



**Universidade Federal de Santa Catarina**  
**Centro de Ciências Biológicas**  
**Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia**  
**Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências**

**Avaliação da expressão e atividade da arginina quinase em  
diferentes formas do ciclo evolutivo do *Trypanosoma rangeli***

**Carime Lessa Mansur Pontes**

**Florianópolis**

**2016**



Carime Lessa Mansur Pontes

**Avaliação da expressão e atividade da arginina quinase em diferentes formas do ciclo evolutivo do *Trypanosoma rangeli***

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Mestre em Biotecnologia e Biociências  
Orientador: Prof. Dr. Edmundo Carlos Grisard  
Coorientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Patrícia Hermes Stoco

Florianópolis

2016

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

Pontes, Carime Lessa Mansur

Avaliação da expressão e atividade da arginina quinase em diferentes formas do ciclo evolutivo do *Trypanosoma rangeli* / Carime Lessa Mansur Pontes ; orientador, Edmundo Carlos Grisard ; coorientadora, Patrícia Hermes Stocco. - Florianópolis, SC, 2016.

80 p.

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

Inclui referências

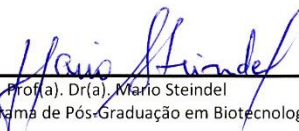
1. Biotecnologia e Biociências. 2. *Trypanosoma rangeli*. 3. Arginina quinase. 4. Atividade enzimática. 5. Expressão proteica. I. Grisard, Edmundo Carlos. II. Stocco, Patrícia Hermes. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências. IV. Título.

**“Avaliação da expressão e atividade da arginina quinase em diferentes formas do ciclo evolutivo do *Trypanosoma rangeli*”**

Por

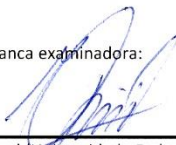
**Carime Lessa Mansur Pontes**

Dissertação julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da Banca Examinadora (01/PPGBTC/2016) do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências - UFSC.



Prof(a). Dr(a). Mario Steindel  
Coordenador(a) do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências

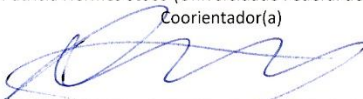
Banca examinadora:



Dr(a) Edmundo Carlos Grisard (Universidade Federal de Santa Catarina)  
Orientador(a)



Dr(a) Patrícia Hermes Stoco (Universidade Federal de Santa Catarina)  
Coorientador(a)



Dr(a) Ariel Mariano Silber (Universidade de São Paulo)



Dr(a) Marcelo Farina (Universidade Federal de Santa Catarina)



Dr(a) Marcelo Maraschir (Universidade Federal de Santa Catarina)

Florianópolis, 15 de fevereiro de 2016.



## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus pais, que mesmo após minha formatura acreditaram em mim e me apoiaram na decisão de continuar meus estudos. Pelo entendimento das minhas ausências nas datas importantes e mesmo muitas vezes nos finais de semana que estavam em Florianópolis.

Agradeço meu orientador, Dr. Edmundo Carlos Grisard, pela oportunidade de estar no laboratório, mas, principalmente, pelos ensinamentos, pelo carinho paternal e por toda a preocupação, tanto com o trabalho quanto com assuntos pessoais.

Agradeço a minha orientadora Dr<sup>a</sup>. Patrícia Hermes Stoco, por todas as vezes que dispôs do seu tempo e foi comigo para a bancada e ajudou nos experimentos, apesar de sempre estar “cercada de amadores”. Mas acima de tudo pela amizade, disponibilidade e risadas, muitas risadas.

A Dr<sup>a</sup>. Milene Moraes, que sempre esteve disponível para ajudar nos experimentos, desde a padronização até a execução. Mas, principalmente pelos momentos de risadas que tivemos, pelas conversas e por todas as queimaduras conjuntas no nitrogênio líquido.

A Laís Yamanaka, por compartilhar comigo todos os momentos desde o início. Pela parceria nos experimentos, desesperos e alegrias. Sem você, fazer esse mestrado seria muito mais difícil e menos divertido.

A Laryssa Liz, que voltou da Irlanda aos 45 do segundo tempo, mas que não pensou duas vezes em me ajudar em tudo que eu precisava. Quero que você saiba que eu não teria terminado a tempo sem você, tanto pela ajuda quanto pelas palavras de incentivo todas as vezes que eu quis desistir de tudo.

Ao meu namorado Saulo, que pela segunda vez nesses 5 anos de namoro passa pela correria e estresse de finalização de um trabalho e início de outro. Agradecer pela companhia nas noites longas de experimentos que você enfrentou. Pela sua compreensão e paciência nos momentos difíceis eu te agradeço do fundo do meu coração. Mas acredito que agradecer pelos momentos em que você me ajudou a levantar e a seguir em frente é mais justo, porque não foram poucos esses momentos.

A minha irmã Camila, por todo o amor de irmã existente no mundo. Por eu sempre poder contar contigo, para tudo. Pelas piadas e risadas, e por me mostrar o lado mais simples da vida.

Aos “pequenos” que chegaram nesse tempo, Natália, Bruno e Thaís. Por sempre me lembrarem que para poder ensinar, precisamos sempre aprender.

A todas as amigas e amigos do laboratório que fizeram de todos os dias de trabalho mais fáceis e prazerosos, Ana Paula G., Greicy, Ana Paula, Carine, Vagner, Ingrid e Tatiana. Obrigada pela amizade e ajuda.

Aos meus amigos que sempre estiveram presentes na minha vida em todos os momentos.

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

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

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



*“A bruise is a lesson, and each lesson  
makes us better”  
Arya Stark – Game of Thrones*



## RESUMO

O *Trypanosoma rangeli* (Kinetoplastida; Trypanosomatidae) é um parasito hemoflagelado que compartilha reservatórios e vetores com o *Trypanosoma cruzi*, sendo capaz de infectar mamíferos silvestres e domésticos, assim como o ser humano. Dentre as proteínas envolvidas na regulação do metabolismo energético do *T. rangeli*, avaliamos neste trabalho a expressão e a atividade enzimática da arginina quinase (AK), enzima que possui atividade de fosfotransferase e cataliza a interconversão entre a fosfoarginina e ADP, assim como arginina e ATP, sendo essencial para diferentes processos celulares em tripanosomatídeos, como por exemplo, infecção, multiplicação celular e diferenciação celular. O crescimento dos parasitos em meio LIT foi acompanhado durante nove dias, sendo observada uma menor expressão da AK somente no dia 1, aumentando no dia 2 e mantendo-se estável nos dias subsequentes. A atividade enzimática da AK aumentou progressivamente até o 5º dia de cultivo, decaindo gradativamente nos dias subsequentes. Durante a diferenciação celular de formas epimastigotas para tripomastigotas realizada ao longo de oito dias em meio DMEM, a maior expressão da AK foi detectada nas formas epimastigotas (dia 0) e a maior atividade enzimática nas formas de transição (dia 4). Durante a diferenciação de tripomastigotas em epimastigotas foi observada uma menor expressão da AK somente nos dias 3 e 4, sendo aumentada no dia 5 e mantendo-se estável nos dias subsequentes. A atividade enzimática da AK se manteve constante nos tripomastigotas recém isolados e no primeiro dia de cultivo, aumentando no segundo dia e se mantendo constante até o sexto dia, quando teve um aumento da atividade, que novamente se manteve constante até o nono dia e então decaindo nos últimos dias. Embora estudo prévio tenha demonstrado uma localização flagelar da TrAK a maior parte da atividade da AK foi encontrada na fração citosólica após purificação do citoesqueleto e flagelo. Na comparação entre diferentes espécies e cepas de tripanosomatídeos, a cepa SC 58 de *T. rangeli* apresentou uma atividade quase duas vezes maior do que a cepa Choachí. A atividade nas cepas de *T. cruzi* foi praticamente constante quando comparadas entre si e também com a cepa Choachí. Através destes resultados é possível inferir que a

atividade da AK parece estar relacionada à multiplicação celular e a adaptação às condições metabólicas adversas (ex. diferenciação celular), sendo influenciada pela demanda energética do parasito.

Palavras-chave: *Trypanosoma rangeli*; Arginina Quinase; atividade enzimática; expressão.

## ABSTRACT

*Trypanosoma rangeli* (Kinetoplastida; Trypanosomatidae) is a hemoflagellate parasite that infects wild and domestic mammals, as well as humans, sharing reservoirs and vectors with *Trypanosoma cruzi*. In this work we evaluate the expression and the enzymatic activity of the *T. rangeli* arginine kinase (AK), an enzyme with phosphotransferase activity that catalyzes the interconversion between phosphoarginine and ATP, as the arginine and ATP. AK is essential in trypanosomatids for different cellular processes, like infection, cellular multiplication and cellular differentiation. The AK expression was monitored during the *T. rangeli* epimastigotes growth in LIT medium for nine days, revealing an increasing expression of AK during the first couple of days and then stabilizing. The enzymatic AK activity have increased up to the fifth day of *in vitro* culture and then gradually decreased during the subsequent days. During the cellular differentiation *in vitro*, higher AK expression levels were observed for the epimastigote forms (day 0) but the higher enzymatic activity was detected for the transition forms (day 4). During the *in vitro* differentiation of bloodstream forms to replicative forms the AK expression have increased up to the fifth day and remained stable up to the ninth day. During this process the AK enzymatic activity revealed a slight increase up to the second day and the stabilised up to the sixth day when a second peak of activity was observed followed by decay up to the ninth day. Although previous studies have demonstrated a flagellar localization for the TrAK, higher AK activity was found on the cytosolic fraction. The AK activity revealed to be distinct among *T. rangeli* strains, being two times higher for the SC58 strain when compared to the Choachí strain, which revealed similar AK activity as observed for *T. cruzi*. We conclude that AK activity might be related to the *T. rangeli* cellular multiplication, differentiation and metabolic adaptation to adverse conditions, being influenced by the parasite's energetic demands.

Key words: *Trypanosoma rangeli*; Arginine Kinase; enzymatic activity, expression.



## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Microfotografia de formas epimastigota (A) e tripomastigota (B) de *Trypanosoma rangeli*, coradas por Giemsa. As barras representam 10 µm. Fonte: (LÜCKEMEYER, 2014). **23**
- Figura 2. Distribuição geográfica do *Trypanosoma cruzi* (doença de Chagas) e pontos de ocorrência do *Trypanosoma rangeli*.** Mapa das Américas Central e do Sul, mostrando a sobreposição geográfica da doença de Chagas humana (sombreado) e dos registros de ocorrência comprovada do *T. rangeli* em humanos, triatomíneos ou animais silvestres (•). Fonte: GRISARD; STEINDEL, 2005. .... **24**
- Figura 3. Representação esquemática do ciclo biológico do *Trypanosoma rangeli* no hospedeiro invertebrado.** A infecção do triatomíneo ocorre pela ingestão de formas tripomastigotas sanguíneas durante o repasto (A), sendo as formas tripomastigotas e epimastigotas predominantes no intestino médio (B). Formas epimastigotas curtas se dividem no intestino médio e podem invadir a hemocele (C), onde dividem-se de forma livre como epimastigotas longas. Alguns parasitos podem invadir hemócitos (D), sendo desconhecida a capacidade de multiplicação no interior desta célula. As formas epimastigotas longas aderem e penetram na glândula salivar (E) diferenciando-se em seu interior em tripomastigotas metacíclicos (F) infectantes que são inoculados com a saliva durante o repasto sanguíneo. Fonte: (STOCO et al., 2014)..... **27**
- Figura 4. Representação esquemática das reações presentes no ensaio de atividade enzimática.** AK- Arginina Quinase; PK- Piruvato Quinase; LD- Lactato Desidrogenase. .... **43**
- Figura 5.** A) Análise da organização do gene *TrAK* de *Trypanosoma rangeli* por *Southern Blot*. B) Mapa de restrição do gene *TrAK* apontando os sítios de restrição das enzimas utilizadas. A barra roxa representa o quadro aberto de leitura do gene *TrAK* e a barra verde representa a região condizente a sonda *TrAK*. .... **50**

<b>Figura 6.</b> Alinhamento da <i>TrAK</i> utilizada com as sequências aminoacídicas da arginina quinase encontradas no genoma de <i>T. rangeli</i> . A terceira sequência representa a sequência utilizada para a produção da proteína recombinante. (-) Ausência de aminoácidos na sequência (* ) Aminoácidos idênticos. ....	<b>50</b>
<b>Figura 7.</b> Alinhamento da <i>TrAK</i> das cepas SC58 e Choachí de <i>Trypanosoma rangeli</i> com as sequências ortólogas de <i>T. cruzi</i> , <i>T. brucei</i> , <i>T. brucei gambiense</i> , <i>T. vivax</i> e <i>T. grayi</i> . (-) Ausência de aminoácidos na sequência (* ) Aminoácidos idênticos. ....	<b>51</b>
<b>Figura 8. Árvore filogenética das sequências de aminoácidos da arginina quinase de tripanosomatídeos utilizando o método A) Máxima Parcimônia e B) Neighbor-Joining. Os números nos nodos das árvores indicam os valores de <i>bootstrap</i> (1.000 replicatas). ....</b>	<b>52</b>
<b>Figura 11.</b> Análise da expressão da arginina quinase durante o crescimento <i>in vitro</i> de <i>Trypanosoma rangeli</i> em meio LIT. A) Número de parasitos estabelecidos diariamente a partir de contagens das formas epimastigotas; B) Níveis proteicos de AK em extratos proteicos totais de <i>T. rangeli</i> ; C) Densidade óptica relativa dos níveis de AK, normalizados a partir da expressão de $\alpha$ -tubulina. ** $p < 0,005$ . ** Comparação entre o dia 1 com os dias 4, 5, 6, 7, 8 e 9. ....	<b>53</b>
<b>Figura 12.</b> Análise da atividade da arginina quinase durante o crescimento <i>in vitro</i> de <i>Trypanosoma rangeli</i> em meio LIT. CP – Controle Positivo; CC – Controle por competição (Adição de $5x >$ de histidina). *** $p < 0,001$ . *** Comparação entre o dia 1 com os dias 4, 5 e 6; *** Comparação entre o dia 5 com os dias 7, 8 e 9. ....	<b>55</b>
<b>Figura 13.</b> Análise da expressão da arginina quinase durante a diferenciação <i>in vitro</i> de epimastigotas para tripomastigotas do <i>Trypanosoma rangeli</i> . A) Níveis proteicos de AK em extratos proteicos totais de <i>T. rangeli</i> ; B) Densidade óptica relativa dos níveis de AK, normalizados a partir da expressão de $\alpha$ -tubulina. * $p < 0,05$ . *Comparação entre o dia 0 e os dias 4, 6 e 8. ....	<b>55</b>



**Figura 14.** Análise da atividade da arginina quinase durante a diferenciação *in vitro* do *Trypanosoma rangeli* de formas epimastigotas para formas tripomastigotas do. A) Atividade enzimática de AK; CP – Controle Positivo; CC – Controle por competição (Adição de excesso de 5x de histidina). \*\*\*  $p < 0,001$ ; \* $p < 0,05$ . \*\*\* Comparação entre o dia 0 com os dias 4,6 e 8; \*\*\* Comparação entre o dia 2 com os dias 4 e 8..... **56**

**Figura 15.** Análise dos níveis relativos de mRNA de *TrAK* durante a diferenciação *in vitro* de *Trypanosoma rangeli*. A) Níveis relativos de mRNA de AK em epimastigotas (0), formas intermediárias (4) e tripomastigotas (8); B) Avaliação da especificidade dos iniciadores em gel de poliacrilamida 10% revelando o produto da amplificação após coloração em brometo de etídeo; C) Curva de dissociação da qPCR. .... **57**

**Figura 16.** Análise da atividade da arginina quinase em diferentes espécies da família Trypanosomatidae: *T. rangeli* Choachí, *T. rangeli* SC 58, *T. cruzi* Y e *T. cruzi* Colombiana. \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*\* Comparação entre *T. rangeli* SC58 com as outras amostras. .... **58**

**Figura 17.** Análise da expressão da arginina quinase em diferentes cepas do *T. rangeli*. A) Níveis proteicos de AK em extratos proteicos totais de *T. rangeli*; B) Densidade óptica relativa dos níveis de AK, normalizados a partir da expressão de  $\alpha$ -tubulina (PONTES et al., 2014)..... **59**

**Figura 18.** Análise da atividade da arginina quinase durante a diferenciação *in vitro* de formas tripomastigotas para formas epimastigotas do *Trypanosoma rangeli*. A) Curva de crescimento de *T. rangeli* estabelecida a partir de contagens diárias das formas epimastigotas; B) Atividade enzimática da AK; CP – Controle Positivo; CC – Controle por competição (Adição de excesso de 5x de histidina). \*\*\*  $p < 0,001$ . \*\*\* Comparação entre os tripomastigotas e o dia 1 com os dias 2 a 10. .... **60**

**Figura 19.** Análise da expressão da arginina quinase durante a diferenciação *in vitro* de tripomastigotas em epimastigotas do *Trypanosoma rangeli*. A) Níveis proteicos de AK em extratos

proteicos totais de *T. rangeli*; B) Densidade óptica relativa dos níveis de AK, normalizados a partir da expressão de  $\alpha$ -tubulina.

