

Ramon Mendes de Almeida

Dissertação de Mestrado

Estudos sobre a interação parasito-hospedeiro:
papel das amastinas de *Trypanosoma cruzi*.

Universidade Federal de Minas Gerais

Instituto de Ciências Biológicas

Departamento de Bioquímica e Imunologia

Belo Horizonte, MG

2011

Ramon Mendes de Almeida

Estudos sobre a interação parasito-hospedeiro:
papel das amastinas de *Trypanosoma cruzi*

Dissertação apresentada ao departamento de Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito para obtenção do título de mestre em Bioquímica e Imunologia.

Orientadora: Dr^a Santuza Maria Ribeiro Teixeira

Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Bioquímica e Imunologia
Belo Horizonte, MG

2011

Agradecimentos

Às pessoas que contribuíram para o desenvolvimento desse trabalho como a aluna de doutorado Patrícia Rosa de Araújo, pelos experimentos de “Northern blot”, e à aluna de pós-doutorado Carla do laboratório de Cálcio pela ajuda com as imunofluorescências.

Ao Elimar, o técnico do laboratório, pelo seu serviço e pela companhia desde a minha iniciação científica. Elimar foi um amigo desde quando entrei no laboratório e sempre ajudou no que podia.

Aos colegas do lab: Fernanda, Gabi, Mariana, Rita, Brenda, Júlia, Juliano, Natália, Nina, Luciana, Tiago, Laura, Bárbara, João Moreira e quem mais eu esqueci-me de colocar aqui. A convivência com vocês foi muito boa durante esse período.

À Priscila, pela companhia, pela ajuda e conselhos e por sempre ajudar quando eu estava precisando.

À Viviane, que está junto comigo desde a iniciação científica no lab e que sempre me apoiou quando precisava. Ela sempre foi uma pessoa com que podia dividir as dificuldades do mestrado.

À Patiu, pelos conselhos e dicas durante a execução do projeto, e pela companhia também.

À Jarina, por ajudar com as colorações de Giemsa e por ser a irmã que nunca tive. Uma amiga que só dá para resumir assim: indescritível. À Patrícia, não só por ter colaborado com o trabalho, mas por ser uma amiga ótima, sempre do lado em todos

os momentos. À Fernanda e ao Tiago, que sempre foram legais comigo em todos os momentos e por sempre deixarem a porta de casa aberta para me receber. E agradeço aos quatro juntos pela oportunidade de conviver com vocês. Esse tempo juntos foi o melhor. Vocês são insubstituíveis.

À minha orientadora, prof^a Santuza Teixeira, por ter me recebido em seu laboratório e por ter me ensinado diversas coisas que me possibilitaram chegar até aqui.

À minha família, que sempre dá apoio quando necessário.

Aos meus pais, Raimundo e Graça, pelo apoio incondicional durante esse tempo. Tudo que sou e que consegui devo a vocês dois.

Abstract

Amastins are 170-200 amino acids, highly hydrophobic surface glycoproteins expressed not only in *T. cruzi* amastigotes but also in amastigotes from several species of Leishmania. The *T. cruzi* genome contains 12 copies of amastins, which can be subdivided in two groups: the δ amastins are organized in a cluster containing alternated copies of tuzin genes, differently from β amastins which are not. Likewise δ amastins, mRNA from members of the β group is more abundant in amastigotes than in the others stages of the parasite. Analyses of amastin genes present in the genome showed that they encode proteins with increased amino acid variability in the hydrophilic domain that is likely in contact with the host cell cytoplasm. In order to gain new insights of their function, parasites over expressing amastin were generated and yeast two hybrid (Y2H) experiments were performed to identify human proteins able to interact with amastins. Epimastigotes over expressing a δ amastin gene in fusion with GFP showed higher densities in cultures in comparison to parasites expressing only GFP. From the Y2H experiments, ten positive clones were identified and IL-15 cDNA was present in two of them (Teixeira *et al.*, not published). We observed that IL-15 with a histidine tag interacts with amastin in *in vitro* pull down experiments. Infection of HEK293T cells expressing intracellular IL-15 with CL Brener trypomastigotes resulted in elevated rates of infection and number of intracellular amastigotes in comparison to non-transfected cells.

Resumo

As amastinas são glicoproteínas de 170 a 200 aminoácidos, altamente hidrofóbicas, expressas não somente em amastigotas de *T. cruzi*, mas também em amastigotas de diversas espécies do gênero *Leshmania*. O genoma de *T. cruzi* contém 12 cópias de amastinas, as quais podem ser subdivididas em dois grupos: as δ amastinas estão organizadas em um agrupamento contendo genes de tuzinas, em contrapartida, as β amastinas não são intercaladas por tuzinas. Como as δ amastinas, mRNA dos membros do grupo β é mais abundante no estágio amastigota do que nos outros estágios do parasito. Análise dos genes de amastina presentes no genoma mostrou que esses codificam proteínas com variabilidade de aminoácidos maior no domínio hidrofílico que supostamente está em contato com o citoplasma da célula hospedeira. Para investigar a função dessas proteínas, foram gerados parasitos que expressa amastina em fusão com GFP e ensaios de duplo híbrido foram realizados para identificar com quais proteínas humanas as amastinas podem interagir. Epimastigotas super expressando uma δ amastina em fusão com GFP alcançou maiores densidades na cultura em comparação com as epimastigotas que expressam GFP somente. A partir dos ensaios de duplo híbrido, 10 clones positivos foram encontrados, sendo que dois deles continham cDNA codificante para IL-15 (Teixeira *et al.*, dados não publicados). Foi observado que IL-15 em fusão com histidina interage com amastina em experimentos de “pull down” *in vitro*. Experimentos de infecção de células HEK293T expressando a forma intracelular de IL-15 com tripomastigotas da cepa CL Brener resultou em taxas mais elevadas de infecção e de número de amastigotas intracelulares em comparação com as células não transfectadas.

Lista de figuras

Figura 1: Representação esquemática do ciclo de vida do protozoário parasito <i>Trypanosoma cruzi</i>	3
Figura 2: Árvore filogenética contendo amastinas pertencentes às diferentes subfamílias nas diversas espécies de tripanosomatídeos.....	15
Figura 3: Ensaio de duplo híbrido para seleção de possíveis ligantes para amastina.	18
Figura 4: Organização genômica das amastina de <i>T. cruzi</i> do clone CL Brener	36
Figura 5: Alinhamento das δ amastinas (A) e β amastinas (B) de <i>T. cruzi</i>	38
Figura 6: Análise topológica das amastina de <i>T. cruzi</i>	39
Figura 7: “Northern blot” de amostras de RNA total de diferentes estágios de <i>T. cruzi</i>	42
Figura 8: Mapa do vetor pTREGFP e pTREXAmaGFP.	44
Figura 9: Expressão de GFP e Ama::GFP em formas epimastigotas da cepa G.....	45
Figura 10: “Western blot” de extratos proteicos totais de epimastigotas transfectadas com pTREGFP e pTREXAmaGFP	46
Figura 11: Curva de crescimento de formas epimastigotas transfectadas com pTREGFP e pTREXAmaGFP.	48
Figura 12: Taxa de infecção e número de amastigotas por célula infectada em células HEK293T infectadas com tripomastigotas expressando GFP ou Ama::GFP.	50
Figura 13: Eletroforese em gel de acrilamida com SDS de amostras de bactéria expressando TcX71.40S::GST e IL-15::his.....	52
Figura 14: “Pull down” de IL-15 recombinante com resina contendo TcX71.40S::GST.	54

Figura 15: Transfecção de células HEK293T com pEGFP usando diferentes reagentes de transfecção.	57
Figura 16: Imunofluorescência de células HEK293T após transfecção para expressão de IL-15.....	58
Figura 17: Infecção de células HEK293T com <i>T. cruzi</i> após transfecção para expressão de IL-15.	60

Lista de abreviações e símbolos

BSA	<i>Bovine serum albumine</i>
cDNA	DNA complementar
cm	centímetro
dCTP	desoxicitidina trifosfato
DMEM	<i>Dulbecco Modified Eagle medium</i>
DNA	ácido desoxirribonucléico
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
GAPDH	Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
GFP	<i>Green fluorescent protein</i>
GST	glutathiona-S-transferase
Ig	imunoglobulina
IL-15	interleucina 15
Kb	kilobases
LIT	Liver infusion tryptose
M	molar
MASP	<i>Mucin associated surface proteins</i>
Mb	megabases
MG	miligramas
min	minutos
mL	mililitro
MLEE	<i>Multi-Locus enzyme electrophoresis</i>
mM	milimolar
MOPS	<i>N-morpholino propanesulfonic acid</i>
mRNA	RNA mensageiro
ng	nanogramas
nm	nanômetros

nt	nucleotídeos
pb	pares de bases
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCR	reação em cadeia da polimerase
PEG	polietilenoglicol
PEI	<i>Polyethylenimine</i>
PMA	<i>Phorbol myristic acetate</i>
RAPD	<i>Random Amplification of Polymorphic</i>
rDNA	DNA codificante para RNA ribossômico
RNA	ácido ribonucléico
rpm	rotações por minuto
rRNA	RNA ribossômico
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
SDS-PAGE	<i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
SSC	<i>Saline sodium citrate buffer</i>
T.E.	Tris-EDTA
TBS	<i>Tris buffered saline</i>
TTBS	<i>Triton X-100 tris buffered saline</i>
UTR	Untranslated region (região não traduzida)
UV	ultravioleta
xg	vezes a força da gravidade
μCi	micro Curie
μg	microgramas
μL	microlitros

Índice

Abstract	i
Resumo.....	ii
Lista de figuras	iii
Lista de abreviações e símbolos	v
1. Introdução	1
1. Doença de Chagas e seu agente etiológico: <i>Trypanosoma cruzi</i>	1
2. Estrutura populacional de <i>T. cruzi</i>	5
3. Genoma e mecanismos de expressão e regulação gênica em <i>T. cruzi</i>	7
4. A família gênica das amastinas	11
5. Estudos sobre o papel das amastinas em <i>T. cruzi</i>	16
2. Objetivos.....	20
1. Objetivos gerais	20
2. Objetivos específicos	20
3. Materiais e métodos	21
1. Cultura de parasitos.....	21
2. Curva de crescimento de formas epimastigotas com pTREGFP ou pTREXAmA GFP.	22
3. Infecção de células HEK293T com tripomastigotas transfectadas com pTREGFP ou pTREXAmA GFP.....	22

4. Clonagem das sequências codificadoras de IL-15 e amastina40S nos vetores pDONRZeo, pDEST15 e pDEST17.	23
5. Transformação de <i>E. coli</i> quimiocompetente	24
6. Purificação de DNA plasmidial	25
7. Expressão das proteínas recombinantes TcX71.40S e IL-15 em fusão com histidinas ou GST.....	25
8. Eletroforese em gel de acrilamida contendo SDS (SDS-PAGE)	26
9. “Western blot”	27
10. Ensaio de “pull down” <i>in vitro</i>	27
11. Cultura e transfecção de células HEK293T.....	28
12. Imunofluorescência para detecção de IL-15.....	30
13. Infecção de células HEK293T com <i>T. cruzi</i> após transfecção para expressão de IL15.	31
14. Coloração de Giemsa	31
15. Extração de RNA de parasitos	32
16. “Northern blot”	32
17. Análises de bioinformática.....	33
4. Resultados	35
1. Organização genômica da família multigênica das Amastinas	35
2. Análise comparativa <i>in silico</i> das diferentes amastinas de <i>T. cruzi</i>	37
3. Expressão das β amastinas nos diferentes estágios de <i>T. cruzi</i>	41

4. Geração de linhagens de <i>T. cruzi</i> expressando amastina em fusão com GFP.	43
5. Curva de crescimento de epimastigotas transfectados com GFP e AmaGFP.	47
6. Multiplicação de amastigotas intracelulares expressando GFP e Ama::GFP.	49
7. Possíveis interações entre amastina e proteínas da célula hospedeira: validação de resultados de ensaios de duplo-híbrido.	51
8. Transfecção de células HEK293T com vetor para expressão de IL-15.	55
9. Infecção de células HEK293T expressando IL-15 com tripomastigotas do clone CL-Brener.	59
5. Discussão	61
6. Referências bibliográficas	83

1. Introdução

1. Doença de Chagas e seu agente etiológico: *Trypanosoma cruzi*

A doença de Chagas foi descoberta e descrita em 1909 por Carlos Chagas (1878-1934) o que foi considerado um feito único, pois o mesmo pesquisador descreveu o inseto vetor que pertence à ordem Reduviidae e o agente etiológico da doença, o protozoário *Trypanosoma cruzi* (Fundação Oswaldo Cruz, <http://www.fiocruz.br/chagas>). Atualmente esta enfermidade acomete em torno de 11 milhões de pessoas, se restringindo às Américas Central e do Sul, sendo por isso também chamada de tripanossomíase americana (Organização Mundial da Saúde).

O agente causador da doença de Chagas, o *T. cruzi*, pertence à ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae. Os gêneros pertencentes a essa família apresentam um flagelo que se origina de uma abertura, conhecida como bolsa flagelar, e uma estrutura proeminente próxima ao local de inserção do flagelo, conhecida como cinetoplasto. Esse corresponde a uma condensação de DNA localizado no interior da mitocôndria única e ramificada que se estende por todo o corpo do protozoário. Durante seu ciclo de vida, o *T. cruzi* apresenta três formas principais: amastigotas, epimastigotas e tripomastigotas. As duas primeiras formas são replicativas e a última é a forma infectante do parasito (Brener *et al.*, 2000).

Sob condições naturais, a infecção é transmitida através do contato do hospedeiro mamífero com as fezes do vetor triatomíneo hematófago infectado, no momento da picada. As formas tripomastigotas metacíclicas presentes nas fezes do inseto penetram na pele lesada ou mucosa e atingem a corrente sanguínea. A partir

daí, o parasito invade diversos tipos celulares e se diferencia nas formas amastigotas no citoplasma das células hospedeiras. Depois de vários ciclos de replicação, as amastigotas se diferenciam em tripomastigotas, que rompem a célula infectada liberando formas amastigotas e tripomastigotas as quais podem infectar novas células. Durante o repasto sanguíneo, o inseto popularmente conhecido como barbeiro se infecta ao ingerir as formas tripomastigotas sanguíneas as quais se diferenciarão em epimastigotas no trato digestivo. As formas epimastigotas replicam-se na luz do trato digestivo do inseto e ao atingir sua porção final, se diferenciam em formas tripomastigotas metacíclicas e são eliminadas com as fezes. Durante o repasto sanguíneo, as formas tripomastigotas metacíclicas presentes nas fezes do inseto vetor penetram no hospedeiro mamífero através de aberturas na pele ou na mucosa dando continuidade ao ciclo de vida do parasito (Brenner *et al.*, 2000) o qual está representado na Figura 1. Além dessa via, a infecção por *T. cruzi* também pode ocorrer por meio de transfusão sanguínea (Young *et al.*, 2007), transplante de órgãos, transmissão vertical (Gurtler *et al.*, 2003) e por ingestão de comida ou bebida contaminada (Benchimol *et al.*, 2006; para revisão veja Stuart *et al.*, 2008).

A doença de Chagas é resultado da persistência da infecção com *T. cruzi* e das complexas interações entre o patógeno e o hospedeiro resultando em duas fases com características distintas. A fase aguda tem as características clínicas de uma infecção generalizada, de gravidade variável, sendo o diagnóstico sugerido pela presença dos sinais de porta de entrada (sinal de Romaña, chagoma cutâneo). Esta fase compreende os primeiros meses após a infecção, apresenta alta parasitemia (grande quantidade de tripomastigotas circulantes no sangue) e pode ser caracterizada por febre acompanhada de mal estar, cefaléia, astenia, hiporexia, hepatomegalia,

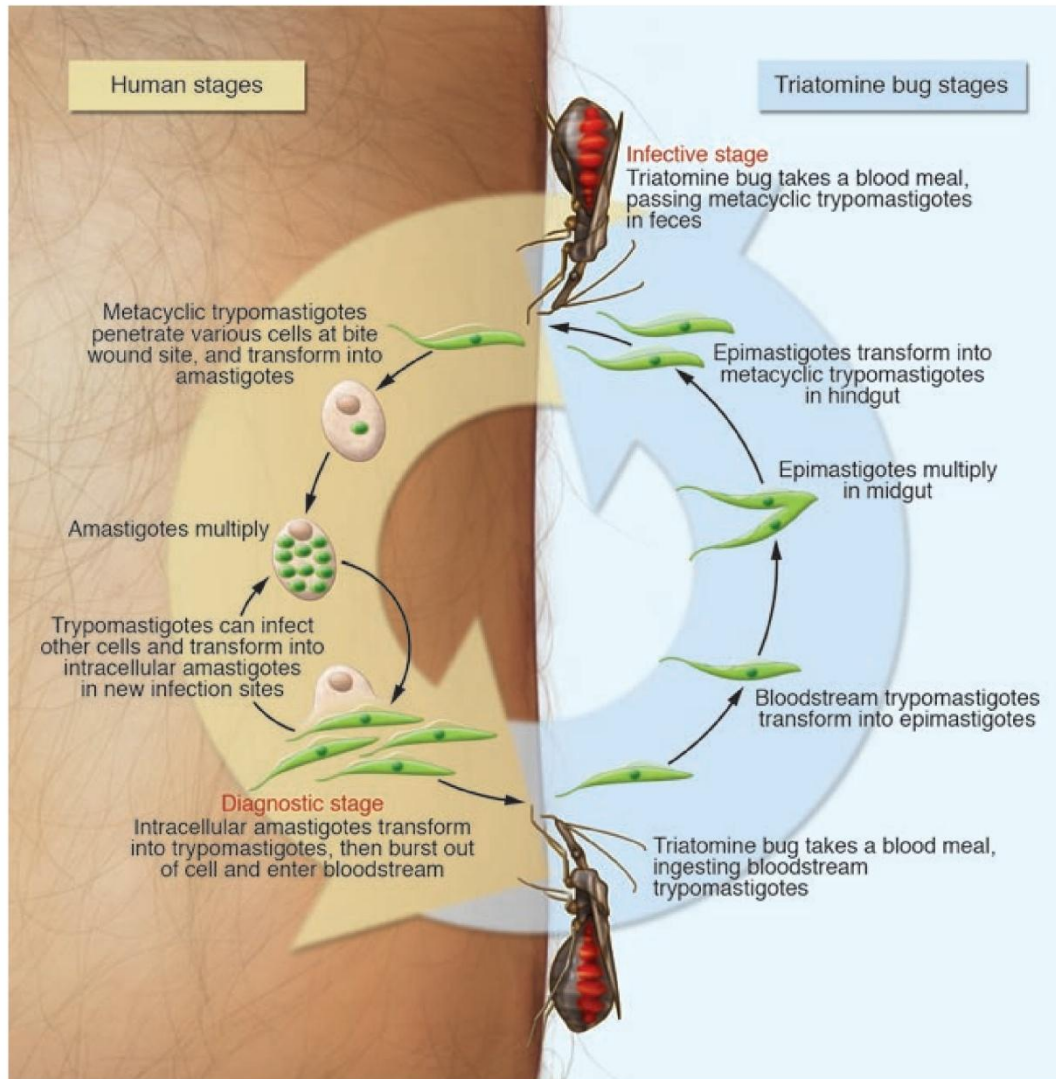


Figura 1: Representação esquemática do ciclo de vida do protozoário parasito *Trypanosoma cruzi*. Os principais estágios de desenvolvimento do parasito como os principais eventos ocorridos durante o ciclo nos hospedeiros vertebrados e invertebrados estão indicados (Stuart *et al.*, 2008).

esplenomegalia e às vezes, perturbações neurológicas e insuficiência cardíaca. A fase crônica inicia-se meses após a infecção e pode se apresentar sob várias formas: indeterminada, cardíaca, digestiva, ou cardio-digestiva (Brener *et al.*, 2000). A maioria dos indivíduos infectados pelo *T. cruzi*, tenha ou não previamente apresentado uma forma aguda evidente, geralmente evolui para um estado de aparente equilíbrio parasito-hospedeiro, sem manifestações clínicas. Este estado de infecção silenciosa é denominado forma indeterminada. As formas sintomáticas aparentam ser resultado de um desequilíbrio entre resposta imune do hospedeiro e carga parasitária, resultando geralmente em uma forma cardíaca, digestiva ou uma combinação de ambas. A forma cardíaca da doença é representada por uma cardiomiopatia inflamatória fibrosante, essencialmente arritmica, que leva a uma insuficiência cardíaca progressiva, de curso fatal. As manifestações clínicas da forma digestiva se iniciam como uma incoordenação motora (disperistalse), devido ao comprometimento dos plexos mioentéricos, a qual afeta principalmente o esôfago e o cólon. Na ausência da ação moderadora do plexo mioentérico os músculos lisos tornam-se hiper-reativos, contraindo-se desordenadamente e hipertrofiando-se. Por fim ocorre a dilatação dos órgãos comprometidos, gerando o megacólon e o megaesôfago (Fundação Oswaldo Cruz, <http://www.fiocruz.br/chagas>).

No Brasil, a forma indeterminada da doença é mais comum (60-70%), seguida pela forma cardíaca e digestiva (20-30% e 8-10% respectivamente). Na região central do Brasil e no Chile, a forma digestiva predomina, enquanto que essa é inexistente na Venezuela e América Central (Luquetti *et al.*, 1986; Dias 1992). As razões para essa diversidade de manifestações clínicas em diferentes regiões ainda são desconhecidas.

O tratamento da doença de Chagas é realizado com a administração de benzonidazol e nifurtimox. Entretanto, o tratamento com essas drogas é questionável devido à ineficiência dessas contra o parasito durante a fase crônica, presença de sérios efeitos colaterais, longo e alto custo do tratamento e surgimento de cepas resistentes às drogas. Por isso os estudos bioquímicos e moleculares acerca desse protozoário são importantes, já que estes estudos proverão informações a respeito de possíveis alvos para o desenvolvimento de novas drogas ou tratamentos.

2. Estrutura populacional de *T. cruzi*

A população de *T. cruzi* é constituída de várias cepas com características genéticas, bioquímicas e fisiológicas distintas. A classificação das diferentes cepas começou através da análise do perfil de isoenzimas de seis loci (Miles *et al.*, 1978), resultando na divisão das cepas em três zimodemas: Z1, Z2 e Z3. Posteriormente, a análise do perfil de 15 loci de isoenzimas sugeriu maior diversidade genética entre os diferentes isolados (Tibayrenc *et al.*, 1986, Zhang *et al.*, 1988).

Em 1995 a técnica de RAPD, "Random Amplification of Polymorphic", DNA foi usada com sucesso para classificação das cepas de *T. cruzi*. Tibayrenc *et al.* (1995) correlacionaram a classificação feita através de RAPD e MLEE, do inglês "multi-Locus enzyme electrophoresis", e observaram que a classificação por RAPD sugeria também a divisão das cepas de *T. cruzi* em três zimodemas. Duas linhagens principais do parasito são representadas pelos zimodemas Z1 e Z2.

Através de análises dos genes de rRNA e do mini-exon, Souto *et al.* (1996) definiram duas linhagens filogenéticas principais de *T. cruzi*. Uma seqüência de aproximadamente 100 pb na extremidade 3' do gene de rRNA 24S α e do gene de mini-exón apresenta dimorfismos que corroboram com a classificação anterior em duas linhagens principais. É importante mencionar que a classificação feita através de marcadores genéticos nos genes mini-exón e rDNA 24S α em linhagens 1 e 2 corresponde às linhagens 2 e 1 respectivamente, na classificação feita através de RAPD e MLEE. Para facilitar os estudos filogenéticos a criação de uma nomenclatura comum para a classificação das linhagens foi então proposta por Momem (1999). A linhagem *T. cruzi* I inclui as cepas caracterizadas pelo zimodema Z1, marcadores genéticos rDNA 24S α e mini-exón referentes ao grupo 2. As cepas pertencentes à linhagem *T. cruzi* II são caracterizadas pelo zimodema Z2 e marcadores genéticos como o rDNA 24S α e mini-exón referentes ao grupo 1. Esta linhagem posteriormente foi dividida em cinco subunidades filogenéticas menores: IIa, IIb, IIc, IId e IIe (Brisse *et al.*, 2000).

Uma terceira linhagem foi definida por Freitas e cols. em 2006 através da análise dos perfis presentes em cinco loci de microssatélites, genes codificantes para rRNA 24S α e polimorfismos presentes no gene mitocondrial da subunidade II da citocromo oxidase. A linhagem *T. cruzi* III abrange cepas que não puderam ser classificadas como linhagens I ou II e as cepas híbridas foram agrupadas separadamente. Os dados de Freitas *et al.* (2006) indicaram ainda que a cepa CL Brener, a qual é híbrida, é resultado da fusão entre cepas parentais pertencentes às linhagens *T. cruzi* II e III.

