

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA, IMUNOLOGIA E PARASITOLOGIA  
CURSO DE GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Ana Paula da Silva Bastiani

**Expressão heteróloga de uma proteína quimérica pan-tripanosomatídeos em *Leishmania tarentolae* e *Trypanosoma rangeli***

Florianópolis

2022

Ana Paula da Silva Bastiani

**Expressão heteróloga de uma proteína quimérica pan-tripanosomatídeos em *Leishmania tarentolae* e *Trypanosoma rangeli***

Trabalho Conclusão do Curso de Graduação em Ciências Biológicas do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito para a obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Edmundo Carlos Grisard

Florianópolis

2022

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

Bastiani, Ana Paula da Silva  
Expressão heteróloga de uma proteína quimérica pan  
tripanosomatídeos em *Leishmania tarentolae* e *Trypanosoma*  
*rangeli* / Ana Paula da Silva Bastiani ; orientador,  
Edmundo Carlos Grisard, 2022.  
66 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) -  
Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências  
Biológicas, Graduação em Ciências Biológicas, Florianópolis,  
2022.

Inclui referências.

1. Ciências Biológicas. 2. Vacina. 3. Tripanosomatídeos.  
4. Doenças negligenciadas. I. Grisard, Edmundo Carlos. II.  
Universidade Federal de Santa Catarina. Graduação em  
Ciências Biológicas. III. Título.

Ana Paula da Silva Bastiani

**Expressão heteróloga de uma proteína quimérica pan-tripanosomatídeos em *Leishmania tarentolae* e *Trypanosoma rangeli***

Este Trabalho Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção do Título de “Bacharel em Ciências Biológicas” e aprovado em sua forma final pelo Curso de Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina.

Florianópolis, 05 de dezembro de 2022.

---

Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Daniella Cristina de Toni  
Coordenador do Curso

**Banca Examinadora:**

---

Prof. Dr. Edmundo Carlos Grisard  
Orientador  
UFSC

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Patricia Hermes Stoco  
Avaliadora  
UFSC

---

Prof. Dr. Rafael Diego da Rosa  
Avaliador  
UFSC

Este trabalho é dedicado ao meu avô que infelizmente não verá o fim desse ciclo e a minha avó que me deixou cedo demais.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço inicialmente ao meu orientador Dr. Edmundo Carlos Grisard por ter me aceitado no laboratório lá no final de 2019 enquanto eu estava perdida sem saber que área da biologia seguir. Desde o início me incentivou a ser uma pessoa curiosa e buscar os porquês das coisas, sempre acreditando no meu potencial e no meu trabalho.

A minha família que, em nenhum momento, me criticou por eu ter escolhido cursar biologia, que sempre me ajudou a ter um ensino de qualidade e me incentivou a correr atrás dos meus alvos, não importasse o que eu escolhesse. Aos meus pais por me ajudarem a me manter durante esse período de graduação para que eu pudesse focar nos meus estudos. Ao meu irmão que fez e faz de tudo por mim e me ajudou a montar um cantinho de estudos onde eu passei horas e horas fazendo resumos e estudando para as provas. A minha prima Kauany que sempre acreditou mais em mim do que eu mesma e sempre teve confiança de que tudo o que eu fizesse iria dar certo (e deu mesmo!). A minha vó Nilva (em memória) que infelizmente me deixou cedo demais, mas sempre me apoiou e ajudou nos meus estudos. A minha avó Lena que sempre me mimou e me ajuda em tudo que precisar e meu vô Fabiano (em memória) que sempre se interessou em saber como estava indo a faculdade e me apoiou em tudo, mas infelizmente me deixou antes de me ver concluir essa etapa.

Aos meus professores do IFSC, em especial o Prof. Marcelo de Biologia que, sem perceber, me ajudou a decidir a área em que eu queria seguir. Aos amigos que o IFSC que me acompanham desde 2013. Em especial a Julia, Nara, Ricardo e Rodrigo que sempre foram bons amigos e me proporcionaram muitas risadas e belos momentos que deixaram o dia-a-dia do IFSC mais leve. Este pequeno parágrafo não faz jus ao quanto vocês foram e são especiais na minha vida. Também quero agradecer a Ádila, Luana e Millena que conheci durante o ensino médio e apesar de não nos falarmos muito ultimamente vocês me proporcionaram muito momentos bons.

A minha amiga Tiffany que sempre esteve disposta a me ouvir falar sobre meus problemas e ansiedades e que me ajuda a passar por momentos difíceis. Ao meu amigo Matheus por sempre proporcionar conversas profundas e conversas interessantes sobre ciência. Esses dois sempre me deram apoio por acreditar em mim e são responsáveis por muitos momentos felizes que eu vivi. A minha amiga Luana que sempre me proporciona muitas risadas e que me faz muitas perguntas biológicas. E a Carmem, que é uma segunda mãe para mim por sempre se preocupar comigo e me dar bons conselhos.

Ao meu namorado Vini que passou a estar presente em um dos momentos mais conturbados da minha vida e se manteve firme do meu lado nas minhas crises de ansiedade não me deixando desistir em nenhum momento. Ele sempre me ajudou, até mesmo indo comigo no laboratório no final de semana me fazer companhia enquanto eu terminava meus experimentos e em todos os momentos me apoia, tanto nos meus estudo quanto nos meus projetos pessoais.

Ao meu quarteto fantástico que se formou durante esses anos de graduação. Só tenho a agradecer a Denise, Iasmin e a Laura por todo companheirismo e amizade. Obrigada por sempre depositarem confiança em mim e por acreditarem no meu potencial, por tornarem as aulas (principalmente de Zoologia) divertidas, por me ajudarem a ser uma pessoa melhor, por todas as horas de conversas e risadas que tivemos e por sempre vibrarem com as minhas conquistas. Com certeza sentirei saudades de encontrar vocês nos corredores do MIP e esse pequeno texto não é nada comparada a tudo que a gente já viveu na UFSC.

Ao João Victor que conheci no laboratório, mas que me acompanhou em algumas disciplinas, tornando-as mais leves. Aos meus colegas de turma que sempre fizeram ótimos questionamentos nas aulas me ajudando a aprender cada vez mais.

Aos meus antigos e atuais colegas de laboratório Caibe, Natália, Viviane, Thais, Vanessa, Guilherme, Vilmar, Ana Claudia, Marilene, Giovanna, Luisa, Luiza, Maria e Lucy que tornaram os dias no laboratório mais divertidos. Em especial a Beatriz que por um tempo fez parte desse projeto comigo, a Carol que tornou a viagem a Caxambu mais divertida e sempre almoça comigo, a Amábilli que sempre está disposta a me ajudar, almoça comigo e juntas desabafamos sobre nossos problemas, a Carime que me ajudou e me ensinou muito no início do meu projeto, a Adriana que forneceu o plasmídeo que utilizei neste projeto. Também a Laryssa e a Bibiana que foram de extrema importância para a realização e construção deste projeto, me ajudando em diversos experimentos e tirando muitas dúvidas, com certeza sem elas eu não teria conseguido fazer metade do que fiz.

Ao Prof. Dr. Ricardo Toshio Fujiwara e a Dr<sup>a</sup>. Luiza Almeida de Figueiredo que forneceram a proteína quimérica, essencial para a realização deste trabalho.

Aos integrantes banca que aceitaram avaliar e fazer suas contribuições para este trabalho.

Por fim, a CNPq, CAPES, FINEP, LAMEB e a UFSC pelo apoio financeiro e estrutural para a realização deste trabalho.

A ciência nunca resolve um problema sem criar pelo menos outros dez. (SHAW,  
George Bernard, 1930)



## RESUMO

A doença de Chagas causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi* e as leishmanioses causadas por diferentes espécies do gênero *Leishmania* e acometem em conjunto cerca de 7-8 milhões de pessoas no mundo. A prevenção e o controle dessas doenças ainda são baseados primariamente no controle vetorial, sendo que os medicamentos disponíveis apresentam elevada toxicidade e baixa eficácia. Buscamos desenvolver neste estudo uma estratégia vacinal baseada no uso de tripanosomatídeos não patogênicos (*L. tarentolae* e *T. rangeli*) expressando uma proteína quimérica formada por genes que codificam epítomos imunogênicos conservados presentes em diferentes tripanosomatídeos patogênicos. Testes preliminares em camundongos imunizados com a proteína purificada revelaram uma redução da parasitemia pelo *T. cruzi* e uma redução das lesões e cargas parasitárias nos animais infectados com *L. amazonensis*, *L. mexicana* e *L. infantum*. No presente estudo, transfectamos promastigotas de *L. tarentolae* e epimastigotas de *T. rangeli* com o plasmídeo FlagGPI\_pROCK Neo contendo o gene da quimera proteica. Ainda durante a seleção dos transfectantes com geneticin (G-418), a presença do plasmídeo verificada através de PCR e a expressão da proteína quimérica foi avaliada indiretamente pela detecção da expressão de mNeonGreen. Para *L. tarentolae*, após sete semanas de seleção, os parasitos apresentaram motilidade e morfologia alteradas (formas arredondadas) e um padrão de fluorescência puntiforme, não progredindo em cultura. A população de *T. rangeli* transfectada ainda em processo inicial de seleção, apresenta expressão puntiforme de mNeonGreen 48h após a transfecção. Com as primeiras passagens, observamos parasitos com morfologia, motilidade e padrões de divisão compatíveis com os parasitos selvagens, possuindo uma fluorescência em crescente intensidade. Os parasitos-controle transfectados com o plasmídeo base (FlagGPI\_pROCK Neo), além de apresentarem os parâmetros biológicos semelhantes aos parasitos selvagens, apresentam uma fluorescência dispersa no citoplasma. Ensaios de Western blot utilizando um antissoro anti-quimera serão realizados com estas populações visando confirmar a expressão da quimera proteica.

**Palavras-chave:** Vacina. Tripanosomatídeos. Doenças negligenciadas.

## ABSTRACT

Chagas disease is caused by the protozoan *Trypanosoma cruzi* and Leishmaniasis (the set of diseases called Leishmaniasis) are caused by different species from the genus *Leishmania*, both affecting approximately 7-8 million people in the world. The prevention and control of these diseases are still primarily based in vector control, and available drugs present high toxicity and low efficacy. In this study, we sought to develop a vaccine strategy based on the use of non-pathogenic trypanosomatids (*L. tarentolae* e *T. rangeli*) expressing a chimeric protein, produced with genes encoding conserved immunogenic epitopes that are present in different pathogenic trypanosomatids. Preliminary infection tests in mice previously immunized with the purified protein revealed a reduction in parasitaemia by *T. cruzi* and a reduction of lesions and parasite load in animals infected by *L. amazonensis*, *L. mexicana* and *L. infantum*. In the present study, we transfected *L. tarentolae* promastigotes and *T. rangeli* epimastigotes with the plasmid FlagGPI\_pROCK containing the chimeric protein gene. During the selection of the transfectants with geneticin (G-418), the plasmid presence was verified through PCR and the expression of the chimeric protein was evaluated indirectly by detection of mNeonGreen expression. For *L. tarentolae*, after seven weeks of selection, the parasites showed altered motility and morphology (rounded shapes) and a punctate fluorescence pattern, not progressing in culture. *T. rangeli* transfectants are still under selection process, initially showing mNeonGreen punctiform expression 48 hours after transfection. Regarding initial passages, we observed parasites showing morphology, motility, and division patterns like those displayed by wild parasites, with fluorescence in increasing intensity. The control parasites transfected with the base plasmid (FlagGPI\_pROCK Neo), in addition to revealing biological parameters similar to those found in wild parasites, also presented a dispersed fluorescence pattern in the cytoplasm. Western blot assays using an anti-chimera antiserum will be performed with these populations in order to confirm the expression of the protein chimera.

**Keywords:** Vaccine. Trypanosomatids. Neglected diseases.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Ciclo de vida do <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	17
Figura 2 - Ciclo de vida da <i>Leishmania sp.</i> .....	19
Figura 3 - Mapa do plasmídeo FlagGPI_pROCK Neo utilizado para expressão proteica em tripanosomatídeos. ....	29
Figura 4 -Verificação da presença e correta orientação do gene da quimera proteica em colônias de bactérias <i>E. coli Top10</i> transformadas com plasmídeo Quimera_pGEM®-T Easy. ....	35
Figura 5 - PCR de colônia da ligação do gene da quimera no plasmídeo FlagGPI_pROCK Neo.....	36
Figura 6 - PCR com diferentes iniciadores para confirmar a presença do gene da quimera no plasmídeo FlagGPI_pROCK Neo. ....	36
Figura 7 - Alinhamento da sequência teórica esperada para a construção do plasmídeo Quimera_FlagGPI_pROCK Neo com o contig gerado através do sequenciamento do plasmídeo (Contig 1).....	38
Figura 8 - Alinhamento da sequência teórica esperada para a construção do plasmídeo Quimera_FlagGPI_pROCK Neo com o contig gerado através do sequenciamento do plasmídeo (Contig 2).....	39
Figura 9 – Concentração de inibição em 50% (CI50) de <i>Leishmania tarentolae</i> quando exposta ao G-418 (Geneticin).....	40
Figura 10 - Detecção do plasmídeo Quimera_FlagGPI_pROCK Neo em <i>Leishmania tarentolae</i> transfectadas.....	41
Figura 11- Detecção do plasmídeo Quimera_FlagGPI_pROCK Neo em <i>Trypanosoma rangeli</i> transfectados.....	42
Figura 12 - Comparação da morfologia dos parasitos dos dois ensaios de transfecção de <i>L. tarentolae</i> com o plasmídeo Quimera_FlagGPI_pROCK Neo. ....	44
Figura 13 – Observação da expressão de mNeonGreen por formas epimastigotas de <i>Trypanosoma rangeli</i> transfectados com plasmídeo Quimera_FlagGPI_pROCK Neo e FlagGPI_pROCK Neo.....	47
Figura 14 – Representação da fluorescência puntiforme em epimastigotas de <i>T. rangeli</i> .....	48

Figura 15 -Western blot de extrato total de proteínas de *Leishmania tarentolae* transfectada com o plasmídeo Quimera\_FlagGPI\_pROCK Neo e FlagGPI\_pROCK Neo, revelado com anticorpo anti-Flag e com soro policlonal anti-quimera. ....49

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%	Porcentagem
µg	Micrograma
µl	Microlitro
anti-IgG	Anti imunoglobulina G
BCG	Bacilo de Calmette e Guérin
BHI	Do inglês <i>Brain Heart Infusion</i>
BSA	Albumina bovina sérica
CI50	Concentração de inibição em 50%
cm	Centímetros
DAPI	4',6'-diamino-2-fenil-indol
DNA	Ácido desoxiribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleotídeos tri fosfatados
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
g	Gramas/força de gravidade
G-418	Geneticin
GPI	Glicosilfosfatidilinositol
HCl	Ácido Clorídrico
KCl	Cloreto de potássio
kDa	Kilodalton
l	Litro
LB	Meio Luria Bertani
LC	Leishmaniose cutânea
LIT	Do inglês <i>Liver Infusion Tryptose</i>
LMC	Leishmaniose mucocutânea
LV	Leishmaniose visceral
mg	Miligrama
Mg <sup>2+</sup>	Magnésio
ml	Mililitro
mM	Milimolar
mNG	mNeonGreen

MPLA	Monofosforil-lipído A
NaCl	Cloreto de Sódio
ng	Nanograma
nm	Nanômetro
°C	Graus Celsius
<i>p</i>	p-valor
pb	Pares de base
PBS	Tampão fosfato salino
PCR	Reação em cadeia da polimerase
pH	Potencial hidrogeniônico
pmol	Picomole
SBF	Soro bovino fetal
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
SDS-PAGE	Do inglês <i>Dodecyl Sulfate - Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>
SUS	Sistema Único de Saúde
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
Tween 20	Polyethylene glycol sorbitan monolaurate
U	Unidade
UFSC	Universidade Federal de Santa Catarina
V	Volts
X-gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactopiranosídeo
$\alpha$	Alfa

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>15</b>
1.1	Doença de Chagas.....	15
1.2	Leishmanioses.....	17
1.3	Prevenção, controle e tratamento da doença de chagas e leishmanioses.....	19
1.4	Vacinas para doença de chagas e leishmanioses .....	21
1.5	OBJETIVOS .....	25
<b>1.5.1</b>	<b>Objetivo Geral.....</b>	<b>25</b>
<b>1.5.2</b>	<b>Objetivos Específicos .....</b>	<b>25</b>
<b>2</b>	<b>Metodologia .....</b>	<b>26</b>
2.1	Parasitas .....	26
2.2	Construção do vetor de expressão da quimera proteica em tripanosomatídeos ....	26
2.3	Sequenciamento do plasmídeo Quimera_FlagGPI_pROCK Neo .....	29
<b>2.3.1</b>	<b>Análises de bioinformática.....</b>	<b>30</b>
2.4	Avaliação da sensibilidade de formas promastigotas de <i>Leishmania tarentolae</i> ao G-418.	30
2.5	Transfecção do plasmídeo Quimera_FlagGPI_pROCK Neo EM <i>Leishmania tarentolae</i> e em <i>Trypanosoma rangeli</i> .....	31
2.6	Avaliação da eficácia da transfecção .....	31
<b>2.6.1</b>	<b>Extração e PCR dos parasitos transfectados.....</b>	<b>31</b>
<b>2.6.2</b>	<b>Citocalização da quimera proteica em <i>Trypanosoma rangeli</i> .....</b>	<b>32</b>
2.7	Avaliação da expressão da quimera proteica.....	32
<b>2.7.1</b>	<b>Ensaios de Western blot .....</b>	<b>32</b>
<b>3</b>	<b>Resultados e discussões .....</b>	<b>34</b>
3.1	Subclonagem da quimera proteica em vetor de expressão para tripanosomatídeos	34
3.2	Sequenciamento do plasmídeo Quimera_FlagGPI_pROCK.....	37

3.3	Avaliação da sensibilidade de formas promastigotas de <i>Leishmania tarentolae</i> ao G-418.	40
3.4	Avaliação da presença do plasmídeo Quimera_FlagGPI_pROCK Neo em transfectados de <i>Leishmania tarentolae</i> e <i>Trypanosoma rangeli</i> .....	41
3.5	Avaliação da transfecção do plasmídeos Quimera_FlagGPI_pROCK em <i>Leishmania tarentolae</i> e em <i>Trypanosoma rangeli</i> .....	43
<b>3.5.1</b>	<b><i>Leishmania tarentolae</i></b> .....	<b>43</b>
<b>3.5.2</b>	<b><i>Trypanosoma rangeli</i></b> .....	<b>46</b>
3.6	Avaliação da expressão da quimera proteica.....	48
<b>4</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>51</b>
<b>5</b>	<b>Perspectivas</b> .....	<b>51</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>52</b>



# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 DOENÇA DE CHAGAS

A doença de Chagas ou tripanosomíase americana é uma doença causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi* (CHAGAS, 1909), pertencente à família Trypanosomatidae e a classe Kinetoplastea. Atualmente estima-se que esta doença acomete cerca 6-7 milhões de pessoas no mundo, causando todo ano 30.000 novos casos e 12.000 mortes (DNDi, 2022). Antigamente ela era restrita apenas em áreas rurais da região das Américas, mas a mobilidade populacional fez com que muitas pessoas infectadas fossem morar em áreas urbanas, proporcionando um novo ambiente de transmissão. Assim, nos dias de hoje a doença de Chagas é encontrada em países da América do Norte, Europa e África, mas sua maior incidência é em 21 áreas endêmicas da América Latina, incluindo o Brasil. Acredita-se que aproximadamente 75 milhões de pessoas no mundo correm risco de infecção (WHO, 2022), sendo que, no Brasil, 2.740 casos de infecção foram registrados no período de 2010-2020 (BRASIL, 2022).

