

Nailma Silva Aprigio dos Santos

Dissertação de Mestrado

Papel de antígenos contendo  
repetições de aminoácidos na infecção  
pelo *Trypanosoma cruzi* e sua utilização para  
sorodiagnóstico da doença de Chagas

Universidade Federal de Minas Gerais

Instituto de Ciências Biológicas

Departamento de Bioquímica e Imunologia

Belo Horizonte, Minas Gerais

2016

Nailma Silva Aprigio dos Santos

Papel de antígenos contendo  
repetições de aminoácidos na infecção  
pelo *Trypanosoma cruzi* e sua utilização para  
sorodiagnóstico da doença de Chagas

Dissertação apresentada ao programa  
de pós-graduação em Bioquímica e  
Imunologia da Universidade Federal  
de Minas Gerais como requisito parcial  
para obtenção do título de mestre em  
Bioquímica e Imunologia

**Orientadora: Santuza Maria Ribeiro Teixeira**

Universidade Federal de Minas Gerais

Instituto de Ciências Biológicas

Departamento de Bioquímica e Imunologia

Belo Horizonte, Minas Gerais

2016

## *Agradecimentos*

À professora Santuza pela oportunidade de trabalhar em seu laboratório, pelos ensinamentos e confiança.

À Professora Jane Lima dos Santos, por ter me incentivado e motivado na pesquisa desde a iniciação científica e por ter sido canal para minha entrada no lab.

À professora Patiu por sempre está a disposição.

Ao professor Flávio da Fonseca pela colaboração e a seus alunos Helton Luis pela ajuda nas funcionalizações e Alice Versiani por ajudar nas purificações e por todo conhecimento transmitido.

Ao Professor Adriano e ao Daniel Santos pelas análises de espectrometria de massas.

A Bruna Mattioly Valente e Leticia Pérez pelos ensinamentos e pelo suporte desde o começo do meu trabalho, sempre dispostas a me ajudar.

A Rafael, por toda ajuda nos experimentos e por sempre trazer alegria com sua presença.

A todos os colegas do laboratório pela amizade, companherismo, momentos de descontração e ajuda quando precisei: Taís, Fernanda, Vivi, Gabi, Luciana, Juliana, Bruna, Rafael, Carlos, Edson, Mariana e Letícia.

A Juliano Leal (*in memoriam*) pelo carinho quando em vida e pelos sequenciamentos.

A Elimar e Jamil por sempre estarem dispostos a ajuda.

A minha mãe (Cleusa), meu pai (Adalto) e meus irmãos (Atila e Adaelson) por sempre me apoiarem em tudo, pela confiança e por todo amor.

Aos amigos de longa data e aos que fiz ao longo dessa caminhada, com os quais compartilhei alegrias e foram “ombro amigo” nos momentos mais difíceis.