.....61

**Figura 20.** Citocalização da *TrAK* em formas epimastigotas e tripomastigotas de *Trypanosoma rangeli* através de ensaio de imunofluorescência utilizando o soro policlonal anti-*TrAK*. As imagens representam microfotografias da expressão da *TrA* (1), núcleo e cinetoplasto corados com o reagente DAPI (2) e campo claro (3). As barras de aumento representam 10 $\mu$ m. (PONTES et al., 2014). .....62

**Figura 21.** Análise da atividade da arginina quinase no citosol e flagelo do *Trypanosoma rangeli*. .....63

**Figura 22.** Análise dos níveis de expressão da arginina quinase nas frações flagelares e citosólicas do *Trypanosoma rangeli*. Densidade óptica relativa dos níveis de AK, normalizados a partir da expressão de  $\alpha$ -tubulina.....63

**Figura 23.** Análise da expressão da arginina quinase em extratos proteicos totais de hemolinfa de *Rhodnius prolixus* infectados pelo *Trypanosoma rangeli* e não infectados. ....64

## LISTA DE ABREVIATURAS

ADP – Adenosina Difosfato  
AK – Arginina Quinase  
ANOVA – Análise de Variância  
ATP – Adenosina Trifosfato  
BLAST – do inglês *Basic Local Alignment Search Tool*  
DMEM – *Dulbecco's Modified Eagle Medium*  
DNA – ácido desoxiribonucleico  
dNTP – desoxinucleotídeos trifosfatados  
g – força da gravidade  
IgG – anticorpo do tipo Imunoglobulina G  
l – litro  
LIT – do inglês *Liver Infusion Triptose*  
ml – mililitro  
mM – milimolar  
ng – nanograma  
ORF – do inglês *Open Reading Frame*  
PCR – do inglês *Polymerase Chain Reaction*  
pmol – picomol  
RNA – ácido ribonucleico  
rTrAK - Arginina quinase recombinante de *T. rangeli*  
SBF – Soro Bovino Fetal  
TA – Temperatura Ambiente  
*Taq* – *Thermus aquaticus*  
*TbAK* - Arginina quinase de *T. brucei*  
*TcAK* – Arginina quinase de *T. cruzi*  
*TrAK* - Arginina quinase de *T. rangeli*  
U – unidade de atividade  
V – Volt  
µg – micrograma  
µl – microlitro  
W – Watt



## SUMÁRIO

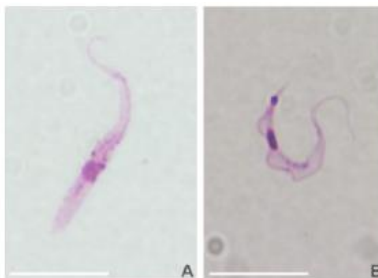
1	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	23
1.1	O <i>Trypanosoma rangeli</i> .....	23
1.2	A proteína arginina quinase .....	29
2	OBJETIVO GERAL .....	33
2.1	Objetivos Específicos .....	33
3	METODOLOGIA .....	35
3.1	Parasitas .....	35
3.1.1	Cultivo <i>in vitro</i> das formas epimastigotas .....	35
3.1.2	Curva de crescimento .....	35
3.1.3	Diferenciação <i>in vitro</i> para obtenção das formas tripomastigotas de <i>T. rangeli</i> .....	36
3.1.4	Obtenção de tripomastigotas sanguíneos.....	37
3.1.5	Curva de crescimento após hemocultura .....	38
3.1.6	Obtenção dos extratos de epimastigotas de hemolinfa de <i>Rhodnius prolixus</i> .....	38
3.1.7	Purificação de citoesqueleto e flagelo .....	39
3.2	Determinação do número de cópias do gene da Arginina Quinase no genoma do <i>T. rangeli</i> através de <i>Southern Blot</i> .....	39
3.2.1	Extração de DNA genômico.....	39
3.2.2	<i>Southern Blot</i> .....	40
3.2.3	Análises <i>in silico</i> do gene da Arginina Quinase	41
3.3	Ensaio de Atividade Enzimática da Arginina Quinase	41
3.4	Análise da transcrição do gene da AK em diferentes formas do <i>T. Rangeli</i> .....	43
3.4.1	Extração de RNA total.....	43
3.4.2	Tratamento com DNaseI.....	44
3.4.3	Reação de Transcrição Reversa (RT-PCR) .....	44
3.4.4	Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa em tempo real (qPCR).....	45
3.4.5	Análise dos resultados da qPCR.....	45
3.5	<i>Western Blot</i> .....	46
4	RESULTADOS.....	49
4.1	Avaliação do número de cópias do gene da AK no genoma de <i>T. rangeli</i> .....	49

4.2	Avaliação dos níveis de expressão proteica e a atividade da <i>TrAK</i> durante curva de crescimento de epimastigotas e durante a diferenciação celular <i>in vitro</i> .....	53
4.3	Avaliação dos níveis de expressão e a atividade da <i>TrAK</i> em cepas das linhagens genéticas KP1+ e KP1- de <i>T. rangeli</i> 57	
4.4	Avaliação dos níveis de expressão e a atividade da <i>TrAK</i> durante a diferenciação de tripomastigotas sanguíneos em epimastigotas.....	59
4.5	Avaliação da citolocalização <i>TrAK</i> no <i>T. rangeli</i> através de ensaios enzimáticos .....	61
4.6	Avaliação da presença e o nível de expressão da <i>TrAK</i> no <i>T. rangeli</i> durante a infecção da hemolinfa de <i>Rhodnius prolixus</i> . 64	
5	DISCUSSÃO.....	65
6	CONCLUSÕES.....	73
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	75

## 1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 1.1 O *Trypanosoma rangeli*

O *Trypanosoma rangeli* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae), descrito por Tejera em 1920, é um parasito hemoflagelado capaz de infectar animais selvagens e domésticos, além do homem, nas Américas Central e do Sul. O *T. rangeli* apresenta duas formas biológicas bem definidas no seu ciclo de vida: a forma epimastigota proliferativa com 45 a 56  $\mu\text{m}$  de comprimento, incluindo o flagelo livre, e a forma tripomastigota sanguínea (Figura 1), a qual é delgada e possui comprimento de 26 a 35  $\mu\text{m}$  (CUBA CUBA, 1998).



**Figura 1.** Microfotografia de formas epimastigota (A) e tripomastigota (B) de *T. rangeli*, coradas por Giemsa. As barras representam 10  $\mu\text{m}$ . Fonte: (LÜCKEMEYER, 2014).

Sua distribuição geográfica é sobreposta à do *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico da doença de Chagas, com o qual compartilha reservatórios e vetores (Figura 2). As implicações epidemiológicas da coexistência destes dois parasitos estão na ocorrência de infecções únicas ou mistas, tanto nos hospedeiros insetos como nos mamíferos (D'ALESSANDRO; DEL PRADO, 1977; GRISARD; STEINDEL, 2005; GRISARD et al., 1999).



**Figura 2. Distribuição geográfica do *T. cruzi* (doença de Chagas) e pontos de ocorrência do *T. rangeli*.** Mapa das Américas Central e do Sul, mostrando a sobreposição geográfica da doença de Chagas humana (sombreado) e dos registros de ocorrência comprovada do *T. rangeli* em humanos, triatomíneos ou animais silvestres (•). Fonte: GRISARD; STEINDEL, 2005.

O *T. rangeli* não apresenta especificidade de hospedeiros mamíferos, sendo encontrado em uma extensa variedade de reservatórios mamíferos, correspondentes as Ordens Edentata, Marsupialia, Carnivora, Rodentia e Primata (D'ALESSANDRO, SARAIVA, 1999). Experimentalmente, diferentes espécies que incluem ratos, camundongos, hamsters, coelhos, cães, morcegos e primatas foram infectadas com *T. rangeli*, comprovando sua possível amplitude de hospedeiros (GUHL, VALLEJO, 2003).

Em relação ao hospedeiro invertebrado, o gênero *Rhodnius* é particularmente susceptível à infecção pelo *T. rangeli*, embora *Panstrongylus megistus*, e espécies do gênero *Triatoma* também tenham sido descritos como susceptíveis à infecção experimental



por *T. rangeli* (DE STEFANI MARQUEZ et al., 2006). As espécies do gênero *Rhodnius* encontradas naturalmente infectadas pelo *T. rangeli* revelam diferentes níveis de susceptibilidade, dependendo da espécie do triatomíneo e da cepa do parasito, sendo observada uma maior relação de susceptibilidade entre a(s) espécie(s) de triatomíneo(s) local com as cepas do parasito que circulam em uma mesma região geográfica (GUHL, VALLEJO, 2003).

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

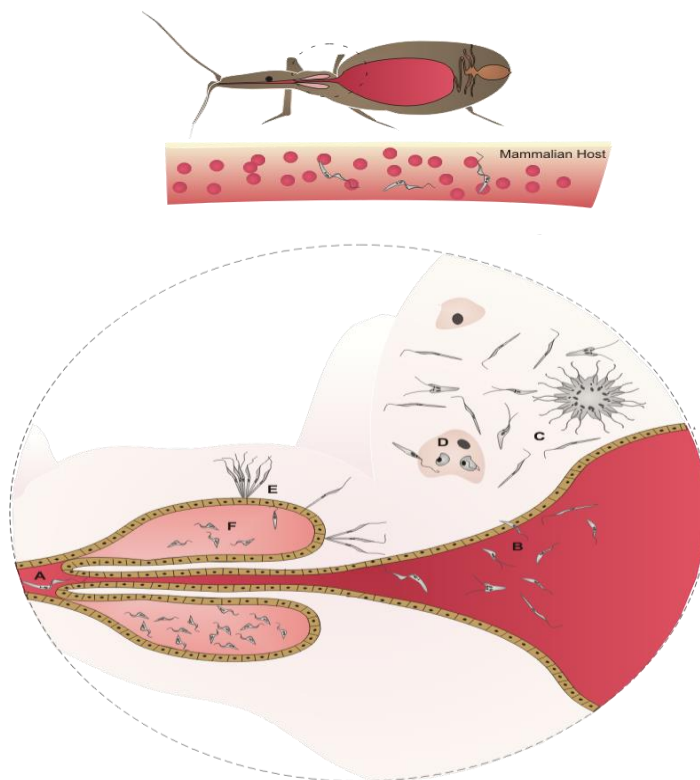
Há uma grande variabilidade intraespecífica descrita para o *T. rangeli*, entretanto, de maneira geral as cepas deste parasito são divididas em duas grandes linhagens genéticas denominadas KP1(+) e KP1(-). Esta classificação foi proposta com base na presença ou ausência de um dos três tipos de minicírculos presentes no DNA do cinetoplasto (kDNA) deste parasito (KP1, KP2 e KP3). Estes minicírculos consistem em arranjos circulares concatenados de DNA constituinte no cinetoplasto, região terminal da única mitocôndria encontrada nos parasitos da Ordem Kinetoplastida (GUHL; VALLEJO, 2003).

Mesmo sendo muito semelhante ao *T. cruzi* em aspectos epidemiológicos, filogenéticos e morfológicos, o *T. rangeli* não é considerado patogênico para seus hospedeiros mamíferos. Ele é descrito como patogênico somente ao hospedeiro invertebrado, onde a intensa multiplicação de epimastigotas na hemolinfa e os eventos relacionados a sobreposição de barreiras celulares podem exercer uma ação prejudicial para o inseto vetor, que caracteriza-se pela destruição dos hemócitos, dificuldade de muda e desenvolvimento das ninfas, podendo eventualmente ocasionar a morte (VALLEJO; GUHL; SCHAUB, 2009).

Nos hospedeiros mamíferos, a infecção pelo *T. rangeli* é capaz de induzir uma resposta imune humoral com elevados títulos de anticorpos, os quais possuem uma elevada reatividade cruzada com o *T. cruzi*, uma vez que suas formas epimastigotas

compartilham cerca de 60 % da sua constituição antigênica solúvel (AFCHAIN et al., 1979). Este fato pode levar a diagnósticos falso-positivos da doença de Chagas, especialmente em sua fase crônica. Desta forma, o *T. rangeli* é de considerável interesse médico e de extrema importância em estudos epidemiológicos da doença de Chagas (AFCHAIN et al., 1979; GRISARD; CAMPBELL; ROMANHA, 1999; SCHOTTELIUS, 1987). Embora diferentes técnicas laboratoriais sejam empregadas atualmente para o diagnóstico da doença de Chagas, incluindo métodos parasitológicos diretos e/ou indiretos, somente poucos métodos ou técnicas especializadas podem indubitavelmente diferenciar *T. cruzi* de *T. rangeli*, não estando estas disponíveis para o diagnóstico de rotina (GRISARD; CAMPBELL; ROMANHA, 1999; GRISARD et al., 1999; STEINDEL et al., 1994; SUAREZ; CUERVO; PUERTA, 2007).

O ciclo de vida do *T. rangeli* é complexo, envolvendo distintas fases com expressivas diferenças morfológicas e funcionais entre elas (Figura 3). O triatomíneo se infecta com o parasito durante a hematofagia em seus hospedeiros mamíferos através da ingestão de formas tripomastigotas sanguíneas. Estas formas diferenciam-se em epimastigotas e iniciam sua multiplicação, colonizando o trato intestinal do inseto. Após alguns dias de infecção, as formas epimastigotas aderem-se ao epitélio do intestino médio e o atravessam, chegando à hemocele. Na hemolinfa, os epimastigotas mais uma vez multiplicam-se e migram para a glândula salivar do inseto. Ao invadirem a glândula salivar, diferenciam-se em formas tripomastigotas metacíclicas, as formas infectantes para os mamíferos, sendo inoculadas quando realizada a hematofagia (GRISARD; STEINDEL, 2005).



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

O ciclo biológico do *T. rangeli* é pouco conhecido a partir do momento em que o parasito alcança a circulação sanguínea do hospedeiro mamífero. A existência de multiplicação intracelular do parasito neste hospedeiro ainda é controversa (HERBIG-SANDREUTER, 1955). Existem relatos de que a multiplicação no hospedeiro mamífero do *T. rangeli* esteja relacionada às características das cepas utilizadas, entretanto, muitos pesquisadores têm procurado, ainda que sem êxito, por formas deste parasito em tecidos de animais experimentalmente infectados (GUHL; VALLEJO, 2003). Independentemente da espécie do hospedeiro mamífero infectado, o *T. rangeli* apresenta parasitemias normalmente baixas (sub-patentes) e de curta duração (D'ALESSANDRO; SARAIVIA, 1999). A taxa de infectividade de diferentes cepas deste parasito frente a diferentes linhagens celulares é geralmente muito baixa e os parasitos tendem a desaparecer ao longo do tempo de interação, sugerindo a ausência de multiplicação intracelular (EGER-MANGRICH et al., 2001).

Aliado à este desconhecimento acerca da multiplicação do parasito em seus hospedeiros mamíferos, o *T. rangeli* possui uma menor capacidade de resposta a estresse oxidativo se comparado ao *T. cruzi* (STOCO et al., 2014), não possuindo alguns componentes de importantes vias de biossíntese relacionadas à esta resposta, como por exemplo, a cisteína sintase (ROMERO et al., 2014).

