contra patógenos e na doença humana, fornecem uma plataforma interessante

para a pesquisa básica e aplicada. Desta forma, estudos contínuos sobre os mecanismos de evasão imune e inibição do SC não devem apenas ampliar a compreensão dessas interações patógeno-hospedeiro, mas também fornecer conhecimentos vitais para melhores estratégias de tratamento para muitos tipos de doenças humanas (LAMBRIS; RICKLIN; GEISBRECHT, 2008).

1.5 Resistência de tripanosomatídeos ao Sistema Complemento

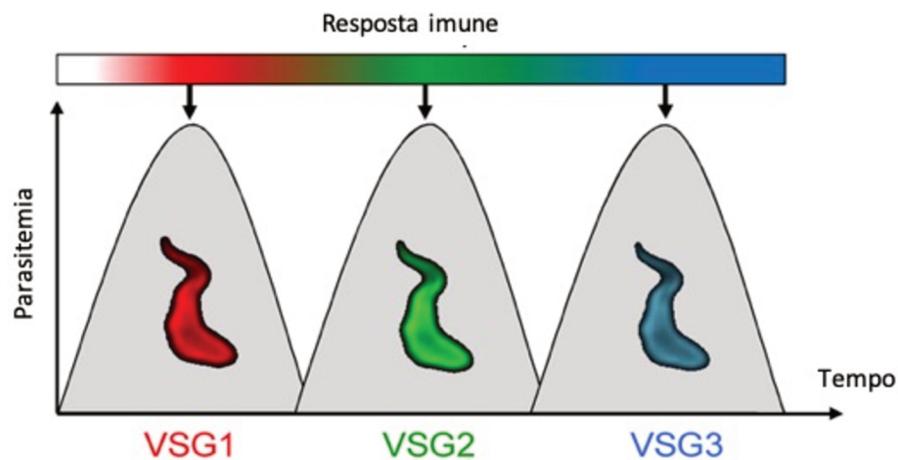
De forma geral, os patógenos utilizam estratégias de evasão do SC modulando todas as facetas da sua ativação, incluindo as etapas de regulação, amplificação, opsonização, fagocitose, quimioatração e lise celular. Os mecanismos de evasão incluem a proteólise de proteínas do SC, a atuação de proteínas que mimetizam a ação de proteínas reguladoras do complemento ou que interagem com proteínas do complemento, a partir da modulação ou inibição de proteínas do complemento por interações diretas; e inativação por degradação enzimática (LAMBRIS; RICKLIN; GEISBRECHT, 2008).

Entretanto, alguns patógenos podem se beneficiar das atividades do SC, favorecendo sua fagocitose ou entrada ativa em células hospedeiras pela sua opsonização com proteínas do SC (SARMA; WARD, 2011). Proteínas homólogas de reguladores do SC humano foram encontradas em diversas espécies de patógenos, tais como *Schistosoma mansoni*, *Candida albicans*, *Streptococcus pyogenes* e *Echinococcus granulosus*, dentre outras. Em particular, algumas destas proteínas são observadas na superfície de algumas espécies de parasitos humanos que possuem pelo menos uma parte do seu ciclo de vida no sistema vascular do hospedeiro (INAL; SIM, 2000). Dentre estes, podemos citar os agentes etiológicos da doença do sono humana (*Trypanosoma brucei rhodesiense* e *Trypanosoma brucei gambiense*), da doença de Chagas (*Trypanosoma cruzi*) e das Leishmanioses (*Leishmania* spp.).

O *T. brucei* possui em sua superfície um revestimento de 12-15 nm de espessura composto por glicoproteínas variantes de superfície (VSG), cuja composição varia ciclicamente ao longo do curso da infecção (CROSS, 1975; HORN, 2014; IRIBARREN et al., 2015) (Figura 2). Durante o curso das infecções pelos tripanosomas africanos, ondas de parasitemia são seguidas pela lise maciça dos parasitos, à medida que o hospedeiro produz anticorpos contra as VSG expressas em dado momento. Entretanto, a infecção é capaz de persistir pela expressão de um novo repertório de VSG antígenicamente distinto do anterior (FERRANTE; ALLISON, 1983). Desta forma, os tripanosomas africanos contornam o sistema imunológico do hospedeiro alterando continuamente o repertório das VSG expressas. Outra função da cobertura de VSG é

impedir a ligação da VA do SC na membrana do parasito, impedindo a formação do complexo de ataque a membrana (MAC) (MILNER; HAJDUK, 1999).

Figura 2. Comutação de VSG resulta em variação antigênica cíclica. Combinado com respostas imunes sucessivas, isso pode gerar uma parasitemia recidivante. As infecções naturais são mais complexas do que este esquema altamente simplificado.

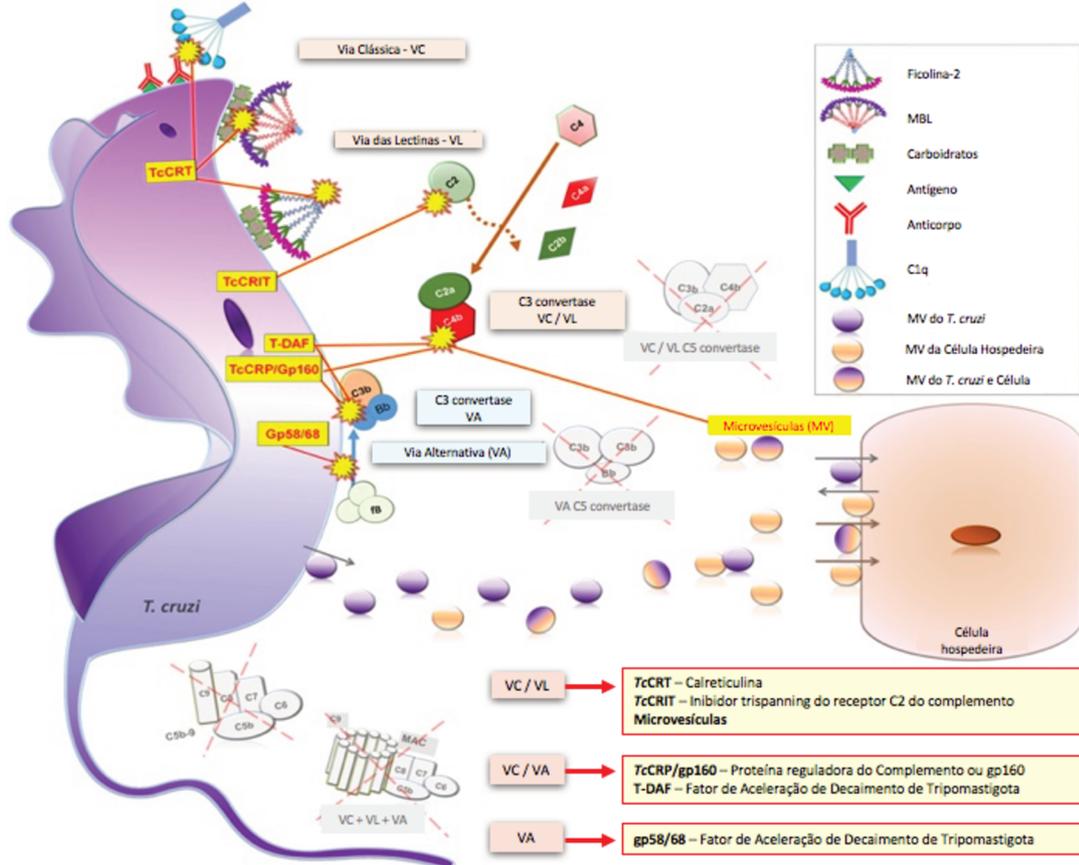


Fonte: Adaptado de HORN, 2014.

Os mecanismos apresentados pelo *T. cruzi* para evitar o SC são refinados e diferentes dos mecanismos presentes em *T. brucei* (INAL; SIM, 2000). Durante a infecção pelo *T. cruzi*, as três vias do complemento de mamíferos são ativadas, porém, interrompidas no momento da formação da C3 convertase por proteínas produzidas pelas formas tripomastigotas do parasito que bloqueiam a via terminal e a formação do MAC. Essa capacidade de evadir o SC permite que as formas tripomastigotas invadam as células hospedeiras e estabeleçam a infecção chagásica (LIDANI et al., 2017).

A resistência dos tripomastigotas metacíclicos ao SC é mediada por várias moléculas presentes na superfície do parasito, tais como: a calreticulina (CRT), a proteína reguladora do complemento (CRP ou gp160), a gp58/68, o inibidor trispanning do receptor C2 do complemento (CRIT) e o fator de aceleração do decaimento de tripomastigotas (T-DAF) (Figura 3) (VALCK et al., 2010).

Figura 3. Evasão do Sistema Complemento pelas formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*. *TcCRT* bloqueia a VC e a VL se ligando a C1q, MBL e Ficolina-2; T-DAF e gp160/*TcCRP* bloqueiam a VA e a montagem da C3 convertase da VC; *TcCRIT* bloqueia a VC e a VL se ligando a C2; gp58/68 bloqueia a montagem da C3 convertase da VA a partir da ligação ao Fator B; e as Microvesículas (MV) inibem a montagem da C3 convertase da VC e VL. VC- Via Clássica; VL- Via das Lectinas; VA- Via Alternativa.



Fonte: Adaptado de LIDANI et al., 2017.

A CRT é uma proteína altamente conservada e presente em todas as células de eucariotos superiores, exceto eritrócitos (MICHALAK et al., 1999). A calreticulina de *T. cruzi* (*TcCRT*) inibe a VC de ativação do SC humano *in vitro*, por possuir a capacidade de interagir com o primeiro componente do SC humano (FERREIRA et al., 2004a, 2004b, 2005). A *TcCRT* é translocada do retículo endoplasmático para a área de emergência flagelar da forma tripomastigota, recrutando C1q, sendo esta uma estratégia de evasão celular que resulta na inibição do SC e aumento da infectividade (FERREIRA et al., 2004b). A *TcCRT* não só compete com o complexo tetramérico (C1r-C1s)₂ para ligar nas caudas de colágeno C1q, como também interfere operacionalmente com a atividade C1s. A partir dessa competição, a *TcCRT* gera um importante decréscimo na geração de C4b, uma vez que a C1q não será capaz de clivar a proteína C4, resultando na interferência da VC (VALCK et al., 2010).

A CRP do *T. cruzi* (*TcCRP*) é uma glicoproteína de superfície, pertencente a superfamília das *trans*-sialidasas, que também confere proteção aos tripomastigotas metacíclicos contra a lise do SC (MATHIEU-DAUDÉ et al., 2008). A *TcCRP* atua restringindo a VC e a VA do SC a partir da ligação nos componentes C3 e C4b, prevenindo assim a formação da C3 convertase (NORRIS, 1998). A *TcCRP* é especificamente expressa em tripomastigotas metacíclicos e não é detectável em epimastigotas ou amastigotas intracelulares (NORRIS; SCHRIMPF; SZABO, 1997).

O CRIT é uma proteína transmembrana de 32 kDa, cujo primeiro domínio extracelular N-terminal apresenta similaridade de sequência com parte da proteína C4 do SC e compete pela ligação a C2, impedindo sua clivagem (HUI et al., 2005; INAL; SCHIFFERLI, 2002). O CRIT é uma proteína altamente conservada em mamíferos, em diferentes espécies do gênero *Schistosoma*, bem como em diferentes cepas de *T. cruzi* (INAL et al., 2005). Em *T. cruzi*, o CRIT é expresso somente nos tripomastigotas, sendo que experimentalmente a indução de expressão de CRIT por formas epimastigotas as tornam mais resistentes à lise pelo SC, bloqueando a VC e VL (CESTARI et al., 2008).

A gp58/68 é uma glicoproteína de um peso molecular aparente de 58 kDa (não-reduzido) e 68 kDa (reduzido) (FISCHER et al., 1988) que é expressa na superfície parasitária ou pode ser liberada para o meio extracelular por tripomastigotas (VELGE et al., 1988). Essa proteína faz parte do receptor de fibronectina/colágeno de *T. cruzi*, que consiste em duas moléculas de 80-85 kDa e 58-68 kDa com um papel importante na adesão de formas tripomastigotas nas células de mamíferos (OUAISSI; CORNETTE; CAPRON, 1986; VELGE et al., 1988). A gp58/68 age como uma proteína reguladora do SC, para a qual se demonstrou a capacidade de inibir a formação da C3 convertase da VA (FISCHER et al., 1988), impedindo a associação inicial do Fator B com o C3b de uma maneira dose dependente. Além disso, a gp58/68 também mostrou restringir a formação da C3 convertase da VA em fase fluida pelo consumo do Fator B presente (FISCHER et al., 1988).

O T-DAF é uma glicoproteína de 87-93 kDa presente na superfície de formas tripomastigotas metacíclicas e derivadas de cultura celular de *T. cruzi*, com atividade similar a DAF presente em mamíferos (TAMBOURGI et al., 1993). O T-DAF regula a ativação da VC e VA e possivelmente da VL, interferindo na formação das C3 convertases (LIDANI et al., 2017). Foi demonstrado que o T-DAF possui 40% de similaridade à DAF humana, e que anticorpos anti-T-DAF são encontrados no soro de 96% dos pacientes em fase aguda e crônica da doença de Chagas. Tanto o T-DAF solúvel quanto o presente na superfície dos parasitos são

essenciais para o escape do *T. cruzi* da ativação do SC e dos seus efeitos líticos, permitindo o desenvolvimento da infecção (LIDANI et al., 2017).

Além das proteínas associadas a membrana, os parasitos também são capazes de liberar e induzir a liberação de microvesículas (MV) por células do hospedeiro. As MV são vesículas de 100 a 1000 nm originadas da membrana plasmática e são liberadas por um grande número de células do sangue, do sistema imunológico, de tecidos epiteliais e endoteliais, entre outros (EVANS-OSSES; DE MESSIAS-REASON; RAMIREZ, 2013). Células do hospedeiro infectadas pelo *T. cruzi* liberam MV que interferem na montagem da C3 convertase da VC e VL na superfície do parasito, levando a inibição de sua atividade catalítica (CESTARI et al., 2012). Ramirez e colaboradores (2016) demonstraram que a interação entre epimastigotas e tripomastigotas de *T. cruzi* com células do hospedeiro podem induzir a formação de microvesículas pelas células infectadas. No início da infecção, tripomastigotas metacíclicos induzem a liberação de MV por células do sistema imune como linfócitos, monócitos e macrófagos em um processo cálcio-dependente (CESTARI et al., 2012).

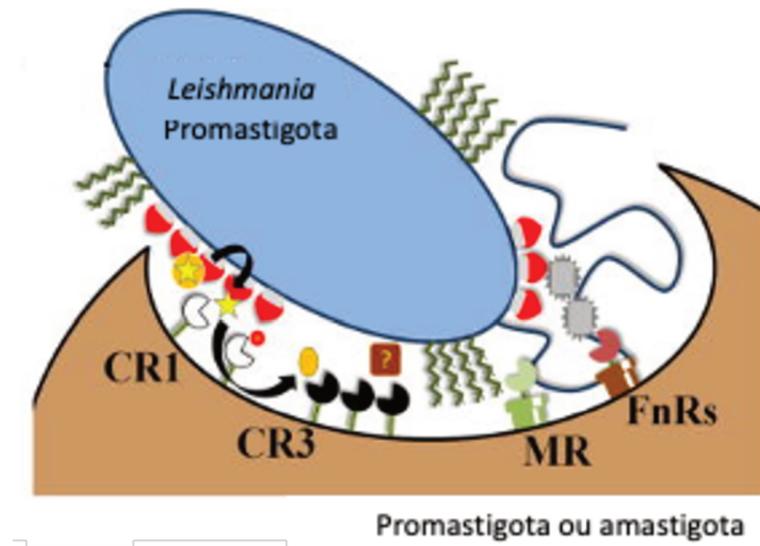
A fusão de MV derivadas das células hospedeiras e do parasito já foi demonstrada, e este fenômeno parece facilitar o contato entre o *T. cruzi* e as membranas plasmáticas das células hospedeiras. Assim, as MV liberadas durante a interação do parasito com as células do hospedeiro foram capazes de aumentar a invasão de células por tripomastigotas metacíclicos (RAMIREZ et al., 2016). Em resumo, a interação entre o *T. cruzi* e as células do hospedeiro promovem a liberação de MV tanto do parasito quanto das células do hospedeiro e esse fenômeno pode contribuir para a evasão da ativação das VC e VL do SC e para aumentar a infecção da célula hospedeira. Assim, as MV do hospedeiro e do parasito parecem possuir um potencial efeito imunomodulador na patogênese da infecção pelo *T. cruzi* (LIDANI et al., 2017).

Após a sua transmissão para o hospedeiro mamífero, os parasitos do gênero *Leishmania* entram em contato imediato com o sistema imunológico inato. No entanto, as estes parasitos desenvolveram muitos mecanismos para escapar das respostas inflamatórias e microbidas inatas, alterando, por exemplo, várias vias chave de sinalização (ISNARD; SHIO; OLIVIER, 2012). Esses parasitos expressam uma glicoproteína de 63 kDa (gp63), uma metaloprotease envolvida na degradação e clivagem de muitas moléculas biológicas como o fator nuclear kappa-B, fibronectina e tirosina fosfatases. A gp63 é capaz de inibir a atividade do SC e reduz as funções imunológicas do hospedeiro, permitindo a sobrevivência do parasito e a sua disseminação (MURASE et al., 2018). Ela pode estar relacionada à degradação de proteínas do SC, protegendo o parasito da lise pelo SC (KULKARNI et al., 2008). Esse padrão de atividade

proteolítica da gp63 é uma característica fenotípica estável de *Leishmania* (CUERVO et al., 2008).

Para *Leishmania* a ativação do SC é interessante para sua capacidade de infecção, uma vez que a ativação do SC promove a formação de elementos quimiotáticos, como C3a e C5a, que atraem macrófagos para o local da infecção. O C3a é gerado a partir da proteólise de C3 pelas C3 convertases, produzindo nesta quebra, moléculas de C3b que se ligam covalentemente a membrana dos parasitos, visando a montagem do MAC responsável pela lise dos parasitos. Para impedir a formação do MAC, *Leishmania* possui antígenos de membrana, como a gp63 que é capaz de inativar o C3b em iC3b. Desta forma, os parasitos mais infectivos conseguem sobreviver a primeira linha de defesa do hospedeiro e são opsonizados por iC3b (GUY; BELOSEVIC, 1993), que por sua vez media o reconhecimento dos promastigotas opsonizados pela proteína CR3 presente na superfície de macrófagos facilitando o processo de fagocitose (RUSSELL; WILHELM, 1986; UENO; WILSON, 2013). Macrófagos que internalizam os parasitos opsonizados com iC3b não ativam o ataque oxidativo evidenciando sua baixa capacidade de promover a destruição dos parasitos, garantindo desta forma a viabilidade destes e interrompendo a ativação da imunidade adquirida e, conseqüentemente afetando o curso da infecção. A gp63 aparenta ser a molécula responsável tanto pela ligação do C3b à membrana do parasito quanto pela sua degradação em iC3b (Figura 4) (PODINOVSKAIA; DESCOTEAUX, 2015). A presença do iC3b na superfície do parasito não acarreta na formação do MAC, porém sua atividade opsônica se mantém, facilitando assim a internalização da *Leishmania* spp. pelos macrófagos. Esta forma de internalização é benéfica para os parasitos, uma vez que não induz a produção de superóxidos (PASSERO; RODRIGUES; PEREIRA, 2016; RUSSELL, 1987).

Figura 4. *Leishmania* emprega várias vias mediadas por receptores para invadir macrófagos e células dendríticas. A gp63 é altamente expressa em promastigotas, converte as opsoninas C3 em C3b, o ligante natural para o CR1. O CR1, com o fator I, cliva o C3b em iC3b, facilitando a ligação ao CR3. O CR3 pode também mediar a ligação direta a promastigotas a partir de um epitopo de superfície ainda desconhecido. A gp63 também se liga à fibronectina, que então liga o parasito às FnRs.



Fonte: Adaptado de WILSON, 2018.

O papel da gp63 em clivar a proteína C3 foi fortalecido quando Brittingham e colaboradores (1995) ao utilizar uma cepa de *Leishmania* que superexpressa gp63 ou uma gp63 mutante sem atividade. Os parasitos superexpressando a gp63 ativa foram capazes de aumentar a conversão de C3b em iC3b e reduzir a fixação de componentes terminais do SC, consequentemente aumentando a resistência à lise comparativamente ao parasito superexpressando a gp63 inativa. Estudos de Russel e colaboradores (1987; 1986) demonstraram uma interação entre a gp63 e o C3, sugerindo que a gp63 é o sítio receptor para a deposição de C3. Posteriormente, foi demonstrado por Chaudhuri e Chang (1988) que a gp63 purificada pode clivar a C3 em seus produtos de decomposição C3b (117 kDa), iC3b (68 kDa) e possivelmente gerar outros catabólitos relacionados (C3c, C3d, C3e de ~29 e 43 kDa).

Dentre os tripanosomatídeos, o *T. rangeli* é um parasito hemoflagelado capaz de infectar diversas espécies de mamíferos selvagens e domésticos, incluindo o ser humano. No entanto, apesar de compartilhar inúmeras características genéticas e fenotípicas com o *T. cruzi*, muito pouco se sabe sobre a sua capacidade de sobrevivência após a infecção no hospedeiro mamífero. As formas epimastigotas de *T. cruzi* que estão presentes apenas nos vetores triatomíneos são altamente suscetíveis à lise mediada pelo SC, enquanto que as formas tripomastigotas, formas infectantes e também presentes na corrente sanguínea do hospedeiro, são resistentes

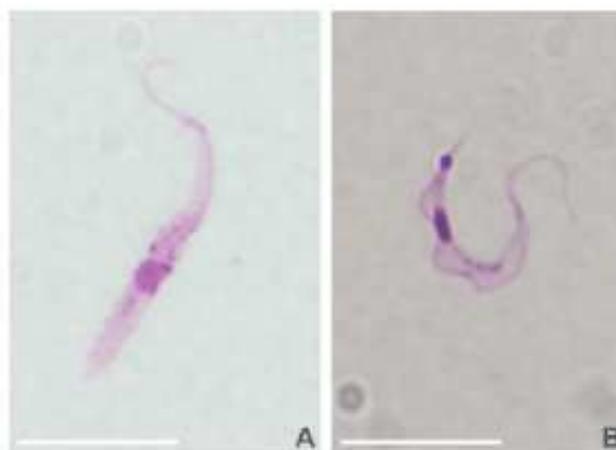
(RAMÍREZ-TOLOZA; FERREIRA, 2017). Segundo De Souza e colaboradores (2012) algumas cepas de *T. rangeli* apresentam resistência a lise mediada pelo SC. Essa resistência foi verificada em ensaios utilizando as formas epimastigotas do parasito que estão apenas presentes no inseto vetor, sendo que poucos dados existem a respeito desta resistência em formas tripomastigotas. De Lima Ferreira e colaboradores (2015) demonstraram que os tripomastigotas metacíclicos provindos da glândula salivar de *R. prolixus* são resistentes ao SC de camundongos Swiss Webster. Assim sendo, apesar de não haver uma vasta gama de dados sobre a capacidade de resistência do *T. rangeli* ao SC, existem evidências indiretas de que ele é capaz de evadir os ataques do SC, já que é possível isolar este parasito do sangue de animais infectados até sete meses após a infecção (STEINDEL, 1993; STEINDEL et al., 1991).

Porém, até o momento, não existem estudos que demonstrem quais os mecanismos que conferem a resistência ao SC nas formas epimastigotas ou tripomastigotas de *T. rangeli*. Por meio de análises *in silico* do genoma de *T. rangeli* realizadas por Stoco e colaboradores (2014) foram encontradas diversas proteínas homólogas as relacionadas à atividade bloqueadora do SC em *T. cruzi*, evidenciando novamente que o *T. rangeli* é capaz de evadir o SC e que esta resistência pode ser mediada por proteínas. Desta forma, este trabalho propõe buscar proteínas que estejam relacionadas com a resistência do *T. rangeli* ao SC de mamíferos.

2. *Trypanosoma rangeli*

O *Trypanosoma rangeli* (Kinetoplastida:Trypanosomatidae), descrito por Tejera em 1920, apresenta três formas biológicas bem definidas no seu ciclo de vida: a forma epimastigota proliferativa com 45 a 56 μm de comprimento, incluindo o flagelo livre, a forma tripomastigota sanguínea, a qual é delgada e possui comprimento de 26 a 35 μm e a forma tripomastigota metacíclica, a qual possui comprimento de 10 μm (Figura 5) (CUBA CUBA, 1998; STOCO et al., 2014).

Figura 5. Microfotografia de formas epimastigota (A) e tripomastigota sanguínea (B) de *Trypanosoma rangeli*, coradas por Giemsa. As barras representam 10 μm .



Fonte: LÜCKEMEYER, 2014.

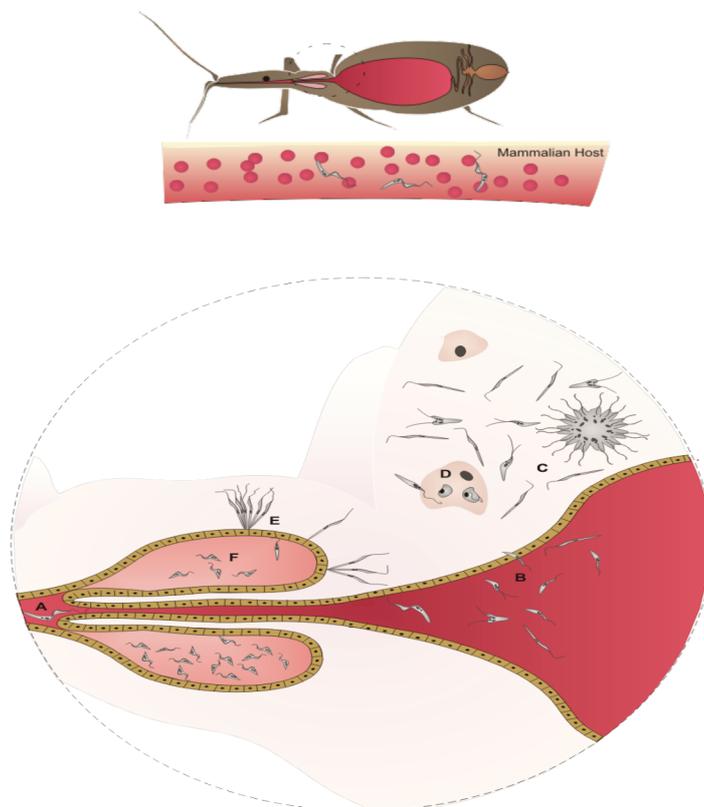
A distribuição geográfica do *T. rangeli* é sobreposta à do *T. cruzi*, incluindo países das Américas do Sul e Central. Essas espécies também compartilham reservatórios e vetores. As implicações epidemiológicas da coexistência destes dois parasitos estão na ocorrência de infecções únicas ou mistas, tanto nos hospedeiros insetos como nos mamíferos (D’ALESSANDRO, 1976; GRISARD et al., 1999; GRISARD; STEINDEL, 2005).

Embora seja relacionado ao *T. cruzi*, tanto em aspectos epidemiológicos, filogenéticos, genéticos e morfológicos, o *T. rangeli* não é considerado patogênico para seus hospedeiros mamíferos. Esse parasito é capaz de induzir uma resposta imune humoral com elevados títulos de anticorpos, os quais determinam uma elevada reatividade cruzada com o *T. cruzi*, uma vez que suas formas epimastigotas compartilham cerca de 60% da sua constituição antigênica solúvel. Este fato pode levar a diagnósticos falso-positivos da doença de Chagas, especialmente

em sua fase crônica. Desta forma, o *T. rangeli* é de considerável interesse médico e de extrema importância em estudos epidemiológicos da doença de Chagas (AFCHAIN et al., 1979; DE MORAES et al., 2008; GRISARD; STEINDEL, 2005; SCHOTTELIUS, 1987).

O *T. rangeli* é descrito como patogênico somente ao hospedeiro invertebrado, no qual a intensa multiplicação de epimastigotas na hemolinfa e os eventos relacionados a sobreposição de barreiras celulares podem exercer uma ação prejudicial para o inseto vetor, tais como: destruição dos hemócitos, dificuldade de muda e desenvolvimento das ninfas, podendo eventualmente ocasionar a morte do inseto (Figura 6) (VALLEJO; GUHL; SCHAUB, 2009).

Figura 6. Representação esquemática do ciclo biológico do *Trypanosoma rangeli* no hospedeiro invertebrado. A infecção do triatomíneo ocorre pela ingestão de formas tripomastigotas sanguíneas durante o repasto (A), sendo as formas tripomastigotas e epimastigotas predominantes no intestino médio (B). Formas epimastigotas curtas se dividem no intestino médio e podem invadir a hemocele (C), onde dividem-se de forma livre como epimastigotas longos. Alguns parasitos podem invadir hemócitos (D), sendo desconhecida a capacidade de multiplicação no interior desta célula. As formas epimastigotas longas aderem e penetram na glândula salivar (E) diferenciando-se em seu interior em tripomastigotas metacíclicos (F) infectantes que são inoculados com a saliva durante o repasto sanguíneo.



Fonte: STOCO et al., 2017.

Em relação ao hospedeiro invertebrado, o gênero *Rhodnius* é particularmente susceptível à infecção pelo *T. rangeli*, sendo que a transmissão via inoculativa foi demonstrada

para 12 espécies deste gênero, a partir de insetos naturalmente ou experimentalmente infectados. Embora, com baixas taxas de infecção nas glândulas salivares, a susceptibilidade de *Panstrongylus megistus*, *Triatoma infestans*, *Triatoma sordida*, *Triatoma braziliensis* e *Triatoma vitticeps* ao *T. rangeli* também foi apontada (DE STEFANI MARQUEZ et al., 2006). As espécies do gênero *Rhodnius* encontradas naturalmente infectadas pelo *T. rangeli* revelam diferentes níveis de susceptibilidade, dependendo da espécie do triatomíneo e da cepa do parasito, sendo observada uma maior relação de susceptibilidade entre a(s) espécie(s) de triatomíneo(s) local com as cepas do parasito que circulam em uma mesma região geográfica (GUHL; VALLEJO, 2003).

Com relação à evasão do intestino das formas epimastigotas para a hemocele do inseto, diferentes estudos têm proposto padrões opostos para este evento. De Oliveira e De Souza (2001) sugerem que os epimastigotas atravessam o citoplasma das células intestinais, onde determinariam dano celular. Entretanto, Hecker e colaboradores (1990) haviam demonstrado que, apesar dos epimastigotas atravessarem as células numa via intracelular, não são observados danos celulares. Outro ponto controverso da biologia do *T. rangeli* no hospedeiro invertebrado é relacionado à multiplicação do parasito. Ao passo que alguns trabalhos postulam que há o conceito de multiplicação intracelular nos hemócitos, não há, no entanto, evidências convincentes da multiplicação no parasito neste tipo celular (TOBIE, 1970; WATKINS, 1971). Da mesma forma, ainda não está bem estabelecido se as células de defesa desses insetos possuem a capacidade de realizar a fagocitose de *T. rangeli* e determinar a morte dos parasitos. De Oliveira e De Souza (2001) utilizando microscopia eletrônica de transmissão demonstraram que plasmatócitos foram capazes de internalizar formas epimastigotas dos parasitos formando um vacúolo, mas não apontaram evidências de parasitos em divisão.

A transmissão anterior do *T. rangeli* (via inoculativa) é um dos fatores que permite sua identificação específica (D’ALESSANDRO; SARAVIA, 1999), entretanto, cabe salientar que as taxas de infecção das glândulas salivares e hemolinfa de triatomíneos são maiores em condições experimentais do que aquelas observadas em condições naturais (D’ALESSANDRO; MANDEL, 1969).

O *T. rangeli* não apresenta especificidade de hospedeiros mamíferos, tendo sido observado em uma extensa variedade de reservatórios mamíferos, correspondentes às Ordens Edentata, Marsupialia, Carnivora, Rodentia e Primata (D’ALESSANDRO; SARAVIA, 1999). Infecções experimentais pelo *T. rangeli* foram realizadas com sucesso em diferentes espécies que incluem ratos, camundongos, hamsters, coelhos, cães, morcegos e primatas, corroborando sua amplitude de hospedeiros (GUHL; VALLEJO, 2003).

O ciclo biológico do *T. rangeli* é pouco conhecido nos seus hospedeiros mamíferos. A existência de um ciclo de multiplicação intracelular do parasito nesses hospedeiros ainda é controversa, sendo baseada em dados controversos e carecendo de evidências para postular uma hipótese (HERBIG-SANDREUTER, 1955). Existem relatos de que a multiplicação no hospedeiro mamífero do *T. rangeli* esteja relacionada às características da cepa utilizada (OSORIO et al., 1995; URDANETA-MORALES; TEJERO, 1986). Porém, muitos pesquisadores têm procurado, ainda sem êxito, por formas deste parasito em tecidos de animais experimentalmente infectados (GUHL; VALLEJO, 2003). O *T. rangeli* apresenta parasitemia normalmente baixa (sub-patente) e de curta duração (D’ALESSANDRO; SARAVIA, 1999). A taxa de infectividade *in vitro* de diferentes cepas deste parasito frente a diferentes linhagens celulares é geralmente muito baixa e os parasitos tendem a desaparecer ao longo do tempo de interação, sugerindo uma incapacidade de infecção e uma ausência de multiplicação intracelular (EGER-MANGRICH et al., 2001).

Observações de formas tripomastigotas sanguíneas de *T. rangeli* que pareciam estar em divisão já foram realizadas em seres humanos e roedores (D’ALESSANDRO; SARAVIA, 1999). Entretanto, estas formas ainda podem ser provenientes da glândula salivar do inseto infectado e não uma consequência da multiplicação do parasito no hospedeiro mamífero. Um extenso estudo histopatológico convencional realizado com mais de cem animais experimentalmente infectados não apresentou qualquer resultado de multiplicação intracelular (HERBIG-SANDREUTER, 1955). No entanto, o isolamento repetido do parasito em animais cronicamente infectados e a detecção de parasitemias mais elevadas que o inóculo realizado sugerem a existência de multiplicação ou de um mecanismo de sobrevivência deste flagelado no hospedeiro mamífero (D’ALESSANDRO; SARAVIA, 1999).

Aliado a este desconhecimento acerca da multiplicação do parasito em seus hospedeiros mamíferos, o *T. rangeli* possui uma menor capacidade de resposta a estresse oxidativo se comparado ao *T. cruzi*. Esta capacidade limitada do *T. rangeli* de responder a esse estresse pode estar relacionada à incapacidade desse parasito de infectar e se multiplicar dentro de células de mamíferos.

Uma vez que a capacidade de resistência ao SC de mamíferos das formas tripomastigotas (diferenciadas *in vitro*, metacíclicas e sanguíneas) ainda é pouco explorada, faz-se importante entender como o *T. rangeli* subverte uma das primeiras barreiras do sistema imune inato. Além disso, o *T. rangeli* possui uma resistência diferenciada de suas formas epimastigotas ao SC, provavelmente relacionada ao seu complexo ciclo no hospedeiro invertebrado, sendo ainda desconhecidos os fatores relacionados à esta resistência diferencial

ao *T. cruzi*, cujas formas epimastigotas são sensíveis à lise pelo SC. Essa comparação da capacidade de resistência entre ambas as formas de *T. rangeli* também deve ser explorada, uma vez que se sabe que existem proteínas que são diferencialmente expressas nas duas formas evolutivas, sendo que a resistência ao SC pode estar relacionada a proteínas diferentes, ou por proteínas diferencialmente expressas em formas epimastigotas e tripomastigotas. Somado ainda a estes fatores, o ciclo do *T. rangeli* no hospedeiro mamífero ainda é desconhecido, e o entendimento sobre sua capacidade de resistência ao SC pode auxiliar na compreensão da existência de um sítio de multiplicação intra e/ou extracelular.