## I. RESUMO

Proteínas contendo sequências repetitivas de aminoácidos estão presentes de maneira abundante em diferentes protozoários parasitos. Dados da literatura indicam que essas repetições funcionam como mecanismo de evasão do parasito do sistema imune do hospedeiro. Para testar essa hipótese, estamos investigando duas proteínas do *T. cruzi*: TcL7a e a trans-sialidase. A TcL7a é uma proteína ribossômica, identificada em um *Immunoscreening* com soro de pacientes com doença de Chagas e que apresenta homologia com outras proteínas L7a eucariotas. Porém, diferentemente das proteínas L7a de outros eucariotos, a proteína L7a do *T. cruzi* contém um domínio com repetições dos aminoácidos Ala-Lys-Pro na sua porção N-terminal. A imunização com apenas o motivo repetitivo da TcL7a e posterior desafio com formas tripomastigotas do *T. cruzi* causou uma exacerbação da parasitemia em comparação com animais não imunizados, sugerindo que as repetições modulam negativamente a resposta imune de forma a favorecer a infecção. A trans-sialidase (TS) também é uma proteína de *T. cruzi* que contém repetições de aminoácidos e tem como função transferir resíduos de ácido siálico de glicoconjugados do hospedeiro para mucinas na superfície do parasito, um processo relacionado a invasão da célula hospedeira e ao escape do sistema imune. Resultados recentes do nosso grupo indicam que as repetições de 12 aminoácidos presentes na porção C-terminal de alguns membros da família da TS contribuem para a virulência do parasito. Para investigar essa hipótese, versões recombinantes dessa proteína foram geradas: a TS na forma completa, com a deleção da parte repetitiva e somente a porção repetitiva da TS. Todas as proteínas foram expressas em bactéria e a proteína contendo somente as repetições SAPA foi purificada para utilização em experimentos de imunização que serão ainda realizados. Visto que as repetições de diferentes proteínas do *T. cruzi* são alvos da resposta imune, propomos a utilização de antígenos contendo esses motivos para o desenvolvimento de testes diagnósticos para a doença de Chagas. Com o objetivo de obter um teste mais sensível, essas regiões foram ligadas em nanopartículas de ouro, as quais foram capazes de interagir com os dois antígenos e esse complexo será testado com o soro de pacientes com doença de Chagas.

## II. ABREVIATURAS

BSA: Albumina de soro bovino

CpG: Citosina-fosfato-Guanina

CTAB: do inglês, *cetyltrimethylammonium bromide*

DNA: Acido desoxiribonucléico

DTU: do inglês, *discrete typing units*

GPI : Glicosilfosfatidilinositol

IFN- $\gamma$ : Interferon-gamma

IgG: Imunoglobulina de cadeia gamma

IL-10: Interleucina 10

IL-12: Interleucina 12

IPTG: Isopropiltio- $\beta$ -galactosídeo

MASP: Proteínas de superfície associadas à mucinas

MHC: Principal complexo de histocompatibilidade

mM: Milimolar

ng: Nanogramas

nm: Nanômetros

NK: Natural killer

OD: Densidade óptica

PBS: Salina tamponada com fosfato

PBST: Salina tamponada com fosfato e tween

pH: Potencial hidrogeniônico

RPM: Rotações por minuto

SAPA: do inglês, *shed acute phase antigen*

SDS: Duodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE: Eletroforese em gel de poli(acrilamida e duodecil sulfato de sódio

TcL7a: Proteína L7a de *Trypanosoma cruzi*

TcL7aDeltaRep: Região não repetitiva da proteína L7a de *T. cruzi*

TcL7aRep: Domínio repetitivo da proteína L7a de *T. cruzi*

Th1: Resposta auxiliadora do tipo 1

Th2: Resposta auxiliadora do tipo 2

TLR: Receptores do tipo Toll-like

μl: Microlitro

## SUMÁRIO

1. Introdução .....	1
1.1 O <i>Trypanosoma cruzi</i> e a doença de Chagas.....	1
1.2 O ciclo de vida do <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	4
1.3 Doença de chagas e resposta imune na infecção pelo <i>T. cruzi</i> .....	6
1.4 Antígenos de superfície do <i>T. cruzi</i> .....	8
1.5 Antígenos do <i>T. cruzi</i> contendo repetições de aminoácidos .....	10
1.6 Diagnóstico da doença de Chagas .....	13
1.7 Nanotecnologia e sua utilização em testes diagnósticos .....	14
2. Objetivos .....	16
2.1 Objetivo geral.....	16
2.2 Objetivos específicos .....	16
3. Material e Métodos.....	17
3.1 Amplificação das sequências de DNA referentes as proteínas TS completa, TS sem SAPA e TS-SAPA .....	17
3.2 Indução em bactéria e análise da expressão das proteínas recombinantes...19	
3.2.1 Transformação bacteriana, indução e teste de solubilidade das proteínas recombinantes em bactérias BL21 Star™(DE3).....	19
3.2.2 Transformação bacteriana, indução e teste de solubilidade da TS-completa em <i>E. coli</i> ArcticExpress (DE3).....	20
3.2.3 Western blot com anticorpo anti-histidina com as proteínas TS completa e TS-SAPA .....	21
3.2.4 Purificação, quantificação e espectrometria de massas da TS-SAPA .....	22
3.3 Western blot com o soro de camundongos infectados com <i>T. cruzi</i> .....	22
3.4 Análise do reconhecimento da proteína TcL7aRep por soro de pacientes com doença de chagas .....	22