Possuindo um genoma menor (24Mb) e menos complexo que o *T. cruzi* (STOCO et al., 2014), uma forma mais eficiente de transmissão a seus hospedeiros mamíferos (via inoculativa) (D'ALESSANDRO; SARAIVIA, 1999) e, conseqüentemente, um ciclo mais complexo em seus hospedeiros invertebrados, o *T. rangeli* possui um metabolismo energético adaptado que permite ao parasito alternar suas formas e evoluir em ambos os hospedeiros.

Dentre as proteínas envolvidas no metabolismo do *T. rangeli*, está a arginina quinase (AK), enzima que possui atividade de fosfotransferase e cataliza a interconversão entre a fosfoarginina e arginina, sendo essencial para diferentes processos celulares em tripanosomatídeos, como por exemplo infecção, multiplicação celular e diferenciação celular (PEREIRA et al., 2000).

## 1.2 A proteína arginina quinase

A arginina quinase (AK) pertence a uma família de proteínas conservadas com atividade de fosfotransferase, as guanidino quinases, sendo a creatina quinase o membro mais bem conhecido (ALONSO et al., 2001). É uma fosfotransferase que catalisa a interconversão entre a fosfoarginina e ATP (PEREIRA et al., 2000).

Fosfoarginina e fosfocreatina, geralmente denominadas de fosfogênes, desempenham um papel de extrema importância como reserva de energia, pois o fosfato de alta energia pode ser transferido para adenosina difosfato (ADP) quando a renovação da adenosina trifosfato (ATP) se faz necessária (PEREIRA et al., 2011).

O sistema de manutenção de ATP baseado em fosfogênes mantém a homeostase de ATP durante a alta e flutuante demanda de energia celular. A fosfoarginina é a principal reserva de compostos de fosfato de alta energia em uma grande variedade de invertebrados, enquanto em vertebrados foi encontrada somente a fosfocreatina (MIRANDA et al., 2009). Tem sido proposto que a fosfoarginina suporta momentos de intensa atividade celular, como a multiplicação celular, até mesmo de eventos catabólicos, tais como a glicólise, glicogenólise e a fosforilação oxidativa (ALONSO et al., 2001).

A síntese de fosfoarginina também permite que as células operem com níveis de ATP abaixo do normal, uma vez que podem constituir um conjunto utilizável de fosfato de alta energia. Fosfogênes agem como reservatórios de fosfato de alta energia que é devolvido ao meio em grande parte pelo consumo metabólico do ATP (PEREIRA et al., 2011).

O *Trypanosoma cruzi* possui apenas uma cópia genômica da AK, sendo a proteína expressa durante todos os estágios do ciclo de vida do parasito (MIRANDA et al., 2009). A proteína correspondente possui 357 aminoácidos e um peso molecular calculado em 40 kDa (PEREIRA et al., 2003). Esta enzima apresenta homologia aminoacídica comparada com aquelas presentes em crustáceos e insetos, sendo que a origem evolucionária desta sequência está em discussão. Especula-se inclusive que eventos de transferência genética horizontal entre

artrópodes e tripanosomatídeos possam ter ocorrido (PEREIRA et al., 2000).

Múltiplas evidências indicam que a expressão da AK de *T. cruzi* é altamente regulada por condições intra e extracelulares, sendo: (1) a proteína AK e a atividade específica associada aumentam continuamente ao longo da curva de crescimento de epimastigotas, sugerindo uma correlação entre a atividade enzimática e a disponibilidade de nutrientes ou densidade parasitária; (2) a existência de uma relação entre a taxa de transporte de arginina, a atividade da AK, a forma do parasita e a capacidade de replicação foi recentemente descrita, indicando o papel crítico desta enzima como um regulador das reservas energéticas e crescimento celular; (3) a super-expressão da AK em *T. cruzi* melhora a capacidade de crescimento e aumenta a resistência a condições de estresse nutricional, oxidativo e de pH das células transfectadas (PEREIRA et al., 2011). Neste sentido, a AK foi proposta como uma reguladora de reservas energéticas sob condições de estresse do parasito induzida por indisponibilidade de nutrientes (PEREIRA et al., 2002).

Além da importância metabólica da AK para o *T. cruzi*, a enzima constitui-se em um alvo terapêutico de interesse para a doença de Chagas e outras doenças parasitárias causadas por organismos relacionados uma vez que esta quinase não está presente nas células dos mamíferos (PEREIRA et al., 2000).

Em *Trypanosoma brucei*, análises de genômica comparativa identificaram três genes que codificam para diferentes AK. As sequências das TbAK1, 2 e 3 são praticamente idênticas, sendo diferenciadas apenas por pequenas sequências nas extremidades N- e C-terminal para a TbAK1 e C-terminal para a TbAK2. A TbAK1 se localiza no flagelo, enquanto a TbAK2 é ligada a glicossomos e a TbAK3 é citosólica (VONCKEN et al., 2013). A TbAK1 possui 404 aminoácidos e um peso molecular de cerca de 45 kDa, a TbAK2 370 aminoácidos com 40kDa e a TbAK3 possui 356 aminoácidos também com 40kDa (OOI et al., 2015).

Segundo Voncken e colaboradores (2013), a superexpressão de cada uma das isoformas separadamente resulta em um aumento da atividade total da AK, sustentando a ideia de que todas as isoformas possuem a atividade de quinase. Análises de *Northern Blot* demonstram uma regulação positiva da AK citoplasmática

(1,5 vezes) e na AK flagelar (2,5 vezes) na forma procíclica, o que sugere um papel importante destas proteínas nesta fase do ciclo do *T. brucei*.

Para o *T. rangeli*, as primeiras evidências da presença da AK foram descritas por Pontes e colaboradores (2014), onde foi visto que a *TrAK* possui 403 aminoácidos e um peso molecular de cerca de 45 kDa. A *TrAK* detectada em *T. rangeli* é expressa tanto por formas epimastigotas de cultura como em formas tripomastigotas diferenciadas *in vitro*. A análise da sequência aminoacídica deduzida da *TrAK* revelou a presença de domínios de ligação de ADP, domínios de ligação da arginina e o *loop* de ligação do substrato que são característicos das argininas quinases. Resultados preliminares de análise por imunofluorescência indireta apontam que a *TrAK* está distribuída pela membrana de todo o corpo celular, porém com marcação mais evidente no flagelo nas formas epimastigotas de *T. rangeli* e na membrana flagelar nas formas tripomastigotas. Estes resultados sugerem que a AK de *T. rangeli* possa atuar no mecanismo de sobrevivência do parasito tanto no hospedeiro mamífero quanto no hospedeiro invertebrado, tendo apontando a necessidade de desenvolvimento de estudos funcionais da AK e de sua forma de atuação no metabolismo do parasito.

Uma vez que para outras espécies de tripanosomatídeos onde a AK foi estudada já foi demonstrada a modulação da expressão e atividade da enzima e, considerando os resultados prévios do grupo, nossa hipótese de trabalho é que a AK sofre modulação de expressão ao longo do ciclo de vida do *T. rangeli*, sendo esta maior no hospedeiro invertebrado, onde o parasito se encontra mais susceptível a estresse nutricional, oxidativo e/ou nitrosativo. Sendo assim, neste trabalho foram avaliadas as variações da expressão e atividade da AK de *T. rangeli* em várias fases do seu ciclo evolutivo.





## 2 OBJETIVO GERAL

Avaliar as variações dos níveis de expressão e da atividade da arginina quinase de *Trypanosoma rangeli* (*TrAK*) durante o ciclo de vida do parasito.

### 2.1 Objetivos Específicos

- Determinar o número de cópias do gene da AK no genoma de *T. rangeli*;
- Avaliar os níveis de expressão e a atividade da *TrAK* durante curva de crescimento de epimastigotas e durante a diferenciação celular *in vitro*;
- Avaliar os níveis de expressão e a atividade da *TrAK* durante a diferenciação de tripomastigotas sanguíneos em epimastigotas;
- Avaliar a citolocalização e a atividade sítio-específica da *TrAK* no *T. rangeli*;
- Avaliar a presença e o nível de expressão da *TrAK* no *T. rangeli* durante a infecção da hemolinfa de *Rhodnius prolixus*.



### 3 METODOLOGIA

#### 3.1 Parasitos

##### 3.1.1 Cultivo *in vitro* das formas epimastigotas

Neste estudo foi utilizada a cepa Choachí de *T. rangeli*, originalmente isolada de *R. prolixus* naturalmente infectado capturado na Colômbia (SCHOTTELIUS, 1987). As formas epimastigotas foram mantidas em meio LIT (*Liver Infusion Tryptose*) suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF, Gibco), 50 U/ml de penicilina e 50 µg/ml de estreptomicina (Cultilab) a 27,5°C através de passagens semanais. Os parasitos foram previamente submetidos à passagem em triatomíneos e camundongos a fim de manter suas características biológicas originalmente descritas.

Foram também utilizadas como controle nos experimentos formas epimastigotas da cepa SC 58 de *T. rangeli*, originalmente isolada de *Echimyis dasythrix* naturalmente infectado capturado em Florianópolis, SC, Brasil (STEINDEL et al., 1991) e das cepas Y e Colombiana de *T. cruzi*, sendo igualmente cultivadas em meio LIT suplementado com 10 % de SBF a 27,5°C através de passagens semanais. Para a utilização como controles, as passagens semanais de todas as cepas foram sincronizadas, de forma que todas as culturas se encontravam no mesmo momento da curva de crescimento quando os experimentos foram realizados.

Todas as cepas utilizadas encontram-se depositadas no criobanco do Laboratório de Protozoologia (MIP/CCB/UFSC).

##### 3.1.2 Curva de crescimento

Em quatro experimentos independentes, epimastigotas em fase exponencial de crescimento ( $4-5 \times 10^6$  parasitos/ml) foram separados em 18 tubos contendo 4 ml de meio LIT e cultivados a 27,5 °C. Para obter a curva de crescimento da cepa Choachí de *T. rangeli* nestas condições de cultivo, dois tubos contendo os parasitos foram usados para contagem em câmara de Neubauer em intervalos de 24 horas, durante nove dias consecutivos.

Amostras de 8 ml de cada tempo foram centrifugadas a 3.000 x g sendo os parasitos lavados duas vezes com PBS (tampão salina fosfato pH 7,4), sendo então separados em duas alíquotas para posterior extração de proteínas solúveis. Uma alíquota teve as proteínas extraídas através da adição de Tris-HCl 1 M pH 7,5 e dois ciclos de congelamento em nitrogênio líquido e descongelamento a temperatura ambiente (TA). A outra alíquota foi adicionada de tampão de lise (50 mM NaCl; 200 mM Tris-HCl pH 8,0; 1% Triton X-100) a 95°C e, após a homogeneização, a amostra foi centrifugada a 12.500 x g por 20 minutos a 4°C, a partir do qual foi retirado o sobrenadante.

A concentração dos extratos proteicos solúveis obtidos foi avaliada através de microdosagem pelo método de Bradford, utilizando como padrão Albumina de Soro Bovino (BSA) (BRADFORD, 1976) utilizando-se o equipamento *Infinite M200* (TECAN) para leitura das amostras. Um total de 50 µg de cada amostra foram utilizados para o ensaio de *Western Blot* e 10 µg para o ensaio de atividade enzimática.

### **3.1.3 Diferenciação *in vitro* para obtenção das formas tripomastigotas de *T. rangeli***

As formas tripomastigotas foram obtidas a partir das formas epimastigotas de *T. rangeli* utilizando o protocolo descrito por Koerich et al. (2002) com algumas modificações. Inicialmente, 12x10<sup>7</sup> epimastigotas em fase exponencial de crescimento em meio LIT foram centrifugados por 10 minutos a 3.000 x g e lavados duas vezes com PBS (pH 7,4). Em seguida, foram adicionados 15 ml de meio DMEM (do inglês *Dulbecco's Modified Eagle Medium*, Himedia), pH 8,0 contendo 5% de SBF e 2 mM de L-glutamina (Sigma) e mantidos a 27,5°C em garrafas de cultura celular de 25 cm<sup>2</sup> sem filtro (Kasvi). O processo de diferenciação foi acompanhado através da observação e contagem diárias de formas tripomastigotas em esfregaços corados pelo método de Giemsa (Merck) ao microscópio óptico. Os parasitos foram recolhidos nos dias 2, 4, 6 e 8 do período de diferenciação e processados para a extração de proteínas solúveis conforme detalhado no item 3.1.2.

### 3.1.4 Obtenção de tripomastigotas sanguíneos

Tripomastigotas da cepa Choachí de *T. rangeli* diferenciados *in vitro* foram coletados por centrifugação (4.000 x g por 10 minutos) e suspensos em PBS (pH 7,4) para a concentração de aproximadamente  $6 \times 10^7$  parasitos. Três camundongos BALB/c foram inoculados por via intraperitoneal com 200  $\mu$ l dessa suspensão. A determinação da parasitemia foi realizada no segundo e terceiro dia após a infecção, através do Método de Brener (BRENER, 1962), onde retira-se 5  $\mu$ l de sangue da veia caudal sobre lâmina, sendo então coberto com lamínula 22 x 22 mm. Foram contados 50 campos por lamínula. Após a determinação do pico de parasitemia no terceiro dia pós-infecção, os camundongos foram anestesiados com Xilazina 10 a 15 mg/Kg + 100 a 150 mg/Kg Quetamina (Cetamina 10%/ Cloridrato de Xilazina 2%) e cerca de 1 ml de sangue foi coletado através de punção cardíaca em tubo contendo 100  $\mu$ l de citrato de sódio 3,48 %. O sangue coletado foi então dividido em duas alíquotas, sendo: 1 ml ( $2,5 \times 10^6$  parasitos) para a purificação de tripomastigotas e os outros 2 ml foram divididos em 12 alíquotas de 200  $\mu$ l de sangue contendo cerca de  $4,2 \times 10^6$  parasitos, sendo cada tubo adicionado de 2,8 ml de meio LIT para a utilização no item 3.1.5.

Para a purificação de tripomastigotas foi adicionado tampão de lise de hemácias (37 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 300  $\mu$ M EDTA, 2,5 mM  $\text{NaHCO}_3$ ) ao sangue coletado dos animais infectados na proporção 1:2, sendo mantido em agitação branda a TA por 20 minutos. Após isto, as amostras foram centrifugadas em baixa rotação (300 x g) por 5 minutos para a separação das células sanguíneas. O sobrenadante foi separado em um novo tubo. Para a coleta dos parasitos, as amostras foram centrifugadas (4000 x g) por 10 minutos e estes foram lavados com PBS (pH 7,4). A amostra foi dividida em dois tubos: um para análise através de ensaio de atividade enzimática e o outro por *Western Blot*. Ambos os procedimentos foram realizados conforme descrito no item 3.1.2.

Os procedimentos de obtenção de tripomastigotas sanguíneos foram realizados na observância dos preceitos estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação animal – COBEA, tendo sido previamente aprovados pela Comissão de Ética em Uso de Animais da UFSC (CEUA/UFSC) (Processo

CEUA: 23080.025618/2009-81).

### 3.1.5 Curva de crescimento após hemocultura

Os 12 tubos de hemocultura obtidos conforme o descrito em 3.1.4 foram mantidos por cerca de 16 horas a 27,5 °C até a total sedimentação das hemácias, sendo então retirado o sobrenadante para um novo tubo, o qual continha, portanto, as formas tripomastigotas sanguíneas do *T. rangeli*.

O número de parasitos em cada tubo foi determinado diariamente conforme o descrito em 3.1.2 visando a elaboração da curva de crescimento, sendo que a cada dia um dos tubos (3 ml) foi utilizado para preparação de extrato protéico para as análises de atividade enzimática e *Western Blot*, sendo processados segundo o item 3.1.2.

### 3.1.6 Obtenção dos extratos de epimastigotas de hemolinfa de *Rhodnius prolixus*

Os exemplares de *R. prolixus* utilizados neste estudo foram obtidos e mantidos no insetário do Laboratório de Protozoologia da UFSC. Os insetos foram alimentados semanalmente em camundongos de acordo com as normas aprovadas pela Comissão de Ética no uso de Animais (CEUA) da UFSC. Os triatomíneos foram mantidos a 26°C, com umidade controlada (65%) e ciclo natural de iluminação.