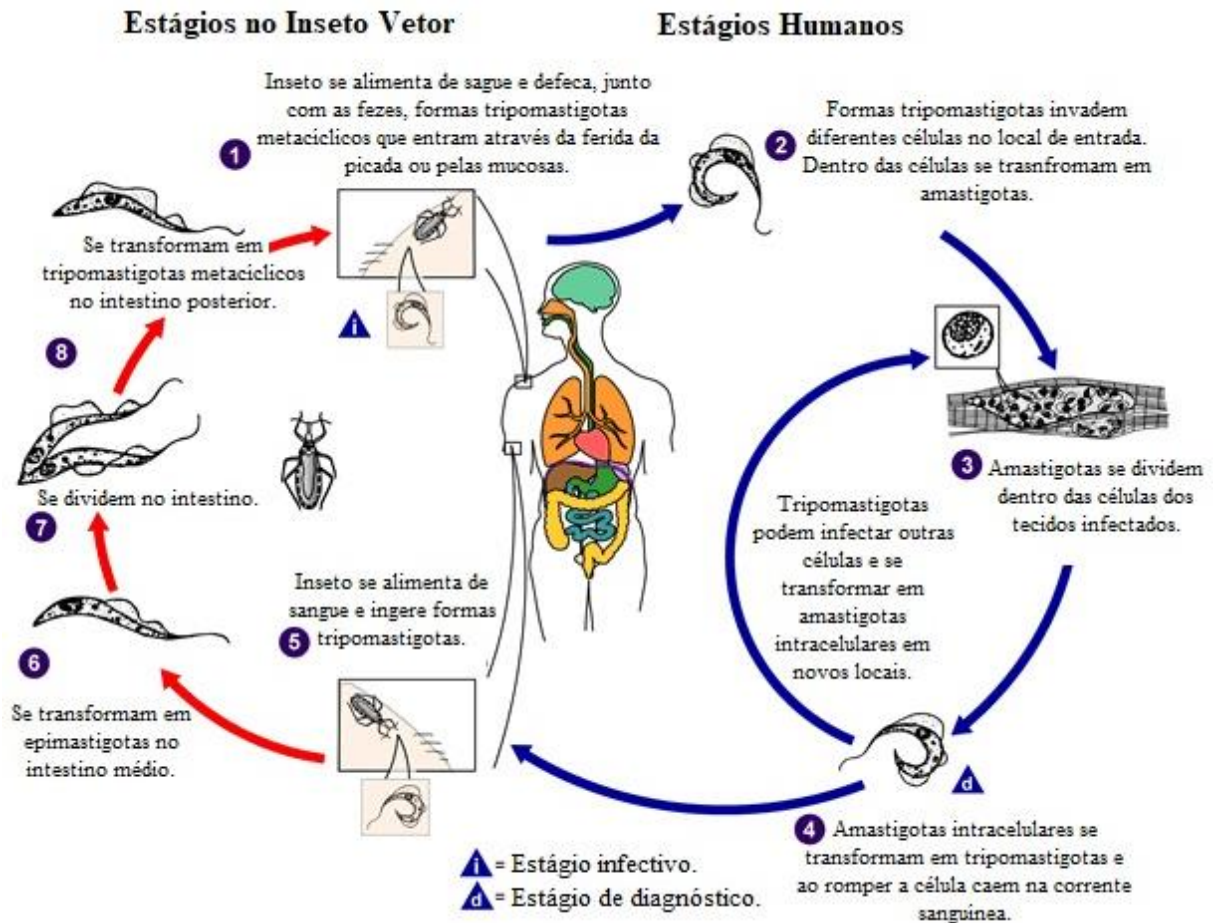
Essa doença é caracterizada por possuir uma fase aguda e uma crônica. A fase aguda se manifesta durante as primeiras semanas ou até dois meses após a infecção, apresentando elevada parasitemia. A maioria dos casos são assintomáticos e quando apresentam sinais clínicos, as manifestações são comuns a outras doenças como febre, fadiga, dores no corpo e entre outros (WHO, 2022). Entretanto, outros sinais podem ser detectados como sinais de penetração do parasito (chagoma), glândulas/regiões inchadas ou inchaço das pálpebras (sinal de Romana) (CDC, 2022). Já a fase crônica pode durar por toda vida da pessoa e na maioria dos infectados ela se apresenta assintomática. Esta fase é caracterizada pela redução dos parasitos circulantes na corrente sanguínea, pois eles passam a invadir principalmente células do cardíacas e do sistema digestivo. Assim, em dez a trinta anos os pacientes portadores da doença de Chagas podem sofrer complicações cardíacas como, aumento do coração, insuficiência cardíaca e até parada cardíaca. Além de complicações gastrointestinais, o que inclui aumento anormal do esôfago (megaesôfago) ou do cólon (megacólon) (CDC, 2022; DNDi, 2022).

A transmissão da doença de Chagas pode se dar por transmissão congênita, transfusão de sangue, transplante de órgão, consumo de alimentos contaminados, exposição laboratorial acidental e principalmente por transmissão vetorial através do inseto triatomíneo ou barbeiro pertencente à família Reduviidae dos gêneros *Triatoma*, *Rhodnius* e *Panstrongylus* (CDC, 2022). Essa última forma de transmissão caracteriza o ciclo de vida do *T. cruzi* como heteroxênico, ou seja, este parasito precisa passar por um hospedeiro invertebrado (barbeiro) e

por um hospedeiro vertebrados (mamíferos, incluindo o ser humano) para completar seu ciclo de vida. Dessa forma, podem ocorrer três ciclos de transmissão sendo eles o ciclo silvestre, peridoméstico e doméstico. O ciclo silvestre ocorre na natureza onde mamíferos como o tatu, macaco e veado servem de alimento para os barbeiros. Já o ciclo peridoméstico acontece quando o ambiente natural é alterado e animais selvagens, como marsupiais e roedores, passam a visitar as regiões peridomésticas para procurar alimentos, e animais domésticos, com cães e gatos, passam a visitar ambientes silvestres. Conseqüentemente, os vetores presentes nas áreas peridoméstica, podem gradualmente invadir o ambiente domiciliar e assim gerar um ciclo de transmissão doméstica, no qual o triatomíneo passa a se alimentar do sangue do ser humano (COURA; DIAS, 2009).

Durante o repasto sanguíneo, em um hospedeiro mamífero infectado, o triatomíneo ingere formas tripomastigostas que estão no sangue. Alguns desses parasitos podem ser eliminados no estômago do vetor, os que sobrevivem migram para o intestino se transformam nas formas epimastigotas (forma somente encontrada no inseto vetor). Essas formas se aderem a membrana perimicrovilares, secretadas pelas células intestinais do intestino médio posterior, e se dividem intensamente. Nas partes posteriores do intestino e no reto, os epimastigotas se despreendem e se transformam em tripomastigotas metacíclicos (forma infectiva para mamíferos) que são eliminados nas fezes e urina do inseto vetor. Em um novo repasto sanguíneo em um mamífero, além de se alimentar o barbeiro elimina a forma tripomastigota do *T. cruzi* juntamente com suas fezes e urina. No caso dos hospedeiros humanos, as principais vias de entrada do parasito no corpo são através da lesão da picada ou pela mucosa ocular (SOUZA *et al.*, 2010).

Assim, uma vez dentro do hospedeiro mamífero, as formas tripomastigotas invadem células próximas ao local de entrada, como fibroblastos, macrófagos e células epiteliais. A entrada na célula envolve o recrutamento de lisossomos ou através da invaginação da membrana plasmática a posterior fusão com o lisossomo (TARDIEUX *et al.*, 1992; ANDRADE; ANDREWS, 2004) formando o vacúolo parasitóforo. Após um tempo, o parasito lisa a membrana o vacúolo parasitóforo escapando para o citoplasma celular, onde se diferencia na forma amastigota possibilitando a replicação do parasito (NOGUEIRA; COHN, 1976; CARVALHO; SOUZA, 1989). Após isso, a forma amastigota do *T. cruzi* se diferencia novamente em tripomastigota que pode romper a célula e ficar livre para infectar novas células, além disso, podem estar na corrente sanguínea e ao fazer o repasto sanguíneo, o barbeiro pode se infectar continuando o ciclo (LIMA *et al.*, 2010) (Figura 1).

Figura 1 - Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*.

Fonte: adaptado do CDC.

## 1.2 LEISHMANIOSES

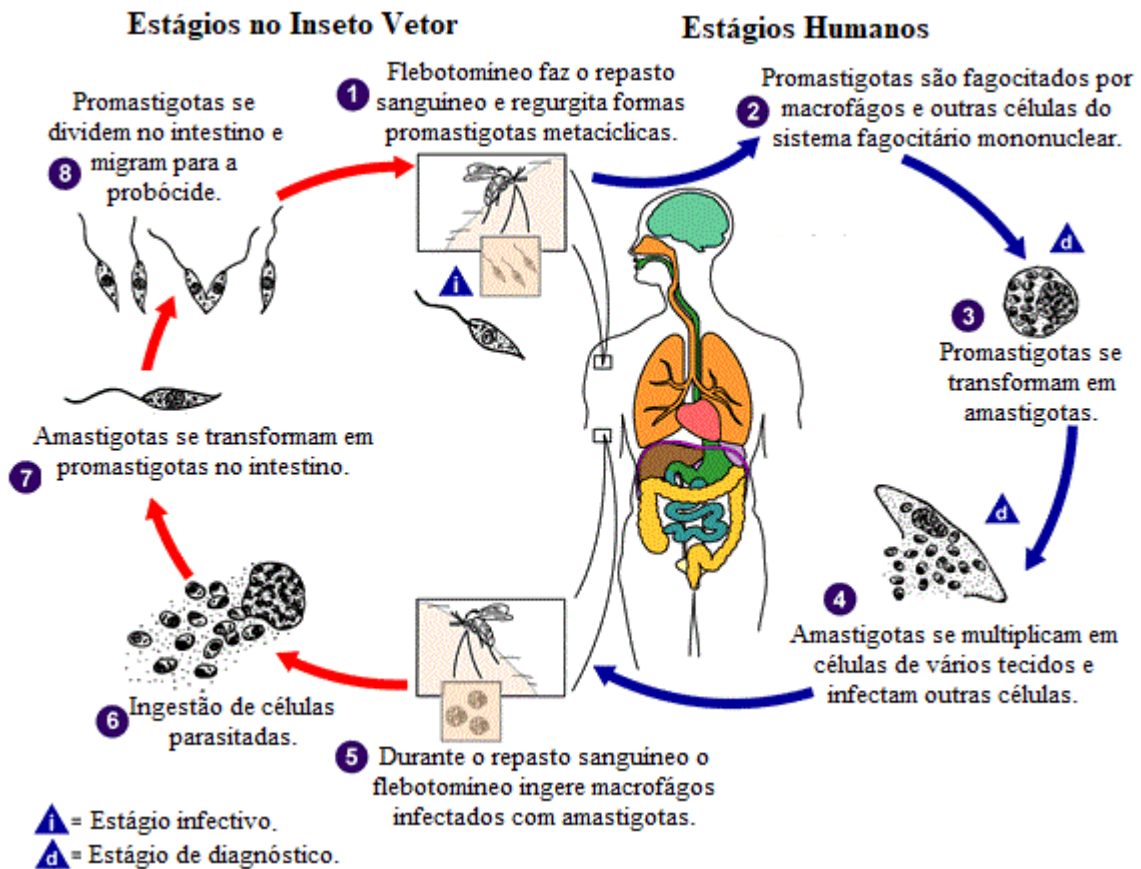
As leishmanioses são causadas por diferentes protozoários do gênero *Leishmania* que pertencem a família Trypanosomatidae e a classe Kinetoplastea, assim com o *T. cruzi*. Essa doença pode se manifestar de três formas distintas, a leishmaniose visceral (LV), cutânea (LC) e mucocutânea (LMC). A LV, causada pelas espécies *Leishmania (L.) infantum* e *Leishmania (L.) donovani*, é a forma mais grave podendo levar a morte se não tratada e seus sintomas são febre, perda de peso e aumento anormal do fígado (hepatomegalia) e do baço (esplenomegalia). Ocorre de forma endêmica em 76 países, contudo a maior parte dos casos se concentra no Brasil, África Oriental e na Índia e estima-se que anualmente ocorrem cerca de 50 a 90 mil novos casos no mundo (WHO, 2022). Na América Latina o Brasil é responsável por 90% dos casos e cerca de 3.500 pessoas são infectadas anualmente (BRASIL, 2022). A LC causada principalmente por *Leishmania (Viannia) brasiliensis*, *Leishmania (L.) major*, *Leishmania (L.) amazonensis* e *Leishmania (L.) mexicana*, é a manifestação mais comum e menos severa, é caracterizada por causar lesões na pele iniciando como inchaços ou caroços, podendo resultar em úlceras e

geralmente são indolores (CDC, 2022). Ela é endêmica em 87 países, incluindo o Brasil e acredita-se que todos os anos 600 mil a 1 milhão de pessoas são infectadas no mundo (DNDi, 2022). Segundo o Ministério da Saúde (2022), em 2020 aproximadamente 16 mil pessoas foram diagnosticadas com LC no Brasil. Por fim, a LMC principalmente associada a *L. brasiliensis*, pode se apresentar como uma complicação da LC ocorrendo meses ou anos após a cicatrização das úlceras cutâneas (DNDi, 2022). Ela leva a destruição das mucosas da boca, garganta e nariz e 90% dos casos se restringem a Bolívia, Brasil, Etiópia e Peru (WHO, 2022). Dessa forma, a Organização Mundial da Saúde estima que mais de 1 bilhão de pessoas vivem em áreas endêmicas e correm o risco de serem infectadas por diferentes espécies de *Leishmania* sp. acarretando nas diferentes formas clínicas das leishmanioses.

A principal forma de transmissão das leishmanioses é através da picada de fêmeas de flebotomíneo infectadas da subfamília Phlebotominae (BATES, 2007). Assim, como o *T. cruzi* as espécies do gênero *Leishmania* possuem o ciclo de vida heteroxênico, no qual infecta um hospedeiro vertebrado e um invertebrado para completar seu ciclo.

Ao se alimentarem de um mamífero infectado, as fêmeas de flebotomíneo ingerem além de sangue, células do sistema fagocitário mononuclear (macrófagos) infectados com formas amastigotas. Dentro do vetor, o parasito fica envolvido por uma matriz peritrófica secretada pelo intestino e se transforma em promastigotas procíclicas (forma flagelada com pouca motilidade), e se replica intensamente durante alguns dias. Depois, migram e se estabelecem no intestino anterior e médio e retomam sua replicação até que por fim atingem a válvula estomodeal do flebotomíneo. Neste local, as formas promastigotas procíclicas se transformam em promastigotas metacíclicas (forma infectiva). Assim, em um novo repasto sanguíneos as fêmeas de flebotomíneo regurgitam essas formas na lesão formada durante a sua alimentação, infectando um novo mamífero (BATES, 2007).

Dentro do hospedeiro vertebrado, as formas promastigotas induzem o recrutamento de neutrófilos nas primeiras horas (MÜLLER *et al.*, 2001; PETERS *et al.*, 2008) e de células do sistema fagocitário mononuclear, principalmente macrófagos. Essas células fagocitam os parasitos e esse processo é mediado por receptores presentes na membrana plasmática dos macrófagos. Neste processo, a *Leishmania* sp. é internalizada, sendo mantida dentro do vacúolo parasitóforo onde se transforma em amastigota e se replica (SOLBACH; LASKAY, 1999). Após se multiplicarem intensamente na forma amastigota provocam apoptose, morte celular e lise da célula (LÜDER *et al.*, 2001), liberando amastigotas para o meio extracelular que irão infectar novos macrófagos dando continuidade à infecção (Figura 2).

Figura 2 - Ciclo de vida da *Leishmania sp.*

Fonte: adaptado do CDC.

### 1.3 PREVENÇÃO, CONTROLE E TRATAMENTO DA DOENÇA DE CHAGAS E LEISHMANIOSES

A prevenção e o controle da doença de Chagas são baseados principalmente no controle vetorial através da pulverização de inseticidas de forma regular e contínua em residências infestadas com barbeiros. Na América Latina esse método foi o mais empregado, mostrando que essa forma de prevenção ajuda a reduzir o ciclo de transmissão doméstico e peridoméstico da doença (MONCAYO, 2003; WHO, 2022). O uso de mosquiteiros e a melhoria das habitações também são boas maneiras de reduzir a presença do vetor dentro das residências. A triagem através de diagnóstico sorológico de bancos de sangue e de órgãos destinados a transplantes ajudam a reduzir infecções por transfusão sanguínea e transplante de órgãos (PAHO, 2022). Outra forma de controle da doença é o tratamento antiparasitário com fármacos que visa eliminar a infecção por *T. cruzi*. Os medicamentos que possuem eficácia comprovada e são utilizados atualmente é o benznidazol, tratamento de primeira linha e o Nifurtimox, o qual não é utilizado no Brasil. Ambos os medicamentos podem causar efeitos adversos variando de

dermatite grave, dermatite associada a febre e linfadenopatia para o benznidazol e efeitos gastrointestinais e efeitos tóxicos neurológicos para o Nifurtimox (JACKSON *et al.*, 2010; PINAZO *et al.*, 2010; TORNHEIM *et al.*, 2013), por isso não é indicado para mulheres grávidas.

Em relação a cura parasitológica, esses medicamentos podem chegar a 100% de eficácia ao serem administrados logo após a infecção ou transmissão congênita. Essa eficiência aumenta em crianças e reduz com o tempo de infecção e a idade (ANDRADE *et al.*, 1996; PAHO, 2022). Em relação ao tratamento na fase crônica há estudos que relatam a prevenção ou o retardo do desenvolvimento de alterações clínico-patológicas, porém o tratamento não pode passar de dois meses devido à alta chance de efeitos adversos (ESTANI *et al.*, 1998; VIOTTI *et al.*, 2006; FABBRO *et al.*, 2007; WHO, 2022).

Entretanto, apesar do controle vetorial ser eficiente, ele necessita ser repetido constantemente o que requer financiamento, equipamentos e pessoas para realizar esse serviço o que não é possível para muitas regiões pobres. Além do mais a existência de um grande número de espécies que são vetores da doença impossibilita a completa interrupção do ciclo de transmissão (TARLETON *et al.*, 2007). Juntamente com a existência de reservatórios animais, falta de medicamentos adequados, pessoas assintomáticas e falta de tratamento eficaz para pessoas na fase crônica a completa eliminação do *T. cruzi* se torna impossível (TARLETON; CURRAN, 2012; ESCH; PETERSEN, 2013).

Para realizar a prevenção e o controle de transmissão das leishmanioses se realiza um controle de vetores como também de reservatórios animais (principalmente para leishmaniose visceral). Assim como para doença de Chagas, a pulverização de inseticidas e o uso de mosquiteiros tratados com inseticidas ajudam a reduzir ou até mesmo eliminar a transmissão da doença no ambiente domiciliar (WHO, 2022). Evitar ficar ao ar livre no período de alimentação do vetor (anoitecer e amanhecer), como também utilizar repelentes e minimizar a quantidade de pele exposta através do uso de blusas de manga comprida e calça ajudam evitar o contato com o flebotomíneo (CDC, 2022). Para o controle dos reservatórios animais cada país ou região adota uma medida distinta. No Brasil, o principal reservatório animal da doença é o cão doméstico, assim o país adotou políticas públicas voltadas para a eutanásia de cães soropositivos. Entretanto, por mais que o abate de cães inicialmente pareça reduzir a prevalência de cães infectados por *Leishmania* sp., não há nenhum estudo que mostre a eficiência desta medida de prevenção no Brasil (DIETZE *et al.*, 1997; COURTENAY *et al.*, 2002). Além disso, a incidência de cães assintomáticos, a demora para realizar os testes e

remoção de cães infectados e a rápida reposição de animais pelos tutores proporcionam a continuidade do ciclo de transmissão. Além disso, o apego emocional dos tutores com seus cães também contribui para a baixa adesão à esta forma de controle, assim uso coleiras repelentes e vacinação de cães torna-se uma alternativa mais viável (ESCH *et al.*, 2012 ESCH; PETERSEN, 2013).