Desta forma, a compreensão dos mecanismos através dos quais estas proteínas podem estar envolvidas na resistência ao SC de mamíferos contribuirão diretamente para os estudos do ciclo do *T. rangeli* no hospedeiro mamífero.

OBJETIVO

Caracterizar proteínas envolvidas na resistência de diferentes formas do *Trypanosoma rangeli* ao sistema complemento de mamíferos.

Objetivos Específicos

Para melhor apresentação dos resultados gerados no presente estudo, os objetivos específicos e esta tese foram divididos em dois capítulos. O primeiro capítulo trata da avaliação da resistência do *T. rangeli* ao SC assim como da geração de um mapa proteico do parasito focando em proteínas possivelmente relacionadas à resistência do parasito ao SC, permitindo a seleção de proteínas de interesse e sua caracterização. O segundo capítulo está focado na padronização e aplicação do sistema CRISPR/Cas9 em *T. rangeli* e nos resultados preliminares da caracterização fenotípica dos parasitos quando da deleção dos genes selecionados com base nos resultados obtidos no primeiro capítulo.

Capítulo 1:

- Avaliar a resistência ao SC de formas epimastigotas e tripomastigotas (diferenciadas *in vitro*, metacíclicas e sanguíneas) de *T. rangeli*;
- Identificar e caracterizar por análise comparativa de sequências de proteínas do *T. rangeli* que possam estar associadas com a capacidade de resistência do parasito ao SC de mamíferos.

Capítulo 2:

- Padronizar a técnica de CRISPR/Cas9 para a deleção de genes de *T. rangeli*;
- Realizar a deleção dos genes de *T. rangeli* codificantes para Calreticulina, Proteína Reguladora do Complemento e proteína hipotética AGN32887.

CAPÍTULO 1: Análise da capacidade de resistência do *Trypanosoma rangeli* ao sistema complemento de mamíferos e identificação de proteínas relacionadas a esta resistência.

1 METODOLOGIA

1.1 Parasitos

Todas as cepas de parasitos utilizadas neste trabalho encontram-se depositadas no criobanco do Laboratório de Protozoologia (MIP/CCB/UFSC) e registradas na coleção do laboratório junto ao Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SIGGEN/MMA) sob número A206000.

1.1.1 Cultivo *in vitro* das formas epimastigotas de *T. rangeli* e *T. cruzi*

Nesse estudo foram utilizadas as cepas de *T. rangeli* Choachí (SCHOTTELIUS, 1987) e Choachí transfectada com o plasmídeo pTEX-GFP (KELLY et al., 1992). A cepa Choachí pTEX-GFP foi utilizada de modo a facilitar a separação dos tripomastigotas sanguíneos das hemácias por citometria de fluxo utilizando sua expressão de GFP. O cultivo de formas epimastigotas foi realizado através de passagens semanais em meio LIT (do inglês *Liver Infusion Tryptose*) suplementado com 10 % (v/v) de soro bovino fetal (SBF, Gibco), 10 U/ml de penicilina e 10 µg/ml de estreptomicina (Cultilab) a 27,5°C. Como controle, foram utilizadas formas epimastigotas da cepa Y de *T. cruzi*, sendo cultivadas conforme o acima descrito.

1.1.2 Cultivo *in vitro* das formas promastigotas de *Leishmania infantum*

O cultivo dos promastigotas de *L. infantum*, cepa PP075, foi realizado a 27,5°C em garrafas de cultura celular de 25 cm², contendo 5 ml de Schneider's insect medium (Sigma-Aldrich), pH 7,4, suplementado com 10% (v/v) de SBF, 2% (v/v) de urina humana estéril, 10 U/ml de penicilina e 10 µg/ml de estreptomicina e mantidos por meio de passagens semanais por no máximo 20 passagens.

1.1.3 Diferenciação *in vitro* de formas tripomastigotas de *T. rangeli*

As formas tripomastigotas foram obtidas a partir das formas epimastigotas de *T. rangeli* utilizando o protocolo descrito por Koerich et al. (2002) com algumas modificações. Inicialmente, 12 x 10⁷ epimastigotas em fase exponencial de crescimento em meio LIT foram centrifugados por 10 minutos a 3.000 x g e lavados duas vezes com PBS (tampão salina fosfato pH 7,4). Em seguida, foram adicionados 15 ml de meio DMEM (do inglês *Dulbecco's Modified Eagle Medium*, Himedia), pH 8,0 contendo 5 % de SBF e 2 mM de L-glutamina (Sigma-Aldrich) e os parasitos mantidos a 27,5°C em garrafas de cultura celular de 25 cm³ sem filtro (TPP). O processo de diferenciação foi acompanhado diariamente por meio da determinação

em microscópio óptico da porcentagem de formas tripomastigotas na cultura em esfregaços delgados corados pelo método de com Giemsa (Merck). As formas tripomastigotas foram obtidas entre o 7º e 8º dia de cultivo, sendo coletadas por centrifugação quando taxas maiores que 95 % de tripomastigotas foram observadas.

1.1.4 Obtenção de formas tripomastigotas sanguíneas de *T. rangeli*

Tripomastigotas da cepa Choachí pTEX-GFP diferenciados *in vitro* foram coletados (4.000 x g por 10 minutos a TA) e adicionados de PBS pH 7,4. Quatro camundongos da linhagem BALB/c foram inoculados por via intraperitoneal com 200 µl dessa suspensão (aproximadamente 6×10^7 parasitos). A determinação da parasitemia foi realizada no segundo e terceiro dia após a infecção, através do Método de Brener (BRENER, 1962), onde retira-se 5 µl de sangue da veia caudal sobre lâmina, sendo então coberto com lamínula 22 x 22 mm. Foram contados 50 campos por lamínula. Após a determinação do pico de parasitemia no terceiro dia pós-infecção, os camundongos foram anestesiados com Xilazina 10 a 15 mg/Kg + 100 a 150 mg/Kg Cetamina (Cetamina 10% / Cloridrato de Xilazina 2%) e cerca de 1 ml de sangue foi coletado por meio de punção cardíaca em tubo contendo 100 µl de citrato de sódio 3,8%.

1.1.5 Obtenção de formas tripomastigotas metacíclicas de *T. rangeli* a partir de glândulas salivares de *Rhodnius prolixus*

Cerca de 30 ninfas de 4º e 5º estágios de *R. prolixus* foram infectadas por inoculação intracelômica com formas epimastigotas de cultura da cepa Choachí de *T. rangeli*. Os triatomíneos foram inoculados com cerca de 10 µl de uma suspensão contendo uma concentração aproximada de 1×10^6 parasitos/ml. Esses insetos foram mantidos em condições controladas de temperatura ($27 \pm 2^\circ\text{C}$) e umidade relativa do ar ($60 \pm 10\%$) em estufas B.O.D. e examinados semanalmente para a presença de parasitos na hemolinfa e glândulas salivares. Após as glândulas salivares estarem positivas, os insetos foram sacrificados e tiveram suas glândulas salivares dissecadas, para a obtenção dos tripomastigotas metacíclicos.

1.1.6 Obtenção de formas tripomastigotas de *T. cruzi*

Para a obtenção de formas tripomastigotas de *T. cruzi* foram utilizadas células L929 (fibroblasto de camundongo). As células foram cultivadas em garrafas de 75 cm³ em meio RPMI (Sigma-Aldrich), suplementado com 5 % de SBF a 37 °C com 5 % de CO₂ e atmosfera

umedecida a partir de passagens semanais ou quando atingissem confluência celular. As monocamadas de células foram infectadas com formas tripomastigotas de cultura da cepa Y de *T. cruzi* previamente congeladas e estocadas no criobanco. Após 72 horas de infecção, as formas tripomastigotas de *T. cruzi* foram obtidas do sobrenadante das culturas.

1.1.7 Aspectos éticos e de biossegurança

O soro humano foi obtido por meio de coleta de doadores voluntários no Laboratório de Protozoologia.

Neste trabalho, foram utilizados camundongos Balb/C oriundos do Biotério Setorial do MIP/UFSC. Os procedimentos de obtenção de soro de camundongo e tripomastigotas sanguíneos foram realizados na observância dos preceitos estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação animal – COBEA, tendo sido previamente aprovados pela Comissão de Ética em Uso de Animais da UFSC (CEUA/UFSC) (Processo CEUA: 9923170516).

Os exemplares de *R. prolixus* utilizados foram criados e mantidos no insetário do Laboratório de Protozoologia da UFSC. Os insetos foram alimentados semanalmente em camundongos de acordo com as normas aprovadas pela Comissão de Ética no uso de Animais (CEUA/UFSC) (Processo CEUA: 419507618). A sala do insetário é mantida a temperatura de aproximadamente 26°C, 65% de umidade relativa do ar e ciclo natural de iluminação.

O Laboratório de Protozoologia da UFSC é certificado pela CTNBio como de nível NB2 e segue todos os procedimentos preconizados para a geração e manipulação de organismos geneticamente modificados (OGM) de classe 2.

1.2 Ensaio de mortalidade de *T. cruzi* e *T. rangeli* ao sistema complemento (SC) de mamíferos

Os ensaios foram realizados de acordo com os protocolos preconizados por De Souza e colaboradores (2012) com pequenas adaptações descritas a seguir.

1.2.1 Preparação do soro

Soro fresco de camundongos BALB/c e de seres humanos foram utilizados como fonte de SC. Após a coleta de sangue realizada em tubos sem anticoagulante, os soros obtidos por centrifugação (3.000 x g por 5 minutos a TA) foram divididos em alíquotas de 1 ml. Uma alíquota de cada soro foi aquecida a 56°C durante 30 minutos para a inativação do SC e de

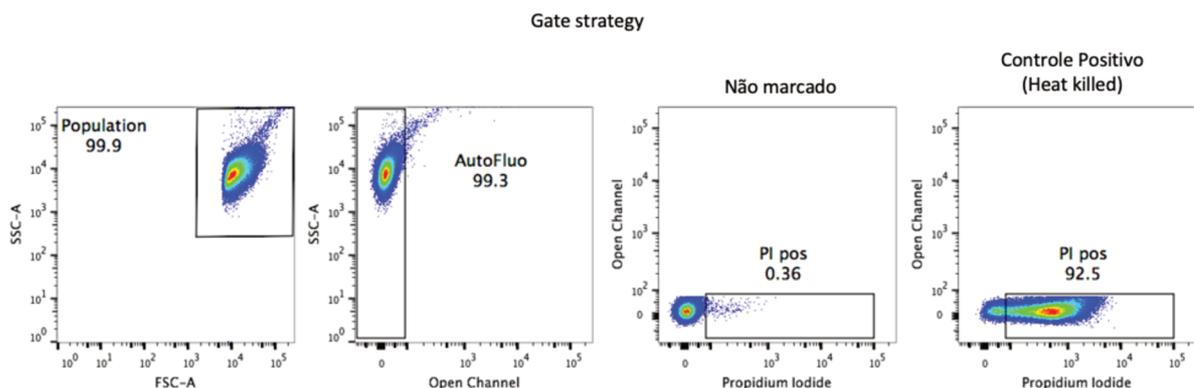
aglutininas naturais, sendo o mesmo utilizado como controle negativo nos experimentos de atividade do SC.

1.2.2 Ensaio de resistência ao Sistema Complemento

Epimastigotas e tripomastigotas de *T. rangeli* e de *T. cruzi* foram quantificados a partir de contagem em câmara de Neubauer, coletados por centrifugação e tiveram sua concentração ajustada para 2×10^6 parasitos /ml com PBS pH 7,4. Foram realizadas três réplicas biológicas com triplicatas técnicas. Os parasitos foram adicionados de 100 μ l de soro normal ou inativado (humano e murino) e mantidos por 30 minutos a 37°C. Então, os parasitos foram lavados 2 vezes com PBS pH 7,4 e adicionados de 200 μ l de PBS pH 7,4 para a análise por citometria de fluxo (BD FACSCanto II, BD Biosciences), utilizando como marcador de morte celular 0,2 μ g de iodeto de propídeo (Sigma-Aldrich) por amostra.

A leitura foi realizada utilizando os canais PerCP-CyTM5.5, além do canal FITC como controle negativo, e em média 20.000 eventos foram adquiridos por amostra. Os resultados foram analisados utilizando o programa *FlowJo* (Tree Star) e os gráficos montados como Dot Plot, no qual é representado a presença de iodeto de Propídeo (ordenada) em função da complexidade (SSC) (abscissa). A figura 7 apresenta a estratégia de gate utilizada nas análises.

Figura 7. Estratégia de Gates para a análise do ensaio de resistência ao SC por citometria de fluxo.



1.3 Ensaio de deposição de C3b

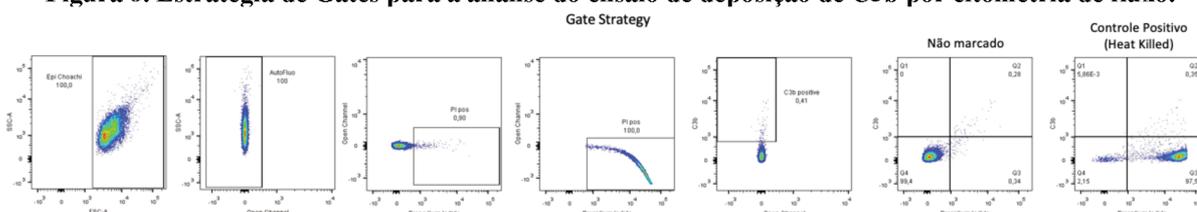
Para os ensaios de deposição de C3b, os parasitos foram obtidos e preparados como descrito no item 1.2.2 e submetidos a citometria de fluxo e *western blot*.

1.3.1 Citometria de Fluxo

As células foram lavadas com PBS pH 7,4 e incubadas com anticorpo anti-C3b humano (Complement Technologies) na diluição de 1:3.000 durante 30 minutos em temperatura ambiente (TA). Os parasitos foram então lavados com PBS pH 7,4 e incubados com anticorpo secundário Alexa Fluor 488 anti-IgG humano na diluição de 1:1.000 durante 30 minutos em TA. Os parasitos foram novamente lavados com PBS pH 7,4 e adicionados de 200 μ l de PBS pH 7,4 para a análise por citometria de fluxo em equipamento FACSCanto II (BD Biosciences) utilizando 0,2 μ g iodeto de propídeo como marcador de morte celular.

A leitura foi realizada utilizando os canais PerCP-Cy™5.5 e FITC, além do PE como controle negativo, e em média 20.000 eventos foram adquiridos por amostra. Os resultados foram analisados utilizando o programa *FlowJo* (Tree Star) e os gráficos montados como *Dot Plots*, no qual é representado a presença de iodeto de Propídeo (ordenada) em função da presença de C3b na membrana (FITC) (abscissa). A figura 8 apresenta a estratégia de gate utilizada nas análises.

Figura 8. Estratégia de Gates para a análise do ensaio de deposição de C3b por citometria de fluxo.



1.3.2 Western blot

Os parasitos foram lavados duas vezes com PBS pH 7,4 e tiveram seus extratos proteicos totais obtidos utilizando-se tampão de lise (50 mM NaCl; 200 mM Tris-HCl pH 8,0; 1% Triton X-100) a 95°C.

Amostras dos parasitos incubados com soros humano e murino, normal e inativado, assim como os soros utilizados para as incubações foram submetidos a ensaios de *western blot* como descrito no item 1.6.

1.3.3 Análises Estatísticas

As análises estatísticas, bem como a confecção dos gráficos foram realizadas no programa Prism 6.0 (GraphPad). Foi utilizado o teste estatístico Análise de Variância (ANOVA) de uma via, seguida do teste de comparação múltipla de Tukey. Valores de p menores que 0,01 foram considerados como estatisticamente significantes.

1.4 Identificação de proteínas associadas com a capacidade de resistência do *Trypanosoma rangeli* ao SC

1.4.1 Co-adsorção

As formas epimastigotas, tripomastigotas diferenciadas *in vitro*, tripomastigotas metacíclicos e tripomastigotas sanguíneos de *T. rangeli* foram lisadas a partir de dois ciclos de congelamento em nitrogênio e descongelamento em banho a 37 °C, sendo os extratos totais acrescidos de coquetel de inibidores de proteases (10 mM E-62; 2 mM 1,10- fenantrolina; 4 mM pepstatina A; 1 mM fenilmetilsulfonilfluoreto) (Sigma-Aldrich). A concentração dos extratos proteicos obtidos foi avaliada em um equipamento Spectramax (Molecular Devices) por meio de microdosagem pelo método de Bradford, utilizando como padrão Albumina de Soro Bovino (BSA) (BRADFORD, 1976). Cerca de 1 mg de cada extrato proteico obtido foi incubado durante 1 hora a TA sob agitação com *beads* magnéticas de streptavidina (Pierce) para remoção de ligações inespecíficas. Após a lavagem com TBS-Tween (150 mM de NaCl; 25 mM Tris-HCl pH 7,4; 0,1% Tween 20), o sobrenadante foi retirado utilizando uma estante magnética e as *beads* foram descartadas. Simultaneamente a remoção das ligações inespecíficas dos extratos proteicos dos parasitos, foi realizada a ligação de 2 µg de Biotina (Sigma-Aldrich) com 10µg da proteína C1q humana (Complement Technologies) ou proteína C3b (Complement Technologies) ou Lectina Ligante de Manose (Sigma-Aldrich) durante 30 minutos a TA, sendo então dialisadas em PBS pH 7,4 durante 16 horas. Após isso, foi adicionado o extrato proteico clarificado dos parasitos, permanecendo a ligação durante 16 horas a 4 °C sob agitação. Após essa etapa novas *beads* foram adicionadas e mantidas durante 1 hora a TA sob agitação. O extrato foi lavado cinco vezes com TBS-Tween. As *beads* foram adicionadas de tampão de eluição (0,5 M Tris-HCl, pH 6,8; 4,4% SDS, 2% β-mercaptoetanol) e então fervidas a 95 °C durante cinco minutos para que ocorresse o desligamento das proteínas das *beads*. O precipitado foi coletado, parte deste precipitado foi analisado em SDS-PAGE 10% e parte foi mantido em solução, sendo as amostras de ambas as abordagens analisadas por espectrometria de massas.

Todos os procedimentos de espectrometria de massas foram realizados em colaboração com o Prof. Dr. Glauber Wagner (MIP/CCB/UFSC) e com o Dr. Hércules Moura no *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC), EUA.

Buscando avaliar se as proteínas detectadas na análise de MS do ensaio de co-adsorção eram transmembranares ou ancoradas na membrana do *T. rangeli*, foi realizada uma busca por peptídeos sinais nas sequências identificadas, utilizando os programas *SignalP*, *Phobius*,

TMHMM V2.0. Também foi buscado detectar a presença de âncora de GPI utilizando o programa *PredGPI* e a presença de proteínas secretadas sem peptídeos sinais utilizando o programa *SecretomeP*.

1.4.2 Ensaios de *Gel-Shift*

Cerca de 100 µg dos extratos proteicos totais de formas epimastigotas e tripomastigotas de *T. rangeli* foram adicionados a 1 µg da proteína C3b ou C1q humanas (Complement Technologies) e mantidos por 16 horas a 4°C. Após este período, as amostras foram resolvidas em duplicata em gel PAGE (5%) não-desnaturante. Uma das réplicas foi transferida para membrana de nitrocelulose *Hybond-ECL* (GE Healthcare) e então submetida a análise por *western blot* utilizando anticorpos anti-C3b ou C1q conforme o descrito no item 1.6. As bandas reveladas pelos anticorpos utilizados foram excisadas da réplica do gel e processadas para análises de espectrometria de massas conforme o descrito no item 1.5.

1.4.3 Análise do Secretoma *in vitro* de *T. rangeli*

Visto que para *T. cruzi*, já é sabido que existe a liberação de proteínas para o meio extracelular que modulam a interação patógeno-hospedeiro, permitindo a sobrevivência destes parasitos, foi realizada uma análise preliminar do secretoma *in vitro* do *T. rangeli*.

Formas epimastigotas e tripomastigotas foram preparadas segundo Bayer-Santos e colaboradores (2013). Para a obtenção do meio condicionado pelos parasitos, formas epimastigotas e tripomastigotas de *T. rangeli* foram coletadas, lavadas três vezes em meio DMEM sem SBF e incubadas no mesmo meio em uma concentração de 1×10^8 parasitos/ml durante 6 horas a 27°C. O pH dos meios contendo os parasitos foi aferido utilizando Tiras Universais de pH (Kasvi). As amostras foram centrifugadas a 3.000 x g durante 10 minutos para retirada dos parasitos, sendo o sobrenadante coletado e desidratado por centrifugação a vácuo (*SpeedVac*, Eppendorf) e mantidos a -20°C, para subsequente digestão trípica e envio para análise por espectrometria de massas (Item 1.5).

Buscando avaliar se as proteínas detectadas no secretoma *in vitro* do *T. rangeli* eram secretadas por meio das vias clássicas, foi realizada uma busca por peptídeos sinais nas sequências identificadas, utilizando os programas *SignalP*, *Phobius*, *TMHMM* V2.0. Também foi buscado detectar a presença de âncora de GPI utilizando o programa *PredGPI* e a presença de proteínas secretadas sem peptídeos sinais utilizando o programa *SecretomeP*.

1.5 Espectrometria de massas

1.5.1 Digestão das proteínas em gel

As proteínas de interesse foram excisadas dos géis, tratadas com solução descorante I (50% metanol / 5% ácido acético) por 15 minutos a 37 °C, em seguida tratadas com a solução descorante II (50% acetonitrila (ACN) em 5 mM de carbonato de amônia NH_4HCO_3) pelo mesmo tempo. Após desidratação com 200 μl de ACN, o excesso de ACN foi removido em centrifugação sob vácuo (*SpeedVac*, Eppendorf) e as proteínas tratadas com 10mM de Diotiotreitol (DTT) para a redução dos grupamentos tiol das cisteínas, seguido da alquilação destes grupos tiol com 50mM de iodoacetamida (IAA). Posteriormente as proteínas foram novamente tratadas com a solução descorante II e desidratadas com ACN. Na sequência, as proteínas foram submetidas a digestão proteolítica em gel com 2 μg tripsina (Promega) durante 16 horas a 37 °C. Os peptídeos foram extraídos do gel com 100 μl de solução descorante II, sendo que o sobrenadante contendo os peptídeos foi transferido para um novo tubo e os géis submetidos a novo tratamento com 50 μl de ACN contendo 10 % de TFA. Após este período, o sobrenadante foi transferido para o tubo contendo o sobrenadante obtido na primeira etapa de extração. Em seguida, a solução contendo os peptídeos foi desidratada por centrifugação a vácuo (*SpeedVac*, Eppendorf) sendo mantidos a -20°C até o momento de utilização, onde os peptídeos foram reconstituídos com 10 μl de 0,1% AF.

1.5.2 Digestão das proteínas em solução

As amostras obtidas na co-adsorção e não resolvidas por eletroforese foram diretamente tratadas com 10mM de DTT para a redução dos grupamentos tiol das cisteínas, seguido da alquilação destes grupos tiol com 50mM de IAA. Na sequência, as proteínas foram submetidas a digestão proteolítica com 2 μg tripsina (Promega) durante 16 horas a 37°C. Em seguida, a solução contendo os peptídeos foi desidratada por centrifugação a vácuo (*SpeedVac*, Eppendorf) sendo mantidos a -20°C até o momento de utilização, onde os peptídeos foram reconstituídos com 10 μl de 0,1% AF.

1.5.3 Análise por LC-ESI-MS/MS

Todo os peptídeos obtidos foram analisados em plataforma LC-ESI-MS/MS, composta por sistema de cromatografia líquida NanoAcquity (Waters) acoplado em linha com

espectrômetro de massas Nanospray LTQ Orbitrap Velos (Thermo Fischer Scientific) no CDC/USA. As análises foram realizadas de acordo com as condições padrão do CDC, descritas por Wagner e colaboradores (2013). Resumidamente, 3 µl de cada digestão foram carregados em uma coluna de fase reversa C18 PepMap™ *Trap* (300 µM × 5 nm) (Waters Corporation) a uma taxa de fluxo de 5000 µl/min. Os peptídeos foram eluídos para uma coluna analítica C18 PepMap™ (75 µm id × 15 cm) (Waters Corporation) utilizando um gradiente de HPLC formado pelo solvente A (água de grau HPLC com 0,1 % de ácido fórmico (AF)) e solvente B (0,1 % de AF em ACN).

1.5.4 Identificação das proteínas

Os dados brutos (raw) de MS/MS oriundos dos espectrômetros de massas LTQ Orbitrap Velos foram processados utilizando o programa MASCOT Distiller® (Matrix Science) e a busca na base de dados do genoma *T. rangeli* (STOCO et al., 2014) foi realizada utilizando o programa MASCOT (Matrix Science). Após estas etapas, o programa *Scaffold* foi utilizado para compilar e validar as proteínas identificadas pelos programas de busca. Foram consideradas proteínas válidas aquelas que apresentaram pelo menos dois peptídeos, com FDR (do inglês, *False Discovery Rate*) menor que 1 % e com probabilidade de acerto dos peptídeos superior a 95 % e 99 % para a proteína (de acordo com o algoritmo *Protein Prophet*). A partir do *Scaffold*, foram geradas planilhas de Excel contendo os dados encontrados.

1.6 Western blot

Após resolução em géis SDS-PAGE ou PAGE, as amostras proteicas obtidas nos diferentes experimentos foram transferidas para membranas de nitrocelulose *Hybond-ECL* (GE Healthcare) durante três horas a 100 V em tampão de transferência (25 mM Tris, 192 mM Glicina, 20% (v/v) Metanol), conforme descrito por Towbin e colaboradores (1979). Posteriormente, as membranas foram bloqueadas em tampão para *blotting* (TB) (150 mM de NaCl; 25 mM Tris-HCl pH 7,4; 1 % Tween 20) acrescido com 5% leite desnatado. Após cinco lavagens de cinco minutos cada com TB as membranas foram incubadas durante 90 minutos com os anticorpos anti-C3b humano (1:64.000) (Complement Technologies), anti-C1q humano (1:32.000) (Complement Technologies), anti-Fator B humano (1:4.000) (Complement Technologies), anti-Fator H humano (1:16.000) (Complement Technologies) ou anti-Fator P humano (1:1.000) (Complement Technologies). Após lavagens as membranas foram adicionadas do anticorpo secundário anti-IgG humano conjugado à peroxidase (Sigma-Aldrich)

na diluição de 1:5.000, permanecendo sob agitação durante 1 hora a TA. As membranas foram novamente submetidas a lavagens em TB e em seguida, a detecção foi realizada através da adição do reagente ECL (Pierce) seguido de exposição a um filme radiográfico para a detecção de quimiluminescência, sendo o filme revelado em um processador de filmes SRX-101A (Konica Minolta Medical & Graphic).

2 RESULTADOS

2.1 Ensaio de mortalidade do *Trypanosoma rangeli* ao Sistema Complemento de mamíferos

A avaliação comparativa da capacidade de resistência das diferentes formas do *T. rangeli* e do *T. cruzi* ao SC de mamíferos foi realizada por ensaios de citometria de fluxo nos quais foi avaliada a viabilidade celular destes parasitos após a exposição a soro fresco e inativado de seres humanos e de camundongos BABL/c. Os resultados da citometria estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Taxa de mortalidade das formas epimastigotas e tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* e *Trypanosoma rangeli* ao Sistema Complemento de mamíferos. Resultados normalizados a partir dos valores encontrados para o controle com PBS. NO – Não observado.

		Soro Humano (HS)	Soro Humano Inativado (HIHS)	Soro de Camundongo (MS)	Soro de Camundongo Inativado (HIMS)
<i>T. cruzi</i>	Epimastigota	77% (± 8.73)	2% (± 6.92)	18% (± 9.7)	NO
	Tripomastigota	NO	NO	NO	NO
<i>T. rangeli</i>	Epimastigota	NO	NO	NO	NO
	Tripomastigota sanguíneo	NO	NO	NO	NO
	Tripomastigota <i>in vitro</i>	NO	NO	NO	NO
	Tripomastigota metacíclico	NO	NO	3.82% (± 5.2)	4.15% (± 5.26)

Os resultados obtidos para *T. cruzi* demonstram que as formas epimastigotas são sensíveis à lise pelo SC, uma vez que quando expostas a soro fresco humano e de camundongo as taxas de viabilidade são próximas a 20%, enquanto quando expostas ao soro inativado essa sensibilidade não é observada. Os tripomastigotas não são sensíveis à ação do SC, apresentando os mesmos valores de viabilidade tanto para as amostras expostas a soro fresco ou inativado de humano e camundongo.

Para *T. rangeli*, as formas epimastigotas não apresentaram sensibilidade ao soro fresco e inativado de humano e camundongo, corroborando dados de Souza e colaboradores (2012).

Os tripomastigotas sanguíneos e obtidos *in vitro* também não apresentaram sensibilidade. Já os tripomastigotas metacíclicos apresentaram uma baixa sensibilidade ao soro de camundongos, dados que corroboram os achados de De Lima Ferreira e colaboradores (2015).

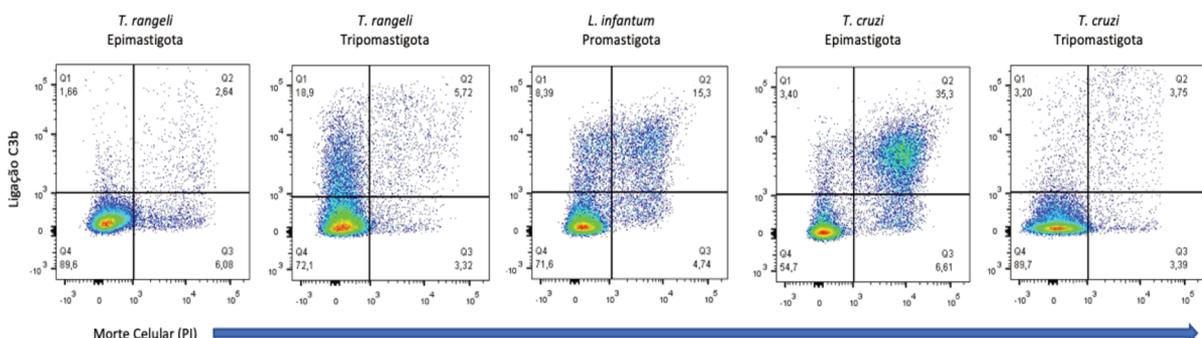
2.2 Ensaio de deposição de C3b na membrana do *Trypanosoma rangeli*

Foram realizados ensaios para analisar o comportamento destes parasitos frente aos mecanismos da VA do SC. A ligação de C3b na membrana dos parasitos foi verificada utilizando ensaios de citometria de fluxo, nos quais os parasitos foram incubados com soro humano fresco ou inativado e um anticorpo anti-C3b humano (Tabela 2 e Figura 9).

Tabela 2. Taxas de deposição de C3b e mortalidade em *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania infantum* e *Trypanosoma rangeli* expostos a soro humano fresco. Resultados normalizados a partir dos valores encontrados para o controle com PBS. NO – Não observado.

		Deposição de C3b	Morte celular
<i>T. cruzi</i>	Epimastigota	28% ($\pm 7,66$)	33% ($\pm 2,85$)
	Tripomastigota	3,75% ($\pm 1,53$)	NO
<i>L. infantum</i>	Promastigota	20,35% ($\pm 4,35$)	12,52% ($\pm 3,76$)
<i>T. rangeli</i>	Epimastigota	2,65% ($\pm 0,94$)	NO
	Tripomastigota	19,8% ($\pm 1,53$)	NO

Figura 9. *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania infantum* e *Trypanosoma rangeli* apresentam diferentes padrões de deposição de C3b. Dot plots demonstrando a ligação do anticorpo anti-C3b humano na membrana e incorporação de iodeto de propídeo para avaliação de viabilidade celular em formas epimastigotas e tripomastigotas de *T. cruzi* e *T. rangeli* e promastigotas de *L. infantum* após incubação com soro humano fresco.



Os resultados dos ensaios de citometria indicam que a ligação de C3b ocorre somente em um baixo percentual (3,75%) das formas tripomastigotas de *T. cruzi* que contrasta com o

percentual de ligação (20,35%) observado para as formas promastigotas de *L. infantum*, não sendo observadas diferenças significativas nas taxas de morte celular para ambas as espécies. Para os epimastigotas de *T. cruzi* foi observado um percentual de células ligantes a C3b de 28% assim como uma taxa de mortalidade de 33%, provavelmente pela VA do SC, uma vez que o percentual de ligação de C3b e mortalidade são similares. Para *T. rangeli*, o percentual de células ligantes a C3b foi de 2,65% para as formas epimastigotas, similar ao observado para formas tripomastigotas de *T. cruzi*, e de 19,8% para as formas tripomastigotas, revelando um padrão de ligação de C3b mais próximo ao de *L. infantum*.

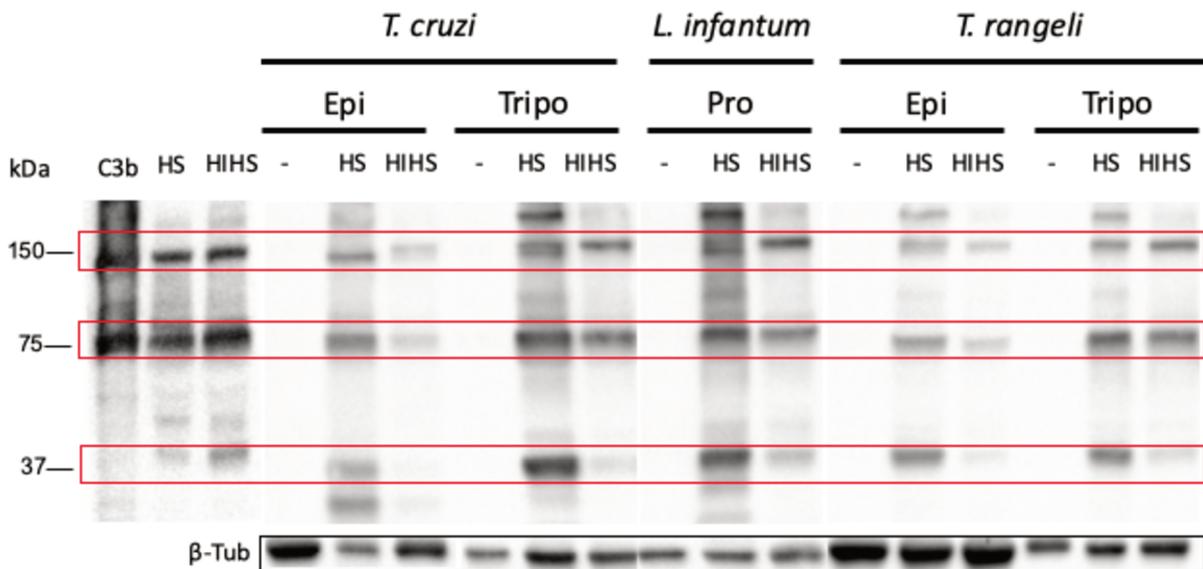
Uma vez que na infecção por *Leishmania* spp. a clivagem de C3b do SC do hospedeiro promovida pelo parasito impede a ação da VA, avaliamos a capacidade do *T. rangeli* em clivar esta molécula. Para tanto, realizamos ensaios de *western blot* utilizando extratos totais de diferentes formas dos parasitos incubados com soro humano fresco e inativado sendo então marcados com um anticorpo anti-C3b humano.