Cerca de 30 ninfas de 4º e 5º estádios de *R. prolixus* foram infectadas por inoculação intracelômica com formas epimastigotas de cultura de *T. rangeli*. Os triatomíneos foram inoculados com cerca de 10 µl de uma suspensão contendo uma concentração aproximada de  $1 \times 10^6$  parasitos/ml. Estes insetos foram mantidos em condições controladas de temperatura ( $27 \pm 2^\circ\text{C}$ ) e umidade relativa do ar ( $60 \pm 10\%$ ). A avaliação da infecção destes triatomíneos foi realizada semanalmente através da busca direta de parasitos na hemolinfa obtida através da secção de uma das patas do inseto. Quando positivos, a hemolinfa dos insetos foi obtida por gotejamento em microtubos de 1,5 ml e as amostras submetidas à extração de proteínas conforme o descrito em 3.1.2. O extrato protéico solúvel obtido foi então utilizado em ensaios de *Western*

*Blot* para verificar o nível de expressão da *TrAK* no *T. rangeli* durante a infecção da hemolinfa de *Rhodnius prolixus*. Um grupo de ninfas não infectadas foi utilizado como controle em todos os experimentos

### **3.1.7 Purificação de citoesqueleto e flagelo**

A purificação de citoesqueleto e flagelo foi realizada segundo Woods e colaboradores (1989). Para tal, cerca de  $2 \times 10^8$  epimastigotas da cepa Choachí de *T. rangeli* foram coletados por centrifugação ( $3.000 \times g$  por 10 minutos a TA) e lavados duas vezes com PBS (pH 7,4). Os parasitos foram então adicionados de solução de lise (2 mM EDTA, 1 mM  $MgSO_4$ , 0,5% NP-40 em PBS pH 7,4) e mantidos nesta solução durante 15 minutos a TA em agitação leve. Os flagelos e os citoesqueletos foram então coletados através de centrifugação a  $4.000 \times g$  por 10 minutos em TA. O sobrenadante foi separado e os citoesqueletos e flagelos foram adicionados de 1 ml de PBS (pH 7,4). Ambas as amostras foram utilizadas para o ensaio de atividade enzimática e de *Western Blot*.

## **3.2 Determinação do número de cópias do gene da Arginina Quinase no genoma do *T. rangeli* através de *Southern Blot***

### **3.2.1 Extração de DNA genômico**

Para a extração do DNA, formas epimastigotas da cepa Choachí de *T. rangeli* em fase exponencial de crescimento foram centrifugadas a  $3.000 \times g$  e lavadas duas vezes com PBS (pH 7,2). Em seguida, os parasitos foram incubados por 12 horas a  $37^\circ C$  em tampão de lise (100 mM Tris-HCl pH 7,4, 10 mM NaCl, 25 mM EDTA pH 8,0, 1 % SDS) acrescido de Proteinase K (100  $\mu g/ml$ ), utilizando cerca de quatro vezes o volume do sedimento obtido. As etapas subsequentes foram realizadas através do método de fenol-clorofórmio, de acordo com protocolo padrão (SAMBROOK, RUSSELL, 2001).

As amostras de DNA obtidas foram dosadas e avaliadas quanto a sua pureza através de espectrofotometria em equipamento BioPhotometer® (Eppendorf), observando-se a absorbância a 260

e a 280 nm, além das relações 260/280 nm e 260/230 nm. As amostras extraídas foram também resolvidas em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio, sendo os resultados registrados digitalmente.

### 3.2.2 Southern Blot

O DNA genômico de *T. rangeli* (20 µg) foi digerido por completo com diferentes enzimas de restrição (*Bam*HI, *Sac*II, *Sal*I e *Eco*RI) em reações contendo 60 unidades de cada enzima e seus tampões próprios em volume final de 15 µl. As reações foram mantidas a 37°C por três horas e os fragmentos resultantes resolvidos em eletroforese em gel de agarose 0,8% em tampão TBE (890 mM Tris, 890 mM Ácido Bórico, 20 mM EDTA) a 5 Volts/cm. O gel foi corado com brometo de etídeo e os resultados digitalmente registrados.

Na sequência, o gel foi imerso em uma solução de depurinação (250 mM HCl) por 12 minutos, lavado em água ultrapura estéril e em seguida colocado em uma solução de desnaturação (1,5 M NaCl, 0,5 M NaOH) por 25 minutos. O gel foi lavado novamente com água ultrapura estéril e imerso em uma solução de neutralização (1,5 M NaCl, 0,5 M Tris pH 7,5) sob agitação por 30 minutos, sendo este procedimento repetido com troca da solução de neutralização por mais 15 minutos. A transferência do DNA para a membrana de Nylon (Sigma) foi realizada através de capilaridade de acordo com protocolos padrão (SOUTHERN, 1975).

Após a transferência, a membrana foi fixada através de luz ultravioleta (Energia 1.200 J) em um aparato *UV Cross Linker*<sup>®</sup> (GE Healthcare) e mantida durante uma hora a 42°C em tampão de hibridização (0,5 M NaCl, 5% agente bloqueador diluído em *ECL Gold Hybridization Buffer*<sup>®</sup>) (GE Healthcare). A sonda correspondente ao gene da AK foi obtida através de amplificação por PCR a partir de DNA genômico, sendo então os produtos de amplificação marcados pelo kit *ECL Direct Nucleic Acid Labelling and Detection System*<sup>®</sup> (GE Healthcare) conforme especificações do fabricante.

Esta sonda foi adicionada à membrana, permanecendo 16 horas sob agitação suave a 42°C, sendo então a membrana lavada



três vezes com o tampão de lavagem primário (SSC 0,5X, 0,4% SDS, 6 M Uréia) por 15 minutos a 42°C e duas vezes com o tampão de lavagem secundário (SSC 2X) por 5 minutos. Em seguida, a detecção foi realizada através da adição do reagente ECL sobre a membrana durante um minuto seguido de exposição a um filme radiográfico para a detecção de quimioluminescência, sendo o filme revelado em um processador de filmes SRX-101A (Konica Minolta Medical & Graphic, INC – China).

### 3.2.3 Análises *in silico* do gene da Arginina Quinase

A busca pelas sequências do gene da AK no genoma do *T. rangeli* foi realizada através do algoritmo *BLAST* (<http://150.162.1.35/blast/blast.html>) (ALTSCHUL et al., 1997).

As sequências encontradas para as cepas Choachí e SC58 foram comparadas entre si e com sequências ortólogas. As sequências foram selecionadas por possuírem alta similaridade com as sequências de *T. rangeli*. As sequências utilizadas foram: *T. cruzi marinkellei* (EKF30369.1), *T. cruzi* CL Brener (EKG01912.1), *T. vivax* (CCC50409.1), *T. grayi* (XP009309127.1), *T. brucei gambiense* (XP011776523.1), *T. cruzi* Dm28 (ESS68123.1), *T. brucei brucei* (Tb927.9.6230, Tb927.9.6170, Tb927.9.6290).

As análises foram realizadas através do alinhamento no programa *Clustal Omega* (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) e pelos métodos *de Bootstrapped Minimal Evolution* e *Neighbour-joining* utilizando o programa MEGA<sup>®</sup>, versão 6 (<http://www.megasoftware.net>), com sequências obtidas através do algoritmo *BLAST* do GenBank (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) ou do Trytrip DB (<http://tritrypdb.org/tritrypdb/>). A análise dos domínios conservados foi realizada através do Software Conserved Domains (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi?>).

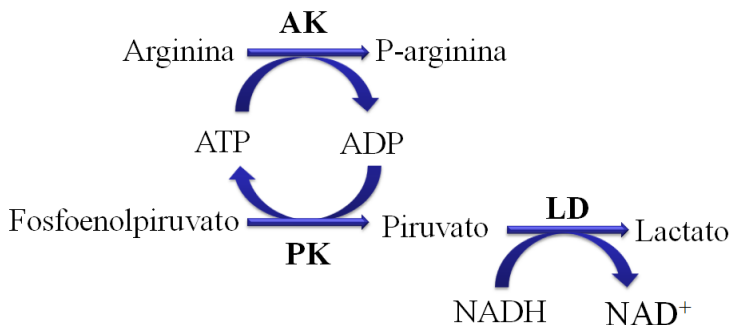
### 3.3 Ensaio de Atividade Enzimática da Arginina Quinase

O ensaio de atividade enzimática foi realizado através do método de duas enzimas descrito por Voncken et al. (2013). A atividade da AK foi medida no sentido da geração de fosfoarginina.

O ensaio utilizou um lisado celular total do *T. rangeli* (10 µg proteína), 50 mM Tris-acetato pH 8,6, 5 mM acetato de magnésio, 50 mM acetato de amônia, 0,75 mM fosfoenolpiruvato, 0,45 mM NADH, 0,8 mM ATP e 2 mM arginina. Como controle positivo foi utilizada a proteína recombinante rTrAK (0,2 µg) expressa em células BL21(DE3) Codon plus, durante 6 horas a 27 °C, sendo a proteína obtida da fração solúvel numa concentração de 338 mg/l, e como controle por competição, foi utilizada a proteína recombinante rTrAK (0,2 µg) adicionada de 10 mM de histidina, que compete com a arginina pelo sítio de ligação do substrato da AK. A reação foi mantida a 27°C durante 3 minutos, e a atividade enzimática passou a ser mensurada após a adição de piruvato quinase (1 unidade) e lactato desidrogenase (1 unidade) durante 4 minutos.

O consumo de NADH foi medido utilizando-se um espectrofotômetro *Infinite M200* (TECAN), onde ao utilizar o substrato piruvato a enzima lactato desidrogenase consome NADH, que é acompanhado através de leitura de absorvância a 340 nm. A relação da absorvância medida foi calculada a partir da seguinte relação: para cada mol de NADH consumido, um mol de fosfoarginina foi produzido (Figura 4).

A atividade da AK foi determinada pela taxa de formação de ADP. Uma unidade de atividade da AK é definida como a quantidade de enzima que catalisa a transferência de 1 pmol de fosfato do ATP para L-arginina por minuto, medida durante dois minutos da reação. Então o ADP é convertido novamente em ATP pela piruvato quinase, e o piruvato formado é reduzido a lactato pela lactato desidrogenase. Os cálculos de atividade foram realizados de acordo com Romero e colaboradores (2014).



**Figura 4. Representação esquemática das reações presentes no ensaio de atividade enzimática.** AK- Arginina Quinase; PK- Piruvato Quinase; LD- Lactato Desidrogenase.

### 3.4 Análise da transcrição do gene da AK em diferentes formas do *T. Rangeli*

#### 3.4.1 Extração de RNA total

Amostras referentes à diferenciação celular foram também processadas para a extração de RNA visando a realização da quantificação dos níveis de transcritos através de qPCR. Para isto os parasitos foram coletados (3.000 x g por 10 minutos a TA), lavados duas vezes com PBS pH 7,4, e homogeneizados vigorosamente em 1 ml do reagente Trizol<sup>®</sup> (Invitrogen). As amostras foram armazenadas a -80 °C até a realização da extração de RNA total.

Após o descongelamento, as amostras foram mantidas por cinco minutos a TA antes da extração de RNA total. Em seguida, foram adicionadas de 200 µl de clorofórmio 98 % (Merck), as quais foram agitadas por 15 segundos, mantidas a TA por dois minutos e, então, centrifugadas a 12.000 x g por 15 minutos a 4 °C. A fase aquosa resultante foi transferida para um tubo novo, onde foi acrescida de 500 µl de isopropanol (Merck) e novamente submetida à centrifugação (12.000 x g por 20 minutos a 4 °C). O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com 1 ml de etanol 75 %, gelado, através de centrifugação a 7.500 x g por cinco minutos a 4 °C. Novamente, o sobrenadante foi descartado e o

precipitado contendo o RNA total foi seco, invertendo-se os tubos sobre papel por aproximadamente 10 minutos a TA. O RNA total foi então solubilizado em 20 µl de água ultrapura livre de nucleases.

As amostras obtidas tiveram sua concentração e pureza avaliadas em um espectrofotômetro BioPhotometer (Eppendorf), observando-se as relações de absorvância 260/280 nm e 260/230 nm.

### 3.4.2 Tratamento com DNaseI

A fim de eliminar qualquer DNA contaminante indevidamente purificado durante o processo de extração de RNA que possa interferir nas reações subsequentes, 1 µg de RNA de cada amostra foi submetido a tratamento com DNaseI (Invitrogen), na razão de 1 unidade por µg de RNA extraído. A reação foi realizada durante 15 minutos a TA, na presença de tampão recomendado pelo fabricante. A inativação da enzima ocorreu com a adição de EDTA na concentração final de 2,5 mM e aquecimento a 65 °C por 10 minutos. O RNA foi então armazenado a -80 °C.

### 3.4.3 Reação de Transcrição Reversa (RT-PCR)

A partir das amostras tratadas com DNaseI, foi utilizado 1 µg de RNA nas reações de transcrição reversa. A RT-PCR foi conduzida a 37 °C por 50 minutos na presença de 200 unidades da enzima transcriptase reversa M-MLV (Invitrogen), 200 µM de dNTP (Invitrogen), 10 pmoles do iniciador *OligodT-Anchor* direcionado à cauda poli(A) (5'-GAC CAC GCG TAT CGA TGT CGA CT16 -3'), 10 mM de DTT (Invitrogen) e 40 unidades do inibidor de ribonucleases RNaseOUT™ (Invitrogen), em tampão recomendado pelo fabricante. A inativação da reação ocorreu por 15 minutos a 70 °C. O DNA complementar (cDNA) obtido foi armazenado a -20 °C.

### 3.4.4 Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa em tempo real (qPCR)

Para utilização como molde na qPCR, o cDNA foi diluído cinco vezes em água ultrapura livre de nucleases. As reações ocorreram na presença do reagente *Maxima*<sup>®</sup> *SYBR Green/ROX qPCR Master Mix* (Thermo Scientific), de acordo com as orientações do fabricante, e 0,5 µM dos iniciadores, sendo realizadas em placas de PCR de 96 poços (Axygen), em volume final de 10 µl. As placas cobertas por selante óptico *MicroAmp*<sup>®</sup> *Optical Adhesive Film* (Applied Biosystems) foram analisadas em equipamento ABI Prism<sup>®</sup> 7900HT *Sequence Detection System* (Applied Biosystems) do Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia (LAMEB/UFSC). As reações tiveram início com uma etapa de desnaturação a 95 °C por 10 minutos, seguida por 40 ciclos contendo uma etapa de desnaturação (95 °C por 15 segundos), uma etapa de ligação dos iniciadores e extensão (~60 °C por 1 minuto). Ao final, foi incluída uma etapa para obtenção da curva de dissociação (95 °C por 15 segundos, 60 °C por 15 segundos e, novamente, 95 °C por 15 segundos). Em cada placa foi adicionado um controle negativo para cada par de iniciadores, composto por todos os reagentes necessários à amplificação, à exceção do DNA molde.

A eficiência da qPCR com cada par de iniciadores foi calculada através da diluição seriada 1:2 de amostras de DNA genômico e de misturas de cDNA (cinco pontos). A inclinação da reta obtida a partir da função entre o C<sub>q</sub> (ciclo de quantificação) e cada ponto da diluição foi aplicada à equação:

$$E = 10e^{-1/slope} - 1$$

Nesta equação, *E* representa a eficiência da qPCR e *slope* é o valor de inclinação da reta. O valor de *E* é obtido como fração de uma unidade.

### 3.4.5 Análise dos resultados da qPCR

Os experimentos de qPCR foram realizados em triplicatas biológicas e em triplicatas técnicas, sendo posteriormente analisados pelo software SDS 2.4 (Applied Biosystems). Para avaliar a variação relativa nos níveis de cada transcrito entre as

amostras analisadas, foi utilizado o método da quantificação relativa (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001), comparando o Cq apresentado para o gene da arginina quinase à média dos Cq de três genes de referência (GAPDH, HGPRT e RNA60S), escolhendo-se aqueles com menor variância interna. Os cálculos necessários para obtenção dos valores de abundância relativa foram realizados em planilha do Excel (Microsoft Office), através das seguintes equações:

$$\Delta Cq = Cq (\text{gene alvo}) - Cq (\text{gene de referência})$$

$$QR = 2e^{-\Delta Cq}$$

As análises estatísticas, bem como a confecção dos gráficos foram realizadas no programa Prism 5.0 (GraphPad). Uma vez que os resultados possuíam uma distribuição normal, foi utilizado o teste estatístico Análise de Variância (ANOVA) de uma via, seguida do teste de comparação múltipla Tukey. Valores de  $p$  menores que 0,01 foram considerados como estatisticamente significantes.