3.5 Funcionalização com nanopartículas de ouro.....	23
4. Resultados .....	25
4.1 Amplificação das sequências correspondentes a trans-sialidase e suas versões truncadas .....	25
4.2 Clonagem dos genes da TS e suas versões truncadas em vetor pET21a para expressão das proteínas recombinantes.....	27
4.3 Avaliação da expressão das proteínas recombinantes por meio de western blots com anticorpo anti-his Tag.....	31
4.4 Teste de solubilidade das proteínas recombinantes em <i>E. coli</i> BL21 Star ....	33
4.5 Indução e teste de solubilidade da TS completa na bactéria ArcticExpress (DE3).....	35
4.6 Purificação da TS-SAPA e análise por espectrometria de massas .....	37
4.7 Western blot com soro de camundongo infectado com <i>T. cruzi</i> .....	40
4.8 ELISA com TcL7aRep usando soro de paciente com doença de chagas.....	41
4.9 Ligação dos antígenos em nanopartículas de ouro.....	42
5. DISCUSSÃO .....	46
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	53

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 O *Trypanosoma cruzi* e a doença de Chagas

O protozoário *Trypanosoma cruzi*, o agente etiológico da doença de Chagas, foi descrito pela primeira vez por Carlos Chagas em 1909, que também descreveu seu ciclo de vida, o hospedeiro invertebrado transmissor do parasito, os hospedeiros vertebrados reservatórios e sinais e sintomas da doença (Chagas, 1909). Como a população do parasito possui uma grande heterogeneidade genética, análises moleculares de diferentes isolados de *T. cruzi* permitiram a classificação das cepas do parasito em seis grupos distintos, TcI –TcVI, conhecidos como DTUs do inglês *discrete typing units* (Zingales *et al.*, 2012).

A doença de Chagas ocorre principalmente na América Latina, contudo, devido às migrações, sua incidência vem aumentando também nos Estados Unidos, países europeus e alguns países do pacífico ocidental, sendo estimado haver atualmente entre 6-7 milhões de pessoas infectadas pelo parasito em todo o mundo (WHO 2016). A transmissão ocorre principalmente através das fezes e urina de insetos hematófagos infectados, pertencentes a família Reduviidae e subfamília Triatominae. Apesar de já terem sido identificadas mais de 130 espécies de insetos triatomíneos, três delas são as mais importantes na transmissão do parasito para o homem: *Triatoma infestans*, *Rhodnius prolixus* e *Triatoma dimidiata*.

Esses insetos, tipicamente, habitam em rachaduras de casas mal construídas em áreas rurais e suburbanas, se escondendo durante o dia e se tornando ativos a noite, onde se alimentam de sangue humano. Ao sugar o sangue do hospedeiro, picam em áreas expostas da pele, defecando no local da picada. Ao coçar a região da picada, o indivíduo espalha os parasitos, que podem penetrar no corpo através da lesão gerada pela picada do inseto. Além dessa forma, o parasito também pode ser transmitido através de alimentos contaminados, transplantes de órgãos, infecção congênita e acidentes de trabalho (Junqueira *et al.*, 2010; Rassi e Marin-Neto, 2010).