Em extratos de *L. infantum* é possível observar que nos parasitos incubados com soro humano fresco ocorre o reconhecimento de três bandas, uma com ± 146 kDa, referente a cadeia maior do C3b, uma de ± 75 kDa, referente a cadeia menor do C3b e uma banda menor de ± 37 kDa, demonstrando uma possível degradação da cadeia maior do C3b (± 146 kDa). Quando incubado com soro inativado, apenas as bandas de ± 146 kDa e ± 75 kDa são identificadas, isso pode ocorrer pois o C3b não se encontra ativo, não havendo necessidade de degradação pelos parasitos, além do fato das bandas correspondentes a C3b serem menos intensas do que as que aparecem quando os parasitos são incubados com soro fresco. Para os extratos proteicos das formas tripomastigotas de *T. cruzi*, formas resistentes à ação do SC, resultados similares aos de *L. infantum* foram observados.

Para as formas epimastigotas de *T. cruzi*, sensíveis ao SC, além das bandas de ± 146 kDa e ± 75 kDa, foram encontradas as duas bandas de menor massa molecular. Uma referente a cadeia menor ± 37 kDa e uma de ± 30 kDa, que foi encontrada proeminente apenas nestes parasitos, sugerindo haver uma relação com a susceptibilidade dos epimastigotas de *T. cruzi* à VA.

O *T. rangeli* revelou um padrão de ligação por C3b similar ao observado para *T. cruzi* e para *L. infantum*. O anticorpo anti-C3b reconheceu as bandas correspondentes a C3b nos extratos proteicos das formas epimastigotas e tripomastigotas de *T. rangeli* incubadas com soro fresco, assim como o observado para os demais parasitos (Figura 10).

Figura 10. Análise da presença e perfil de ligação de C3b na membrana de *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania infantum* e *Trypanosoma rangeli*. Western blot utilizando o anticorpo anti-C3b humano em extratos totais de epimastigotas e tripomastigotas de *T. cruzi* e *T. rangeli* e promastigotas de *L. infantum* e amostras de soro fresco e inativado antes da incubação dos parasitos e proteína C3b purificada. C3b: Proteína C3b purificada; -: Não tratado; HS: Soro humano fresco; HIHS: Soro humano inativado.

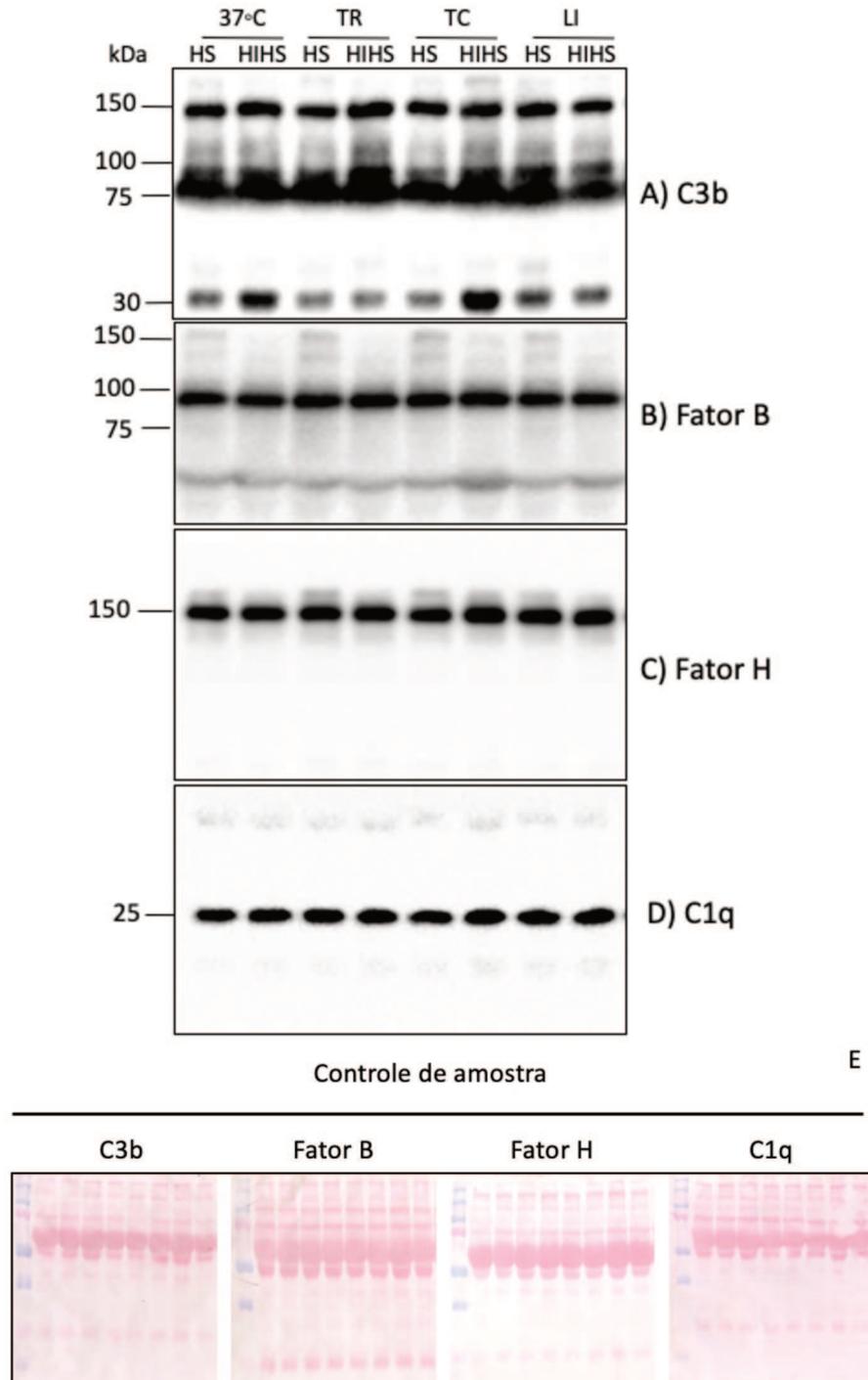


2.3 Avaliação da capacidade de alterar, clivar ou degradar componentes do SC do *T. rangeli*, *T. cruzi* e *L. infantum*

Com o objetivo de avaliar se o *T. rangeli*, o *T. cruzi* ou a *L. infantum* são capazes de ativamente alterar, clivar ou degradar os componentes iniciais ou de controle da VC ou VA, alíquotas de soro humano fresco e inativado foram incubadas com os parasitos. Após remoção dos parasitos, os soros foram avaliados por *western blot*, buscando diferentes padrões de clivagem para as proteínas C3b, C1q, Fator B e Fator H do SC humano.

Como é possível observar na figura 11, apesar de todas as amostras possuírem apenas as bandas esperadas (C3b: 150, 75 e 30 kDa; Fator B: 93 kDa; Fator H: 150 kDa; C1q: 25 kDa) não houve alteração nos soros analisados em relação ao controle que foi mantido na ausência de parasitos a 37°C, demonstrando desta forma estes parasitos, apesar degradar ou clivar ativamente as proteínas do SC do soro humano, não alteram a concentração total destas proteínas no soro.

Figura 11. *Trypanosoma rangeli*, *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania infantum* não são capazes de degradar as proteínas C3b, Fator B, Fator H e C1q presentes no soro humano fresco. *Western blot* revelando proteínas do sistema complemento presentes no soro humano fresco e inativado exposto a tripomastigotas de *T. rangeli* e *T. cruzi* e promastigotas de *L. infantum*. A) *Western blot* utilizando antissoro anti-C3 humano; B) anti-Fator B humano; C) anti-Fator H humano; D) anti-C1q humano; E) Controle de concentração das amostras. TR – *T. rangeli*; TC – *T. cruzi*; LI – *L. infantum*; HS – Soro humano normal; HIHS – Soro humano inativado.

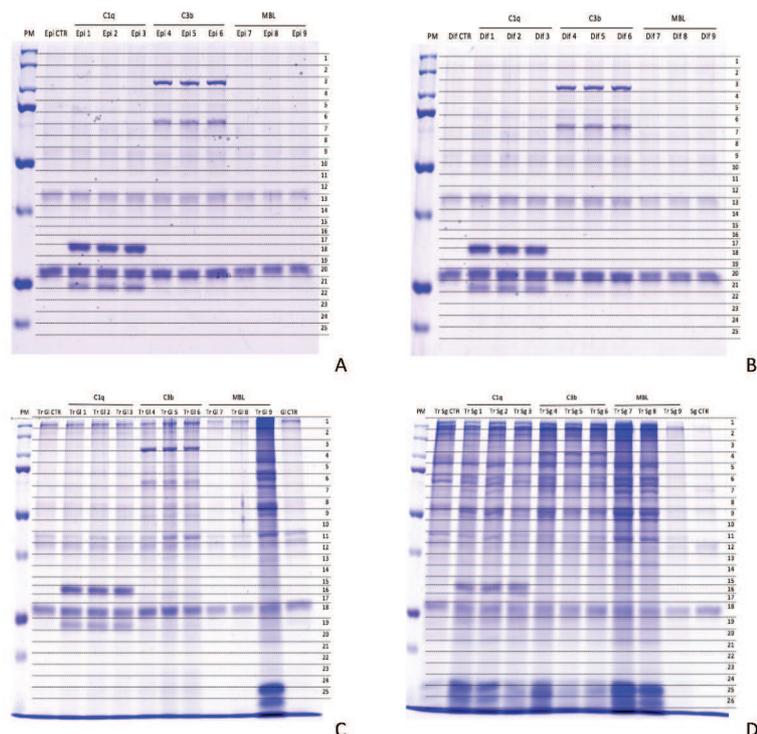


2.4 Identificação de proteínas associadas com a capacidade de sobrevivência do parasito ao Sistema Complemento

2.4.1 Co-Adsorção

Com base na observação da resistência do *T. rangeli* ao SC humano e murino em nossos ensaios, realizamos um novo ensaio visando a identificação proteômica de possíveis proteínas relacionadas a esta resistência. Para tanto, utilizamos extratos proteicos totais de formas epimastigotas, tripomastigotas diferenciados *in vitro*, tripomastigotas metacíclicos e tripomastigotas sanguíneos de *T. rangeli* em ensaios de co-adsorção utilizando *beads* ligadas às proteínas iniciais das vias do SC: C1q, C3b e MBL. Uma réplica biológica de cada ensaio de co-adsorção foi resolvida em SDS-PAGE 10% e 25 faixas distintas de massa molecular foram excisadas para cada amostra e analisadas independentemente por espectrometria de massas (Figura 12).

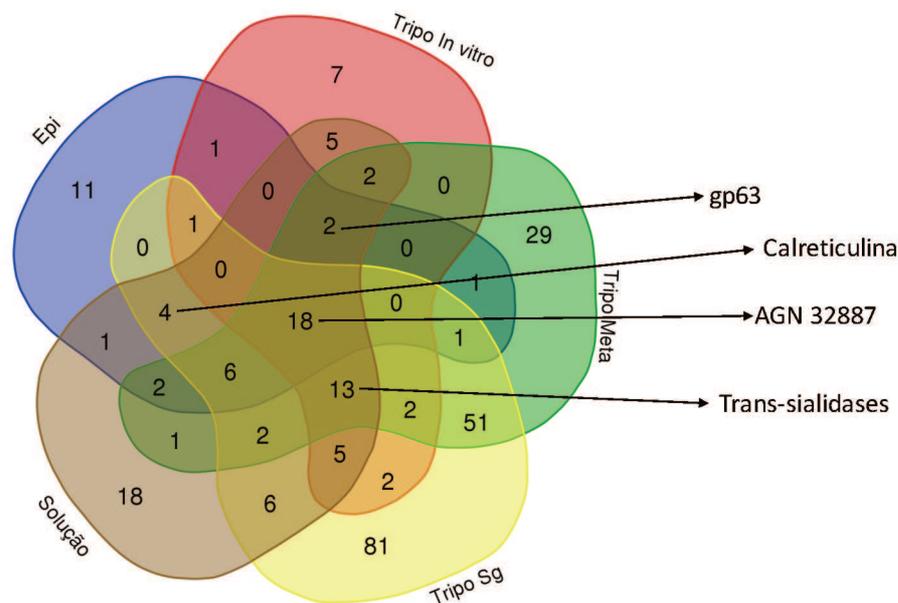
Figura 12. Análise dos extratos proteicos das diferentes formas do *Trypanosoma rangeli* submetidas ao ensaio de co-adsorção demonstrando um diferente padrão de bandas utilizando as proteínas C1q, C3b e MBL do sistema complemento humano como isca. A) Epimastigotas; B) Tripomastigotas diferenciados *in vitro*; C) Tripomastigotas metacíclicos; C) Tripomastigotas sanguíneos. As linhas em destaque representam os fragmentos de gel contendo as proteínas (25) analisadas por espectrometria de massas. Aliquotas de 50 µg de proteínas foram resolvidas em SDS-PAGE 10 % e o gel corado com Azul de Coomassie R-250. PM: Padrão de Tamanho Molecular (Precision plus Protein Standards, BIORAD); C1q: amostras obtidas através da utilização da proteína C1q como isca; C3b: amostras obtidas através da utilização da proteína C3b como isca; MBL: amostras obtidas através da utilização da proteína MBL como isca.



Análises por espectrometria de massas foram realizadas das bandas excisadas dos géis e das mesmas amostras da co-adsorção sem uso de gel. As amostras que foram analisadas pela abordagem sem uso de gel foram analisadas como um todo no programa MASCOT, impossibilitando a separação dos resultados por forma evolutiva do parasito. Utilizando-se o banco de dados genômicos do *T. rangeli*, constituído pela publicação original de Stoco et al. (2014) e de novos sequenciamentos utilizando-se a plataforma PacBio, um total de 273 proteínas foram identificadas, dentre as quais, 85 proteínas foram provenientes da abordagem em solução e 255 da abordagem em gel (Figura 13).

As sequências aminoacídicas obtidas por MS/MS foram então analisadas *in silico* para a presença de peptídeo sinal de endereçamento à membrana, localização celular, presença de domínios trans-membranares, envolvimento em rotas celulares e presença de âncora de GPI. Para a abordagem em gel foram identificadas 31 proteínas com peptídeo sinal (12,16%), 59 não citoplasmáticas (23,14%) e seis com âncora de GPI (2,35%). Para a abordagem em solução foram identificadas 11 proteínas com peptídeo sinal (12,94%), 25 não citoplasmáticas (29,41%), duas com âncora de GPI (2,35%). Dentre as proteínas relacionadas ao SC encontradas encontram-se: a Calreticulina (CRT), trans-sialidases do grupo II e grupo III, gp63, calmodulina e diversas proteínas hipotéticas listadas no apêndice (Apêndices A - E).

Figura 13. Diagrama de Venn apontando o número de proteínas de diferentes formas de *Trypanosoma rangeli* identificadas por meio das diferentes abordagens de espectrometria de massas. Solução: análise da abordagem sem uso de eletroforese SDS-PAGE; Epi: análise da abordagem com uso de eletroforese SDS-PAGE das formas epimastigotas de cultura; Tripo *In vitro*: Formas tripomastigotas diferenciadas *in vitro*. Tripo Meta: Formas tripomastigotas metacíclicas; Tripo Sg: Formas tripomastigotas sanguíneas.

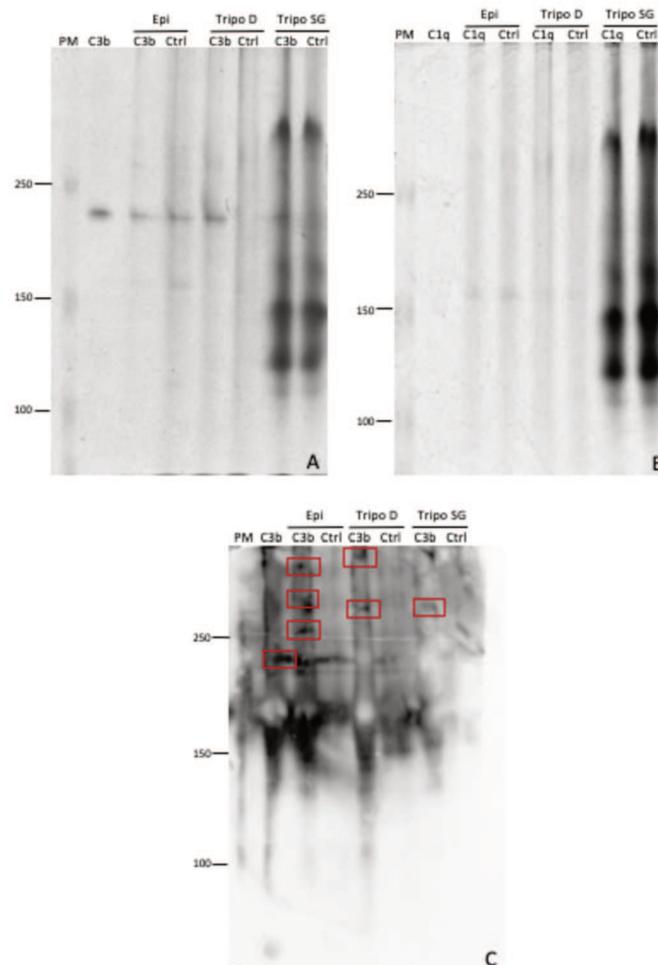


2.4.2 Ensaios de *Gel-Shift*

Buscando confirmar a interação das proteínas detectadas nas análises proteômicas, utilizamos uma abordagem de co-adsorção seguida de ensaios de ligação das proteínas selecionadas à componentes do SC.

Como é possível observar nas Figuras 14A e B, apenas as amostras que foram co-adsorvidas com a proteína C3b foram passíveis de separação eletroforética em géis de SDS-PAGE. Ao analisarmos as cargas das proteínas do SC utilizadas nestes ensaios de co-adsorção, observamos que a proteína C3b possui carga negativa e migra naturalmente em géis não denaturantes. Entretanto, a proteína C1q, que possui carga positiva mesmo estando ligada a alguma outra proteína do parasito, não foi passível de separação eletroforética em géis não-denaturantes.

Figura 14. Diferentes padrões de bandas são encontrados para as amostras de epimastigotas e tripomastigotas de *Trypanosoma rangeli* incubadas com a proteína C3b. A) Gel de poliacrilamida de extratos proteicos obtidos a partir de parasitos vivos incubados com a proteína C3b; B) Gel de poliacrilamida de extratos proteicos obtidos a partir de parasitos vivos incubados com a proteína C1q; C) *western blot* utilizando antissoro anti-C3 humano, quadros em vermelho demonstrando bandas excisadas para espectrometria de massas.



As bandas correspondentes às proteínas co-adsorvidas com a proteína C3b reveladas nos ensaios de *western blot* (Figura 14C) foram excisadas e analisadas por espectrometria de massas. Os resultados das análises de MS/MS não se mostraram consistentes com as demais análises realizadas neste trabalho, tendo sido identificadas apenas proteínas que não possuem função relacionada ou predita a aspectos de interação parasito-hospedeiro, em especial, com componentes do sistema complemento (Apêndice F).

2.4.3 Análise do Secretoma *in vitro* de *T. rangeli*

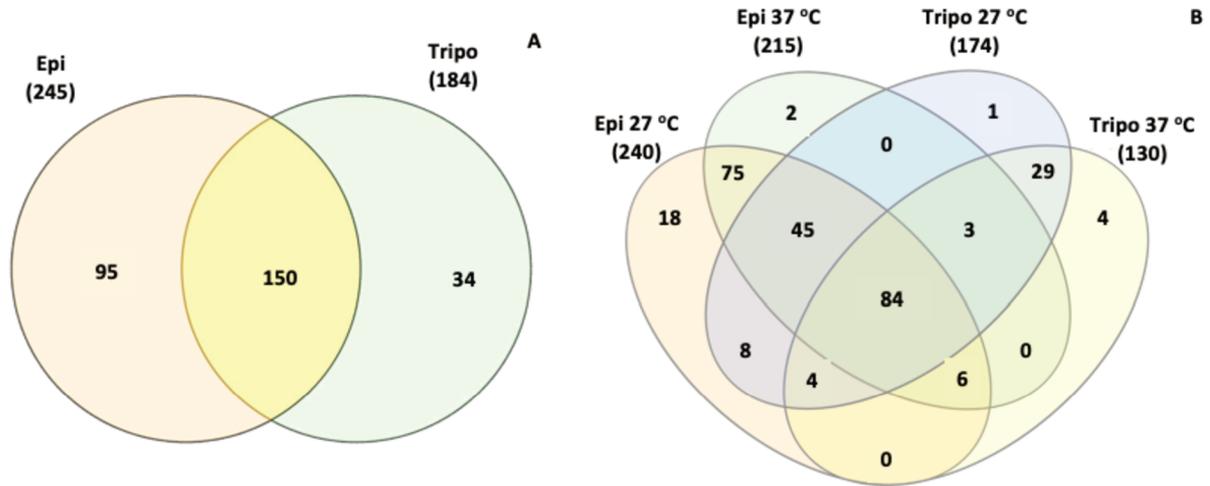
Uma vez que grande parte das proteínas de *T. cruzi* e de *T. brucei* envolvidas na resistência destes parasitos ao sistema imune de mamíferos é secretada pelos mesmos, investimos em uma análise do secretoma de formas epimastigotas e formas tripomastigotas diferenciadas *in vitro* de *T. rangeli*.

Durante as seis horas que os parasitos foram mantidos em meio DMEM sem SBF pH 7,4, foi possível detectar uma alteração de pH no meio. Enquanto o meio com as formas epimastigotas acidificou para um pH $\pm 6,5$, o meio com as formas tripomastigotas diferenciada *in vitro* basificou para um pH $\pm 8,0$, mesmo pH utilizado no meio de diferenciação. Essas alterações de pH ocorreram mesmo depois dos parasitos terem sido lavados com o próprio meio DMEM antes do período de incubação para a obtenção do meio condicionado.

Utilizando a metodologia proposta, foram identificadas 245 proteínas excretadas/secretadas por formas epimastigotas e 184 por formas tripomastigotas diferenciadas *in vitro*. Do total de 279 proteínas identificadas, 34,05% foram identificadas somente em formas epimastigotas, 12,18% em formas tripomastigotas diferenciados *in vitro* e 53,76% em ambas formas analisadas (Figura 15A).

Considerando que as formas epimastigotas e tripomastigotas do parasito são encontradas em triatomíneos vetores e hospedeiros mamíferos, respectivamente, avaliamos a influência da temperatura na composição do secretoma de ambas as formas do *T. rangeli*. A avaliação do número de proteínas excretadas/secretadas pelas duas formas do parasito cultivadas a 27,0°C e a 37,0°C revelou que 84 proteínas são secretadas por ambas as formas nas duas temperaturas. Sendo que epimastigotas secretam 95 (38,78%) proteínas que não são presentes em tripomastigotas, e tripomastigotas secretam 34 (18,48%) proteínas não presentes em epimastigotas (Figura 15B).

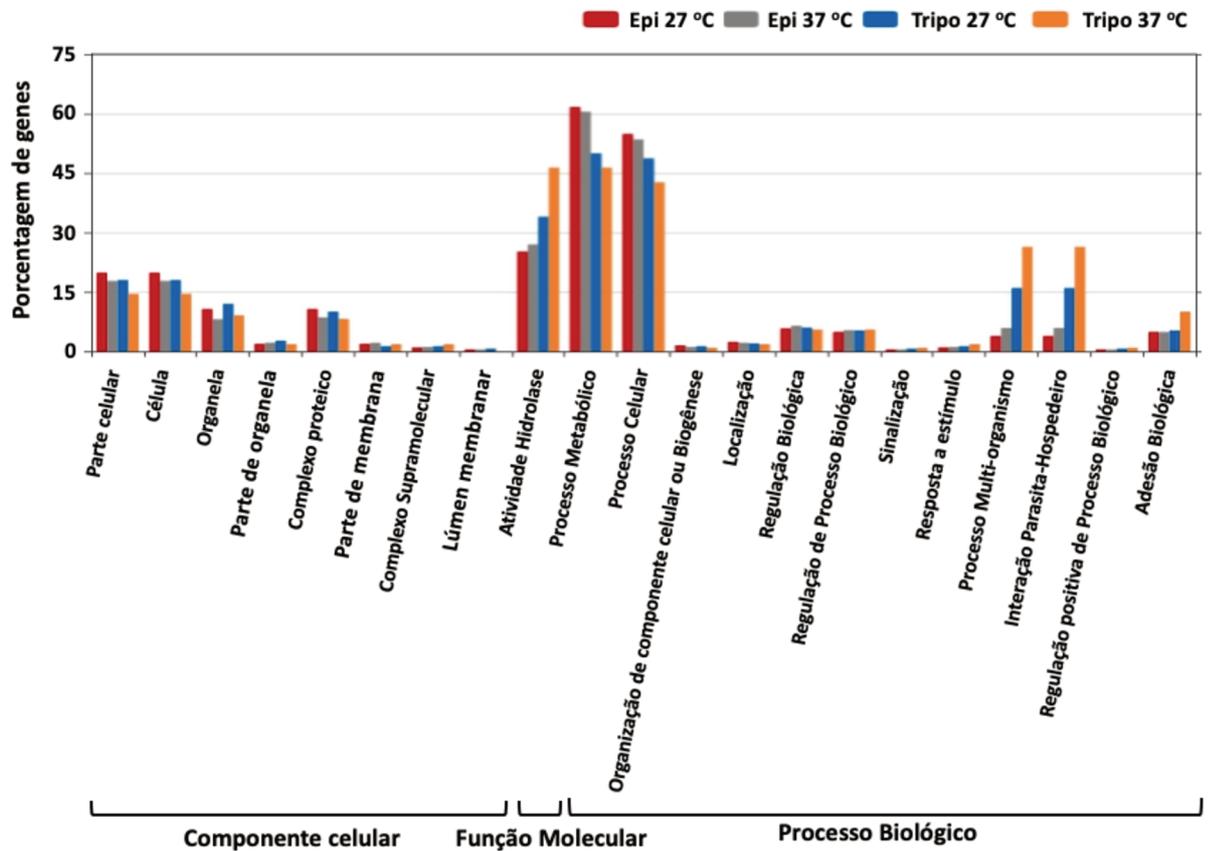
Figura 15. Diagrama de Venn demonstrando proteínas identificadas no secretoma das diferentes formas de *Trypanosoma rangeli* por espectrometria de massas. (A) Número de proteínas identificadas nas formas epimastigota, tripomastigota e em ambas as formas e (B) número de proteínas distintas detectadas nas diferentes formas de *T. rangeli* cultivadas em diferentes temperaturas.



Análises usando Gene Ontology permitiram a classificação dessas proteínas em 21 funções biológicas diferentes (Figura 16), dentre as quais a categoria “Interação parasito-hospedeiro” revelou inúmeras diferenças entre epi e tripomastigotas. Dentro desta categoria, 41% das proteínas foram secretadas pelas duas formas, mas 59% foram secretadas exclusivamente por tripomastigotas (Figura 17A), incluindo fatores de virulência como gp63, proteína reguladora do complemento e diferentes trans-sialidases (Tabela 2).

Esses resultados corroboram os dados encontrados por Bayer-Santos e colaboradores (2013), que demonstraram que formas tripomastigotas de *T. cruzi* também secretam fatores de virulência que não são secretados por epimastigotas. Permitindo assim a inferência de que os tripomastigotas de *T. rangeli* secretam um maior número de proteínas relacionadas a interação parasito-hospedeiro para sua adaptação ao hospedeiro mamífero.

Figura 16. Categorização das proteínas secretadas pelo *Trypanosoma rangeli* de acordo com o Gene Ontology.



Vale ressaltar que na categoria "Metabolismo de Carboidratos" não foram detectadas proteínas específicas para tripomastigotas. No entanto, 39% das proteínas dessa categoria parecem ser secretadas exclusivamente por epimastigotas e podem estar relacionadas ao desenvolvimento do parasito no inseto (Figura 17B).

Figura 17. As formas de tripomastigotas do *Trypanosoma rangeli* secretam mais proteínas relacionadas à interação parasito-hospedeiro, enquanto as epimastigotas secretam mais proteínas relacionadas ao metabolismo de carboidratos. A) Porcentagens de proteínas identificadas por MS secretadas por *T. rangeli* categorizadas como interação hospedeiro-parasito; B) Porcentagens de proteínas identificadas por MS secretadas por *T. rangeli* categorizadas como metabolismo de carboidratos.

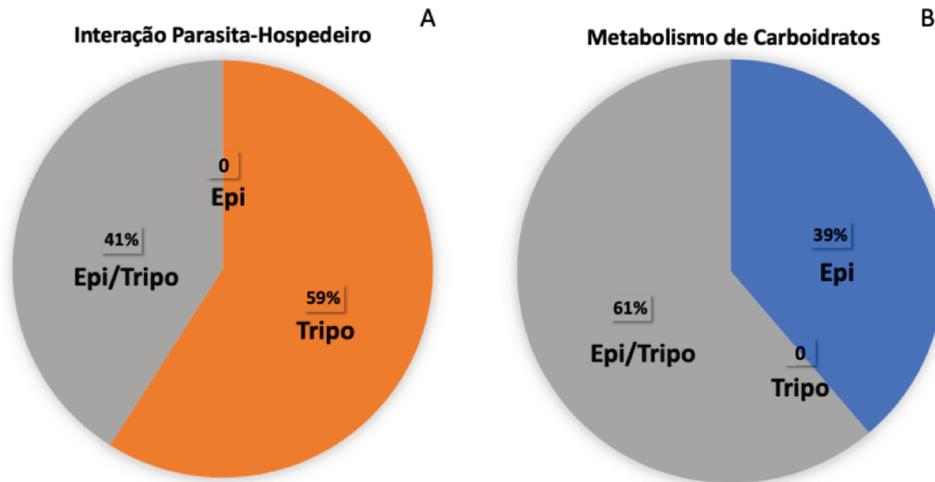


Tabela 3. Proteínas identificadas na análise do secretoma de *Trypanosoma rangeli* relacionadas à interação parasita-hospedeiro.

Proteína	Nº de Acesso	MW	Epimastigotas		Tripomastigotas	
			27 °C	37°C	27°C	37°C
Calreticulin	g9153.t1	46 kDa	X	X	X	X
Complement regulatory protein	g834.t1	92 kDa	-	-	X	X
Complement regulatory protein	g7907.t1	112 kDa	-	X	X	X
Complement regulatory protein	g5607.t1	98 kDa	-	-	X	X
Complement regulatory protein	g9391.t1	105 kDa	-	X	X	X
Complement regulatory protein, putative	g6423.t1	87 kDa	X	X	X	X
Cyclophilin A	g4329.t1	19 kDa	X	X	X	X
Cyclophilin	g6895.t1	21 kDa	X	X	X	X
Leishmanolysin	g9158.t1	63 kDa	-	-	X	X
Leishmanolysin	g6853.t1	29 kDa	-	-	X	X
Mucin-associated surface protein (MASP)	g1312.t1	36 kDa	-	-	X	X
Putative calmodulin	g5314.t1	17 kDa	X	X	X	X
Surface protease GP63	g2634.t1	31 kDa	X	-	X	X
Surface protease GP63	g623.t1	61 kDa	X	X	X	X
Surface protease GP63	g4086.t1	79 kDa	X	X	X	-
Surface protease GP63	g4088.t1	64 kDa	-	X	X	X
Surface protease GP63	g9938.t1	49 kDa	X	X	X	X
Surface protease GP63	g6852.t1	21 kDa	X	X	-	X
Surface protease GP63	g6851.t1	64 kDa	-	X	X	X
Surface protease GP63	g9222.t1	77 kDa	X	-	X	X
Surface protease GP63	g1202.t1	64 kDa	-	-	X	X

Surface protease GP63	g614.t1	62 kDa	X	X	X	X
Surface protease GP63	g4036.t1	52 kDa	X	X	X	X
Surface protease GP63	g4023.t1	75 kDa	X	X	X	X
Surface protease GP63	g7112.t1	68 kDa	X	X	X	X
Surface protease GP63	g4090.t1	69 kDa	X	X	-	X
Surface protease GP63	g7148.t1	22 kDa	-	X	-	X
Surface protease GP63	g4033.t1	65 kDa	X	X	X	X
Surface protease GP63	g1198.t1	77 kDa	X	-	-	-
Surface protease GP63	g7041.t1	74 kDa	X	-	-	9
Surface protease GP63, putative	g3466.t1	65 kDa	-	-	X	X
Surface protease GP63, putative	g9217.t1	93 kDa	X	X	X	X
Surface protease GP63, putative	g5309.t1	88 kDa	-	-	X	X
Surface protease GP63, putative	g7177.t1	62 kDa	X	X	-	-
Surface protease GP63, putative	g7366.t1	90 kDa	-	-	X	X
Surface protease GP63, putative	g9519.t1	88 kDa	X	X	X	X
Surface protease GP63, putative	g9451.t1	62 kDa	X	X	X	X
Surface protease GP63, putative	g835.t1	88 kDa	X	-	X	X
Surface protease GP63, putative	g9614.t1	62 kDa	X	X	X	X
Surface protease GP63, putative	g8388.t1	67 kDa	X	-	X	X
Surface protease GP63, putative	g9894.t1	59 kDa	X	-	-	X
Surface protease GP63, putative	g4276.t1	74 kDa	X	X	X	X
Surface protease GP63, putative	g3469.t1	60 kDa	-	-	X	X
Surface protease GP63, putative	g9842.t1	36 kDa	-	-	X	X
Surface protease GP63, putative	g1159.t1	69 kDa	-	-	X	X
Surface protease GP63, putative	g4273.t1	73 kDa	X	X	X	X
Trans-sialidase (pseudogene), putative	g9893.t1	92 kDa	X	X	X	X
Trans-sialidase	g1108.t1	47 kDa	X	X	X	X
Trans-sialidase	g6134.t1	93 kDa	X	X	X	X
Trans-sialidase	g6159.t1	57 kDa	-	X	X	X
Trans-sialidase	g8755.t1	78 kDa	-	-	X	X
Trans-sialidase	g7847.t1	92 kDa	X	-	X	X
Trans-sialidase	g6435.t1	71 kDa	-	-	X	X
Trans-sialidase	g7285.t1	60 kDa	-	-	X	X
Trans-sialidase	g8333.t1	89 kDa	-	X	X	X
Trans-sialidase	g7841.t1	94 kDa	-	-	X	X
Trans-sialidase	g4592.t1	94 kDa	X	X	X	X
Trans-sialidase	g837.t1	81 kDa	X	X	X	X
Trans-sialidase	g5548.t1	76 kDa	X	X	X	X
Trans-sialidase	g7910.t1	96 kDa	-	-	X	X
Trans-sialidase	g364.t1	239 kDa	-	-	X	X
Trans-sialidase	g9329.t1	100 kDa	X	X	X	X
Trans-sialidase	g8395.t1	51 kDa	X	-	X	X

Trans-sialidase	g707.t1	117 kDa	X	X	-	X
Trans-sialidase	g8366.t1	79 kDa	X	X	-	X
Trans-sialidase	g7854.t1	110 kDa	X	X	X	X
Trans-sialidase	g2975.t1	61 kDa	X	X	-	-
Trans-sialidase	g7829.t1	72 kDa	X	X	X	X
Trans-sialidase	g9545.t1	72 kDa	X	X	-	-
Trans-sialidase	g109.t1	32 kDa	-	-	X	X
Trans-sialidase	g7833.t1	93 kDa	-	-	X	X
Trans-sialidase	g7845.t1	72 kDa	-	-	X	X
Trans-sialidase	g9406.t1	82 kDa	-	-	X	X
Trans-sialidase	g831.t1	72 kDa	-	-	X	X
Trans-sialidase	g9896.t1	56 kDa	-	X	X	X
Trans-sialidase	g7843.t1	107 kDa	-	-	X	X
Trans-sialidase	g7071.t1	72 kDa	X	X	-	X
Trans-sialidase	g9274.t1	82 kDa	-	-	X	X
Trans-sialidase	g9523.t1	48 kDa	-	-	X	X
Trans-sialidase	g5549.t1	57 kDa	X	X	-	X
Trans-sialidase	g7362.t1	58 kDa	-	-	X	X
Trans-sialidase	g824.t1	60 kDa	X	X	X	X
Trans-sialidase	g4955.t1	79 kDa	-	-	X	X
Trans-sialidase	g9214.t1	68 kDa	-	-	X	X
Trans-sialidase	g6543.t1	78 kDa	-	-	X	X
Trans-sialidase	g7856.t1	48 kDa	-	-	X	X
Trans-sialidase	g7901.t1	83 kDa	-	-	X	X
Trans-sialidase	g9240.t1	94 kDa	-	-	X	X
Trans-sialidase	g6141.t1	73 kDa	X	X	X	X
Trans-sialidase	g8288.t1	100 kDa	X	X	-	-
Trans-sialidase	g7208.t1	75 kDa	-	X	-	-
Trans-sialidase	g9994.t1	31 kDa	-	-	-	X
Trans-sialidase	g9488.t1	76 kDa	-	X	-	X
Trans-sialidase	g7832.t1	52 kDa	-	-	-	X
trans-sialidase	g9485.t1	82 kDa	-	X	-	X
Trans-sialidase	g6138.t1	97 kDa	-	-	-	X
Trans-sialidase, Group I, putative	g4621.t1	76 kDa	-	-	X	X
Trans-sialidase, Group I, putative	g7379.t1	41 kDa	-	-	X	X
Trans-sialidase, Group I, putative	g8576.t1	87 kDa	-	-	X	X
Trans-sialidase, Group I, putative	g7367.t1	80 kDa	-	-	X	X
Trans-sialidase, Group I, putative	g9679.t1	87 kDa	-	-	X	X
Trans-sialidase, Group I, putative	g7906.t1	82 kDa	-	-	X	X
Trans-sialidase, Group I, putative	g8392.t1	75 kDa	-	-	X	X
Trans-sialidase, Group II, putative	g6903.t1	70 kDa	X	X	X	X
Trans-sialidase, Group II, putative	g5702.t1	74 kDa	X	X	X	X

Trans-sialidase, Group II, putative	g7836.t1	79 kDa	X	X	X	X
Trans-sialidase, Group II, putative	g8944.t1	136 kDa	X	X	-	-
Trans-sialidase, Group II, putative	g1361.t1	91 kDa	X	X	-	-
Trans-sialidase, Group II, putative	g9400.t1	65 kDa	X	X	-	-
Trans-sialidase, Group II, putative	g5606.t1	63 kDa	X	X	-	-
Trans-sialidase, Group II, putative	g8947.t1	116 kDa	X	X	-	-
Trans-sialidase, Group II, putative	g9484.t1	76 kDa	-	-	-	X
Trans-sialidase, Group II, putative	g2696.t1	76 kDa	-	-	X	X
Trans-sialidase, Group VII, putative	g9288.t1	65 kDa	-	-	X	X
Trans-sialidase, Group VIII, putative	g8390.t1	97 kDa	X	X	X	X
Trans-sialidase, Group VIII, putative	g8387.t1	100 kDa	X	X	X	X
Trans-sialidase, Group VIII, putative	g9218.t1	95 kDa	-	-	X	X
Trans-sialidase, Group VIII, putative	g7904.t1	102 kDa	-	-	X	X
Trans-sialidase, Group VIII, putative	g4277.t1	86 kDa	X	X	X	X
Trans-sialidase, Group VIII, putative	g9517.t1	82 kDa	X	X	X	X
Trans-sialidase, Group VIII, putative	g705.t1	55 kDa	-	-	X	X
Trans-sialidase, Group VIII, putative	g7840.t1	107 kDa	X	X	X	X
Trans-sialidase, Group VIII, putative	g9239.t1	100 kDa	-	-	X	X
Trans-sialidase, Group VIII, putative	g5300.t1	80 kDa	X	X	X	X
Trans-sialidase, Group VIII, putative	g8757.t1	92 kDa	X	X	X	X
Trans-sialidase, putative	g9448.t1	235 kDa	X	X	-	X
Trans-sialidase, putative	g9521.t1	13 kDa	-	-	-	X
Trans-sialidase, putative	g8678.t1	22 kDa	-	-	X	X
Trans-sialidase, putative	g7044.t1	69 kDa	-	-	-	X
Trans-sialidase, putative	g9999.t1	24 kDa	-	-	-	X
Trans-sialidase, putative	g9418.t1	51 kDa	-	-	X	X
Trans-sialidase, putative	g10011.t1	45 kDa	-	-	-	X
Trans-sialidase, putative	g9208.t1	98 kDa	-	-	-	X

X: Presença da proteína na amostra; -: ausência da proteína

Os resultados demonstraram que apenas 16% das 301 proteínas identificadas possuem peptídeo sinal e são secretadas por vias clássicas, enquanto 9,63% possuem âncora de GPI. Alternativamente, somente 2,33% das proteínas foram preditas como secretadas pelo *SecretomeP* por vias não-clássicas.