### 3.5 Western Blot

Os extratos proteicos referentes às curvas de crescimento, diferenciação celular, bem como o extrato de epimastigotas de hemolinfa e a proteína *TrAK* recombinante (r*TrAK*) foram resolvidos em gel SDS-PAGE (10%) e transferidos para membranas de nitrocelulose *Hybond-ECL* (GE Healthcare) durante três horas a 100 V em tampão de transferência (25 mM Tris, 192 mM Glicina, 20% (vol/vol) Metanol), conforme descrito por Towbin e colaboradores (1979). Posteriormente, a membrana foi bloqueada em tampão para “*blotting*” (150 mM de NaCl; 25 mM Tris-HCl pH 7,4; 1% Tween 20) acrescido com 5% leite desnatado. Após cinco lavagens de cinco minutos cada com o tampão para “*blotting*” a membrana foi incubada durante 90 minutos com o antissoro anti-*TrAK* na diluição de 1:250. Após cinco lavagens de cinco minutos cada com o tampão para “*blotting*”, as membranas foram adicionadas do antissoro secundário anti-IgG de camundongo conjugado à peroxidase (Sigma) na diluição de 1:10.000, permanecendo sob agitação durante 1 hora a TA. As membranas foram novamente submetidas a cinco lavagens de cinco minutos cada com o tampão para

“*blotting*” e reveladas através da utilização do reagente *ECL* (GE Healthcare) em filmes radiográficos como descrito no item 3.2.2.

Como normalizador da quantidade de proteína, foi utilizada a proteína  $\alpha$ -tubulina, sendo esta detectada através da utilização de um anticorpo monoclonal direcionado a  $\alpha$ -tubulina de *T. rangeli*, na diluição de 1:2000, sendo então procedido o protocolo descrito acima.

A comparação dos níveis de expressão foi realizada através de densitometria das bandas obtidas, onde utilizando-se o programa ImageJ (National Institute of Health, EUA), é possível obter o nível de intensidade das bandas. Utilizando então os níveis de expressão da  $\alpha$ -tubulina como normalizador, é possível verificar diferenças de expressão em diferentes tempos e/ou tratamentos, pela razão da intensidade das bandas obtidas para a *TrAK* pela intensidade das bandas obtidas para a  $\alpha$ -tubulina.



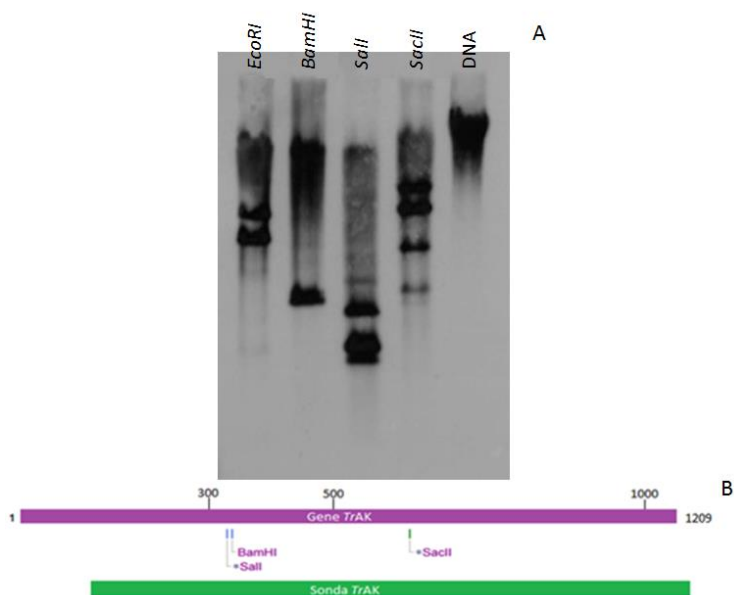


## 4 RESULTADOS

### 4.1 Avaliação do número de cópias do gene da AK no genoma de *T. rangeli*

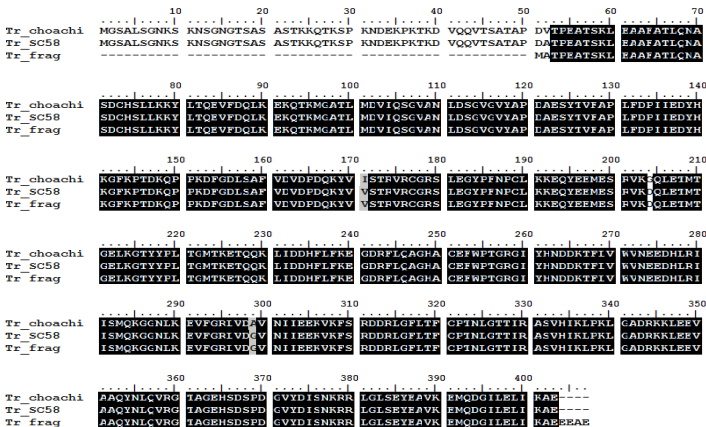
A partir da técnica de hibridização de ácidos nucleicos padronizada por Southern (1975) e o kit *ECL Direct Nucleic Acid Labelling and Detection System*® (GE Healthcare), foi realizada a determinação do número de cópias do gene da AK presentes no genoma do *T. rangeli*.

A análise por *Southern Blot* utilizando-se como sonda parte do gene *TrAK* (Figura 5), revelou um padrão correspondente a duas cópias gênicas. Para o DNA digerido com a enzima *EcoRI*, que não possui o sítio de clivagem dentro da região da sonda foi observada a detecção de duas bandas. Enquanto que, para as digestões com as enzimas *BamHI*, *Sall*, *SacII*, as quais possuem um sítio de clivagem dentro da região da sonda, foram observadas quatro bandas para cada enzima.



**Figura 5.** A) Análise da organização do gene *TrAK* de *Trypanosoma rangeli* por *Southern Blot*. B) Mapa de restrição do gene *TrAK* apontando os sítios de restrição das enzimas utilizadas. A barra roxa representa o quadro aberto de leitura do gene *TrAK* e a barra verde representa a região condizente a sonda *TrAK*.

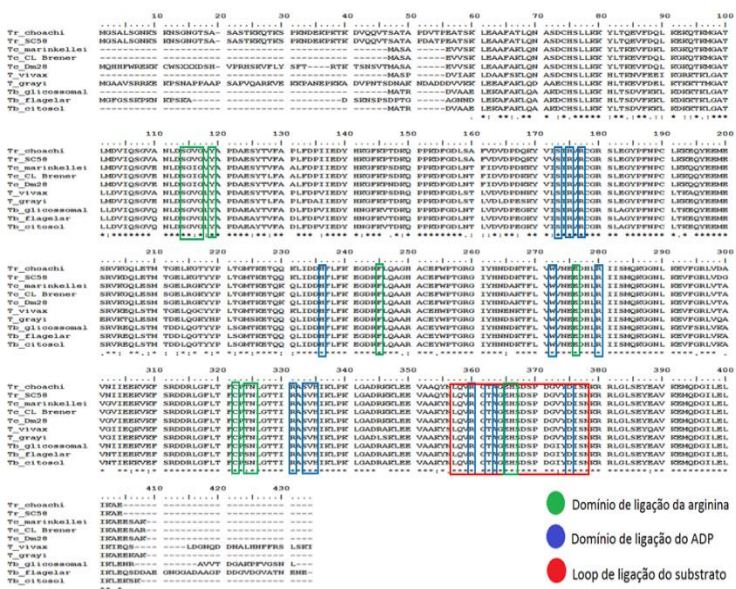
Após a realização do *Southern Blot* foi realizada a busca por sequências gênicas correspondentes a possíveis cópias de AK nos bancos de dados genômicos das cepas Choachí e SC58 de *T. rangeli* ([www.brgene.lncc.br](http://www.brgene.lncc.br) e GenBank), incluindo-se as sequências recém geradas na plataforma Illumina HiSeq em colaboração do laboratório do Dr. Björn Andersson do Karolinska Institutet (Dados não publicados). A partir desta busca, foram encontradas duas sequências preditas de aminoácidos tanto para a cepa Choachí quanto para cepa SC58, condizendo com os resultados obtidos por *Southern blot*. Como as cópias em nível aminoacídico são idênticas, apenas uma cópia de cada cepa foi evidenciada nas análises, as sequências possuem 403 aminoácidos, e um tamanho esperado de 45kDa (Figura 6). Análises das sequências nucleotídicas ainda se fazem necessárias para melhor comparação entre as cepas em relação a outros marcadores biológicos e moleculares, em especial, às linhagens genéticas do parasito.



**Figura 6.** Alinhamento da *TrAK* utilizada com as sequências aminoacídicas da arginina quinase encontradas no genoma de *T. rangeli*.

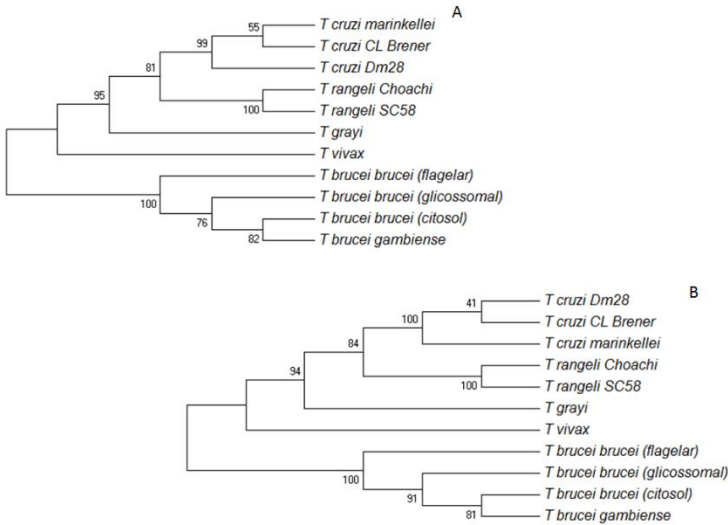
A terceira sequência representa a sequência utilizada para a produção da proteína recombinante. (-) Ausência de aminoácidos na sequência (▪) Aminoácidos idênticos.

As sequências aminoacídicas da AK de ambas as cepas de *T. rangeli* foram alinhadas com as sequências ortólogas de *T. cruzi*, *T. brucei*, *T. brucei gambiense*, *Trypanosoma vivax* e *Trypanosoma grayi* (Figura 7). É possível observar no alinhamento uma maior semelhança entre as sequências de *T. rangeli* com as sequências de *T. cruzi*. A similaridade entre as sequências de *T. rangeli* Choachí e *T. cruzi* Dm28c foi de 90%, entre *T. cruzi* CL Brener e *T. cruzi marinkellei* 92%, entre *T. vivax* 87% e entre *T. brucei gambiense* 85% e *T. brucei brucei* 85%.



**Figura 7.** Alinhamento da TrAK das cepas SC58 e Choachí de *Trypanosoma rangeli* com as sequências ortólogas de *T. cruzi*, *T. brucei*, *T. brucei gambiense*, *T. vivax* e *T. grayi*. (-) Ausência de aminoácidos na sequência (▪) Aminoácidos idênticos.

Uma análise filogenética também foi realizada com as sequências de AK, utilizando os métodos de Máxima parcimônia e Neighbour-Joining (Figura 8).



**Figura 8.** Árvore filogenética das sequências de aminoácidos da arginina quinase de tripanosomatídeos utilizando o método A) Máxima Parcimônia e B) Neighbor-Joining. Os números nos nodos das árvores indicam os valores de *bootstrap* (1.000 replicatas).

Como é possível observar nas árvores obtidas, independentemente do método utilizado as sequências da AK das cepas de *T. rangeli* formam um agrupamento distinto com alto valor de *bootstrap*, o qual está inserido no agrupamento que contém os tripanosomas do continente americano (*T. cruzi*, *T. vivax* e *T. grayi*). Independentemente da espécie ou da localização celular, as sequências de AK de *T. brucei* formam um agrupamento distinto de todas as demais espécies, suportado por alto valor de *bootstrap*. Desta forma, conclui-se que a proteína da AK de *T. rangeli* está filogeneticamente mais próxima das proteínas de *T. cruzi* do que seus ortólogos presentes em *T. brucei*.

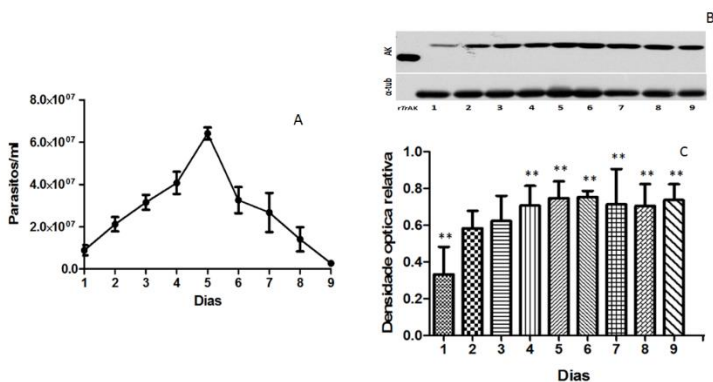
Através da análise dos domínios conservados (Figura 7), é possível observar que a sequência da TrAK possui todos os domínios conservados da superfamília das fosfogeno quinases,

sendo também identificada como uma arginina quinase-like, onde apresenta os domínios de ligação ao ADP e também o domínio de ligação a arginina, assim como o *loop* de ligação ao substrato. Desta forma, a *TrAK* possui todos os domínios necessários para ser funcional.

#### 4.2 Avaliação dos níveis de expressão proteica e a atividade da *TrAK* durante curva de crescimento de epimastigotas e durante a diferenciação celular *in vitro*

O crescimento do *T. rangeli* em meio LIT foi acompanhado durante nove dias, sendo diariamente avaliada a expressão e atividade enzimática da AK conforme o descrito em 3.5 e 3.3 respectivamente. Como pode ser observado na figura 11A, os parasitos apresentaram crescimento exponencial até o 5º dia de cultivo, a partir do qual começaram a morrer, havendo somente poucos parasitos viáveis ao 9º dia de cultivo. Esta curva de crescimento *in vitro* do *T. rangeli* é condizente com estudos prévios do grupo (GRISARD et al., 1999).

Em relação aos níveis de AK, sua expressão aumentou a partir do segundo dia e manteve-se estável nos dias subsequentes, sendo significativamente diferente do 1º dia após o 4º dia (Figura 11B e C).

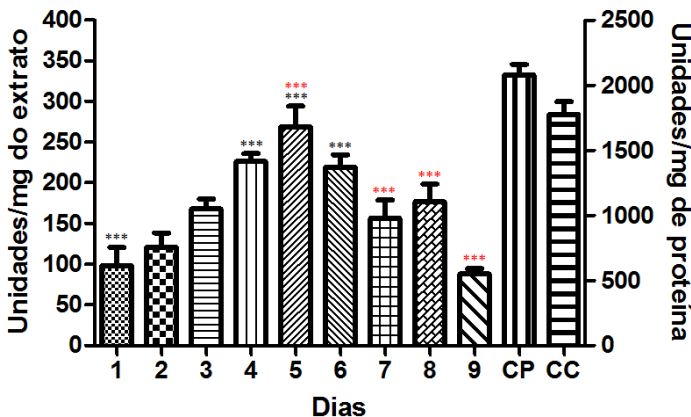


**Figura 9.** Análise da expressão da arginina quinase durante o crescimento *in vitro* de *Trypanosoma rangeli* em meio LIT. A) Número de parasitos

estabelecidos diariamente a partir de contagens das formas epimastigotas; B) Níveis proteicos de AK em extratos proteicos totais de *T. rangeli*; C) Densidade óptica relativa dos níveis de AK, normalizados a partir da expressão de  $\alpha$ -tubulina. \*\*  $p < 0,005$ . \*\* Comparação entre o dia 1 com os dias 4, 5, 6, 7, 8 e 9.