O tratamento das leishmanioses depende da espécie do parasito e da condição do paciente (gravidez, imunossupressão), mas de forma geral ela se dá pelo uso de antimoniato de N-metil glucamina como fármaco de primeira linha, e anfotericina B nas formulações lipossomal ou desoxicolato de anfotericina B como medicamentos de segunda linha, especialmente quando há resistência ao de primeira linha e em pacientes imunodeprimidos. Em 2020 foi incorporado ao Sistema Único de Saúde (SUS) a miltefosina para tratamento de leishmaniose tegumentar, contudo devido a falta de dados científicos esse medicamento não é amplamente utilizado (BRASIL, 2021; WHO, 2022). Esses fármacos possuem um perfil de toxicidade, causando muitos efeitos adversos como náuseas, dores abdominais além de causarem problemas renais, cardíacos e hepáticos (MONZOTE, 2009; BRASIL, 2021). Além disso, nenhum desses medicamentos podem proporcionar a cura estéril, pois *Leishmania spp.* parece permanecer viável no hospedeiro e podem reacender os sintomas quando ocorre imunossupressão (WHO, 2022). Outro aspecto, é o aumento de cepas resistentes aos medicamentos, podendo ser ocasionado pela falha terapêutica, abandono do tratamento devido aos efeitos adversos ou não adesão ao tratamento, pois a maioria dos fármacos são administrados por via intravenosa necessitando de um profissional da saúde experiente (SUNDAR *et al.*, 1994; SUNDAR *et al.*, 2000; WHO, 2022).

Considerando que a doença de Chagas e as leishmanioses são doenças tropicais negligenciadas com um elevado impacto socioeconômico e que suas formas de prevenção, controle e tratamento não são eficientes para interromper o ciclo de transmissão, o desenvolvimento de vacinas se torna uma alternativa de interesse. O uso de medidas preventivas como a vacinação podem reduzir custos com tratamentos por prevenir enfermidades, além de reduzir a severidade e morbidade associadas as estas doenças (LEE *et al.*, 2010; LEE *et al.*, 2012).

#### 1.4 VACINAS PARA DOENÇA DE CHAGAS E LEISHMANIOSES

O surgimento das vacinas foi um ponto chave para a história da ciência e da saúde humana e animal. Desde que a primeira vacina foi criada, proporcionou uma redução drástica

na mortalidade e morbidade, aumento do tempo de vida e diminuiu custos com tratamentos (PLOTKIN *et al.*, 2012). Isso pode ser constatado quando observamos os impactos positivos causados pelo surgimento de vacinas contra vírus e bactérias como a BCG, febre amarela, hepatite B, poliomielite e entre outras. A proteção mediada pelas vacinas envolve o sistema imune adaptativo, principalmente a imunidade do tipo humoral de longa duração, que estimula a produção de anticorpos, sendo este um aspecto importante. Isso porque, quando o corpo entra em contato com o patógeno os anticorpo protetores, produzidos devido a vacina, servirão como primeira linha de defesa (THAKUR *et al.*, 2012).

Contudo, ainda carecemos de vacinas para muitas doenças importantes, principalmente para parasitas. Existem poucas vacinas antiparasitárias e em sua maioria são direcionadas a animais (DALTON; MULCAHY, 2001). Entretanto, há muitas doenças negligenciadas que até os dias de hoje afetam pessoas e animais no mundo inteiro e que não possuem uma forma eficaz e segura de prevenção e tratamento, como a doença de Chagas e as leishmanioses. Nesse contexto, o desenvolvimento de uma vacina, mesmo com eficácia protetora moderada, é fundamental para controlar a transmissão dessas doenças (LEE *et al.*, 2010; LEE *et al.*, 2012).

Atualmente não há uma vacina disponível para doença de Chagas, mas muitas pesquisas vêm sendo feitas para desenvolver uma estratégia vacinal eficiente para esta doença. Diversas metodologias vêm sendo empregadas como imunização com parasitos vivos, mortos, atenuados ou frações celulares (MILLER *et al.*, 1996; BASSO *et al.*, 2008; BRANDAN *et al.*, 2011). Outras formulações com proteínas purificadas, recombinantes e até mesmo de DNA vem sendo exploradas (SNARY, 1983; PEREIRA *et al.*, 2003; DUMONTEIL *et al.*, 2022). Além disso, há estudos que visam desenvolver uma vacina terapêutica, afim de utilizá-la em pacientes na fase crônica da doença sendo ou não combinada com fármacos disponíveis (SANCHEZ-BURGOS *et al.*, 2007; ZAPATAESTRELLA *et al.*, 2006).

Em relação as leishmanioses, o primeiro relato de vacinação foi o método conhecido como leishmanização que consistia na inoculação de formas virulentas de *Leishmania* sp. em pessoas saudáveis buscando conferir proteção contra a leishmaniose cutânea, reduzindo as chances de desenvolvimento de lesões na face, tendo sido muito utilizado em locais endêmicos da doença (NOAZIN *et al.*, 2008; SINGH; SUNDAR, 2012). Entretanto, esse método foi descontinuado devido à falta de padronização, controle das doses, identidade das cepas e perda de virulência das cepas. Além disso, alguns indivíduos apresentavam lesões persistentes, incorrendo em grande risco de disseminar leishmaniose em imunocomprometidos



(GILLESPIE *et al.*, 2016). Posteriormente, se desenvolveu formulações utilizando parasitos inteiros e mortos, sendo ou não combinadas com a vacina BCG (MAYRINK *et al.*, 1985; ANTUNES *et al.*, 1986; ARMIJOS *et al.*, 1998; SHARIFI *et al.*, 1998). Contudo, nenhuma das abordagens utilizando parasitos mortos mostrou reprodutibilidade da eficácia protetora além de não produzirem uma resposta imune relevante e duradoura (NOAZIN *et al.*, 2008).

Com o avanço da tecnologia, novas formulações começaram a ser exploradas e estratégias utilizando proteínas recombinantes, DNA, formulações lisossômicas e entre outras, foram criadas (MAZUMDAR *et al.*, 2004; AGUILAR-BE *et al.*, 2005; FERNANDES *et al.*, 2008). Outra estratégia que vem sendo utilizada é formulações com proteínas quiméricas, pela junção de diferentes proteínas e epítomos imunogênicos (LAGE *et al.*, 2020; OSTOLIN *et al.*, 2021). Para isso, diversos modelos animais são utilizados a fim de testar a eficácia vacinal, sendo o cão um modelo útil, uma vez que a vacinação bem-sucedida em cães pode controlar a transmissão da doença para humanos em áreas endêmicas (TESH, 1995). Com isso em mente, muitas formulações foram testadas e sua eficácia foi avaliada para serem utilizadas como vacinas caninas. Atualmente no Brasil, apenas a vacina recombinante Leish-Tec<sup>®</sup> foi regulamentada para uso em cães sob a licença N° 9.270/2007 e apresenta uma eficácia vacinal de 71,4% (REGINA-SILVA *et al.*, 2016).

Considerando que os gêneros *Trypanosoma* e *Leishmania* compartilham em média 80-93% dos seus genes, uma nova abordagem vacinal passa a ser explorada levando em consideração o alto nível de conservação genética entre esses tripanosomatídeos (KISSINGER, 2006; DUMONTEIL, 2009). Uma estratégia que teve a participação de nosso grupo, buscou a construção de uma vacina multicompetente para proteção contra infecção por *Trypanosoma cruzi* e diferentes espécies de *Leishmania*. Essa construção se baseou em genômica comparativa e levou ao desenvolvimento de uma proteína quimérica formada pela fusão de epítomos antigênicos conservados entre *L. braziliensis*, *L. donovani*, *L. infantum*, *L. major*, *L. mexicana* e *T. cruzi* (Cepas CL Brener e Sylvio) (FIGUEIREDO, 2019).

A proteína quimérica purificada a partir de expressão heteróloga em *Escherichia coli* foi utilizada em ensaios de imunização de camundongos Balb/C, associada ou não à monofosforil-lipídeo A (MPLA) como adjuvante. Nos ensaios de desafio dos animais imunizados frente à infecção experimental por *T. cruzi*; por *L. mexicana* (como modelo de leishmaniose cutânea) e por *L. infantum* (como modelo de leishmaniose visceral), os animais desafiados com formas sanguíneas de *T. cruzi* revelaram uma redução de 68% da parasitemia. Além disso, detectaram uma cicatrização mais rápida e a redução e 60% das lesões cutâneas

determinadas por *L. mexicana* e uma proteção significativa com redução na carga parasitária (73%) das lesões hepáticas nos animais desafiados com *L. infantum* em relação aos grupos controle (FIGUEIREDO *et al.*, 2019).

Considerando esses resultados preliminares do seu uso como imunizante, buscamos adaptar a expressão dessa proteína quimérica em tripanosomatídeos não patogênicos (*Leishmania tarentolae* e *Trypanosoma rangeli*) utilizando vetores plasmidiais que permitam a apresentação da mesma na membrana celular dos parasitos.

A *L. tarentolae* pertence ao subgênero *Sauroleishmania* e é um protozoário parasita de lagarto que não é infectivo para mamíferos, mas que possui uma maquinaria eucariótica de expressão proteica similar aos organismos patogênicos para os quais se deseja elicitar uma resposta imune protetora, possuindo ainda a vantagem de crescer rapidamente *in vitro* e produzir grandes quantidades de proteínas recombinantes (KLATT *et al.*, 2019), fato pelo qual já sendo utilizada em estudos biotecnológicos como organismo vacinal com bons resultados (ABDOSSAMADI *et al.*, 2017; BRETON *et al.*, 2005). O *T. rangeli* é um parasito filogeneticamente próximo do *T. cruzi*, sendo transmitido pelos mesmos vetores e igualmente infectivo para o ser humano, porém, não sendo patogênico para seus hospedeiros mamíferos. Apesar disso, a infecção pelo *T. rangeli* induz uma resposta imune humoral com elevados níveis de anticorpos que incorrem em uma reatividade cruzada com o *T. cruzi* em exames sorológicos convencionais face ao compartilhamento de cerca de 60% de suas constituições antigênicas solúveis (GRISARD *et al.*, 1999; STOCO *et al.*, 2014). Ainda que alguns pesquisadores relatem a indução de proteção contra a infecção pelo *T. cruzi* em animais previamente infectados pelo *T. rangeli*, este parece ser um fenômeno cepa-dependente, apontando somente uma redução não significativa da parasitemia pelo *T. cruzi* nos animais desafiados, carecendo de detalhamento acerca da caracterização dos parasitos utilizados e dos mecanismos pelos quais esta redução da carga parasitária ocorre (INTROINI *et al.*, 1998; BASSO *et al.*, 2008).

Dessa forma, considerando a relevância médico-social da doença de Chagas e das leishmanioses e de sua natureza como doenças tropicais negligenciadas, o que limita o desenvolvimento de novas formas de controle, buscamos expressar a proteína quimérica em organismos não patogênicos como uma nova estratégia para elicitação de resposta imune contra os agentes etiológicos destas doenças.

Considerando que a proteína quimérica expressa de forma heteróloga em *E. coli* gerou resultados promissores quanto ao curso destas doenças em modelos animais, nossa hipótese é que realizando a expressão da mesma em organismos filogeneticamente próximos aos agentes

etiológicos das leishmanioses e doença de Chagas, permita a apresentação dos epítomos da quimera por tripanosomatídeos, levando a indução de uma resposta imune humoral mais efetiva e duradoura. Neste estudo, portanto, tratamos de realizar o desenvolvimento de uma ferramenta que permita esta apresentação de antígenos por tripanosomatídeos não patogênicos.

## 1.5 OBJETIVOS

### 1.5.1 Objetivo Geral

Expressar uma proteína quimérica pan-tripanosomatídeos em *Leishmania tarentolae* e em *Trypanosoma rangeli* como estratégia vacinal para Doença de Chagas e Leishmanioses.

### 1.5.2 Objetivos Específicos

- Subclonar o gene da quimera proteica em um vetor plasmidial adaptado para expressão heteróloga em tripanosomatídeo;
- Expressar, de forma heteróloga, o gene da quimera proteica em *Leishmania tarentolae*;
- Expressar, de forma heteróloga, o gene da quimera proteica em *Trypanosoma rangeli*;
- Avaliar a expressão da quimera proteica nos organismos transfectados.

## 2 METODOLOGIA

### 2.1 PARASITOS

O cultivo da forma promastigota de *Leishmania tarentolae* da cepa P10 foi realizada em meio BHI (*Brain Heart Infusion*) suplementado com hemina a 25 mg/ml, 50 U/ml de penicilina e 50 µg/ml de estreptomicina (Cultilab) a 26,5 °C. O cultivo de formas epimastigotas de *Trypanosoma rangeli* foi realizado em meio LIT (*Liver Infusion Tryptose*) suplementado com 50 U/ml de penicilina e 50 µg/ml de estreptomicina (Cultilab) e 10% de soro bovino fetal (Sigma-Aldrich) a 26,5 °C. Estas cepas foram mantidas através de passagens semanais em seus respectivos meios e encontram-se criopreservadas no Laboratório de Protozoologia (MIP/CCB/UFSC).

### 2.2 CONSTRUÇÃO DO VETOR DE EXPRESSÃO DA QUIMERA PROTEICA EM TRIPANOSOMATÍDEOS

O desenvolvimento da proteína quimérica foi realizado pelo Laboratório de Imunologia e Genômica de Parasitos da UFMG (FIGUEIREDO et al., 2019). O gene da proteína quimérica é formado pela fusão de sequências de DNA conservadas que codificam para epítomos com elevado potencial imunogênico, definidas por análises de bioinformática de alta stringência utilizando como base os genomas de *L. braziliensis*, *L. donovani*, *L. infantum*, *L. major*, *L. mexicana* e *T. cruzi* (Cepas CL Brener e Sylvio), considerando também os padrões de expressão proteica. A estrutura quimérica final possui 1.707 pares de base (pb) representando 66 epítomos distintos e foi sintetizada pela empresa GenScript, tendo inicialmente sido clonada em vetor pUC57. Salienta-se que o processo de desenvolvimento e uso desta quimera para fins diagnósticos foi registrado no INPI (Processo BR 10 2018 002228 8), sendo a UFSC participante deste registro através do nosso grupo de pesquisa.

O vetor pUC57 contendo a sequência codificante para a quimera proteica foi utilizado na transformação de bactérias *E. coli* DH5α por choque térmico, seguindo o protocolo padrão do laboratório. Após a transformação as bactérias foram crescidas em meio SOC (2 g/L triptona, 0,5 g/L extrato de levedura, 1 mM NaCl, 0,25 mM KCl, 2 mM Mg<sup>2+</sup>, 2 mM Glicose) e mantidas a 37 °C por 1 hora, sob agitação a 120 rpm (Shaker MaxQ 4000, Thermo Scientific). Depois da incubação, a suspensão celular foi plaqueada em meio LB (10 g/L triptona, 5 g/L extrato de levedura, 0,17 mM NaCl) com ampicilina (100 µg/ml) e mantida por 12 horas a 37 °C. Algumas colônias foram selecionadas, repicadas e crescidas em meio LB suplementado ampicilina (100 µg/ml) por 16 horas, a 37 °C sob agitação. Em seguida, foi realizado a extração do DNA

plasmidial por protocolo padrão de lise alcalina (SAMBROOK; RUSSEL, 2001), sendo o material obtido dosado por espectrometria a 260 a 280 nm em equipamento Picodrop P100 e estocado a -20 °C.

Para a subclonagem do gene codificante para a quimera em vetor de expressão adaptado a tripanosomatídeos, foram desenhados iniciadores específicos quimera senso (5' **GGT ACC** TTA CAG AAT CTG CAC GGT GCT 3') e quimera antissenso (5' **AAG CTT** ATG GCC CTG CTG GAA CTG C 3'), os quais foram acrescidos de sítios de restrição para as enzimas *KpnI* e *HindIII* nas suas extremidades 5' (sublinhado/negrito), respectivamente. A amplificação do gene codificante para a quimera foi realizada via PCR utilizando 1 U da enzima *Taq* DNA polimerase no tampão do fabricante (Invitrogen), 2 mM de dNTP (Invitrogen), 10 pmol de cada iniciador e 50 ng de DNA molde. O perfil térmico de amplificação consistiu em uma etapa de desnaturação a 95 °C por 2 minutos, seguida por 35 ciclos contendo uma etapa de desnaturação (95 °C por 1 minuto), uma etapa de ligação dos iniciadores (62 °C por 30 segundos) e uma etapa de alongação do DNA pela polimerase (72 °C por 2 minutos). Por fim, uma etapa da reação à 72 °C por 10 minutos foi adicionada para alongação das cadeias. Os produtos de amplificação foram visualizados através de resolução por eletroforese em gel de agarose 1% corado pelo brometo de etídio (10 mg/ml), sendo os resultados registrados digitalmente. Na sequência, realizou-se a purificação do fragmento de 1789 pb da amplificação excisando-o do gel e utilizando o kit *GFX PCR DNA and gel band purification* (GE Healthcare), segundo as especificações do fabricante.

O fragmento da quimera foi inicialmente subclonado no vetor pGEM<sup>®</sup>-T Easy (Promega), seguindo-se as recomendações do fabricante. Após a transformação em bactérias *E. coli* *Top 10*, conforme descrito anteriormente, a suspensão celular foi plaqueada em meio LB (10 g/L triptona, 5 g/L extrato de levedura, 0,17 mM NaCl contendo X-gal (20 µg/ml), IPTG (40 µg/ml) e ampicilina (100 µg/ml)) e mantida por 12 h a 37 °C. A ligação do inserto no vetor foi verificada primariamente pela coloração branca das colônias, as quais foram selecionadas para confirmação através de PCR utilizando-se iniciadores dirigidos as sequências do vetor que flanqueiam o sítio de clonagem e também iniciadores dirigidos para o gene da quimera, descritos acima. Os iniciadores dirigidos ao plasmídeo pGEM<sup>®</sup>-T Easy foram o M13 senso (5' CGC CAG GGT TTT CCC AGT CAC GAC 3') e o M13 antissenso (5' TAC CAC AGG AAA CAG CTA TGA C 3'). Em seguida, os fragmentos amplificados foram resolvidos através de eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio, conforme descrito acima.

Após a confirmação, as colônias contendo o inserto desejado foram repicadas e crescidas a 37 °C em meio LB com ampicilina (100 µg/ml) por 16 horas sob agitação, sendo os plasmídeos extraídos pelo protocolo padrão de lise alcalina (SAMBROOK; RUSSEL, 2001), dosados por espectrofotometria a 260 e 280 nm em equipamento Picodrop P100 e estocados a -20 °C.