Com o avanço no entendimento da estrutura populacional de *T. cruzi* e com a descoberta de novas técnicas de tipagem, um novo sistema de classificação se tornou necessário. Em 2009, Zingales e colaboradores propuseram um novo sistema de classificação que abrange as cepas ainda não classificadas no sistema anterior de nomenclatura e mantém as cepas já classificadas nas mesmas linhagens. O novo sistema divide o táxon em seis linhagens, TcI a TcVI, sendo que *T. cruzi* I e a linhagem *T. cruzi* II não são alteradas (correspondem à divisão de Brisse e cols. em 2000 como DTU I e DTU IIb respectivamente). A linhagem *T. cruzi* III corresponde ao DTU IIc, a linhagem *T. cruzi* IV à DTU IIa, *T. cruzi* V à DTU II d e *T. cruzi* VI a DTU IIe. Uma mudança notável ocorrida com a nova classificação é que o clone CL Brener, cujo genoma foi seqüenciado por El-Sayed *et al.* em 2005, antes classificado como *T. cruzi* II, agora é classificado como pertencente à linhagem *T. cruzi* VI.

3. Genoma e mecanismos de expressão e regulação gênica em *T. cruzi*

Para compreender melhor os fatores genéticos do parasito que podem estar envolvidos na doença de Chagas, El-Sayed *et al.* trabalharam no sequenciamento do genoma de *T. cruzi*, que foi concluído em 2005. O genoma do clone CL Brener foi determinado através da técnica de “Whole genome shotgun”. Devido ao fato do alto conteúdo de sequências repetitivas no genoma (mais de 50 %) e pela natureza híbrida desse isolado, a montagem do genoma após o sequenciamento foi muito. Weatherly e cols. em 2009 obtiveram uma montagem do genoma com 41 cromossomos, cujos tamanhos variam de 78 Kb a 2.4 Mb. Os dados obtidos estão de acordo com resultados de eletroforese em campo pulsátil e com sequências obtidas de clones BAC (“bacterial

artificial chromosome”). Com um tamanho de 67 Mb, o genoma haplóide de *T. cruzi* contém em torno de 12000 genes codificadores de proteínas. Grande parte destes genes pertence a famílias multigênicas codificadoras de proteínas de superfície. Estes genes ocorrem em agrupamentos *in tandem*, ou seja, cópias seguidas de um mesmo gene, ou ocorrem de forma alternada por outros genes (El-Sayed *et al.*, 2005). Exemplos dessas famílias multigênicas são as MASPs (“mucin associated surface proteins), trans-sialidases, mucinas entre outras.

A organização dos genes em agrupamentos permite a transcrição coordenada desses já que os RNAs mensageiros primários em *T. cruzi* são policistrônicos. Por terem divergido muito cedo durante o processo evolutivo, a linhagem dos tripanosomatídeos possui várias características ausentes nos outros eucariotos como a transcrição policistrônica, processamento do pré-RNA mensageiro por *trans-splicing*, ausência de íntrons nos genes, edição do RNA mitocondrial e transcrição de genes codificadores de proteínas por RNA polimerase I (para revisão, veja Teixeira e DaRocha, 2003).

Como os mRNAs transcritos são policistrônicos, eles precisam ser clivados no núcleo para gerar mRNAs maduros monocistrônicos. Esta clivagem ocorre através da adição de uma sequência de 39 nt denominada sequência líder (do inglês “spliced leader”) a qual já contém o cap 5´metilado. A adição da sequência líder e da cauda poli-A é regulada por sequências presentes no pré-mRNA sendo que a adição de ambas não é um evento independente. O sítio AG localizado logo após a primeira sequência de polipirimidinas consecutivas próximo ao início da região codificadora guia a adição da sequência líder. Essa mesma sequência de polipirimidinas guia a

adição da cauda poli-A na extremidade 3' do gene anterior no transcrito primário policistrônico (Campos *et al.*, 2008).

Devido a essas características que fazem com que os tripanosomatídeos sejam organismos únicos, vetores específicos para estudos de expressão gênica nesses organismos tiveram que ser desenvolvidos. O primeiro vetor desenvolvido com essa finalidade, denominado pTEX (Kelly *et al.*, 1992), continha sequências “upstream” e intergênica do gene de GAPDH I flanqueando o sítio múltiplo de clonagem e as sequências intergênica e “downstream” do gene GAPDH II flanqueando o gene de resistência a neomicina. Esses elementos inseridos flanqueando os genes a serem expressos garantem o correto processamento do mRNA e a expressão do gene de interesse. Para testar os níveis de expressão com esse vetor foi usado o gene *cat* (cloranfenicol acetiltransferase) como gene repórter. Os resultados da atividade desse gene indicaram que somente de 1 a 10% do total de proteína correspondia ao produto do gene repórter, indicando que esse plasmídeo possuía baixa eficiência de expressão.

Para aumentar a eficiência de expressão do vetor pTEX, a sequência “upstream” de GAPDH I foi substituída por um fragmento de rDNA (DNA que codifica RNA ribossômico) que continha o promotor e o ponto de início de transcrição já mapeado. Após clonagem, a eficiência de expressão propiciada pelo vetor foi testada com o gene *cat*. Parasitos transfectados com esse novo vetor, denominado de pRIBOTEX, apresentaram uma atividade de cloranfenicol acetiltransferase muito maior do que os parasitos transfectados com o vetor parental pTEX (Martínez-Calvillo *et al.*, 1997).

Ao estudar o gene *TcP2β* que codifica uma proteína ribossômica, Vazquez e Levin (1999) encontraram sequências contendo sinais para o processamento do mRNA. A sequência denominada HX1 apresentava alta eficiência em determinar o transplicing do mRNA e por isso foi usada para modificar o vetor pRIBOTEX. Essa foi inserida entre o promotor de rRNA e o gene *cat* de modo a aumentar a eficiência de expressão, gerando por fim o vetor pTREX que foi usado neste trabalho.

Em *T. cruzi* a transcrição de um conjunto de genes presentes no genoma resulta em uma única unidade policistônica. Porém, genes individuais pertencentes à mesma unidade podem apresentar diferentes padrões de expressão. Elementos em *cis* presentes nas regiões 5' e 3' UTR contribuem para a diferença nos níveis dos mRNAs como os elementos em *trans* que se ligam nessas regiões (para revisão, veja Teixeira e DaRocha, 2003). A regulação gênica feita no nível pós-transcricional permite o parasito uma rápida mudança dos padrões de expressão gênica, a qual possibilita a adaptação do parasito a diferentes ambientes já que ele apresenta diferentes formas e hospedeiros durante o seu ciclo de vida.

Essa variabilidade de ambientes torna mais complexa a manutenção do ciclo biológico completo e o cultivo de todas as formas do parasito em laboratório. As formas epimastigotas são as formas mais estudadas porque são mais facilmente cultiváveis em laboratório. Entretanto, o estágio do parasito presente no hospedeiro mamífero, forma amastigota, é de maior relevância para a doença, pois essa permanece em constante contato com o hospedeiro vertebrado e os antígenos produzidos nesse estágio são constantemente apresentados ao sistema imune. Interessados em estudar os genes mais expressos na forma amastigota, Teixeira e

colaboradores (1994) descobriram um gene cujo mRNA era muito mais abundante nesse estágio. Este gene não continha nenhuma similaridade com outros genes anotados até o momento, tendo sido denominado de amastina.

4. A família gênica das amastinas

As amastinas foram descobertas através de uma seleção de genes diferencialmente expressos em uma biblioteca de cDNA de formas amastigotas. Os clones dessa biblioteca foram selecionados com uma sonda feita a partir de RNA de formas amastigotas ou epimastigotas, permitindo a determinação de quais clones continham cDNAs mais expressos em cada forma (Teixeira *et al.*, 1994).

As amastinas constituem uma família multigênica a qual possui 12 cópias no genoma de *T. cruzi*. Estes genes contêm uma pequena região 5' UTR, seguida de uma ORF de aproximadamente 522 pb e uma região 3' UTR de 630 pb. Os mRNAs de amastinas codificam proteínas de 174 aminoácidos que contêm vários sítios potenciais de O-glicosilação. Análises *in silico* indicam a presença de quatro domínios hidrofóbicos separados por duas alças hidrofílicas na proteína, o que confere a esta proteína uma localização na membrana do parasito, o que foi confirmado por meio de ensaios de microscopia eletrônica (Teixeira *et al.*, 1994). Estudando a organização genômica das amastinas, Teixeira e colaboradores em 1995 encontraram genes que intercalam as amastinas, os quais foram denominados de tuzinas. Apesar de estarem agrupados no genoma e de serem transcritos em um único pré-mRNA policistrônico, a regulação dos genes de amastinas e tuzinas é distinta. O mRNA de amastina é cerca de 50 vezes mais

abundante no estágio amastigota em relação às outras formas do parasito e também está em níveis mais elevados quando comparado com os níveis do mRNA de tuzina.

A transcrição do gene de amastina durante os diferentes estágios de vida do parasito é semelhante, o que indica a presença de um mecanismo de regulação pós-transcricional para explicar a diferença nos níveis do mRNA desse gene. A modulação da estabilidade do mRNA de amastina é o principal mecanismo responsável pelos altos níveis deste mRNA no estágio amastigota. Uma sequência de aproximadamente 215 nt presente na porção 3' UTR do mRNA de amastina, além de conferir maior estabilidade ao mRNA, é sítio de ligação de um fator protéico presente no estágio amastigota do parasito (Coughlin *et al.*, 2000).

Como em *T. cruzi*, a família das amastinas também está presente em diferentes espécies de *Leishmania*. Através de uma metodologia similar à usada por Teixeira e cols. (1994), Wu *et al.* (2000) identificaram um gene com 36 % de similaridade às amastina de *T. cruzi* após uma seleção de uma biblioteca de cosmídeos de *Leishmania donovani* com sondas feitas a partir de RNA de formas promastigotas e amastigotas. Como as amastinas de *T. cruzi*, o gene homólogo de *Leishmania* apresenta um mRNA com níveis mais elevados no estágio amastigota e a diferença nos níveis destes é obtida através do aumento da estabilidade do mensageiro. Através de ensaios de luciferase, foi demonstrado que a 3' UTR confere uma maior estabilidade ao mRNA já que este é transcrito na mesma taxa nos dois estágios de vida da leishmania. Análise de hidrofobicidade deste ortólogo de amastina de *L. donovani* indicou a presença de quatro domínios transmembrana e a localização da proteína na membrana plasmática

do parasito foi confirmada por meio de microscopia de fluorescência com parasitos expressando amastina em fusão com GFP (Wu *et al.*, 2000).

Após o sequenciamento do genoma de *Leishmania major* (Ivens *et al.*, 2005), foi confirmada a existência de um número muito maior de amastinas (Rochette *et al.*, 2005). Com 45 membros no genoma das espécies de *L. major* e *L. infantum*, as amastinas constituem a maior família gênica (nas leishmanias) cujos membros possuem expressão regulada durante o ciclo de vida do parasito. Como as amastinas de *T. cruzi*, as amastinas das leishmanias também estão intercaladas por genes de tuzinas. O alinhamento dos diferentes membros de amastinas oriundos dos gêneros *Trypanosoma* e *Leishmania* mostrou uma conservação significativa tanto em sequência quanto em estrutura. É possível notar as quatro hélices compostas por aminoácidos hidrofóbicos e intercaladas por domínios que apresentam aminoácidos hidrofílicos com grande variabilidade entre os diferentes membros de amastinas.

Estudos de sequências de genoma têm mostrado que a família das amastinas é muito maior no gênero *Leishmania* do que em *Trypanosoma*, entretanto pouco é conhecido acerca da história evolutiva dessa família e de sua associação com o parasitismo em vertebrados. Estudando a dinâmica de evolução e diversificação dessa família, Jackson (2010) subdividiu essa família gênica em quatro grupos de acordo com posição genômica, estrutura secundária e evolução. As α amastinas estão presentes nos tripanosomatídeos como um par *in tandem* de isoformas estruturalmente distintas. As β amastinas estão presentes como um agrupamento de genes *in tandem*, compreendendo múltiplas cópias de duas isoformas estruturalmente distintas. As γ amastinas são conservadas no gênero *Leishmania*, mas estão ausentes no gênero

Trypanosoma, e ocorrem como um agrupamento gênico composto de múltiplas cópias. Por fim, os genes de δ amastinas (incluindo as amastinas denominadas $\rho\delta$) que formam um grupo altamente diverso, estão espalhados em diversos loci em vários cromossomos no gênero *Leishmania* e estão intercalados com os genes de tuzina. Somente um locus é conservado entre estes organismos como um agrupamento gênico *in tandem*. A árvore filogenética contendo os diferentes membros de amastinas representada na Figura 2 revela que em *T. cruzi* há somente membros pertencentes às famílias β e δ e que esta última sofreu uma expansão no gênero *Leishmania*.

Apesar de serem conhecidos vários aspectos acerca da distribuição e organização das amastinas no genoma de diferentes parasitos, a função dessas proteínas ainda é desconhecida. Nosso grupo tem tentado entender o papel dessas proteínas na fisiologia do parasito e no processo de infecção. Para isto, diferentes metodologias foram empregadas e os resultados obtidos serão descritos neste trabalho.

5. Estudos sobre o papel das amastinas em *T. cruzi*

Existem diferentes metodologias para estudo da função de um determinado gene em um organismo. Entretanto, em *T. cruzi*, a geração de linhagens nocautes para um gene de amastina por recombinação homóloga não é possível devido à quantidade de cópias deste gene no genoma do parasito. Como demonstrado por DaRocha e colaboradores (2004), *T. cruzi* não apresenta a maquinaria funcional de RNA de interferência, portanto, não é possível realizar o “knock down” do gene por esta técnica. Ainda não dispomos de anticorpos eficientes para o bloqueio da função das amastinas. Assim, como alternativas para o estudo da função desse gene foi adotada a super expressão de amastina e a determinação de interações com proteínas da célula hospedeira.

Análises iniciais avaliando o efeito da super expressão de amastina foram feitas através da clonagem do gene TcX71.40 (cujo identificador é Tc00.1047053511071.40, GeneDB), pertencente à subfamília δ , em fusão com histidinas no vetor pROCK, trabalho desenvolvido durante a dissertação de mestrado de Danielle Marra de Freitas Silva (2006). Formas epimastigotas da cepa CL Brener foram transfectadas por eletroporação de acordo com o protocolo descrito por DaRocha *et al.* (2004). A expressão de TcX71.40 em formas amastigotas foi confirmada através da detecção do mRNA de amastina::his através de experimentos de “Northern blot” e a proteína produzida foi detectada através de “Western blot” em diferentes clones.

Curvas de crescimento feitas com clones desses parasitos mostraram que formas epimastigotas transfectadas super expressando amastina apresentam maior taxa de multiplicação do que os parasitos selvagens. Essa alteração levanta a hipótese

de que esta amastina pode ter uma função no ciclo celular do parasito. Por sua localização na superfície da célula amastigota e pela presença de supostas alças extracelulares voltadas para o citoplasma da célula hospedeira, a amastina poderia atuar como um receptor. Para avaliar essa hipótese, ensaios de duplo híbrido foram feitos pelo nosso grupo com a finalidade de identificar proteínas da célula hospedeira capazes de interagir com as amastinas (Teixeira *et al.*, não publicado).

Estudos anteriores do nosso grupo indicaram que a amastina TcX71.40 possui duas alças extracelulares intercaladas por domínios hidrofóbicos. A alça hidrofílica extracelular de maior tamanho (TcX71.40S) foi clonada em fusão com domínio de ligação a DNA do fator de transcrição de levedura Gal4 (Gal4DB) e usada em experimentos de duplo híbrido. Leveduras haplóides transformadas com o plasmídeo contendo TcX71.40S::Gal4DB foram usadas na seleção de uma biblioteca de leveduras haplóides contendo todos os cDNAs humanos, cada um em fusão com o domínio de ativação do fator de transcrição Gal4 (Pretransformed Normalized Matchmaker™ Human HeLa S3 Library, Clontech). A interação entre amastina e proteína humana restaura a função do fator Gal4, o que resulta na expressão de marcadores que permitem o crescimento das leveduras diplóides em meio seletivo. A representação do ensaio de duplo híbrido pode ser observada na Figura 3.

Foram obtidos dez clones positivos após os ensaios de duplo híbrido, os quais correspondiam, por exemplo, a diferentes proteínas envolvidas em vias de tráfego intracelular e proteínas secretadas. Dentre os clones positivos havia dois que continham cDNA codificador para o gene de IL15 (dados não publicados). Este clone nos chamou a atenção devido a trabalhos anteriores que relatam presença de maiores

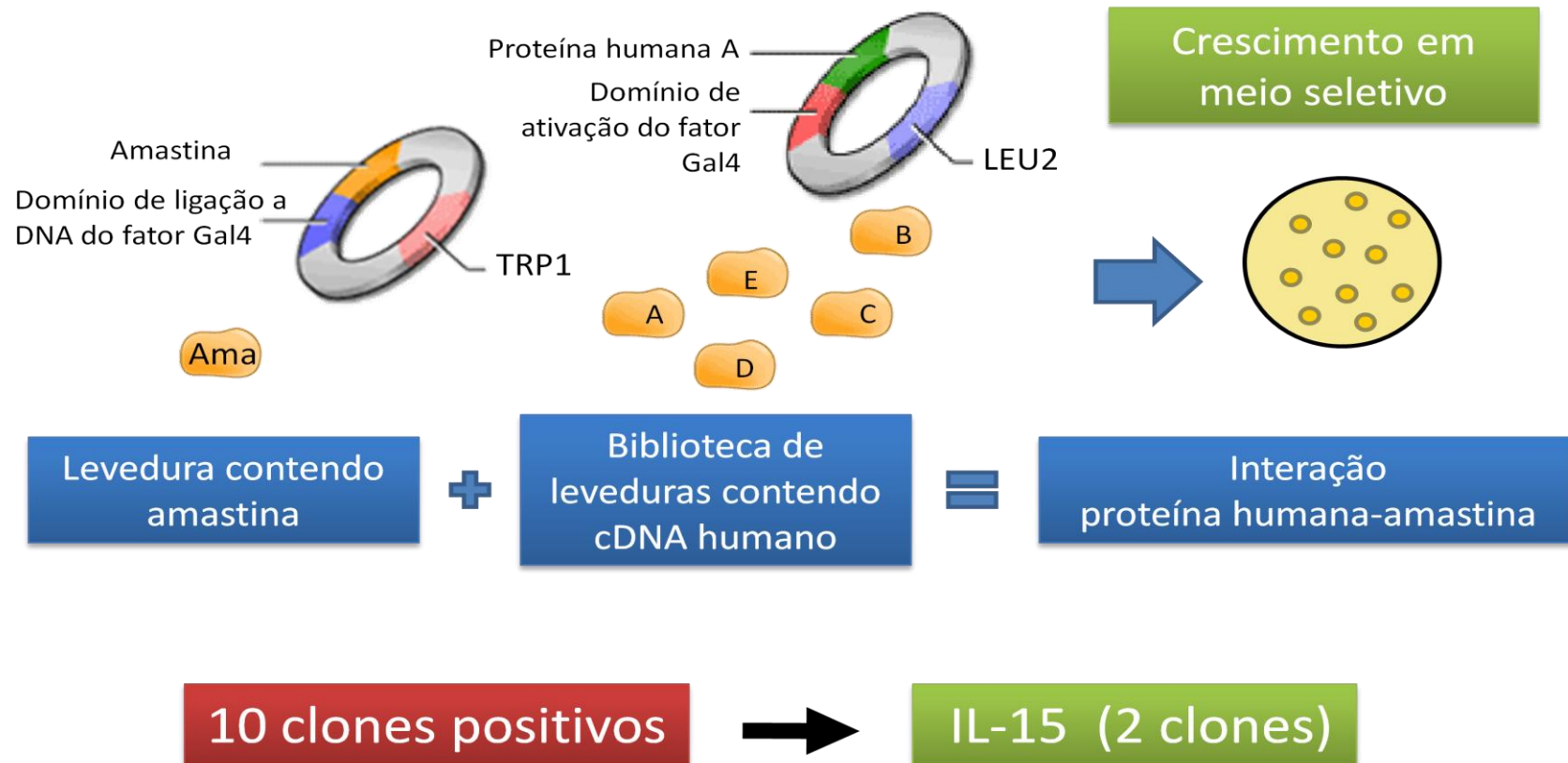


Figura 3: Ensaio de duplo híbrido para seleção de possíveis ligantes para amastina. A primeira alça hidrofílica de TcX71.40 foi clonada em fusão com domínio de ligação a DNA do fator Gal4 e usada para seleção de uma biblioteca de cDNA humano contendo todas as ORFs presentes no genoma clonadas em fusão com o domínio de ativação do fator Gal4. Leveduras auxotróficas haplóides contendo o plasmídeo com uma porção de TcX71.40 foram cruzadas com as leveduras da biblioteca. A interação entre amastina e proteína humana restaura o fator de transcrição Gal4 o que permite aos clones que apresentam essa interação crescimento em meio seletivo.

níveis desta citocina em infecções com diversos patógenos como herpesvírus (Flamand *et al.*, 1996), micobactérias (Maeurer *et al.*, 1999), *Cryptococcus neoformans* (Mody *et al.*, 1998) e alguns protozoários como *Leishmania infantum* (Milano *et al.*, 2002) e *T. cruzi*.

Níveis aumentados de IL-15 foram encontrados em lesões cardíacas de indivíduos infectados com *T. cruzi*, apesar de não ter sido observado um aumento nos níveis do mRNA da citocina nessas lesões (Fonseca *et al.*, 2007). Este aumento de IL-15 se deve principalmente à produção aumentada da citocina e do aumento do número de células CD68⁺, o qual é um marcador específico de macrófagos. Já é estabelecido o papel estimulatório de IL-15 e a função reguladora da atividade de diversas células durante a montagem de uma resposta imune. Além desse efeito, IL-15 atua também em células do sistema não imune induzindo a proliferação celular e proteção contra apoptose. Diferente das outras citocinas, a IL-15 apresenta duas isoformas: uma secretada e outra intracelular (para revisão, veja Budagian *et al.*, 2006). A maior parte dos trabalhos que envolvem a detecção de IL-15 é baseada na quantificação da citocina secretada ou da forma intracelular presente em células do sistema imune. Ainda há poucas informações sobre os efeitos dessa citocina em células do sistema não imune em processos infecciosos. Com a finalidade de entender melhor a interação entre *T. cruzi* e célula hospedeira, nosso interesse foi obter informações acerca da interação dessa proteína com proteínas da superfície das células amastigotas. Diante dos resultados obtidos nos ensaios de duplo híbrido, esse trabalho teve como finalidade a validação dessa interação, o estudo dos efeitos biológicos da IL-15 em células infectadas pelo parasito e também o estudo das outras amastinas presentes em *T. cruzi*.

2. Objetivos

1. Objetivo geral

- Investigar a função das amastinas de *T. cruzi*.

2. Objetivos específicos

- Estudar a organização genômica das amastinas em *T. cruzi* e o padrão de expressão dos membros pertencentes à subfamília β .
- Avaliar os efeitos da super expressão de amastina no ciclo celular de formas epimastigotas de *T. cruzi*.
- Avaliar os efeitos da super expressão de amastina no processo de infecção e multiplicação do *T. cruzi* em células de mamíferos.
- Obter a expressão de Amastina e IL-15 recombinantes em *Escherichia coli*.
- Investigar a interação entre Amastina e IL-15 observada nos experimentos de duplo híbrido através de experimentos de “pull down” *in vitro*.
- Testar o efeito da super expressão de IL-15 sobre a infecção com *T. cruzi*.

3. Materiais e métodos

1. Cultura de parasitos

Nesse estudo, foram cultivadas formas epimastigotas do clone CL Brener e da cepa G transfectadas com os vetores pTREXGFP ou pTREXAmGFP, cedidos gentilmente pelo prof^o Renato A. Mortara da Universidade Federal de São Paulo. Estes parasitos foram mantidos em meio LIT (10 g/L de infuso de fígado; 4 g/L NaCl; 400 mg/L KCl; 8 g/L Na₂HPO₄; 1 g/L de glicose; 5 g/L triptose; 10 mL de hemina a 0,2% em NaOH (p/v); pH 7,2), suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado (Cultilab), penicilina a 100 U/mL e streptomicina a 100 µg/mL (Invitrogen) final, em estufa a 28° C (Camargo, 1964).