Após a infecção, ocorre um período de incubação do parasito que varia de 2-3 semanas, sendo posteriormente observado um elevado número destes na corrente sanguínea e nos tecidos, o que caracteriza a fase aguda da doença de Chagas. Nessa fase, há uma excessiva ativação do sistema imune e em 90% dos casos a infecção é controlada sem o uso de drogas tripanossomicidas. Tem duração de aproximadamente 2 meses e em muitos casos os sintomas são leves ou ausentes.

Por outro lado, a transmissão por insetos vetores pode resultar no chagoma de inoculação, quando a porta de entrada do parasito é a pele ou o sinal de Romanã, quando é pela mucosa ocular (figura 1). Além disso, alguns pacientes podem apresentar febre, dor de cabeça, gânglios linfáticos aumentados, palidez, dor muscular, dificuldade em respirar, inchaço, dor abdominal ou no peito. Com relação a sorologia, é possível detectar anticorpos da classe IGM e IgG durante essa fase, havendo queda de IgM na fase crônica (Cançado, 1999; Junqueira *et al.*, 2010; Rassi e Marin-Neto, 2010).

Na fase crônica, a parasitemia e o parasitismo tecidual são controlados devido à forte resposta imune estabelecida, sendo encontrados altos níveis de anticorpos IgG no soro. Contudo, além do dano tecidual provocado, a resposta imune gerada é incapaz de erradicar completamente a infecção, levando a persistência de parasitos em diferentes tecidos do hospedeiro, o que é demonstrado, por exemplo, pela presença de reservatórios de amastigotas quando a resposta imune é reprimida, em processos de imunossupressão. A evolução da fase crônica da doença de Chagas varia em diferentes pacientes. Cerca de 60-70% dos pacientes não apresentam as manifestações clínicas características da fase crônica, contudo possuem sorologia positiva para o *T. cruzi*, o que caracteriza a forma indeterminada da doença. Por outro lado a forma sintomática da doença é desenvolvida por cerca de 30-40% das pessoas infectadas. Até 30% desses pacientes sofrem de distúrbios cardíacos, enquanto aproximadamente 10% sofrem de alterações digestivas e neurológicas (figura 1). De fato, a persistência de parasitos em células cardíacas, do intestino e músculo esquelético é fundamental para o processo de cronicidade da doença, (Cançado, 1999; Tarleton, 2007; Junqueira *et al.*, 2010; Rassi e Marin-Neto, 2010).

Apesar das intensas pesquisas na área, ainda não existem vacinas para a doença de Chagas, sendo o controle de vetores o método mais eficaz de prevenção na América latina. O tratamento pode ser realizado a partir de dois medicamentos, o benznidazol e o nifurtimox, ambos eficazes se administrados nas fases iniciais da doença, sendo pouco efetivos na fase crônica. Sua utilização também é indicada em casos de reativação da doença, infecção congênita ou em casos assintomáticos. Apesar dos seus benefícios, estes medicamentos provocam reações adversas em cerca de 40% dos pacientes e não são indicados para mulheres grávidas ou pessoas com insuficiência renal ou hepática (Cançado, 1999).