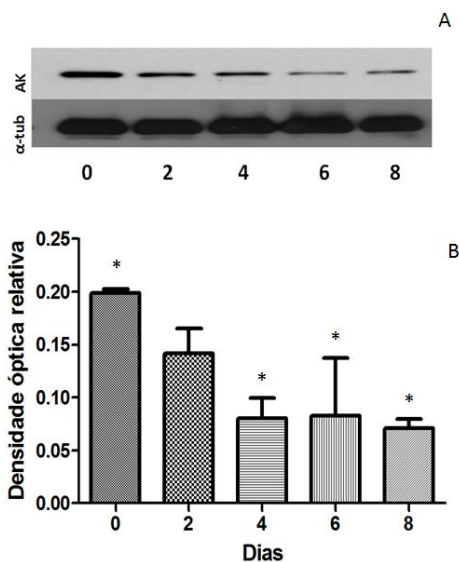
Já a atividade enzimática da AK aumentou progressivamente até o 5º dia de cultivo, coincidindo o pico máximo de atividade enzimática com a maior densidade de parasitos em crescimento exponencial, decaindo gradativamente nos dias subsequentes (Figura 12). A atividade no 5º dia foi cerca de três vezes maior do que no primeiro ou no último dia. Provavelmente a diminuição progressiva da atividade após o 5º dia se dá pelo decaimento do número de parasitos, uma vez que os níveis de atividade também estão relacionados ao número de parasitos.

É possível observar que os controles possuem quase 10 vezes mais atividade de AK do que os extratos proteicos totais dos parasitos. Isto pode ocorrer porque os controles são proteínas purificadas, não havendo outras proteínas que podem interferir na atividade da AK. O controle por competição possui uma atividade menor, porém muito próxima a atividade do controle positivo, isto porque a histidina possui capacidade de diminuir a ligação da arginina, porém não é capaz de inibi-la durante toda a medição da atividade, de forma que ainda haja grande atividade da AK.



**Figura 10.** Análise da atividade da arginina quinase durante o crescimento *in vitro* de *Trypanosoma rangeli* em meio LIT. CP – Controle Positivo; CC – Controle por competição (Adição de 5x > de histidina). \*\*\*  $p < 0,001$ . \*\*\* Comparação entre o dia 1 com os dias 4, 5 e 6; \*\*\* Comparação entre o dia 5 com os dias 7, 8 e 9.

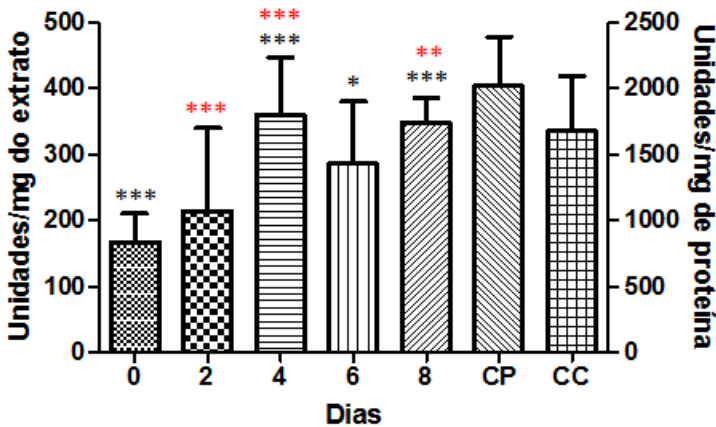
Durante a diferenciação celular *in vitro* de formas epimastigotas para tripomastigotas realizada ao longo de oito dias em meio DMEM a maior expressão da AK foi detectada nas formas epimastigotas (Dia 0), sendo os níveis gradativamente reduzidos até a diferenciação em formas tripomastigotas (Figura 13).



**Figura 11.** Análise da expressão da arginina quinase durante a diferenciação *in vitro* de epimastigotas para tripomastigotas do *Trypanosoma rangeli*. A) Níveis proteicos de AK em extratos proteicos totais de *T. rangeli*; B) Densidade óptica relativa dos níveis de AK, normalizados a partir da expressão de  $\alpha$ -tubulina. \* $p < 0,05$ . \*Comparação entre o dia 0 e os dias 4, 6 e 8.

De forma contrária, a atividade enzimática da AK aumentou até o 4º dia de diferenciação, não tendo sido observada variação significativa nos dias subsequentes. Este momento, portanto,

coincide com os maiores níveis de atividade de AK, ainda que a quantidade da proteína seja menor (Figura 14). Interessantemente, no processo de diferenciação *in vitro* do *T. rangeli*, observa-se parasitos em divisão somente até o 4<sup>o</sup> dia, quando a maior porcentagem dos mesmos já revela alterações morfológicas para formas tripomastigotas.



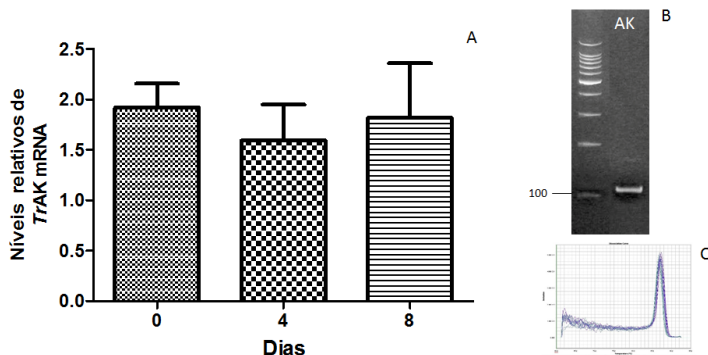
**Figura 12.** Análise da atividade da arginina quinase durante a diferenciação *in vitro* do *Trypanosoma rangeli* de formas epimastigotas para formas tripomastigotas do. A) Atividade enzimática de AK; CP – Controle Positivo; CC – Controle por competição (Adição de excesso de 5x de histidina). \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*  $p < 0,05$ . \*\*\* Comparação entre o dia 0 com os dias 4,6 e 8; \*\*\* Comparação entre o dia 2 com os dias 4 e 8.

Uma vez que observamos diferenças nos níveis proteicos da AK ao longo da diferenciação, buscamos avaliar se a regulação da expressão já poderia estar sendo realizada em nível transcricional. Para tal, os níveis relativos de mRNA da *TrAK* foram avaliados através de qPCR. Iniciadores dirigidos para *TrAK* foram desenhados e apresentaram-se específicos e com uma eficiência de 104%, eficiência esta muito próxima a dos iniciadores utilizados na amplificação dos genes normalizadores o que permite a utilização do método descrito por Livak e Schmittgen (2001).

Como pode ser observado na figura 13, após a normalização com a média geométrica de três genes normalizadores não houve diferença entre os níveis de mRNA de AK nos parasitos ao longo



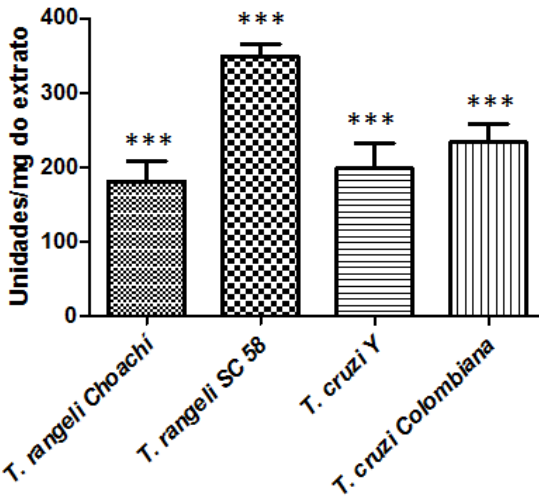
do processo de diferenciação celular *in vitro*, sugerindo, portanto, uma regulação pós-transcricional da expressão da AK pelo *T. rangeli*.



**Figura 13.** Análise dos níveis relativos de mRNA de *TrAK* durante a diferenciação *in vitro* de *Trypanosoma rangeli*. A) Níveis relativos de mRNA de AK em epimastigotas (0), formas intermediárias (4) e tripomastigotas (8); Os valores de Cq obtidos para cada amostra foram normalizados pela média geométrica dos Cqs dos genes de referência. B) Avaliação da especificidade dos iniciadores em gel de poliacrilamida 10% revelando o produto da amplificação após coloração em brometo de etídeo; C) Curva de dissociação da qPCR.

### 4.3 Avaliação dos níveis de expressão e a atividade da *TrAK* em cepas das linhagens genéticas KP1+ e KP1- de *T. rangeli*

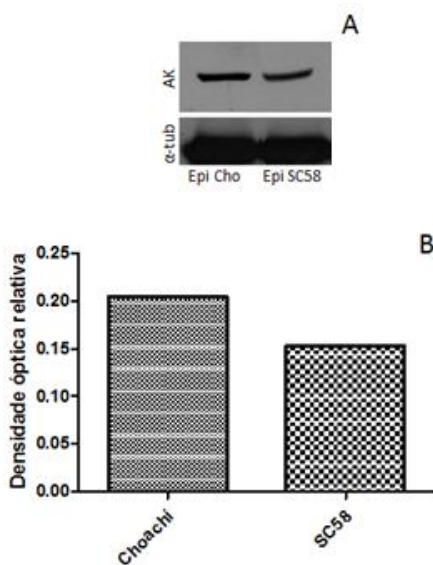
Como a AK é uma enzima presente em diferentes espécies de tripanosomatídeos, grupo este que inclui organismos com diferentes habilidades e curso de desenvolvimento em seus hospedeiros, foi realizada uma comparação da atividade enzimática entre diferentes espécies de tripanosomatídeos e também entre cepas. Foram então utilizadas as cepas Choachí (KP1+) e SC 58 (KP1-) de *T. rangeli*, as cepas Y (DTU II) e Colombiana (DTU I) de *T. cruzi* (Figura 16).



**Figura 14.** Análise da atividade da arginina quinase em diferentes espécies da família Trypanosomatidae: *T. rangeli* Choachí, *T. rangeli* SC 58, *T. cruzi* Y e *T. cruzi* Colombiana. \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*\* Comparação entre *T. rangeli* SC58 com as outras amostras.

É possível observar que existem diferenças significativas entre a atividade da AK entre as cepas de *T. rangeli*. A cepa SC 58 (KP1-) possui quase duas vezes mais unidades de atividade da enzima quando comparada com a cepa Choachí (KP1+). A atividade nas cepas de *T. cruzi* não apresentou diferença significativa entre si e também com a atividade demonstrada para a cepa Choachí.

Como o antissoro anti-TrAK é espécie específico, não reconhecendo AK de outras espécies, não foi possível avaliar a expressão da enzima em *T. cruzi* com o intuito de realizar uma análise comparativa da atividade e expressão da AK neste táxon (Figura 15A). Os resultados da análise de densitometria não permitem evidenciar uma diferença de expressão da AK entre as cepas de *T. rangeli* analisadas.



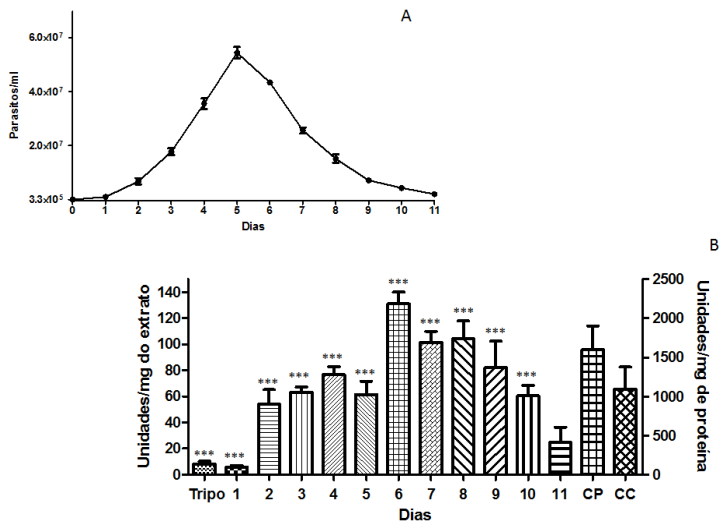
**Figura 15.** Análise da expressão da arginina quinase em diferentes cepas do *T. rangeli*. A) Níveis proteicos de AK em extratos proteicos totais de *T. rangeli*; B) Densidade óptica relativa dos níveis de AK, normalizados a partir da expressão de  $\alpha$ -tubulina (PONTES et al., 2014).

#### 4.4 Avaliação dos níveis de expressão e a atividade da TrAK durante a diferenciação de tripomastigotas sanguíneos em epimastigotas

Após a obtenção dos tripomastigotas sanguíneos de *T. rangeli*, o crescimento dos parasitos em meio LIT foi acompanhado durante onze dias, sendo diariamente avaliada a expressão e atividade enzimática da AK. Este ensaio visou verificar se há alteração nos padrões de expressão e atividade enzimática da AK durante o processo de ingestão de formas tripomastigotas de *T. rangeli* por triatomíneos.

Como pode ser observado na figura 18A os parasitos apresentaram crescimento até o quinto dia de cultivo, a partir do qual começaram a morrer, havendo somente poucos parasitos viáveis ao décimo primeiro dia de cultivo. Esta curva é condizente com resultados prévios do grupo (GRISARD et al., 1999), sendo consoante com os resultados apresentados na figura 11A.

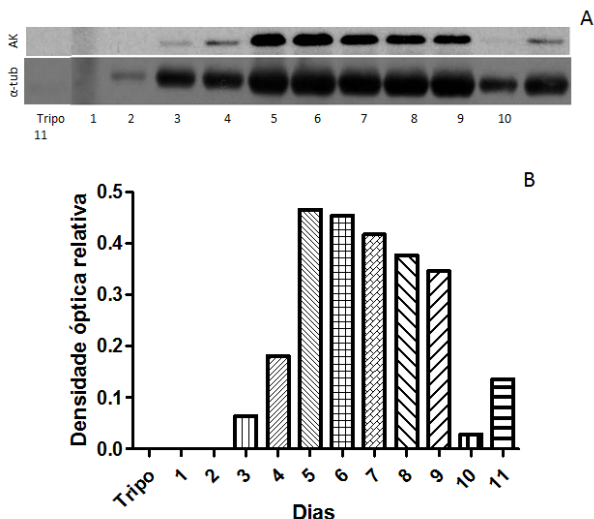
A atividade da AK passou a aumentar a partir do segundo dia de cultivo até o sexto dia, onde atingiu seu pico máximo, mantendo-se estável até o nono dia e decaindo no décimo e décimo primeiro dias, mas ainda com valores superiores aos observados nas formas tripomastigotas sanguíneas (Figura 17B).



**Figura 16.** Análise da atividade da arginina quinase durante a diferenciação *in vitro* de formas tripomastigotas para formas epimastigotas do *Trypanosoma rangeli*. A) Curva de crescimento de *T. rangeli* estabelecida a partir de contagens diárias das formas epimastigotas; B) Atividade enzimática da AK; CP – Controle Positivo; CC – Controle por competição (Adição de excesso de 5x de histidina). \*\*\*  $p < 0,001$ . \*\*\* Comparação entre os tripomastigotas e o dia 1 com os dias 2 a 10.

Com relação aos níveis de AK nos extratos proteicos dos parasitos, observa-se um padrão semelhante aos ensaios de atividade, havendo um aumento da expressão a partir do terceiro dia de cultivo, atingindo um pico máximo no quinto dia e decaindo progressivamente até o 11º dia de cultivo. Nas formas tripomastigotas e nos dois primeiros dias da hemocultura a expressão da AK não foi detectada, possivelmente devido a uma

baixa sensibilidade da técnica na detecção de baixos níveis da proteína (Figura 19A e B).



**Figura 17.** Análise da expressão da arginina quinase durante a diferenciação *in vitro* de tripomastigotas em epimastigotas do *Trypanosoma rangeli*. A) Níveis proteicos de AK em extratos proteicos totais de *T. rangeli*; B) Densidade óptica relativa dos níveis de AK, normalizados a partir da expressão de  $\alpha$ -tubulina.

#### 4.5 Avaliação da citolocalização TrAK no *T. rangeli* através de ensaios enzimáticos

Como em trabalho anterior observamos por imunofluorescência indireta utilizando o antissoro anti-TrAK que a localização celular da TrAK era principalmente flagelar (Figura 20) (Pontes et al., 2014), no presente estudo buscamos detalhar este resultado utilizando frações purificadas de *T. rangeli* correspondentes ao citoesqueleto e ao flagelo em ensaios de atividade enzimática.