3. DISCUSSÃO

A interação entre as formas infectivas do *T. cruzi* e sistema imune dos hospedeiros mamíferos representa um ponto-chave para uma melhor compreensão da fisiopatologia da doença de Chagas, além de ser crucial para o desenvolvimento de novos fármacos e vacinas. Neste contexto, o SC, como uma das primeiras linhas de defesa do hospedeiro contra a infecção, possui um importante papel no reconhecimento de formas tripomastigotas metacíclicas do *T. cruzi* e no controle da invasão celular pelos parasitos. De outro lado, o *T. cruzi* alça de múltiplos mecanismos para escapar da resposta imune do hospedeiro e para realizar a infecção celular.

O *T. rangeli* possui um ciclo de vida heteroxênico, sendo que a parte do seu ciclo de vida no hospedeiro invertebrado (triatomíneo) é complexa e perfaz uma série de evoluções distintas se comparado com o *T. cruzi*. O *T. rangeli* atravessa a parede intestinal, colonizando a hemolinfa, onde os epimastigotas estão submetidos a intensa atividade do sistema imune do triatomíneo, posteriormente invadindo as glândulas salivares do mesmo. A partir deste ponto, o *T. rangeli* se diferencia em tripomastigotas metacíclicos, sendo estas as formas infectivas para o hospedeiro mamífero e que irão entrar em contato com o sistema imune do hospedeiro mamífero quando de sua inoculação junto da saliva do inseto no momento do repasto sanguíneo.

De Sousa e colaboradores (2012), não confirmaram ser a resistência dos epimastigotas ao SC uma característica comum à todas as cepas de *T. rangeli* utilizadas no estudo, porém, demonstraram uma alta variabilidade na susceptibilidade à este sistema entre estas cepas ou em dias diferentes da cultura. Considerando esta observação e os nossos resultados obtidos até o momento, é passível de considerarmos que de forma similar ao observado para o *T. cruzi*, as diferentes cepas e formas biológicas do *T. rangeli*, incluindo suas formas de transição, possam apresentar uma variabilidade na sensibilidade ao SC, ainda que o genoma do *T. rangeli* seja menor e não contenha famílias gênicas repetitivas como *T. cruzi*, apontando para uma reduzida variabilidade intraespecífica se comparado à este (DE SOUSA; DOS SANTOS PEREIRA; DOS SANTOS FAISSAL, 2012; STOCO et al., 2014).

De Lima Ferreira e colaboradores (2015) incubaram formas tripomastigotas metacíclicas do *T. rangeli* com soro inativado de camundongos e observaram uma taxa de lise de cerca de 1%, enquanto que para os parasitos incubados com soro fresco a taxa de lise observada foi de aproximadamente 3%, para nossas análises encontramos valores próximos para o soro fresco de camundongos (3,82%), porém para o soro inativado as taxas foram mais altas (4,15%). Já De Sousa e colaboradores (2012) encontraram resultados variáveis utilizando

epimastigotas, nos quais os parasitos apresentaram uma variação de taxa de lise de 34,9 a 52,5%. Porém, em alguns ensaios estas taxas se modificaram, alguns estoques mostraram sobrevivência total ou muito alta para lise pelo SC (0–10,1%).

No presente trabalho utilizamos a cepa Choachí de *T. rangeli*, a mesma utilizada nos trabalhos de De Lima Ferreira e colaboradores (2015) e De Sousa e colaboradores (2012), tendo observado que as formas epimastigotas do parasito desafiadas com soro fresco de humanos e de camundongos apresentaram taxas de lise muito baixas, entre 1 e 3%, estando de acordo com os resultados de De Sousa (2012). Esta variação demonstra que cepas e formas podem apresentar variação substancial nos dados, porém confirmando que as formas epimastigotas da cepa Choachí de *T. rangeli* são resistentes à lise pelo SC. Cabe salientar que em nossas condições experimentais, sempre realizamos passagens cíclicas em triatomíneos e camundongos e nos acercamos da ausência de contaminação com *T. cruzi* antes da realização dos experimentos.

No presente estudo, avaliamos a resistência ao SC de formas tripomastigotas diferenciadas *in vitro* e de formas tripomastigotas sanguíneas, as quais se revelaram igualmente resistentes ao SC de humanos e de camundongos assim como as formas tripomastigotas metacíclicas. Nossos resultados apontam que quando expostas ao soro normal ou inativado de camundongos, as formas tripomastigotas metacíclicas da cepa Choachí de *T. rangeli* apresentam uma taxa de lise de cerca de 5,0 %, não sendo observada lise quando incubadas com soro humano normal ou inativado. Essa observação pode indicar que a lise possa estar relacionada a fatores séricos não sensíveis à temperatura e não diretamente relacionados ao SC, entretanto, carecendo tal hipótese de investigação detalhada.

Para *L. infantum*, o mecanismo de resistência ao SC também é utilizado pelo parasito para a entrada na célula hospedeira. Os promastigotas metacíclicos utilizam a opsonização pelo SC para facilitar sua entrada mediada por receptores em células fagocíticas, dentro das quais os parasitos sobrevivem e se replicam durante seu estágio amastigota. Porém, para evitar a lise mediada pelo SC, os parasitos utilizam uma glicoproteína de superfície de 63kDa (gp63), uma metaloprotease que bloqueia a cascata do SC induzindo a proteólise do C3b em uma forma iC3b-like, mantendo a função de opsonina, enquanto perde sua atividade adicional de montagem da C3 convertase para o início do complexo de ataque a membrana (MAC) (BRITTINGHAM et al., 1995; DA SILVA et al., 1989).

Já para *T. cruzi*, os mecanismos envolvidos na resistência ao SC incluem a expressão de moléculas como a Calreticulina (*TcCRT*) (FERREIRA et al., 2004a; VALCK et al., 2010), a Proteína Reguladora do Complemento (*TcCRP*) (NORRIS; HARTH; SO, 1989; NORRIS;

SCHRIMPF, 1994), o Inibidor do Receptor complemento C2 Trispanning (*TcCRIT*) (CESTARI et al., 2008), gp58/68 (FISCHER et al., 1988) e o T-DAF (TAMBOURGI et al., 1993), moléculas estas que inibem a formação das C3 convertases na membrana dos parasitos. Além disso, tem sido demonstrado que as formas tripomastigotas metacíclicas do *T. cruzi* induzem a formação de microvesículas pelas células hospedeiras, que interagem com a C3 convertase, resultando na inibição da ativação do complemento e aumento da sobrevivência do parasito, bem como na invasão de células eucarióticas (CESTARI et al., 2012).

A ligação de C3b nas membranas e proteínas de patógenos é uma ligação covalente e forte (GEIGER et al., 2016), permitindo desta forma que a presença desta proteína nas membranas dos parasitos possa ser avaliada utilizando diferentes técnicas. Os resultados obtidos nas análises de deposição de C3b na membrana dos parasitos por citometria de fluxo corroboraram os dados da literatura, igualmente demonstrando que os promastigotas de *L. infantum* são opsonizados por C3b, mantendo sua morfologia e viabilidade inalteradas. Os ensaios de *western blot* apontaram a presença de C3b ligada a proteínas presentes nos extratos proteicos dos parasitos incubados com soro fresco ou inativado de humano, indicando que a opsonização com C3b possa ocorrer tanto pela atividade do SC quanto de forma ativa pela gp63.

A sensibilidade de formas epimastigotas de *T. cruzi*, frente ao SC de humanos foi comprovada nos ensaios de viabilidade celular. Os ensaios de *western blot* revelaram que o reconhecimento de C3b ocorreu nos parasitos expostos a soro humano fresco, demonstrando que a lise dos epimastigotas é causada ativamente pelo SC, especialmente pela VA. As formas tripomastigotas de *T. cruzi* apresentaram níveis baixos de C3b nas avaliações por citometria de fluxo. Entretanto, nas análises por *western blot* observamos um reconhecimento de C3b nos parasitos expostos a soro humano fresco e inativado. Esta observação é condizente com a literatura, onde há o registro de uma baixa porcentagem de lise celular, podendo indicar que nos tripomastigotas de *T. cruzi* o C3b pode inicialmente se ligar nas membranas do parasito e levá-lo à lise, mas de forma geral é posteriormente inativado e liberado das membranas pelas proteínas envolvidas na inibição da ativação do SC (LIDANI et al., 2017; RAMÍREZ-TOLOZA; FERREIRA, 2017). Dessa forma, como a marcação com anticorpos na citometria é realizada com os parasitos vivos, é passível de considerarmos que uma etapa de inativação possa ocorrer e que a liberação de C3b para o meio seja realizada. De outra forma, nos ensaios de *western blot* os parasitos são lisados imediatamente após a exposição, talvez não havendo tempo hábil para que ocorra esta inativação.

A análise global dos resultados obtidos para o *T. rangeli* nos permitiu evidenciar a ligação de C3b proveniente de soro humano à membrana das formas epimastigota e

tripomastigota do parasito de forma idêntica à observada para formas tripomastigotas de *T. cruzi* e promastigotas de *L. infantum*. Este resultado nos permite inferir que o *T. rangeli* não seja susceptível à lise pela VA do SC humano. O fato dos epimastigotas não serem susceptíveis à lise pelo SC pode estar relacionado ao ciclo diferencial deste parasito no hospedeiro invertebrado pois o parasito possui um repertório distinto de proteínas antigênicas de superfície se comparado à formas tripomastigotas e ao *T. cruzi* (DE MORAES et al., 2008). Em especial apontamos a evolução diferencial do *T. rangeli* na hemocele de triatomíneos, onde as formas epimastigotas são expostas à mecanismos de defesa do inseto como os hemócitos, os peptídeos antimicrobianos, o sistema profeoloxidase e a geração de óxido nítrico (FLORES-VILLEGAS et al., 2015).

No trabalho de Da'Dara e colaboradores (2017), utilizando-se uma abordagem proteômica, foi observado que no soro de pacientes infectados com *Schistosoma mansoni* ocorre uma modulação das proteínas séricas, especialmente de proteínas do SC. Os autores avaliaram soros de pacientes infectados e detectaram uma considerável degradação de C3b, o que bloquearia a ação da VA do SC e levando a uma alteração da composição sérica.

Incubando *T. rangeli*, *T. cruzi* e *L. infantum* em soro humano, não foram observadas clivagens nas proteínas C3b, Fator B, Fator H e C1q presentes no soro, demonstrando que estes parasitos não causam alterações na composição destas proteínas. Nossos resultados são condizentes com estas observações uma vez que *L. infantum* é opsonizada com iC3b ao passo que o *T. rangeli* e o *T. cruzi* são igualmente opsonizados, porém promovem o desligamento de C3b de suas membranas.

Considerando a opsonização de *T. rangeli* por C3b revelada em nosso estudo, realizamos uma busca por proteínas do parasito que poderiam estar relacionadas à resistência do parasito ao SC. Para tanto, utilizamos diferentes abordagens de busca por estas proteínas (Co-adsorção, *Gel-Shift* e análise de secretoma), todas acopladas à identificação das mesmas por espectrometria de massas. Inicialmente foi utilizada uma estratégia de Co-Adsorção utilizando duas abordagens, uma em gel e a outra em solução, ambas seguidas de análises por espectrometria de massas. Esta estratégia provou ser eficaz em gerar um aumento qualitativo das proteínas analisadas.

As análises de espectrometria de massas permitiram a identificação de 273 proteínas, das quais 85 foram obtidas através da abordagem em solução e 255 na abordagem em gel. Apesar do uso da estratégia de co-adsorção e de duas diferentes metodologias na busca por uma maior especificidade, foram identificadas diversas proteínas não alvo/contaminantes ($\pm 63,0\%$) tais como a beta-tubulina, proteínas mitocondriais e nucleares, as quais não possuem relação

com a resistência ao sistema complemento relatadas na literatura. Isso pode ter ocorrido uma vez que as proteínas iniciais das vias têm uma maior capacidade de ligação covalente a membranas e outras proteínas. Como por exemplo a C3b, que quando ainda C3 possui um tioéster protegido por interações hidrofóbicas. E quando se dá a clivagem do C3, este passa por tal mudança conformacional que expõe este tioéster reativo, sendo este o mecanismo que permite o C3b presente no plasma se ligar covalentemente as superfícies por ligações éster ou amida (ELVINGTON; LISZEWSKI; ATKINSON, 2016). Além disso, um refinamento desta técnica, utilizando extratos enriquecidos de membrana destes parasitos poderia facilitar a visualização das possíveis ligações proteína-proteína e sua identificação por espectrometria de massas.

Assim sendo, como forma de realizar uma busca mais refinada por estas proteínas relacionadas à resposta ao SC, realizamos os ensaios de mobilidade eletroforética ou *Gel-Shift*.

A análise de interação proteína-proteína realizada pelos ensaios de *gel-shift* utilizou extratos totais de epimastigotas, tripomastigotas diferenciados *in vitro* e tripomastigotas sanguíneas do *T. rangeli* incubados com as proteínas C3b e C1q, as quais foram submetidas à eletroforese não-desnaturante seguida de *western blot* com anticorpos específicos anti-C3b e anti-C1q. Face à diferença de carga elétrica das proteínas, foi somente possível analisar a proteína C3b, sendo reconhecidas seis bandas proteicas, três nas amostras de formas epimastigotas, duas nos tripomastigotas diferenciados *in vitro* e uma nas formas tripomastigotas sanguíneas. Porém, após a identificação das bandas reconhecidas por MS, os resultados revelaram proteínas que não possuem interação com C3b relatada na literatura. Isto pode ter ocorrido pois o gel não-desnaturante necessita que as proteínas tenham cargas negativas para que possam ser eletroforicamente separadas, desta forma é possível que os complexos proteicos formados podem não ter entrado no gel por diferença de cargas. Neste caso novamente a utilização de extratos enriquecidos de membrana poderiam facilitar a visualização das interações proteína-proteína.

Além das análises de interação proteína-proteína, foi realizada uma abordagem inicial para a avaliação do secretoma do *T. rangeli*, buscando avaliar uma possível liberação de proteínas por microvesículas. Esta hipótese foi levantada com base nos registros de literatura apontando que formas tripomastigotas metacíclicos de *T. cruzi* liberam fatores de virulência para o meio e induzem a formação de microvesículas pelas células hospedeiras, que interagem com a C3 convertase, resultando na inibição do SC.

Para a avaliação preliminar do secretoma *in vitro* do *T. rangeli*, utilizamos a mesma metodologia utilizada para o estudo do secretoma de formas epimastigotas de *T. cruzi* (BAYER-

SANTOS et al., 2013). Em suma, os parasitos são mantidos em meio DMEM por 6 horas a 27 °C quando pudemos observar alterações de pH variando com a forma evolutiva dos parasitos, pH mais ácido para epimastigotas e pH mais alto para tripomastigotas. Para realizar a diferenciação de epimastigotas de *T. rangeli* em tripomastigotas, é utilizado meio DMEM pH 8,0 com 5% de SBF, ou seja, a diferenciação é obtida através da basificação do meio e estresse nutricional (KOERICH et al., 2002), o que pode explicar o fato dos tripomastigotas basificarem o meio em que foram mantidos para a realização do secretoma. Enquanto a acidificação que ocorreu com os epimastigotas pode ter ocorrido devido ao consumo dos nutrientes presentes no meio, uma vez que esses parasitos foram retirados de um meio muito rico (LIT 10% SBF) e transferidos para o meio DMEM.

Os resultados das análises de espectrometria de massas para o secretoma de *T. rangeli* se mostraram similares aos de *T. cruzi*, compartilhando algumas características como padrões diferenciados para formas epimastigotas e tripomastigotas. Nos dados presentes na análise do transcrito de *T. rangeli* (GRISARD et al., 2010), também foi observada uma transcrição diferencial nas formas epimastigotas e tripomastigotas de *T. rangeli*, corroborando os dados encontrados na análise do secretoma.

Segundo Bayer-Santos e colaboradores (2013), as proteínas de *T. cruzi* são aparentemente secretadas de acordo com os ambientes específicos e distintos aos quais o parasito está exposto durante a infecção em mamíferos ou triatomíneos. Essa secreção de proteínas estágio-específicas parece também estar relacionada a co-evolução desse parasito com suas espécies vetoras, influenciando a transmissão do parasito aos hospedeiros mamíferos.

Esta co-evolução parasito-vetor já é muito bem postulada para *T. rangeli*. As espécies de triatomíneos normalmente infectadas pertencem ao gênero *Rhodnius*, porém, a susceptibilidade e o nível de infecção varia de acordo com a espécie do triatomíneo e a cepa do parasito que ocorrem na mesma região geográfica (GUHL; VALLEJO, 2003).

Através da análise da amplificação do kDNA e do miniéxon, Vallejo e colaboradores (2003) mostraram que o *T. rangeli* claramente é dividido em dois grandes grupos filogenéticos associados a vetores específicos na Colômbia e em outros países da América Latina. Esses resultados apoiam a evolução clonal ou a especiação nas populações de *T. rangeli*, possivelmente derivadas como uma adaptação secundária à sua condição parasitária nos vetores de triatomíneos. Esses grupos filogenéticos podem estar relacionados a adaptações particulares para espécies específicas de *Rhodnius* (URREA et al., 2005).

Vallejo e colaboradores (2007) demonstraram que a interação *T. rangeli*-vetor é um modelo importante no qual cada subpopulação fenotípica e genotipicamente divergente de *T.*

rangeli será transmitida por um vetor específico do gênero *Rhodnius*, fazendo com que os vetores atuassem como filtros biológicos das referidas subpopulações.

Na atual era das ômics, estudos de genômica, transcritômica e proteômica comparativa têm sido utilizados nas diferentes populações de *T. rangeli*, o que vem auxiliando a identificação e caracterização de proteínas envolvidas no ciclo celular desse parasito, assim como na indução da resposta imune do hospedeiro (STEVENS et al., 1999).

Neste contexto de subpopulações, comparações dos perfis proteicos totais de *T. rangeli* de acordo com seus estágios morfológicos e fisiológicos (epimastigotas e tripomastigotas) apontam a expressão gênica diferencial durante o ciclo de vida, incluindo algumas proteínas espécie específicas (MEJIA et al., 2004).

Com relação as análises preditivas para a presença de peptídeos sinal, âncora de GPI e sinais indicativos de secreção proteica provavelmente nem todas as sequências puderam ser reconhecidas, uma vez que tripanosomatídeos possuem sequências específicas de endereçamento que nem sempre são contempladas nos softwares de predição. Porém nossos resultados sugerem que a via clássica de secreção possui um maior papel em entrega extracelular de proteínas para *T. rangeli*. Diferentemente do que foi encontrado para *T. cruzi*, onde a maior parte das proteínas era excretada por vias não-clássicas e exovesículas (BAYER-SANTOS et al., 2013).

Além disso, 37 proteínas hipotéticas diferentes foram identificadas nestas análises (13,26% do secretoma identificado), demonstrando assim a existência de muitas proteínas não caracterizadas, podendo gerar alvos para estudos futuros com potencial papel na virulência e patogênese do *T. rangeli*. Assim sendo, esses resultados fornecem o primeiro passo para uma investigação mais aprofundada dos mecanismos de secreção e proteínas secretadas no *T. rangeli*.

Face aos resultados obtidos neste capítulo, selecionamos as proteínas Calreticulina; uma Trans-sialidase do grupo III, que compreendem as proteínas reguladoras do complemento em *T. cruzi*, e uma proteína hipotética denominada AGN32887, a qual possui peptídeo sinal de endereçamento à membrana e uma região transmembranar, para dar início aos estudos funcionais das proteínas de *T. rangeli* com capacidade de inibição do SC de mamíferos. Ainda que consideremos a relevância da gp63 na resposta de *Leishmania* spp. ao SC de mamíferos, o estudo do envolvimento desta molécula do *T. rangeli* é objeto de outro trabalho de dissertação de Mestrado desenvolvido no Laboratório de Protozoologia da UFSC e não será tratado no presente estudo.

4. RESUMO DOS RESULTADOS

- O *T. rangeli* é resistente ao sistema complemento de mamíferos;
- C3b humano opsoniza o *T. rangeli*, porém não é capaz de induzir a lise do parasito;
- O *T. rangeli* não é capaz de degradar ou clivar a presença componentes das vias do SC humano;
- Análises de espectrometria de massas indicam uma possível interação proteína-proteína mediando esta resistência.
- O *T. rangeli* secreta proteínas no meio extracelular. Formas tripomastigotas secretam maior número de proteínas relativas à virulência enquanto formas epimastigotas secretam maior número de proteínas relacionadas a metabolismo celular;
- As proteínas Calreticulina, Proteína hipotética AGN 32887 e uma proteína reguladora do complemento foram selecionadas para estudos posteriores.

**CAPÍTULO 2: Aplicação da técnica de CRISPR/Cas9 para
deleção de genes de *Trypanosoma rangeli*.**

Neste capítulo, está apresentada a padronização da técnica de CRISPR/Cas9 para *T. rangeli*, utilizando como alvos primários proteínas do parasito possivelmente relacionadas à resistência ao sistema complemento de mamíferos.

1 METODOLOGIA

1.1 Deleção de genes endógenos via CRISPR/Cas9

Inicialmente, geramos uma linhagem de *T. rangeli* expressando constitutivamente a *SpCas9* nuclease visando os estudos de deleção gênica neste parasito. Entretanto, durante o período de estágio sanduíche no grupo do Prof. John Kelly na London School of Hygiene and Tropical Medicine (Reino Unido) adaptamos uma metodologia de transfecção transiente para *T. cruzi* desenvolvido por Costa e colaboradores (2018), utilizando o plasmídeo pLEWCas9 para uso no *T. rangeli*. Nesta proposta, há a co-transfecção conjunta de todos os elementos necessários à deleção dos genes-alvo. Resumindo, os ensaios de deleção gênica de *T. rangeli* foram padronizados utilizando as transfecções dos cassetes de transcrição dos sgRNA e de homologia conjuntamente com o plasmídeo pLEWCas9, reduzindo o custo, o tempo e a manipulação dos parasitos pós-transfecção e alcançando uma eficiência superior.

1.1.1 Desenho dos cassetes de transcrição dos sgRNA e homologia

As sequências alvo dos sgRNA e homologia foram identificadas utilizando o software *Eukaryotic Pathogen CRISPR guide RNA/DNA Design Tool* (<http://grna.ctegd.uga.edu>) (PENG; TARLETON, 2015) com a opção *SpCas9* (sequência-alvo de 20 pb anterior a um site NGG PAM). Foram desenhados dois sgRNA direcionados à porção 5' e 3' das sequências, de forma que todo o gene fosse excluído do genoma. Os cassetes de homologia foram desenhadas contendo os genes de resistência a Puomicina e Blastocidina, flanqueados por sequências de 30 nt com 100 % de identidade às sequências gênicas dos genes a serem removidos. Para tal, foram desenhados manualmente iniciadores senso e antissenso utilizando as sequências apropriadas em banco de dados interno utilizando o genoma do *T. rangeli* (Tabela 3).

Na figura 18 está o desenho esquemático das regiões de ligação dos sgRNA e dos iniciadores desenhados para gerar os cassetes de homologia para cada gene. Os cassetes de

transcrição dos sgRNA e homologia foram obtidos através de reações de PCR, realizadas segundo Costa e colaboradores (2018).

Figura 18. Esquema de ligação dos sgRNA (verde) e iniciadores utilizados para a construção dos cassetes de homologia nos genes de *T. rangeli*.



Tabela 4. Lista de iniciadores para a amplificação dos sgRNA e cassete de homologia.

Genes		Iniciadores (5' - 3')	
Fla1BP	sgRNA	TrFla1BP_5sgRNA	gaaattaatacagactcactataggGGAGGCTGAACGGATA GGGGAGGgttttagagctagaaatagc
		TrFla1BP_3sgRNA	gaaattaatacagactcactataggAACCTGCCCTCCCCATG CAGCGGgttttagagctagaaatagc
	Cassete homologia	TrFla1BP_Up Fw	TTTGCCTCTTTCTTTTTCCTTCTCTCTGTGgtataa tgcagacctgctgc
		TrFla1BP_Down Rev	CGGTGGGAATGACCTCTTTGTCTCGTTCcca attgagagacctgctgc
Calreticulina	sgRNA	TrCRT_5sgRNA	gaaattaatacagactcactataggACCTTCTGGCTCTTGCA ACGCTGGgttttagagctagaaatagc
		TrCRT_3sgRNA	gaaattaatacagactcactataggACAAGTCTCCTTGTC CCGTCCGgttttagagctagaaatagc
	Cassete homologia	TrCRT_Up Fw	GGTGGCTCCACGCGGTGCATTGACGCCCATgt ataatgcagacctgctgc
		TrCRT_Down Rev	CTACCTACCTTGTTGTTGTTGTGTGCGTGTccaa ttgagagacctgctgc
Proteína Reguladora do Complemento	sgRNA	TrCRP_5sgRNA	gaaattaatacagactcactataggACGTGTGTGTGCAACAA AAGTGGgttttagagctagaaatagc
		TrCRP_3sgRNA	gaaattaatacagactcactataggACCACGCACGCTTTGAG TGGATGGgttttagagctagaaatagc
	Cassete homologia	TrCRP_Up Fw	TGCCCGTGTACCGGGAAGCCTCCGTTTTGTgta taatgcagacctgctgc
		TrCRP_Down Rev	ATGGCAGCAGCAAACAGAAGGGGAAAAGGC ccaattgagagacctgctgc
Proteína Hipotética AGN32887	sgRNA	TrAGN_5sgRNA	gaaattaatacagactcactataggATTCAGACGCATCGCTT CAATTGGgttttagagctagaaatagc
		TrAGN_3sgRNA	gaaattaatacagactcactataggACAATTCGGCCGGAGG TACATGGgttttagagctagaaatagc
	Cassete homologia	TrAGN_Up Fw	AATACAGCAACAAAAAGGGTCTAACAGGCg tataatgcagacctgctgc
		TrAGN_Down Rev	ATGTGTTTCTACGATTCTTGTCTGCTACccaa ttgagagacctgctgc
	sgRNA	CRISPRsgRev	aaaagcaccgactcggtgccacttttcaagttgataacggactagccttatt ttaactgctatttctagctctaaaac

Bases em maiúsculo: Sequências específicas do gene a ser deletado.

Bases em minúsculo: Sequências de sobreposição para a amplificação do sgRNA ou para a amplificação dos cassetes de homologia.

1.1.2 Preparo e transfecção dos cassetes de transcrição dos sgRNA e de homologia e plasmídeo contendo o gene da Cas9

Para a amplificação via PCR dos cassetes de transcrição dos sgRNA, 2 μ M de cada iniciador: CRISPR antissenso (sgRNA *scaffold*) e senso gene-específico foram adicionados ao *GoTaq[®] Master Mix* (Promega) em um volume final 20 μ l. As reações foram realizadas utilizando o seguinte perfil térmico: 30 segundos a 98°C, seguido por 35 ciclos de 10 segundos a 98°C, 30 segundos a 60°C, 15 segundos a 72°C em um termociclador modelo *Verity* (Applied Biosystems) conforme o descrito por Beneke e colaboradores (2017). Para amplificar as cassetes de homologia, as reações de PCR foram realizadas com 30 ng do plasmídeo pTCBLAST ou do plasmídeo pTPURO_v1 (Figura 19), 2 μ M dos iniciadores específicos para cada gene, 3% (v/v) de DMSO em um tampão *GoTaq[®] Master Mix* (Promega), totalizando 40 μ l de volume total. As reações foram realizadas utilizando o seguinte perfil térmico: cinco minutos a 98°C, seguidos por 40 ciclos de 30 segundos a 98°C, 30 segundos a 65°C, dois minutos a 72°C, seguidos por um passo final de sete minutos a 72°C.

Para a transfecção dos parasitos, os cassetes de transcrição dos sgRNA e cassetes de homologia utilizando-se os volumes de reação padrão acima). O DNA foi purificado usando o kit *PCR Clean-up and Gel Extraction kit* (Macherey-Nagel) e eluído em 40 μ l de água livre de nucleases. Um total de 10^8 formas epimastigotas foram transfectadas em cubetas de 0,2 cm usando o programa X-014 em um aparelho *Nucleofector[®]* (Lonza) com uma mistura combinada de DNA contendo 40 μ l de mistura de DNA, 5 μ l do plasmídeo pLEWCas9 (400ng/ μ l, Figura 20) e 200 μ l de tampão Tb-BSF, perfazendo um volume final de 250 μ l. Após a nucleofecção, os parasitos foram transferidos para tubos contendo 5 ml de meio NNN-LIT 20% SBF e incubados durante a noite a 27,5 °C. Os agentes seletivos foram então adicionados (puromicina, 0,166 μ g ml⁻¹; blasticidina, 0,2 μ g ml⁻¹), tendo a concentração de drogas aumentada semanalmente até a concentração final de puromicina, 2 μ g ml⁻¹; blasticidina, 4 μ g ml⁻¹.

Figura 19. Representação dos plasmídeos contendo os genes de resistência a Blasticidina e Puromicina. A) pTCBLAST; B) pTPURO_v1. Fonte: (COSTA et al., 2018).

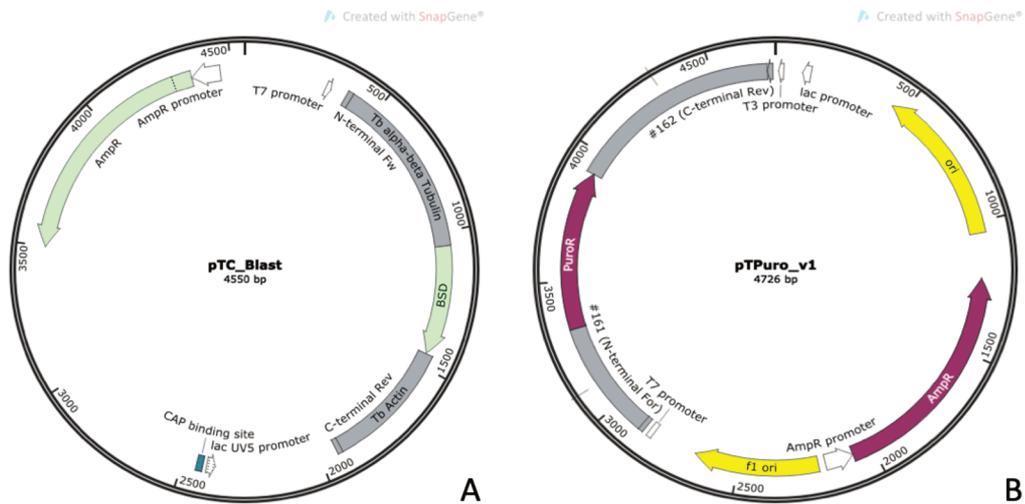
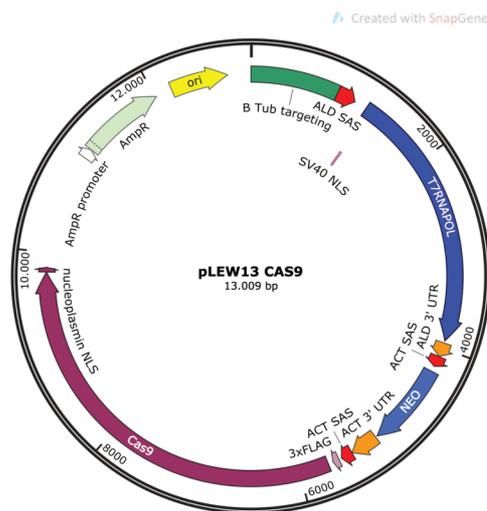


Figura 20. Representação do plasmídeo pLEWCas9. Fonte: (COSTA et al., 2018).