Formas tripomastigotas metacíclicas foram obtidas a partir de culturas de epimastigotas mantidas com o mesmo meio por aproximadamente 15 dias. Células L6 foram infectadas com essas culturas e cultivadas por quatro dias em DMEM (Gibco) suplementado com 10% de soro de cavalo a 34° C com 5% de CO₂, sendo que o meio foi trocado uma vez por dia. Após esse período as células foram cultivadas em DMEM suplementado com 5% de soro fetal bovino. O meio de cultura foi trocado a cada dois dias e após, em média, sete dias de infecção, as formas tripomastigotas foram coletadas do sobrenadante da cultura. As células foram mantidas em meio com 1% de soro fetal bovino enquanto liberavam tripomastigotas.

As amastigotas foram obtidas através do mesmo procedimento de infecção descrito anteriormente. Contudo, após infecção, as células foram cultivadas em meio contendo 5% de soro fetal bovino e mantidas em incubadora a 37° C com 5% de CO₂.

As amastigotas liberadas no meio de cultura pelas células foram coletadas por centrifugação a 3000 rpm por 10 min em centrífuga Eppendorf 5810R.

2. Curva de crescimento de formas epimastigotas com pTREXGFP ou pTREXAmaGFP.

Formas epimastigotas transfectadas mantidas em meio LIT foram diluídas para a concentração de 2×10^6 parasitos/mL em garrafas de cultura de 25 cm² e cultivadas num volume de 5 mL de meio. A multiplicação dos parasitos foi acompanhada durante 20 dias e as contagens foram feitas num intervalo médio de dois dias cada. Cada contagem foi feita usando câmara de Neubauer de acordo com as instruções do fabricante com o uso do microscópio CX41 (Olympus).

Cada ponto do gráfico é resultado da contagem de uma triplicata e os resultados foram plotados usando o programa GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software). A diferença estatística entre os valores obtidos foi avaliada usando o teste t.

3. Infecção de células HEK293T com tripomastigotas transfectadas com pTREXGFP ou pTREXAmaGFP.

Células HEK293T mantidas em DMEM (Gibco) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Cultilab) foram tripsinizadas e plaqueadas em placas de 24 poços (Corning) contendo lamínulas de vidro circulares esteréis no fundo de cada poço (Glasscyto). 5×10^4 células foram plaqueadas, infectadas com tripomastigotas derivados de cultura celular na proporção de 10:1 e cultivadas na presença dos parasitos durante todo o experimento. As células infectadas foram cultivadas em DMEM suplementado

com 10% de soro fetal bovino e infecção foi avaliada nos períodos de 4, 24 e 48 horas (modificação do protocolo descrito por Staquicini *et al.*, 2010). As células foram coradas com Giemsa de acordo com o protocolo descrito posteriormente.

Os gráficos foram feitos plotando os resultados das contagens das triplicatas de cada experimento com auxílio do programa GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software). A diferença estatística entre os valores obtidos foi avaliada usando o teste de análise de variância.

4. Clonagem das sequências codificadoras de IL-15 e amastina40S nos vetores pDONRZeo, pDEST15 e pDEST17.

Os amplicons correspondentes a IL-15 e à primeira alça extracelular de amastina40, denominada Ama40S, foram amplificados por meio de PCR (Ausubel *et al.*, 2007) em fusão com sequências de recombinação *attB*. Os amplicons foram purificados da reação de PCR por precipitação com PEG 8000\ MgCl₂. Resumidamente, a reação de amplificação foi diluída quatro vezes em T.E. (10 mM Tris-HCl; 1 mM EDTA; pH 7.5-8) e então foi adicionado a solução de PEG 8000 e MgCl₂ para concentração final de 10% PEG e 10 mM MgCl₂. A mistura foi vortexada e centrifugada por 15 min a velocidade máxima. O pellet obtido após centrifugação foi resuspendido em T.E.

A reação de clonagem BP foi feita usando o Gateway BP Clonase™ II Enzyme Mix. Em uma reação de 8 µL foi adicionado o amplicon a ser clonado, 150 ng do vetor pDONR e o mix de recombinação contendo a enzima no tampão apropriado. A reação

foi feita a 25° C por 1 hora e metade desta foi usada em transformação de bactérias quimiocompetentes *E. coli* da cepa XL-1 Blue como descrito abaixo.

A clonagem das regiões codificadoras de IL-15 e amastina40S do vetor pDONRZeo para pDEST15 ou pDEST17 foi feita por meio de recombinação usando o Gateway LR Clonase™ II Enzyme Mix (Invitrogen). A reação de recombinação foi feita usando 150 ng do vetor contendo o DNA a ser transferido e do vetor de destino. Os vetores de destino pDEST15 e pDEST17 (Invitrogen) produzem as proteínas recombinantes em fusão com GST e histidinas, ambos N-terminal, respectivamente. Após a adição do mix de recombinação, a reação foi incubada a 25° C por 1 hora. Bactérias quimiocompetentes *E. coli* da cepa BL21 AI (Invitrogen) foram transformadas por choque térmico como descrito a seguir.

5. Transformação de *E. coli* quimiocompetente

Células quimiocompetentes de *E. coli* cepa XL1-Blue ou BL21AI (Invitrogen) foram transformadas com os plasmídeos citados anteriormente. De maneira resumida, a transformação foi feita adicionando às bactérias competentes o DNA a ser clonado e incubando a suspensão por 30 minutos no gelo. Um choque térmico de 42° C foi dado nas bactérias seguido por uma incubação de 1 minuto no gelo. 500 µL de meio 2XYT foram adicionados nas culturas e estas foram incubadas a 37° C por 1 hora. A cultura transformada foi plaqueada em placas contendo meio 2XYT semi sólido com antibiótico apropriado e incubada por 16 horas a 37° C (Ausubel *et al.*, 2007).

6. Purificação de DNA plasmidial

Os vetores pDEST15 e pDEST17 nos quais estão clonados as regiões codificadoras de IL-15 e amastina40 foram purificados usando o kit de extração Nucleospin Plasmid (Macherey-Nagel). As colônias transformadas foram inoculadas em 5 mL de meio de cultura 2XYT contendo antibiótico apropriado e incubadas a 37° C por 16 horas. A extração foi feita de acordo com o manual do fabricante e o DNA extraído foi eluído em tampão 5 mM de Tris-HCl pH 8,0.

Os plasmídeos usados na transfecção de células, pEGFP (Clontech) e pIL15, foram purificados usando o kit QIAGEN Plasmid Maxi Kit (Qiagen). Colônias transformadas com esse plasmídeos foram inoculadas em 10 mL de 2XYT contendo antibiótico apropriado e incubadas a 37° C por 16 horas. Esses inóculos foram diluídos 1:50 em 400 mL de meio fresco contendo antibiótico apropriado e incubadas a 37° C por 16 horas. A cultura foi centrifugada a 6000 rpm por 15 min em centrífuga Hitachi CR21GII e o pellet usado na extração do DNA plasmidial. Os DNAs obtidos foram quantificados por absorvância a 260 nm no aparelho GeneQuant (GE Healthcare) e analisados em gel de agarose.

7. Expressão das proteínas recombinantes TcX71.40S e IL-15 em fusão com histidinas ou GST

Células de *E. coli* da cepa BL21AI (Invitrogen) foram transformadas de acordo com o protocolo descrito anteriormente com os plasmídeos pDEST15TcX71.40S e pDEST17IL-15, para produção de amastina em fusão com GST e IL-15 em fusão com

histidina respectivamente. A indução dos transformantes foi feita de acordo com o manual do fabricante: 1 colônia foi inoculada em 10 mL de meio de cultura contendo ampicilina a 100 µg/mL e cultivado a 37° C durante 16 horas. Esse inóculo foi diluído aproximadamente 1:50 em meio fresco contendo os antibióticos apropriados e cultivada até OD₆₀₀ 0,4. Nesse momento foi adicionada solução de L-arabinose (Sigma) para concentração final de 0,2% e a expressão dos genes de interesse foi feita durante 3 ou 16 horas.

O mesmo protocolo foi usado para expressão de GST em células de *E. coli* da cepa XL1-Blue (Invitrogen) transformadas com o vetor pGEX4T2 (GE Healthcare).

8. Eletroforese em gel de acrilamida contendo SDS (SDS-PAGE)

As amostras protéicas foram preparadas em tampão apropriado contendo 125 mM de Tris Cl, 20% glicerol, 4% SDS, 0,2% de 2-mercaptoetanol e 0,001% de azul de bromofenol. Previamente à eletroforese, as amostras foram fervidas ou aquecidas a 37° C por 30 minutos. As proteínas foram separadas de acordo com o protocolo descrito por Ausubel *et al.* (2007) em gel de poliacrilamida 14% a 200 volts por uma hora. Os géis foram corados com solução de azul de comassie 0,1% em metanol:ácido acético:água (5:2:2) por 2 horas, seguida por descoloramento com solução aquosa 30% metanol e 10% ácido acético. A coloração pela prata foi feita com o kit PlusOne Silver Staining (Pharmacia Biotech) conforme instruções do fabricante. Como padrão de peso molecular foi usado o Low Molecular Weight (GE Healthcare).

9. “Western blot”

Extratos totais de 8×10^6 epimastigotas lisados em tampão de amostra para eletroforese foram submetidos a SDS-PAGE e transferidos para membrana de nitrocelulose Hybond-ECL (GE Healthcare) a 100 volts, na temperatura de 4° C por uma hora. A membrana foi bloqueada com leite desnatado Molico 5% em TBS (100 mM de Tris-HCl pH 7,5; 150 mM de NaCl) com 0,1% de Tween 20 por no mínimo duas horas. Os anticorpos anti-Histidina (GE Healthcare), anti-GST (GE Healthcare), anti-IL15 (R e D Systems) e anti-GFP (Santa Cruz) foram diluídos em TTBS (TBS contendo 0,1% de Tween 20) e incubados durante 2 horas. A membrana foi lavada 3 vezes durante 15 minutos cada com TTBS e incubada com anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase (GE Healthcare) ou anti-IgG de cabra conjugado com peroxidase (Signalabs) 1:9000 durante 2 horas. A membrana foi lavada novamente com TTBS 3 vezes de 15 minutos cada e revelada com ECL plus Western blot detection reagents (GE Healthcare) Ausubel *et al.* (2007). A captura da imagem foi feita no aparelho Storm 840 (GE Healthcare).

10. Ensaio de “pull down” *in vitro*

Pellets de 50 mL de cultura de bactéria induzida a produzir GST ou GST::TcX71.40S foram ressuspensos em 2 e 1 mL de PBS respectivamente. Foi adicionada lisozima para concentração final de 100 µg/mL seguida por incubação de 15 min no gelo. As bactérias foram lisadas através de 5 ciclos de congelamento e descongelamento, o lisado resultante foi passado por uma seringa e centrifugado a 16000 xg por 10 minutos a 4° C. O sobrenadante obtido da amostra induzida de GST foi

reservado. Os pellets das amostras restantes foram solubilizados em 500 µL de solução contendo 1% Sarkosyl (USB) e 1,5% Triton X-100 (BioRad). As frações solubilizadas foram centrifugadas a 16000 xg por 10 minutos a 4° C e o sobrenadante foi coletado. As amostras foram adicionadas a um coquetel de inibidor de proteases (Amresco). As proteínas solúveis em fusão com GST foram ligadas na resina glutationa sepharose 4B (GE Healthcare) após incubação por 2 horas a 4° C. A resina contendo as proteínas ligadas foi coletada por centrifugação a 500 xg por 5 min e lavada três vezes com PBS. Para incubar IL-15::his com GST ou GST::TcX71.40S, pellets de cultura de bactérias produtoras de IL-15::his foram lisadas da mesma maneira citada anteriormente. A fração insolúvel do lisado foi ressuspensa em solução 2 M de uréia e centrifugada a 16000 xg por 10 minutos a 4° C. O sobrenadante contendo as proteínas solúveis foi incubado com resina glutationa sepharose contendo GST ou GST::TcX71.40S por 16 horas a 4° C. Após incubação, as resinas foram lavadas três vezes com PBS e coletadas por centrifugação a 500 xg por 5 min a 4° C.

As proteínas ligadas à resina foram eluídas com tampão de amostra para SDS-PAGE (tampão composto por 500 mM Tris-HCl; 0,4% de SDS pH 6,8; acrescido de SDS 10%, β-mercaptoetanol a 4%; glicerol 40%) e fervidas por 10 min (Ausubel *et al.*, 2007). Após separação por SDS-PAGE, as proteínas foram analisadas por “Western blot” com os anticorpos apropriados.

11. Cultura e transfecção de células HEK293T.

Células HEK293T foram cultivadas em meio DMEM (Gibco) suplementado com 10% de soro fetal bovino. Para transfecção, essas células foram desaderidas da garrafa por tripsinização e ressuspensas em DMEM contendo 10% de soro fetal bovino. 5×10^4 células foram semeadas em placas de 24 poços contendo lamínulas de vidro redondas (Glasscyto) no fundo de cada poço e transfectadas 24 horas após repique.

As células foram transfectadas com os plasmídeos pEGFP (Clontech) e pIL15, cedido gentilmente pelo prof^o Thomas A. Waldmann, com auxílio do reagente FuGene (Roche), ou Lipofectamina 2000 (Invitrogen) ou PEI (polietilimina), para mais informações acerca do último reagente ver revisão escrita por Godbey *et al.* (1999). As quantidades de reagentes e DNA usadas correspondem à quantidade necessária para a transfecção de células cultivadas em um poço de placa de 24 poços e são recomendadas pelos fabricantes dos reagentes.

A transfecção com Fugene foi feita misturando o plasmídeo para expressão de IL-15 com o reagente na proporção de 2 μ g DNA para 3 μ L de reagente em 100 μ L de meio DMEM sem antibiótico e sem soro fetal bovino. O mix de transfecção foi homogeneizado e incubado por 15 minutos a temperatura ambiente. Após esse período, o mix foi adicionado às células.

A transfecção com Lipofectamina 2000 foi feita diluindo 2 μ L do reagente e 0,8 μ g do DNA em 50 μ L de DMEM sem soro em dois tubos separados. Após 5 minutos, o conteúdo dos tubos foi homogeneizado e incubados juntos durante 20 minutos. Depois da incubação, o mix de transfecção foi adicionado nos poços.

Por fim, a transfecção com polietilimina foi feita diluindo 5 μL do reagente e 2 μg do DNA em 100 μL de DMEM sem soro. O conteúdo do tubo foi homogeneizado e incubado durante 10 minutos à temperatura ambiente. 200 μL de DMEM com 10% de soro fetal bovino foram adicionados no tubo. O meio dos poços a serem transfectados foi trocado por meio novo e então o mix de transfecção foi adicionado em cada. A eficiência de transfecção foi avaliada por meio de microscopia de fluorescência com o uso do microscópio invertido de fluorescência Axio Observer (Zeiss) acoplado a câmera AxioCam Mrc (Zeiss).

12. Imunofluorescência para detecção de IL-15.

As células cultivadas em lamínulas de vidro foram lavadas com PBS e fixadas com solução de paraformaldeído 4% a 4° C por 15 minutos. Após fixação, as células foram lavadas três vezes com solução de PBS contendo Triton X-100 5% durante 5 minutos cada. O bloqueio foi feito com PBS contendo 1% BSA, Triton X-100 0,5% e soro de cabra 5% durante 1 hora e a incubação com anticorpo anti-IL-15 (R e D Systems) diluído 1:400 em PBS com 0,1% BSA foi feita durante 2 horas. Então as células foram lavadas três vezes com PBS durante 5 minutos cada e incubadas com anticorpo anti-IgG de cabra conjugado com Alexa555 (Molecular Probes) por 1 hora. As células foram lavadas novamente com PBS como descrito anteriormente e então as lamínulas foram montadas sobre as lâminas com Hydromount (National Diagnostics) e seladas com esmalte comum. As imagens foram capturadas em microscópio invertido de fluorescência Axio Observer (Zeiss) acoplado a câmera AxioCam Mrc (Zeiss).

13. Infecção de células HEK293T com *T. cruzi* após transfecção para expressão de IL15.

Células HEK293T foram transfectadas com plasmídeo para expressão de IL-15 intracelular e após 24 horas de transfecção, foram infectadas com tripomastigotas do clone CL Brener por um período de 48 e 72 horas. A infecção, a contagem das células infectadas e das amastigotas intracelulares e as análises estatísticas foram feitas como descrito no item 3 dessa seção.

14. Coloração de Giemsa

A carga parasitária e o número de células infectadas foram avaliados através da contagem do número de células infectadas e do número de amastigotas após tempos variados de infecção. Esses valores eram obtidos a partir da contagem de 250 células, incluindo infectadas e não infectadas, e do número total de amastigotas após coloração com Giemsa. O protocolo de coloração foi adaptado a partir da técnica descrita por Giaimis *et al.* (1992). As células cultivadas sobre lamínulas de vidro circulares (Glasscyto) foram lavadas com PBS e fixadas por no mínimo 20 minutos com metanol gelado. Após fixação, as células foram coradas por 10 a 15 minutos com uma solução de Giemsa preparada na hora pela adição de 2 gotas de corante por mililitro de água.

Após coloração, as lamínulas contendo as células foram montadas sobre as lâminas com Entellan (Merck). O número de células infectadas, não infectadas e o

número de amastigotas foram determinados através de contagem em microscópio CX41 (Olympus).

15. Extração de RNA de parasitos

RNA de formas amastigotas, epimastigotas e tripomastigotas foi extraído usando o RNeasy Mini Kit (Qiagen). 3×10^8 parasitos foram coletados por centrifugação e o RNA foi extraído conforme instruções do fabricante. A eluição do RNA foi feita com água e a concentração deste na amostra foi determinada através de absorbância a 260 nm no espectrofotômetro GeneQuant (GE Healthcare).

16. “Northern blot”

As amostras de RNA foram submetidas à eletroforese em géis de agarose 1,2% em tampão MOPS pH 7,0 (20 mM de MOPS; 5 mM de acetato de sódio e 1 mM de EDTA) e formaldeído 5% (Teixeira *et al.*, 1995). A cada amostra foram adicionados 2,5 μ L de tampão da amostra (0,75 mL de formamida; 0,15 mL de tampão MOPS 10x; 0,24 mL de formaldeído; 0,1 mL de água livre de DNase/RNase; 0,1 mL de glicerol e 0,08 mL de azul de bromofenol a 10%). As amostras foram incubadas por 15 minutos a 65° C e a elas foi adicionado 1 μ L de uma solução de brometo de etídio a 1,0 mg/mL antes da aplicação no gel. A eletroforese foi feita a 100 volts durante 3 horas à temperatura ambiente.

Após eletroforese, os géis foram tratados 2 vezes com SSC 10x (3 M de NaCl, 0,3 mM de citrato de sódio; pH 7,0) por 20 minutos. Os RNAs foram transferidos por capilaridade, em SSC 10x, para membranas de nylon Hybond-N (GE Healthcare) previamente tratadas com SSC 10x por 5 minutos. Após a transferência, as membranas foram lavadas com SSC 6x e os RNAs imobilizados na membrana através de irradiação com luz UV no aparelho UVStratalinker (Stratagene) (Ausubel *et al.*, 2007). As membranas foram pré-hibridadas por 3 horas, a 42° C sob rotação, em solução de formamida a 50%, SSC 6x, Denhardt's 10x, SDS a 0,2% e DNA de esperma de salmão a 75 µg/mL. Em seguida as membranas foram hibridadas por 14 horas a 42° C com 50 µL de sonda purificada, marcada radioativamente com 50 µCi de [α -³²P] dCTP usando o kit Ready-to-go DNA labeled beads dCTP (GE Healthcare) conforme instruções do fabricante. Após a hibridação, as membranas foram lavadas 3 vezes com solução de lavagem (SSC 2x; SDS a 0,1%) a 65° C por 30 minutos e reveladas à temperatura ambiente por 1 dia usando o aparelho Storm 840 (GE Healthcare).

17. Análises de bioinformática

As sequências de amastinas e tuzinas anotadas no genoma de *T. cruzi* foi obtida no banco de dados TritypDB (<http://tritypdb.org/tritypdb/>).

Os alinhamentos das sequências foi feito usando o programa ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) e editado com auxílio do programa BioEdit.

As análises de predição topológica para predição dos domínios transmembrana dos membros da família das amastinas foram feitas usando o programa TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>).

4. Resultados

1. Organização genômica da família multigênica das Amastinas

As formas amastigotas permanecem em constante contato com o hospedeiro após ele ter sido infectado. Os antígenos produzidos nesse estágio do parasito, então, são de maior relevância para a doença de Chagas pois são continuamente apresentados ao sistema imune. Com o interesse de estudar os genes diferencialmente expressos, Teixeira e colaboradores em 1994 descobriram uma nova família multigênica cujos membros eram principalmente expressos no estágio intracelular do parasito. Após o seqüenciamento do genoma do clone CL Brener (El-Sayed *et al.*, 2005) e da montagem feita por Weatherly e cols. em 2009, o número exato de cópias de amastinas e a respectiva localização pôde ser determinada.

Seis cópias de amastinas estão anotadas no genoma do clone CL Brener. Como descrito na Introdução, o genoma desse clone é um genoma híbrido e as diferenças entre os alelos permitem diferenciar os haplótipos correspondentes às cepas parentais denominados “Esmeraldo” e “não Esmeraldo”. Assim, 6 cópias de amastina são similares às encontradas no genoma da cepa Esmeraldo e 6 não similares. Das quatro subfamílias de amastinas descritas por Jackson (2010), representadas pelas letras gregas α , β , γ e δ , *T. cruzi* apresenta somente membros pertencentes às famílias β , e δ (Figura 4). Os membros da família δ estão presentes nos cromossomos 26 e 34 enquanto as β amastinas estão localizadas no cromossomo 32. Além disso, assim como nas amastinas de leishmania, genes de tuzina em associação com genes de amastinas somente são observados com membros que pertencem à subfamília δ .

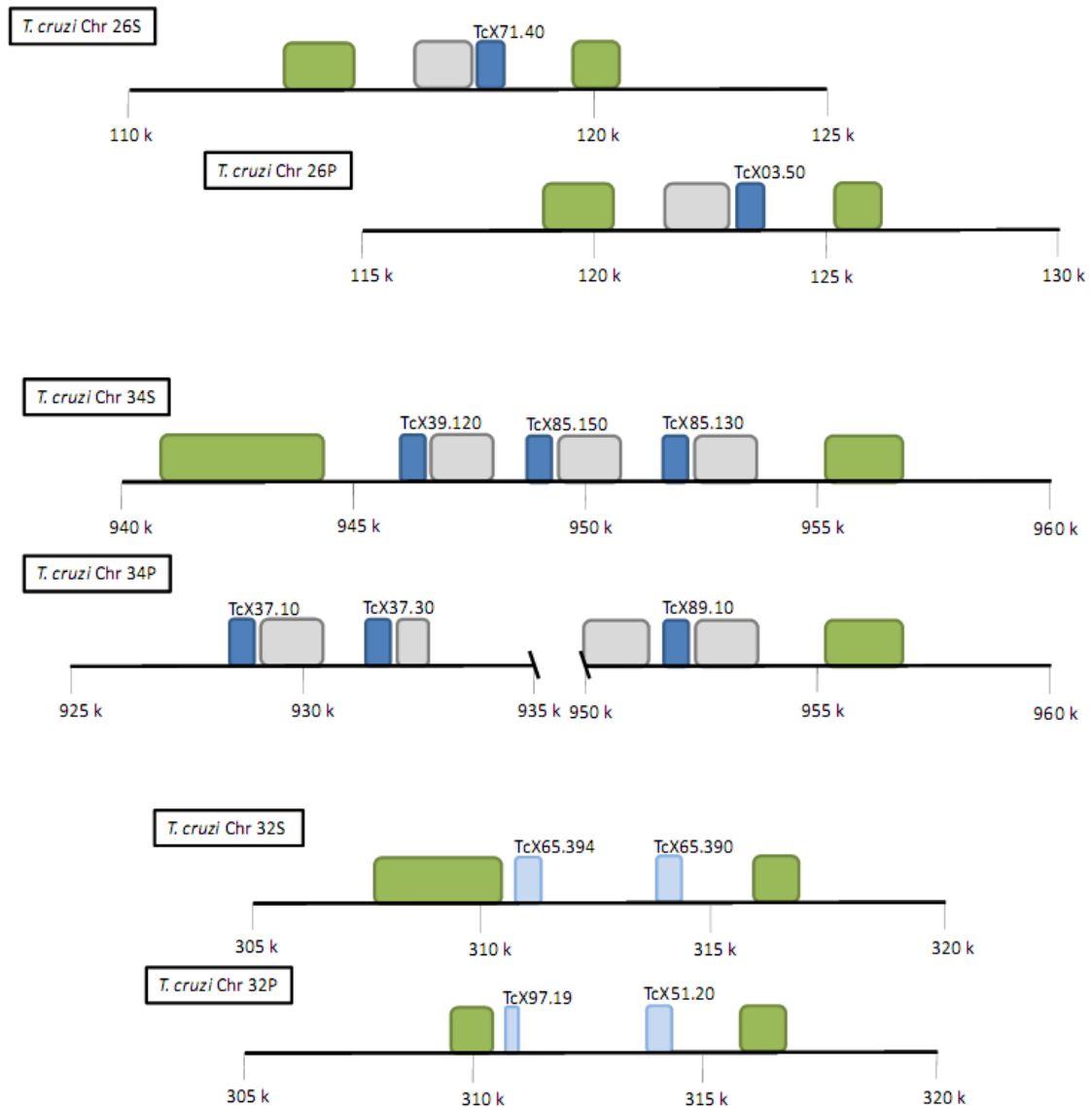


Figura 4: Organização genômica das amastinas de *T. cruzi* do clone CL Brener. Os cromossomos estão representados pelas linhas e os genes das amastinas pelas caixas de cor azul, sendo azul escuro para δ amastinas e azul claro para β amastinas. Os genes de tuzinas e os genes adjacentes estão representados pelas caixas de cor cinza e de cor verde respectivamente. Acima de cada amastina está indicada parte de seu identificador. O número do cromossomo está indicado acima de cada e a letra S designa cromossomos do haplótipo Esmeraldo e a letra P designa cromossomos do haplótipo não Esmeraldo. O número abaixo de cada cromossomo indica a posição física dos genes.