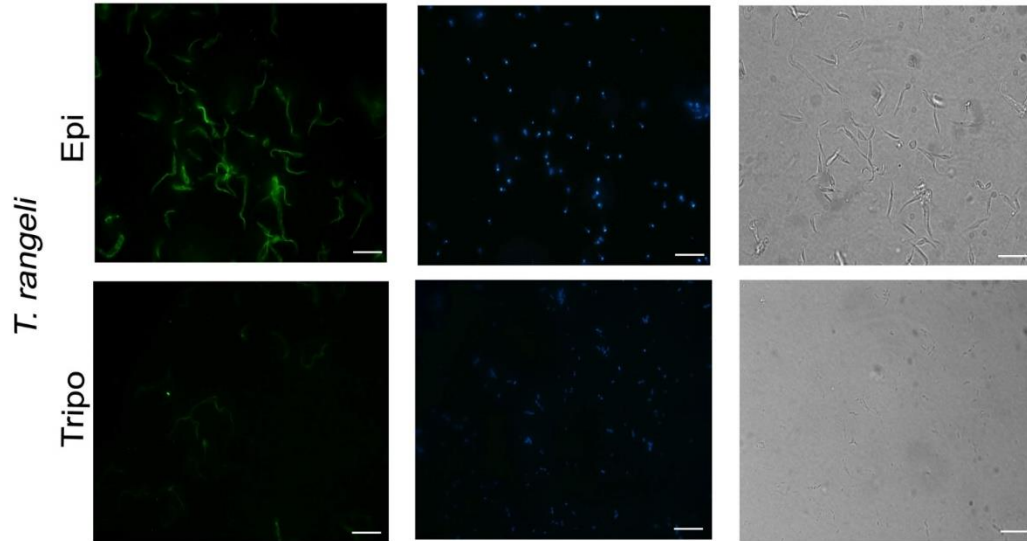
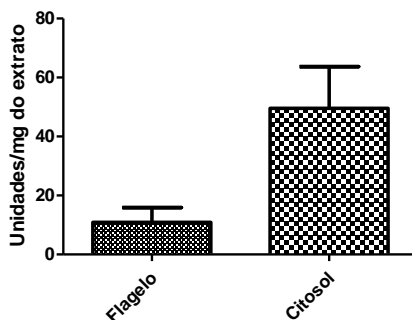


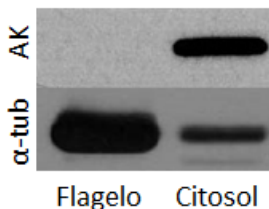
Figura 18. Citocalização da *TrAK* em formas epimastigotas e tripomastigotas de *Trypanosoma rangeli* através de ensaio de imunofluorescência utilizando o soro policlonal anti-*TrAK*. As imagens representam microfotografias da expressão da *TrA* (1), núcleo e cinetoplasto corados com o reagente DAPI (2) e campo claro (3). As barras de aumento representam 10µm. (PONTES et al., 2014).

De forma contrária aos resultados obtidos anteriormente para a imunolocalização utilizando imunofluorescência indireta, a maior parte da atividade da AK encontra-se na fração citosólica dos parasitos. Como é possível observar na figura 21, a atividade presente na fração citosólica é cerca de cinco vezes maior do que quando comparada com a atividade na fração contendo o flagelo.



**Figura 19.** Análise da atividade da arginina quinase no citosol e flagelo do *Trypanosoma rangeli*.

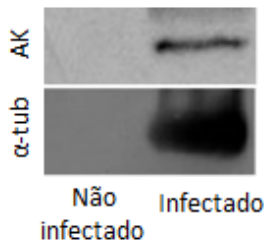
Estes resultados foram ainda corroborados em ensaios de *Western blot* quando foi possível detectar elevados níveis da AK na fração citosólica dos extratos de *T. rangeli*, enquanto que na fração flagelar não houve detecção da AK, ainda que o a normalização por detecção da  $\alpha$ -tubulina indique haver maior concentração proteica total na fração flagelar (Figura 22).



**Figura 20.** Análise dos níveis de expressão da arginina quinase nas frações flagelares e citosólicas do *Trypanosoma rangeli*. Densidade óptica relativa dos níveis de AK, normalizados a partir da expressão de  $\alpha$ -tubulina.

#### 4.6 Avaliação da presença e o nível de expressão da *TrAK* no *T. rangeli* durante a infecção da hemolinfa de *Rhodnius prolixus*.

Após a colonização da hemolinfa pelas epimastigotas de *T. rangeli* inoculadas na hemocele, o processamento das amostras e dos controles para os ensaios de *Western blot*, observamos a ausência de detecção da AK nos extratos proteicos de hemolinfa total coletados de triatomíneos não infectados, indicando não haver reconhecimento cruzado do antissoro anti-*TrAK* com a AK de *R. prolixus* (Figura 23). Já na fração de hemolinfa coletada de animais infectados pelo *T. rangeli* é possível observar uma banda específica para a AK de *T. rangeli* (Figura 23).



**Figura 21.** Análise da expressão da arginina quinase em extratos proteicos totais de hemolinfa de *Rhodnius prolixus* infectados pelo *Trypanosoma rangeli* e não infectados.

Os ensaios de detecção e quantificação da atividade enzimática da AK de *T. rangeli* enquanto na hemolinfa de *R. prolixus* estão sendo realizados, que incluirá a verificação da expressão e da atividade enzimática da AK nas tripomastigotas metacíclicos presentes nas glândulas salivares de *R. prolixus*.



## 5 DISCUSSÃO

A arginina quinase catalisa a transfosforilação reversível entre a adenosina difosfato (ADP) e a fosfoarginina, a qual está envolvida na manutenção temporal e espacial de adenosina trifosfato (ATP) (PEREIRA et al., 2000). Esta enzima está presente em Anelídeos, Celenterados, Platelminhos, Nemertíneos, Moluscos, Lofóforados, Artrópodes, Equinodermos, Hemicordados e Cordados, nos quais junto com outras quinases mantém a homeostase de ATP durante a contração muscular (PEREIRA et al., 2000).

Atualmente a mais bem descrita arginina quinase em tripanosomatídeos é a de *T. cruzi*, cujo padrão de expressão sugere uma correlação entre atividade enzimática e a disponibilidade de nutrientes (PEREIRA et al., 2003). Embora haja estudos envolvendo arginina quinases de outros tripanosomatídeos, somente a AK de *T. brucei* pode ser considerada bem descrita como a de *T. cruzi*. Nesse contexto, os resultados obtidos neste trabalho para a arginina quinase de *T. rangeli* (TrAK) são primariamente comparados com estudos funcionais realizados em *T. cruzi*, embora alguns aspectos sejam passíveis de análise em relação a outros tripanosomatídeos.

Duas cópias gênicas que codificam para AK foram identificadas no genoma do *T. rangeli*. Pereira e colaboradores (2000), através da mesma técnica de *Southern Blot* demonstrou que a AK em *T. cruzi* é codificada por um gene cópia única. Já Voncken e colaboradores (2013), utilizando apenas a ferramenta Blast, conseguiu encontrar 3 diferentes cópias para a AK de *T. brucei*. Ele demonstrou a expressão de todas através de citolocalização e realizou análises de predição de endereçamento celular.

O número de cópias gênicas de AK em *T. rangeli* também foi confirmado nos dados genômicos de duas distintas cepas deste parasito (Choachí e SC58). As cópias encontradas em cada cepa apresentam alta similaridade e uma ORF de 1209 pares de base, codificando uma proteína de 403 aminoácidos e 45 kDa. A ORF parcial utilizada para a produção da proteína recombinante não possui 150 pares de base da porção inicial do gene. Entretanto, os testes de atividade com a proteína recombinante (40 kDa)

demonstraram que esta região não influencia em sua atividade, uma vez que todos os domínios catalíticos se encontram na porção mediana e final da sequência.

As sequências de aminoácidos preditas a partir dos genes identificados nos genomas foram submetidas a análises em softwares de predição de localização celular, porém nenhuma evidência de endereçamento celular foi evidenciada, sugerindo que a *TrAK* seja uma proteína citosólica. Uda e colaboradores (2006) já haviam descrito que as AKs geralmente são citosólicas e encontradas em monômeros, apesar de outras sinalizações serem possíveis. O *T. cruzi* segue o padrão estabelecido para as AKs, pois possui um monômero localizado no citosol (MIRANDA et al., 2009). Já o *T. brucei* possui três isoformas, todas monoméricas, porém com localizações celulares diferentes, onde a *TbAK1* se localiza no flagelo, enquanto a *TbAK2* é ligada a glicosossomos e a *TbAK3* é citosólica (VONCKEN et al., 2013).

Nas análises filogenéticas utilizando a AK como marcador foi possível perceber que *T. rangeli* está mais próximo de *T. cruzi* do que dos outros tripanosomatídeos. Esta separação foi evidenciada nas árvores geradas por ambos os métodos, os quais apresentaram a mesma topologia. Nos alinhamentos das sequências é possível verificar que a maior parte das diferenças encontradas se localiza na porção N-terminal. Este fato já havia sido proposto por Mühlebach e colaboradores (1994) para as sequências aminoacídicas das fosfogeno quinases como a arginina quinase e a creatina quinase. Análises filogenéticas e de sequências demonstram claramente que as AK são homólogas, tendo surgido em algum ancestral comum (UDA et al., 2006).

Para que os ensaios enzimáticos pudessem ser realizados, o primeiro passo foi a padronização do ensaio de atividade enzimática, utilizando um extrato proteico de formas epimastigotas da cepa Choachí e a proteína recombinante produzida anteriormente. A atividade da enzima recombinante se mostrou dez vezes mais ativa do que os extratos dos parasitos, corroborando o que foi encontrado por Pereira e colaboradores (2000), que demonstraram que a enzima recombinante produzida por eles possuía atividade maior do que a dos extratos de *T. cruzi*, apesar de possuir algumas características diferentes da enzima nativa.

Isto pode ter ocorrido pelo fato de terem sido expressas em um sistema bacteriano, onde as próprias bactérias podem fazer uso desta enzima para melhorar sua capacidade de sobrevivência, uma vez que bactérias não possuem a AK. Estes resultados corroboram com os achados feitos por Canonaco e colaboradores (2003). Este trabalho mostra que a expressão heteróloga de arginina quinase por organismos que não possuem esta enzima, assim como bactérias e leveduras, pode ser um fator de resistência ao estresse nutricional.

Os valores de atividade encontrados para a recombinante de *T. cruzi* são de cerca de 12 vezes maior do que a atividade encontrada no parasito (PEREIRA et al., 2000), apoiando assim também os achados para *T. rangeli*. Estes resultados também são muito similares aqueles descritos por Voncken e colaboradores (2013), onde a recombinante possuía maior atividade do que a enzima nativa de *T. bucei*.

Segundo os achados de Alonso e colaboradores (2001), a atividade enzimática e os níveis proteicos cresceram continuamente durante a fase exponencial da curva de crescimento de epimastigotas. A atividade enzimática durante a curva de crescimento de epimastigotas, em *T. rangeli* os valores de atividade crescem conjuntamente com a curva de crescimento, onde no quinto dia de cultura atinge sua atividade máxima, sendo esta cerca de três vezes maior do que a atividade inicial, começando então seu decaimento. Para *T. cruzi*, os dados também são parecidos, onde a atividade específica da AK aumentou cerca de sete vezes ao longo da curva de crescimento de epimastigotas (PEREIRA et al., 2003).

Para Pereira e colaboradores (2002), o padrão da expressão da arginina quinase em epimastigotas sugere uma correlação entre a atividade enzimática e a disponibilidade de nutrientes ou a densidade parasitária. É possível perceber com relação aos níveis proteicos em *T. rangeli* que a expressão de AK aumenta no início da curva, mas depois se mantém constante, demonstrando um padrão que pode ser comparado aos achados para *T. cruzi*, demonstrando assim que a atividade enzimática da AK em *T. rangeli* provavelmente está relacionada com densidade parasitária.

Condições nutricionais durante o ciclo de vida de *T. cruzi* impõem restrições à disponibilidade de nutrientes. Estes parasitos são expostos a uma grande variação de ambientes. No hospedeiro

mamífero os tripomastigotas e amastigotas conseguem ainda se beneficiar de um ambiente relativamente estável, com suprimentos constantes de glicose e aminoácidos. Em contraste, quando no triatomíneo, o *T. cruzi* depende muito mais da disponibilidade de nutrientes relacionada ao nível nutricional do inseto que pode ficar longos períodos sem se alimentar (KOLLIEN; SCHAUB, 2000).

Para a diferenciação celular *in vitro*, a atividade enzimática cresce até o quarto dia, se mantendo então constante até o oitavo dia. O quarto dia de diferenciação é o momento onde ocorre a maior mudança nos parasitos e onde a maior parte deles está na forma tripomastigota ou então em formas intermediárias, sendo o momento em que cessa a multiplicação celular. O pico de atividade de AK durante a diferenciação celular chega a ser quatro vezes maior neste momento de transição do que o dia 0 no qual temos somente formas epimastigotas. Este fato é corroborado pelos achados de Pereira e colaboradores que demonstram que a atividade em formas tripomastigotas de *T. cruzi* é 2,5 vezes maior do que a encontrada em formas epimastigotas de cultura.

Além da atividade enzimática os níveis de AK em formas tripomastigotas também é maior do que em epimastigotas em *T. cruzi*, dado que difere do encontrado para *T. rangeli*. A partir de *Western Blot* foi possível observar uma maior expressão em formas epimastigotas do que em tripomastigotas diferenciados *in vitro*. Pereira e colaboradores (2002) demonstraram que a ausência de captação de L-arginina e a maior taxa de atividade da arginina quinase observada em formas tripomastigotas quando comparada com as formas replicativas, sugerindo uma correlação entre replicação celular e metabolismo de arginina.

Como foram encontradas diferenças nos níveis proteicos de AK ao longo da diferenciação *in vitro*, foi realizada a PCR Quantitativa em Tempo Real para determinação dos níveis de mRNA de *TrAK*, visando detectar a existência de correlação dos níveis de mRNA com os níveis de expressão proteica. Não observamos alterações significativas nos níveis de mRNA para a AK durante o processo de diferenciação celular *in vitro* do *T. rangeli* assim como foi observado anteriormente para *T. cruzi* (ALONSO et al., 2001), permitindo concluir que a AK seja regulada pós-transcricionalmente. Esta falta de correlação entre níveis proteicos e de transcritos pode ser facilmente explicado em

tripanosomatídeos, uma vez que a regulação da expressão gênica é realizada em sua maioria a nível pós-transcricional, sendo que a transcrição primária da maioria dos genes ocorre em longas unidades policistrônicas e é constitutiva. Os transcritos são processados por trans-splicing e poliadenilação (VANHAMME; PAYS, 1995).

A atividade de AK foi comparada entre duas cepas de *T. rangeli*, *T. cruzi* e *Leishmania* sp. As cepas de *T. cruzi* apresentaram praticamente a mesma atividade, porém para *T. rangeli* foi observada uma grande diferença entre as cepas Choachí e SC58. A cepa SC58 é uma cepa muito mais sensível a alterações no seu meio. Seu cultivo apresenta maior dificuldade do que o cultivo da cepa Choachí, desde a necessidade de maior concentração de soro bovino fetal (20% para SC58 e 10% para Choachí), assim como crescimento mais lento. A cepa SC58 não atinge uma densidade parasitária tão alta quanto a cepa Choachí, sendo este fato observável visualmente, até mesmo sem contagens da cultura. Porém, a SC58 é uma cepa de cultura muito mais homogênea, onde todos os parasitos possuem o mesmo tamanho aproximadamente, enquanto a cepa Choachí possui uma cultura mais heterogênea. Por possuírem todas estas diferenças, estas duas cepas foram selecionadas para a comparação da atividade e expressão da AK.

Em trabalho anterior já havia sido realizada a comparação da expressão destas cepas, onde foi visto que não há diferença de expressão, demonstrando que, apesar dos mesmos níveis de expressão, a atividade é maior. Esta diferença de atividade pode estar relacionada com a demanda energética da cepa SC 58, devido aos fatores de cultivo e densidade parasitária citados acima. Infelizmente, devido ao fato de o antissoro anti-TrAK ser espécie específico, não foi possível realizar a comparação dos níveis proteicos entre as espécies.