1.1.3 Verificação de deleção de genes endógenos

Inicialmente, formas epimastigotas de *T. rangeli* foram transfectadas com sgRNA desenhados para a deleção do gene Fla1BP, um gene endógeno ligado à zona de adesão flagelar e cujo *knockdown* por RNAi leva à uma alteração fenotípica detectável por microscopia (SUN et al., 2013). Além deste gene controle, foram utilizados sgRNA para os genes alvo Calreticulina, proteína hipotética (AGN32887.1) e a Proteína Reguladora do Complemento, assim como os cassetes de homologia contendo genes de resistência na fase correta de leitura. Os parasitos foram coletados 90 dias após a transfecção, fixados, corados com Giemsa e

visualizados em microscópio óptico. O DNA dos parasitos foi isolado em 30, 60 e 90 dias após a transfecção para verificação da integração genômica do cassete de homologia através de PCR convencional e PCR semi-quantitativa. Para isto, iniciadores específicos para os genes (Tabela 4) foram combinados em pares em reações de PCR contendo: 50 ng do DNA total de *T. rangeli*, 10 pmol de cada um dos iniciadores, 200 µM de dNTP, 1 unidade de *GoTaq*[®] *DNA polimerase* (Promega) em seu tampão apropriado em um volume final de 10 µl. As reações foram compostas com uma etapa de desnaturação do DNA a 94 °C durante três minutos. Subsequentemente foram realizados 35 ciclos para a PCR convencional e 20 ciclos para a PCR semi-quantitativa com as etapas de desnaturação (92 °C por 30 segundos), ligação dos iniciadores a sequência alvo (60 °C, por 30 segundos) e alongamento da cadeia de DNA pela polimerase (72 °C por 1-3 minutos), sendo estes passos realizados em um termociclador modelo *Verity* (Applied Biosystems). Os produtos de PCR foram resolvidos por eletroforese em géis de agarose 1% para os fragmentos relativos aos genes e 2% para os fragmentos dos genes de resistência e corados por brometo de etídio (1 µg/ml).

Após a confirmação das deleções os parasitos tiveram verificadas suas características biológicas como capacidade de crescimento e foram submetidos a ensaios de lise e de deposição de C3b conforme o descrito nos itens 1.2 e 1.3 do capítulo I.

Tabela 5. Sequência dos iniciadores escolhidos para PCR para os genes alvo e tamanho dos produtos amplificados com cada par de iniciadores.

Genes		Iniciadores (5' - 3')	Tamanho do produto (pb)
CRT	S	<u>CATATGCACGAGGAGTTCAAGAG</u>	1.262
	AS	<u>GGATCCGTTGTTGTGTGCGTGTCCCTC</u>	
AGN	S	<u>CTCGAGCTAACAGGCATTATGGCACTC</u>	975
	AS	<u>GGATCCGGTTTTTCGCCCGTCTCTTG</u>	
CRP	S	<u>CTCGAGATGAGTAATTTAAGAATCACCCCTG</u>	2829
	AS	<u>GGATCCTTAAGCAAAGAGAGCCGCAATG</u>	
Fla1BP	S	<u>GAATTCAATGCGTATCTCGCTCTTCAG</u>	2214
	AS	<u>AAGCTTGGAGGGCAGGTTTAGTATCG</u>	

Após a verificação do *knockdown* os parasitos tiveram verificadas suas características biológicas como capacidade de crescimento e foram submetidos a ensaios de lise e de deposição de C3b conforme o descrito nos itens 1.2 e 1.3 do capítulo I.

1.2 Busca e avaliação dos transcritos referentes aos genes CRT, CRP e AGN no transcriptoma de *T. rangeli*

Utilizou-se neste trabalho dados do transcriptoma de formas tripomastigotas sanguíneas de *T. rangeli* obtidas de camundongos infectados, bem como de formas epimastigotas obtidas de hemolinfa e de formas tripomastigotas metacíclicas obtidas de glândulas salivares de *Rhodnius prolixus* experimentalmente infectados (dados não publicados). Para o transcriptoma foram construídas nove bibliotecas de cDNA que foram sequenciadas na plataforma Illumina HiSeq 2500 no Instituto Karolinska. A montagem do transcriptoma foi realizada na plataforma Trinity v2.2.0 (GRABHERR et al., 2013) e a quantificação dos níveis de transcritos foi realizada pelo programa Kallisto. As sequências de CRT, CRP e AGN encontradas no genoma foram utilizadas como *query* em uma busca por similaridade por *BLASTn* nas sequências dos transcriptomas.

Posteriormente, foi gerada uma matriz com os identificadores dos transcritos, a anotação do gene e as diferentes contagens absolutas das réplicas dos diferentes grupos e analisada utilizando o programa START (<https://kcvl.shinyapps.io/START/>).

2 RESULTADOS

2.1 Avaliação da deleção de genes endógenos

Para dar início à deleção dos genes de interesse, o número de cópias genômicas dos genes-alvo foi avaliado para verificação da possibilidade de deleção. Os genes CRT e AGN são de cópia única no genoma, enquanto o gene da CRP possui duas cópias gênicas (98% de similaridade entre as cópias). A partir disto, foram selecionados guias direcionados à porção 5' e 3' dos genes que não possuíssem sequências *off-target*.

A partir dos iniciadores desenhados, foram realizadas as PCR para a obtenção dos guias de DNA (Figura 21) e dos cassetes de homologia contendo os genes de resistência à puromicina e à blasticidina (Figura 22). Como é possível perceber, a amplificação tanto dos guias quanto dos cassetes de homologia foi obtida com sucesso para todos os genes.

Figura 21. Amplificação dos templates de DNA para os sgRNA. Eletroforese em gel de agarose a 2% corado por brometo de etídio revelando os produtos de amplificação de 124 pb dos guias de DNA para a porção 5' e 3' dos genes CRT, AGN, CRP, e Fla1BP de *Trypanosoma rangeli*. PM – Padrão de peso molecular em pares de bases (pb) (pUC18 digerido com *HaeIII*); 5sg: sgRNA direcionado a porção 5' do gene; 3sg: sgRNA direcionado a porção 3' do gene.

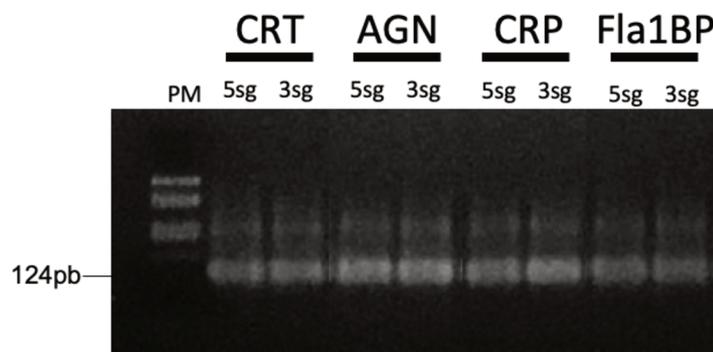
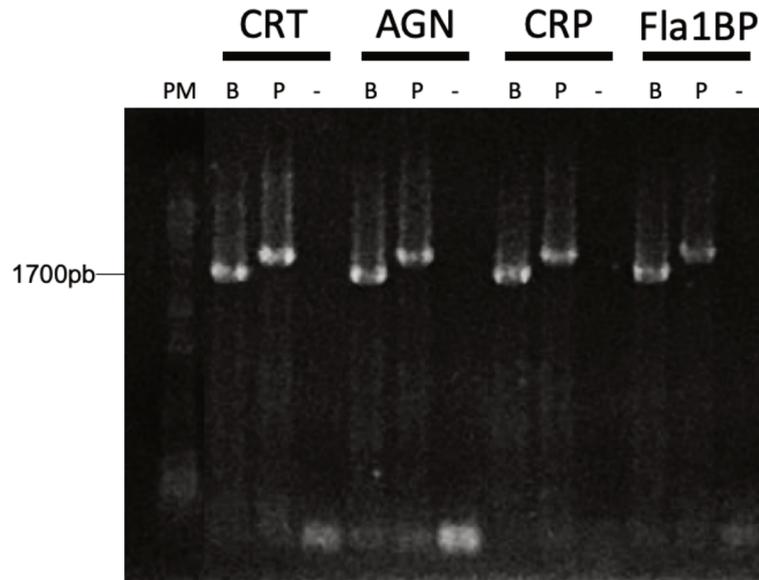


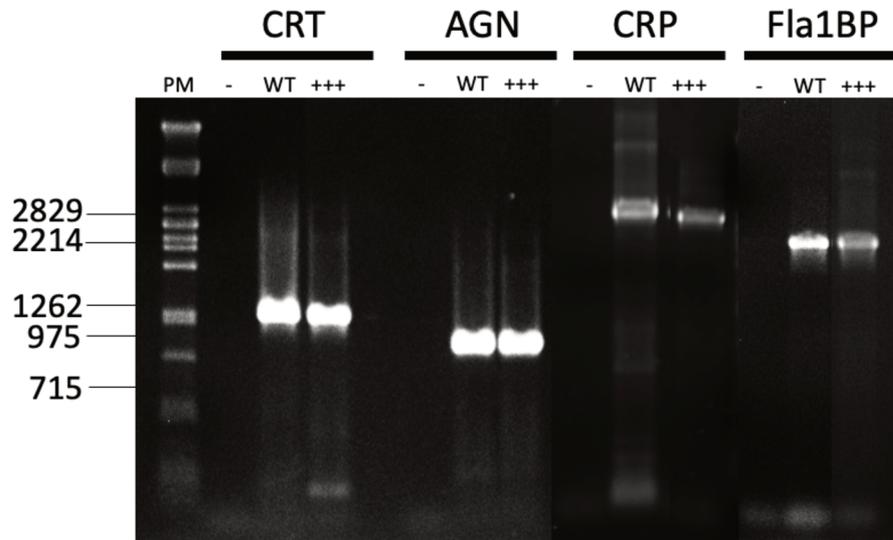
Figura 22. Amplificação dos templates de de homologia. Eletroforese em gel de agarose a 1% corado pelo brometo de etídio revelando o produto de amplificação de 1.700 e 1.800 pb dos cassetes de homologia contendo os genes de resistência à Blastidina (B) e à Puromicina (P) dos genes CRT, AGN, CRP e Fla1BP. PM – Padrão de peso molecular em pares de bases (pb) (Fago Lambda digerido com *Pst*I); B: cassete de homologia contendo o gene da blastidina; P: cassete de homologia contendo o gene da puromicina; -: Controle negativo (sem adição de DNA).



Além dos genes da CRT, AGN e CRP, todo o procedimento para a deleção foi realizado também para o gene da Fla1BP, uma proteína ligada a zona de adesão flagelar de *T. rangeli*. A *Tr*Fla1BP está sendo caracterizada em outro trabalho em andamento no Laboratório de Protozoologia, no entanto foi incluída neste trabalho como um controle da técnica, uma vez que a deleção deste gene gera um fenótipo de fácil observação em microscópio, além de termos disponível no laboratório um antissoro policlonal dirigido à proteína *Tr*Fla1BP.

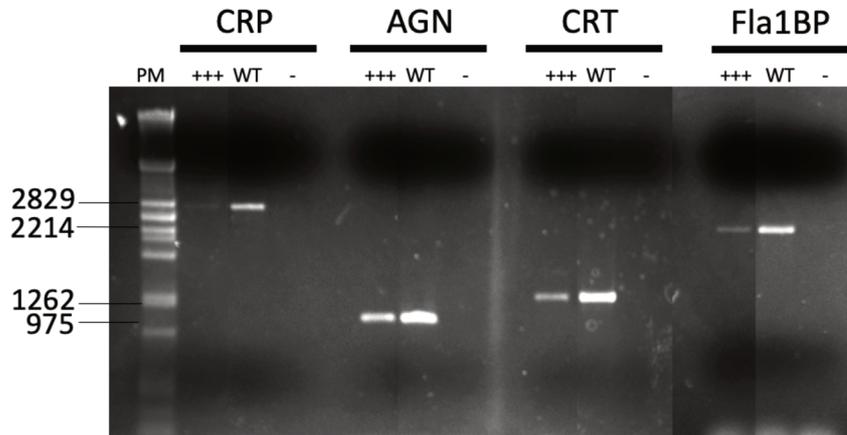
Dois meses após as transfeções realizadas para a tentativa de deleção destes genes, ensaios de PCR foram realizados visando a confirmação das deleções. Conforme é possível observar na Figura 23, não foi possível realizar a deleção dos dois alelos de cada gene-alvo em nenhuma das linhagens uma vez que obtivemos produtos de amplificação em todas as amostras.

Figura 23. Amplificação dos genes alvo após 90 dias de seleção. Eletroforese em gel de agarose a 1% corado pelo brometo de etídeo revelando os produtos de amplificação de 1.262 pb, 975 pb, 2.829 pb, 2.214 pb e 715 pb dos fragmentos dos genes *TrCRT*, *TrAGN* e *TrCRP* e *TrFla1BP* de *Trypanosoma rangeli*, respectivamente, submetidos a transfecção e seleção com blasticidina e puromicina em diferentes concentrações. PM – padrão de peso molecular em pares de bases (pb)(Fago Lambda digerido com *Pst*I); -: Controle negativo (sem adição de DNA); WT: parasito selvagem; +++: pressão seletiva com 4 µg/ml de blasticidina e 2 µg/ml de puromicina.



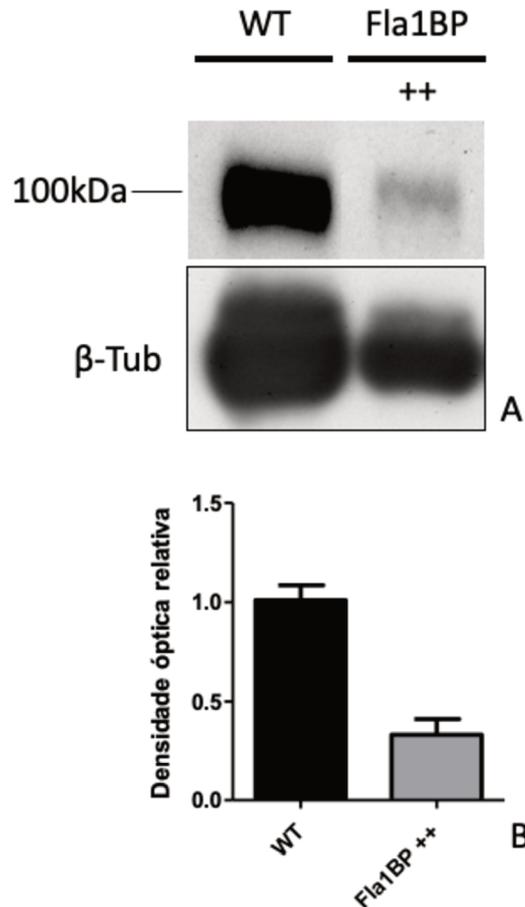
Realizamos então um ensaio de PCR convencional semi-quantitativa, de forma a buscar detectar se somente um dos alelos fora removido, visto que os parasitos cresceram na pressão de drogas seletivas, o que é revelado através de diferenças de intensidade dos produtos de amplificação. Os resultados dos ensaios de PCR semi-quantitativa estão apresentados na figura 24, permitindo observar que obteve-se eficiência parcial nos ensaios de deleção, não tendo gerado linhagens *knockout*, mas aparentemente linhagens *knockdown* para os genes CRP, AGN, CRT e Fla1BP.

Figura 24. Amplificação dos genes alvo após 90 dias de seleção utilizando PCR convencional semi-quantitativa. Eletroforese em gel de agarose a 1% corado pelo brometo de etídeo revelando os produtos de amplificação de 2.829 pb, 1.262 pb e 975 pb dos fragmentos dos genes *TrCRP*, *TrAGN* e *TrCRT* de *Trypanosoma rangeli*, respectivamente, submetidos a uma PCR convencional semi-quantitativa. PM – Padrão de peso molecular em pares de bases (pb) (Fago Lambda digerido com *Pst*I); -: Controle negativo (Sem adição de DNA); WT: parasito selvagem; +++: pressão seletiva com 4 µg/ml de blastidina e 2 µg/ml de puromicina.



Como forma secundária de avaliar a eficiência da técnica de deleção utilizando CRISPR-Cas9 em *T. rangeli* utilizou-se o soro policlonal anti-*TrFLA1BP* em um experimento preliminar, o qual revelou uma redução > 50% da expressão deste gene na linhagem *knockdown* se comparada ao grupo controle (WT) (Figura 25). Desta forma, como observa-se apenas a diminuição na expressão da Fla1BP, e não a sua interrupção, sugere-se apenas que tenhamos gerado uma linhagem modificada para a Fla1BP.

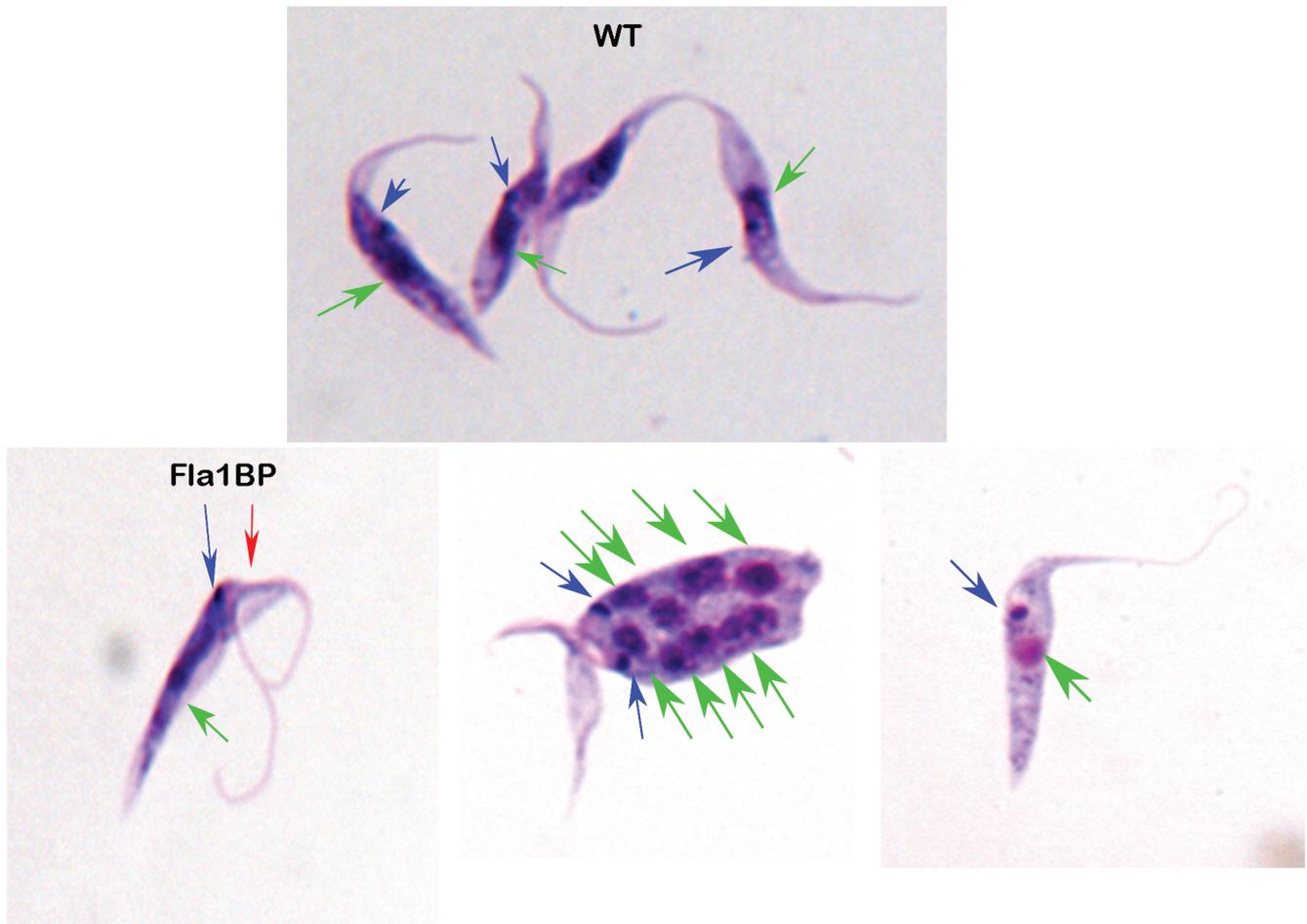
Figura 25. Análise da expressão da Fla1BP em epimastigotas selvagens e da linhagem modificada para o gene da Fla1BP de *Trypanosoma rangeli*. A) Níveis proteicos de Fla1BP em extratos proteicos totais de *T. rangeli*; B) Densidade óptica relativa dos níveis de Fla1BP, normalizados a partir da expressão de β -tubulina. WT: parasito selvagem; ++: pressão seletiva com 4 μ g/ml de blasticidina e 2 μ g/ml de puomicina.



Apesar da obtenção de apenas um *knockdown* para o gene Fla1BP, foi possível observar o fenótipo do destacamento do flagelo em cerca de 60-70% da cultura. O gene da Fla1BP ainda não foi estudado em *T. cruzi*, porém, quando o gene da gp72 (proteína que compõe a FAZ e interage diretamente com a Fla1BP mantendo o flagelo aderido a membrana), tem um ou ambos os seus alelos deletados, também apresenta o fenótipo de flagelo destacado (BURLE-CALDAS et al., 2017; COOPER; DE JESUS; CROSS, 1993; DAROCHA et al., 2004). Sun e colaboradores (2013) também demonstraram que em *T. brucei*, realizando o knockdown da Fla1BP através de RNAi, o fenótipo do flagelo destacado é visível nestes parasitos.

Porém, para as outras linhagens modificadas, nenhum fenótipo visível pode ser observado (Figura 27).

Figura 26. Análise dos fenótipos obtidos nas linhagens modificadas através de coloração por Giemsa. Formas epimastigotas de cultura selvagem e das linhagens modificadas. As barras de aumentam representam 10 µm. Setas verdes: núcleo; Setas azuis: cinetoplasto; Setas vermelhas: flagelos destacados.



Para a obtenção das formas tripomastigotas das linhagens de *T. rangeli* modificadas foi utilizado o protocolo padrão descrito por Koerich e colaboradores (2002), realizando-se duas adaptações distintas. Em uma delas mantivemos a pressão seletiva com antibióticos (blasticidina e puromicina) no parasitos e na outra, após as lavagens e mudança de meio de cultura, a pressão seletiva era removida. No primeiro protocolo não foi possível obter a diferenciação *in vitro* para formas tripomastigotas, tendo os parasitos morrido durante o processo.

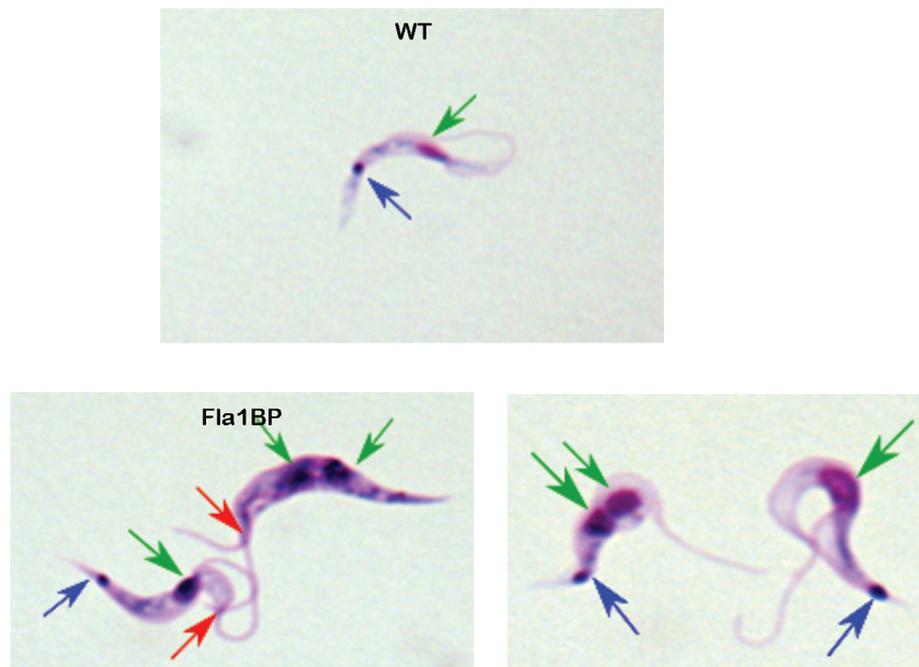
Utilizando o protocolo de diferenciação sem a pressão seletiva de blasticidina e puromicina, obtivemos uma taxa de diferenciação entre 40% e 50%, muito aquém do que foi obtido para a linhagem selvagem (96 a 99%), evidenciando uma interferência da presença dos antibiótico no processo de diferenciação *in vitro*. Em função deste resultado, está em curso um ensaio onde os parasitas estão sendo mantidos sem pressão seletiva com blasticidina e

puromicina por dois dias antes de serem submetidos à mudança de meio e ao processo de diferenciação *in vitro* buscando reduzir ou evitar tal interferência.

Utilizando esfregaços corados pelo Giemsa, podemos observar que o fenótipo dos tripomastigotas *knockdown* para o gene da Fla1BP não possuem membrana ondulante, além das culturas apresentarem parasitos morfológicamente alterados (Figura 28).

Cerca de 30% dos tripomastigotas da linhagem AGN diferenciados *in vitro* apresentaram dois núcleos, indicando alguma interferência no processo de diferenciação. Para a linhagem CRP, cerca de 50% da cultura apresentou alterações morfológicas e a presença de muitas formas arredondadas e múltiplos núcleos, também indicando que ocorreu alguma alteração do processo de diferenciação em relação às células WT.

Figura 27. Análise dos fenótipos obtidos nas linhagens modificadas através de coloração por Giemsa. Formas tripomastigotas de cultura selvagem e das linhagens modificadas. As barras de aumentam representam 10 μ m.



Após as análises de fenótipos e genótipos, não conseguimos deletar os genes, apenas realizar um *knockdown* dos mesmos. Possivelmente isto ocorreu pelo fato de o *T. rangeli* se adaptar aos antibióticos, ou mesmo os cassetes de homologia terem realizado recombinação homóloga em outros pontos do genoma. Maiores investigações genômicas se fazem necessárias para o entendimento deste sistema em *T. rangeli*.

2.2 Avaliação da mortalidade das linhagens *knockdown* ao SC

A avaliação comparativa da capacidade de resistência ao SC de mamíferos das formas epimastigotas do *T. rangeli* selvagem (WT) em relação às linhagens *knockdown* para os genes CRT, AGN e CRP foi realizada por ensaio de citometria de fluxo, nos qual foi avaliada a viabilidade celular destes parasitos após a exposição a soro humano fresco (HS) e soro humano inativado (HIHS). Os resultados da citometria estão apresentados na tabela 5.

Tabela 6. Taxa de mortalidade das formas epimastigotas de *Trypanosoma rangeli* selvagem (WT) e linhagens *knockdown* ao sistema complemento de seres humanos. Resultados normalizados a partir dos valores encontrados para o controle com PBS.

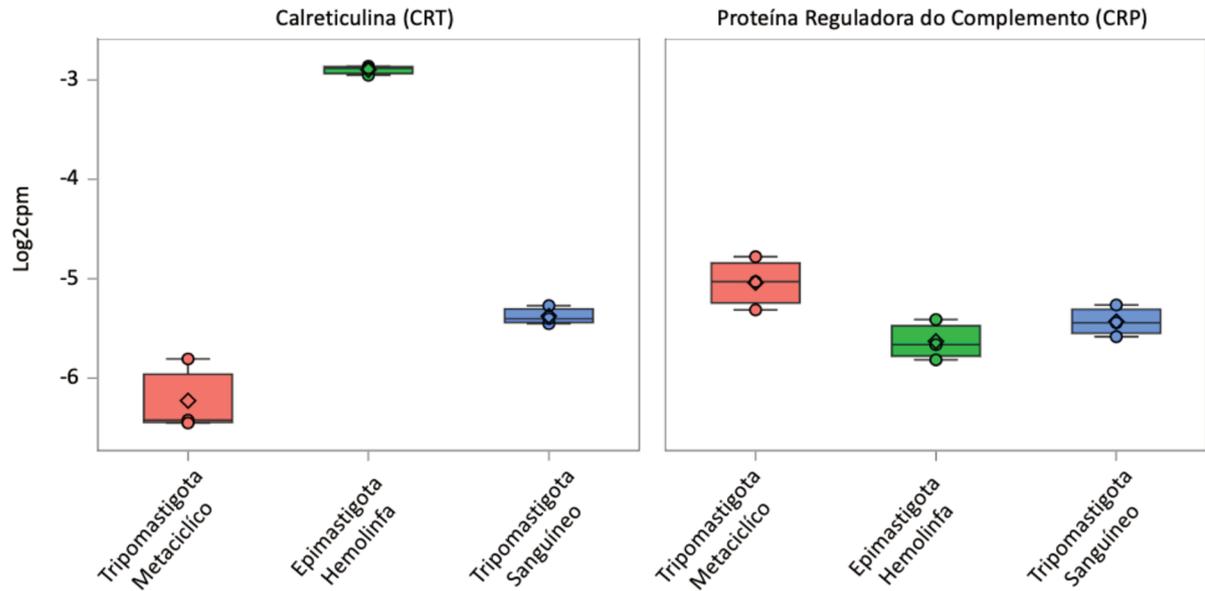
Linhagem	Soro Humano	
	Normal (HS)	Inativado (HIHS)
WT	0 ($\pm 2,79$)	0 ($\pm 1,12$)
AGN	5,43% ($\pm 2,79$)	2,06% ($\pm 1,12$)
CRT	4,24% ($\pm 2,14$)	0,40% ($\pm 1,58$)
CRP	5,56% ($\pm 2,14$)	0,86% ($\pm 0,51$)
Fla1BP	4,2% ($\pm 2,04$)	0,23% ($\pm 2,6$)

Os resultados obtidos para *T. rangeli* WT foram similares aos encontrados nos ensaios iniciais presentes no capítulo 1, onde as formas epimastigotas não apresentaram sensibilidade ao soro fresco e inativado de humano e camundongo. Para todas as linhagens *knockdown* geradas, não foi observada uma sensibilidade distinta dos parasitos quando expostas ao soro fresco e inativado.

2.3 Busca e avaliação dos transcritos referentes aos genes CRT, CRP e AGN no transcrito de *T. rangeli*

Em uma busca preliminar pelos transcritos dos genes da CRT, da CRP e da AGN no transcrito de *T. rangeli*, não foram encontrados transcritos referentes ao gene da AGN, independentemente da forma analisada. Os resultados referentes ao número de transcritos dos genes da CRT e da CRP estão apresentadas na Figura 29.

Figura 28. Box plot da contagem dos transcritos dos genes CRT e CRP nas diferentes formas evolutivas de *Trypanosoma rangeli*. Box plot do log2 das contagens por milhão (eixo y) pelos diferentes grupos (eixo x). As contagens estão representadas pelas médias (losango) mais os intervalos interquartis. Em rosa estão representados os transcritos de tripomastigotas metacíclicos, em verde de epimastigotas e, em azul, de tripomastigotas sanguíneos.



Como é possível perceber, o número de transcritos para CRT apresentam diferenças entre as formas evolutivas, sendo o maior número de transcritos encontrados nas formas epimastigotas presentes na hemolinfa (até três logs de diferença). Os transcritos da CRP não apresentaram diferença entre as formas evolutivas. Salientamos que estes resultados são preliminares e que carecem de confirmação através de RT-qPCR e *western blot* buscando verificar a existência de correspondência entre aumento da transcrição e de expressão.

3 DISCUSSÃO

As publicações dos genomas de tripanosomatídeos, incluindo *T. cruzi* (EL-SAYED et al., 2005) e *T. rangeli* (STOCO et al., 2014) geraram a base para o desenvolvimento de estudos de genômica funcional em larga escala. Métodos tais como deleção gênica, superexpressão, complementação de mutantes, inserção de genes repórteres e determinação da localização celular de proteínas têm se beneficiado da disponibilidade dos genomas e tem contribuído para a caracterização de um grande número de genes para os quais a função não poderia ser atribuída somente com base na similaridade de sequências (TAYLOR; HUANG; KELLY, 2011).

As ferramentas de silenciamento gênico como o RNA de interferência (RNAi) são muito eficazes nos tripanosomatídeos que possuem essa maquinaria funcional como o *T. brucei*. Entretanto, nas espécies em que esta maquinaria não é funcional ou está ausente, como no caso do *T. cruzi* (DAROCHA et al., 2004) e do *T. rangeli* (STOCO et al., 2014) os estudos dependem do desenvolvimento de ferramentas que possibilitem estas abordagens. Entre as ferramentas utilizadas para silenciamento de genes encontra-se o sistema CRISPR/Cas9, que se apresenta como uma promissora ferramenta para análises de genômica funcional. Em especial, esta ferramenta é relevante no estudo das abundantes famílias multigênicas de tripanosomatídeos, as quais estão relacionadas à relevantes aspectos biológicos destes organismos.

O sistema CRISPR/Cas9 é relativamente simples, de baixo custo e proporciona novas possibilidades para pesquisas relacionadas à engenharia genética, apresentando grande potencial para os estudos de genética funcional de parasitos (CUI; YU, 2016). Em *T. cruzi*, já foi demonstrada a capacidade do sistema CRISPR/Cas9 em reduzir os níveis de expressão de uma família gênica composta por 65 membros (PENG et al., 2015).

Peng e colaboradores (2015) demonstraram uma diminuição severa no crescimento dos parasitos *T. cruzi* cepa CL expressando a Cas9, porém, esse efeito pode ser revertido com a deleção do gene utilizando-se da própria proteína. Porém, Burle-Caldas (2016) demonstrou que para o clone CL14 de *T. cruzi*, os parasitos expressando a Cas9 nuclease constitutivamente apresentaram apenas uma pequena redução nos pontos mais tardios da curva de crescimento (acima de 5×10^7 parasitos/ml), indicando que o fenômeno observado por Peng e colaboradores (2015) possa ser cepa-dependente.

Costa e colaboradores (2018) utilizaram um plasmídeo contendo uma T7 RNA polimerase incorporada no sistema CRISPR/Cas9 com o objetivo de criar um sistema com uma abordagem viável e flexível para a edição do genoma de *T. cruzi*. Desta forma, foi possível

inclusive diminuir o tempo de geração de mutantes nulos para menos de 30 dias. Utilizando esta mesma metodologia para geração de mutantes em *T. rangeli*, no presente estudo realizamos a padronização da técnica durante o período de estágio realizado no laboratório do Professor John Morris Kelly na London School of Higiene and Tropical Medicine.

Como controle nestes experimentos, objetivamos realizar a deleção do gene da Fla1BP de *T. rangeli*, proteína cuja ausência permite a observação direta de uma alteração fenotípica evidenciada pelo descolamento do flagelo do corpo celular. Cerca de 1 mês pós-transfecção o fenótipo com flagelo descolado começou a ser observado nas culturas.