2. Análise comparativa *in silico* das diferentes amastinas de *T. cruzi*

De acordo com a divisão da família das amastinas proposta por Jackson (2010), *T. cruzi* apresenta membros oriundos de duas subfamílias distintas. As amastinas de *T. cruzi* são genes que possuem em torno de 500 pares de bases os quais codificam proteínas de aproximadamente 174 aminoácidos, com uma massa de 19,5 kDa (Teixeira *et al.*, 1994). O alinhamento das amastinas de *T. cruzi* e das amastinas presentes nas espécies do gênero *Leishmania*, as quais possuem um número de amastinas muito maior do que *T. cruzi*, mostrou que todas as amastinas possuem quatro hélices hidrofóbicas em sua estrutura (Rochette *et al.*, 2005). Esses domínios estariam intercalados com duas alças voltadas para o exterior da célula amastigota e as regiões N e C terminais estariam voltadas para o citoplasma do parasito.

Para comparar as sequências de aminoácidos das amastinas de *T. cruzi*, as sequências obtidas do banco de dados “TriTrypDB” foram alinhadas com auxílio do programa ClustalW2. Além disso, com a finalidade de investigar se a estrutura de todas as amastinas de *T. cruzi* seguem um padrão, a predição da estrutura topológica com a indicação das possíveis hélices transmembrana e dos domínios extra e intracelulares foram determinadas com auxílio do programa TMHMM. O alinhamento da sequência protéica das amastinas está mostrado na Figura 5 e a análise topológica de cada proteína está representada na Figura 6.

O alinhamento das amastinas de *T. cruzi* mostra que os membros de amastinas são diferentes entre si principalmente na região predita como extracelular, onde a variação de aminoácidos é maior. Nas outras regiões, principalmente nas regiões transmembrana, há variação, mas em geral as substituições são sinônimas (Cerqueira

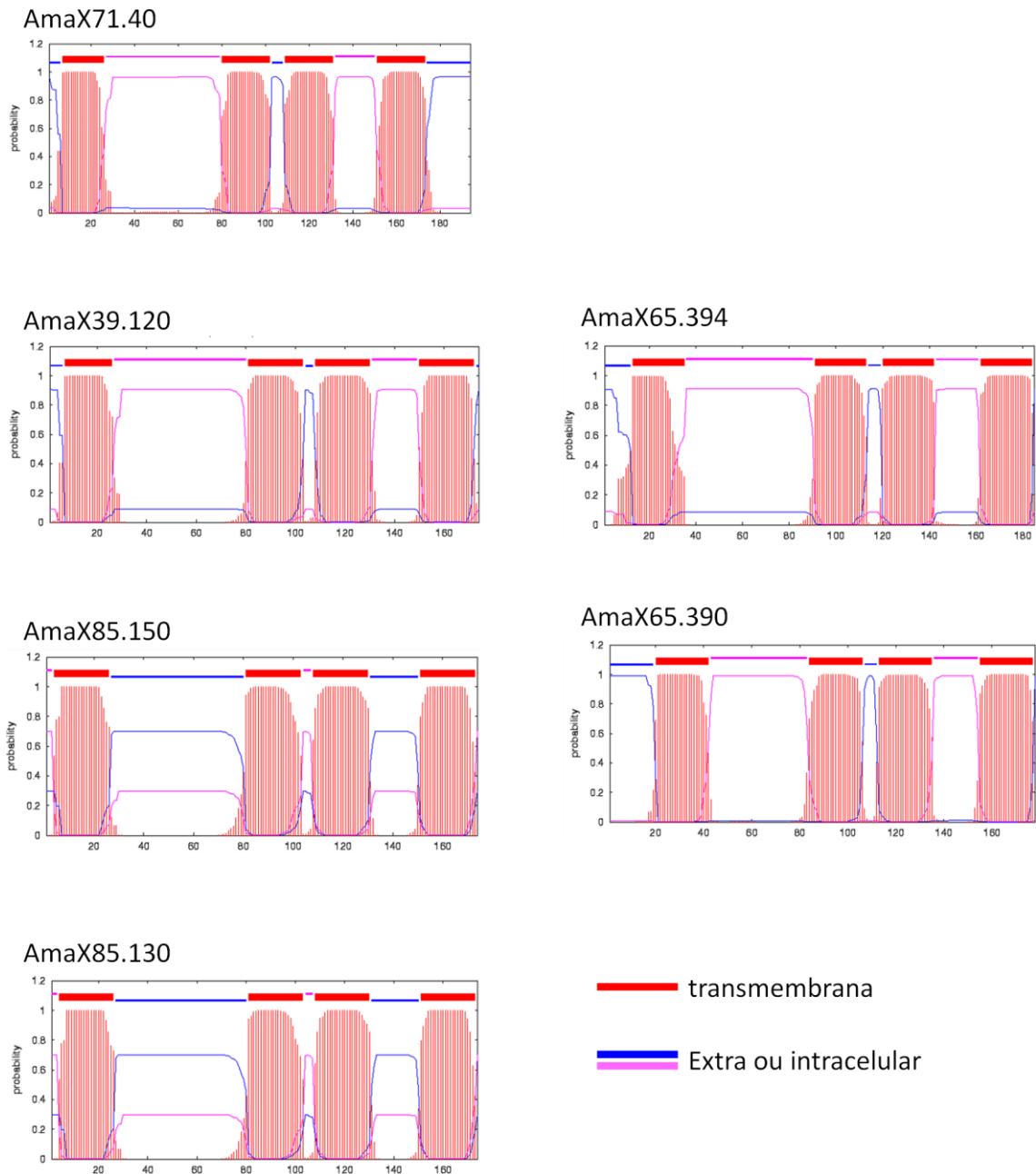


Figura 6: Análise topológica das amastinas de *T. cruzi*. As sequências anotadas como amastinas no banco de dados TriTrypDB foram analisadas pelo programa TMHMM quanto à presença de regiões transmembrana. No eixo vertical do gráfico está indicada a probabilidade de determinado aminoácido da sequência, mostrado pelo eixo horizontal, de estar num segmento transmembrana ou extra ou intracelular. Os gráficos à esquerda e à direita correspondem à análise da topologia das δ e β amastinas respectivamente. Parte dos identificadores de cada amastina analisada está indicada acima de cada gráfico. Na porção superior do gráfico está indicado o resultado da análise com cada domínio representado por cores sendo vermelho para domínios transmembrana e azul e rosa para domínios intra e extracelular.

et al., 2008). Apesar da diferença entre os membros, os alelos de um mesmo gene de amastina são praticamente idênticos, com algumas substituições somente. A amastina AmaX97.19 depositada no banco de dados não está completa e por isso só está mostrada os primeiros 96 aminoácidos da proteína anotada.

A análise topológica das amastinas corrobora com o padrão estabelecido previamente na literatura. A predição da estrutura resulta em uma proteína com quatro hélices transmembrana separados por domínios extracelulares de tamanhos diferentes os quais carregam maior parte da variação de aminoácidos observada. O primeiro domínio hidrofóbico seria o peptídeo sinal que sofreria clivagem ao gerar a proteína madura. O domínio extracelular maior possui em torno de 52 aminoácidos de tamanho e somente TcX65.390 apresenta esse mesmo domínio com tamanho de 40 aminoácidos. O domínio extracelular menor apresenta em média um tamanho de 18 aminoácidos.

Diferente dos outros membros presentes em *T. cruzi*, as amastinas TcX71.40 e seu alelo TcX03.50, e TcX39.120 apresentam uma porção adicional de 20 aminoácidos na extremidade C-terminal, que está ausente nos outros membros de amastinas de *T. cruzi*. Ao contrário do que ocorre em TcX71.40, essa porção é predita como um domínio transmembrana nas outras amastinas.

As β amastinas são bem diferentes das δ amastinas, apesar de possuírem a mesma topologia do que a predita para os outros membros. Do mesmo modo que ocorre no outro grupo, os alelos de β amastinas são muito mais parecidos entre si do que as cópias *in tandem* no mesmo cromossomo. Além disso, as β amastinas possuem

um tamanho idêntico de 186 aminoácidos enquanto uma variação no tamanho da sequência está presente entre os membros da subfamília δ .

3. Expressão das β amastinas nos diferentes estágios de *T. cruzi*.

De acordo com a sequência publicada de amastina do clone TcA21 da cepa Tulahuén por Teixeira e cols em 1994 e de acordo com a classificação proposta por Jackson (2010), sabe-se que o gene presente no clone TcA21 corresponde a uma δ amastina. Estudos posteriores em *Leishmania* mostraram que as amastinas da família δ também são expressas principalmente no estágio amastigota do parasito (Rochette *et al.*, 2005).

Sabendo que as δ amastinas são mais expressas em amastigotas, um dos objetivos desse trabalho foi avaliar a expressão das amastinas da subfamília β . Para isso o ensaio de “Northern blot” foi feito com RNA total de epimastigotas, tripomastigotas e amastigotas. As amostras de RNA foram separadas por eletroforese e transferidas para membranas. A detecção dos transcritos foi feita com o uso de sondas radioativas específicas desenvolvidas a partir da região codificadora dos genes TcX65.394 e TcX65.390.

A hibridação das membranas com as sondas revelou somente um transcrito para o gene TcX65.390 com aproximadamente 1,9 Kb e dois transcritos de tamanhos diferentes para o gene TcX65.394, um de tamanho aproximado de 1,9 kb e outro menor que 1,3 kb, como pode ser observado na Figura 7. Assim como as δ amastinas, as β amastinas foram detectadas somente nas amostras de RNA de amastigotas.

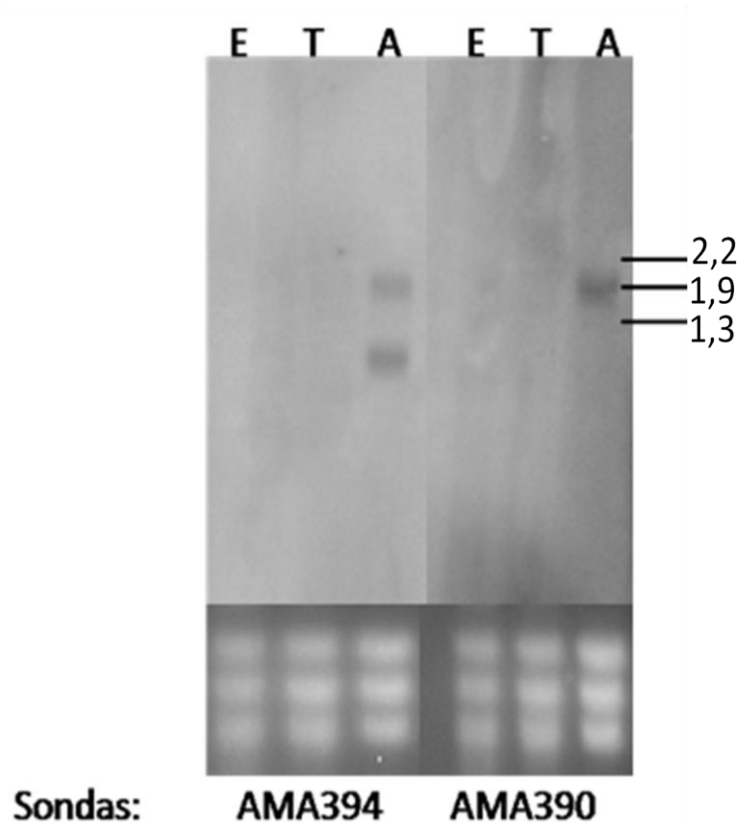


Figura 7: “Northern blot” de amostras de RNA total de diferentes estágios de *T. cruzi*. RNA total de epimastigotas (E), tripomastigotas (T) e amastigotas (A) foi separado por eletroforese, transferido para membranas e hibridado com sondas para detecção de mRNA de TcX65.394 e TcX65.390. As sondas estão indicadas abaixo de cada foto. Fotos dos géis mostrando as bandas correspondentes aos rRNAs corados com brometo de etídio estão indicadas abaixo da respectiva membrana hibridada. À direita estão indicados os tamanhos das bandas de rRNAs na membrana em kb.

4. Geração de linhagens de *T. cruzi* expressando amastina em fusão com GFP.

Para obter a expressão de amastina em *T. cruzi*, a região codificadora do clone TcA21 foi clonada gerando o vetor pTREXAmagFP (DaRocha *et al.*, dados não publicados) de forma que os parasitos transfectados pudessem ser monitorados pela visualização da fluorescência. Uma representação esquemática dos vetores pTREXGFP e pTREXAmagFP pode ser observada na Figura 8.

Culturas da cepa G transfectadas com esses plasmídeos foram gentilmente cedidos pelo grupo do prof^o Dr. Renato Arruda Mortara da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP). Resumidamente, epimastigotas foram transfectados com os plasmídeos pTREXGFP e pTREXAmagFP de acordo com o protocolo descrito por DaRocha *et al.* (2004), clonados e selecionados com G418. Os parasitos transfectados expressando a proteína verde fluorescente isolada ou em fusão com amastina (TcA21) podem ser observados na Figura 9. Os parasitos expressando somente GFP exibem uma fluorescência verde difusa por toda célula e de intensidade muito maior em comparação com parasitos não transfectados ou expressando Ama::GFP. Esses últimos apresentam uma fluorescência menor e mais concentrada nas bordas do parasito, indicando a localização da proteína Ama::GFP na membrana plasmática. Ao contrário dos parasitos transfectados, os parasitos selvagens não exibem nenhuma fluorescência detectável.

Além da confirmação da expressão das proteínas feita por microscopia de fluorescência, extratos totais dos parasitos transfectados foram submetidos a eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS e “Western blot” com anticorpos anti-GFP. A imagem obtida após revelação da membrana pode ser observada na Figura 10.

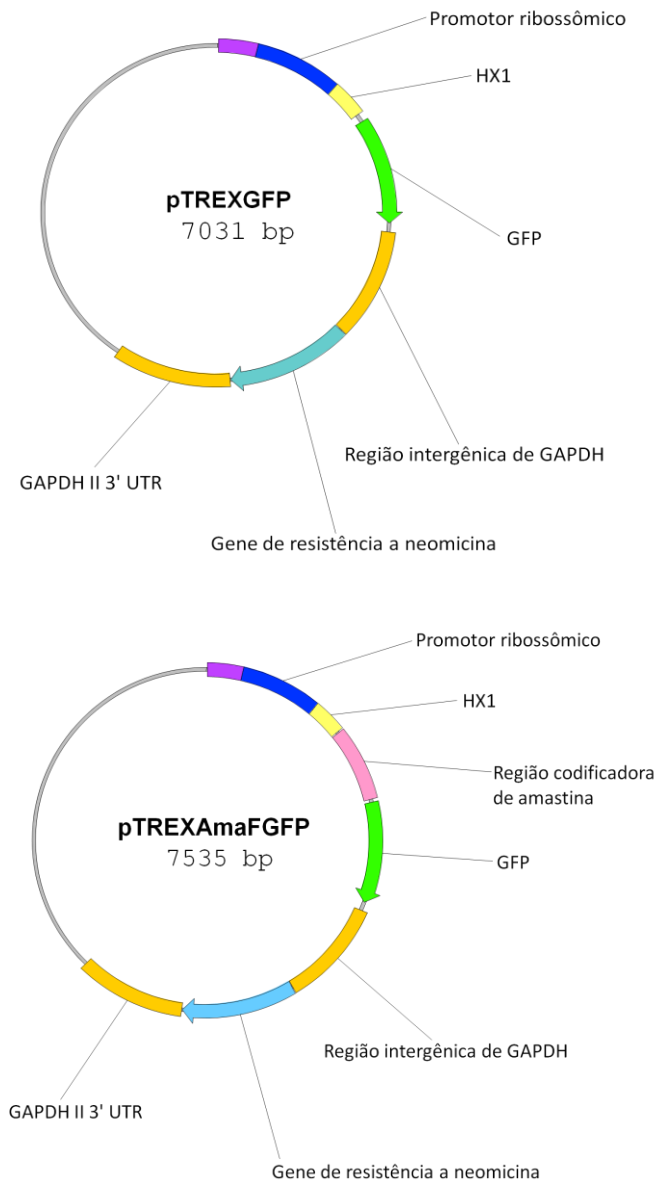


Figura 8: Mapa do vetor pTREXGFP e pTREXAmaGFP. A região codificadora GFP está indicada em verde. A região codificadora do clone Tca21 foi clonada em fusão com GFP gerando o vetor pTREXAmaGFP. Abaixo do nome do vetor está indicado o tamanho total em pares de bases (pb). As linhas conectam a designação de cada parte do vetor representada pelas caixas coloridas. Os sítios de restrição estão omitidos.

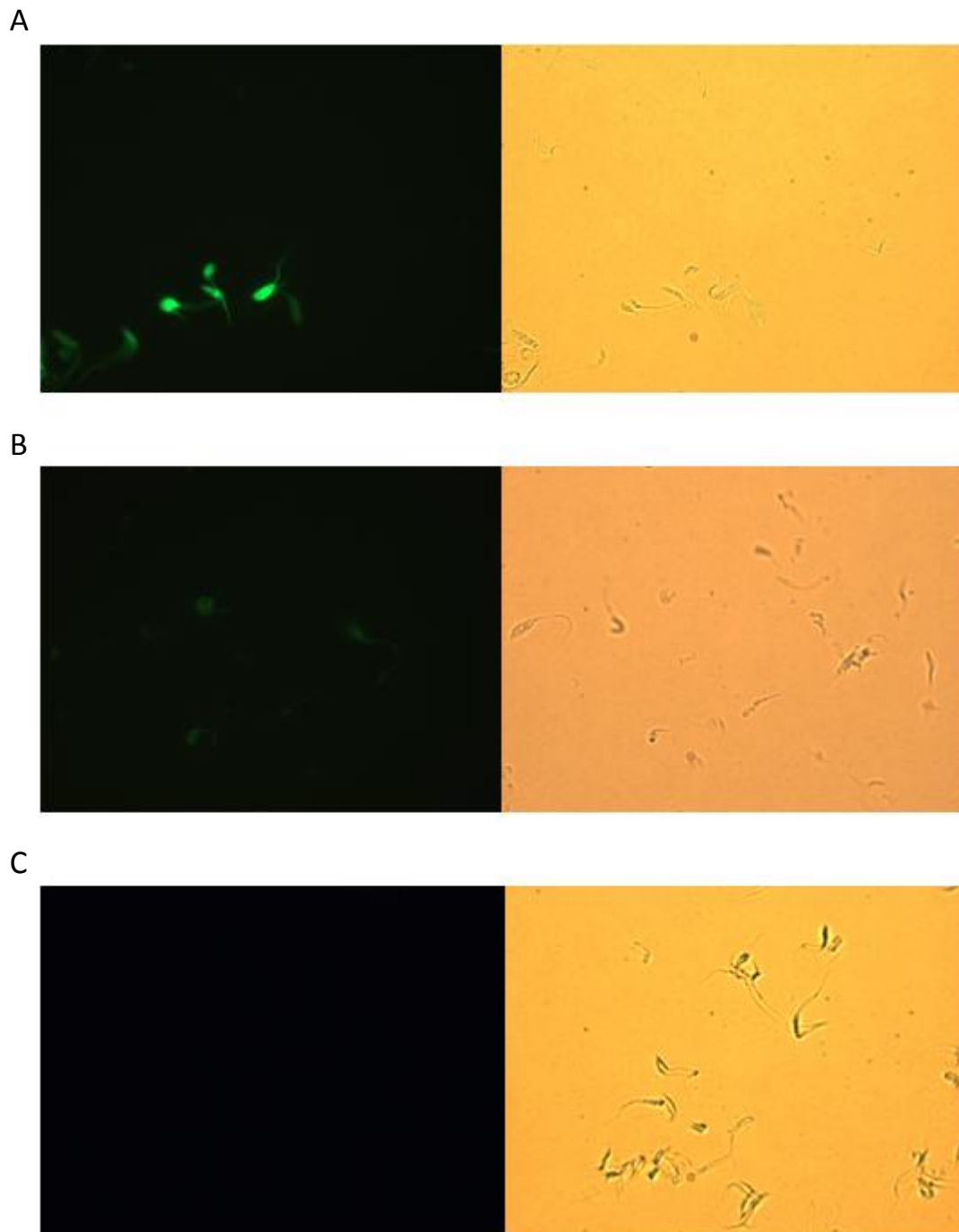


Figura 9: Expressão de GFP e Ama::GFP em formas epimastigotas da cepa G. Formas epimastigotas da cepa G expressando (A) GFP, (B) Ama::GFP e (C) a cepa G não transfectada foram fotografadas em aumento de 100 vezes. À esquerda estão as imagens fluorescentes dos parasitos e à direita as respectivas imagens de campo claro.

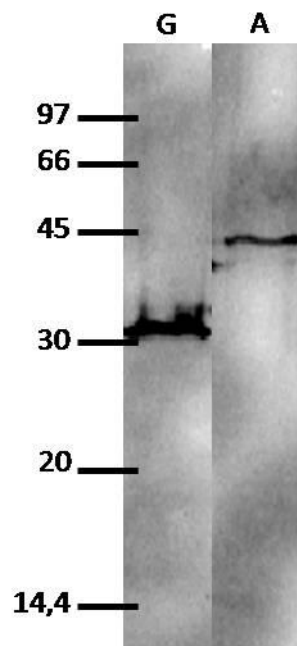


Figura 10: “Western blot” de extratos proteicos totais de epimastigotas transfectadas com pTREXGFP e pTREXAmaGFP. Extratos totais de 8×10^6 parasitos foram submetidos a SDS-PAGE e as proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose. As proteínas foram detectadas com anticorpo anti-GFP e anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase na diluição de 1:1000 e 1:2000 respectivamente. À esquerda da imagem está indicada a massa das bandas do padrão em kDa. Acima de cada canaleta está indicada a amostra sendo G para extrato de epimastigotas expressando GFP e A para extrato de epimastigota expressando Ama::GFP.

Nela é possível observar uma única banda de tamanho aproximado de 30 kDa referente a GFP e outra banda de tamanho aproximado a 45 kDa referente a amastina em fusão com GFP. Ambas as proteínas possuem peso molecular compatível com o peso molecular esperado de 26 kDa para GFP e 41 kDa para Ama::GFP.

5. Curva de crescimento de epimastigotas transfectados com GFP e AmaGFP.

Os parasitos transfectados com pTREXGFP e pTREXAmaGFP foram mantidos em meio LIT. Para monitorar o crescimento das epimastigotas, uma diluição para 2×10^6 parasitos/mL foi feita e a proliferação foi acompanhada durante 20 dias por meio de contagem em câmara de Neubauer. Os dados obtidos foram submetidos a testes estatísticos e a curva resultante pode ser observada na Figura 11.

O resultado do teste estatístico indica que há uma diferença significativa entre as médias dos pontos analisados da curva de crescimento de epimastigotas expressando GFP ou Ama::GFP. Apesar de proliferarem de maneira similar, os parasitos que expressam Ama::GFP são capazes de alcançar uma densidade maior no meio de cultura em comparação com os parasitos expressando a proteína fluorescente sozinha.

Até do dia 6 da curva de crescimento, tanto o clone que expressa GFP quanto o que expressa Ama::GFP apresentaram mesma densidade na cultura. A partir desse ponto, o clone que expressa Ama::GFP continuou proliferando chegando a alcançar uma densidade máxima de 7×10^7 parasitos/mL. Enquanto isso, o clone que expressa GFP mantém uma densidade menor que alcançou o máximo de $6,3 \times 10^7$ parasitos/mL.