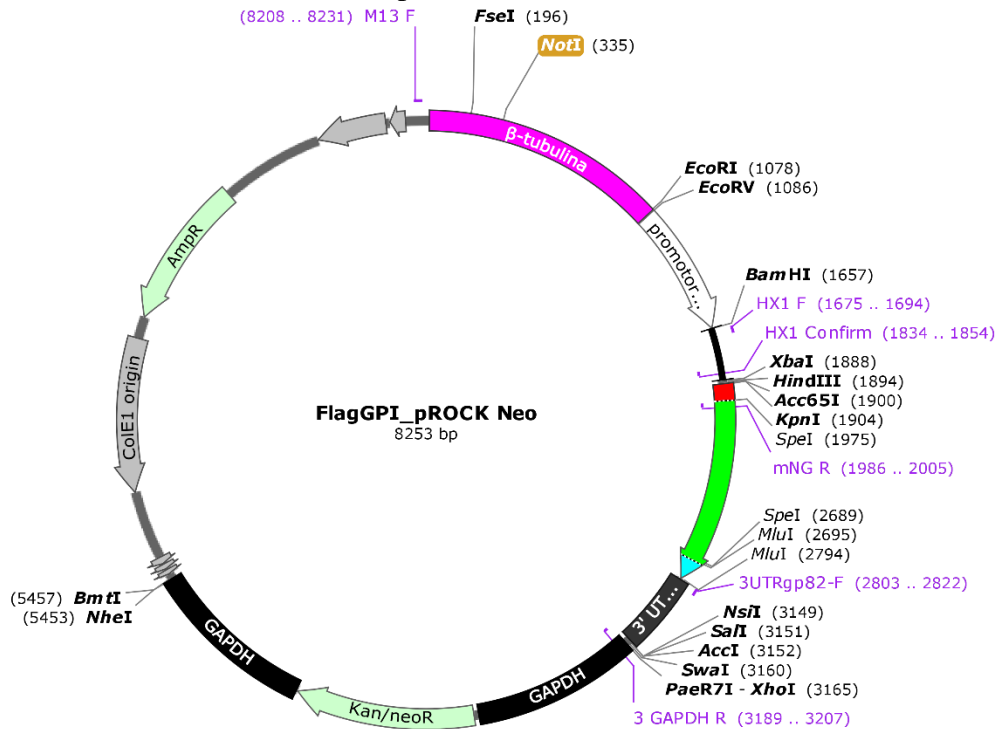
Por fim, subclonamos o gene da quimera em um plasmídeo de expressão adaptado para tripanosomatídeos, desenvolvido por nosso grupo. O plasmídeo FlagGPI\_pROCK Neo (SILVA, 2021) foi desenvolvido com base na subclonagem da sequência sintética de 3xFlagTag<sup>®</sup> (DYKDHD-G-DYKDHD-I-DYKDDDDK) (Sigma-Aldrich), mNeonGreen e âncora GPI de *T. rangeli* em um vetor pROCK-Neo em substituição ao gene da eGPF do vetor de expressão e sua estrutura está demonstrada na figura 3.

Para tanto, o plasmídeo pGEM<sup>®</sup>-T Easy contendo o gene da quimera e o plasmídeo FlagGPI\_pROCK Neo foram digeridos com as enzimas *KpnI* (Invitrogen) a 37 °C por 3 horas e *HindIII* (Promega) a 37 °C por 5 horas. O fragmento correspondente ao gene da proteína quimérica foi purificado do gel utilizando-se o kit *GFX PCR DNA and gel band purification* (GE Healthcare), segundo as especificações do fabricante. A ligação do fragmento purificado no vetor foi realizada na presença da enzima T4 DNA ligase (Promega) em tampão fornecido pelo fabricante e os produtos da ligação foram utilizados para transformação de bactérias *E. coli Top 10*, que foram inicialmente crescidas em meio SOC (2 g/L tripton, 0,5 g/L extrato de levedura, 1 mM NaCl, 0,25 mM KCl, 2 mM Mg<sup>2+</sup>, 2 mM Glicose) e mantidas a 37 °C por 1 hora, sob agitação a 120 X g (Shaker MaxQ 4000, Thermo Scientific). Depois, a suspensão celular foi plaqueada em meio LB (10 g/L tripton, 5 g/L extrato de levedura, 0,17 mM NaCl) com ampicilina (100 µg/ml) e mantida por 12 horas a 37 °C.

Algumas colônias foram selecionadas para verificar a correta inserção do gene codificante para a quimera no plasmídeo FlagGPI\_pROCK Neo, através de PCR utilizando-se uma combinação iniciadores dirigidos ao vetor e a sequência da quimera. Os iniciadores direcionados ao vetor foram o HX1 senso (5' GGC GGT TAA CGA GTT TCT TC 3') e mNG antissenso (5' TAT CCT CCT CGC CCT TGC TC 3') e os mesmo iniciadores quimera senso e antissenso dirigidos a quimera descritos acima. Em seguida, os fragmentos amplificados foram resolvidos através de eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio, indicando a presença dos insertos. Os clones selecionados contendo o plasmídeo Quimera\_FlagGPIpROCK Neo foram crescidos em meio LB (Luria-Bertani) suplementado com 100 µg/ml de ampicilina, por 16 horas a 37 °C, sendo as bactérias submetidas a lise alcalina

para extração dos plasmídeos. Por fim, foram dosados por espectrofotometria a 260 e 280 nm em equipamento Picodrop P100 e estocados a -20 °C.

Figura 3 - Mapa do plasmídeo FlagGPI\_pROCK Neo utilizado para expressão proteica em tripanosomatídeos.



Fonte: Silva, 2021

\* Mapa do vetor Flag GPI pROCK. Em lilás são regiões de ligação dos iniciadores desenhados para o plasmídeo, em negrito os sítios únicos de clivagem e entre parênteses as distâncias em pares de base em relação ao início da sequência  $\beta$ -tubulina. Em vermelho está a sequência 3xFlagTag, em verde o gene mNeonGreen seguido pelo gene da âncora GPI em azul.

### 2.3 SEQUENCIAMENTO DO PLASMÍDEO Quimera\_FlagGPI\_pROCK Neo

Os plasmídeos Quimera\_FlagGPIpROCK Neo gerados conforme descrito no item 2.2 foram sequenciadas pela empresa ACTGene Análises Moleculares (Alvorada, RS) para confirmação da correta inserção do fragmento e a manutenção da correta fase de leitura. Para isso, utilizaram-se no sequenciamento pelo método de Sanger os iniciadores específicos direcionados ao inserto (quimera) e a sequência do vetor (FlagGPI\_pROCK Neo) (item 2.2) e 150 ng de DNA plasmidial conforme o protocolo da empresa.

### 2.3.1 Análises de bioinformática

Os cromatogramas gerados a partir do sequenciamento foram inicialmente submetidos ao programa *Pred-Phrap-Consed* (EWING; GREEN, 1998; EWING et al., 1998) para estimar qualidade das bases sequenciadas, tendo sido utilizado um cut-off de *phred*  $\geq 30$  para, realizar a limpeza dos cromatogramas, removendo bases de baixa qualidade, determinar as bases sequenciadas (*basecalling*), obter sequências contíguas (*contigs*) quando houvesse complementariedade dentre os fragmentos gerados e gerar uma sequência consenso.

As sequências consenso obtidas foram alinhadas através do software *Clustal Omega* (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) com a sequência montada da Quimera\_FlagGPI\_pROCK.

### 2.4 AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE DE FORMAS PROMASTIGOTAS DE *Leishmania tarentolae* AO G-418.

Promastigotas de *Leishmania tarentolae* da cepa P10 obtidos no terceiro dia de cultivo foram distribuídos em uma placa de 96 poços na concentração de  $0,72 \times 10^6$  parasitos por poço em 180  $\mu$ l de meio BHI suplementado com hemina a 25 mg/ml. Em seguida, os parasitos foram tratados com 300  $\mu$ g/ml, 100  $\mu$ g/ml, 33,3  $\mu$ g/ml, 11,1  $\mu$ g/ml, 3,70  $\mu$ g/ml, 1,24  $\mu$ g/ml, 0,41  $\mu$ g/ml de Geneticin – G418 (Santa Cruz). Utilizamos 7,4  $\mu$ g/ml de anfotericina B (Sigma-Aldrich) como controle positivo e como controle negativo os parasitos somente em meio de cultura. A placa foi incubada por 67 horas em estufa a 26 °C e então, adicionado Resazurina (Sigma-Aldrich) a 250  $\mu$ g/ml em todos os poços e mantida por mais 5 horas em estufa a 37 °C. A fluorescência foi lida em um comprimento de onda de 530 nm de excitação e 590 nm de emissão de filtro em espectrofotômetro Tecan® Modelo Infinite M200 (TADELE et al., 2021). Os ensaios foram realizados em triplicatas técnicas e repetidos três vezes.

Os valores da concentração de inibição, do crescimento parasitário *in vitro*, em 50% (CI50) foram estimados a partir dos valores médios obtidos na triplicata do percentual de inibição utilizando-se a seguinte equação:

$$\text{Percentual de inibição: } 100 - (\text{DO}_{\text{amostra}}/\text{DO}_{\text{controle negativo}}) * 100$$

Os valores brutos obtidos foram armazenados em planilha no EXCEL®, onde passaram por um tratamento para realizar análises no software *GraphPad Prism* (v. 8.0).



Esses valores foram determinados pela regressão não linear da curva a dose resposta com transformação de  $x$  para  $\log(x)$  e  $\log(\text{inhibitor})$  vs  $\text{normalized response} - \text{variable slope}$ . As médias das CI50 foram submetidas a análises estatísticas. Para avaliar a normalidade dos dados utilizou o teste de Shapiro-Wilk e para a identificação de outliers os dados foram submetidos ao teste de outliers de ROUT. Para análise paramétrica foi usado análise de variância simples (*one-way ANOVA*) com teste múltiplo de Tukey's com valores de  $p < 0,05$  considerados significativos.

## 2.5 TRANSFEÇÃO DO PLASMÍDEO Quimera\_FlagGPI\_pROCK Neo EM *Leishmania tarentolae* E EM *Trypanosoma rangeli*

Para a transfeção utilizamos  $5 \times 10^7$  parasitos, os quais foram primeiramente lavados duas vezes em tampão fosfato salino (PBS) pH 7,4 por centrifugação 2.000 X g por 10 minutos a 22 °C, sendo então adicionados de 200  $\mu$ l de tampão de eletroporação e 10  $\mu$ g de DNA plasmidial. A cada transfeção foi realizada em cubetas de 0,2 cm de abertura (Bio-Rad), em pulso único, sendo utilizado o programa U-033 no equipamento Nucleofector (Lonza). Em seguida, os parasitos foram transferidos para tubos contendo meio de cultura específico a cada espécie conforme descrito no item 2.1, cultivados por 24 horas e então acrescentados 37  $\mu$ g/ml e 20  $\mu$ g/ml G-418 para a seleção de população transfectante de *L. tarentolae* e *T. rangeli* conforme protocolos do laboratório, respectivamente. Os parasitos foram mantidos em fase exponencial de crescimento a 27 °C através de repiques semanais em meio específico suplementado com G-418. Os fenótipos dos parasitos transfectados foram comparados as cepas selvagens, observando-se o crescimento, a ocorrência de divisão celular, a motilidade, a morfologia e a expressão de mNeonGreen dos mesmos.

## 2.6 AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DA TRANSFEÇÃO

### 2.6.1 Extração e PCR dos parasitos transfectados

Após um período de pelo menos 21 dias de cultivo *in vitro* na presença de droga seletiva (G-418), a comprovação da presença do plasmídeo Quimera\_FlagGPI\_pROCK Neo nas cepas de transfectados foi realizado através de PCR.

Para tanto, as formas promastigotas de *L. tarentolae* e epimastigotas de *T. rangeli* foram coletadas e lavadas duas vezes em PBS pH 7,4 por centrifugação 2.000 X g por 10 minutos a 22 °C. Após a adição de 500  $\mu$ l de tampão de lise (10 mM Tris-HCl pH 7,4; 10 mM

NaCl; 25 mM EDTA pH 8,0; 1% Dodecil Sulfato de Sódio - SDS) suplementados com 2,5 µl de proteinase K a 20 mg/ml (Sigma-Aldrich), os lisados foram incubados a 42 °C por 12 horas.

A extração dos ácidos nucleicos foi realizada utilizando-se o método padrão de fenol/clorofórmio (GREEN; SAMBROOK, 2012) sendo o material extraído tratado com 200 µg/ml RNase A (Sigma-Aldrich) por 1 h à 37 °C. Após a avaliação da concentração, pureza e integridade do DNA por espectrofotometria a 260 e 280 nm em equipamento Picodrop P100 e eletroforese em gel de agarose 1% corado por brometo de etídio conforme descrito no item 2.2 o DNA extraído foi estocado a -20 °C.

Após a extração, o de DNA, foi utilizado em reações de PCR com o intuito de detectar a presença do plasmídeo Quimera\_FlagGPI\_pROCK Neo nos parasitos transfectados. Estas reações foram realizadas conforme descrito no item 2.2, utilizando os iniciadores quimera senso e quimera antissenso direcionados ao gene da quimera proteica e os iniciadores HX1 senso e mNG antissenso direcionados ao plasmídeo.

### 2.6.2 Citolocalização da quimera proteica em *Trypanosoma rangeli*

Para visualizar a localização da quimera proteica e o marcador mNeonGreen, formas epimastigotas de *T. rangeli* transfectados com plasmídeo Quimera\_FlagGPI\_pROCK Neo e FlagGPI\_pROCK Neo foram lavadas duas vezes com PBS pH 7,4 por centrifugação a 2.000 X g por 10 minutos a 22 °C, e incubadas sob lamínulas de vidro por 20 minutos a temperatura ambiente, para permitir sua adesão ao vidro. Em seguida, os parasitos foram fixados com paraformaldeído 4% em PBS pH 7,4 por 5 minutos e lavados três vezes com PBS pH 7,4 por 5 minutos cada lavagem. Para visualização do núcleo e do cinetoplasto, os parasitos foram incubados com DAPI (1mg/ml) por 5 minutos a temperatura ambiente. Após uma lavagem com PBS pH 7,4, as lamínulas foram lavas com água milliQ e montadas em lâminas de vidro com Hydromount (National Diagnostics, EUA). Os resultados foram obtidos em microscópio Olympus BX41 e as imagens foram posteriormente editadas com o programa Adobe Photoshop (V. 7.0).

## 2.7 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DA QUIMÉRA PROTEICA

### 2.7.1 Ensaios de Western blot

Para avaliar a expressão da proteína quimérica pelos parasitos transfectados foi realizado ensaios de Western blot utilizando-se extratos totais de *L. tarentolae* transfectados com o plasmídeo Quimera\_FlagGPI\_pROCK Neo. Para tanto, aproximadamente 4ml de cultivo

foram lavados duas vezes em PBS pH 7,4 a 2000 X g por 10 minutos a temperatura ambiente. Após as lavagens os parasitos foram acrescidos de tampão de lise (50 mM NaCl, 200 mM Tris-HCl pH 8,0, 1% de Triton X-100) previamente aquecido à 95 °C, acrescido de 1 µl de coquetel de inibidores de proteases (Merck), homogeneizados vigorosamente e mantidos em banho de gelo.

A concentração de proteínas nos extratos totais foi mensurada pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976), utilizando uma curva padrão de 0 a 4 µg/µl albumina bovina sérica (BSA) como controle para a mensuração por absorbância a 595 nm em espectrofotômetro Tecan® Modelo Infinite M200. Na sequência os extratos foram adicionados ao tampão de amostra na proporção 1:5 (20% glicerol, 0,5% azul de bromofenol, 0,5 M Tris-HCl pH 6,8, 4,4% SDS e 2% β-mercaptoetanol), aquecidos a 95 °C por 5 minutos e submetidos à separação eletroforética em gel SDS-PAGE 5 % de concentração e 10 % separação, a 100 volts (V) por aproximadamente 3 horas. Após a separação, as proteínas foram então transferidas para membranas de nitrocelulose *Hybond-ECL*® (GE Healthcare) conforme descrito por Towbin *et al.* (1979). Após a transferência, as membranas foram coradas com Ponceau (Serva) para verificar a eficiência da transferência. Depois, as membranas foram bloqueadas com leite desnatado 5% diluído em tampão de *blotting* (25 mM Tris-HCl, pH 7,4; 150 mM NaCl e 0,1% Tween 20) durante 1 hora, lavadas e incubadas com anticorpo anti-flag ou com soro policlonal anti-quimera (gentilmente cedido pelo Dr. R.T. Fujiwara da UFMG) por 1 hora à temperatura ambiente sob agitação. Após as lavagens, a membrana foi incubada com anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado à peroxidase (Sigma-Aldrich) nas mesmas condições. A detecção foi realizada utilizando-se o reagente *Pierce*® *ECL Plus Substrate* (Thermo Scientific) sendo o resultado revelado utilizando o fotodocumentador Chemidoc MP® BIORAD®.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 SUBCLONAGEM DA QUIMERA PROTEICA EM VETOR DE EXPRESSÃO PARA TRIPANOSOMATÍDEOS

A abordagem inicial para subclonagem do gene da quimera no vetor de expressão em tripanosomatídeos constituiu na excisão do gene de interesse do plasmídeo pUC57 através de digestão com as enzimas de restrição *HindIII* e *KpnI*, uma vez que possibilitavam uma clonagem direcional e em correta fase de leitura no plasmídeo FlagGPI\_pROCK Neo.

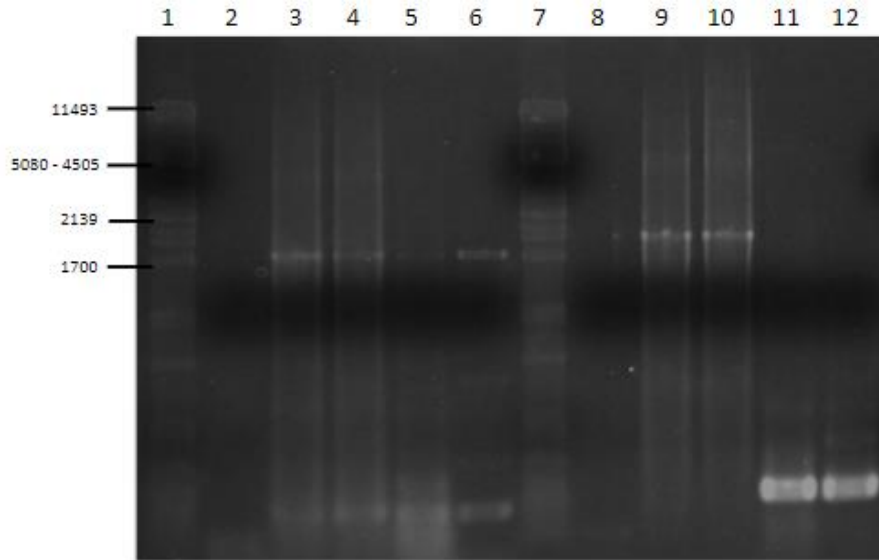
Após a digestão inicial do plasmídeo pUC57 e verificação da excisão do inserto por eletroforese em gel de agarose 1%, o mesmo foi purificado e ligado no plasmídeo FlagGPI\_pROCK Neo utilizando-se a enzima DNA ligase, o qual havia previamente sido digerido com as mesmas enzimas.

Após diversas tentativas de subclonagem utilizando-se a estratégia acima, não obtemos nenhum resultado positivo. As tentativas infrutíferas utilizaram diferentes marcas de enzimas de restrição e de ligação, diferentes tampões, tempos de reação de restrição e ligação, proporções de inserto:vetor e linhagens bacterianas. Cabe salientar ainda que foram testados ensaios de co-digestão assim como de digestão sequencial, sendo igualmente infrutíferas as tentativas de ligação, ainda que controles realizados passo-a-passo utilizando-se outros plasmídeos como o próprio pUC57 apontassem o funcionamento das enzimas.

Devido a isso, utilizamos uma nova abordagem que envolveu uma etapa intermediária de subclonagem em vetor pGEM<sup>®</sup>-T Easy dos produtos de amplificação por PCR do gene da quimera proteica a partir do plasmídeo pUC57 utilizando-se os iniciadores quimera senso e quimera antissenso. Esse é um vetor comercial pré-linearizado com uma timina extra na região 3'- terminal de ambas as fitas, permitindo a ligação de forma direta de produtos de PCR (PROMEGA, 2021).

Com base nesta estratégia, obtivemos diversas colônias positivas na seleção azul/branco em meio de cultura, sendo selecionadas aleatoriamente quatro delas para realizar uma PCR confirmatória. Conforme descrito no item 2.2, utilizamos iniciadores direcionados ao plasmídeo e a sequência da quimera, confirmando a presença e a correta orientação do inserto em duas colônias (Colônias 1 e 2) e gerando o plasmídeo Quimera\_ pGEM<sup>®</sup>-T Easy (figura 4).

Figura 4 -Verificação da presença e correta orientação do gene da quimera proteica em colônias de bactérias *E. coli Top10* transformadas com plasmídeo Quimera\_pGEM®-T Easy.