Além de avaliar a diferenciação *in vitro* de formas epimastigotas para tripomastigotas, foi pensado também em realizar o processo inverso, no qual tripomastigotas sanguíneos seriam diferenciados em epimastigotas de cultura através de hemocultura. Utilizando esta metodologia, os valores de atividade para os tripomastigotass sanguíneos e para o primeiro dia da hemocultura estão bem abaixo do que seria esperado, isto

provavelmente ocorreu uma vez que havia uma grande quantidade de células sanguíneas junto com os parasitos, e existe a possibilidade de que este excesso de proteínas do hospedeiro possa ter interferido no ensaio como um todo. Analisando os outros dias da curva, a atividade da AK se manteve constante entre os dias 2 a 5, tendo seu pico no sexto dia. Uma possível explicação seria que neste momento o parasito que estava anteriormente em condições de alta demanda nutricional dentro do hospedeiro mamífero passou encontrar uma situação metabólica adversa. Através destes resultados é possível inferir que a atividade da AK parece estar relacionada à multiplicação celular e a adaptação a condições metabólicas adversas, sendo influenciada pela demanda energética do parasito. Estes dados são corroborados por diversos trabalhos nos quais a arginina quinase está envolvida na adaptação do parasito a mudanças ambientais e condições de estresse (ALONSO et al., 2001; CANONACO et al., 2003; MIRANDA et al., 2006; PEREIRA; ALONSO; IVALDI et al., 2002).

Quando analisada a expressão proteica deste ensaio é possível perceber que os níveis de AK aumentam juntamente com a atividade, apesar de não ter sido possível detectar a expressão nos tripomastigotas e nos dias 1 e 2 da diferenciação. Novamente para os tripomastigotas e o dia 1, o excesso de proteínas provenientes de células sanguíneas pode ter interferido na técnica. Já nos dias 2 e 10, o que pode ter acontecido é que na verdade ocorreu dosagem superestimada dos extratos proteicos totais, e desta forma ocorreu a diferença e a dificuldade na detecção. Este ensaio necessita ser repetido para a confirmação dos resultados.

No trabalho anterior sobre a AK em *T. rangeli*, os resultados de análise por imunofluorescência indireta apontam que a TrAK está distribuída pelo citoplasma em formações granulosas. Dados fornecidos por Ooi e colaboradores (2015), demonstraram a importância da arginina quinase flagelar de *T. brucei* no ciclo de vida deste parasito dentro do inseto vetor. A AK flagelar é responsável não só pelo batimento flagelar como também relacionado com o desenvolvimento do parasito na mosca tsé-tsé.

Desta forma, como o protocolo de fracionamento celular para obtenção de frações enriquecidas em citoesqueleto e flagelo já havia sido padronizado no Laboratório de Protozoologia, foi realizado um ensaio para verificar onde se localiza a atividade da

AK no *T. rangeli*. Porém, os resultados obtidos demonstram que a maior parte da atividade da AK se localiza na parte citosólica e não na porção flagelar, o que é corroborado pelas análises de sequência que não apresentam nenhum peptídeo de direcionamento flagelar. Outro ponto a ser destacado, é o fato da atividade como um todo ficar abaixo da atividade encontrada em outras situações para o *T. rangeli*, mas isto provavelmente ocorreu pelo tampão utilizado para a purificação de citoesqueleto e flagelo que deve ter desnaturado parte das proteínas. Com a análise dos níveis de expressão é possível perceber que a maior parte das proteínas se encontra na fração citosólica, sendo que, na fração flagelar nem foi possível realizar a detecção. Já para *T. brucei*, quando é realizada a purificação do flagelo, a banda correspondente a AK flagelar é identificada (OOI et al., 2015).

Como último ponto analisado, verificou-se a expressão da AK no *T. rangeli* que se encontra no triatomíneo. Estes insetos ingerem quantidades enormes de sangue, sendo que a ingestão é seguida rapidamente por uma forte diurese, digestão lenta e ocasionalmente longos períodos de inanição (KOLLIEN; SCHAUB, 2000). Para que seja possível completar seu ciclo evolutivo no inseto vetor, o *T. rangeli* precisa invadir a hemocele, para superar as defesas presentes no intestino (EICHLER; SCHAUB, 2002). Uma vez na hemocele, o parasito é capaz de sobreviver e se multiplicar livremente na hemolinfa, sendo capaz de evadir a resposta imune do triatomíneo (DE OLIVEIRA; DE SOUZA, 2003).

Como é possível observar na figura, no extrato total de hemócitos coletados de triatomíneos não infectados o antissoro anti-TrAK não reconheceu nenhuma banda, apesar dos triatomíneos possuírem também a proteína funcional. Entretanto, um forte reconhecimento se deu nos epimastigotas de hemolinfa coletados de animais infectados pelo *T. rangeli*. Desta forma é possível afirmar que durante a infecção nos triatomíneos ocorre a expressão da arginina quinase de *T. rangeli*. Maiores estudos relacionados a atividade da AK durante o período de infecção do triatomíneo se fazem necessários para o completo entendimento do metabolismo desta proteína nesta fase do ciclo evolutivo destes parasitos, incluindo os momentos de transição entre o intestino e

hemocele, bem como da hemocele para a glândula salivar onde ocorre a diferenciação em tripomastigotas metacíclicos.

Os ensaios apresentados neste trabalho mostram que a proteína *TrAK* é ativa, sofrendo modificações durante o ciclo evolutivo de *T. rangeli*, sendo a maior atividade encontrada em momentos de alta atividade celular, como a diferenciação e o crescimento, demonstrando assim seu papel de suma importância na sobrevivência do parasito em situações de estresse nutricional e fisiológico.



## 6 CONCLUSÕES

- O *T. rangeli* possui duas cópias genômicas da AK.
- A atividade da *TrAK* sofre modulação durante a curva de crescimento de epimastigotas.
- A atividade da *TrAK* sofre modulação durante a diferenciação celular *in vitro*.
- A atividade da *TrAK* é maior em tripomastigotas do que em epimastigotas.
- A atividade entre epimastigotas mantidos em cultura é maior do que a atividade presente nos epimastigotas recém diferenciados de tripomastigotas sanguíneos.
- A atividade a *TrAK* se encontra no citosol.
- A *TrAK* é expressa no *T. rangeli* quando este se encontra na hemolinfa.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AFCHAIN, D.; LE RAY, D.; FRUIT, J. et al. Antigenic make-up of *Trypanosoma cruzi* culture forms: identification of a specific component. **J Parasitol**, v. 65, n. 4, p. 507-14, Aug. 1979.

ALONSO, G. D.; PEREIRA, C. A.; REMEDI, M. S. et al. Arginine kinase of the flagellate protozoa *Trypanosoma cruzi*. Regulation of its expression and catalytic activity. **FEBS Lett**, v. 498, n. 1, p. 22-5, Jun 1. 2001.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, v. 72, p. 248-54, May 7. 1976.

BRENER, Z. Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 4, p. 389-96, Nov-Dec. 1962.

CANEPA, G. E.; CARRILLO, C.; MIRANDA, M. R. et al. Arginine kinase in *Phytomonas*, a trypanosomatid parasite of plants. **Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol**, v. 160, n. 1, p. 40-3, Sep. 2011.

CANONACO, F.; SCHLATTNER, U.; WALLIMANN, T. et al. Functional expression of arginine kinase improves recovery from pH stress of *Escherichia coli*. **Biotechnol Lett**, v. 25, n. 13, p. 1013-7, Jul. 2003.

CUBA CUBA, A. Review of the biologic and diagnostic aspects of *Trypanosoma (Herpetosoma) rangeli*. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 31, n. 2, p. 207-20, Mar-Apr. 1998.

D'ALESSANDRO, A.; DEL PRADO, C. E. Search for *Trypanosoma rangeli* in endemic areas of *Trypanosoma cruzi* in Argentina and Brazil. **Am J Trop Med Hyg**, v. 26, n. 4, p. 623-7, Jul. 1977.

D'ALESSANDRO, A.; MANDEL, S. Natural infections and behavior of *Trypanosoma rangeli* and *Trypanosoma cruzi* in the vector *Rhodnius prolixus* in Colombia. **J Parasitol**, v. 55, n. 4, p. 846-52, Aug. 1969.

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

DE OLIVEIRA, M. A.; DE SOUZA, W. Further morphological studies on the behavior of *Trypanosoma rangeli* in the hemocytes of *Rhodnius prolixus*. **Parasitol Int**, v. 52, n. 4, p. 299-307, Dec. 2003.

DE STEFANI MARQUEZ, D.; RODRIGUES-OTTAIANO, C.; MONICA OLIVEIRA, R. et al. Susceptibility of different triatomine species to *Trypanosoma rangeli* experimental infection. **Vector Borne Zoonotic Dis**, v. 6, n. 1, p. 50-6, Spring. 2006.

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

EICHLER, S.; SCHAUB, G. A. Development of symbionts in triatomine bugs and the effects of infections with trypanosomatids. **Exp Parasitol**, v. 100, n. 1, p. 17-27, Jan. 2002.

GRISARD, E. C.; CAMPBELL, D. A.; ROMANHA, A. J. Mini-exon gene sequence polymorphism among *Trypanosoma rangeli* strains isolated from distinct geographical regions. **Parasitology**, v. 118 ( Pt 4), p. 375-82, Apr. 1999.

GRISARD, E. C.; STEINDEL, M. *Trypanosoma (Herpetosoma) rangeli*. In: NEVES, D. P. (Ed.). **Parasitologia Humana**. São Paulo: Editora Atheneu, 2005. p. 109-114.

GRISARD, E. C.; STEINDEL, M.; GUARNERI, A. A. et al. Characterization of *Trypanosoma rangeli* strains isolated in

Central and South America: an overview. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 94, n. 2, p. 203-9, Mar-Apr. 1999.

GUHL, F.; VALLEJO, G. A. *Trypanosoma (Herpetosoma) rangeli* Tejera, 1920: an updated review. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 98, n. 4, p. 435-42, Jun. 2003.

HERBIG-SANDREUTER, A. Experimental study of the life cycle of *Trypanosoma rangeli* Tejera 1920 in warm-blooded animals and in *Rhodnius prolixus*. **Acta Trop**, v. 12, n. 3, p. 261-4, 1955.

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

KOLLIEN, A. H.; SCHAUB, G. A. The development of *Trypanosoma cruzi* in triatominae. **Parasitol Today**, v. 16, n. 9, p. 381-7, Sep. 2000.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-</sup>(Delta Delta C(T)) Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402-8, Dec. 2001.

LÜCKEMEYER, D. D. **AVALIAÇÃO DO PERFIL PROTEICO DE *Trypanosoma rangeli* DURANTE O PROCESSO DE DIFERENCIAÇÃO CELULAR *in vitro*** 2014. 263 f.PhD). Centro de Ciências Biológicas Universidade Federal de Santa Catarina Florianópolis, 2014.

MIRANDA, M. R.; BOUVIER, L. A.; CANEPA, G. E. et al. Subcellular localization of *Trypanosoma cruzi* arginine kinase. **Parasitology**, v. 136, n. 10, p. 1201-7, Sep. 2009.

MIRANDA, M. R.; CANEPA, G. E.; BOUVIER, L. A. et al. *Trypanosoma cruzi*: Oxidative stress induces arginine kinase expression. **Exp Parasitol**, v. 114, n. 4, p. 341-4, Dec. 2006.

MUHLEBACH, S. M.; GROSS, M.; WIRZ, T. et al. Sequence homology and structure predictions of the creatine kinase

isoenzymes. **Mol Cell Biochem**, v. 133-134, p. 245-62, Apr-May. 1994.

OOI, C. P.; ROTUREAU, B.; GRIBALDO, S. et al. The Flagellar Arginine Kinase in *Trypanosoma brucei* Is Important for Infection in Tsetse Flies. **PLoS One**, v. 10, n. 7, p. e0133676, 2015.

PEREIRA, C. A.; ALONSO, G. D.; IVALDI, S. et al. Arginine metabolism in *Trypanosoma cruzi* is coupled to parasite stage and replication. **FEBS Lett**, v. 526, n. 1-3, p. 111-4, Aug 28. 2002.

PEREIRA, C. A.; ALONSO, G. D.; IVALDI, S. et al. Arginine kinase overexpression improves *Trypanosoma cruzi* survival capability. **FEBS Lett**, v. 554, n. 1-2, p. 201-5, Nov 6. 2003.

PEREIRA, C. A.; ALONSO, G. D.; PAVETO, M. C. et al. *Trypanosoma cruzi* arginine kinase characterization and cloning. A novel energetic pathway in protozoan parasites. **J Biol Chem**, v. 275, n. 2, p. 1495-501, Jan 14. 2000.

PEREIRA, C. A.; ALONSO, G. D.; TORRES, H. N. et al. Arginine kinase: a common feature for management of energy reserves in African and American flagellated trypanosomatids. **J Eukaryot Microbiol**, v. 49, n. 1, p. 82-5, Jan-Feb. 2002.

PEREIRA, C. A.; BOUVIER, L. A.; CAMARA MDE, L. et al. Singular features of trypanosomatids' phosphotransferases involved in cell energy management. **Enzyme Res**, v. 2011, p. 576483, 2011.

PONTES, C. L. M.; LUCKEMEYER, D. D.; STOCO, P. H. et al. **Caracterização molecular de uma fosfotransferase (Arginina Quinase) de *Trypanosoma rangeli*** 2014. 77 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação). Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2014.

ROMERO, I.; TELLEZ, J.; YAMANAKA, L. E. et al. Transsulfuration is an active pathway for cysteine biosynthesis in *Trypanosoma rangeli*. **Parasit Vectors**, v. 7, p. 197, 2014.

SCHOTTELIUS, J. Neuraminidase fluorescence test for the differentiation of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli*. **Trop Med Parasitol**, v. 38, n. 4, p. 323-7, Dec. 1987.

SOUTHERN, E. M. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. **J Mol Biol**, v. 98, n. 3, p. 503-17, Nov 5. 1975.

STEINDEL, M.; DIAS NETO, E.; PINTO, C. J. et al. Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) and isoenzyme analysis of *Trypanosoma rangeli* strains. **J Eukaryot Microbiol**, v. 41, n. 3, p. 261-7, May-Jun. 1994.

STEINDEL, M.; PINTO, J. C.; TOMA, H. K. et al. *Trypanosoma rangeli* (Tejera, 1920) isolated from a sylvatic rodent (*Echymys dasythrix*) in Santa Catarina Island, Santa Catarina State: first report of this trypanosome in southern Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 86, n. 1, p. 73-9, Jan-Mar. 1991.

STOCO, P. H.; WAGNER, G.; TALAVERA-LOPEZ, C. et al. Genome of the avirulent human-infective trypanosome - *Trypanosoma rangeli*. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 8, n. 9, p. e3176, Sep. 2014.

SUAREZ, B. A.; CUERVO, C. L.; PUERTA, C. J. The intergenic region of the histone H2a gene supports two major lineages of *Trypanosoma rangeli*. **Biomedica**, v. 27, n. 3, p. 410-8, Sep. 2007.

TOWBIN, H.; STAEBELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 76, n. 9, p. 4350-4, Sep. 1979.

UDA, K.; FUJIMOTO, N.; AKIYAMA, Y. et al. Evolution of the arginine kinase gene family. **Comp Biochem Physiol Part D Genomics Proteomics**, v. 1, n. 2, p. 209-18, Jun. 2006.

VALLEJO, G. A.; GUHL, F.; SCHAUB, G. A. Triatominae-Trypanosoma cruzi/T. rangeli: Vector-parasite interactions. **Acta Trop**, v. 110, n. 2-3, p. 137-47, May-Jun. 2009.

VANHAMME, L.; PAYS, E. Control of gene expression in trypanosomes. **Microbiol Rev**, v. 59, n. 2, p. 223-40, Jun. 1995.

VONCKEN, F.; GAO, F.; WADFORTH, C. et al. The phosphoarginine energy-buffering system of *Trypanosoma brucei* involves multiple arginine kinase isoforms with different subcellular locations. **PLoS One**, v. 8, n. 6, p. e65908, 2013.

WOODS, A.; SHERWIN, T.; SASSE, R. et al. Definition of individual components within the cytoskeleton of *Trypanosoma brucei* by a library of monoclonal antibodies. **J Cell Sci**, v. 93 ( Pt 3), p. 491-500, Jul. 1989.