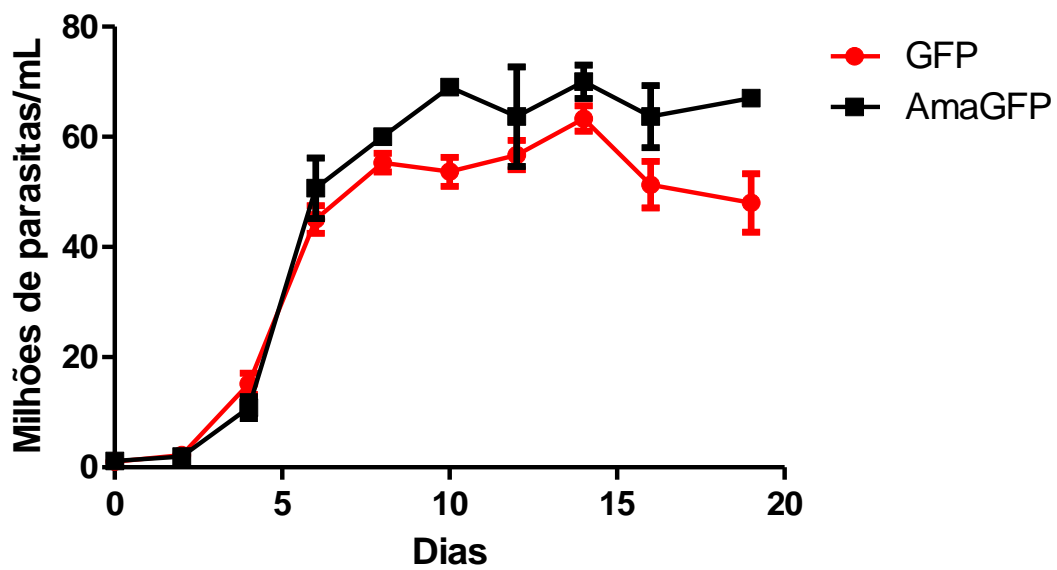


Figura 11: Curva de crescimento de formas epimastigotas transfetadas com pTREGFP e pTREXAmaGFP. Epimastigotas mantidas em LIT foram diluídas para 2×10^5 parasitos/mL e o crescimento dos parasitos foi monitorado durante 20 dias. Os pontos representam a contagem de triplicatas. No eixo x estão indicados os dias e no eixo y a concentração de parasitos. A legenda do gráfico encontra-se à direita. Os dados foram submetidos ao teste t com $p < 0,05$.

É importante ressaltar que ao longo do experimento não foi observada nenhuma alteração de morfologia das epimastigotas.

6. Multiplicação de amastigotas intracelulares expressando GFP e Ama::GFP

Com a finalidade de investigar se os parasitos que expressam Ama::GFP possuem maior taxa de proliferação também no estágio amastigota, células HEK293T foram infectadas com tripomastigotas transfectadas na proporção de 10 parasitos por célula hospedeira. O número de amastigotas foi determinado em diferentes tempos por meio da contagem dos parasitos dentro das células infectadas, além da porcentagem de células infectadas.

Os dados da Figura 12A mostram que a expressão de Ama::GFP não afetou de forma estatisticamente significativa a porcentagem de células infectadas nem o número de amastigotas por célula infectada, em comparação com parasitos expressando GFP nos tempos observados. A média de células infectadas com parasitos expressando GFP ou Ama::GFP no período de 4 horas foi de 21,52 e 30,46%. Esses valores aumentaram para 75,94 e 86,8%; 87,9 e 90,02% nos períodos de 24 e 48 horas respectivamente.

A expressão de Ama::GFP também não afetou o número de amastigotas intracelulares por célula infectada. A média de amastigotas por célula infectada no período de 4 horas após infecção foi de 2,26 nas células infectadas com parasitos expressando GFP e de 1,75 para células infectadas com parasitos expressando Ama::GFP. Esses valores aumentaram para 4,25 e 4,53 no período de 24 horas e depois

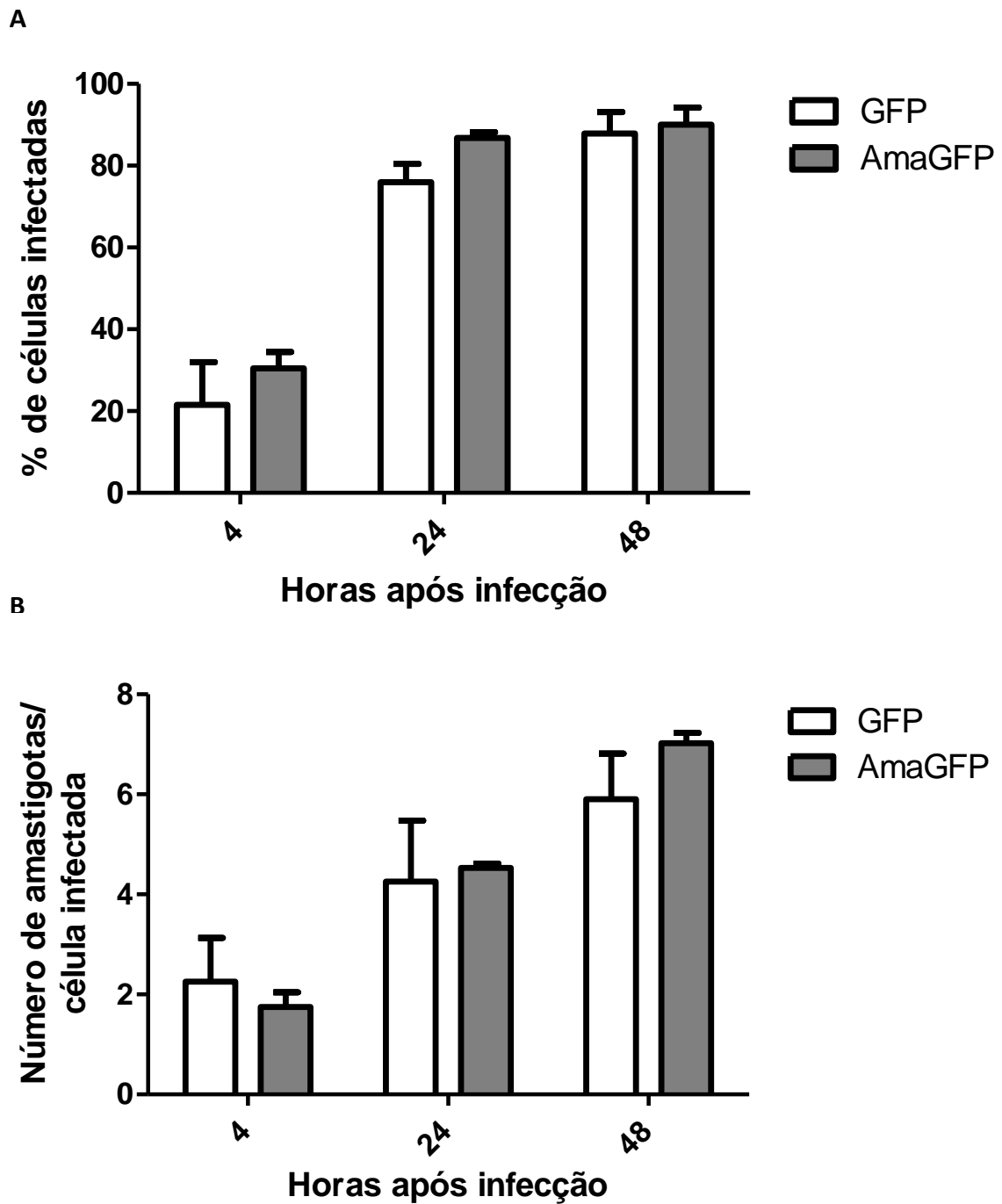


Figura 12: Taxa de infecção e número de amastigotas por célula infectada em células HEK293T infectadas com tripomastigotas expressando GFP ou Ama::GFP. Células HEK foram infectadas na proporção de 10:1 com tripomastigotas derivados de parasitos transfectados com pTREXGFP ou pTREXAmaGFP. **(A)** Porcentagem de células infectadas em diferentes tempos de infecção. **(B)** Número de amastigotas por célula infectada. No eixo x do gráfico estão indicados os tempos de infecção. A legenda de cada gráfico encontra-se à direita.

aumentaram para 5,9 e 7,02 no período de 48 horas como mostrado na Figura 12 B.

7. Possíveis interações entre amastina e proteínas da célula hospedeira: validação de resultados de ensaios de duplo-híbrido.

Para realizar o experimento de duplo híbrido, a região correspondente à primeira alça extracelular de TcX71.40 (aminoácido 27 ao 79) foi usada como isca para a seleção de clones da biblioteca Pretransformed Normalized Matchmaker™ Human HeLa S3 Library (Clontech) expressando proteína humanas que poderiam interagir com as amastinas. Os experimentos de duplo híbrido executados pela prof^a Santuza Teixeira na Universidade de Maryland em colaboração com prof^o Najib El-Sayed resultaram em 10 clones positivos. Dois desses clones continham cDNAs que codificam a citocina IL-15. Com o objetivo de verificar se a interação entre IL-15 e amastina pode ser detectada por meio de outras metodologias, o cDNA dessa citocina, bem como um fragmento do gene correspondente à região hidrofílica de Amastina foram clonados em vetores para expressão em bactéria.

As regiões codificadoras de TcX71.40S (primeira alça extracelular predita que se estende do aminoácido 27 ao 79) e de IL-15 clonadas no vetor pDONR (Invitrogen) foram recombinadas com os vetores pDEST15 e pDEST17 com uso da LR Clonase™ II enzyme mix (Invitrogen). Como produto da reação de recombinação, foram obtidos os plasmídeos pDEST15TcX71.40S e pDEST17IL15 que produzem proteínas recombinantes em fusão com GST e histidina na posição N-terminal respectivamente.

Na Figura 13 estão mostrados os resultados de análises por SDS-PAGE de

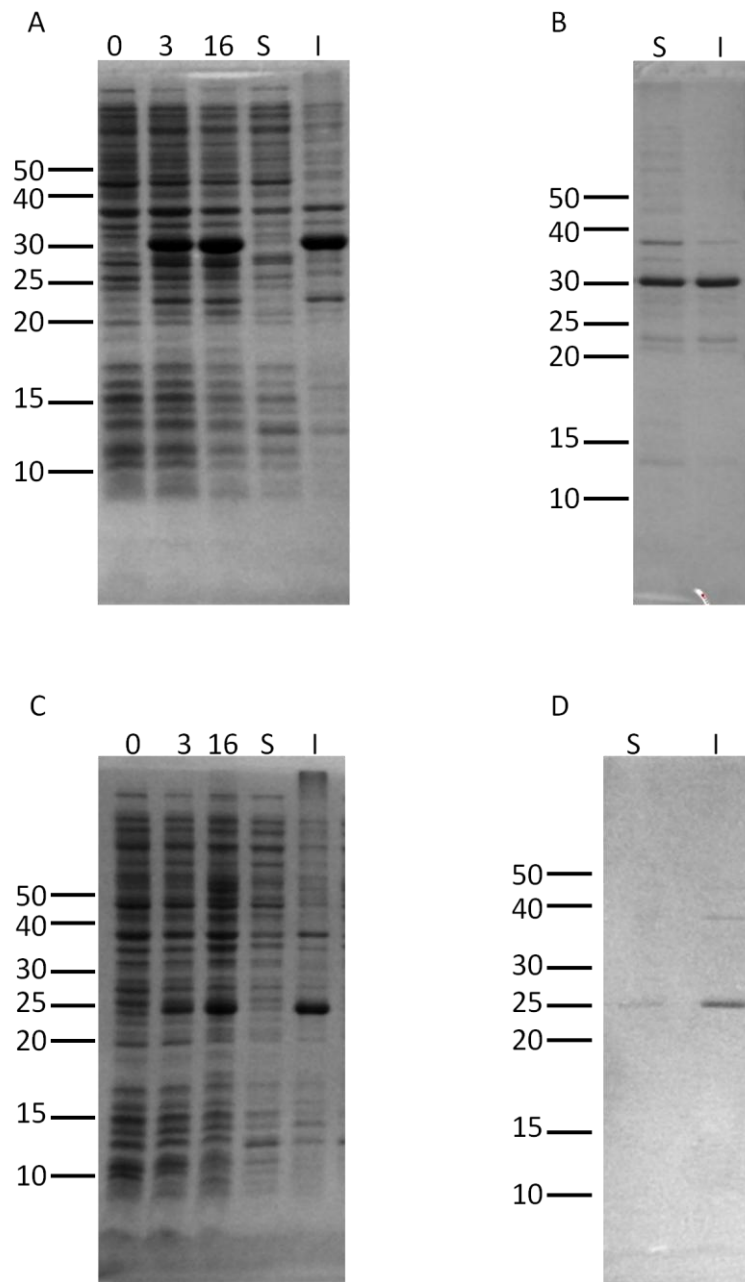


Figura 13: Eletroforese em gel de acrilamida com SDS de amostras de bactéria expressando TcX71.40S::GST e IL-15::his. Os números acima de cada foto indicam o tempo de indução da amostra. As letras S e I indicam as frações solúveis e insolúveis dos extratos totais. À esquerda de cada foto está representado o padrão de peso molecular em kDa. **(A):** Expressão de TcX71.40S::GST em diferentes tempos e solubilidade da proteína induzida. **(B):** Solubilidade de TcX71.40S::GST após tratamento com detergentes. **(C):** Expressão de IL-15::his em diferentes tempos e solubilidade da proteína induzida. **(D):** Solubilidade de IL15::his após tratamento com 2 M de uréia.

extratos protéicos totais, bem como das frações solúvel e insolúvel de bactérias expressando as proteínas recombinantes. Pode-se concluir que tanto TcX71.40S::GST e IL-15::his foram produzidas nos períodos de 3 e 16 horas após indução com arabinose. A TcX71.40::GST migra no gel com um tamanho de aproximadamente 30 kDa enquanto IL-15::his apresenta um tamanho em torno de 25 kDa. Diferente da amastina induzida, a IL-15 recombinante apresentou um pequeno aumento de expressão no período de 16 horas. Contudo ambas as proteínas recombinantes foram produzidas em formas insolúveis. O tratamento de TcX71.40S::GST com os detergentes sarkosyl e triton X-100 resultou num aumento da solubilidade da proteína em torno de 50 %. Já o tratamento de IL-15::his com esses reagentes não alterou a solubilidade. Foi utilizado então, um tampão contendo 2 M de uréia o qual aumentou um pouco a solubilidade da proteína.

Para validar a interação encontrada nos ensaios de duplo híbrido foi escolhido o experimento de “Pull down *in vitro*” usando IL-15 recombinante em fusão com histidina e a alça extracelular de TcX71.40 em fusão com GST. O “western blot” das amostras analisadas pode ser observado na Figura 14.

As proteínas GST e a alça extracelular de TcX71.40 (aminoácidos 27-79), denominada de TcX71.40S, em fusão com GST, foram produzidas em bactéria e ligadas em resina glutationa sepharose (GE Healthcare). A expressão de TcX71.40S::GST e GST sozinha pode ser observada nas canaletas 6, 8 e a ligação das respectivas proteínas pode ser observada nas canaletas 7, 9. A IL-15 recombinante expressa com uma cauda de histidina utilizada para a ligação a TcX71.40S::GST pôde ser detectada no blot incubado com anticorpo anti-histidina (GE Healthcare) e como

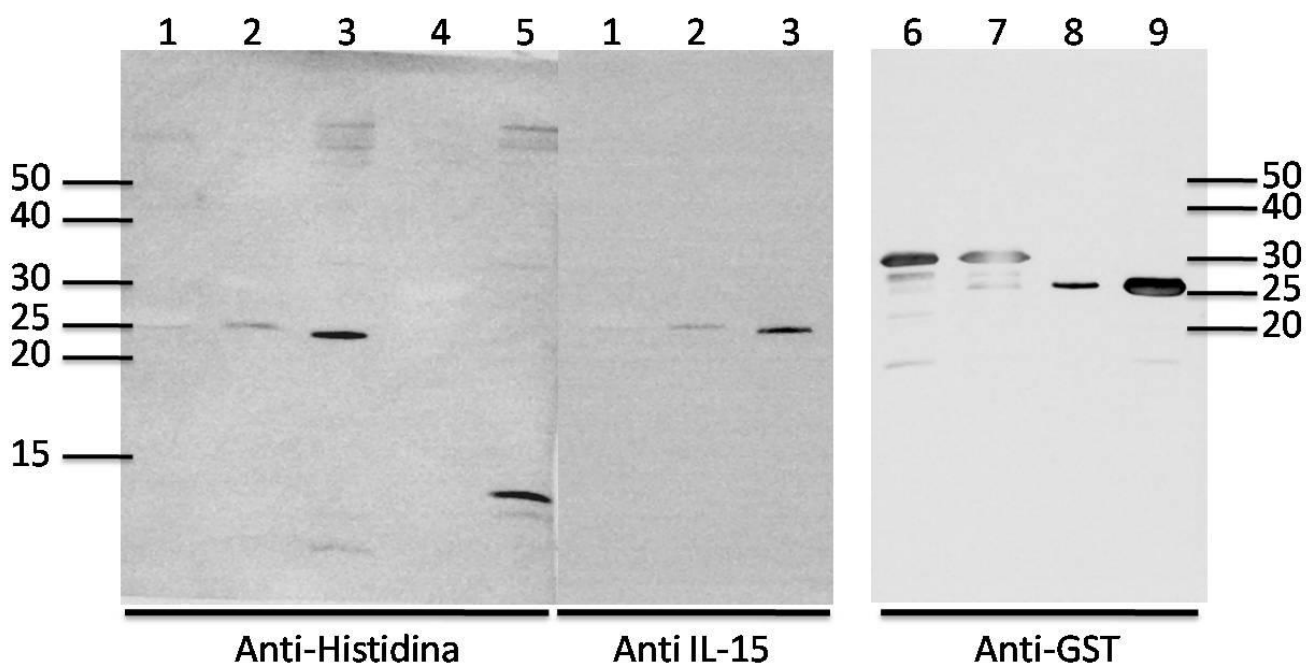


Figura 14: “Pull down” de IL-15 recombinante com resina contendo TcX71.40S::GST. “Western blot” das amostras obtidas após experimento de “pull down”. À esquerda e à direita da figura estão os pesos referentes ao padrão de peso molecular. Abaixo de cada membrana está indicado o anticorpo primário. As diluições dos anticorpos anti-histidina, anti IL-15 e anti-GST foram respectivamente 1:1000, 500 e 3000. As diluições dos respectivos anticorpos secundários para cada blot foram 1:2000, 1000 e 6000. Acima da figura estão indicadas as amostras: (1) resina GST incubada com lisado de bactéria contendo IL-15, (2) resina TcX71.40S::GST incubada com lisado de bactéria contendo IL-15, (3) lisado de bactéria contendo IL-15, (4) resina TcX71.40 incubada com lisado de bactéria contendo TcRpL7aREP, (5) lisado de bactéria contendo TcRpL7aREP, (6) lisado de bactéria contendo TcX71.40S::GST, (7) resina contendo TcX71.40S::GST, (8) lisado de bactéria contendo GST, (9) resina contendo GST.

no blot incubado com anticorpo anti-IL15 (R&D Systems), como pode ser observado na canaleta 3. Esta amostra foi obtida a partir de corpos de inclusão após indução da expressão.

IL-15 recombinante em fusão com histidinas ou uma proteína não relacionada, nesse caso a porção repetitiva da proteína ribossômica TcRpL7aREP também em fusão com histidinas, foram incubadas com resina na qual foi ligada GST ou TcX71.40S::GST. As proteínas ligadas às resinas com GST ou TcX71.40S::GST após incubação com corpos de inclusão semi-purificados tratados com 2 M de uréia contendo IL-15 recombinante podem ser observada nas canaletas 1 e 2 nessa ordem. É possível observar uma banda na posição próxima de 25 kDa detectada nos blots incubados com anti-histidina e anti-IL15, a qual é similar com a banda detectada no extrato total de bactéria contendo IL-15 recombinante. Em contrapartida, foi detectada somente uma banda extremamente fraca correspondente a IL-15 na amostra contendo a resina ligada somente à GST, o que pode ser observado na canaleta 1. A proteína TcRpL7aREP pôde ser detectada no extrato total de bactéria, mas nenhuma proteína em fusão com histidina não foi detectada na resina contendo TcX71.40S::GST. Essas amostras estão presentes nas canaletas 5 e 4.

8. Transfecção de células HEK293T com vetor para expressão de IL-15.

Com a finalidade de determinar os possíveis efeitos biológicos de IL-15 sobre a infecção de células com *T. cruzi*, células HEK293T foram transfectadas com o plasmídeo para expressão de IL-15 citoplasmática. Inicialmente a estratégia adotada foi a inibição da expressão de IL-15. O mRNA dessa citocina é constitutivamente produzido por

diversas linhagens celulares contudo, a proteína foi detectada somente em extratos de cardiomiócitos neonatos (dados não mostrados).

Primeiramente as células foram transfectadas com diversos reagentes e com o plasmídeo pEGFP (Clontech) para determinar qual reagente possuía melhor eficiência de transfecção. As células expressando GFP podem ser observadas na Figura 15.

Os reagentes PEI e Fugene HD (Roche) não apresentaram nenhum efeito sobre a morfologia da célula. Contudo, o reagente Fugene HD (Roche) apresentou uma baixa eficiência de transfecção nas condições testadas em comparação com os outros reagentes. Já nas células transfectadas com Lipofectamina 2000 (Invitrogen) é possível observar uma alta eficiência de transfecção, mas a morfologia das células é alterada.

Nas transfecções feitas com plasmídeo pEGFP (Clontech) é possível observar um aumento do número de células fluorescentes de 24 para 72 horas, juntamente com o número de células na cultura. Mesmo assim, o Fugene (Roche) apresentou a menor eficiência de transfecção enquanto a lipofectamina 2000 (Invitrogen) mostrou uma alta eficiência desde o período de 24 horas até o final do experimento. Apesar de não ser tão eficiente quanto a lipofectamina 2000 (Invitrogen) o PEI concilia uma eficiência significativa a preservação da morfologia celular.