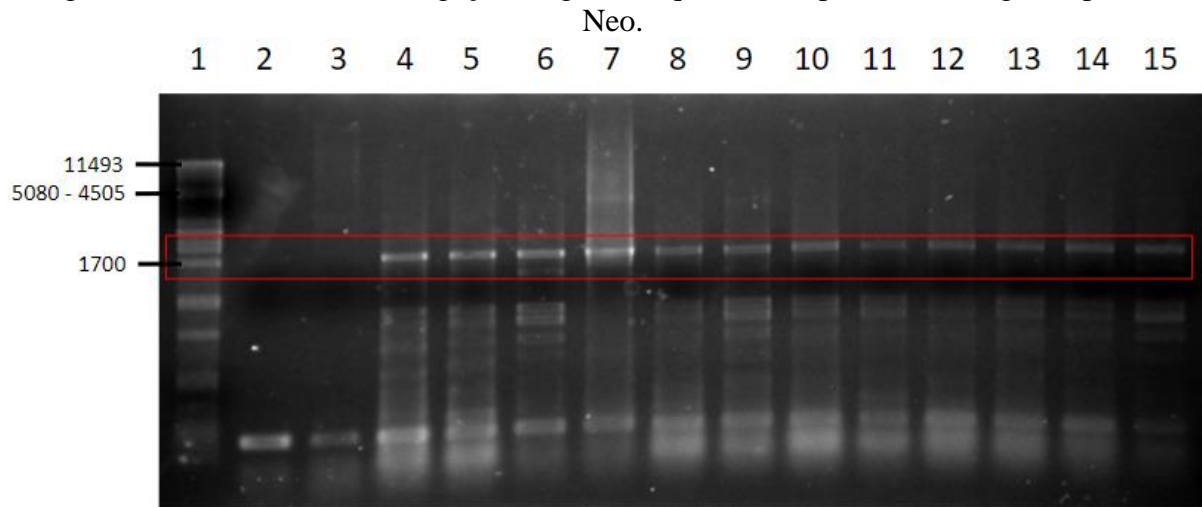


Fonte: Autora.

\* Gel agarose 1% corado com brometo de etídio. PCR da ligação do gene da quimera no vetor pGEM®-T Easy. 1= Marcador molecular (Fago Lambda digerido com a enzima *Pst*I), 2= Controle negativo (Sem DNA), 3= Colônia 1 (iniciadores quimera senso e antissenso), 4= Colônia 2 (iniciadores quimera senso e antissenso), 5= Colônia 3 (iniciadores quimera senso e antissenso), 6= Colônia 4 (iniciadores quimera senso e antissenso), 7= Marcador molecular, 8= Controle negativo (Sem DNA), 9= Colônia 1 (iniciadores plasmídeo M13 senso e antissenso), 10= Colônia 2 (iniciadores plasmídeo M13 senso e antissenso), 11= Colônia 3 (iniciadores plasmídeo M13 senso e antissenso) e 12= Colônia 4 iniciadores plasmídeo M13 senso e antissenso). Tamanho esperado para a PCR com iniciadores da quimera proteica 1.789 pb. Tamanho esperado para a PCR com os iniciadores do vetor: 2.023 pb.

A etapa seguinte de subclonagem ocorreu conforme descrito no item 2.2, onde obtivemos o crescimento de várias colônias. De forma aleatória, foram selecionadas 13 colônias que foram submetidas a uma PCR confirmatória utilizando-se bactérias coletadas diretamente das colônias da placa de cultivo (PCR de colônia) e os iniciadores desenhados para o gene da quimera proteica (figura 5). Das 13 colônias positivas para a presença da quimera, escolhemos as colônias 2, 5 e 6 para realizar uma nova PCR usando diferentes combinações de iniciadores direcionados ao plasmídeo e a quimera, buscando verificar a correta inserção do inserto. Os tamanhos teóricos dos fragmentos de amplificação esperados para as combinações de iniciadores HX1 senso com quimera antissenso e quimera senso e mNG antissenso foram observados exclusivamente para a colônia 5 sendo 2.018 pb e 1.899 pb, respectivamente (figura 6).

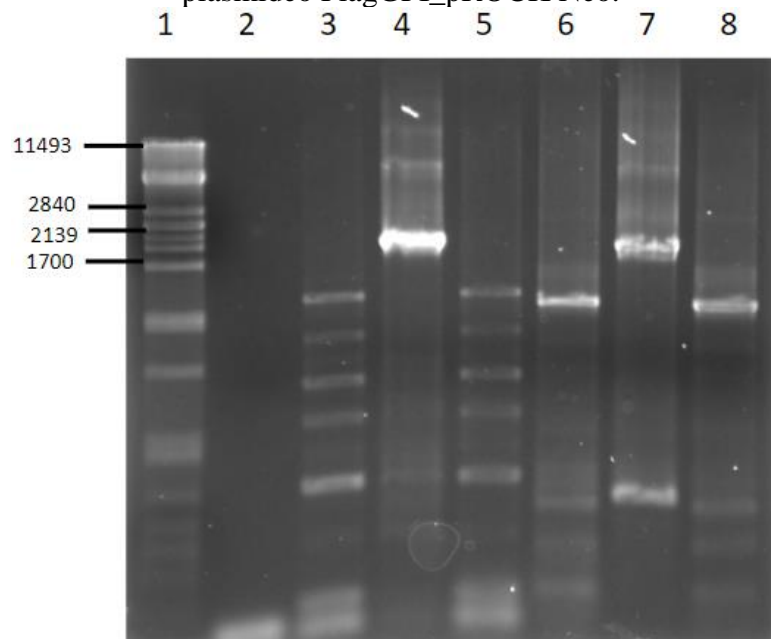
Figura 5 - PCR de colônia da ligação do gene da quimera no plasmídeo FlagGPI\_pROCK Neo.



Fonte: Autora.

\* Gel de agarose 1% corado em brometo de etídio. PCR de colônia para confirmar a ligação do gene da quimera no vetor FlagGPI\_pROCK Neo. 1= Marcador molecular (Fago Lambda digerido com a enzima *Pst*I), 2= Controle negativo, 3-15= Colônias de 1 a 13. Tamanho esperado: 1.789 pb.

Figura 6 - PCR com diferentes iniciadores para confirmar a presença do gene da quimera no plasmídeo FlagGPI\_pROCK Neo.



Fonte: Autora.

\* Gel de agarose 1% corado em brometo de etídio. PCR de colônia para confirmar a ligação do gene da quimera no vetor FlagGPI\_pROCK Neo. 1= Marcador molecular (Fago Lambda digerido com a enzima *Pst*I), 2= Controle negativo, 3= Colônia 2 com iniciadores HX1 senso e quimera antissenso, 4= Colônia 5 com iniciadores HX1 senso e quimera antissenso, 5= Colônia 6 com iniciadores HX1 senso e quimera antissenso, 6= Colônia 2 com iniciadores quimera senso e mNG antissenso, 7= Colônia 5 com iniciadores quimera senso e mNG antissenso e 8= Colônia 6 com iniciadores quimera senso e mNG antissenso. Tamanho dos fragmentos esperado para os iniciadores HX1 senso e quimera antissenso e para os iniciadores quimera senso e mNG antissenso de 2.018 pb e 1.899 pb, respectivamente.

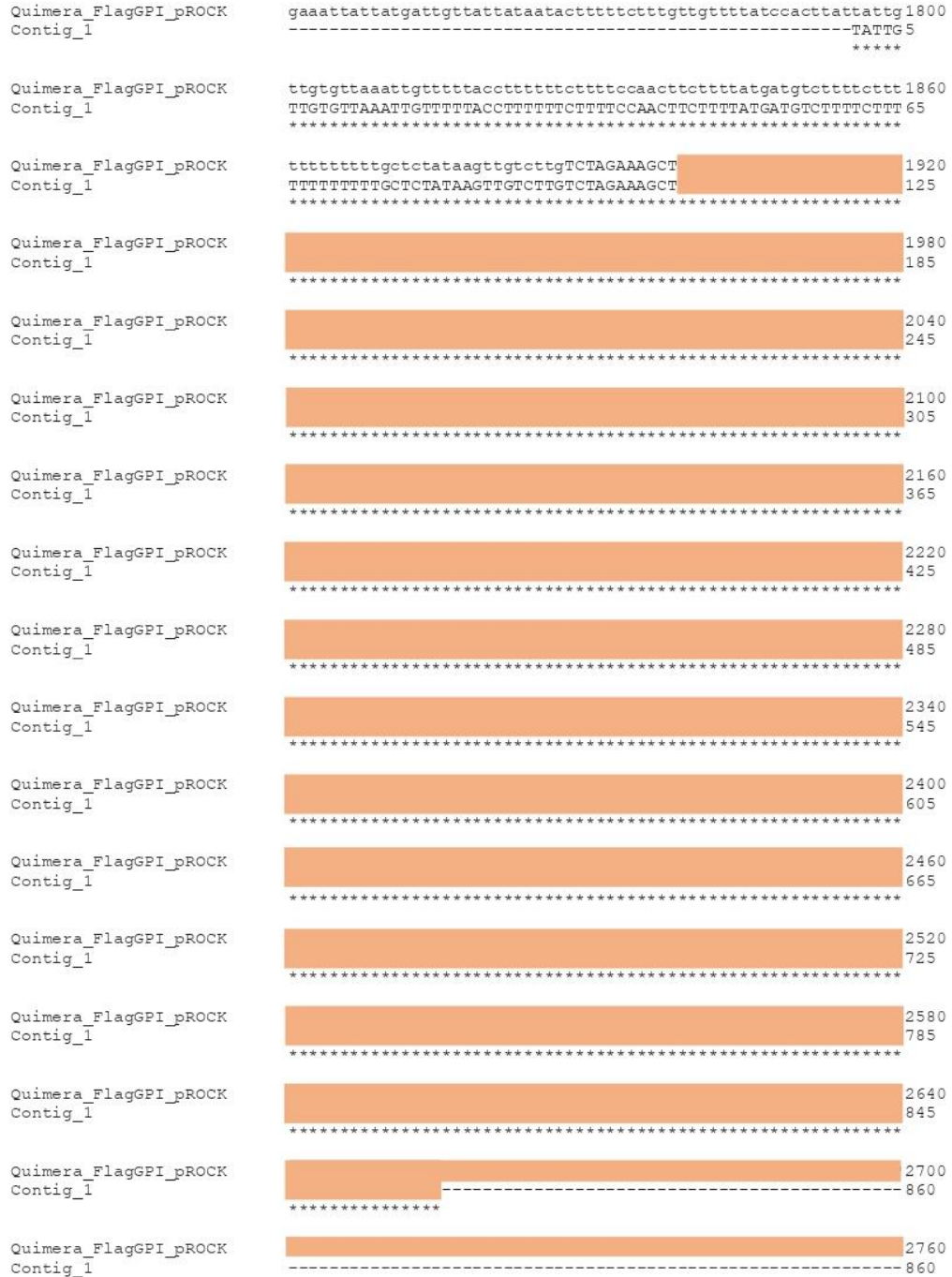
Com base nos resultados obtidos nas PCR com as diferentes combinações de iniciadores, a colônia 5 apresentou os perfis desejados, indicando a correta inserção do gene da

quimera no plasmídeo FlagGPI\_pROCK Neo gerando o plasmídeo Quimera\_FlagGPI\_pROCK Neo. Dessa forma, a colônia 5 foi crescida em meio LB e teve seu DNA plasmidial extraído por lise alcalina, conforme anteriormente descrito, visando i) confirmar a manutenção da correta fase de leitura do gene da quimera no vetor plasmídial através de sequenciamento e ii) transfectar o plasmídeo Quimera\_FlagGPI\_pROCK Neo em *L. tarentolae* e *T. rangeli*.

### 3.2 SEQUENCIAMENTO DO PLASMÍDEO Quimera\_FlagGPI\_pROCK

O sequenciamento do plasmídeo Quimera\_FlagGPI\_pROCK Neo foi realizado utilizando-se quatro iniciadores diferentes, sendo: quimera senso, quimera antissenso, HX1 senso e mNG antissenso. O sequenciamento pelo método de Sanger resultou, portanto, em quatro fragmentos distintos, os quais, quando analisados com o programa *Phred-Phrap-Consed*, geraram dois *contigs* em função da sobreposição dos fragmentos gerados. Essas sequências foram comparativamente analisadas com a sequência teórica esperada para o plasmídeo Quimera\_FlagGPI\_pROCK Neo utilizando-se o software *Clustal Omega*, resultando em um alinhamento com 100% de identidade, conforme ilustrado nas figuras 7 e 8.

Figura 7 - Alinhamento da sequência teórica esperada para a construção do plasmídeo Quimera\_FlagGPI\_pROCK Neo com o contig gerado através do sequenciamento do plasmídeo (Contig 1).

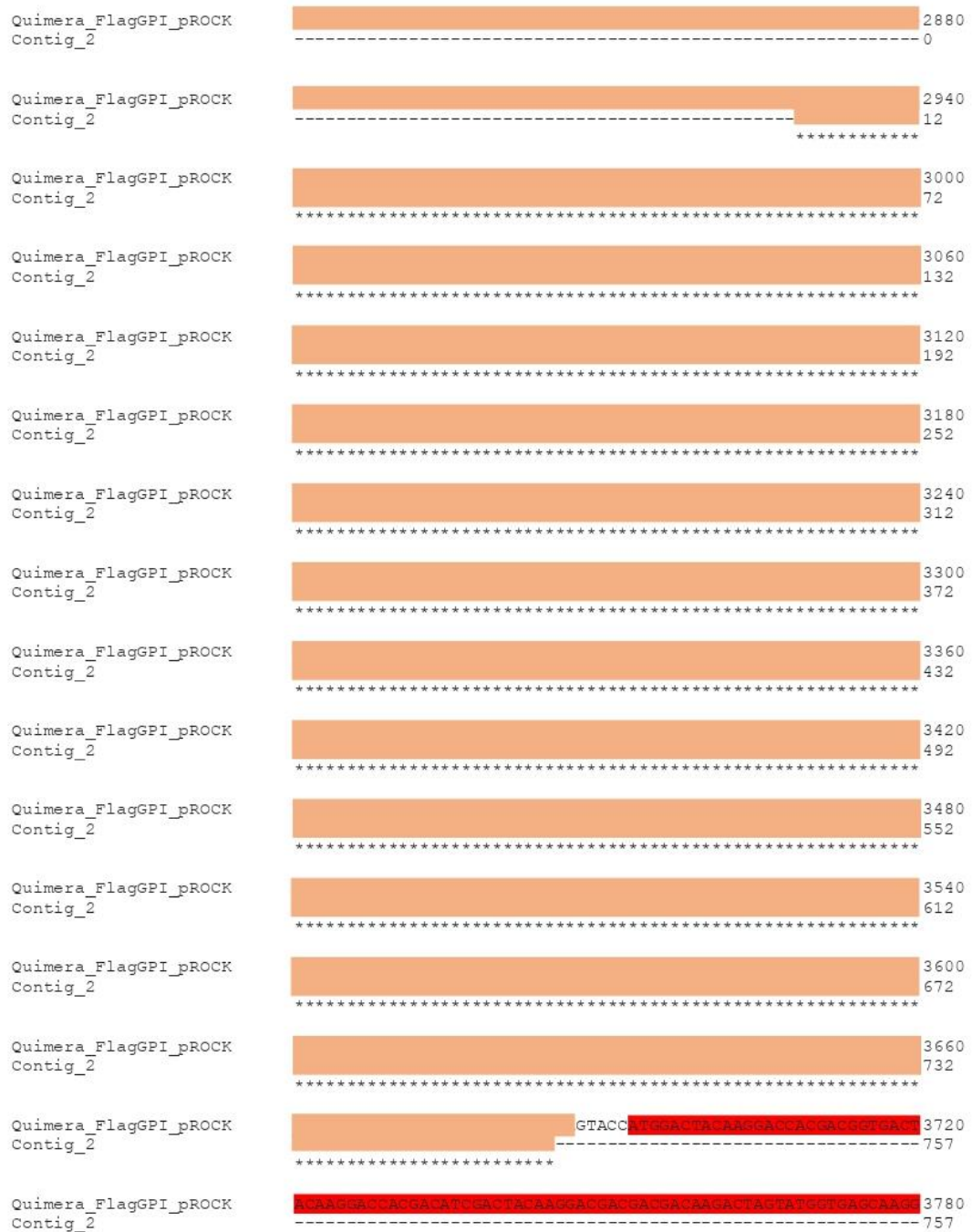


Fonte: Autora.

\* Alinhamento das sequências realizado no software Clustal Omega. Os asteriscos indicam que os nucleotídeos são iguais entre as duas sequências e os traços indicam que não há nenhuma correspondência. Toda a região com asterisco corresponde a sequência consenso 1. Os retângulos laranja cobrem toda a sequência correspondente ao gene da quimera, que foi ocultada em função de estar protegida por registro junto ao INPI (Processo BR 10 2018 002228 8).



Figura 8 - Alinhamento da sequência teórica esperada para a construção do plasmídeo Quimera\_FlagGPI\_pROCK Neo com o contig gerado através do sequenciamento do plasmídeo (Contig 2).



Fonte: Autora.

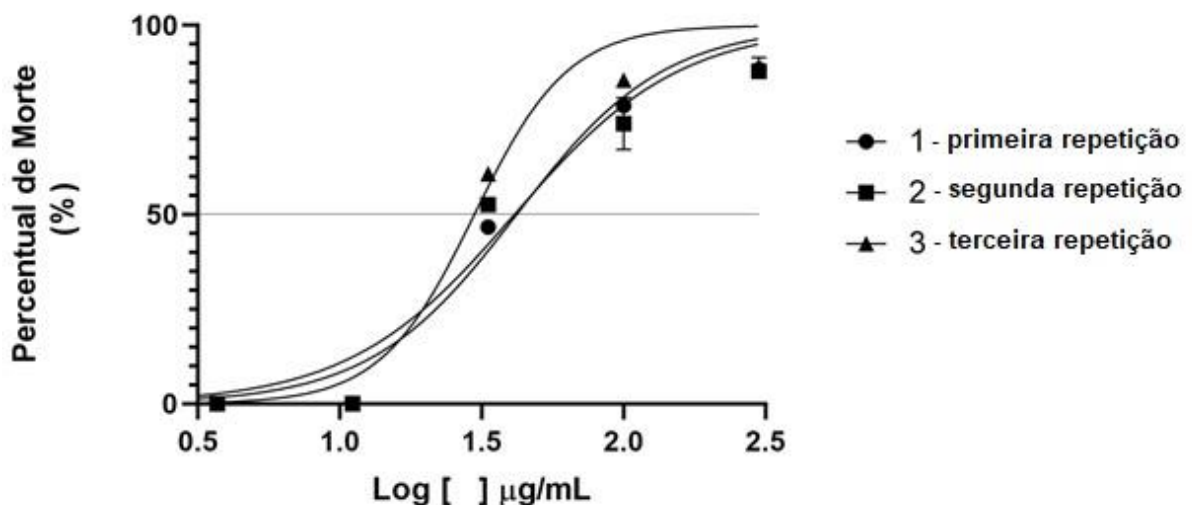
\* Alinhamento das sequências realizado no software *Clustal Omega*. Os asteriscos indicam que os nucleotídeos são iguais entre as duas sequências e os traços indicam que não há nenhuma correspondência. Toda a região com asterisco corresponde a sequência consenso 2. Os retângulos laranja cobrem toda a sequência correspondente ao gene da quimera, que foi ocultada em função de estar protegida por registro junto ao INPI (Processo BR 10 2018 002228 8). Em vermelho indica a região do plasmídeo contendo parte da sequência 3xFlagTag.

### 3.3 AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE DE FORMAS PROMASTIGOTAS DE *Leishmania tarentolae* AO G-418.

O vetor Quimera\_FlagGPI\_pROCK Neo possui em sua sequência o gene de resistência a neomicina, como demonstrado na figura 3. Neste estudo, utilizamos o G418 (Geneticin) para selecionar os parasitos transfectados com este vetor. O G418 é um aminoglicosídeo usado como agente seletivo em culturas de células e análogo ao fármaco neomicina, possuindo mecanismos de ações similares (INVITROGEN, 2022).