Diferentemente do que Costa e colaboradores (2018) obtiveram para *T. cruzi*, em *T. rangeli* após 3 meses de seleção com quantidades crescentes de antibióticos, os resultados indicam que obtivemos apenas a deleção de um alelo de cada gene, tendo gerado parasitos *knockdown* para o gene *TrFLA1BP*. Isto pode ter ocorrido por alguns fatores já descritos na literatura para alguns dos genes. A Calreticulina (CRT) é um gene essencial a sobrevivência de *T. cruzi*, e em várias tentativas de realizar a deleção, apenas parasitos com ao menos um alelo do gene conseguiam sobreviver (SÁNCHEZ VALDÉZ et al., 2013). Provavelmente este também é o caso para *T. rangeli*, especialmente para epimastigotas, uma vez que a análise preliminar do transcrito demonstrou que os transcritos para a CRT nos epimastigotas possuem até 3 logs a mais do que os transcritos presentes nos tripomastigotas metacíclicos e sanguíneos.

Já a CRP, é uma proteína de membrana ancorada no glicosilfosfatidilinositol (GPI), regulada no desenvolvimento e que tem como única função descrita até o momento para *T. cruzi* a proteção do parasito da morte mediada pelo complemento (BEUCHER et al., 2003). Porém, até o momento não foi realizada nenhuma deleção deste gene, então, não existem evidências na literatura sobre a essencialidade deste gene para a sobrevivência de *T. cruzi in vitro*. Desta forma, ainda não é possível afirmar que a deleção monoalélica realizada deste trabalho tem relação direta com a incapacidade do *T. rangeli* de sobreviver sem a presença dos genes codantes para a CRP.

Associado a este fato, a expressão da CRP em *T. cruzi* é regulada através do ciclo evolutivo dos parasitos, sendo expressa somente nas formas tripomastigotas (BEUCHER et al., 2003), sendo este um indicativo de que não é uma proteína essencial para o desenvolvimento destes tripanosomatídeos. Porém, quando analisado o transcrito, podemos ver que os mesmos níveis de RNA são encontrados para todas as formas evolutivas do *T. rangeli*, podendo indicar que a CRP desse parasito pode também ter alguma relação com o complexo ciclo de vida do *T. rangeli* no hospedeiro invertebrado.

A AGN é uma proteína hipotética sem função descrita e domínio conservado conhecido. Desta forma, maiores análises precisam ser realizadas para verificar se esta proteína é essencial para o desenvolvimento *T. rangeli*.

Analisando os fenótipos obtidos por meio dos esfregaços de formas epimastigotas corados com Giemsa podemos ver que para Fla1BP obtivemos o fenótipo esperado de descolamento flagelar, mesmo sem a deleção dos dois alelos destes genes. Os mutantes para AGN também apresentam um fenótipo de descolamento de flagelo, porém ensaios de citolocalização e confirmação de expressão por *western blot* ainda se fazem necessários para ser possível confirmar que esta proteína é expressa e possui uma função putativa em *T. rangeli*, uma vez que seus transcritos não foram encontrados no transcritoma.

Para CRT também não foram observadas grandes alterações morfológicas, porém um grande número de parasitos contendo 2 cinetoplastos e 2 núcleos foram encontrados o que pode indicar um aumento no tempo de replicação. O que é corroborado por Sánchez Valdéz e colaboradores (2013) que detectaram um comprometimento significativo na taxa de crescimento *in vitro* de epimastigotas *T. cruzi* com uma deleção monoalélica da CRT (*TcCRT +/-*) em relação à sua linhagem parental.

A CRP apresenta vários parasitos em processo de divisão, porém com poucas alterações morfológicas visíveis. porém este é uma proteínas estágio específica em *T. cruzi* (BEUCHER et al., 2003), podendo também não ser expressa em epimastigotas de *T. rangeli*.

Não conseguimos obter um número significativo de tripomastigotas após o processo de diferenciação *in vitro* de todas as linhagens *knockdown*. Foram testados dois protocolos diferentes para a diferenciação, um mantendo os antibióticos no meio de diferenciação e um retirando os antibióticos no momento da diferenciação. Porém nenhum dos protocolos foi realizado com sucesso, como é possível perceber nos esfregaços de tripomastigotas corados com Giemsa. Em trabalho anterior realizado no Laboratório de Protozoologia, Stoco (2010) realizou a diferenciação de parasitos sob pressão de drogas seletivas de forma eficiente após retirar a pressão de antibióticos cerca de dois dias antes de realizar o processo de diferenciação. Desta forma, o próximo passo para a obtenção de tripomastigotas será manter os parasitos sem antibiótico dois dias antes de realizar o processo de diferenciação para verificar se dessa forma os parasitos se diferenciarão em taxas maiores.

Além de visualizar o fenótipo, também foi utilizado o antissoro anti-*Tr*Fla1BP para verificar se ainda havia expressão desta proteína nos mutantes. A expressão foi diminuída pela metade, indicando a deleção de apenas um alelo. Porém análises de citolocalização ainda precisam ser realizados para verificar se a FAZ de *T. rangeli* também é afetada pelo *knockdown*

da Fla1BP como *T. brucei*, que tem reduzido o tamanho da FAZ nos parasitos *knockout* para este gene (SUN et al., 2013).

Quando analisada a capacidade de resistência ao SC humano, não observamos um aumento significativo nas taxas de lise dos parasitos. Porém a variação observada pode ter ocorrido devido a sensibilização destes parasitos pela presença dos antibióticos, Stoco (2010) já havia demonstrado que algumas drogas específicas podem alterar processos e até mesmo impedir a diferenciação em *T. rangeli*.

Analisando os resultados para CRT, é possível perceber que não existe uma variação na sobrevivência dos parasitos, o que difere do encontrado por Sánchez Valdéz e colaboradores (2013) para *T. cruzi*, onde eles não demonstraram uma maior ligação de C3b nas membranas, mas sim uma maior susceptibilidade ao SC. Ensaio de lise pelo complemento, onde as três vias do complemento estavam ativas, demonstraram que os parasitos *TcCRT +/-* exibiram maior suscetibilidade à morte, especialmente quando a concentração sérica excedia 10%. Muito provavelmente, os resultados obtidos foram uma consequência da capacidade da *TcCRT* de se ligar e sequestrar C1 do soro, interrompendo a via clássica do complemento (FERREIRA et al., 2004a, 2004b, 2005; VALCK et al., 2010). Assim, a suscetibilidade à lise pelo complemento observada nos parasitos *TcCRT +/-* é provavelmente devida à diminuição do sequestro de C1q do soro produzido pela menor expressão de *TcCRT* na superfície do parasito (SÁNCHEZ VALDÉZ et al., 2013).

Para CRP, não existem dados na literatura sobre parasitos *knockout*. No entanto, existem dados para epimastigotas de *T. cruzi* superexpressando a *TcCRP*, os quais revelaram um aumento na resistência à lise mediada por complemento, confirmando o papel de *TcCRP* como fator de resistência ao complemento de tripomastigotas de *T. cruzi* (NORRIS, 1998; NORRIS; SCHRIMPF; SZABO, 1997). Desta forma, sugere-se a ausência de um dos alelos da *TrCRP* pode levar a parasitos com uma maior susceptibilidade ao SC. Porém a expressão da *TrCRP* em formas epimastigotas ainda precisa ser confirmada para que maiores conclusões sejam feitas.

A metodologia utilizada neste estudo visando a deleção gênica em *T. rangeli* apresentaram apenas resultados parciais. Foi observado com o decorrer do tempo que o *T. rangeli* se adaptou a presença das drogas, especialmente a blasticidina. Tanto a blasticidina quanto a puromicina atuam desligando os complexos de polipeptídeos das unidades ribossomais (AZZAM; ALGRANATI, 1973; SVIDRITSKIY et al., 2013). É possível conjecturar que na hipótese de um antagonismo destas duas moléculas o potencial de ação seja alterado, permitindo que o *T. rangeli* desenvolva resistência a presença de ambas as drogas.

Além desta dificuldade, percebemos que quando realizamos a transfecção dos cassetes de homologia e sgRNA para genes que não tem um fenótipo observável, a seleção dos transfectantes se torna complexa. Dessa forma, foi elaborada uma nova estratégia para a utilização do sistema CRISPR/Cas9 em *T. rangeli*, onde como cassete de homologia, serão utilizados os plasmídeos pROCKGFP contendo genes de resistência a higromicina e G418. Esses antibióticos já vem sendo utilizados em *T. rangeli* e, desta forma, utilizando iniciadores diferentes, poderemos adicionar ou remover o GFP na construção do cassete de homologia. Este novo cassete de homologia está em processo de testes neste momento.

O *T. rangeli* enfrenta diferentes desafios para completar seu ciclo, tanto no hospedeiro invertebrado quanto no mamífero. Nestes diferentes ambientes o parasito necessita lidar tanto com os peptídeos antimicrobianos presentes nos triatomíneos quanto com o sistema imune de mamíferos. Desta forma a regulação da transcrição e da expressão gênica é de extrema importância para o desenvolvimento destes parasitos (GRISARD et al., 2010; STOCO et al., 2014; URREA et al., 2011; VIEIRA et al., 2015).

A regulação da expressão gênica é fundamental para o desenvolvimento e homeostase celular, além de um mecanismo de adaptação ao meio ao qual se encontram. A expressão gênica em eucariotos é controlada por uma regulação dinâmica, incluindo mudanças na cromatina, transcrição do DNA em RNA, processamento do transcrito, transporte para o citoplasma e tradução do RNA mensageiro (mRNA) em proteína (GOMEZ et al., 2010). Tripanosomatídeos, apresentam diferenças com relação a esse perfil, possuindo mecanismos genéticos peculiares. A primeira delas é a organização dos genes codificadores de proteínas em unidades policistrônicas, mas não codificam proteínas com funções relacionadas entre si, portanto, não funcionando como os operons nos procariotos (MARTÍNEZ-CALVILLO et al., 2010).

Uma vez que os genes presentes na mesma unidade policistrônica apresentam níveis de mRNA processados distintos reforça a hipótese de que a regulação seja em nível pós-transcricional (ELIAS et al., 2001). Deste modo, é possível observar que a expressão de alguns genes pode manter-se constante ou aumentar, mesmo com a redução da quantidade dos seus transcritos (ABUIN et al., 1999; RECINOS; KIRCHHOFF; DONELSON, 2001). Também é possível observar proteínas de expressão transiente nas formas em diferenciação (CONTRERAS et al., 1985).

Desta forma, analisando o transcrito de três distintas formas biológicas de *T. rangeli* foi possível detectar transcritos dos genes *TrCRT* e *TrCRP*. Para CRT foi observado um maior número de transcritos em epimastigotas sugerindo uma regulação diferencial entre as diferentes formas evolutivas do parasito. No entanto, estes dados ainda necessitam de validação através

de RT-qPCR e também por *western blot* para verificação dos níveis proteicos nas diferentes formas.

Para que seja possível realizar os ensaios de *western blot*, estamos realizando a produção de proteínas recombinantes que posteriormente serão utilizadas para a imunização de camundongos Balb/c e produção de anticorpo monoclonal direcionado as proteínas de interesse. Até o momento, os ensaios de expressão das proteínas estão sendo realizados buscando padronizar as condições ótimas de expressão.

4 RESUMO DOS RESULTADOS

- A transfecção e edição gênica utilizando o plasmídeo pLEWCas9 de forma transiente se mostrou funcional, apesar de ainda necessitar de otimizações;
- Não foi possível obter uma deleção completa;
- O fenótipo de descolamento de flagelo foi observado na linhagem *knockdown* para Fla1BP;
- Não foi possível realizar a diferenciação *in vitro* das linhagens alteradas de forma eficiente;
- As linhagens *knockdown* dos genes CRT, CRP e AGN não possuem alteração na sensibilidade ao soro humano;

CONCLUSÃO

Com o passar dos anos, avanços contínuos nas pesquisas com o *T. rangeli* ainda não foram capazes de elucidar seu ciclo no hospedeiro mamífero. Neste sentido, entender como o *T. rangeli* se protege como a ação do SC pode ajudar a elucidar os primeiros passos desse parasito no hospedeiro mamífero.

Sabendo-se então que o *T. rangeli* é resistente ao SC de mamíferos e não sendo opsonizado de forma eficiente, as análises preliminares de espectrometria de massas indicam uma possível interação proteína-proteína que media esta resistência.

A partir disso então, utilizar o sistema CRISPR/Cas9 para geração de mutantes não expressando ou expressando parcialmente proteínas com possível atividade de bloqueio do SC de mamíferos, possibilitará utilizar as informações obtidas para compreender o início do ciclo evolutivo do *T. rangeli* no hospedeiro mamífero, já que esta parte do ciclo ainda é pouco conhecida, desta forma abrindo caminhos para o maior entendimento do ciclo do *T. rangeli*.

Apesar da utilização do sistema CRISPR/Cas9 ter se mostrado bem efetiva em *T. rangeli*, otimizações posteriores podem facilitar e diminuir o tempo de seleção destes parasitos.

As análises preliminares presentes neste trabalho se apresentam promissoras para o entendimento da relação do *T. rangeli* com o sistema complemento humano. Porém, análises posteriores ainda se fazem necessárias para confirmar a função destas proteínas na interação do *T. rangeli* com seu hospedeiro mamífero.

PERSPECTIVAS

- Realizar otimizações na aplicação do sistema CRISPR/Cas9 em *T. rangeli*;
- Realizar a expressão heteróloga das proteínas CRT, CRP e AGN de *T. rangeli*;
- Produzir anticorpos monoclonais dirigidos as proteínas CRT, CRP e AGN de *T. rangeli*;
- Realizar a citolocalização das proteínas CRT, CRP e AGN em *T. rangeli*;
- Verificar a capacidade de bloqueio das proteínas CRT, CRP e AGN de *T. rangeli* através de ensaios de bloqueio de sítios de ação;

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABUIN, G. et al. Expression of trans-sialidase and 85-kDa glycoprotein genes in *Trypanosoma cruzi* is differentially regulated at the post-transcriptional level by labile protein factors. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 19, p. 13041–13047, 1999.
- AFCHAIN, D. et al. Antigenic make-up of *Trypanosoma cruzi* culture forms: identification of a specific component. **The Journal of parasitology**, v. 65, n. 4, p. 507–514, ago. 1979.
- AZZAM, M. E.; ALGRANATI, I. D. Mechanism of puromycin action: Fate of ribosomes after release of nascent protein chains from polysomes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 70, n. 12 (II), p. 3866–3869, 1973.
- BAYER-SANTOS, E. et al. Proteomic analysis of *Trypanosoma cruzi* secretome: Characterization of two populations of extracellular vesicles and soluble proteins. **Journal of Proteome Research**, v. 12, n. 2, p. 883–897, 2013.
- BENEKE, T. et al. A CRISPR Cas9 high-throughput genome editing toolkit for kinetoplastids. **Royal Society Open Science**, v. 4, n. 5, p. 1–16, 2017.
- BEUCHER, M. et al. Expression and purification of functional, recombinant *Trypanosoma cruzi* complement regulatory protein. **Protein Expression and Purification**, v. 27, n. 1, p. 19–26, 2003.
- BOTTAZZI, B. et al. An Integrated View of Humoral Innate Immunity: Pentraxins as a Paradigm. **Annual Review of Immunology**, v. 28, n. 1, p. 157–183, 2010.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1–2, p. 248–254, 1976.
- BRITTINGHAM, A. et al. Role of the *Leishmania* surface protease gp63 in complement fixation, cell adhesion, and resistance to complement-mediated lysis. **The Journal of Immunology**, v. 155, p. 3102–3111, 1995.
- BURLE-CALDAS, G. A. et al. Editing the *Trypanosoma cruzi* genome with zinc finger nucleases. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 212, p. 28–32, 2017.
- BURLE-CALDAS, G. DE A. **Edição de genoma em *Trypanosoma cruzi* utilizando nucleases dedo de zinco e o sistema CRISPR/Cas9**. [s.l.] Universidade Federal de Minas Gerais, 2016.
- CESTARI, I. et al. *Trypanosoma cruzi* Immune Evasion Mediated by Host Cell-Derived Microvesicles. **The Journal of Immunology**, v. 188, n. 4, p. 1942–1952, 2012.
- CESTARI, I. DOS S. et al. Complement C2 Receptor Inhibitor Trispanning Confers an Increased Ability to Resist Complement-Mediated Lysis in *Trypanosoma cruzi*. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 198, n. 9, p. 1276–1283, 2008.
- CHAUDHURI, G.; CHANG, K.-P. Acid protease activity of a major surface membrane glycoprotein (gp63) from *Leishmania mexicana* promastigotes. **Molecular and Biochemical**

Parasitology, v. 27, n. 1, p. 43–52, 1988.

CONTRERAS, V. T. et al. In vitro differentiation of *Trypanosoma cruzi* under chemically defined conditions. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 16, n. 3, p. 315–327, 1985.

COOPER, R.; DE JESUS, A. R.; CROSS, G. A. M. Deletion of an immunodominant *Trypanosoma cruzi* surface glycoprotein disrupts flagellum-cell adhesion. **Journal of Cell Biology**, v. 122, n. 1, p. 149–156, 1993.

COSTA, F. C. et al. Expanding the toolbox for *Trypanosoma cruzi*: A parasite line incorporating a bioluminescence-fluorescence dual reporter and streamlined CRISPR/Cas9 functionality for rapid in vivo localisation and phenotyping. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 12, n. 4, p. 1–21, 2018.

CROSS, G. A. M. Identification, purification and properties of clone-specific glycoprotein antigens constituting the surface coat of *Trypanosoma brucei*. **Parasitology**, v. 71, p. 393–417, 1975.

CUBA CUBA, A. Revisión de los aspectos biológicos y diagnósticos del *Trypanosoma (Herpetosoma) rangeli*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 31, n. 2, p. 207–220, 1998.

CUERVO, P. et al. Cellular localization and expression of gp63 homologous metalloproteases in *Leishmania (Viannia) braziliensis* strains. **Acta Tropica**, v. 106, n. 3, p. 143–148, 2008.

CUI, Y.; YU, L. Parasitology International Application of the CRISPR / Cas9 gene editing technique to research on functional genomes of parasites. **Parasitology International**, v. 65, n. 6, p. 641–644, 2016.

D’ALESSANDRO, A. Biology of *Trypanosoma (Herpetosoma) rangeli* Tejera, 1920. In: LUMSDEN, W.; EVANS, D. (Eds.). **Biology of Kinetoplastida, vol. 1**. Londres: Academic Press, 1976. p. 327–403.

D’ALESSANDRO, A.; MANDEL, S. Natural infections and behavior of *Trypanosoma rangeli* and *Trypanosoma cruzi* in the vector *Rhodnius prolixus* in Colombia. **Journal of Parasitology**, v. 55, n. 4, p. 846–52, 1969.

D’ALESSANDRO, A.; SARAVIA, N. G. *Trypanosoma rangeli*. In: GILLES, H. (Ed.). **Protozoal Diseases**. London: Arnold Press, 1999.

DA’DARA, A. A. et al. How schistosomes alter the human serum proteome. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 215, p. 40–46, 2017.

DA SILVA, R. P. et al. CR1, the C3b receptor, mediates binding of infective *Leishmania major* metacyclic promastigotes to human macrophages. **Journal of immunology**, v. 143, n. 2, p. 617–622, 1989.

DAROCHA, W. D. et al. Tests of cytoplasmic RNA interference (RNAi) and construction of a tetracycline-inducible T7 promoter system in *Trypanosoma cruzi*. v. 133, p. 175–186, 2004.

DAVIS, A. E. I.; MEJIA, P.; LU, F. Biological activities of C1 Inhibitor. v. 45, n. 16, p. 4057–4063, 2008.

DE LIMA FERREIRA, L.; PEREIRA, M. H.; GUARNERI, A. A. Revisiting *Trypanosoma rangeli* transmission involving susceptible and non-susceptible hosts. **PLoS ONE**, v. 10, n. 10, p. 1–14, 2015.

DE MORAES, M. H. et al. Different serological cross-reactivity of *Trypanosoma rangeli* forms in *Trypanosoma cruzi*-infected patients sera. **Parasites and Vectors**, v. 1, n. 1, p. 1–10, 2008.

DE OLIVEIRA, M. A.; DE SOUZA, W. An electron microscopic study of penetration by *Trypanosoma rangeli* into midgut cells of *Rhodnius prolixus*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 77, n. 1, p. 22–26, 2001.

DE SOUSA, M. A.; DOS SANTOS PEREIRA, S. M.; DOS SANTOS FAISSAL, B. N. Variable sensitivity to complement-mediated lysis among *Trypanosoma rangeli* reference strains. **Parasitology Research**, v. 110, n. 2, p. 599–608, 2012.

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

EGER-MANGRICH, I. et al. Interaction of *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920 with different cell lines in vitro. **Parasitology Research**, v. 87, n. 6, p. 505–509, 18 maio 2001.

EL-SAYED, N. M. et al. The Genome Sequence of *Trypanosoma cruzi*, Etiologic Agent of Chagas Disease. **Science**, v. 309, n. 5733, p. 409–415, 2005.

ELIAS, M. C. Q. B. et al. Transcription rate modulation through the *Trypanosoma cruzi* life cycle occurs in parallel with changes in nuclear organisation. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 112, n. 1, p. 79–90, 2001.

ELVINGTON, M.; LISZEWSKI, M. K.; ATKINSON, J. P. Evolution of the complement system: from defense of the single cell to guardian of the intravascular space. **Immunological Reviews**, v. 274, n. 1, p. 9–15, nov. 2016.

EVANS-OSES, I.; DE MESSIAS-REASON, I.; RAMIREZ, M. I. The emerging role of complement lectin pathway in trypanosomatids: Molecular bases in activation, genetic deficiencies, susceptibility to infection, and complement system-based therapeutics. **The Scientific World Journal**, v. 2013, 2013.

FERRANTE, A.; ALLISON, A. C. Alternative pathway activation of complement by African trypanosomes lacking a glycoprotein coat. **Parasite Immunology**, v. 5, n. 5, p. 491–498, 1983.

FERREIRA, V. et al. Role of calreticulin from parasites in its interaction with vertebrate hosts. **Molecular Immunology**, v. 40, n. 17, p. 1279–1291, 2004a.

FERREIRA, V. et al. The Classical Activation Pathway of the Human Complement System Is Specifically Inhibited by Calreticulin from *Trypanosoma cruzi*. **The Journal of Immunology**, v. 172, n. 5, p. 3042–3050, 2004b.

FERREIRA, V. et al. Does *Trypanosoma cruzi* calreticulin modulate the complement system and angiogenesis? **Trends in Parasitology**, v. 21, n. 4, p. 169–174, 2005.

FISCHER, E. et al. gp 58/68, a parasite component that contributes to the escape of the trypomastigote form of *T. cruzi* from damage by the human alternative complement pathway. **Immunology**, v. 65, n. 2, p. 299–303, 1988.

FLORES-VILLEGAS, A. L. et al. Immune defence mechanisms of triatomines against bacteria, viruses, fungi and parasites. **Bulletin of Entomological Research**, v. 105, n. 5, p. 523–532, 2015.

FRIEC, G. LE; KEMPER, C. Complement: Coming full circle. **Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis**, v. 57, n. 6, p. 393–407, 2009.

GEIGER, A. et al. Escaping deleterious immune response in their hosts: Lessons from trypanosomatids. **Frontiers in Immunology**, v. 7, n. MAY, p. 1–21, 2016.

GOMEZ, C. et al. Regulation of gene expression in protozoa parasites. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2010, 2010.

GRABHERR, M. G. . et al. Trinity: reconstructing a full-length transcriptome without a genome from RNA-Seq data. **Nature Biotechnology**, v. 29, n. 7, p. 644–652, 2013.

GRISARD, E. C. et al. Characterization of *Trypanosoma rangeli* Strains Isolated in Central and South America: An Overview. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94, n. 2, p. 203–209, 1999.

GRISARD, E. C. et al. Transcriptomic analyses of the avirulent protozoan parasite *Trypanosoma rangeli*. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 174, n. 1, p. 18–25, nov. 2010.

GRISARD, E. C.; STEINDEL, M. *Trypanosoma (Herpetosoma) rangeli*. In: NEVES, D. P. (Ed.). . **Parasitologia Humana**. [s.l: s.n.]. p. 109–114.

GUHL, F.; VALLEJO, G. A. *Trypanosoma (Herpetosoma) rangeli* Tejera, 1920: an updated review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, n. 4, p. 435–42, jun. 2003.

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

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

HOLERS, V. M.; KULIK, L. Complement receptor 2, natural antibodies and innate immunity: Inter-relationships in B cell selection and activation. **Molecular Immunology**, v. 44, n. 1–3, p. 64–72, 2007.

- HORN, D. Antigenic variation in African trypanosomes. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 195, n. 2, p. 123–129, 2014.
- HUANG, Y. et al. Defining the CD59-C9 binding interaction. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 37, p. 27398–27404, 2006.
- HUI, K.-M. et al. Expression of functional recombinant von Willebrand factor-A domain from human complement C2: a potential binding site for C4 and CRIT. **The Biochemical journal**, v. 389, n. Pt 3, p. 863–8, 2005.
- INAL, J. M. et al. Complement C2 Receptor Inhibitor Trispanning: A Novel Human Complement Inhibitory Receptor. **The Journal of Immunology**, v. 174, n. 1, p. 356–366, 2005.
- INAL, J. M.; SCHIFFERLI, J. A. Complement C2 receptor inhibitor trispanning and the beta-chain of C4 share a binding site for complement C2. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 168, n. 10, p. 5213–21, 2002.
- INAL, J. M.; SIM, R. B. A Schistosoma protein, Sh-TOR, is a novel inhibitor of complement which binds human C2. **FEBS Letters**, v. 470, n. 2, p. 131–134, 2000.
- IRIBARREN, P. A. et al. Different proteomic strategies to identify genuine Small Ubiquitin-like Modifier targets and their modification sites in *Trypanosoma brucei* procyclic forms. **Cellular Microbiology**, v. 17, n. 10, p. 1413–1422, 2015.
- ISNARD, A.; SHIO, M. T.; OLIVIER, M. Impact of Leishmania metalloprotease GP63 on macrophage signaling. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 2, n. May, p. 1–9, 2012.
- KALANT, D. et al. C5L2 is a functional receptor for acylation-stimulating protein. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 25, p. 23936–23944, 2005.
- KELLY, J. M. et al. A shuttle vector which facilitates the expression of transfected genes in *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania*. **Nucleic Acids Research**, v. 20, n. 15, p. 3963–3969, 1992.
- KEMPER, C.; ATKINSON, J. P.; HOURCADE, D. E. Properdin: Emerging Roles of a Pattern-Recognition Molecule. **Annual Review of Immunology**, v. 28, n. 1, p. 131–155, 2010.
- KOERICH, L. B. et al. Differentiation of *Trypanosoma rangeli*: high production of infective trypomastigote forms in vitro. **Parasitology research**, v. 88, p. 21–25, 2002.
- KULKARNI, M. M. et al. Fibronectin binding and proteolytic degradation by *Leishmania* and effects on macrophage activation. **Infection and Immunity**, v. 76, n. 4, p. 1738–1747, 2008.
- LAMBRIS, J. D.; RICKLIN, D.; GEISBRECHT, B. V. Complement evasion by human pathogens. **Nature Reviews Microbiology**, v. 29, n. 10, p. 1883–1889, 2008.
- LIDANI, K. C. F. et al. The complement system: A prey of *Trypanosoma cruzi*. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. APR, p. 1–14, 2017.

LÜCKEMEYER, D. D. **Avaliação do perfil proteico de *Trypanosoma rangeli* durante o processo de diferenciação celular *in vitro*.** [s.l: s.n.].

MARTÍNEZ-CALVILLO, S. et al. Gene expression in trypanosomatid parasites. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2010, 2010.

MATHIEU-DAUDÉ, F. et al. Exploring the FL-160-CRP gene family through sequence variability of the complement regulatory protein (CRP) expressed by the trypomastigote stage of *Trypanosoma cruzi*. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 8, n. 3, p. 258–266, 2008.

MEDZHITOV, R.; JANEWAY, C. Innate immunity. **The New England Journal of Medicine**, v. 343, n. 5, p. 338–344, 2000.

MEJIA, J. S. et al. The surface-mosaic model in host-parasite relationships. **Trends in Parasitology**, v. 20, n. 11, p. 508–511, 2004.

MERLE, N. S. et al. Complement system part I - molecular mechanisms of activation and regulation. **Frontiers in Immunology**, v. 6, n. JUN, p. 1–30, 2015.

MICHALAK, M. et al. Calreticulin: one protein, one gene, many functions. **The Biochemical journal**, v. 344 Pt 2, p. 281–92, 1999.

MILNER, J. D.; HAJDUK, S. L. Expression and localization of serum resistance associated protein in *Trypanosoma brucei rhodesiense*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 104, n. 2, p. 271–283, 1999.

MURASE, L. S. et al. The role of metalloproteases in *Leishmania* species infection in the New World: a systematic review. **Parasitology**, v. 63, p. 1–11, 2018.

NORRIS, K. A. Stable transfection of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes with the trypomastigote-specific complement regulatory protein cDNA confers complement resistance. **Infection and Immunity**, v. 66, n. 6, p. 2460–2465, 1998.

NORRIS, K. A.; HARTH, G.; SO, M. Purification of a *Trypanosoma cruzi* membrane glycoprotein which elicits lytic antibodies. **Infection and Immunity**, v. 57, n. 8, p. 2372–2377, 1989.

NORRIS, K. A.; SCHRIMPF, J. E. Biochemical analysis of the membrane and soluble forms of the complement regulatory protein of *Trypanosoma cruzi*. **Infection and Immunity**, v. 62, n. 1, p. 236–243, 1994.

NORRIS, K. A.; SCHRIMPF, J. E.; SZABO, M. J. Identification of the gene family encoding the 160-kilodalton *Trypanosoma cruzi* complement regulatory protein. **Infection and immunity**, v. 65, n. 2, p. 349–57, 1997.

OSORIO, Y. et al. Infectivity of *Trypanosoma rangeli* in a promonocytic mammalian cell line. **The Journal of Parasitology**, v. 81, n. 5, p. 687–693, 1995.

OUAISSI, M. A.; CORNETTE, J.; CAPRON, A. Identification and isolation of *Trypanosoma cruzi* trypomastigote cell surface protein with properties expected of a fibronectin receptor.

Molecular and Biochemical Parasitology, v. 19, n. 3, p. 201–211, 1986.

PENG, D. et al. CRISPR-Cas9-mediated single-gene and gene family disruption in *Trypanosoma cruzi*. **mBio**, v. 6, n. 1, p. 1–11, 2015.

PENG, D.; TARLETON, R. EuPaGDT: a web tool tailored to design CRISPR guide RNAs for eukaryotic pathogens. **Microbial Genomics**, v. 1, n. 4, p. 1–7, 2015.

QU, H.; RICKLIN, D.; LAMBRIS, J. D. Recent Developments in Low Molecular Weight Complement Inhibitors. **Molecular Immunology**, v. 47, p. 185–195, 2009.

RAMÍREZ-TOLOZA, G.; FERREIRA, A. *Trypanosoma cruzi* evades the complement system as an efficient strategy to survive in the mammalian host: The specific roles of host/parasite molecules and *Trypanosoma cruzi* calreticulin. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. SEP, p. 1–13, 2017.

RAMIREZ, M. I. et al. Dynamic flux of microvesicles modulate parasite–host cell interaction of *Trypanosoma cruzi* in eukaryotic cells. **Cellular Microbiology**, v. 19, n. 4, p. 1–15, 2016.
RECINOS, R. F.; KIRCHHOFF, L. V.; DONELSON, J. E. Cell cycle expression of histone genes in *Trypanosoma cruzi*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 113, n. 2, p. 215–222, 2001.

RUSSELL, D. G. The macrophage-attachment glycoprotein gp63 is the predominant C3-acceptor site on *Leishmania mexicana* promastigotes. **European Journal of Biochemistry**, v. 164, n. 1, p. 213–221, 1987.

RUSSELL, D. G.; WILHELM, H. The involvement of the major surface glycoprotein (gp63) of *Leishmania* promastigotes in attachment to macrophages. **The Journal of Immunology**, v. 136, n. 7, p. 2613 LP – 2620, 1 abr. 1986.

SÁNCHEZ VALDÉZ, F. J. et al. *Trypanosoma cruzi* carrying a monoallelic deletion of the calreticulin (*TcCRT*) gene are susceptible to complement mediated killing and defective in their metacyclogenesis. **Molecular Immunology**, v. 53, n. 3, p. 198–205, 2013.

SARMA, J. V.; WARD, P. A. The complement system. **Cell and Tissue Research**, v. 343, n. 1, p. 227–235, 2011.

SCHOTTELIUS, J. Neuraminidase fluorescence test for the differentiation of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli*. **Tropical medicine and parasitology**, v. 38, n. 4, p. 323–327, dez. 1987.

SJÖBERG, A. P.; TROUW, L. A.; BLOM, A. M. Complement activation and inhibition: a delicate balance. **Trends in Immunology**, v. 30, n. 2, p. 83–90, 2009.

STEINDEL, M. et al. *Trypanosoma rangeli* (Tejera, 1920) isolated from a sylvatic rodent (*Echimys dasythrix*) in Santa Catarina Island, Santa Catarina State: first report of this trypanosome in southern Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 1991.

STEINDEL, M. **Caracterização de cepas de *Trypanosoma cruzi* e *Trypanosoma rangeli* isoladas de reservatórios e vetores silvestres naturalmente infectados em Santa Catarina.**

[s.l.] Universidade Federal de Minas Gerais, 1993.

STEVENS, J. R. et al. The taxonomic position and evolutionary relationships of *Trypanosoma rangeli*. **International journal for parasitology**, v. 29, p. 749–757, 1999.

STOCO, P. H. **CARACTERIZAÇÃO DAS DNA TOPOISOMERASES II DE *Trypanosoma rangeli***. [s.l.] Universidade Federal de Santa Catarina, 2010.

STOCO, P. H. et al. Genome of the Avirulent Human-Infective Trypanosome—*Trypanosoma rangeli*. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 9, 2014.

STOCO, P. H. et al. Other Major Trypanosomiasis. In: MARCONDES, C. B. (Ed.). **Arthropod Borne Diseases**. 1. ed. Cham: Springer Nature, 2017. p. 299–324.

SUN, S. Y. et al. An intracellular membrane junction consisting of flagellum adhesion glycoproteins links flagellum biogenesis to cell morphogenesis in *Trypanosoma brucei*. **Journal of Cell Science**, v. 126, n. 2, p. 520–531, 2013.

SVIDRITSKIY, E. et al. Blastocidin S inhibits translation by trapping deformed tRNA on the ribosome. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110, n. 30, p. 12283–12288, 2013.

TAMBOURGI, D. V. et al. A partial cDNA clone of trypomastigote decay-accelerating factor (T-DAF), a developmentally regulated complement inhibitor of *Trypanosoma cruzi*, has genetic and functional similarities to the human complement inhibitor DAF. **Infection and Immunity**, v. 61, n. 9, p. 3656–3663, 1993.

TAYLOR, M. C.; HUANG, H.; KELLY, J. M. Genetic Techniques in *Trypanosoma cruzi*. **Advances in Parasitology**, v. 75, p. 231–250, 2011.

TOBIE, E. J. Observations on the development of *Trypanosoma rangeli* in the hemocoel of *Rhodnius prolixus*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 15, n. 1, p. 118–125, 1970.

TOWBIN, H.; STAEGELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 76, n. 9, p. 4350–4354, 1979.

UENO, N.; WILSON, M. E. Receptor-mediated phagocytosis of *Leishmania*: implications for intracellular survival. **Magn Reson Imaging**, v. 31, n. 3, p. 477–479, 2013.