A transfecção de células HEK293T para a expressão de IL-15 foi feita com o reagente PEI e o plasmídeo contendo a região codificadora de IL-15 intracelular foi gentilmente cedido por T.A. Waldmann (Tagaya *et al.*, 1997). Após 48 e 72 horas de transfecção, experimentos de imunofluorescência foram feitos para verificar a expressão de IL-15 pelas células transfectadas a qual pode ser observada na Figura 16. Como esperado, a expressão de IL-15 ocorre de forma difusa no

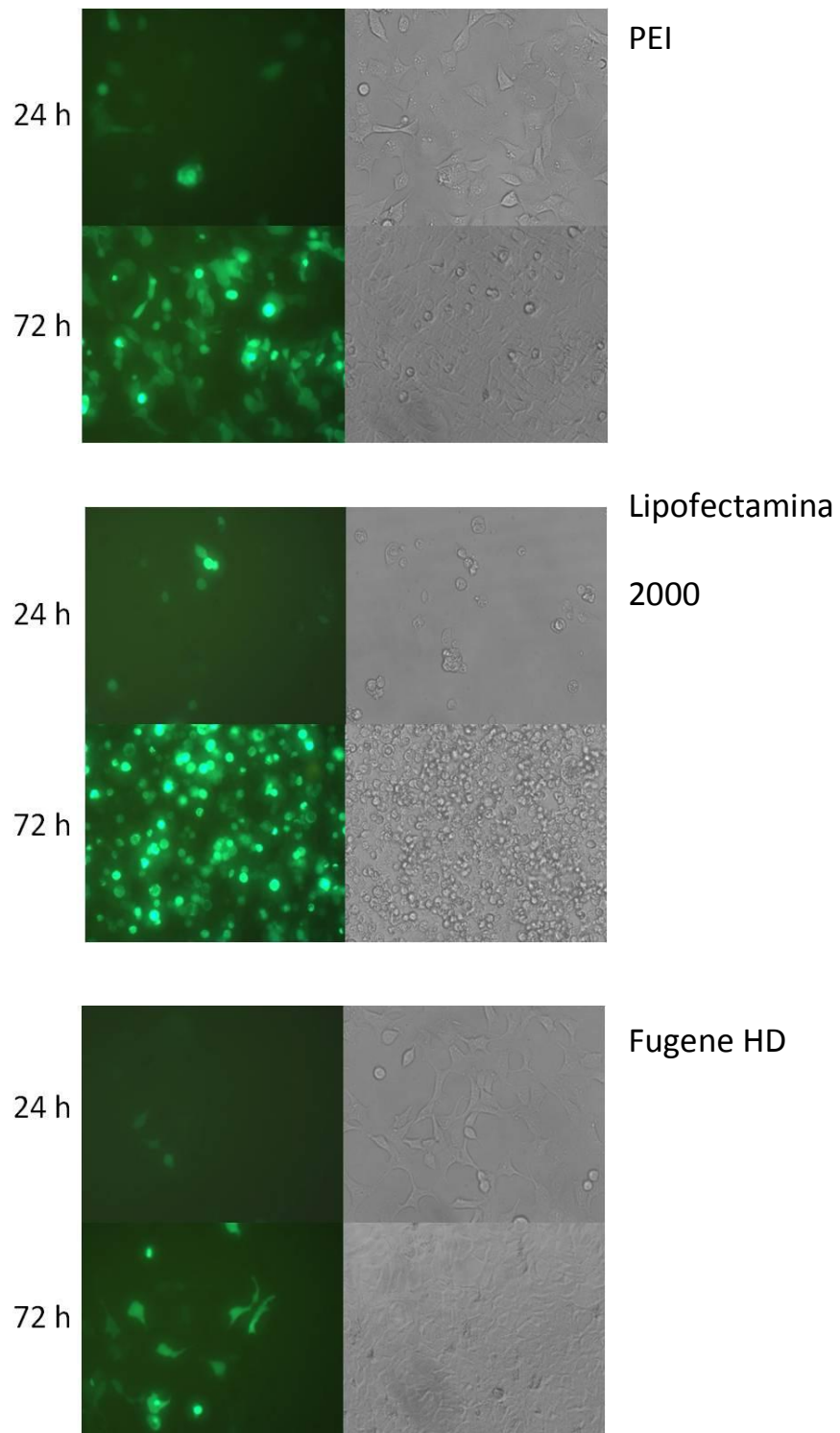
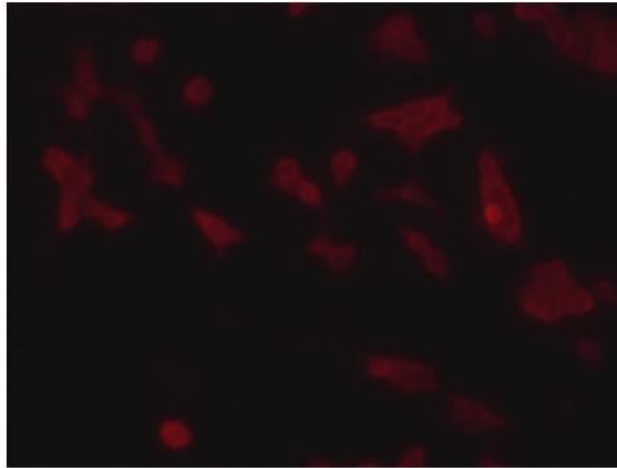


Figura 15: Transfecção de células HEK293T com pEGFP usando diferentes reagentes de transfecção. Células HEK293T foram transfectadas com PEI, Lipofectamina 2000 (Invitrogen) e FugeneHD (Roche). Os reagentes usados estão indicados à direita e os tempos de transfecção à esquerda. As fotos de campo claro estão ao lado das respectivas imagens das células fluorescentes.

48 h



72 h

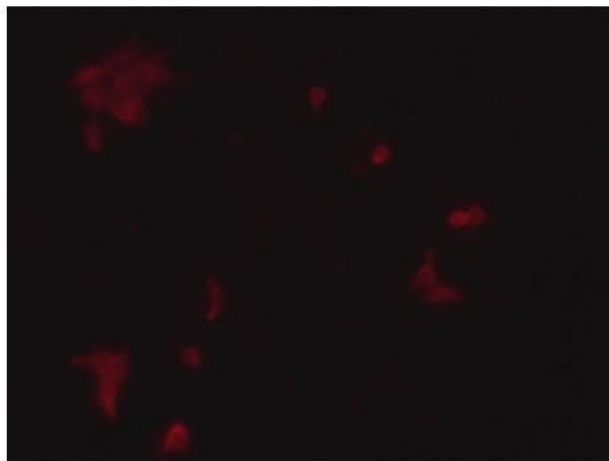


Figura 16: Imunofluorescência de células HEK293T após transfecção para expressão de IL-15. Células HEK foram transfectadas com plasmídeo contendo região codificadora de IL-15 intracelular com auxílio do reagente PEI. Os tempos de transfecção analisados estão indicados à esquerda. A detecção da citocina produzida foi feita por imunofluorescência com anticorpo conjugado com Alexa 555.

citoplasma como pode ser observada pela marcação em vermelho.

9. Infecção de células HEK293T expressando IL-15 com tripomastigotas do clone CL-Brener.

Para testar os efeitos biológicos da super expressão de IL-15 sobre a infecção por *T. cruzi*, células HEK293T transfectadas de forma a produzirem IL-15 foram infectadas com o clone CL Brener na proporção de 10 parasitos do por célula após 24 horas de transfecção. A infecção foi avaliada nos tempos de 48 e 72 horas e foi medida a porcentagem de células infectadas e o número de amastigotas por célula infectada.

No período de 48 e 72 horas após infecção, a média de células infectadas é de 41 e 53% respectivamente, nos poços nos quais as células não foram transfectadas. Já os poços que continham células transfectadas com IL-15 apresentaram uma média de células infectadas de 40% no período de 48 horas após infecção. Esse valor aumenta para 65% após 72 horas de infecção. Obviamente, não foi observada diferença estatisticamente significativa na infecção de células HEK293T com o clone CL Brener no período de 48 horas. Entretanto, foi observada uma diferença estatisticamente significativa no período de 72 horas após infecção. Esses resultados podem ser visualizados na Figura 17 A. Da mesma forma, o número de amastigotas por célula infectada apresentou diferença estatisticamente significativa somente no período de 72 horas após infecção. Nas células não transfectadas, a média de amastigotas por célula infectada é de 2,8 e 5,7 nos períodos de 48 e 72 horas após infecção. Já nas células transfectadas com IL-15 essa média é de 2,7 e 9,8 nos períodos de 48 e 72 horas após infecção. Esses resultados podem ser visualizados na Figura.17 B.

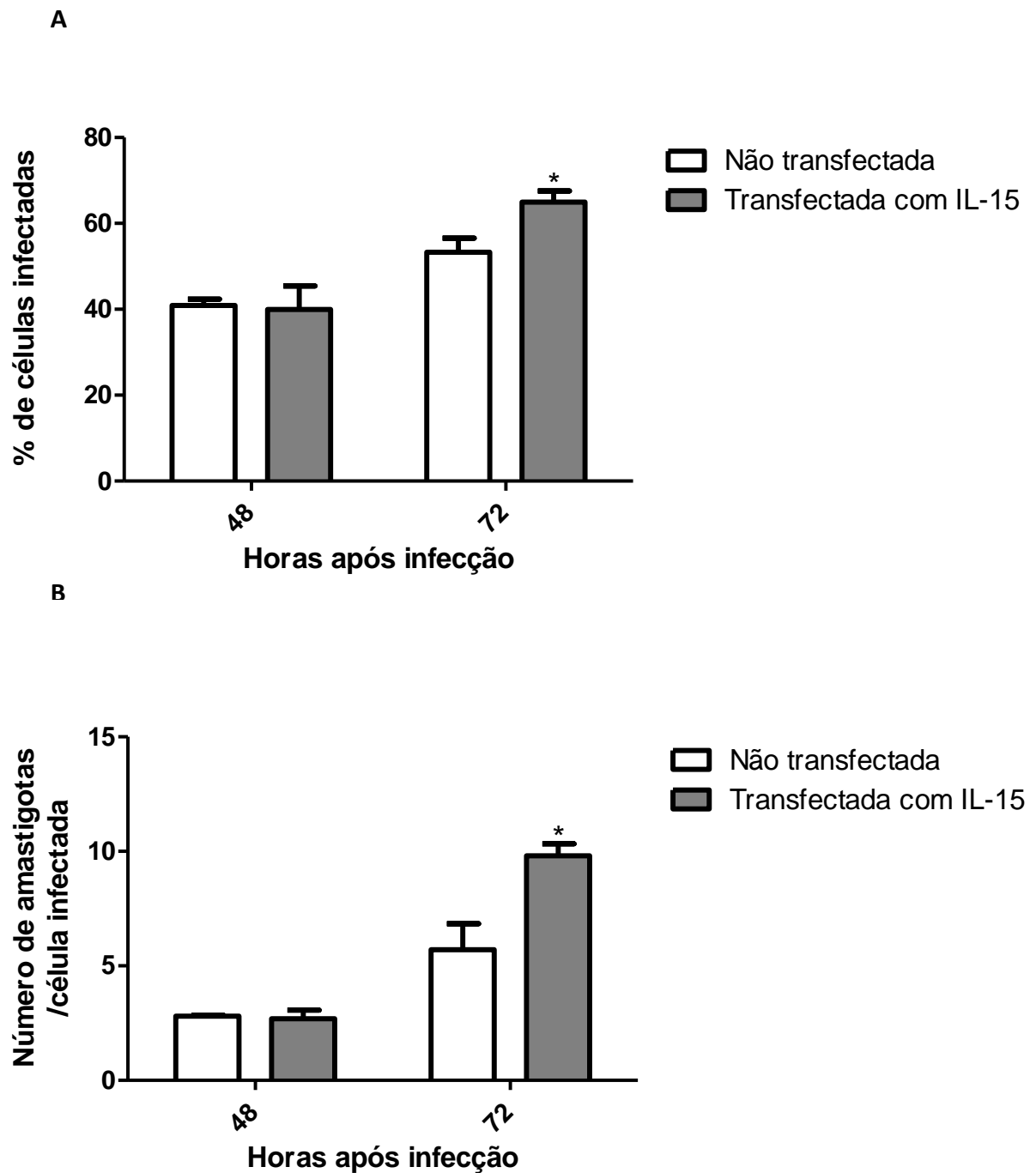


Figura 17: Infecção de células HEK293T com *T. cruzi* após transfecção para expressão de IL-15. Células HEK foram infectadas com tripomastigotas do clone CL Brener 24 horas após serem transfectadas com plasmídeo para expressão de IL-15 intracelular. O asterisco em cima de cada barra do gráfico indica diferença estatisticamente significativa com $p < 0,05$. Em **(A)** Porcentagem de células infectadas e em **(B)** Número de amastigotas por célula infectada.

5. Discussão

A transformação de *T. cruzi* de um estágio para outro está associada com mudanças morfológicas e expressão de moléculas estágio específicas. Como as formas tripomastigotas e amastigotas estão presentes no hospedeiro vertebrado, o estudo de proteínas expressas nessas formas são de grande relevância para o entendimento da doença de Chagas.

Várias proteínas de superfície de tripomastigotas já foram caracterizadas como, por exemplo, as trans-sialidases (Parodi *et al.*, 1992; Colli W., 1993; Frasch A.C., 2000), mucinas (Frasch A.C., 2000; Yoshida *et al.*, 1989; Acosta-Serrano *et al.*, 2001), as proteínas associadas a mucinas ou MASPs (Bartholomeu *et al.*, 2009) e as TASVs (do inglês, “trypomastigote alanine, serine, valine rich proteins”) (García *et al.*, 2010). Contudo, poucas proteínas de superfície expressas no estágio amastigota foram caracterizadas, entre elas podemos citar: ASP-1 (Santos *et al.*, 1997) e ASP-2 (Low e Tarleton, 1997) que são membros da família das trans-sialidases, SA-85 (Kahn *et al.*, 1990, 1991) e SSP4 (Andrews *et al.*, 1988; Olivas-Rubio *et al.*, 2009). A maioria das proteínas citadas acima são glicoproteínas ancoradas à membrana por meio de âncora GPI e foram descobertas a partir do reconhecimento por anticorpos contra antígenos presentes na superfície da célula amastigota. Alguns desses anticorpos reconhecem a porção glicídica dessas glicoproteínas.

A partir de uma seleção de clones de uma biblioteca de cDNA, Texeira *et al.* (1994) descobriram genes cujo mRNA era muito mais abundante no estágio intracelular do parasito, os quais foram denominados de amastinas. No genoma

haplóide de *T. cruzi* há seis amastinas que foram classificadas em duas subfamílias (Jackson P.A., 2010). As amastinas TcX65.394 e TcX65.390, classificadas como pertencentes à subfamília β , estão localizadas no cromossomo 32. Já as amastinas TcX71.40, TcX39.120, TcX85.150 e TcX85.130 são classificadas como δ amastinas. A primeira está localizada no cromossomo 26 enquanto as 3 últimas estão presentes no cromossomo 34. Nessa subfamília é possível observar genes de tuzina intercalando os genes de amastinas enquanto que essa associação está ausente nos membros da subfamília β .

Ao estudar as amastinas presentes em *L. major* e *L. infantum*, Rochette *et al.* (2005) identificaram, por meio de análises *in silico*, 55 sequências homólogas a amastinas no genoma de *L. major* enquanto 37 foram identificadas em *L. infantum*. Como ocorre no genoma de *T. cruzi* do clone CL Brener, o maior cluster de amastinas está localizado no cromossomo 34 o qual em *L. major* contém 27 genes enquanto que em *L. infantum* estão presentes 12 cópias de amastinas. O maior número de amastinas nessas espécies se deve a uma expansão da subfamília δ .

Ao analisar a sintenia das amastinas do cromossomo 34 entre os tripanosomatídeos citados acima de acordo com os dados depositados no TriTrypDB, observa-se que as amastinas do haplótipo Esmeraldo, TcX39.120, TcX85.150, TcX85.130, não apresentam sintenia com as amastinas de *L. major* e *L. infantum*. Em contrapartida, as amastinas do haplótipo não Esmeraldo são sintênicas com os genes presentes nessas espécies de *Leishmania*. As amastinas β também são sintênicas entre os tripanosomatídeos. Já a amastina TcX71.40 e seu alelo TcX03.50 não apresentam sintenia com nenhum outro membro. A cepa CL-Brener é híbrida, sendo o resultado de

eventos de hibridização entre cepas parentais dos grupos *T. cruzi* II e *T. cruzi* III (Freitas *et al.*, 2006). As amastinas do haplótipo não Esmeraldo, devido à presença de sintonia com as amastinas das leishmanias, podem ser mais próximas evolutivamente a esses ortólogos. Sendo assim, estudos filogenéticos acerca da família das amastinas em cepas do grupo *T. cruzi* III são importantes para determinar a variabilidade dessa família no táxon *T. cruzi*.

O alinhamento das sequências de aminoácidos das amastinas de *T. cruzi* mostra uma significativa similaridade entre os membros como já observado em trabalhos anteriores do nosso grupo (Cerqueira *et al.*, 2008). Essa similaridade pode ser observada tanto em nível de sequência de aminoácidos, como em nível de estrutura. A conservação de aminoácidos da sequência é muito maior entre os alelos de uma mesma amastina do que com outros membros, como pode ser observado no alinhamento na Figura 5. Apesar dessa variação de aminoácidos, a topologia geral das amastinas é mantida como quatro domínios hidrofóbicos separados por dois domínios preditos como não transmembrana, como pode ser visto na Figura 6. No primeiro domínio hidrofílico há duas cisteínas universalmente conservadas e dentre elas uma sequência de 11 aminoácidos que foi denominada de assinatura de amastina (Rochette *et al.*, 2005). Essas cisteínas podem formar uma ponte dissulfeto entre si responsável pela manutenção da estrutura dessa região da proteína a qual também apresenta significativa variabilidade observada entre os membros e pode ser responsável por diferenças funcionais entre cada um. Diferente de todas as outras amastinas, somente TcX71.40, TcX03.50 e TcX39.120 apresentam uma porção adicional de 20 aminoácidos a qual é ausente nos outros membros. Por causa da suposta localização das amastinas na membrana citoplasmática, essa porção adicional presente em alguns membros

pode ser responsável pelo ancoramento de outras proteínas ou pela transdução de algum sinal por via de fosforilação como demonstrado, por exemplo, para as transsialidases (Bao *et al.*, 2010).

Juntamente com as diferenças estruturais presentes entre membros das subfamílias de amastinas, Minning e cols. (2009) observaram um padrão de expressão gênica diferente entre amastinas δ e amastinas β . Ao estudar o transcriptoma dos diferentes estágios do ciclo de vida de *T. cruzi*, através da técnica de microarranjo de DNA, os autores observaram que muitos grupos de genes parálogos apresentam variação na abundância relativa de mRNA. Um desses grupos estudados foi o grupo das amastinas. A abundância dos transcritos, medida por microarranjo de DNA e confirmada por PCR quantitativa com transcriptase reversa, mostrou que o transcrito de TcX71.40 apresenta uma abundância relativa maior no estágio amastigota do que nos outros estágios do ciclo de vida. Entretanto, transcritos derivados dos alelos TcX65.390 e TcX65.394 apresentaram uma abundância maior nos estágios encontrados no inseto vetor como epimastigotas e tripomastigotas metacíclicas. Ambos genes apresentaram transcritos com aproximadamente 1,9 kb, contudo TcX65.394 apresentou um transcrito adicional de tamanho inferior a 1,3 kb. Esse transcrito pode ser um processamento alternativo durante a transcrição dessa amastina.

Como pode ser observado na Figura 7, diferentemente dos dados encontrados por Minning e cols. (2009), os dados presentes no presente trabalho mostram que a expressão das β amastinas é maior no estágio amastigota, similarmente às outras amastinas já estudadas. Diante desses dados conflitantes, o experimento de “northern

blot” será repetido. Contudo vale ressaltar que a análise da expressão das amastinas TcX65.394 e TcX65.390 nesse estudo foi feita por meio de uma técnica mais precisa em comparação com a técnica de microarranjo de DNA.

Apesar dos conhecimentos acerca da organização, expressão dos mRNAs e topologia das proteínas, a função das amastinas ainda é desconhecida. Evidências indiretas da função das amastinas em amastigotas devem ser consideradas uma vez que esse gene é principalmente expresso nessa forma. Além disso, por ter sido localizada na membrana citoplasmática (Teixeira *et al.*,1994), essas proteínas podem ter alguma participação nas interações que ocorrem entre o parasito e moléculas presentes no citoplasma da célula hospedeira.

Existem diversas estratégias para estudar a função de um determinado gene, dentre elas super expressão do gene, nocautes por recombinação homóloga ou por RNA de interferência, RNA anti-senso, bloqueio da função da proteína com anticorpos e determinação das interações entre proteínas. Entretanto, nem todas essas estratégias são possíveis de serem empregadas tendo *T. cruzi* como organismo em estudo. O *T. cruzi* não apresenta a maquinaria funcional de RNA de interferência (DaRocha *et al.*, 2004). A geração de nocautes por recombinação homóloga não é possível devido à presença de várias cópias de amastinas no genoma do parasito e ainda não foi possível gerar anticorpos eficientes para o bloqueio da função da proteína. Dessa forma, as estratégias adotadas nesse trabalho para estudar as amastinas de *T. cruzi* foram a super expressão do gene e a determinação da interação das amastinas com outras proteínas.

Para super expressar amastina em *T. cruzi*, a região codificadora do clone TcA21 (Teixeira *et al.*, 1994) foi clonada no vetor pTREGFP gerando o vetor pTREGAMAGFP cujos mapas podem ser observados na Figura 8. Formas epimastigotas foram transfectadas com esses vetores e os parasitos modificados expressando as proteínas fluorescentes podem ser observados na Figura 9. As proteínas em fusão com GFP também podem ser detectadas por “western blot” como pode ser visto na Figura 10.

Apesar de plasmídeos circulares apresentarem um potencial recombinogênico baixo (Lorenzi *et al.*, 2003), os parasitos transfectados com pTREGFP e pTREGAMAGFP apresentam uma expressão estável das proteínas fluorescentes, observável por microscopia de fluorescência tanto em epimastigotas quanto em amastigotas. A capacidade de integração dos vetores pTREG já havia sido relatada por Lorenzi e cols. (2003) que demonstraram que a recombinação ocorre na região do promotor ribossômico. Geralmente em *T. cruzi*, plasmídeos circulares são instáveis na ausência de seleção por drogas, mas os transformantes são estáveis quando o vetor se integra no genoma. Em *T. brucei*, a transfecção com plasmídeos circulares possui uma eficiência muito menor em comparação com a transfecção com DNA linear que se integra nos cromossomos por recombinação homóloga (ten Asbroek *et al.*, 1993). Em contrapartida, a transfecção das espécies do gênero *Leishmania* com DNA circular, que se mantém no parasito como um epissomo, é estável (revisto por Clayton, 1999).

Trabalhos anteriores do nosso grupo indicaram que a super expressão da amastina em fusão com cauda de histidinas (tese de mestrado de Danielle Marra de Freitas Silva, 2006) resulta em parasitos com uma maior taxa de proliferação em comparação com parasitos selvagens. Entretanto esses dados não puderam ser

reproduzidos uma vez que esses parasitos expressando amastina::his eram instáveis e a super expressão da proteína de fusão deixou de ocorrer por algum motivo desconhecido. Já as epimastigotas transfectadas com pTREMAGFP, descritos nesse trabalho, os quais mostraram uma expressão estável da proteína de fusão, apresentaram uma densidade maior a partir do dia 6 de crescimento em comparação com os parasitos que expressam GFP, como observado na Figura 11.

Para investigar se esse efeito sobre a multiplicação também ocorria nas formas amastigotas, os parasitos citados acima foram usados em experimentos de infecção de células HEK293T. A porcentagem de células infectadas e o número de amastigotas por célula infectada foi medido nos intervalos de 4, 24 e 48 horas. Diferente do que ocorre nas formas epimastigotas, não foi observada diferença na porcentagem de células infectadas e no número de amastigotas dentro de cada célula infectada entre os parasitos expressando GFP ou Ama::GFP nos períodos analisados. Experimentos de infecção com tempos mais longos não foram realizados devido à possibilidade de interferência na porcentagem de células infectadas causada pela liberação de tripomastigotas. Dessa forma, novos ensaios de infecção utilizando outros tipos celulares nos quais serão feitas análises em tempos de infecção mais longos juntamente com a contagem das tripomastigotas liberadas serão realizados.

A segunda estratégia adotada para estudar as amastinas foi determinar as interações que essas proteínas fazem com proteínas da célula hospedeira. Para isso, experimentos de duplo híbrido foram realizados usando a porção extracelular de TcX71.40 como isca para uma biblioteca normalizada de cDNA humano. Dez clones positivos foram encontrados após os ensaios de duplo híbrido. O seqüenciamento do

cDNA de cada clone mostrou que dois dos clones encontrados continham cDNA que codificava a interleucina 15 ou IL-15.

Esta interação nos chamou a atenção devido ao fato de que foram encontrados maiores níveis de IL-15 em lesões cardíacas de indivíduos infectados com *T. cruzi* (Fonseca *et al.*, 2007). Este aumento de IL-15 se deve principalmente à produção aumentada da citocina e do aumento do número de células CD68⁺, o qual é um marcador específico de macrófagos. Sendo assim, essa citocina pode ter algum papel na doença de Chagas.

A interleucina 15 foi descrita independentemente por Burton *et al.* (1994), durante estudos acerca da proliferação de células HuT-102 derivadas de leucemia de células T adultas e por Grabstein *et al.* (1994) ao isolarem uma citocina de sobrenadantes de células epiteliais de rim de macaco. Foi observado por esses pesquisadores que a linhagem de células HuT-102 secreta uma proteína de aproximadamente 15 kDa, que apresenta similaridade com a citocina encontrada por Grabstein *et al.* (1994), capaz de induzir a proliferação de células T e a ativação de diferentes linfócitos Bamford *et al.* (1996).

Durante o trabalho desenvolvido por Grabstein *et al.* (1994) foi isolado o gene codificador de IL-15. Apesar de não haver similaridade significativa entre IL-2 e IL-15, análise da estrutura secundária destas citocinas revela que, como IL-2, IL-15 pertence à família das citocinas de quatro α hélices. Esta família de citocinas compreende proteínas com quatro α hélices como IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-21, fator estimulador de colônia de macrófago-granulócito, fator estimulador de colônia de granulócito. Alguns

hormônios como eritropoietina, prolactina e hormônio do crescimento também fazem parte dessa família. (para uma revisão, veja Budagian *et al.*, 2006).

O cDNA de IL-15 obtido por Grabstein *et al.* (1994) codifica um peptídeo de 162 aminoácidos que após processamento gera uma proteína madura de 114 aminoácidos. Essa citocina é bastante conservada entre diferentes espécies, pois ao se comparar a região codificadora de IL-15 humana com outros organismos, esta apresenta 97 % de identidade com o gene de macaco, 82 % com o gene derivado de porco e 73 % com o de camundongo.