Não sendo conhecida a concentração de inibição 50% do G418 para cepa P10 de *L. tarentolae*, realizamos ensaios preliminares para determinar a concentração de inibição em 50% (CI50%) dos parasitos pelo G418, conforme descrito no item 2.4. Com isso, o valor médio de CI50% para cada um dos três experimentos independentes realizados foram submetidos ao teste de Shapiro-Wilk, sendo os valores das médias não considerados normais e com o teste de ROUT não identificamos nenhum *outlier*. Por fim, utilizando o teste de *one-way ANOVA* e teste de múltipla comparação de Tukey's verificamos que não havia diferença significativa entre as três médias obtidas, resultando em uma CI50% de *L. tarentolae* cepa P10 por G418 de 37,67  $\mu\text{g/ml}$  (figura 9). O valor obtido em nossas condições experimentais é menor que as concentrações frequentemente utilizadas em alguns estudos de seleção de *L. tarentolae* transfectantes com G418, que fica em torno de 40-50  $\mu\text{g/ml}$  (LIMA; SIMPSON, 1996; PAPADOPOULOU *et al.*, 1996; GRONDIN *et al.*, 1997; CARDOZO, 2020).

Figura 9 – Concentração de inibição em 50% (CI50) de *Leishmania tarentolae* quando exposta ao G-418 (Geneticin).



Fonte: Autora.

\* Os dados não se apresentaram normais pelo teste de normalidade de Shapiro-Wilk e não foram detectados outliers pelo teste de ROUT. Os valores de CI<sub>50</sub> foram analisados pelo teste *one-way ANOVA* e teste de

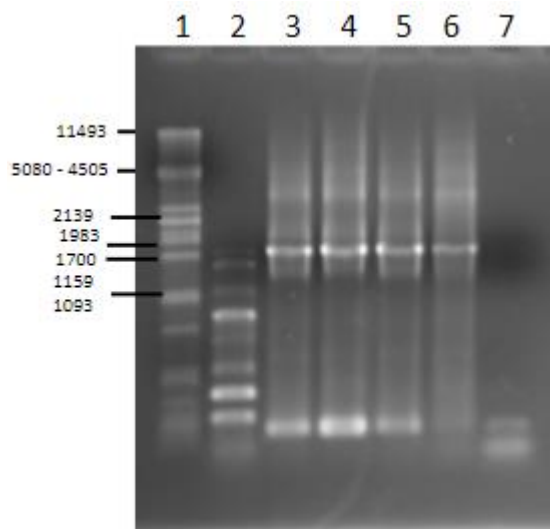
múltipla comparação de Tukey's, os valores foram considerados  $p > 0,05$ , logo a média foi efetuada utilizando os três valores de  $CI_{50}$  obtidos. A linha indica horizontal no percentual de mortalidade em 50%.

A avaliação de sensibilidade de formas epimastigotas de *T. rangeli* ao G-418 não foi realizada neste estudo uma vez que as concentrações para a seleção de parasitos transfectados foi anteriormente estabelecida no Laboratório de Protozoologia (UFSC/MIP/CCB), iniciando em 20  $\mu\text{g/ml}$ .

### 3.4 AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DO PLASMÍDEO Quimera\_FlagGPI\_pROCK Neo EM TRANSFECTADOS DE *Leishmania tarentolae* E *Trypanosoma rangeli*.

Após a extração de DNA de transfectados de *L. tarentolae* e *T. rangeli* pelo método de fenol-clorofórmio como descrito no item 2.6, utilizamos 10 ng de DNA de cada cepa em reações de PCR. Para *L. tarentolae* utilizamos um conjunto de iniciador, os dirigidos ao gene da quimera (quimera senso e quimera antissenso). Para *T. rangeli* usamos dois conjuntos de iniciadores, os dirigidos ao gene da quimera (quimera senso e quimera antissenso) e os dirigidos a sequências do vetor (HX1 e mNG). Considerando que o tamanho do fragmento de amplificação esperado para a reação com os iniciadores da quimera é de 1.789 pb e para a reação com os iniciadores do plasmídeo 2.118 pb, o resultado das reações de PCR apresentados nas figuras 10 e 11 indica a presença do plasmídeo Quimera\_FlagGPI\_pROCK Neo nos transfectados de *L. tarentolae* e *T. rangeli*, respectivamente.

Figura 10 - Detecção do plasmídeo Quimera\_FlagGPI\_pROCK Neo em *Leishmania tarentolae* transfectadas.



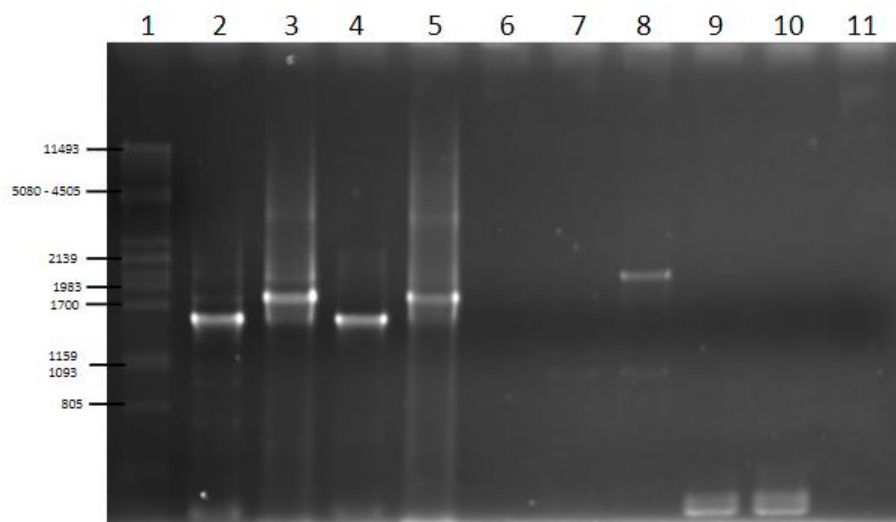
Fonte: Autora.

\* Gel agarose 1% corado pelo brometo de etídio. PCR da extração de DNA de *Leishmania tarentolae* transfectada com plasmídeo Quimera\_Flag\_GPI\_pROCK Neo, utilizando os iniciadores direcionados ao gene da quimera. 1=

Marcador molecular (Fago Lambda digerido com a enzima *Pst*I), 2= parasitos não transfectados (WT), 3= Transfecção 1 com plasmídeo Quimera\_Flag\_GPI\_pROCK Neo, 4= Transfecção 2 com o Quimera\_Flag\_GPI\_pROCK Neo, 5= Transfecção 1 com o plasmídeo Flag\_GPI\_pROCK Neo 6= Controle positivo (Quimera\_pUC57) e 7= Controle negativo (Sem DNA). Tamanho de fragmento esperado para a amplificação dos transfectados com o plasmídeo Quimera\_Flag\_GPI\_pROCK Neo e o controle positivo: 1.789 pb.

Na figura 10, observamos na coluna 5 um fragmento de amplificação de 1.789 pb correspondendo ao tamanho do gene da quimera proteica. Entretanto não esperávamos a amplificação de nenhum fragmento nesta posição, uma vez que a amostra utilizada nessa reação foi da extração de DNA de parasitos transfectados com o plasmídeo FlagGPI\_pROCK Neo, no qual não possui nenhuma sequência complementar aos iniciadores direcionados a quimera proteica. Considerando que o controle negativo da reação não apresenta quaisquer sinais de contaminação, uma das hipóteses é que *L. tarentolae* pode ter, em seu genoma, uma sequência complementar aos iniciadores direcionados a quimera proteica, pois podemos observar no parasito selvagem (coluna 2) uma banda fraca com o mesmo tamanho fragmento de amplificação da quimera proteica. Assim, considerando que quimera proteica contém sequências conservadas de DNA de diferentes espécies de *Leishmania* e que esse gênero é um clado irmão do gênero *Sauroleishmania* (FIGUEIREDO, 2019; KLATT, 2019), os iniciadores direcionados ao gene da quimera proteica podem ter correspondência a alguma região do DNA de *L. tarentolae*, gerando um fragmento de amplificação de tamanho compatível. Outra hipótese é de que a cultura de parasitos transfectados com FlagGPI\_pROCK Neo possam ter sido contaminados com a cultura dos parasitos transfectados com Quimera\_FlagGPI\_pROCK Neo, fato que será dirimido com a nova transfecção realizada.

Figura 11- Detecção do plasmídeo Quimera\_FlagGPI\_pROCK Neo em *Trypanosoma rangeli* transfectados.



Fonte: Autora.

\* Gel agarose 1% corado pelo brometo de etídio. PCR da extração de DNA de *Leishmania tarentolae* transfectada com plasmídeo Quimera\_Flag\_GPI\_pROCK Neo, utilizando os iniciadores direcionados ao gene da quimera. 1= Marcador molecular (Fago Lambda digerido com a enzima *Pst*I), 2= parasitos não transfectados (WT), 3= Transfecção 1 com plasmídeo Quimera\_Flag\_GPI\_pROCK Neo, 4= Transfecção 2 com o Quimera\_Flag\_GPI\_pROCK Neo, 5= Transfecção 1 com o plasmídeo Flag\_GPI\_pROCK Neo 6= Controle positivo (Quimera\_pUC57) e 7= Controle negativo (Sem DNA). 8= parasitos não transfectados (WT), 9= Transfecção 1 com plasmídeo Quimera\_Flag\_GPI\_pROCK Neo, 10= Transfecção 2 com o Quimera\_Flag\_GPI\_pROCK Neo, 11= Transfecção 1 com o plasmídeo Flag\_GPI\_pROCK Neo. Tamanho do fragmento de amplificação esperado para a reação com os iniciadores da quimera é de 1.789pb e para a reação com os iniciadores do plasmídeo 2.118 pb.

Assim como na *L. tarentolae* observamos na figura 11 a amplificação de fragmento no DNA extraído da cultura de *T. rangeli* transfectado com plasmídeo FlagGPI\_pROCK Neo (coluna 4) ao utilizar iniciadores direcionados ao gene da quimera. Entretanto, o fragmento amplificado é menor que 1.700 pb e não corresponde ao gene da quimera. Observamos o mesmo tamanho de fragmento de amplificação no parasito selvagem (coluna 2) quando usado os iniciadores direcionados ao gene da quimera. Considerando que, para a construção da quimera proteica se utilizou diferentes cepas de *T. cruzi* e que ele é filogeneticamente próximo ao *T. rangeli* (STOCO *et al.*, 2014; FIGUEIREDO, 2019), os iniciadores direcionados ao gene da quimera podem ter complementariedade com alguma região do genoma de *T. rangeli*. A natureza destas amplificações não esperadas será objeto de avaliações futuras.

### 3.5 AVALIAÇÃO DA TRANSFECCÃO DO PLASMÍDEOS Quimera\_FlagGPI\_pROCK EM *Leishmania tarentolae* E EM *Trypanosoma rangeli*

#### 3.5.1 *Leishmania tarentolae*

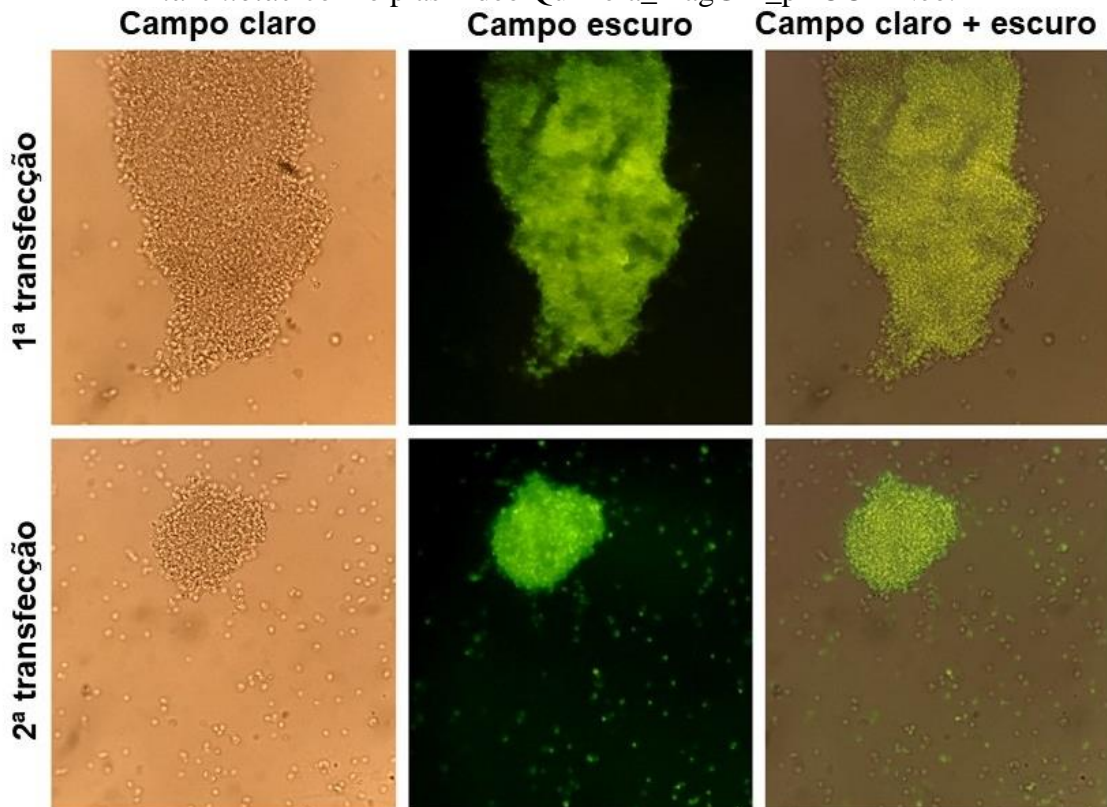
Foram realizados dois ensaios distintos de transfecção do plasmídeo Quimera\_FlagGPI\_pROCK Neo e FlagGPI\_pROCK Neo em *L. tarentolae*, conforme descrito no item 2.5. Após 24 horas se iniciou a seleção dos parasitos com 37,67 µg/ml de G418. Durante as primeiras semanas os parasitos foram cultivados em meio ágar sangue suplementado com meio BHI contendo hemina, 10% de SBF e 37,67 µg/ml de G418 a 26,5 °C. Depois de uma semana, observamos que a morfologia dos parasitos transfectados com ambos os plasmídeos era de, em sua maioria, formas arredondadas distintas da morfologia característica dos promastigotas de *L. tarentolae* e com motilidade reduzida quando comparadas à morfologia dos parasitos selvagens não transfectados. Além disso, o número de parasitos observados em divisão foi muito inferior ao observado nos parasitos selvagens.

Considerando que a condição ideal de crescimento *in vitro* de *L. tarentolae* é sob leve agitação, realizamos repique de parte da cultura dos parasitos transfectados para garrafa de

poliestireno de 25cm<sup>2</sup> com tampa contendo filtro, a qual foi mantida sob agitação leve no agitador *Titer Plate Shaker* (Lab-Line) a 26,5 °C. Após duas semanas, comparando os parasitos crescidos em garrafa e em tubo, não foram observadas diferenças na morfologia entre os dois tratamentos, tendo sido descontinuado o cultivo em garrafas de cultura.

Em todas as semanas de cultivo dos parasitos transfectados em presença de G418, observamos as culturas em microscópio de fluorescência, pois como ilustrado na figura 3, o plasmídeo FlagGPI\_pROCK Neo possui em sua estrutura o gene mNeonGreen que permite a detecção de expressão de produtos plasmidiais. De forma global, somente os parasitos de morfologia alterada (formas arredondadas) apresentavam um padrão de fluorescência puntiforme, não sendo o mesmo observado nas raras formas promastigotas livre-natantes. Além disso, os parasitos de morfologia alterada formavam grandes agrupamentos em cultura, lembrando divisão de formas amastigotas (figura 12).

Figura 12 - Comparação da morfologia dos parasitos dos dois ensaios de transfecção de *L. tarentolae* com o plasmídeo Quimera\_FlagGPI\_pROCK Neo.



Fonte: Autora.

\* Cada linha representa uma transfecção diferente de *L. tarentolae* com o plasmídeo Quimera\_FlagGPI\_pROCK Neo e as duas primeiras colunas mostram o campo em que a foi tirado a foto, a última coluna é a sobreposição das duas primeiras.

Após quatro semanas de seleção com G418, a morfologia dos parasitos em cultura não apresentou qualquer alteração, sendo observada uma baixa divisão celular, uma motilidade reduzida nas formas arredondadas e a presença de raros promastigotas apresentando baixa taxa de divisão celular e motilidade normal.

Considerando que tal fenômeno possa estar relacionado à pressão de droga seletiva e ou à expressão da quimera, dentre outros fatores, realizamos duas passagens dos parasitos em meio sem a adição de G418. O acompanhamento destas culturas ao longo de três semanas, de forma comparativa aos parasitos selvagens e aos transfectados mantidos na presença de G418, não revelou nenhuma alteração na morfologia dos parasitos, havendo uma baixa quantidade de formas promastigotas não fluorescentes e grande quantidade de formas arredondadas com motilidade reduzida, as quais mantinham uma fluorescência como a apresentada na figura 10. Uma vez que ao fim de sete semanas de cultivo as culturas não apresentavam diferenças visíveis (figura 10) realizamos a extração de DNA das mesmas a fim de verificar a presença do plasmídeo nos parasitos por PCR, sendo que todas as passagens foram criopreservadas no criobanco do Laboratório de Protozoologia para análises futuras da expressão da quimera por *Western blot*.

Devido aos parâmetros morfológicos e de crescimento *in vitro* de *L. tarentolae* transfectadas com os plasmídeos Quimera\_FlagGPI\_pROCK Neo e FlagGPI\_pROCK Neo permanecerem alterados durante sete semanas, resolvemos descontinuar momentaneamente os cultivos e iniciar o processo de transfecção desses plasmídeos em *T. rangeli*, sendo este um segundo objetivo originalmente traçado para este trabalho.

Em relação à mudança morfológica de *L. tarentolae* da forma promastigotas para uma forma arredondada similar à forma amastigota, acreditamos que a proteína quimérica possa apresentar toxicidade ou alterar algum outro parâmetro biológico de *L. tarentolae* não compreendido por nós. Considerando que a proteína quimérica é formada pela junção de 66 epítomos distintos dando origem a uma proteína sintética não natural e inexistente em organismos vivos, sua expressão pode favorecer a formação de agregados proteicos e de corpos de inclusão (MARKOSSIAN; KURGANOV, 2004). Esse efeito foi observado quando Figueiredo (2019) expressou a proteína quimérica em bactéria *E. coli*, na qual apresentou baixo rendimento e uma característica insolúvel. Em *L. tarentolae* pudemos observar em microscopia de fluorescência uma fluorescência verde puntiforme, podendo indicar a formação de corpos de inclusão contendo a proteína quimérica. Esta observação pode ser corroborada pois observamos a expressão de fluorescência, ainda que tênue, relacionada com a alteração



morfológica para formas arredondadas, sendo a fluorescência não observada em formas promastigotas.

Outra hipótese é que não houve uma boa recepção do plasmídeo FlagGPI\_pROCK Neo por essa espécie, uma vez que a transfecção somente com o plasmídeo FlagGPI\_pROCK Neo também apresentou uma morfologia alterada. Este plasmídeo foi desenvolvido com base em sequências genômicas de *T. rangeli* que, apesar de apresentarem alta similaridade com as de *L. tarentolae*, não são idênticas. Há diversos trabalhos que utilizam a *L. tarentolae* como estratégia vacinal para diferentes doenças por ela possuir uma maquinaria de expressão proteica eucariótica similar a organismos não patogênicos (KLATT et al., 2019). Alguns deles utilizam diferentes tipos de plasmídeos de expressão para tripanosomatídeos tendo, de forma geral, boa eficiência de transfecção (PINEDA et al., 2016; KUSHNIR et al., 2011). Entretanto o plasmídeo mais utilizado e recomendado para a expressão em *L. tarentolae* é o plasmídeo comercial pLEXY (Jena Bioscience, Alemanha), o qual foi desenvolvido especificamente para expressão em *L. tarentolae*, proporcionando uma transfecção estável e objetivando a secreção de proteínas (ABDOSSAMADI et al., 2017; BRETON et al., 2005).