URDANETA-MORALES, S.; TEJERO, F. *Trypanosoma (herpetosoma) rangeli* Tejera, 1920. Intracellular amastigote stages of reproduction in white mice. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 28, n. 3, p. 166–169, 1986.

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

URREA, D. A. et al. Sequence analysis of the spliced-leader intergenic region (SL-IR) and

random amplified polymorphic DNA (RAPD) of *Trypanosoma rangeli* strains isolated from *Rhodnius ecuadoriensis*, *R. colombiensis*, *R. pallescens* and *R. prolixus* suggests a degree of co-evolution. **Acta Tropica**, v. 120, n. 1–2, p. 59–66, 2011.

VALCK, C. et al. Molecular mechanisms involved in the inactivation of the first component of human complement by *Trypanosoma cruzi* calreticulin. **Molecular Immunology**, v. 47, n. 7–8, p. 1516–1521, 2010.

VALLEJO, G. A. et al. *Trypanosoma rangeli* parasite-vector-vertebrate interactions and their relationship to the systematics and epidemiology of american trypanosomiasis | Interacción tripanosoma-vector-vertebrador y su relación con la sistemática y la epidemiología de la trip. **Biomedica**, v. 27, n. SUPPL. 1, p. 110–118, 2007.

VALLEJO, G. A.; GUHL, F.; SCHAUB, G. A. Triatominae-*Trypanosoma cruzi*/*T. rangeli*: Vector-parasite interactions. **Acta Tropica**, v. 110, n. 2–3, p. 137–147, 2009.

VELGE, P. et al. Identification and isolation of *Trypanosoma cruzi* trypomastigote collagen-binding proteins: Possible role in cell-parasite interaction. **Parasitology**, v. 97, n. 2, p. 255–268, 1988.

VIEIRA, C. S. et al. *Rhodnius prolixus* interaction with *Trypanosoma rangeli*: Modulation of the immune system and microbiota population. **Parasites and Vectors**, v. 8, n. 1, p. 1–13, 2015.

WAGNER, G. et al. The *Trypanosoma rangeli* trypomastigote surfaceome reveals novel proteins and targets for specific diagnosis. **Journal of Proteomics**, v. 82, p. 52–63, 2013.

WALLIS, R. Interactions between mannose-binding lectin and MASPs during complement activation by the lectin pathway. **Immunobiology**, v. 212, n. 4–5, p. 289–299, 2007.

WATKINS, R. Histology of *Rhodnius prolixus* Infected with *Trypanosoma rangeli*. **Journal of invertebrate pathology**, v. 17, p. 59–66, 1971.

ZIPFEL, P. F. Complement and immune defense: From innate immunity to human diseases. **Immunology Letters**, v. 126, n. 1–2, p. 1–7, 2009.

APÊNDICE A - Tabela de proteínas identificadas por MS na análise em solução das formas epimastigotas, tripomastigotas diferenciados *in vitro*, metacíclicos e sanguíneos de *Trypanosoma rangeli* obtidos a partir do ensaio de co-adsorção, com suas respectivas massas moleculares relativas (MW) teóricas e potenciais isoelétricos (pI).

Número de Acesso	Descrição	MW	IP
AAA85332.1		187164,1	6,335
AAD17500.1	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, putative	36987,59	8,465
ADD83084.1	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, putative	30492,76	8,952
AGN32880.1	ras-related protein RAB1A, putative	22470,49	6,466
AGN32887.1	hypothetical protein, conserved	34101,35	4,842
AGN32904.1	glycosomal membrane protein, putative	26559,12	8,677
AGN32923.1	hypothetical protein, conserved	87431,55	4,52
AGN32951.1	Mitochondrial outer membrane protein porin, putative	29719,21	9,416
AGN32962.1	surface protein TolT	34106,79	6,162
AGN32974.1	hypothetical protein	35514,56	9,512
AGN32984.1	trans-sialidase, Group II, putative	84007,24	6,587
AGN32991.1	surface protease GP63, putative	61140	6,817
AGN32997.1	trans-sialidase, Group II, putative	32078,07	6,64
AGN32998.1	surface protease GP63, putative	47612,3	7,889
AGN33007.1	surface protease GP63, putative	43855,24	8,239
ALU67517.1	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, putative	29133,1	8,981
ALU67521.1	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, putative	29091,14	9,22
ESL05063.1	hypothetical protein, conserved (fragment)	43324,98	5,984
ESL05141.1		34036,24	5,193
ESL05667.1	cytoskeleton-associated protein CAP5.5, putative	88012,34	4,581
ESL06069.1	cytoskeleton-associated protein CAP5.5, putative	87755,05	4,576
ESL06144.1	flagellar calcium-binding 24 kDa protein	23296,2	4,776
ESL06249.1	hypothetical protein, conserved	32483	10,003
ESL06378.1		42861,18	9,585
ESL06441.1		28442,24	4,937
ESL06591.1	mitochondrial processing peptidase, beta subunit, putative	36301,05	8,128
ESL06635.1	ATP synthase F1 subunit gamma protein, putative	34706,62	9,911
ESL06981.1	40S ribosomal protein SA, putative	27907,22	8,152
ESL07142.1		89073,11	6,256
ESL07200.1	calreticulin, putative	45366,58	4,347
ESL07312.1	paraxonemal rod protein PAR2, putative	23134,35	6,762
ESL07366.1	citrate synthase, putative	52269,41	8,744
ESL07451.1	surface protein TolT	24835,85	5,496
ESL07464.1	prohibitin, putative	32778,83	9,429
ESL07475.1	heat shock protein 60	64660,48	5,487
ESL07500.1	Paraflagellar rod protein 2	68747,1	5,958
ESL07732.1	elongation factor 1-alpha, putative	41289,13	8,644
ESL08275.1		63309,49	12,606
ESL08562.1	heat shock protein 70 (hsp70), putative	71499,19	4,838
ESL08706.1	beta tubulin, putative	35285,16	5,747
ESL08950.1	cytochrome oxidase subunit IV, putative	38990,6	5,615
ESL09558.1	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, putative	35046,84	9,554

ESL09670.1	beta tubulin, putative	27953,78	4,763
ESL09713.1	tryparedoxin peroxidase, putative	20573,8	7,061
ESL09781.1	beta tubulin, putative	16949,24	4,486
ESL09837.1	mitochondrial malate dehydrogenase,putative	33194,41	8,468
ESL10022.1	L-threonine 3-dehydrogenase,putative	36870,6	7,604
ESL10061.1	mitochondrial processing peptidase alpha subunit, putative	50977,6	7,993
ESL10143.1	beta tubulin, putative	22326,93	4,189
ESL10160.1		27548,72	9,361
ESL10228.1	Paraflagellar rod protein 2	44162,15	6,109
ESL10262.1	hypothetical protein, conserved	30322,27	9,11
ESL10561.1	ATP synthase subunit beta, mitochondrial,putative	55671,55	5,037
ESL10595.1	ATP synthase F1, alpha subunit, putative (pseudogene)	64884,14	9,961
ESL10653.1	paraflagellar rod component, putative	67992,9	4,94
ESL10705.1	ribonuclease inhibitor-like protein,putative	119059,72	4,792
ESL10875.1	elongation factor 1-alpha, putative	52751,96	9,1
ESL11451.1	elongation factor 1-alpha, putative	33132,29	9,118
ESL11520.1	heat shock protein 85, putative	81178,05	4,798
ESL11683.1		30152,23	9,174
ESL11753.1	hypothetical protein, conserved	27149,71	5,828
ESL11832.1		109106,18	5,631
ESL11890.1	paraflagellar rod component par4,putative	57509,91	5,022
ESL11899.1	Flagellar calcium-binding protein(fragment)	10091,16	3,814
ESL11989.1	heat shock protein 85, putative	71917,53	4,81
ESL12200.1	actin 3, putative (fragment)	41981,01	5,462
ESL12225.1	ATP synthase F1, alpha subunit, putative (pseudogene)	52477,06	10,014
NP_002272.2		54928,28	5,142
P00330.5	NADP-dependent alcohol hydrogenase,putative	36849,17	6,648
P00761.1		24409,48	7,119
P02745.2		26016,57	9,425
P02746.3		26721,76	8,773
P02747.3		25773,65	8,453
Q27052.1	flagellar calcium-binding 24 kDa protein	23119,98	4,7
g1698.t1	flagellum targeting protein kharon1,putative	44033,67	10,321
g1727.t1		40954,5	6,237
g2545.t1	tryparedoxin peroxidase, putative	22343,77	6,691
g2966.t1	tricarboxylate carrier, putative	34333,12	9,767
g3779.t1	hypothetical protein, conserved (fragment)	47010,19	6,145
g3805.t1	trans-sialidase, Group II, putative	53919,52	4,848
g3945.t1	Mitochondrial outer membrane protein porin, putative	21369,57	9,517
g4632.t1	surface protease GP63, putative	53763,21	6,225
g5302.t1	trans-sialidase, Group II, putative	45677,1	4,482
g6223.t1	Paraflagellar rod protein 2	69270,89	6,233
g6361.t1	trans-sialidase, Group II, putative	77829,44	9,366

APÊNDICE B - Tabela de proteínas identificadas por MS na análise em gel das formas epimastigotas de *Trypanosoma rangeli* obtidos a partir do ensaio de co-adsorção, com suas respectivas massas moleculares relativas (MW) teóricas e potenciais isoelétricos (pI).

Número de Acesso	Descrição	MW	IP
AAD17500.1	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase,putative	36987,59	8,465
AAR87495.1	heat shock protein 70 (hsp70),putative	27489,08	5,029
ADD83084.1	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase,putative	30492,76	8,952
AGN32887.1	hypothetical protein, conserved	34101,35	4,842
AGN32904.1	glycosomal membrane protein, putative	26559,12	8,677
AGN32951.1	Mitochondrial outer membrane protein porin, putative	29719,21	9,416
AGN33007.1	surface protease GP63, putative	43855,24	8,239
ESL05687.1	hypothetical protein, conserved	328542,25	7,209
ESL05938.1		286452,77	6,959
ESL06069.1	cytoskeleton-associated protein CAP5.5,putative	87755,05	4,576
ESL06441.1		28442,24	4,937
ESL06601.1	hypothetical protein, conserved	149359,83	7,346
ESL07107.1		92872,38	4,699
ESL07142.1		89073,11	6,256
ESL07170.1	hypothetical protein, conserved	106527,37	6,589
ESL07200.1	calreticulin, putative	45366,58	4,347
ESL07312.1	paraxonemal rod protein PAR2, putative	23134,35	6,762
ESL07475.1	heat shock protein 60	64660,48	5,487
ESL07500.1	Paraflagellar rod protein 2	68747,1	5,958
ESL08008.1	hypothetical protein	176018,66	7,507
ESL08541.1	hypothetical protein, conserved	102343,31	4,787
ESL08706.1	beta tubulin, putative	35285,16	5,747
ESL08950.1	cytochrome oxidase subunit IV,putative	38990,6	5,615
ESL09024.1	hypothetical protein, conserved	171347,42	4,88
ESL09670.1	beta tubulin, putative	27953,78	4,763
ESL09713.1	tryparedoxin peroxidase, putative	20573,8	7,061
ESL09781.1	beta tubulin, putative	16949,24	4,486
ESL09837.1	mitochondrial malate dehydrogenase,putative	33194,41	8,468
ESL09911.1	SWI/SNF-related matrix-associated actin-dependent regulator of chromatin subfamily-related,putative	116229,7	6,297
ESL10022.1	L-threonine 3-dehydrogenase,putative	36870,6	7,604
ESL10143.1	beta tubulin, putative	22326,93	4,189
ESL10160.1		27548,72	9,361
ESL10228.1	Paraflagellar rod protein 2	44162,15	6,109
ESL10561.1	ATP synthase subunit beta, mitochondrial,putative	55671,55	5,037
ESL10653.1	paraflagellar rod component, putative	67992,9	4,94
ESL11125.1	DNA repair helicase, putative	114621,23	7,541
ESL11341.1		106043,75	8,141
ESL11451.1	elongation factor 1-alpha, putative	33132,29	9,118
ESL11520.1	heat shock protein 85, putative	81178,05	4,798
ESL11832.1		109106,18	5,631
NP_002272.2		54928,28	5,142
P00330.5	NADP-dependent alcohol hydrogenase,putative	36849,17	6,648
P00761.1		24409,48	7,119
Q27052.1	flagellar calcium-binding 24 kDa protein	23119,98	4,7

g3364.t1	dynein heavy chain, putative	538140,96	6,225
g4214.t1	hypothetical protein, conserved	188610,56	6,295
g6223.t1	Paraflagellar rod protein 2	69270,89	6,233
g6277.t1	hypothetical protein, conserved	357847,5	7,073

APÊNDICE C- Tabela de proteínas identificadas por MS na análise em gel das formas tripomastigotas diferenciados *in vitro* de *Trypanosoma rangeli* obtidos a partir do ensaio de co-adsorção, com suas respectivas massas moleculares relativas (MW) teóricas e potenciais isoelétricos (pI).

Número de Acesso	Descrição	MW	IP
AAD17500.1	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase,putative	36987,59	8,465
ACO87650.1	trans-sialidase, Group II, putative	75397,75	6,506
AGN32887.1	hypothetical protein, conserved	34101,35	4,842
AGN32923.1	hypothetical protein, conserved	87431,55	4,52
AGN32951.1	Mitochondrial outer membrane protein porin, putative	29719,21	9,416
AGN32974.1	hypothetical protein	35514,56	9,512
AGN32984.1	trans-sialidase, Group II, putative	84007,24	6,587
AGN32996.1	trans-sialidase, Group I, putative	36050,79	4,773
AGN32997.1	trans-sialidase, Group II, putative	32078,07	6,64
AGN33007.1	surface protease GP63, putative	43855,24	8,239
AGO14644.1	heat shock protein 70 (hsp70),putative	50623,04	5,114
ESL05063.1	hypothetical protein, conserved (fragment)	43324,98	5,984
ESL05141.1		34036,24	5,193
ESL06069.1	cytoskeleton-associated protein CAP5.5,putative	87755,05	4,576
ESL06144.1	flagellar calcium-binding 24 kDa protein	23296,2	4,776
ESL06378.1		42861,18	9,585
ESL06441.1		28442,24	4,937
ESL06512.1	flagellar protofilament ribbon protein, putative	46483,98	6,641
ESL06591.1	mitochondrial processing peptidase,beta subunit, putative	36301,05	8,128
ESL06635.1	ATP synthase F1 subunit gamma protein,putative	34706,62	9,911
ESL06981.1	40S ribosomal protein SA, putative	27907,22	8,152
ESL07449.1	hypothetical protein, conserved	170814,22	6,569
ESL07451.1	surface protein TolT	24835,85	5,496
ESL07464.1	prohibitin, putative	32778,83	9,429
ESL07500.1	Paraflagellar rod protein 2	68747,1	5,958
ESL07795.1	hypothetical protein, conserved	54427,97	6,15
ESL08008.1	hypothetical protein	176018,66	7,507
ESL08562.1	heat shock protein 70 (hsp70),putative	71499,19	4,838
ESL08706.1	beta tubulin, putative	35285,16	5,747
ESL08950.1	cytochrome oxidase subunit IV,putative	38990,6	5,615
ESL09670.1	beta tubulin, putative	27953,78	4,763
ESL09781.1	beta tubulin, putative	16949,24	4,486
ESL10022.1	L-threonine 3-dehydrogenase,putative	36870,6	7,604
ESL10061.1	mitochondrial processing peptidase alpha subunit, putative	50977,6	7,993
ESL10143.1	beta tubulin, putative	22326,93	4,189
ESL10228.1	Paraflagellar rod protein 2	44162,15	6,109
ESL10262.1	hypothetical protein, conserved	30322,27	9,11
ESL10269.1		45118,08	6,808
ESL10561.1	ATP synthase subunit beta, mitochondrial,putative	55671,55	5,037
ESL10653.1	paraflagellar rod component, putative	67992,9	4,94

ESL10705.1	ribonuclease inhibitor-like protein,putative	119059,72	4,792
ESL10816.1	kinesin, putative (fragment)	211553,12	7,633
ESL10875.1	elongation factor 1-alpha, putative	52751,96	9,1
ESL11451.1	elongation factor 1-alpha, putative	33132,29	9,118
ESL11683.1		30152,23	9,174
ESL11753.1	hypothetical protein, conserved	27149,71	5,828
ESL11766.1	Enkuring domain-containig protein	44297,89	9,863
ESL11890.1	paraflagellar rod component par4,putative	57509,91	5,022
ESL11995.1	STOP axonemal protein, putative	29968,01	8,577
ESL12200.1	actin 3, putative (fragment)	41981,01	5,462
ESL12225.1	ATP synthase F1, alpha subunit, putative (pseudogene)	52477,06	10,014
P00330.5	NADP-dependent alcohol hydrogenase,putative	36849,17	6,648
Q27052.1	flagellar calcium-binding 24 kDa protein	23119,98	4,7
g1727.t1		40954,5	6,237
g348.t1	ATP-dependent DEAD/H RNA helicase,putative	61299,1	9,458
g3779.t1	hypothetical protein, conserved (fragment)	47010,19	6,145
g6223.t1	Paraflagellar rod protein 2	69270,89	6,233
g6277.t1	hypothetical protein, conserved	357847,5	7,073

APÊNDICE D - Tabela de proteínas identificadas por MS na análise em gel das formas tripomastigotas metacíclicas de *Trypanosoma rangeli* obtidos a partir do ensaio de co-adsorção, com suas respectivas massas moleculares relativas (MW) teóricas e potenciais isoelétricos (pI).

Número de Acesso	Descrição	MW	IP
AAD17500.1	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase,putative	36987,59	8,465
AAR87495.1	heat shock protein 70 (hsp70),putative	27489,08	5,029
AAX40414.1	elongation factor 1-alpha, putative	49094,73	9,212
ABL74475.1	heat shock protein 70 (hsp70),putative	72200,59	5,154
ADD83084.1	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase,putative	30492,76	8,952
AGN32880.1	ras-related protein RAB1A, putative	22470,49	6,466
AGN32882.1	I/6 autoantigen, putative	21942,84	5,02
AGN32886.1	ADP-ribosylation factor 1, putative	20686,85	8,445
AGN32887.1	hypothetical protein, conserved	34101,35	4,842
AGN32904.1	glycosomal membrane protein, putative	26559,12	8,677
AGN32914.1	rieske iron-sulfur protein,mitochondrial precursor, putative	33661,66	6,6
AGN32925.1	lysosomal/endosomal membrane protein p67 (pseudogene),putative	71472,74	6,914
AGN32931.1	beta tubulin, putative	49813,35	4,696
AGN32934.1	unspecified product	34112,32	8,776
AGN32935.1	SPFH domain / Band 7 family protein,putative	41938,49	9,362
AGN32951.1	Mitochondrial outer membrane protein porin, putative	29719,21	9,416
AGN32974.1	hypothetical protein	35514,56	9,512
AGN32982.1	heat shock protein DNAJ, putative	44235,21	7,38
AGN32989.1	heat shock 70 kDa protein, mitochondrial precursor, putative	55415,46	4,861
AGN33007.1	surface protease GP63, putative	43855,24	8,239
AGO14644.1	heat shock protein 70 (hsp70),putative	50623,04	5,114
ESL05141.1		34036,24	5,193
ESL05222.1	High mobility group protein TDP1	30500,81	10,4
ESL05255.1	trans-sialidase, putative (fragment)	44276,59	6,83
ESL05298.1	40S ribosomal protein S3A, putative	36951,22	10,244
ESL05452.1	hypothetical protein, conserved	110318,75	5,457
ESL05619.1	calmodulin, putative (fragment)	72085,05	4,331
ESL05730.1		33573,62	4,851
ESL05732.1	40S ribosomal protein S2, putative	18877,02	10,621
ESL05832.1	hypothetical protein, conserved	157187,1	7,834
ESL05845.1	phosphatidylinositol 3-related kinase, putative	258934,54	6,655
ESL05883.1	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase,cytosolic, putative	35706,03	8,6
ESL05975.1	Mitochondrial ADP/ATP carrier protein 5, putative	34497,52	10,319
ESL06069.1	cytoskeleton-associated protein CAP5.5,putative	87755,05	4,576
ESL06076.1	60S ribosomal protein L4, putative(fragment)	41392,24	12,064
ESL06144.1	flagellar calcium-binding 24 kDa protein	23296,2	4,776
ESL06217.1	hypothetical protein, conserved	35188,3	9,909
ESL06245.1	hypothetical protein, conserved	32032,71	4,624
ESL06378.1		42861,18	9,585
ESL06441.1		28442,24	4,937
ESL06601.1	hypothetical protein, conserved	149359,83	7,346
ESL06627.1	mitochondrial phosphate transporter,putative	34462,18	9,503

ESL06631.1	ras-related protein Rab21, putative	25909,3	8,78
ESL06635.1	ATP synthase F1 subunit gamma protein, putative	34706,62	9,911
ESL06645.1	hypothetical protein, conserved	42963,59	10,187
ESL06883.1	ribosomal protein L21E (60S), putative	18023,09	11,28
ESL06900.1		21561,63	6,694
ESL06981.1	40S ribosomal protein SA, putative	27907,22	8,152
ESL07142.1		89073,11	6,256
ESL07312.1	paraxonemal rod protein PAR2, putative	23134,35	6,762
ESL07390.1		18147,56	10,934
ESL07451.1	surface protein TolT	24835,85	5,496
ESL07454.1	Succinate dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein subunit, mitochondrial (fragment)	66983,87	6,644
ESL07475.1	heat shock protein 60	64660,48	5,487
ESL07500.1	Paraflagellar rod protein 2	68747,1	5,958
ESL07508.1	40S ribosomal protein S5, putative	21266,65	11,014
ESL07652.1	hypothetical protein, conserved	17489,98	9,374
ESL07655.1		29452	10,893
ESL07717.1	dolicholphosphate-mannose synthase, putative	29035,81	7,105
ESL07861.1	mitochondrial processing peptidase, beta subunit, putative	35961,59	6,724
ESL08255.1		13363,65	10,512
ESL08356.1	heat shock 70 kDa protein, mitochondrial precursor, putative	25490,1	4,897
ESL08479.1		223564,53	6,723
ESL08488.1	hypothetical protein, conserved	27308,37	9,982
ESL08562.1	heat shock protein 70 (hsp70), putative	71499,19	4,838
ESL08686.1	DnaJ homolog, putative	35887,71	5,807
ESL08706.1	beta tubulin, putative	35285,16	5,747
ESL08731.1	60S ribosomal protein L7a, putative	30611,07	11,641
ESL08781.1	hypothetical protein, conserved	127780,36	6,152
ESL08950.1	cytochrome oxidase subunit IV, putative	38990,6	5,615
ESL08998.1	beta tubulin, putative	20428,91	4,429
ESL09021.1	hypothetical protein, conserved	39605,6	5,336
ESL09055.1	hypothetical protein, conserved	28444,7	6,296
ESL09238.1	40S ribosomal protein S9, putative	22151,79	11,14
ESL09488.1	60S ribosomal protein L18a, putative	20746,18	10,722
ESL09670.1	beta tubulin, putative	27953,78	4,763
ESL09713.1	tryparedoxin peroxidase, putative	20573,8	7,061
ESL09716.1	hypothetical protein, conserved	36893,42	6,091
ESL09781.1	beta tubulin, putative	16949,24	4,486
ESL09837.1	mitochondrial malate dehydrogenase, putative	33194,41	8,468
ESL10011.1	hypothetical protein, conserved	70146,65	5,986
ESL10013.1	membrane-bound acid phosphatase 2, putative	56221,1	7,92
ESL10022.1	L-threonine 3-dehydrogenase, putative	36870,6	7,604
ESL10061.1	mitochondrial processing peptidase alpha subunit, putative	50977,6	7,993
ESL10143.1	beta tubulin, putative	22326,93	4,189
ESL10160.1		27548,72	9,361
ESL10182.1	Radial spoke protein 11	19151,35	4,01
ESL10207.1	60S ribosomal protein L7, putative	27920	11,359
ESL10228.1	Paraflagellar rod protein 2	44162,15	6,109
ESL10247.1	hypothetical protein, conserved	74979,96	7,1
ESL10262.1	hypothetical protein, conserved	30322,27	9,11
ESL10330.1	mitochondrial processing peptidase alpha subunit, putative	58111,68	7,672

ESL10441.1	ATP-dependent 6-phosphofructokinase, glycosomal (pseudogene)	53561,83	9,672
ESL10561.1	ATP synthase subunit beta, mitochondrial, putative	55671,55	5,037
ESL10586.1	adenylate kinase 1	28953,18	6,278
ESL10653.1	paraflagellar rod component, putative	67992,9	4,94
ESL10705.1	ribonuclease inhibitor-like protein, putative	119059,72	4,792
ESL11075.1	60S ribosomal protein L18, putative	21667,46	12,227
ESL11113.1	leucine-rich repeat protein, putative	26033,93	5,562
ESL11245.1	40S ribosomal protein S4, putative	30775,16	11,022
ESL11298.1	Regulatory particle triple-A ATPase subunit 6	45379,31	8,964
ESL11445.1	hypothetical protein, conserved	57753,7	8,46
ESL11451.1	elongation factor 1-alpha, putative	33132,29	9,118
ESL11562.1	60S ribosomal protein L9, putative	13006,04	8,921
ESL11592.1	hypothetical protein, conserved	31882,24	4,591
ESL11594.1	Histone H2B variant V	12396,33	12,117
ESL11783.1	proteasome regulatory ATPase subunit 3, putative	44275,62	6,908
ESL11845.1	40S ribosomal protein S8, putative	25340,73	11,633
ESL11879.1	phosphoenolpyruvate mutase, putative	32772,59	6,602
ESL11890.1	paraflagellar rod component par4, putative	57509,91	5,022
ESL11899.1	Flagellar calcium-binding protein (fragment)	10091,16	3,814
ESL11948.1	flagellar pocket cytoskeletal protein bilbo1	66389,68	5,329
ESL11995.1	STOP axonemal protein, putative	29968,01	8,577
ESL12116.1	calmodulin	16824,59	3,857
ESL12200.1	actin 3, putative (fragment)	41981,01	5,462
ESL12225.1	ATP synthase F1, alpha subunit, putative (pseudogene)	52477,06	10,014
P00330.5	NADP-dependent alcohol hydrogenase, putative	36849,17	6,648
Q27052.1	flagellar calcium-binding 24 kDa protein	23119,98	4,7
g10.t1	40S ribosomal protein S6, putative	28428,24	11,745
g1727.t1		40954,5	6,237
g1852.t1	GMP reductase	46330,9	8,425
g1931.t1	hypothetical protein, conserved	79757,85	6,739
g2498.t1	hypothetical protein, conserved	25952,09	4,585
g2826.t1	surface protease GP63, putative	46088,17	8,077
g2966.t1	tricarboxylate carrier, putative	34333,12	9,767
g3702.t1	fibrillarin, putative	15335,94	9,405
g4548.t1	radial spoke protein 3, putative	39210,54	6,396
g4736.t1		31389,17	7,989
g6223.t1	Paraflagellar rod protein 2	69270,89	6,233
g6372.t1	trans-sialidase, Group I, putative	75564	5,193

APÊNDICE E -Tabela de proteínas identificadas por MS na análise em gel das formas tripomastigotas sanguíneas de *Trypanosoma rangeli* obtidos a partir do ensaio de co-adsorção, com suas respectivas massas moleculares relativas (MW) teóricas e potenciais isoelétricos (pI).

Número de Acesso	Descrição	MW	IP
AAA30264.1	beta tubulin, putative	6010,13	10,473
AAA85332.1		187164,11	6,335
AAD17500.1	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase,putative	36987,59	8,465
AAN46819.1	histone H2A, putative	14448,97	12,261
AAR87495.1	heat shock protein 70 (hsp70),putative	27489,08	5,029
ADD83084.1	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase,putative	30492,76	8,952
AGN32880.1	ras-related protein RAB1A, putative	22470,49	6,466
AGN32882.1	I/6 autoantigen, putative	21942,84	5,02
AGN32886.1	ADP-ribosylation factor 1, putative	20686,85	8,445
AGN32887.1	hypothetical protein, conserved	34101,35	4,842
AGN32904.1	glycosomal membrane protein, putative	26559,12	8,677
AGN32914.1	rieske iron-sulfur protein,mitochondrial precursor, putative	33661,66	6,6
AGN32915.1		22285,47	9,972
AGN32923.1	hypothetical protein, conserved	87431,55	4,52
AGN32929.1	Ras-related protein Rab4, putative	23803,7	5,07
AGN32934.1	unspecified product	34112,32	8,776
AGN32935.1	SPFH domain / Band 7 family protein,putative	41938,49	9,362
AGN32943.1	heat shock protein 60	59702,42	5,145
AGN32948.1	histone H4, putative	11154,09	11,651
AGN32951.1	Mitochondrial outer membrane protein porin, putative	29719,21	9,416
AGN32974.1	hypothetical protein	35514,56	9,512
AGN32982.1	heat shock protein DNAJ, putative	44235,21	7,38
AGN32986.1	Calcium ATPase SERCA-like	32239,74	5,284
AGN32989.1	heat shock 70 kDa protein, mitochondrial precursor, putative	55415,46	4,861
AGN33003.1	trans-sialidase, Group I, putative	70345,94	6,336
AGO14644.1	heat shock protein 70 (hsp70),putative	50623,04	5,114
ESL05063.1	hypothetical protein, conserved (fragment)	43324,98	5,984
ESL05222.1	High mobility group protein TDP1	30500,81	10,4
ESL05298.1	40S ribosomal protein S3A, putative	36951,22	10,244
ESL05386.1	protein kinase, putative	167321,77	7,378
ESL05619.1	calmodulin, putative (fragment)	72085,05	4,331
ESL05661.1	60S ribosomal protein L9, putative	21915,42	10,812
ESL05730.1		33573,62	4,851
ESL05732.1	40S ribosomal protein S2, putative	18877,02	10,621
ESL05848.1	aspartyl-tRNA synthetase, putative	32222,64	4,857
ESL05892.1	dynein heavy chain, putative (fragment)	508990,65	5,942
ESL05934.1	acetyl-CoA carboxylase (fragment)	163430,44	6,345
ESL05975.1	Mitochondrial ADP/ATP carrier protein 5, putative	34497,52	10,319
ESL06065.1	pyruvate phosphate dikinase,putative	101036,54	8,276
ESL06069.1	cytoskeleton-associated protein CAP5.5,putative	87755,05	4,576
ESL06076.1	60S ribosomal protein L4, putative(fragment)	41392,24	12,064

ESL06087.1	Calcium ATPase SERCA-like	48649,39	6,246
ESL06144.1	flagellar calcium-binding 24 kDa protein	23296,2	4,776
ESL06217.1	hypothetical protein, conserved	35188,3	9,909
ESL06245.1	hypothetical protein, conserved	32032,71	4,624
ESL06249.1	hypothetical protein, conserved	32483	10,003
ESL06356.1	hypothetical protein, conserved	59674,1	8,183
ESL06372.1	ULK family serine/threonine-protein kinase, putative	126539,54	7,708
ESL06378.1		42861,18	9,585
ESL06430.1	2-amino-3-ketobutyrate coenzyme A ligase, putative	43825,4	7,741
ESL06441.1		28442,24	4,937
ESL06512.1	flagellar protofilament ribbon protein, putative	46483,98	6,641
ESL06516.1	beta tubulin, putative	40863,5	5,083
ESL06591.1	mitochondrial processing peptidase,beta subunit, putative	36301,05	8,128
ESL06627.1	mitochondrial phosphate transporter,putative	34462,18	9,503
ESL06635.1	ATP synthase F1 subunit gamma protein,putative	34706,62	9,911
ESL06645.1	hypothetical protein, conserved	42963,59	10,187
ESL06883.1	ribosomal protein L21E (60S),putative	18023,09	11,28
ESL06900.1		21561,63	6,694
ESL06972.1		18953,19	10,542
ESL07133.1	serine peptidase, Clan SJ, family S16, putative	44802,63	6,666
ESL07142.1		89073,11	6,256
ESL07166.1	40S ribosomal protein S3, putative	27214,82	10,741
ESL07200.1	calreticulin, putative	45366,58	4,347
ESL07217.1	kinesin, putative	148406,3	6,375
ESL07283.1	hypothetical protein, conserved	65313,59	6,897
ESL07324.1	hypothetical protein, conserved	35578,44	6,823
ESL07325.1	Phosphoenolpyruvate carboxykinase[ATP], glycosomal	58512,08	8,325
ESL07383.1	kinesin, putative	112359,53	9,62
ESL07390.1		18147,56	10,934
ESL07451.1	surface protein TolT	24835,85	5,496
ESL07454.1	Succinate dehydrogenase [ubiquinone]flavoprotein subunit, mitochondrial (fragment)	66983,87	6,644
ESL07464.1	prohibitin, putative	32778,83	9,429
ESL07475.1	heat shock protein 60	64660,48	5,487
ESL07500.1	Paraflagellar rod protein 2	68747,1	5,958
ESL07508.1	40S ribosomal protein S5, putative	21266,65	11,014
ESL07539.1	AAA ATPase, putative	88962,75	5,537
ESL07648.1	hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase,putative	26228,26	8,583
ESL07652.1	hypothetical protein, conserved	17489,98	9,374
ESL07739.1	peroxidoxin	25595,39	8,002
ESL07861.1	mitochondrial processing peptidase,beta subunit, putative	35961,59	6,724
ESL07873.1	hypothetical protein, conserved	24740,35	4,836
ESL07884.1	hypothetical protein, conserved	61219,9	9,098
ESL08189.1	ATP-dependent DEAD/H RNA helicase (pseudogene), putative	46624,53	7,455
ESL08457.1	hypothetical protein, conserved	14878,95	6,434
ESL08460.1	hypothetical protein, conserved	43238,27	8,196
ESL08488.1	hypothetical protein, conserved	27308,37	9,982
ESL08506.1	hypothetical protein, conserved	27784,52	4,866
ESL08547.1	Mitochondrial import receptor subunit ATOM46, putative	45631,76	7,616
ESL08562.1	heat shock protein 70 (hsp70),putative	71499,19	4,838
ESL08686.1	DnaJ homolog, putative	35887,71	5,807