O mRNA de IL-15 é constitutivamente expresso em diferentes tipos celulares e tecidos, incluindo macrófagos/monócitos, células dendríticas, queratinócitos, fibroblastos, células nervosas, rim, placenta, pulmões, coração e músculo estriado esquelético. Diferentes de outras citocinas, o mRNA de IL-15 apresenta duas isoformas geradas por splice alternativo, que diferem somente no tamanho da sequência codificadora do peptídeo sinal. O cDNA da IL-15 originalmente identificada contém uma região 5' UTR de pelo menos 316 pb, uma região codificadora de 486 pb e uma 3' UTR de 400 pb. A tradução deste mRNA gera um precursor com um peptídeo sinal longo de 48 aminoácidos e a proteína resultante (IL-15 LSP, do inglês "long signal peptide") é encontrada em organelas da via de secreção celular como retículo endoplasmático, complexo de Golgi e endossomos primários. Posteriormente, um segundo mRNA contendo um sítio de início de tradução alternativo com uma sequência de Kozak não conservada foi identificado. A tradução desse transcrito gera um precursor cujo peptídeo sinal é composto por 21 aminoácidos, assim essa isoforma é denominada de IL-15 SSP (do inglês "short signal peptide"). A isoforma IL-15 SSP não

é secretada e nem co-localiza com organelas ou estruturas envolvidas com a via secretória da célula, de fato, ela é armazenada no citoplasma da célula hospedeira (para uma revisão, veja Budagian *et al.*, 2006).

Apesar da ampla distribuição do mRNA, a citocina IL-15 é de difícil detecção tanto em células quanto em tecidos. Isso se deve principalmente à regulação da expressão de IL-15 a qual ocorre em diferentes níveis. Um controle modesto ocorre no nível transcricional, em contrapartida, um controle dominante ocorre pós-transcricionalmente incluindo tradução e tráfego intracelular. A regulação no nível transcricional é feita através de uma série de sítios para ligação de fatores de transcrição como NF- κ B, IRF-E, myb, γ IRE, IL-6 e α INF-2 os quais estão presentes em regiões regulatórias 5' do gene de IL-15. Dentre esses sítios, já é conhecido que os sítios para ligação de NF- κ B, IRF e IRF-E estão envolvidos com o aumento nos níveis do mRNA de IL15. Esse transcrito contém uma longa sequência 5' UTR (352 nt nos transcritos humanos e 465 nos transcritos de camundongos) na qual está presente diversos códons de início (AUG). Estes códons que precedem a região codificadora diminuem drasticamente a eficiência de tradução Além disso, os mRNAs codificantes para IL-15 possuem um peptídeo sinal que leva a uma baixa eficiência na tradução e secreção da proteína (para uma revisão, veja Waldmann e Tagaya, 1999).

Mesmo sendo secretada ou armazenada no citoplasma, a IL-15 exerce seus principais efeitos biológicos através da ligação no seu receptor. Esse é composto por três cadeias denominadas α , β e γ , sendo que cada receptor pode ser composto pelas três cadeias ou somente pelas subunidades β e γ . Estas cadeias também estão presentes no receptor da IL-2, o que explicaria parte da redundância dos efeitos

biológicos dessas citocinas. A especificidade de cada receptor é conferida pela cadeia α , a qual apresenta características distintas entre os receptores de IL-2 e IL-15. As subunidades α do receptor de ambas citocinas são estruturalmente similares, pois ambos são compostos por domínios sushi, seguidos por um domínio rico em treoninas e prolinas que se localiza próximo à membrana plasmática e uma curta cauda citoplasmática. Domínios sushi são estruturas protéicas compostas por um sanduíche de 2 a 3 fitas β , contendo de 2 a 3 pontes dissulfeto. Estes domínios são responsáveis pela ligação desses receptores às respectivas citocinas: o receptor α de IL-2 contém dois domínios sushi e o receptor α de IL-15 contém somente um, o qual é suficiente para a ligação do receptor com seu ligante (revisado por Bódnar *et al.*, 2008). Apesar da semelhança estrutural descrita acima, a interação do receptor α de IL-15 com seu ligante é muito mais forte e estável do que a interação entre o receptor α de IL-2 com seu respectivo ligante.

A ligação de IL-15 em seu receptor desencadeia diversos efeitos na célula alvo que incluem células do sistema imune e não imune. Esta citocina está envolvida na manutenção de linfócitos T e age em sinergismo com IL-2 na expansão da população dessas células, promove a diferenciação e ativação de linfócitos T citotóxicos e a manutenção de linfócitos T CD8⁺ de memória. Apesar de não possuir efeitos em linfócitos B não ativados, IL-15 induz proliferação e síntese de imunoglobulinas nas formas ativadas dessas células. Há fortes evidências de que IL-15 também está envolvida na diferenciação, sobrevivência e funcionamento de células NK. Animais nocaute para a cadeia β do receptor de IL-15 apresentam uma deficiência marcante nos níveis de células NK, o mesmo não ocorre quando cadeias exclusivas do receptor

de IL-2 são deletadas (Waldmann e Tagaya, 1999). Em células do sistema não imune, IL-15 tem como principais efeitos a indução de proliferação celular e de proteção contra apoptose, por exemplo, em fibroblastos, queratinócitos, hepatócitos e células epiteliais. Em células musculares, IL-15 induz hipertrofia sugerindo um efeito anabólico e de acúmulo de massa muscular. Mesmo antes de conhecer as diversas funções dessa citocina, a presença do mRNA de IL-15 em diferentes tipos celulares já havia levantado hipóteses a respeito de sua atividade sobre diversas linhagens celulares incluindo células não pertencentes ao sistema imune.

O aumento dos níveis de IL-15 já foi observado durante infecções por diferentes patógenos como herpesvírus (Flamand *et al.*, 1996), micobactérias (Maeurer *et al.*, 1999), *Cryptococcus neoformans* (Mody *et al.*, 1998) e alguns protozoários como *Leishmania infantum* (Milano *et al.*, 2002) e *T. cruzi*. Além desses patógenos, o papel da IL-15 na infecção por *T. gondii* e a ação leishmanicida em macrófagos já é bem compreendido.

O apicomplexa *Toxoplasma gondii* é um parasito intracelular capaz de infectar teoricamente qualquer tipo celular. A resposta imune celular é a principal forma de eliminação do parasito pelo hospedeiro. Essa resposta pode ser dividida em uma resposta imune inata, mediada principalmente por células NK, e uma resposta celular antígeno específica, mediada principalmente por linfócitos T CD8⁺. A administração de IL-15 recombinante seguida da vacinação de animais com uma cepa vacinal de *T. gondii* resulta num aumento da população de linfócitos CD8⁺ antígeno específicos e numa maior produção de IFN- γ (Khan e Casciotti, 1999). Em contrapartida, o bloqueio de IL-15 feito por meio da administração da cadeia α receptor leva a uma perda da

resposta imune celular mediada por linfócitos T CD8⁺ e a morte dos animais desafiados com uma dose letal do parasito (Khan *et al.*, 2002). A resposta celular contra *T. gondii* é mediada principalmente pelas citocinas IFN- γ , IL-2 e também por IL-15. Através de PCR em tempo real, Doherty *et al.* (1996) identificaram um aumento nos níveis do mRNA de IL-15 em macrófagos murinos infectados com *T. gondii* após receberem um estímulo prévio de IFN- γ .

O potencial leishmanicida de IL-15 foi estudado em macrófagos ativados com PMA e infectados com *L. infantum*. As células cultivadas na presença de IL-15 apresentaram uma atividade leishmanicida comparada àquela induzida por IFN- γ . Essa atividade era reduzida mediante neutralização da citocina com anticorpos monoclonais anti IL-15 ou IFN- γ . Esses dados sugerem que IL-15 é um ativador direto ou indireto da atividade leishmanicida de macrófagos (D'Agostino *et al.*, 2004).

Diferente do que ocorre com outros protozoários parasitos, a produção de IL-15 por certos tipos celulares poderia ser um fator favorável para o parasito. Essa citocina promoveria a multiplicação do parasito e inibiria o processo de apoptose da célula hospedeira. Isso seria uma estratégia muito eficiente porque as células com maiores níveis de IL-15 seriam melhores hospedeiras para *T. cruzi*: essas células não entrariam em apoptose e ao mesmo tempo promoveriam a multiplicação intensa do parasito.

Já é estabelecido o papel estimulatório de IL-15 no sistema imune e sua função reguladora da atividade de diversas células durante a montagem de uma resposta imune. Entretanto, alguns parasitos podem ter desenvolvido métodos para usarem as citocinas do hospedeiro em seu próprio favor. Para validar a interação entre TcX71.40S

e IL-15 encontrada nos ensaios de duplo híbrido, experimentos de “Pull down” foram feitos. A porção de amastina TcX71.40 usada no ensaios de duplo híbrido foi clonada em fusão com GST e a IL-15 foi produzida em bactéria em fusão com cauda de histidinas. A expressão e a solubilidade das proteínas recombinantes foram analisadas por SDS-PAGE e os resultados podem ser observados na Figura 13. Ambas as proteínas recombinantes foram produzidas em corpos de inclusão e por isso foram tratadas com agentes desnaturantes. A citocina IL-15 já foi expressa em fusão com outras proteínas (Xiong *et al.*, 2005) e também se apresentou insolúvel como ocorreu nesse trabalho. Diante disso, amastina foi tratada com os detergentes Sarkosyl e Triton X-100 porque esses compostos não são desnaturantes fortes. Já IL-15 foi tratada com uréia porque Ward e cols (2009) relataram que a citocina recombinante produzida em *E. coli* possui atividade após tratamento com 6 M de cloreto de guanidina e 8 M de uréia. Após solubilização, as proteínas recombinantes foram usadas em experimentos de “pull down” *in vitro*.

Como pode se observado na Figura 14, a IL-15 pôde ser encontrada ligada à resina contendo amastina enquanto que uma interação bem mais fraca (quase não detectável) foi detectada entre IL-15 recombinante e a resina com GST. A interação Amastina::GST com IL-15::His pode ser observada tanto nos blots revelados com anticorpo anti-IL15 quanto com anti-histidina. A interação encontrada entre amastina e IL15 no experimento de “pull down” *in vitro* é uma forte evidência porque foram usadas proteínas recombinantes produzidas em bactéria durante o experimento. Como as proteínas produzidas se encontram insolúveis elas foram tratadas com agentes solubilizantes. Não se sabe se a estrutura das proteínas recombinantes é a mesma das proteínas nativas e se as condições usadas durante o experimento são as

ideais para que a interação ocorra. Mesmo assim, foi detectada uma interação específica entre amastina e IL-15.

Porém, para afirmar que há uma interação entre essas duas proteínas é necessário a execução de experimentos adicionais como, por exemplo, “pull down” *in vivo* usando extratos celulares de parasitos super expressando Amastina::GFP, co-imunoprecipitação de amastina e IL-15 a partir de lisados totais de células produtoras de IL-15 infectadas com cepa G de *T. cruzi* expressando Amastina::GFP e experimentos de imunofluorescência ou FRET (do inglês, “fluorescence resonance energy transfer”). Esses experimentos usam proteínas oriundas dos organismos que as produzem e assim as condições nas quais o experimento é feito se aproximam do que ocorre fisiologicamente. Então, as interações encontradas nesses experimentos são mais próximas do que as que ocorrem durante o processo de infecção.

No último conjunto de experimentos, procuramos avaliar os possíveis efeitos biológicos resultantes de uma possível interação entre a amastina e IL-15. Inicialmente havíamos planejado realizar ensaios de RNAi com o objetivo de bloquear a expressão de IL-15 nas células hospedeiras e avaliar o efeito dessa inibição sobre a infecção. Entretanto, sabendo que IL-15 apresenta baixos níveis de expressão em vários tecidos, decidimos adotar a estratégia de transfectar células para aumentar os níveis da forma intracelular da citocina. Primeiramente, células HEK foram transfectadas com o gene de GFP para escolha do reagente de transfecção mais adequado. Foram testados os reagentes comerciais Fugene HD (Roche) e Lipofectamina 2000 (Invitrogen) e o polímero PEI (Godbey *et al.*, 1999). Ao contrário dos outros reagentes, a lipofectamina alterou a morfologia das células apesar de ter apresentado a maior eficiência de

transfecção. Essa alteração se deve à baixa quantidade de células usadas no momento da transfecção que acarreta numa diminuição da viabilidade celular, como descrito pelo fabricante. Esse problema pode ser contornado aumentando o número de células ou diminuindo a quantidade de reagente no momento da transfecção. Já o Fugene HD não alterou a morfologia celular, entretanto a eficiência de transfecção obtida foi muito baixa. Dessa forma, o reagente escolhido para transfecção foi o PEI devido a conciliar a morfologia celular com uma eficiência de transfecção satisfatória.

O plasmídeo usado na transfecção das células HEK93T para expressão de IL-15, gentilmente cedido pelo prof.^o T.A. Waldman, codifica a forma citoplasmática de IL-15 além de conter modificações nos elementos regulatórios desse gene para aumentar os níveis de expressão (Tagaya *et al.*, 1997). Após transfecção com PEI, a IL-15 produzida foi detectada por imunofluorescência com 48 e 72 horas pós-transfecção, sendo possível observar uma distribuição uniforme da marcação da citocina em vermelho condizente com a localização citoplasmática esperada.

Células HEK293T transfectadas para expressarem IL-15 foram infectadas com *T. cruzi* 24 horas após a transfecção. A porcentagem de células infectadas e o número de amastigotas por célula infectada foi determinado nos períodos de 48 e 72 horas após infecção. A expressão de IL-15 somente afetou esses parâmetros no período de 72 horas em comparação com as células não transfectadas. Esse efeito pode ser devido a uma maior quantidade da citocina no período de 72 horas que poderia ter causado um aumento da proliferação dos parasitos, por isso o número de amastigotas por célula infectada seria maior. Contudo, os níveis de IL-15 no período de 48 e 72 horas não variam de acordo com a imunofluorescência. Dessa forma, o efeito observado no

número de amastigotas por célula infectada no período de 72 horas deve ser explicado pela ação da IL-15 sobre a proliferação do parasito, a qual é observada em tempos mais longos. Como a porcentagem de células infectadas foi avaliada até o período de 72 horas, não é possível concluir que a citocina IL-15 aumenta a taxa de infecção. Para isso seriam necessários experimentos de infecção com tempos mais longos, nos quais seria possível observar a infecção das células hospedeiras por tripomastigotas liberadas pela própria cultura. Provavelmente essa taxa de infecção seria maior já que as células infectadas e transfectadas para expressarem IL-15 apresentam uma quantidade maior de amastigotas intracelulares, as quais posteriormente seriam liberadas como tripomastigotas na cultura.

São poucos os estudos funcionais acerca das amastinas. Sabe-se que essa família multigênica está presente em parasitos como *T. cruzi* e *Leishmania sp* e que os membros são expressos principalmente no estágio presente no hospedeiro mamífero durante o ciclo de vida. Os dados de estudos indicando o efeito da super expressão das amastinas sobre a taxa de divisão celular do parasito precisam ser melhor avaliados, mas sugerem um papel dessa proteína no controle do ciclo celular. Por outro lado, ensaios de duplo híbrido e os ensaios de interação *in vitro* indicaram que uma das isoformas das amastinas (TcX71.40) interage com a interleucina 15, isso nos levou a especular que as amastinas poderiam atuar como receptores de IL-15 cujo efeito seria o de induzir a proliferação do parasito. O fato de lesões cardíacas de pacientes infectados com *T. cruzi* apresentarem níveis maiores dessa citocina (Fonseca *et al.*, 2007) poderia indicar também que o parasito estaria “utilizando” essa citocina como um fator de crescimento. Como descrito acima, diferentemente do que ocorre nas outras citocinas, a IL-15 apresenta uma isoforma citoplasmática e pode ser produzida

por vários tipos celulares. Essa isoforma poderia ser explorada pela célula amastigota como um fator de crescimento presente no citoplasma da célula hospedeira. Normalmente, o hospedeiro produz citocinas para estimular o sistema imune a controlar determinada infecção. Nesse caso, a produção da IL-15 citoplasmática seria benéfica em parte para *T. cruzi*, pois estimularia a proliferação das amastigotas.

Após penetrarem na célula hospedeira, parasitos intracelulares enfrentam uma série de obstáculos para completarem seu ciclo de vida e por isso desenvolveram estratégias para alterar o metabolismo celular e adaptá-lo às próprias necessidades. A apoptose é o principal obstáculo enfrentado, pois a morte da célula hospedeira por apoptose impede o desenvolvimento, proliferação e disseminação do parasito. Dessa forma, as estratégias desenvolvidas visam o controle sobre esse processo celular, como feito pelos apicomplexa *T. gondii* e *Plasmodium sp.*

Várias proteínas de *T. gondii* são secretadas no citoplasma da célula hospedeira, dentre elas proteínas das roptrias e dos grânulos densos (revisado por Ravindran e Boothroyd, 2008). Essas proteínas injetadas na célula alteram várias vias de sinalização como a via das JAKs/STATs, IL-4 e IL-6 (Saeij *et al.*, 2007). As proteínas que interferem nessas vias são kinases, como a ROP16 descrita por Saeij e cols. (2007), ou fosfatases, como a PP2C descrita por Gilbert e cols. (2007) que alteram fatores de transcrição ou interferem em interações entre as proteínas da célula hospedeira. Essas proteínas podem ser encontradas no núcleo da célula hospedeira poucos minutos após infecção pelo parasito, o que evidencia a manipulação do metabolismo celular logo após a infecção. Além das proteínas mencionadas acima, o *T. gondii* secreta proteínas que permanecem na membrana do vacúolo parasitóforo que podem interagir com

proteínas presentes no citoplasma da célula hospedeira. Hajj e cols. (2007) caracterizaram mais uma kinase presente nas roptrias, denominada ROP18, que permanece no vacúolo parasitóforo. Parasitos super expressando essa proteína apresentam maior taxa de proliferação em comparação com parasitos selvagens. Além disso, experimentos de co-infecção usando parasitos selvagens e transfectados mostraram que o aumento na proliferação ocorre somente nos parasitos dentro dos vacúolos parasitóforos que contém maior quantidade de ROP18.

Essa manipulação do metabolismo celular por *T. gondii* tem como principal objetivo a criação de um ambiente anti-apoptótico onde o parasito pode se multiplicar. A interferência no processo de apoptose é feita por meio da inibição das caspases 3 e 7 (Keller *et al.*, 2005), por aumentar a expressão de fatores anti-apoptóticos, inibir a liberação de citocromo c da mitocôndria e por inibir a ativação de fatores pro-apoptóticos como Bax e Bak (Hippe *et al.*, 2009; revisado por Laliberté e Carruthers, 2008).

O apicomplexa *Plasmodium sp* apresenta dois estágios no hospedeiro vertebrado que infectam diferentes células. Os esporozoítos têm os hepatócitos como células hospedeiras enquanto os merozoítos infectam hemácias. A proteína UIS3, super expressa na superfície dos esporozoítos, interage com a proteína L-FABP (do inglês, "liver fatty acid binding protein") do hepatócito (Mikolajczak *et al.*, 2007). Essa proteína é a principal carreadora de ácidos graxos no interior da célula, atuando na importação, armazenamento e destinação dessas moléculas. A super expressão de L-FABP aumenta a proliferação do parasito no interior do hepatócito enquanto a inibição da expressão dessa proteína tem efeito oposto. A aquisição de ácidos graxos pelo

parasito é a principal explicação para essa interação e para os efeitos observados na multiplicação do parasito.

Os hepatócitos infectados por *Plasmodium* apresentam resistência a apoptose tanto *in vitro* quanto *in vivo* (van de Sand *et al.*, 2005). A inibição da apoptose parece ser crucial durante a infecção e replicação nos hepatócitos contudo a manipulação da apoptose é feita de forma mais precisa no final do desenvolvimento dos esporozoítos em merozoítos. Sturm e cols. (2006) observaram previamente à infecção dos eritrócitos um número crescente de hepatócitos livres na circulação sanguínea contendo merozoítos de *P. berghei*. Esses hepatócitos livres exibem várias características de células apoptóticas como presença de citocromo c no citoplasma, aumento da permeabilidade da membrana externa mitocondrial e condensação da cromatina, mas não apresentam fosfatidil serina no folheto externo da membrana plasmática. Os merozoítos induzem uma morte celular no hepatócito, que não pode ser classificada como necrose nem como apoptose, para promover a formação de vesículas que transportarão os merozoítos na circulação sanguínea (revisto por Carmen e Sinai, 2007). Ao infectar os eritrócitos, os merozoítos degradam a hemoglobina presente no citoplasma. Porém, as hemácias de mamíferos são anucleadas e não possuem organelas, portanto não são capazes de sintetizar novas proteínas e outros componentes celulares. A célula hospedeira nesse caso possui uma deficiência em vários nutrientes necessários ao parasito. A aquisição de nutrientes por *P. falciparum* é feita a partir das substâncias presentes no meio extracelular por meio do aumento da permeabilidade das hemácias infectadas a diferentes solutos (Cobbold *et al.*, 2011). Diante desses exemplos, fica claro que os parasitos intracelulares desenvolveram diversos mecanismos para sobrevivência dentro de seus hospedeiros

os quais se baseiam na defesa das células parasitadas e no aumento da eficiência de aquisição de nutrientes.

A estratégia de criar um ambiente anti-apoptótico também é explorada por *T. cruzi*. Por meio da interferência em vias de sinalização e por inibição da apoptose o parasito promove a sobrevivência da célula hospedeira até diferenciar e continuar seu ciclo. Chuenkova e PereiraPerrin. (2009) mostraram que o *T. cruzi* produz um fator neurotrófico, que é uma transialidase presente na superfície do parasito, que é substrato e ativador da kinase Akt. Esse fator aumenta a expressão de Akt e suprime a transcrição de genes pro-apoptóticos em células de Schwann, resultando numa resistência da célula hospedeira a indutores externos de apoptose como TNF- α , TGF- β e stress oxidativo. Essa mesma transialidase é capaz de ligar no receptor TrkC, um receptor da família dos receptores tirosino-kinases envolvido na regeneração de células do sistema nervoso central e periférico. A ligação do fator neurotrófico derivado do parasito no receptor TrkC promove a via de sinalização das MAPKs (do inglês, "mitogen activated protein kinases) que resulta no crescimento e sobrevivência de neurônio e de células de Schwann (Weinkauf e PereiraPerrin, 2009).

Outro fator solúvel, a cruzipaina, na ausência de atividade catalítica, protege cardiomiócitos neonatais contra apoptose. As células tratadas com essa proteína apresentam níveis elevados de Bcl-2 (Aoki *et al.*, 2004), uma proteína anti-apoptótica, e ativação de múltiplas vias de sinalização que modulam a apoptose (Aoki *et al.*, 2006).

A interação entre amastina e a forma citoplasmática de IL-15 pode ser mais um mecanismo de interferência na célula hospedeira. Essa citocina promoveria a multiplicação do parasito e inibiria o processo de apoptose da célula hospedeira. Isso

seria uma estratégia muito eficiente para o parasito porque as células com maiores níveis de IL-15 seriam melhores hospedeiras: essas células não entrariam em apoptose e ao mesmo tempo promoveriam a multiplicação intensa do parasito. A ligação de moléculas do parasito em citocinas para promover a própria multiplicação ainda não foi observada em outros organismos e por isso mais experimentos são necessários para validar a interação entre amastina e IL-15.

Para dar mais suporte à hipótese acima, experimentos de infecção de animais nocaute para IL-15 e avaliação da parasitemia e carga parasitária tissular seriam importantes. Além disso, experimentos de co-immunoprecipitação, restauração de fluorescência ou FRET (do inglês, “fluorescence resonance energy transfer”) estão sendo planejados para confirmar se essa interação observada tanto nos ensaios de duplo híbrido e nos experimentos de “pull down” estaria ocorrendo realmente.

6. Referências bibliográficas

Acosta-Serrano A., Almeida I.C., Freitas-Junior L.H., Yoshida N., Schenkman S. (2001). The mucin-like glycoprotein super-family of *Trypanosoma cruzi*: structure and biological roles. ***Molecular and Biochemical parasitology***. 114: 143-150.

Andrews N.W., Robbins E.S., Ley V., Hong K.S., Nussenzweig V. (1988). Developmentally regulated, phospholipase C-mediated release of the major surface glycoprotein of amastigotes of *Trypanosoma cruzi*. ***Journal of Experimental Medicine***. 167: 300-314.

Aoki M.P., Guinazu N.L., Pellegrini A.V., Gotoh T., Masih D.T., Gea S. (2004). Cruzipain, a major *Trypanosoma cruzi* antigen, promotes arginase-2 expression and survival of neonatal mouse cardiomyocytes. ***American Journal of Physiology and Cell Physiology***. 286: C206-C212.

Aoki M.P., Cano R.C., Pellegrini A.V., Tanos T., Guinazu N.L., Coso O.A., Gea S. (2006) Different signaling pathways are involved in cardiomyocyte survival induced by a *Trypanosoma cruzi* glycoprotein. ***Microbes and Infection***. 8: 1723–1731.

Ausubel F.M., Brent R., Kingston R.E., Moore D.D., Seidman J.G., Smith J.A., Struhl K. Current protocols in molecular biology. (2007). Wiley Interscience.