### 3.5.2 *Trypanosoma rangeli*

Dois ensaios distintos de transfecção do plasmídeo Quimera\_FlagGPI\_pROCK Neo e FlagGPI\_pROCK Neo foram realizados em *T. rangeli*, conforme descrito no item 2.5. Ao fim de 24 horas se iniciou a seleção dos parasitos com 20 µg/ml de G418. Os parasitos transfectados se encontram em processo de seleção e estão sendo cultivados em meio ágar sangue suplementado com meio LIT, 10% de SBF e 20µg/ml de G418 a 26,5 °C. Após uma semana da transfecção, observamos que a morfologia dos parasitos com ambos os plasmídeos era, em sua maioria, similar à morfologia característica de epimastigotas de *T. rangeli*. Entretanto, os parasitos com o plasmídeo FlagGPI\_pROCK Neo demoraram uma semana a mais para se recuperar do processo de transfecção. Além disso, a motilidade e divisão celular, comparadas aos parasitos selvagens, se encontram preservados.

Durante as semanas de cultivo dos parasitos transfectados na presença de G-418, observamos ambas as culturas em microscópio de fluorescência, a fim de verificar se o gene mNeonGreen estava sendo expresso. De forma geral, a cultura com o plasmídeo Quimera\_FlagGPI\_pROCK Neo apresenta alguns epimastigotas livre-natantes com motilidade e morfologia preservadas e fluorescência puntiforme verde. Enquanto a cultura com o plasmídeo FlagGPI\_pROCK Neo possui epimastigotas livre-natantes que mantêm motilidade

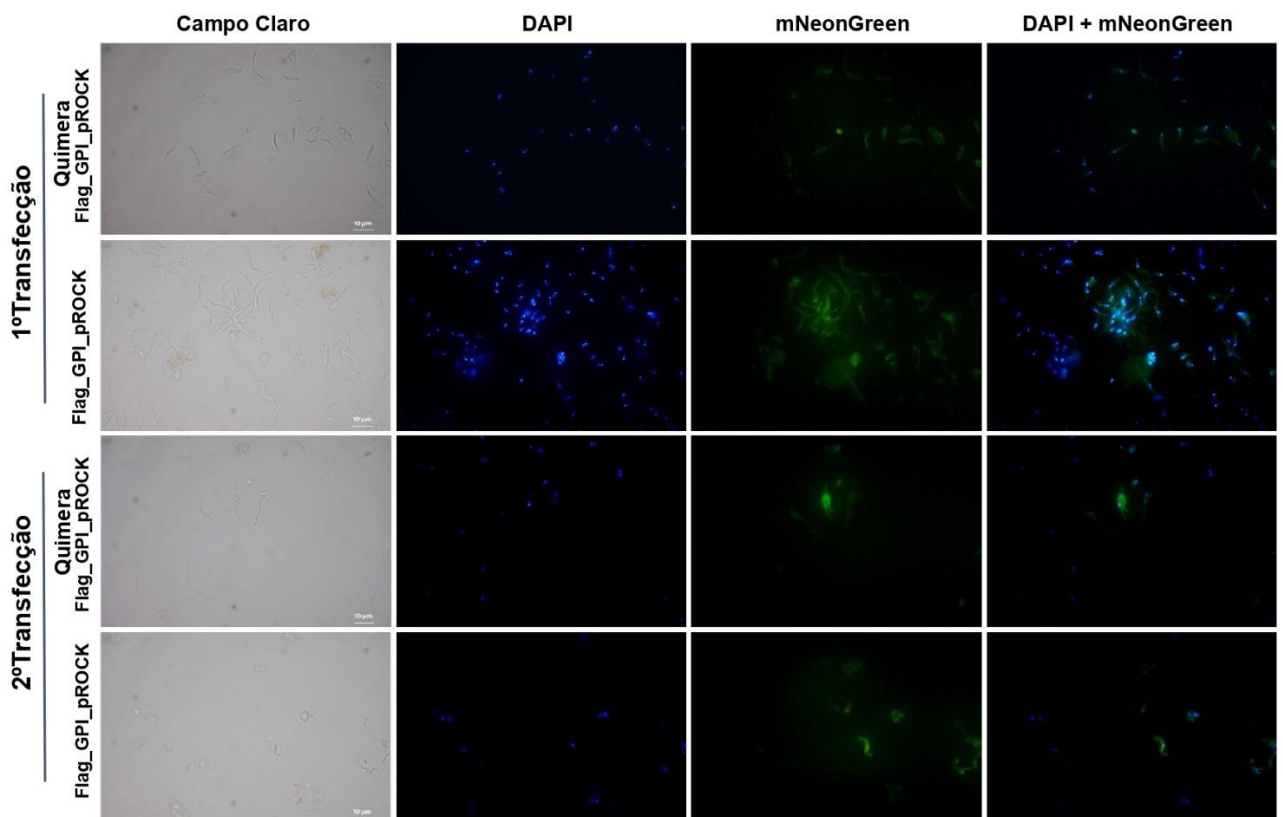


e morfologia preservadas e com dois tipos de fluorescência, alguns apresentam uma fluorescência puntiforme verde (figura 14) igual a cultura com plasmídeo Quimera\_FlagGPI\_pROCK e outros com fluorescência em todo o corpo celular.

Para uma melhor visualização dos parasitos transfectados, realizamos um ensaio de microscopia corando o DNA com DAPI e, conforme mostra a figura 13, as culturas da primeira transfecção apresentam formas epimastigotas expressando fluorescência verde difusa, indicando um sucesso da transfecção. Os parasitos da segunda transfecção ainda estão sendo submetidos ao processo de seleção e, por isso, ainda não apresentam muitos parasitos com morfologia característica de epimastigotas de *T. rangeli* ou fluorescência.

Diferente da transfecção do plasmídeo FlagGPI\_pROCK Neo em *L. tarentolae*, era esperado a compatibilidade deste plasmídeo com o *T. rangeli*, uma vez que Silva (2022) desenvolveu o plasmídeo FlagGPI\_pROCK Neo para realizar expressão de proteínas em *T. rangeli*, tendo bons resultados em suas transfecções.

Figura 13 – Observação da expressão de mNeonGreen por formas epimastigotas de *Trypanosoma rangeli* transfectados com plasmídeo Quimera\_FlagGPI\_pROCK Neo e FlagGPI\_pROCK Neo.

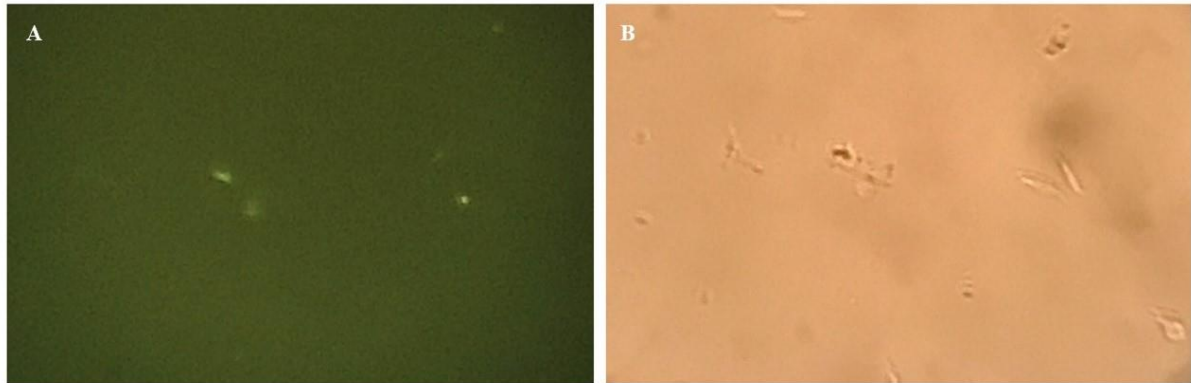


Fonte: Autora.

\* As duas primeiras linhas representam a primeira transfecção em *T. rangeli* com o plasmídeo Quimera\_FlagGPI\_pROCK Neo e FlagGPI\_pROCK Neo, respectivamente. As duas últimas representam a

segunda transfecção em *T. rangeli* com o plasmídeo Quimera\_FlagGPI\_pROCK Neo e FlagGPI\_pROCK Neo, respectivamente. A última coluna é a sobreposição da coluna do DAPI e do mNeonGreen.

Figura 14 – Representação da fluorescência puntiforme em epimastigotas de *T. rangeli*

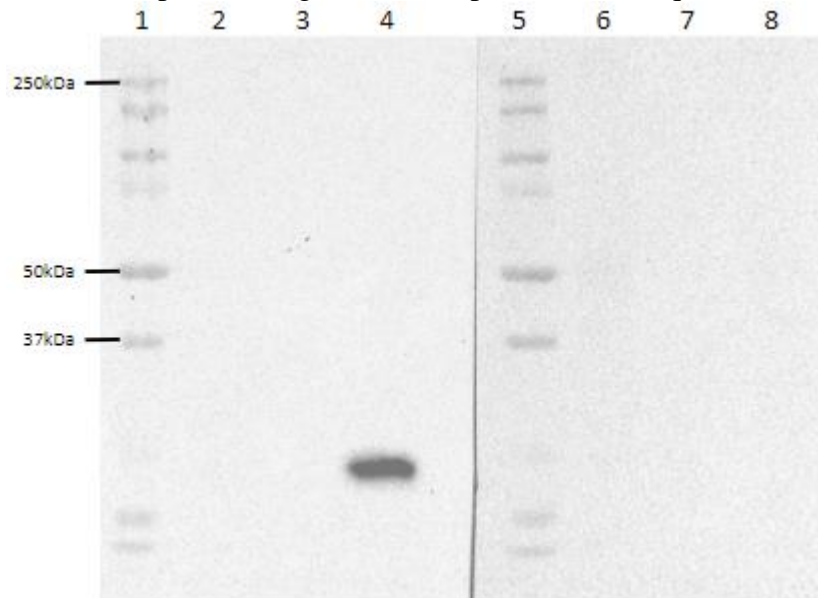


\*A) campo escuro, pontos representa a fluorescência puntiforme proveniente da expressão de mNeonGreen. B) campo claro, representando os parasitos .

### 3.6 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DA QUIMERA PROTEICA

Ainda que os parâmetros morfológicos e de crescimento *in vitro* de *L. tarentolae* transfectada com o plasmídeo Quimera\_FlagGPI\_pROCK Neo não tenham sido esperados, a detecção do plasmídeo nesses parasitos através de PCR nos levou a realizar a avaliação preliminar da expressão da quimera através de ensaios de *Western blot* utilizando um anticorpo monoclonal anti-Flag e um soro policlonal anti-quimera conforme descrito no item 2.7.1. Com base nas análises *in silico* e nos resultados de Figueiredo (2019), o tamanho esperado da quimera é 99,43 kDa, uma vez que se projetou a expressão da quimera de forma fusionada à Flag. Neste ensaio preliminar de *Western blot* (figura 14), obtivemos unicamente a detecção de uma proteína de aproximadamente 33,13 kDa com anticorpo anti-Flag, o que corresponderia apenas a expressão da proteína Flag+mNeonGreen, não sendo observado nenhum reconhecimento da quimera.

Figura 15 -Western blot de extrato total de proteínas de *Leishmania tarentolae* transfectada com o plasmídeo Quimera\_FlagGPI\_pROCK Neo e FlagGPI\_pROCK Neo, revelado com anticorpo anti-Flag e com soro policlonal anti-quimera.



Fonte: Autora.

\* Western blot com extratos totais de proteína de *L. tarentolae* transfectada com o plasmídeo Quimera\_FlagGPI\_pROCK Neo para verificar a expressão da proteína quimérica. Membrana de nitrocelulose a esquerda com amostras de 1-4 reveladas com anticorpo anti-Flag. 1= Padrão massa molecular para proteínas (BIORAD), 2= Extrato total de proteínas de *L. tarentolae* selvagem, 3= Extrato total de proteínas de *L. tarentolae* transfectada com FlagGPI\_pROCK Neo, 4= Extrato total de proteínas de *L. tarentolae* transfectada com Quimera\_FlagGPI\_pROCK Neo. Membrana de nitrocelulose a direita com amostras de 5-8 reveladas com anticorpo policlonal anti-quimera. 5= Padrão massa molecular para proteínas, 6= Extrato total de proteínas de *L. tarentolae* selvagem, 7= Extrato total de proteínas de *L. tarentolae* transfectada com FlagGPI\_pROCK Neo, 8= Extrato total de proteínas de *L. tarentolae* transfectada com Quimera\_FlagGPI\_pROCK Neo. Tamanhos esperados para Flag+Quimera 99,43 kDa e para Flag 33,13 kDa.

A não detecção da expressão da proteína Flag nos parasitos transfectados com FlagGPI\_pROCK Neo pelo anticorpo monoclonal anti-Flag pode estar associado ao baixo número de proteínas extraídas da cultura desses parasitos. Contudo, não esperávamos a detecção apenas da proteína Flag em transfectados com Quimera\_FlagGPI\_pROCK Neo quando utilizado o anticorpo anti-Flag, uma vez que o plasmídeo foi projetado para que a sequência Flag estivesse fusionada com a proteína quimérica. A ausência de proteínas detectadas com a utilização do soro policlonal anti-quimera pode ter resultado da baixa quantidade de soro utilizado no experimento. Como recebemos uma pequena quantidade de soro policlonal anti-quimera gerado por Figueiredo (2019), não pudemos testar diferentes concentrações do soro para estimar a quantidade necessária para ser utilizada no ensaio de *Western blot*.

O grupo colaborador da UFMG está em fase final de produção de novo antissoro anti-quimera, o que será utilizado na repetição destes ensaios com as populações de *T. rangeli* selvagem, transfectadas com Quimera\_FlagGPI\_pROCK Neo e com FlagGPI\_pROCK Neo.

#### **4 CONCLUSÃO**

De forma geral, a estratégia de subclonagem com os plasmídeos FlagGPI\_pROCK Neo e Quimera\_FlagGPI\_pROCK Neo em promastigotas *Leishmania tarentolae* não apresentou um bom desempenho tendo os parasitos apresentado alterações de crescimento, motilidade e morfologia em relação à cepa selvagem. Entretanto, a transfecção com os plasmídeos FlagGPI\_pROCK Neo e Quimera\_FlagGPI\_pROCK Neo em epimastigotas de *Trypanosoma rangeli* apresentou um bom desempenho no qual as características biológicas de crescimento e divisão celular iguais à população selvagem do parasito.

#### **5 PERSPECTIVAS**

Apesar de não obtermis evidência direta da expressão da proteína quimérica em *Leishmania tarentolae* e *Trypanosoma rangeli*, novos ensaios serão realizados com extratos

totais, com extratos solúveis e insolúveis de parasitos selvagens e transfectados com os plasmídeos FlagGPI\_pROCK Neo e Quimera\_ FlagGPI\_pROCK Neo visando determinar a expressão da quimera. Para tanto, novo antissoro anti-quimera está sendo produzido pelos nossos colaboradores na UFMG. Para confirmar, se houve uma incompatibilidade do plasmídeo FlagGPI\_pROCK Neo por *L. tarentolae* ou se a quimera proteína é realmente tóxica, uma nova subclonagem do gene da quimera proteica será realizada em um vetor pLEXSY, uma vez que esse vetor foi desenvolvido para ter uma melhor eficiência na transfecção e expressão de proteínas em *L. tarentolae*. Além disso, para identificar corretamente os sítios de expressão da quimera proteica em *T. rangeli*, ensaios de imunofluorescência indireta deverão ser realizados e visualizados em microscopia confocal. Em sendo verificada a expressão da quimera proteica por *Trypanosoma rangeli*, propõe-se a realização de ensaios-desafio de eficácia vacinal de animais previamente infectados com o *T. rangeli* expressando a quimera proteica com cepas de *T. cruzi* ou *Leishmania* spp.

## REFERÊNCIAS

ABDOSSAMADI, Zahra. *et al.* Live *Leishmania tarentolae* secreting HNP1 as an immunotherapeutic tool against *Leishmania* infection in BALB/c mice. **Immunotherapy**, 9(13): 1089-1102, 2017.

AGUILAR-BE, Ingrid *et al.* Cross-Protective Efficacy of a Prophylactic *Leishmania donovani* DNA Vaccine against Visceral and Cutaneous Murine Leishmaniasis. **Infection And Immunity**, [S.L.], v. 73, n. 2, p. 812-819, fev. 2005. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/iai.73.2.812-819.2005>.

ANDRADE, Ana Lucia Sgambatti de *et al.* Randomised trial of efficacy of benznidazole in treatment of early *Trypanosoma cruzi* infection. **The Lancet**, [S.L.], v. 348, n. 9039, p. 1407-1413, nov. 1996. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736\(96\)04128-1](http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736(96)04128-1).

ANDRADE, Luciana O.; ANDREWS, Norma W.. Lysosomal Fusion Is Essential for the Retention of *Trypanosoma cruzi* Inside Host Cells. **Journal Of Experimental Medicine**, [S.L.], v. 200, n. 9, p. 1135-1143, 1 nov. 2004. Rockefeller University Press. <http://dx.doi.org/10.1084/jem.20041408>.

ANTUNES, Carlos M. F. *et al.* Controlled Field Trials of a Vaccine Against New World Cutaneous Leishmaniasis. **International Journal Of Epidemiology**, [S.L.], v. 15, n. 4, p. 572-580, 1986. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/ije/15.4.572>.

ARMIJOS, Rodrigo X. *et al.* Field Trial of a Vaccine against New World Cutaneous Leishmaniasis in an At-Risk Child Population: safety, immunogenicity, and efficacy during the first 12 months of follow :up. **The Journal Of Infectious Diseases**, [S.L.], v. 177, n. 5, p. 1352-1357, maio 1998. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1086/515265>.

BASSO, Beatriz *et al.* Vaccination with epimastigotes of different strains of *Trypanosoma rangeli* protects mice against *Trypanosoma cruzi* infection. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, [S.L.], v. 103, n. 4, p. 370-374, jun. 2008. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0074-02762008000400010>.

BATES, Paul A.. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. **International Journal For Parasitology**, [S.L.], v. 37, n. 10, p. 1097-1106, ago. 2007. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpara.2007.04.003>.

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,p. 248–254, 1976.

BRASIL. Ministério da Saúde. Governo Federal. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br>. Acesso em: 10 out. 2022.

BRANDAN, Cecilia P. *et al.* Knockout of the dhfr-ts Gene in *Trypanosoma cruzi* Generates Attenuated Parasites Able to Confer Protection against a Virulent Challenge. **Plos Neglected Tropical Diseases**, [S.L.], v. 5, n. 12, p. 1418, 13 dez. 2011. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0001418>.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **GUIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE**. 5. ed. Brasília: Recurso Eletrônico, 2021. 1128 p. Disponível em: [https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/publicacoes-svs/vigilancia/guia-de-vigilancia-em-saude\\_5ed\\_21nov21\\_isbn5.pdf/view](https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/publicacoes-svs/vigilancia/guia-de-vigilancia-em-saude_5ed_21nov21_isbn5.pdf/view). Acesso em: 28 out. 2022.

BRETON, Marie. *et al.* Live Nonpathogenic Parasitic Vector as a Candidate Vaccine against Visceral Leishmaniasis. **Infection And Immunity**, 73(10): 6372-6382, 2005

CARDOZO, Gabriel Henrique de Arruda. **Clonagem e expressão do antígeno sintético E5 multiepítopos 2 de HPV 16 em *Leishmania tarentolae***. 2020. 55 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-Graduação em Genética, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2020.