ESL08692.1	cyclosome subunit, putative (fragment)	201147,2	7,128
ESL08706.1	beta tubulin, putative	35285,16	5,747
ESL08717.1	hypothetical protein, conserved	109104,27	6,801
ESL08731.1	60S ribosomal protein L7a, putative	30611,07	11,641
ESL08837.1	calpain-like cysteine peptidase, putative	12736,33	4,616
ESL08950.1	cytochrome oxidase subunit IV, putative	38990,6	5,615
ESL09021.1	hypothetical protein, conserved	39605,6	5,336
ESL09055.1	hypothetical protein, conserved	28444,7	6,296
ESL09159.1		30018,01	6,832
ESL09359.1	fibrillar, putative	30549,55	10,383
ESL09377.1	elongation factor 1-alpha, putative	49133,73	9,212
ESL09385.1	hypothetical protein, conserved	37640,2	10,103
ESL09475.1	hypothetical protein, conserved	20740,47	7,449
ESL09501.1		15652,65	11,736
ESL09514.1	60S ribosomal protein L10, putative	24721,14	11,464
ESL09543.1	hypothetical protein, conserved	22963,29	7,27
ESL09670.1	beta tubulin, putative	27953,78	4,763
ESL09713.1	tryparedoxin peroxidase, putative	20573,8	7,061
ESL09716.1	hypothetical protein, conserved	36893,42	6,091
ESL09781.1	beta tubulin, putative	16949,24	4,486
ESL09988.1	hypothetical protein, conserved	53412,75	6,431
ESL10011.1	hypothetical protein, conserved	70146,65	5,986
ESL10022.1	L-threonine 3-dehydrogenase, putative	36870,6	7,604
ESL10045.1	hypothetical protein, conserved	42473,96	9,641
ESL10061.1	mitochondrial processing peptidase alpha subunit, putative	50977,6	7,993
ESL10139.1	heat shock protein DNAJ, putative	43028,12	8,694
ESL10143.1	beta tubulin, putative	22326,93	4,189
ESL10145.1	tricarboxylate carrier, putative	23045,65	9,688
ESL10160.1		27548,72	9,361
ESL10182.1	Radial spoke protein 11	19151,35	4,01
ESL10207.1	60S ribosomal protein L7, putative	27920	11,359
ESL10215.1	ribosomal protein L3, putative	52572,66	11,39
ESL10228.1	Paraflagellar rod protein 2	44162,15	6,109
ESL10262.1	hypothetical protein, conserved	30322,27	9,11
ESL10269.1		45118,08	6,808
ESL10330.1	mitochondrial processing peptidase alpha subunit, putative	58111,68	7,672
ESL10405.1	hexokinase, putative	51789,91	9,156
ESL10415.1	N-acetyltransferase subunit Nat1, putative	82391,53	7,341
ESL10441.1	ATP-dependent 6-phosphofructokinase, glycosomal (pseudogene)	53561,83	9,672
ESL10561.1	ATP synthase subunit beta, mitochondrial, putative	55671,55	5,037
ESL10584.1	60S ribosomal protein L8, putative	28319,91	11,307
ESL10586.1	adenylate kinase 1	28953,18	6,278
ESL10653.1	paraflagellar rod component, putative	67992,9	4,94
ESL10705.1	ribonuclease inhibitor-like protein, putative	119059,72	4,792
ESL10722.1	ATP synthase, epsilon chain, putative	20570,49	6,075
ESL10775.1	hypothetical protein, conserved	16113,39	4,784
ESL10843.1	60S ribosomal protein L10a, putative	25126,44	9,104
ESL10875.1	elongation factor 1-alpha, putative	52751,96	9,1
ESL11075.1	60S ribosomal protein L18, putative	21667,46	12,227
ESL11077.1	hypothetical protein, conserved	57532,34	9,102

ESL11113.1	leucine-rich repeat protein, putative	26033,93	5,562
ESL11149.1	Flagellar calcium-binding protein(fragment)	10119,21	3,814
ESL11220.1		23162,17	5
ESL11245.1	40S ribosomal protein S4, putative	30775,16	11,022
ESL11298.1	Regulatory particle triple-A ATPase subunit 6	45379,31	8,964
ESL11315.1	40S ribosomal protein S15A, putative	14584,12	10,581
ESL11451.1	elongation factor 1-alpha, putative	33132,29	9,118
ESL11520.1	heat shock protein 85, putative	81178,05	4,798
ESL11525.1	60S ribosomal protein L10a, putative	17754,21	9,88
ESL11562.1	60S ribosomal protein L9, putative	13006,04	8,921
ESL11594.1	Histone H2B variant V	12396,33	12,117
ESL11608.1	Ras-related protein Rab4, putative	15982,23	8,963
ESL11702.1	60S ribosomal protein L30, putative	15481,15	10,467
ESL11783.1	proteasome regulatory ATPase subunit 3, putative	44275,62	6,908
ESL11788.1	Ras-related protein RabX1, putative	24268,6	8,478
ESL11879.1	phosphoenolpyruvate mutase,putative	32772,59	6,602
ESL11890.1	paraflagellar rod component par4,putative	57509,91	5,022
ESL11989.1	heat shock protein 85, putative	71917,53	4,81
ESL11995.1	STOP axonemal protein, putative	29968,01	8,577
ESL12004.1	fructose-bisphosphate aldolase,glycosomal, putative	41004,02	8,997
ESL12025.1	arginine kinase (fragment)	35233,75	4,767
ESL12065.1	Phosphoenolpyruvate carboxykinase[ATP], glycosomal	44734,24	7,906
ESL12116.1	calmodulin	16824,59	3,857
ESL12146.1	NADH-dependent fumarate reductase,putative	37126,21	9,996
ESL12200.1	actin 3, putative (fragment)	41981,01	5,462
ESL12225.1	ATP synthase F1, alpha subunit, putative (pseudogene)	52477,06	10,014
NP_002272.2		54928,28	5,142
P00761.1		24409,48	7,119
P02745.2		26016,57	9,425
P02746.3		26721,76	8,773
P02747.3		25773,65	8,453
Q27052.1	flagellar calcium-binding 24 kDa protein	23119,98	4,7
g10.t1	40S ribosomal protein S6, putative	28428,24	11,745
g1236.t1	hypothetical protein, conserved	46505,14	5,504
g1437.t1	hypothetical protein, conserved	44283,64	6,617
g1727.t1		40954,5	6,237
g1852.t1	GMP reductase	46330,9	8,425
g2498.t1	hypothetical protein, conserved	25952,09	4,585
g2966.t1	tricarboxylate carrier, putative	34333,12	9,767
g3415.t1		31490,63	8,303
g3918.t1	hypothetical protein, conserved	42775,52	4,607
g4033.t1	hypothetical protein, conserved	47570,15	5,937
g4043.t1	protein disulfide isomerase,putative	41611,67	8,682
g4268.t1		24878,15	7,194
g4275.t1	calreticulin, putative	45725,92	4,319
g4548.t1	radial spoke protein 3, putative	39210,54	6,396
g4736.t1		31389,17	7,989
g5876.t1	GTP-binding nuclear protein rtb2,putative	24387,87	7,277
g6149.t1	heat shock protein 70 (hsp70),putative	97150,34	6,518
g6223.t1	Paraflagellar rod protein 2	69270,89	6,233
g6277.t1	hypothetical protein, conserved	357847,5	7,073

g996.t1	hypothetical protein, conserved	30284,35	8,979
----------------	---------------------------------	----------	-------

APÊNDICE F -Tabela de proteínas identificadas por MS na análise em gel das bandas excisadas do ensaio de Gel-Shift em formasepimastigotas, tripomastigotas diferenciadas in vitro e tripomastigotas sanguíneos de *Trypanosoma rangeli*, com suas respectivas massas moleculares relativas (MW) teóricas.

Número de Acesso	Description	MW
g5174.t1	paraflagellar rod protein 3	69 kDa
g8398.t1	paraflagellar rod protein 3, putative	69 kDa
g4635.t1	Tubulin C-terminal domain	50 kDa
g5616.t1	malic enzyme	63 kDa
g4636.t1	alpha tubulin, putative	50 kDa
g1194.t1	glutamate dehydrogenase	49 kDa
g1451.t1	tryparedoxin peroxidase	22 kDa
g1693.t1	elongation factor 2	94 kDa
g1576.t1	D-isomer specific 2-hydroxyacid dehydrogenase-protein	38 kDa
g1581.t1	D-isomer specific 2-hydroxyacid dehydrogenase-protein	39 kDa
g6651.t1	10 kDa heat shock protein	11 kDa
g6079.t1	protein kinase, putative	46 kDa
g1851.t1	co-chaperone GrpE	24 kDa
g3375.t1	histone H2B	12 kDa
g6216.t1	branched-chain amino acid aminotransferase	41 kDa
g7840.t1	trans-sialidase, Group VIII, putative	107 kDa
g7345.t1	heat shock 70kDa protein 1/8	73 kDa
g9767.t1	heat shock 70kDa protein 1/8	77 kDa
g7348.t1	heat shock 70kDa protein 1/8	75 kDa

APÊNDICE G -Tabela de proteínas identificadas por MS na análise em solução do secretoma de formas epimastigotas e tripomastigotas diferenciados in vitro de *Trypanosoma rangeli*, com suas respectivas massas moleculares relativas (MW) teóricas.

Número de Acesso	Descrição	MW
g4636.t1	alpha tubulin, putative	50 kDa
g4635.t1	Tubulin C-terminal domain	50 kDa
g10030.t1	molecular chaperone HtpG	100 kDa
g3596.t1	quinone oxidoreductase, putative	36 kDa
g750.t1	pyruvate phosphate dikinase	101 kDa
g6735.t1	tyrosine aminotransferase	46 kDa
g48.t1	enolase	46 kDa
g1693.t1	elongation factor 2	94 kDa
g4885.t1	cystathione gamma lyase	44 kDa
g1108.t1	trans-sialidase	47 kDa
g5938.t1	glucose-regulated protein 78	71 kDa
g9153.t1	calreticulin	46 kDa
g798.t1	aminopeptidase	55 kDa
g5248.t1	tryparedoxin	16 kDa
g6134.t1	trans-sialidase	93 kDa
g3476.t1	hypothetical protein	43 kDa
g1451.t1	tryparedoxin peroxidase	22 kDa
g6241.t1	phosphoenolpyruvate carboxykinase (ATP)	59 kDa
g1262.t1	seryl-tRNA synthetase, putative	53 kDa
g3466.t1	surface protease GP63, putative	65 kDa
g5724.t1	threonyl-tRNA synthetase	91 kDa
g4329.t1	cyclophilin A	19 kDa
g2931.t1	S-adenosylhomocysteine hydrolase	48 kDa
g2907.t1	glutamate dehydrogenase	49 kDa
g7393.t1	2-amino-3-ketobutyrate coenzyme A ligase	44 kDa
g5781.t1	aspartate aminotransferase	46 kDa
g1803.t1	fructose-bisphosphate aldolase, glycosomal	41 kDa
g2016.t1	Hsp70 protein	71 kDa
g9654.t1	activated protein kinase C receptor	35 kDa
g6903.t1	trans-sialidase, Group II, putative	70 kDa
g3368.t1	trypanothione reductase	54 kDa
g7232.t1	hypothetical protein	56 kDa
g5986.t1	ATPase beta subunit, putative	56 kDa
g8398.t1	paraflagellar rod protein 3, putative	69 kDa
g3835.t1	aminopeptidase	99 kDa
g3425.t1	thiol-dependent reductase 1	48 kDa

g11.t1	malate dehydrogenase	33 kDa
g2727.t1	succinyl-CoA ligase [GDP-forming] beta-chain	45 kDa
g8038.t1	protein disulfide isomerase 2	53 kDa
g4787.t1	poly(A)-binding protein	61 kDa
g1576.t1	D-isomer specific 2-hydroxyacid dehydrogenase-protein	38 kDa
g6067.t1	thermostable carboxypeptidase 2, putative	58 kDa
g2540.t1	pyrroline-5-carboxylate synthetase-like protein, putative	81 kDa
g6235.t1	trypanothione synthetase	73 kDa
g7592.t1	aconitase, putative	98 kDa
g7931.t1	hypothetical protein	17 kDa
g2526.t1	hypothetical protein, conserved	103 kDa
g1051.t1	lipophosphoglycan biosynthetic protein	87 kDa
g6488.t1	nucleoside phosphorylase, putative	37 kDa
g4327.t1	isocitrate dehydrogenase	47 kDa
g5702.t1	trans-sialidase, Group II, putative	74 kDa
g3365.t1	microtubule-associated protein, putative, (fragment)	487 kDa
g1205.t1	cystathionine beta-synthase	41 kDa
g623.t1	surface protease GP63	61 kDa
g1856.t1	hypothetical protein	21 kDa
g5174.t1	paraflagellar rod protein 3	69 kDa
g2516.t1	nucleoside diphosphate kinase	17 kDa
g7417.t1	transketolase	73 kDa
g6216.t1	branched-chain amino acid aminotransferase	41 kDa
g1456.t1	glutamate dehydrogenase	113 kDa
g4344.t1	eukaryotic initiation factor 5a	18 kDa
g7022.t1	triosephosphate isomerase	27 kDa
g3909.t1	heat shock 70kDa protein 4	93 kDa
g8878.t1	elongation factor 1-gamma	47 kDa
g3197.t1	glycerol dehydrogenase	41 kDa
g3233.t1	flagellum targeting protein kharon1, putative	44 kDa
g1905.t1	pyridoxal kinase	33 kDa
g1370.t1	cytoskeleton associated protein, putative	129 kDa
g4817.t1	t-complex protein 1, eta subunit+H73	61 kDa
g7982.t1	asparaginyl-tRNA synthetase	85 kDa
g497.t1	hypothetical protein, conserved	84 kDa
g271.t1	eukaryotic initiation factor 4a	46 kDa
g2769.t1	spermidine synthase	33 kDa
g7481.t1	stress-induced protein sti1	63 kDa
g7639.t1	transitional endoplasmic reticulum ATPase	87 kDa
g1816.t1	succinyl-coA:3-ketoacid-coenzyme A transferase, mitochondrial precursor	53 kDa
g7836.t1	trans-sialidase, Group II, putative	79 kDa

g3690.t1	large subunit ribosomal protein LP0	35 kDa
g5314.t1	putative calmodulin	17 kDa
g4621.t1	trans-sialidase, Group I, putative	76 kDa
g5485.t1	ubiquitin-activating enzyme E1	114 kDa
g5381.t1	cytoskeleton-associated protein CAP5.5	88 kDa
g8558.t1	actin	42 kDa
g1291.t1	14-3-3 protein	29 kDa
g3075.t1	serine carboxypeptidase (CBP1), putative,serine peptidase, Clan SC, Family S10, putative	51 kDa
g6159.t1	trans-sialidase	57 kDa
g3704.t1	chaperonin containing t-complex protein, putative	58 kDa
g1911.t1	L-threonine 3-dehydrogenase	37 kDa
g2490.t1	iron superoxide dismutase	22 kDa
g8073.t1	2,3-bisphosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase	61 kDa
g1005.t1	methylthioadenosine phosphorylase	31 kDa
g5550.t1	chaperonin/T-complex protein 1 gamma subunit	61 kDa
g5333.t1	Oligopeptidase B	80 kDa
g4757.t1	phosphoglycerate kinase	45 kDa
g643.t1	IgE-dependent histamine-releasing factor	20 kDa
g2924.t1	14-3-3 protein 1, putative	30 kDa
g1629.t1	peptidase M20/M25/M40	52 kDa
g8390.t1	trans-sialidase, Group VIII, putative	97 kDa
g6170.t1	chaperone DNAJ protein, putative	44 kDa
g2283.t1	large subunit ribosomal protein L18Ae	21 kDa
g3532.t1	large subunit ribosomal protein L3e	49 kDa
g4982.t1	aminopeptidase P	55 kDa
g3832.t1	40S ribosomal protein S4	31 kDa
g1584.t1	D-isomer specific 2-hydroxyacid dehydrogenase-protein	40 kDa
g2869.t1	aminopeptidase	43 kDa
g3260.t1	isoleucyl-tRNA synthetase	132 kDa
g8773.t1	threonine synthase	73 kDa
g8959.t1	40S ribosomal protein S6, putative	28 kDa
g8387.t1	trans-sialidase, Group VIII, putative	100 kDa
g2298.t1	chaperonin containing T-complex protein	59 kDa
g6630.t1	asparagine synthetase A	39 kDa
g6807.t1	hypothetical protein	87 kDa
g848.t1	peptidylprolyl isomerase	47 kDa
g301.t1	fatty acyl CoA synthetase 2, putative	80 kDa
g1473.t1	myo-inositol-1 phosphatase	40 kDa
g4266.t1	glutaredoxin	11 kDa
g5814.t1	ATP-dependent DEAD/H RNA helicase	47 kDa
g4342.t1	Protein phosphatase 2C	46 kDa

g4452.t1	calpain-like cysteine peptidase	13 kDa
g8777.t1	proteasome alpha 3 subunit	32 kDa
g1306.t1	ATP-dependent Clp protease subunit, heat shock protein 100	97 kDa
g2621.t1	large subunit ribosomal protein L8e	28 kDa
g2558.t1	dihydrolipoyl dehydrogenase	51 kDa
g3815.t1	leucyl-tRNA synthetase, putative	122 kDa
g883.t1	hypothetical protein, conserved	34 kDa
g8042.t1	chaperonin	58 kDa
g6098.t1	succinyl-CoA synthetase alpha subunit	29 kDa
g7569.t1	citrate synthase	52 kDa
g7671.t1	clathrin heavy chain	192 kDa
g5809.t1	40S ribosomal protein S3a	29 kDa
g9217.t1	surface protease GP63, putative	93 kDa
g3325.t1	large subunit ribosomal protein L18e	22 kDa
g300.t1	fatty acyl CoA synthetase 2	79 kDa
g5743.t1	NADH-dependent fumarate reductase	124 kDa
g6743.t1	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, cytosolic	36 kDa
g4365.t1	hypothetical protein	31 kDa
g3174.t1	elongation factor 1-alpha (EF-1-alpha)	49 kDa
g4588.t1	glutamate dehydrogenase	38 kDa
g8020.t1	40S ribosomal protein S12	16 kDa
g1874.t1	p22 protein precursor	25 kDa
g4506.t1	hypothetical protein	20 kDa
g2995.t1	proteasome alpha 2 subunit, putative	25 kDa
g8617.t1	glucose-6-phosphate isomerase, glycosomal	68 kDa
g6015.t1	GTP-binding nuclear protein rtb2, putative	24 kDa
g3825.t1	adenylosuccinate synthetase	69 kDa
g834.t1	complement regulatory protein	92 kDa
g7191.t1	hypothetical protein	33 kDa
g6651.t1	10 kDa heat shock protein	11 kDa
g4976.t1	phosphoinositide-binding protein	48 kDa
g8790.t1	hypothetical protein	22 kDa
g4779.t1	prostaglandin F2alpha synthase	42 kDa
g5309.t1	surface protease GP63, putative	88 kDa
g2554.t1	chaperonin alpha subunit	59 kDa
g1400.t1	surface antigen TASV, putative, hypothetical protein	30 kDa
g105.t1	chaperonin TCP20	59 kDa
g6081.t1	hypothetical protein	30 kDa
g5765.t1	aldose 1-epimerase	42 kDa
g4706.t1	cytidine triphosphate synthase, putative, CTP synthase, putative	66 kDa
g8755.t1	trans-sialidase	78 kDa
g2592.t1	enoyl-CoA hydratase/isomerase family protein	41 kDa

g1111.t1	cysteine peptidase C (CPC)	37 kDa
g7332.t1	putative cytosolic malate dehydrogenase	36 kDa
g6583.t1	heat shock protein 70 (hsp70)	71 kDa
g1137.t1	I/6 autoantigen, putative	22 kDa
g4708.t1	hypothetical protein	126 kDa
g2944.t1	basic transcription factor 3a	11 kDa
g3192.t1	DnaJ chaperone protein	37 kDa
g1868.t1	adenosine kinase, putative	37 kDa
g4255.t1	isovaleryl-coA dehydrogenase	45 kDa
g6072.t1	chloride channel protein, putative	74 kDa
g6423.t1	complement regulatory protein, putative	87 kDa
g5156.t1	fumarate hydratase	62 kDa
g920.t1	glycosomal malate dehydrogenase	34 kDa
g9167.t1	hypothetical protein	52 kDa
g133.t1	peptidase M20/M25/M40	52 kDa
g1841.t1	aminopeptidase	60 kDa
g692.t1	prostaglandin f synthase	31 kDa
g5661.t1	fumarate hydratase	61 kDa
g1839.t1	metallocarboxypeptidase	58 kDa
g8944.t1	trans-sialidase, Group II, putative	136 kDa
g9893.t1	trans-sialidase (pseudogene), putative	92 kDa
g2925.t1	phosphoenolpyruvate mutase	33 kDa
g4942.t1	galactokinase-like protein	52 kDa
g664.t1	hypothetical protein, conserved	14 kDa
g3894.t1	prolyl-tRNA synthetase	82 kDa
g5931.t1	ribonucleoside-diphosphate reductase large chain	91 kDa
g2132.t1	S-adenosylmethionine synthetase, putative	43 kDa
g9218.t1	trans-sialidase, Group VIII, putative	95 kDa
g9229.t1	mitochondrial trypanedoxin peroxidase, trypanosomatid typical 2-Cys peroxiredoxin	26 kDa
g1827.t1	hypothetical protein, conserved	47 kDa
g9156.t1	hypothetical protein	66 kDa
g2087.t1	homoserine kinase	36 kDa
g7168.t1	hypothetical protein	69 kDa
g4005.t1	large subunit ribosomal protein L21e	18 kDa
g7177.t1	surface protease GP63, putative	62 kDa
g7333.t1	cytosolic malate dehydrogenase, putative	36 kDa
g4003.t1	V-type ATPase, A subunit	68 kDa
g7904.t1	trans-sialidase, Group VIII, putative	102 kDa
g5127.t1	aminopeptidase	97 kDa
g4277.t1	trans-sialidase, Group VIII, putative	86 kDa
g1034.t1	ADP-ribosylation factor 3	20 kDa

g4253.t1	1,2-Dihydroxy-3-keto-5-methylthiopentene dioxygenase, putative	37 kDa
g9288.t1	trans-sialidase, Group VII, putative	65 kDa
g8171.t1	small GTP-binding protein Rab11, putative, Rab11 GTPase, putative	22 kDa
g2215.t1	dihydroorotate dehydrogenase	34 kDa
g444.t1	lysine decarboxylase-like protein	36 kDa
g1583.t1	D-isomer specific 2-hydroxyacid dehydrogenase-protein	35 kDa
g8971.t1	60S ribosomal protein L5	35 kDa
g5256.t1	60S ribosomal protein L4	41 kDa
g6157.t1	Hypothetical protein	28 kDa
g4314.t1	ribokinase, putative	36 kDa
g7847.t1	trans-sialidase	92 kDa
g6978.t1	hypothetical protein	63 kDa
g7907.t1	complement regulatory protein	112 kDa
g10005.t1	aspartate aminotransferase, mitochondrial	46 kDa
g9158.t1	leishmanolysin	63 kDa
g7415.t1	hypothetical protein	25 kDa
g7379.t1	trans-sialidase, Group I, putative	41 kDa
g3055.t1	Hypothetical protein	30 kDa
g5993.t1	hypothetical protein	75 kDa
g4278.t1	hypothetical protein	17 kDa
g6895.t1	cyclophilin	21 kDa
g1171.t1	flagellar calcium-binding protein	23 kDa
g5780.t1	NADH-dependent fumarate reductase	132 kDa
g8576.t1	trans-sialidase, Group I, putative	87 kDa
g5616.t1	malic enzyme	63 kDa
g5742.t1	NADH-dependent fumarate reductase, putative	82 kDa
g9517.t1	trans-sialidase, Group VIII, putative	82 kDa
g6437.t1	retrotransposon hot spot (RHS) protein	24 kDa
g6069.t1	hypothetical protein	36 kDa
g3561.t1	hypothetical protein, conserved	25 kDa
g6954.t1	pyrroline-5-carboxylate reductase	29 kDa
g5595.t1	hypothetical protein	27 kDa
g3019.t1	RNA helicase	49 kDa
g6435.t1	trans-sialidase	71 kDa
g7334.t1	putative cytosolic malate dehydrogenase	36 kDa
g6368.t1	aspartyl-tRNA synthetase	64 kDa
g705.t1	trans-sialidase, Group VIII, putative	55 kDa
g7118.t1	vacuolar ATP synthase subunit B	56 kDa
g2214.t1	aspartate carbamoyltransferase	36 kDa
g1312.t1	mucin-associated surface protein (MASP)	36 kDa
g4086.t1	surface protease GP63	79 kDa

g7840.t1	trans-sialidase, Group VIII, putative	107 kDa
g7046.t1	dipeptidyl-peptidase	77 kDa
g8323.t1	Hsc70-interacting protein, putative	54 kDa
g2092.t1	valyl-tRNA synthetase, putative	111 kDa
g5826.t1	60S ribosomal protein L30	12 kDa
g6748.t1	glucokinase 1	42 kDa
g6853.t1	Leishmanolysin	29 kDa
g4282.t1	hypothetical protein	13 kDa
g7285.t1	trans-sialidase	60 kDa
g1468.t1	arginine kinase	45 kDa
g5064.t1	elongation initiation factor 2 alpha subunit	47 kDa
g8333.t1	trans-sialidase	89 kDa
g7841.t1	trans-sialidase	94 kDa
g4592.t1	trans-sialidase	94 kDa
g4088.t1	surface protease GP63	64 kDa
g837.t1	trans-sialidase	81 kDa
g5951.t1	haloacid dehalogenase-like hydrolase	31 kDa
g4534.t1	40 kDa cyclophilin	38 kDa
g5548.t1	trans-sialidase	76 kDa
g1361.t1	trans-sialidase, Group II, putative	91 kDa
g1079.t1	cofilin/actin depolymerizing factor	16 kDa
g6805.t1	chaperonin GroEL	65 kDa
g6586.t1	heat shock protein 70 (hsp70)	70 kDa
g9938.t1	surface protease GP63	49 kDa
g8028.t1	hypothetical protein	39 kDa
g7910.t1	trans-sialidase	96 kDa
g7366.t1	surface protease GP63, putative	90 kDa
g364.t1	trans-sialidase	239 kDa
g9239.t1	trans-sialidase, Group VIII, putative	100 kDa
g5144.t1	hypothetical protein	323 kDa
g5733.t1	ubiquitin-conjugating enzyme E2	17 kDa
g8922.t1	hexokinase	52 kDa
g9329.t1	trans-sialidase	100 kDa
g8395.t1	trans-sialidase	51 kDa
g9448.t1	trans-sialidase, putative	235 kDa
g2634.t1	surface protease GP63 (pseudogene), putative	31 kDa
g7271.t1	phosphatidylinositol kinase related protein ATM	457 kDa
g707.t1	trans-sialidase	117 kDa
g8366.t1	trans-sialidase	79 kDa
g6130.t1	hypothetical protein	92 kDa
g9521.t1	trans-sialidase, putative	13 kDa
g8921.t1	hexokinase	52 kDa

g6852.t1	surface protease GP63	21 kDa
g5372.t1	mevalonate kinase	35 kDa
g6851.t1	surface protease GP63	64 kDa
g9222.t1	surface protease GP63	77 kDa
g3625.t1	fatty acyl CoA synthetase	79 kDa
g7355.t1	heat shock 70kDa protein 1/8	71 kDa
g6725.t1	hypothetical protein	20 kDa
g7854.t1	trans-sialidase	110 kDa
g2975.t1	trans-sialidase	61 kDa
g5607.t1	complement regulatory protein	98 kDa
g219.t1	large subunit ribosomal protein L6e	21 kDa
g9767.t1	heat shock 70kDa protein 1/8	77 kDa
g2701.t1	hypothetical protein	48 kDa
g9519.t1	surface protease GP63, putative	88 kDa
g5501.t1	acetyl-CoA synthetase	75 kDa
g9400.t1	trans-sialidase, Group II, putative	65 kDa
g7829.t1	trans-sialidase	72 kDa
g2985.t1	40S ribosomal protein S6	29 kDa
g8678.t1	trans-sialidase, putative	22 kDa
g5300.t1	trans-sialidase, Group VIII, putative	80 kDa
g9545.t1	trans-sialidase	72 kDa
g1326.t1	Chain A, Sialidase	65 kDa
g109.t1	trans-sialidase	32 kDa
g7354.t1	heat shock 70kDa protein 1/8	75 kDa
g7346.t1	heat shock 70kDa protein 1/8	44 kDa
g7833.t1	trans-sialidase	93 kDa
g9451.t1	surface protease GP63, putative	62 kDa
g835.t1	surface protease GP63, putative	88 kDa
g7348.t1	heat shock 70kDa protein 1/8	75 kDa
g2074.t1	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	39 kDa
g9399.t1	hypothetical protein	79 kDa
g7845.t1	trans-sialidase	72 kDa
g5606.t1	trans-sialidase, Group II, putative	63 kDa
g1202.t1	surface protease GP63	64 kDa
g5991.t1	hypothetical protein	85 kDa
g9406.t1	trans-sialidase	82 kDa
g6431.t1	hypothetical protein	31 kDa
g831.t1	trans-sialidase	72 kDa
g9957.t1	heat shock 70kDa protein 1/8	66 kDa
g9614.t1	surface protease GP63, putative	62 kDa
g8433.t1	hypothetical protein	75 kDa
g8947.t1	trans-sialidase, Group II, putative	116 kDa

g1321.t1	Chain A, Sialidase	67 kDa
g7367.t1	trans-sialidase, Group I, putative	80 kDa
g9896.t1	trans-sialidase	56 kDa
g7843.t1	trans-sialidase	107 kDa
g7071.t1	trans-sialidase	72 kDa
g9679.t1	trans-sialidase, Group I, putative	87 kDa
g9274.t1	trans-sialidase	82 kDa
g2066.t1	hypothetical protein	19 kDa
g8388.t1	surface protease GP63, putative	67 kDa
g9523.t1	trans-sialidase	48 kDa
g5549.t1	trans-sialidase	57 kDa
g108.t1	hypothetical protein	38 kDa
g614.t1	surface protease GP63	62 kDa
g7362.t1	trans-sialidase	58 kDa
g824.t1	trans-sialidase	60 kDa
g9484.t1	trans-sialidase, Group II, putative	76 kDa
g7044.t1	trans-sialidase, putative	69 kDa
g4955.t1	trans-sialidase	79 kDa
g7855.t1	Protein of unknown function (DUF3676)	22 kDa
g6144.t1	surface protease GP63	82 kDa
g6742.t1	tyrosine aminotransferase	11 kDa
g6804.t1	chaperonin GroEL	60 kDa
g8757.t1	trans-sialidase, Group VIII, putative	92 kDa
g7345.t1	heat shock 70kDa protein 1/8	73 kDa
g9766.t1	hypothetical protein	28 kDa
g7705.t1	chaperonin GroEL	59 kDa
g9214.t1	trans-sialidase	68 kDa
g7906.t1	trans-sialidase, Group I, putative	82 kDa
g2696.t1	trans-sialidase, Group II, putative	76 kDa
g6979.t1	hypothetical protein	43 kDa
g8815.t1	hypothetical protein	79 kDa
g6543.t1	trans-sialidase	78 kDa
g7856.t1	trans-sialidase	48 kDa
g7901.t1	trans-sialidase	83 kDa
g9999.t1	trans-sialidase, putative	24 kDa
g9894.t1	surface protease GP63, putative	59 kDa
g2382.t1	iron superoxide dismutase	23 kDa
g9240.t1	trans-sialidase	94 kDa
g9651.t1	chaperonin GroEL	60 kDa
g6141.t1	trans-sialidase	73 kDa
g8128.t1	hypothetical protein	35 kDa
g4036.t1	surface protease GP63	52 kDa

g7357.t1	Hsp70 protein	73 kDa
g4276.t1	surface protease GP63, putative	74 kDa
g1470.t1	ATP:guanido phosphotransferase, C-terminal catalytic domain	40 kDa
g4023.t1	surface protease GP63	75 kDa
g7112.t1	surface protease GP63	68 kDa
g3469.t1	surface protease GP63, putative	60 kDa
g7013.t1	malic enzyme	37 kDa
g4090.t1	surface protease GP63	69 kDa
g8288.t1	trans-sialidase	100 kDa
g7208.t1	trans-sialidase	75 kDa
g9842.t1	surface protease GP63, putative	36 kDa
g9418.t1	trans-sialidase, putative	51 kDa
g7288.t1	BNR repeat-like domain	37 kDa
g6429.t1	hypothetical protein	21 kDa
g7148.t1	surface protease GP63	22 kDa
g9207.t1	hypothetical protein	43 kDa
g8812.t1	hypothetical protein	72 kDa
g9522.t1	trans-sialidase, putative	20 kDa
g828.t1	trans-sialidase	89 kDa
g4171.t1	trans-sialidase	85 kDa
g9994.t1	trans-sialidase	31 kDa
g3917.t1	hypothetical protein	15 kDa
g9818.t1	retrotransposon hot spot (RHS) protein	25 kDa
g6803.t1	chaperonin GroEL	65 kDa
g2068.t1	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	39 kDa
g7358.t1	heat shock 70kDa protein 1/8	45 kDa
g7330.t1	cytosolic malate dehydrogenase	35 kDa
g2700.t1	hypothetical protein	48 kDa
g7012.t1	malic enzyme	64 kDa
g4033.t1	surface protease GP63	65 kDa
g8392.t1	trans-sialidase, Group I, putative	75 kDa
g622.t1	hypothetical protein	33 kDa
g6718.t1	hypothetical protein	100 kDa
g7331.t1	cytosolic malate dehydrogenase	36 kDa
g7107.t1	dipeptidyl-peptidase	67 kDa
g7213.t1	hypothetical protein	86 kDa
g9488.t1	trans-sialidase	76 kDa
g9765.t1	heat shock 70kDa protein 1/8	44 kDa
g5850.t1	trans-sialidase	45 kDa
g10012.t1	trans-sialidase	19 kDa
g1159.t1	surface protease GP63, putative	69 kDa
g10011.t1	trans-sialidase, putative	45 kDa

g9735.t1	BNR repeat-like domain	62 kDa
g7831.t1	Protein of unknown function (DUF3676)	22 kDa
g6724.t1	hypothetical protein	62 kDa
g4756.t1	phosphoglycerate kinase	55 kDa
g4273.t1	surface protease GP63, putative	73 kDa
g7832.t1	trans-sialidase	52 kDa
g9391.t1	complement regulatory protein	105 kDa
g9238.t1	hypothetical protein	19 kDa
g6156.t1	trans-sialidase	82 kDa
g9208.t1	trans-sialidase, putative	98 kDa
g9485.t1	trans-sialidase	82 kDa
g5472.t1	acetyl-CoA synthetase	75 kDa
g1198.t1	surface protease GP63	77 kDa
g7838.t1	hypothetical protein	19 kDa
g7568.t1	surface protease GP63, putative	42 kDa
g2244.t1	hypothetical protein	22 kDa
g6138.t1	trans-sialidase	97 kDa
g6790.t1	chaperonin GroEL	59 kDa
g5359.t1	BNR repeat-like domain	27 kDa
g6734.t1	tyrosine aminotransferase	21 kDa
g9407.t1	hypothetical protein	21 kDa
g6529.t1	Leishmanolysin	24 kDa
g9327.t1	hypothetical protein	18 kDa
g7371.t1	trans-sialidase, putative	21 kDa
g6726.t1	trans-sialidase, Group II, putative	66 kDa
g9026.t1	trans-sialidase	27 kDa
g5483.t1	hypothetical protein	31 kDa
g1324.t1	putative trans-sialidase	21 kDa
g6455.t1	hypothetical protein	56 kDa
g4773.t1	hypothetical protein	38 kDa
g10020.t1	trans-sialidase, Group VIII, putative	62 kDa
g8817.t1	trans-sialidase, Group II, putative	67 kDa
g4590.t1	BNR repeat-like domain	42 kDa
g4653.t1	BNR repeat-like domain	20 kDa
g7041.t1	surface protease GP63	74 kDa
g8930.t1	elongation factor 1-alpha (EF-1-alpha)	47 kDa
g9659.t1	surface protease GP63	66 kDa
g6132.t1	hypothetical protein	87 kDa
g8669.t1	trans-sialidase	67 kDa
g7706.t1	chaperonin GroEL	59 kDa
g7344.t1	heat shock 70kDa protein 1/8	73 kDa
g9616.t1	hypothetical protein	41 kDa

g4087.t1	surface protease GP63	77 kDa
g1199.t1	surface protease GP63, putative	64 kDa
g7839.t1	trans-sialidase	48 kDa
g9170.t1	hypothetical protein	52 kDa
g9927.t1	surface antigen TASV, putative, hypothetical protein	30 kDa
g6427.t1	hypothetical protein	12 kDa
g9673.t1	hypothetical protein	18 kDa
g2591.t1	enoyl-CoA hydratase/isomerase family protein, putative	42 kDa
g6469.t1	rab1 small GTP-binding protein	24 kDa
g5290.t1	hypothetical protein	34 kDa
g9993.t1	trans-sialidase	73 kDa
g6436.t1	hypothetical protein	38 kDa
g1109.t1	hypothetical protein	21 kDa