Bamford R.N., Battiata A.P., Burton J.D., Sharma H. Waldmann T.A. (1996). Interleukin (IL) 15/IL-T production by the adult T-cell leukemia cell line HuT-102 is associated with a human T-cell lymphotropic virus type I R region/IL-15 fusion message that lacks many upstream AUGs that normally attenuate IL-15 mRNA translation. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 93: 2897-2902.

Bao Y., Weiss L.M., Ma Y.F., Kahn S., Huang H. (2010). Protein kinase A catalytic subunit interacts and phosphorylates members of trans-sialidase super-family in *Trypanosoma cruzi*. **Microbes and Infection.** 12: 716-726.

Benchimol Barbosa P.R. (2006). The oral transmission of Chagas' disease: an acute form of infection responsible for regional outbreaks. **Int. J. Cardiol.** 112:132–133.

Bódnar A., Nizsalóczy E., MocsárG., Szalóki N., Waldmann T.A., Damjanovich S., Vámosi G. (2008). A biophysical approach to IL-2 and IL-15 receptor function: localization, conformation and interactions. **Immunology Letters.** 116: 117–125.

Brener Z., Andrade A., Barral-Netto M. *Trypanosoma cruzi* e a Doença de Chagas. 2ªEd (2000). Guanabara Koogan (Rj).

Brisse S., Barnabé C., Tibayrenc M. (2000). Identification of six *Trypanosoma cruzi* phylogenetic lineages by random amplified polymorphic DNA and multilocus enzyme electrophoresis. ***International Journal for Parasitology***. 30: 35-44.

Budagian V., Bulanova E., Paus R., Bufone-Paus S. (2006). IL-15/IL-15 receptor biology: a guided tour through an expanding universe. ***Cytokine & Growth Factor Reviews***. 17 259–280.

Burton J.D., Bamford R.N., Peters C., Grant A.J., Kurys G., Goldman C.K., Brennan J., Roessler E., Waldmann T.A. (1994). A lymphokine, provisionally designated interleukin T and produced by a human adult T-cell leukemia line, stimulates T-cell proliferation and the induction of lymphokine-activated killer cell. ***Proc. Natl. Acad. Sci.*** 91: 4935-4939.

Camargo E.P. (1964). Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi*: origin of metacyclic trypanosomes in liquid media. ***Rev. Inst. Med. Tro.*** São Paulo. 12: 93-100.

Campos P.C., Bartholomeu D.C., DaRocha W.D., Cerqueira G.C., Teixeira S.M.R. (2008). Sequences involved in mRNA processing in *Trypanosoma cruzi*. ***International Journal for Parasitology***. 38: 1383-1389.

Carmen J.C. e Sinai A.P. (2007). Suicide prevention: disruption of apoptotic pathways by protozoan parasites. ***Molecular Microbiology***. 64(4): 904-916.

Chuenkova M.V., Perrin M.P. (2009). *Trypanosoma cruzi* targets Akt in host cells as an intracellular antiapoptotic strategy. ***Host-pathogen Interactions***. 2(97): 1-9.

Clayton C.E. (1999). Genetic manipulation of kinetoplastida. ***Parasitology Today***. 15(9): 372-378.

Cobbold S.A., Martin R.E., Kirk K. (2011). Methionine transport in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. ***International Journal for Parasitology***. 41: 125-135.

Colli W. (1993). Trans-sialidase: a unique enzyme activity discovered in the protozoan *Trypanosoma cruzi*. ***FASEB Journal***. 7: 1257-1264.

Coughlin B.C., Teixeira S.M.R., Kirchhoff L.V., Donelson J.E. (2000). Amastin mRNA abundance in *Trypanosoma cruzi* is controlled by a 3'UTR untranslated region position-dependent cis-element and an untranslated region binding protein. **J. Biol. Chem.** 275(18): 12051-12060.

D'Agostino P., Milano S., Arcoleo F., Di Bella G., La Rosa M., Ferlazzo V., Caruso R., Chifari N., Vitalli G., Mansueto S., Cillari E. (2004). Interleukin-15, as Interferon-gamma, induces the killing of *Leishmania infantum* in Phorbol-myristate-acetate-activated macrophages increasing Interleukin-12. **Scandinavian Journal of Immunology.** 60: 609-614.

DaRocha W.D., Otsu K., Teixeira S.M.R., Donelson J.E. (2004). Tests of cytoplasmic RNA interference (RNAi) and construction of a tetracycline-inducible T7 promoter system in *Trypanosoma cruzi*. **Molecular and Biochemical Parasitology.** 133: 175-186.

DaRocha W.D., Silva R.A., Bartholomeu D.C., Pires S.F., Freitas J.M., Macedo A.M., Vazquez M.P., Levin M.J., Teixeira S.M.R. (2004). Expression of exogenous genes in *Trypanosoma cruzi*: improving vectors and electroporation protocols. **Parasitology Research.** 92: 113-120.

Dias J.C.P. (1992). Epidemiology of Chagas Disease. Chagas disease (American Trypanosomiasis): its Impact on Transfusion and Clinical Medicine. **ISBT Brasil.** (Sp). 92: 49-80.

Di Noia J.M., Buscaglia C.A., Marchi C.R.D., Almeida I.C., Frasch A.C.C. (2002). A *Trypanosoma cruzi* small surface molecule provides the first immunological evidence that chagas' disease is due to a single parasite lineage. **J. Exp. Med.** 195(4): 401-413.

Doherty T.M., Seder R.A., Sher A. (1996). Induction and regulation of IL-15 expression in murine macrophages. **J. Immunol.** 156(2): 735-741.

El-Sayed N.M., Myler P.J., Bartholomeu D.C., Nilsson D., Aggarwal G., Tran A., Ghedin E., Wortley E.A., Delcher A.L., Blandin G., Westenberger S.J., Caler E., Cerqueira G.C., Branche C., Haas B., Anupama A., Arner E., Aslund L., Attipoe P., Bontempi E., Bringaud F., Burton P., Cadag E., Campbell D.A., Carrington M., Crabtree J., Darban H., Silveira J.F., Jong P., Edwards K., Englund P.T., Fazelina G., Feldblyum T., Ferella M., Frasch A.C., Gull K., Horn D., Hou L., Huang Y., Kindlund E., Klingbeil M., Kluge S., Koo H., Lacerda D., Levin M.J., Lorenzi H., Louie T., Machado C.R., McCulloch R., McKenna A., Mizuno Y., Mottram J.C., Nelson S., Ochaya S., Osoegawa K., Pai G., Parsons M., Pentony M., Pettersson U., Pop M., Ramirez J.L., Rinta J., Robertson L., Salzberg S.L., Sanchez D.O., Seyler A., Sharma R., Shetty J., Simpson A.J., Sisk E., Tammi M.T., Tarleton R., Teixeira S., Aken S.V., Vogt C., Ward P.N., Wickstead B., Wortman J., Shetty J., White O., Fraser C.M., Stuart K.D., Andersson B. (2005). The Genome Sequence of *Trypanosoma cruzi*, Etiologic Agent of Chagas Disease. **Science.** 309: 409-415.

Flamand L., Stefanescu I., Menezes J. (1996). Human Herpesvirus-6 enhances natural killer cell cytotoxicity via IL-15. *J. Clin. Invest.* 97(6): 1373-1381.

Fonseca S.G., Reis M.M., Coelho V., Nogueira L.G., Monteiro S.M., Maicarena E.C., Bacal F., Bocchi E., Guilherme L., Zheng X.X., Liew F.Y., Higuchi M.L., Kalil J., Cunha-Neto E. (2007). Locally produced survival cytokines IL-15 and IL-7 may be associated to the predominance of CD8⁺ T cells at heart lesions of human chronic Chagas disease cardiomyopathy. *Scandinavian Journal of Immunology.* 66: 362-371.

Frasch A.C.C. (2000). Functional diversity in the Trans-sialidase and mucin families in *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology today.* 16(7): 282-286.

Freitas J.M., Augusto-Pinto L., Pimenta J.R., Bastos-Rodrigues L., Gonçalves V.F., Teixeira S.M.R., Chiari E., Junqueira A.C.V., Fernandes O., Macedo A.M., Machado C.R., Pena S.D.J (2006). Ancestral Genomes, Sex, and the Population Structure of *Trypanosoma cruzi*. *Plos Pathogens.* 2(3): e24.

Fundação Oswaldo Cruz, <http://www.fiocruz.br/chagas>.

García E.A., Ziliani M., Agüero F., Bernabó G., Sánchez D.O., Tekiel V. (2010). TcTASV: a novel protein family in *Trypanosoma cruzi* identified from a subtractive trypanomastigote cDNA library. ***PLOS Neglected Tropical Diseases***. 4(10): e841.

Giaimis J., Lombard Y., Makaya-Kumba M., Fonteneau P, Poindron P. (1992). A new and simple method for studying the binding and ingestion steps in the phagocytosis of yeasts. ***J.Immunol. Methods***. 154(2): 185-193.

Gilbert L.A., Ravindran S., Turetzky J.M., Boothroyd J.C., Bradley P.J. (2007). *Toxoplasma gondii* targets a protein phosphatase 2C to the nuclei of infected host cells. ***Eukaryotic Cell***. 6(1): 73-83.

Godbey W.T., Kenneth K.Wu., Mikos A.G. (1999). Poly(ethylenimine) and its role in gene delivery. ***Journal of controlled release***. 60:149-160.

Grabstein K.H., Eisenman J., Shaneback K., Rauch C., Srivinasan S., Fung V. Beers C., Richardson J., Schoenborn M.A., Ahdieh M., Johnson L., Alderson M.R., Watson J.D., Anderson D.M., Giri J.G. (1994). Cloning of a T cell growth factor that interacts with the β chain of interleukin 2 receptor. ***Science***. 264: 965-968.

Gurtler R.E., Segura E.L., Cohen J.E. (2003). Congenital transmission of *Trypanosoma cruzi* infection in Argentina. ***Emerg. Infect Dis.*** 9:29-32.

Hajj H.E., Lebrun M., Arold S.T., Vial H., Labesse G., Dubremetz J.F. (2007). ROP18 is a Rhoptry kinase controlling the intracellular proliferation of *Toxoplasma gondii*. ***PLOS Pathogens.*** 3(2): e14.

Hippe D., Weber A., Zhou L., Chang D.C., Häcker G., Lüder C.G.K. (2009). *Toxoplasma gondii* infection confers resistance against Bim₅-induced apoptosis by preventing the activation and mitochondrial targeting of pro-apoptotic Bax. ***Journal of Cell Science.*** 122: 3511-3521.

Ivens A.C., Peacock C.S., Worthey E.A., Murphy L., Aggarwal G., Berriman M., Sisk E., Rajandream M., Adlem E., Aert R., Anupama A., Apostolou Z., Attipoe P., Bason N., Bauser C., Beck A., Beverley S.M., Biachettin G., Borzym K., Bothe G., Bruschi C.V., Collins M., Cadag E., Ciarloni L., Clayton C., Coulson R.M.R., Cronin A., Cruz A.M., Davies R.M., Gaudenzi J.D., Dobson D.E., Duesterhoeft A., Fazelina G., Fosker N., Frasch A.C., Fraser A., Fuchs M., Gabel C., Goble A., Goffeau A., Harris D., Hertz-Fowler C., Hilbert H., Horn D., Huang Y., Klages S., Knights A., Kube M., Larke N., Litvin L., Lord A., Louie T., Marra M., Masuy D., Matthews K., Michaeli S., Mottram J.C., Müller-Auer S., Munden S., Nelson S., Norbertczak H., Oliver K., O'Neil S., Pentony M., Pohl T.M., Price C., Purnelle B., Quail M.A., Rabbinowitsch E., Reinhardt R., Rieger M., Rinta J., Robben

J., Robertson L., Ruiz J.C., Rutter S., Saunders D., Schäfer M., Schein J., Schwartz D.C., Seeger K., Seyler A., Sharp S., Shin H., Sivam D., Squares R., Squares S., Tosato V., Vogt C., Volckaert G., Wambutt R., Warren T., Wedler H., Woodward J., Zhou S., Zimmermann W., Smith D.F., Blackwell J.M., Stuart K.D., Barrell B., Myler P.J. (2005). The Genome of the Kinetoplastid Parasite, *Leishmania major*. **Science**. 309(5733): 436-442.

Jackson P.A. (2010). The evolution of amastin surface glycoproteins in trypanosomatid parasites. **Mol. Biol. Evo.** 27(1): 33-45.

Kahn S., Colbert T.G., Wallace J.C., Hoagland N.A., Eisen H. (1991). The major 85-kDa surface antigen of the mammalian-stage forms of *Trypanosoma cruzi* is a family of sialidases. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 88: 4481-4485.

Kahn S., Wesley C., Voorhis V., Eisen H. (1990). The major 85-kD surface antigen of the mammalian form of *Trypanosoma cruzi* is encoded by a large heterogeneous family of simultaneously expressed genes. **Journa of Experimental Medicine**. 17: 589-597.

Keller P., Schaumburg F., Fischer S.F., Häcker G., Grob U., Lüder C.G.K. (2005). Direct inhibition of cytochrome c-induced caspase activation invitro by *Toxoplasma gondii*

reveals novel mechanisms of interference with host cell apoptosis. **FEMS Microbiology**. 258: 312-319.

Kelly J.M., Ward H.M., Miles M.A., Kendall G. (1992). A shuttle vector which facilitates the expression of transfected genes in *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania*. **Nucleic Acids Research**. 20(15): 3963-3969.

Khan I.A., Casciotti L. (1999). IL-15 prolongs the duration of CD8⁺ T cell-mediated immunity in mice infected with a vaccine strain of *Toxoplasma gondii*. **The Journal of Immunology**. 163: 4503-4509.

Khan I.A., Moretto M., Wei X.Q., Williams M., Schwartzman J.D., Liew F.Y. (2002). Treatment with soluble interleukin-15R α exacerbates intracellular parasitic infection by blocking the development of memory CD8⁺ T cell response. **Journal of Experimental Medicine**. 195(11): 1463-1470.

Laliberté J., Carruthers V.B. (2008). Host cell manipulation by the human pathogen *Toxoplasma gondii*. **Cellular and Molecular Life Sciences**. 65: 1900-1915.

Lorenzi H.A., Vazquez M.P., Levin M.J. (2003). Integration of expression vectors into the ribosomal locus of *Trypanosoma cruzi*. **Gene**. 310: 91-99.

Low H.P., Tarleton R.L. (1997). Molecular cloning of the gene encoding the 83 kDa amastigote surface protein and its identification as a member of the *Trypanosoma cruzi* sialidase superfamily. **Molecular and Biochemical Parasitology**. 88: 137-149.

Luquetti A.O., Miles M.A., Rassi A., de Rezende J.M., de Souza A.A., Pova M.M., Rodrigues I. (1986). *Trypanosoma cruzi*: zymodemes associated with acute and chronic Chagas' disease in central Brazil. **Trans. Roy. Soc. Trop. Med Hyg.** 80: 462-470.

Maeurer M., Seliger B., Trinder P., Gerdes J., Seitzer U. (1999). Interleukin-15 in mycobacterial infection of antigen-presenting cells. **Scand. J. Immunol.** 50: 280-288.

Martínez-Calvillo S., López I., Hernández R. (1997). pRIBOTEX expression vector: a pTEX derivative for a rapid selection of *Trypanosoma cruzi* transfectants. **Gene**. 199: 71-76.

Mikolajczak S.A., Jacobs-Lorena V., MacKellar D.C., Camargo N., Kappe S.H.I. (2007). L-FABP is a critical host factor for successful malaria liver stage development. **International Journal for Parasitology**. 37: 483-489.

Milano S., Di Bella G., D'Agostino P., Barbera C., Caruso R., La Rosa M., Ferlazzo V., Vitales G., La Russa C., Gambino G., Chifari N., Mansueto S., Cillari E. (2002). IL-15 in human visceral leishmaniasis caused by *Leishmania infantum*. **Clin. Exp. Immunol.** 127:360-365.

Miles M.A., Souza A., Povoá M., Shaw J.J., Lainson R., Toyé P.J. (1978). Isozymic heterogeneity of *Trypanosoma cruzi* in the first autochthonous patients with Chaga's disease in Amazonian Brazil. **Nature.** 272(5656): 819-821.

Minning T.A., Weatherly D.B., Atwood J. 3rd., Orlando R., Tarleton R.L. (2009). The steady-state transcriptome of the four major life-cycle stages of *Trypanosoma cruzi*. **BMC Genomics.** 7(10): 370.

Mody C.H., Spurrell J.C.L., Wood C.J. (1998). Interleukin-15 induces antimicrobial activity after release by *Cryptococcus neoformans*-stimulated monocytes. **The Journal of Infectious Diseases.** 178: 803-814.

Momem H. (1999). Taxonomy of *Trypanosoma cruzi*: a Commentary on Characterization and Nomenclature. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** 94: 181-184.

Olivas-Rubio M., Hernández-Martínez S., Talamás-Rohama P., Tsutsumi V., Reyes-López P.A., Rosales-Encina J.L. (2009). cDNA cloning and partial characterization of amastigote specific surface protein from *Trypanosoma cruzi*. ***Infection, Genetics and Evolution***. 9: 1083-1091.

Parodi A.J., Pollevick G.D., Mautner M., Buschiazzi A., Sanchez D.O., Frasch A.C.C. (1992). Identification of the gene(s) coding for the trans-sialidase of *Trypanosoma cruzi*. ***The EMBO Journal***. 11(5): 1705-1710.

Ravindran S., Boothroyd J.C. (2008). Secretion of proteins into host cells by apicomplexan parasites. ***Traffic***. 9: 647-656.

Rochette A., McNicoll F., Girard J., Breton M., Leblanc E., Bergeron M.G., Papadopoulou B. (2005). Characterization and developmental gene regulation of a large gene family encoding amastin surface proteins in *Leishmania spp.* ***Molecular and Biochemical Parasitology***. 140: 205-220.

Saeij J.P.J., Coller S., Boyle J.P., Jerome M.E., White M.W., Boothroyd J.C. (2007). *Toxoplasma* co-opts host gene expression by injection of a polymorphic kinase homologue. ***Nature***. 445(18): 324-327.

Santos M.A.M., Garg N., Tarleton R.L. (1997). The identification and molecular characterization of *Trypanosoma cruzi* amastigote surface protein-1, a member of the trans-sialidase gene super-family. ***Molecular and Biochemical Parasitology***. 86: 1-11.

Silva, D.M.F. Estudos sobre o papel das proteínas amastinas em *Trypanosoma cruzi*. **Dissertação de mestrado**. 2006.

Souto R.P., Fernandes O., Macedo A.M., Campbell A.D., Zingales B. (1996). DNA markers define two major phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi*. ***Molecular and Biochemical Parasitology***. 83 141-152.

Staquicini D.I., Martins R.M., Macedo S., Sasso G.R.S., Atayde V.D., Juliano M.A., Yoshida N. (2010). Role of GP82 in the selective binding to gastric mucin during oral infection with *Trypanosoma cruzi*. ***PLOS Neglected Tropical Diseases***. 4(3): e613.

Stuart K., Brun R., Croft S., Fairlamb A., Gurtler R.E., Mckerrrow J., Reed S., Tarleton R. (2008). ***The Jour. Of Clin. Inves.*** 118 (4): 1301-1310.

Sturm A., Amino R., van de Sand C., Regen T., Retzlaff S., Rennenberg A., Krueger A., Pollok J., Menard R., Heussler V.T. (2006) Manipulation of host hepatocytes by the malaria parasite for delivery into liver sinusoids. **Science**. 313: 1287-1290.

Tagaya Y., Kurys G., Thies T.A., Losi J.M., Azimi N., Hanover J.A., Bamford R.N., Waldman T.A. (1997). Generation of secretable and non secretable interleukin 15 isoforms through alternate usage of signal peptides. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 94: 14444-14449.

Teixeira S.M.R., DaRocha W.D. (2003). Control of gene expression and genetic manipulation in the Trypanosomatidae. **Genetics and Molecular Research**. 2(1): 148-158.

Teixeira S.M.R., Kirchhoff L.V., Donelson J.E. (1995). Pos-transcriptional elements regulating expression of mRNA of the amastin/tuzin gene cluster of *Trypanosoma cruzi*. **J. Biol. Chem.** 270(38): 22586-22594.

Teixeira S.M.R., Russell D.G., Kirchhoff L.V., Donelson J.E. (1994). A differentially expressed gene family encoding "amastin", a surface protein of *Trypanosoma cruzi* amastigotes. **J. Biol. Chem.** 269(32): 20509-20516.

ten Asbroek L.A., Mol C.A., Kieft R., Borst P. (1993). Stable transformation of *Trypanosoma brucei*. ***Molecular and Biochemical Parasitology***. 59(1): 133-142.

Tibayrenc M., Ward P., Moya A., Ayala F.J., (1986). Natural populations of *Trypanosoma cruzi*, the agente of Chagas disease, have a complex multiclonal structure. ***Proc. Natl. Acad. Sci.*** 83: 115-119.

Tibayrenc M., Neubauer K., Barnabé C., Guerrini F., Skarecky D., Ayala F.J. (1995). Genetic characterization of six parasitic protozoa: Parity between random-primer DNA typing and multilocus enzyme electrophoresis. ***Proc. Natl. Acad. Sci.*** 90: 1335-1339.

Van de Sand C., Horstmann S., Schmidt A., Sturm A., Bolte S., Krueger A., Lutgehetmann M., Pollok JM., Libert C., Heussler V.T. (2005). The liver stage of *Plasmodium berghei* inhibits host cell apoptosis. ***Molecular Microbiology***. 58(3): 731-742.

Vazquez M.P., Levin M.J. (1999). Functional analysis of the intergenic regions of TcP2 β gene *loci* allowed the construction of an improved *Trypanosoma cruzi* expression vector. ***Gene***. 239: 217-225.

Waldmann T.A. e Tagaya Y. (1999). The multifaceted regulation of interleukin-15 expression and the role of this cytokine in NK cell differentiation and host response to intracellular pathogens. ***Annu. Rev. Immunol.*** 17: 19-49.

Ward A., Anderson M., Craggs R.L., Maltby J., Grahames C., Davies R.A., Finch D., Pattison D., Oakes H., Mallinder P.R. (2009). *E. coli* expression and purification of human and cynomolgus IL-15. ***Protein expression and purification.*** 68: 42-48.

Weatherly D.B., Boehlke C., Tarleton R.L. (2009). Chromosome level assembly of the hybrid *Trypanosoma cruzi* genome. ***BMC genomics.*** 10: 255.

Weinkauff C. e PereiraPerrin M. (2009). *Trypanosoma cruzi* promotes neuronal and glial cell survival through the neurotrophic receptor TrkC. ***Infection and Immunity.*** 77(4): 1368-1375.

WHO (World Health Organization), <http://www.who.int>.

Wu Y., Fakhry Y.E., Sereno D., Tamar S., Papadopoulou B. (2000). A new developmentally regulated gene family in *Leishmania* amastigotes encoding a homolog of amastin surface proteins. ***Mol. And Biochem. Parasitology.*** 110: 345-357.

Xiong C., Hixson P.M., Mendoza L.H., Smith C.W. (2005). Cloning and expression of rabbit interleukin-15. ***Veterinary Immunology. Immunopathology***. 107: 131–141.

Yoshida N., Mortara R.A., Araguth M.F., Gonzalez J.C., Russo M. (1989). Metacyclic neutralizing effect of monoclonal antibody 10D8 directed to the 35- and 50-kilodalton surface glycoconjugates of *Trypanosoma cruzi*. ***Infection and Immunity***. 57(6): 1663-1667.

Young C., Losikoff P., Chawla A., Glasser L., and Forman E. (2007). Transfusion-acquired *Trypanosoma cruzi* infection. ***Transfusion***. 47:540–544.

Zingales B., Andrade S.G., Briones M.R.S., Campbell D.A., Chiari E., Fernandes O., Guhl K., Lages-Silva E., Macedo A.M., Machado C.R., Miles A.M., Romanha A.J., Sturm N.R., Tibayrenc M., Schijman A.G. (2009). A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraespecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. ***Mem. Inst. Oswaldo Cruz***. 104(7): 1051-1054.

Zingales B., Souto R.P., Mangia R.H., Lisboa C.V., Campbell D.A., Coura J.R., Jansen A., Fernandes O. (1998). Molecular epidemiology of American trypanosomiasis in Brazil

based on dimorphisms of rRNA and mini-exon gene sequences. *Int. J. Parasitol.* 28(1): 105-112.

Zhang Q., Tibayrenc M., Ayala F.J., (1988). Linkage disequilibrium in natural populations of *Trypanosoma cruzi* (Flagellate), the agent of Chaga's disease. *J. Parasitol.* 35: 81-85.