CARVALHO, Tecia M. U. de; SOUZA, Wanderley de. Early events related with the behaviour of *Trypanosoma cruzi* within an endocytic vacuole in mouse peritoneal macrophages. **Cell Structure And Function**, [S.L.], v. 14, n. 4, p. 383-392, 1989. Japan Society for Cell Biology. <http://dx.doi.org/10.1247/csf.14.383>



(CDC) CENTERS OF DISEASE CONTROL AND PREVENTION. (USA). Disponível em: <https://www.cdc.gov/>. Acesso em: 10 out. 2022.

COURA, José R.; DIAS, João C. P. Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease: 100 years after its discovery. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, [S.L.], v. 104, n. 1, p. 31-40, jul. 2009. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0074-02762009000900006>

COURTENAY, Orin *et al.* Infectiousness in a Cohort of Brazilian Dogs: why culling fails to control visceral leishmaniasis in areas of high transmission. **The Journal Of Infectious Diseases**, [S.L.], v. 186, n. 9, p. 1314-1320, nov. 2002. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1086/344312>.

DALTON, J.P; MULCAHY, Grace. Parasite vaccines — a reality? **Veterinary Parasitology**, [S.L.], v. 98, n. 1-3, p. 149-167, jul. 2001. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0304-4017\(01\)00430-7](http://dx.doi.org/10.1016/s0304-4017(01)00430-7).

DIETZE, Reynaldo *et al.* Effect of Eliminating Seropositive Canines on the Transmission of Visceral Leishmaniasis in Brazil. **Clinical Infectious Diseases**, [S.L.], v. 25, n. 5, p. 1240-1242, nov. 1997. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1086/516096>.

(DNDi) DRUGS FOR NEGLECTED DISEASES INITIATIVE (Genebra). Disponível em: <https://dndi.org>. Acesso em: 10 out. 2022.

DUMONTEIL, Eric *et al.* Safety and preservation of cardiac function following therapeutic vaccination against *Trypanosoma cruzi* in rhesus macaques. **Journal Of Microbiology, Immunology And Infection**, [S.L.]. p. 1-8, set. 2022. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmii.2022.09.003>.

DUMONTEIL, Eric. Vaccine development against *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania* species in the post-genomic era. **Infection, Genetics And Evolution**, [S.L.], v. 9, n. 6, p. 1075-1082, dez. 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2009.02.009>.

ESCH, Kevin J. *et al.* Preventing Zoonotic Canine Leishmaniasis in Northeastern Brazil: pet attachment and adoption of community leishmania prevention. **The American Journal Of Tropical Medicine And Hygiene**, [S.L.], v. 87, n. 5, p. 822-831, 7 nov. 2012. American Society of Tropical Medicine and Hygiene. <http://dx.doi.org/10.4269/ajtmh.2012.12-0251>.

ESCH, Kevin J.; PETERSEN, Christine A.. Transmission and Epidemiology of Zoonotic Protozoal Diseases of Companion Animals. **Clinical Microbiology Reviews**, [S.L.], v. 26, n. 1, p. 58-85, jan. 2013. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/cmr.00067-12>.

ESTANI, S Sosa *et al.* Efficacy of chemotherapy with benznidazole in children in the indeterminate phase of Chagas' disease. **The American Journal Of Tropical Medicine And Hygiene**, [S.L.], v. 59, n. 4, p. 526-529, 1 out. 1998. American Society of Tropical Medicine and Hygiene. <http://dx.doi.org/10.4269/ajtmh.1998.59.526>.

EWING, Brent; GREEN, Phil. Base-Calling of Automated Sequencer Traces Using Phred. II. Error Probabilities. **Genome Research**, [S.L.], v. 8, n. 3, p. 186-194, 1 mar. 1998. Cold Spring Harbor Laboratory. <http://dx.doi.org/10.1101/gr.8.3.186>.

EWING, Brent *et al.* Base-Calling of Automated Sequencer Traces Using Phred. I. Accuracy Assessment. **Genome Research**, [S.L.], v. 8, n. 3, p. 175-185, 1 mar. 1998. Cold Spring Harbor Laboratory. <http://dx.doi.org/10.1101/gr.8.3.175>.

FABBRO, Diana L. *et al.* Trypanocide treatment among adults with chronic Chagas disease living in Santa Fe city (Argentina), over a mean follow-up of 21 years: parasitological, serological and clinical evolution. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, [S.L.], v. 40, n. 1, p. 1-10, fev. 2007. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0037-86822007000100001>.

FERNANDES, Ana P. *et al.* Protective immunity against challenge with *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi* in beagle dogs vaccinated with recombinant A2 protein. **Vaccine**, [S.L.], v. 26, n. 46, p. 5888-5895, out. 2008. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2008.05.095>.

FIGUEIREDO, Luiza Almeida de. **Desenvolvimento de proteína quimérica como alvo vacinal para a doença de Chagas e as leishmanioses**. 2019. 106 f. Tese (Doutorado) - Curso de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2019.

GILLESPIE, Portia M. *et al.* Status of vaccine research and development of vaccines for leishmaniasis. **Vaccine**, [S.L.], v. 34, n. 26, p. 2992-2995, jun. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2015.12.071>.

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

GREEN, M. R.; SAMBROOK, J. **Molecular cloning: a laboratory manual**. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2012.

GRONDIN, K. *et al.* Co-amplification of the gamma -glutamylcysteine synthetase gene *gsh1* and of the ABC transporter gene *pgpA* in arsenite-resistant *Leishmania tarentolae*. **The Embo Journal**, [S.L.], v. 16, n. 11, p. 3057-3065, 1 jun. 1997. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1093/emboj/16.11.3057>.

INTROINI M.V. *et al.* 'Experimental Chagas' disease: I. Study of different immunization conditions in the infection course. **Boletín chileno de parasitología**, 53(3-4): 45-51, 1998.

JACKSON, Yves *et al.* Tolerance and Safety of Nifurtimox in Patients with Chronic Chagas Disease. **Clinical Infectious Diseases**, [S.L.], v. 51, n. 10, p. 69-75, 15 nov. 2010. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1086/656917>.

KISSINGER, Jessica C.. A tale of three genomes: the kinetoplastids have arrived. **Trends In Parasitology**, [S.L.], v. 22, n. 6, p. 240-243, jun. 2006. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pt.2006.04.002>.

KLATT, Stephan. *et al.* *Leishmania tarentolae*: taxonomic classification and its application as a promising biotechnological expression host. **Plos Neglected Tropical Diseases**, 13(7): e0007424, 2019.

KUSHNIR, Susanna *et al.* Artificial linear episome-based protein expression system for protozoon *Leishmania tarentolae*. **Molecular And Biochemical Parasitology**, [S.L.], v. 176, n. 2, p. 69-79, abr. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molbiopara.2010.12.002>.

LAGE, Daniela P. *et al.* Liposomal Formulation of ChimeraT, a Multiple T-Cell Epitope-Containing Recombinant Protein, Is a Candidate Vaccine for Human Visceral Leishmaniasis. **Vaccines**, [S.L.], v. 8, n. 2, p. 289, 9 jun. 2020. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/vaccines8020289>.

LEE, Bruce Y. *et al.* The Economic Value of a Visceral Leishmaniasis Vaccine in Bihar State, India. **The American Journal Of Tropical Medicine And Hygiene**, [S.L.], v. 86, n. 3, p. 417-425, 1 mar. 2012. American Society of Tropical Medicine and Hygiene. <http://dx.doi.org/10.4269/ajtmh.2012.10-0415>.

LEE, Bruce Y. *et al.* The Potential Economic Value of a *Trypanosoma cruzi* (Chagas Disease) Vaccine in Latin America. **Plos Neglected Tropical Diseases**, [S.L.], v. 4, n. 12, p. 916, 14 dez. 2010. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0000916>.

LIMA, Beatriz D; SIMPSON, Larry. Sequence-dependent in vivo importation of tRNAs into the mitochondrion of *Leishmania tarentolae*. **Cambridge University Press**, Cambridge, v. 2, n. 5, p. 429-440, maio 1996.

LIMA, F.M. *et al.* The challenge of Chagas' disease: has the human pathogen, *Trypanosoma cruzi*, learned how to modulate signaling events to subvert host cells?. **New Biotechnology**, [S.L.], v. 27, n. 6, p. 837-843, dez. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.nbt.2010.02.003>.

LÜDER, Carsten G.K *et al.* Intracellular protozoan parasites and apoptosis: diverse strategies to modulate parasite-host interactions. **Trends In Parasitology**, [S.L.], v. 17, n. 10, p. 480-486, out. 2001. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s1471-4922\(01\)02016-5](http://dx.doi.org/10.1016/s1471-4922(01)02016-5).

MARKOSSIAN, K. A.; KURGANOV, B. I.. Protein Folding, Misfolding, and Aggregation. Formation of Inclusion Bodies and Aggresomes. **Biochemistry (Moscow)**, [S.L.], v. 69, n. 9, p. 971-984, set. 2004. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1023/b:biry.0000043539.07961.4c>.

MAYRINK, W. *et al.* An experimental vaccine against American dermal leishmaniasis: experience in the state of espírito santo, Brazil. **Annals Of Tropical Medicine & Parasitology**, [S.L.], v. 79, n. 3, p. 259-269, jan. 1985. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/00034983.1985.11811917>.

MAZUMDAR, Tuhina *et al.* A mixed Th1/Th2 response elicited by a liposomal formulation of *Leishmania* vaccine instructs Th1 responses and resistance to *Leishmania donovani* in susceptible BALB/c mice. **Vaccine**, [S.L.], v. 22, n. 9-10, p. 1162-1171, mar. 2004. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2003.09.030>.

MILLER, Mark J. *et al.* *Trypanosoma cruzi*: protective immunity in mice immunized with paraflagellar rod proteins is associated with a t-helper type 1 response. **Experimental Parasitology**, [S.L.], v. 84, n. 2, p. 156-167, nov. 1996. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1006/expr.1996.0101>.

MONCAYO, Alvaro. Chagas disease: current epidemiological trends after the interruption of vectorial and transfusional transmission in the southern cone countries. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, [S.L.], v. 98, n. 5, p. 577-591, jul. 2003. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0074-02762003000500001>.

MONZOTE, Lianet. Current Treatment of Leishmaniasis: A Review. **The Open Antimicrobial Agents Journal**, Havana, v. 1, p. 9-19, 2009. <http://dx.doi.org/10.2174/1876518100901010009>.

MÜLLER, Kerstin *et al.* Chemokines, natural killer cells and granulocytes in the early course of *Leishmania major* infection in mice. **Medical Microbiology And Immunology**, [S.L.], v. 190, n. 1-2, p. 73-76, 21 ago. 2001. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s004300100084>.

NOAZIN, Sassan *et al.* First generation leishmaniasis vaccines: a review of field efficacy trials. **Vaccine**, [S.L.], v. 26, n. 52, p. 6759-6767, dez. 2008. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2008.09.085>.

NOGUEIRA, N; COHN, Z. *Trypanosoma cruzi*: mechanism of entry and intracellular fate in mammalian cells.. **Journal Of Experimental Medicine**, [S.L.], v. 143, n. 6, p. 1402-1420, 1 jun. 1976. Rockefeller University Press. <http://dx.doi.org/10.1084/jem.143.6.1402>.

OSTOLIN, Thais Lopes Valentim di Paschoale *et al.* A chimeric vaccine combined with adjuvant system induces immunogenicity and protection against visceral leishmaniasis in BALB/c mice. **Vaccine**, [S.L.], v. 39, n. 20, p. 2755-2763, maio 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2021.04.004>.

(PAHO) ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE. **Doença de Chagas**. Disponível em: <https://www.paho.org/en/topics/chagas-disease>. Acesso em: 25 out. 2022.

PANASIUK, Mirosława *et al.* Immunization with *Leishmania tarentolae*-derived norovirus virus-like particles elicits high humoral response and stimulates the production of neutralizing antibodies. **Microbial Cell Factories**, [S.L.], v. 20, n. 1, p. 1-11, 24 set. 2021. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s12934-021-01677-1>.

PAPADOPOULOU, Barbara *et al.* Gene Disruption of the P-Glycoprotein Related Gene *pgpa* of *Leishmania tarentolae*. **Biochemical And Biophysical Research Communications**, [S.L.], v. 224, n. 3, p. 772-778, jul. 1996. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1006/bbrc.1996.1098>.

PEREIRA, Valéria Ra *et al.* Antibody isotype responses in Balb/c mice immunized with the cytoplasmic repetitive antigen and flagellar repetitive antigen of *Trypanosoma*

*cruzi*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, [S.L.], v. 98, n. 6, p. 823-825, set. 2003. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0074-02762003000600019>.

PETERS, Nathan C. *et al.* In Vivo Imaging Reveals an Essential Role for Neutrophils in Leishmaniasis Transmitted by Sand Flies. **Science**, [S.L.], v. 321, n. 5891, p. 970-974, 15 ago. 2008. American Association for the Advancement of Science (AAAS). <http://dx.doi.org/10.1126/science.1159194>.

PINAZO, María-Jesús *et al.* Tolerance of Benznidazole in Treatment of Chagas' Disease in Adults. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, [S.L.], v. 54, n. 11, p. 4896-4899, nov. 2010. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/aac.00537-10>.

PINEDA, Tatiana *et al.* A non-commercial approach for the generation of transgenic *Leishmania tarentolae* and its application in antileishmanial drug discovery. **Parasitology**, [S.L.], v. 143, n. 9, p. 1133-1142, 13 maio 2016. Cambridge University Press (CUP). <http://dx.doi.org/10.1017/s0031182016000585>.

PLOTKIN, Stanley A. *et al.* **Vaccines**. 6. ed. Filadélfia: Elsevier Saunders, 2012. 1551 p.

PROMEGA. **PGEM®-T and pGEM®-T Easy Vector Systems**: technical manual. Madison: Promega Corporation, 2021. 29 p.

REGINA-SILVA, Shara *et al.* Field randomized trial to evaluate the efficacy of the Leish-Tec® vaccine against canine visceral leishmaniasis in an endemic area of Brazil. **Vaccine**, [S.L.], v. 34, n. 19, p. 2233-2239, abr. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2016.03.019>.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. **Molecular Cloning: a Laboratory Manual**. 3. ed. New York: Cold Spring Harbour Laboratory Press, 2001.

SANCHEZ-BURGOS, Gilma *et al.* Comparative evaluation of therapeutic DNA vaccines against *Trypanosoma cruzi* in mice. **Fems Immunology & Medical Microbiology**, [S.L.], v.

50, n. 3, p. 333-341, ago. 2007. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-695x.2007.00251.x>.

SHARIFI, Iraj *et al.* Randomised vaccine trial of single dose of killed *Leishmania major* plus BCG against anthroponotic cutaneous leishmaniasis in Bam, Iran. **The Lancet**, [S.L.], v. 351, n. 9115, p. 1540-1543, maio 1998. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736\(98\)09552-x](http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736(98)09552-x).

SILVA, Adriana Corrêa da. **Avaliação do tropismo tissular de *Trypanosoma rangeli* em mamíferos e caracterização das glicoproteínas mucinas-like nessa espécie.** 2021. 216 f. Tese (Doutorado) - Curso de Biotecnologia e Biociências, Centro Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2021.

SINGH, Bhawana; SUNDAR, Shyam. Leishmaniasis: vaccine candidates and perspectives. **Vaccine**, [S.L.], v. 30, n. 26, p. 3834-3842, jun. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.03.068>.

SNARY, David. Cell surface glycoproteins of *Trypanosoma cruzi*: protective immunity in mice and antibody levels in human chagasic sera. **Transactions Of The Royal Society Of Tropical Medicine And Hygiene**, [s. l.], v. 77, n. 1, p. 126-129, jan. 1983. [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(83\)90037-8](https://doi.org/10.1016/0035-9203(83)90037-8).

SOLBACH, Werner; LASKAY, Tamás. The Host Response to *Leishmania* Infection. **Advances In Immunology**, [S.L.], p. 275-317, 1999. Elsevier. [http://dx.doi.org/10.1016/s0065-2776\(08\)60912-8](http://dx.doi.org/10.1016/s0065-2776(08)60912-8)

SOUZA, Wanderley de *et al.* Review on *Trypanosoma cruzi*: host cell interaction. **International Journal Of Cell Biology**, [S.L.], v. 2010, p. 1-18, 2010. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2010/295394>.

STOCO, Patrícia H. *et al.* Genome of the avirulent human-infective trypanosome--*Trypanosoma rangeli*. **PLoS Neglected Tropical Disease**, 8(9):e3176, 2014.



SUNDAR, Shyam *et al.* Clinicoepidemiological study of drug resistance in Indian kalazar. **Bmj**, [S.L.], v. 308, n. 6924, p. 307, 29 jan. 1994. BMJ. <http://dx.doi.org/10.1136/bmj.308.6924.307>.

SUNDAR, Shyam *et al.* Failure of Pentavalent Antimony in Visceral Leishmaniasis in India: report from the center of the indian epidemic. **Clinical Infectious Diseases**, [S.L.], v. 31, n. 4, p. 1104-1107, out. 2000. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1086/318121>.

TADELE, MARKOS *et al.* “In vitro growth inhibitory activity of Medicines for Malaria Venture pathogen box compounds against *Leishmania aethiopica*.” **BMC pharmacology & toxicology** v. 22. n.1, p.1-10, 2021.

TARDIEUX, Isabelle *et al.* Lysosome recruitment and fusion are early events required for trypanosome invasion of mammalian cells. **Cell**, [S.L.], v. 71, n. 7, p. 1117-1130, dez. 1992. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0092-8674\(05\)80061-3](http://dx.doi.org/10.1016/s0092-8674(05)80061-3).

TARLETON, Rick L.; CURRAN, James W.. Is Chagas Disease Really the “New HIV/AIDS of the Americas”? **Plos Neglected Tropical Diseases**, [S.L.], v. 6, n. 10, p. 1861, 25 out. 2012. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0001861>.

TARLETON, Rick L *et al.* The Challenges of Chagas Disease— Grim Outlook or Glimmer of Hope? **Plos Medicine**, [S.L.], v. 4, n. 12, p. 332, 27 dez. 2007. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pmed.0040332>.

TESH, Robert B.. Control of Zoonotic Visceral Leishmaniasis: is it time to change strategies?. **The American Journal Of Tropical Medicine And Hygiene**, [S.L.], v. 52, n. 3, p. 287-292, 1 mar. 1995. American Society of Tropical Medicine and Hygiene. <http://dx.doi.org/10.4269/ajtmh.1995.52.287>.

THAKUR, Aneesh *et al.* Immune markers and correlates of protection for vaccine induced immune responses. **Vaccine**, [S.L.], v. 30, n. 33, p. 4907-4920, jul. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.05.049>.

TORNHEIM, Jeffrey A. *et al.* Improved Completion Rates and Characterization of Drug Reactions with an Intensive Chagas Disease Treatment Program in Rural Bolivia. **Plos Neglected Tropical Diseases**, [S.L.], v. 7, n. 9, p. 2407, 19 set. 2013. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0002407>.

TOWBIN, H *et al.* Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications.. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, [S.L.], v. 76, n. 9, p. 4350-4354, set. 1979. Proceedings of the National Academy of Sciences. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.76.9.4350>.

VIOTTI, Rodolfo *et al.* Long-Term Cardiac Outcomes of Treating Chronic Chagas Disease with Benznidazole versus No Treatment. **Annals Of Internal Medicine**, [S.L.], v. 144, n. 10, p. 724, 16 maio 2006. American College of Physicians. <http://dx.doi.org/10.7326/0003-4819-144-10-200605160-00006>.

(WHO) WORLD HEALTH ORGANIZATION. Disponível em: <https://www.who.int/>. Acesso em: 10 out. 2022.

ZAPATAESTRELLA, H *et al.* Control of *Trypanosoma cruzi* infection and changes in T-cell populations induced by a therapeutic DNA vaccine in mice. **Immunology Letters**, [S.L.], v. 103, n. 2, p. 186-191, 15 mar. 2006. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.imlet.2005.11.015>.