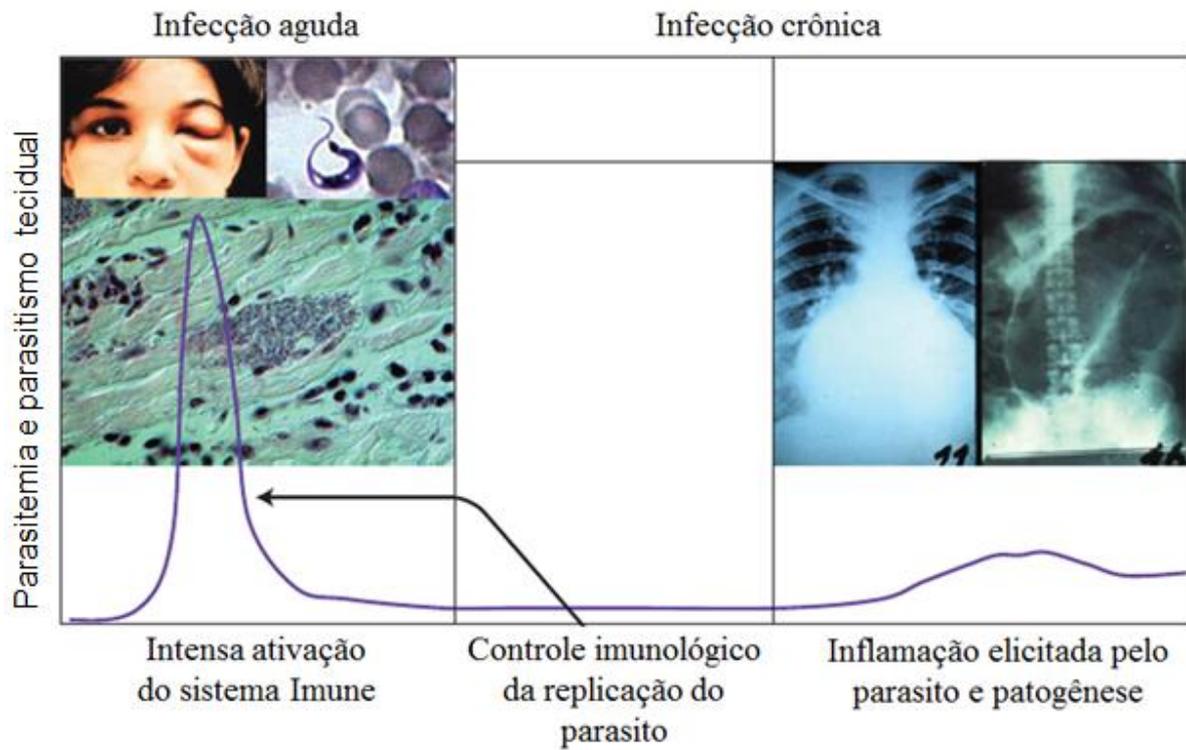


Figura 1: **Manifestações clínicas que podem ser apresentadas por indivíduos infectados pelo *T. cruzi*.** A imagem da esquerda representa o sinal de Romaña, um sinal da fase aguda, onde há elevada parasitemia. A direita, as diferentes formas clínicas que a fase crônica pode apresentar. Adaptado de Junqueira *et al.* 2010.

## 1.2 O ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*

O *Trypanosoma cruzi* apresenta um complexo ciclo de vida, que compreende estágios em hospedeiros vertebrados e invertebrados, podendo assumir três formas principais durante esse processo: tripomastigotas, epimastigotas e amastigotas. Como pode ser acompanhado na figura 2, as formas tripomastigotas circulam no sangue do hospedeiro vertebrado infectado e são ingeridas pelo inseto triatomíneo ao se alimentar do sangue do hospedeiro. No estômago do inseto, muitos tripomastigotas acabam sendo lisados e os que sobrevivem se diferenciam, poucos dias depois, na forma chamada epimastigota. Essas formas migram, então, para o intestino médio do inseto, onde se multiplicam por fissão binária. Na região posterior do intestino e no reto, as formas epimastigotas diferenciam-se em tripomastigotas metacíclicas, que são liberadas junto com as fezes e urina do inseto e são altamente infectivas para células humanas, podendo infectar qualquer célula nucleada.

No citoplasma dessas células, as formas tripomastigotas se diferenciam nas formas chamadas amastigotas. Essas formas são capazes de replicar no hospedeiro vertebrado por meio de fissão binária e diferenciar-se em tripomastigotas que, após rompimento da célula, caem na corrente sanguínea e são capazes de infectar outra célula ou ainda serem ingeridos por insetos hematófagos, retornando ao ciclo no triatomíneo (Junqueira *et al.*, 2010; Rassi e Marin-Neto, 2010). Como uma rota alternativa, as formas amastigotas podem também invadir ativamente os macrófagos (Buscaglia *et al.*, 2006).

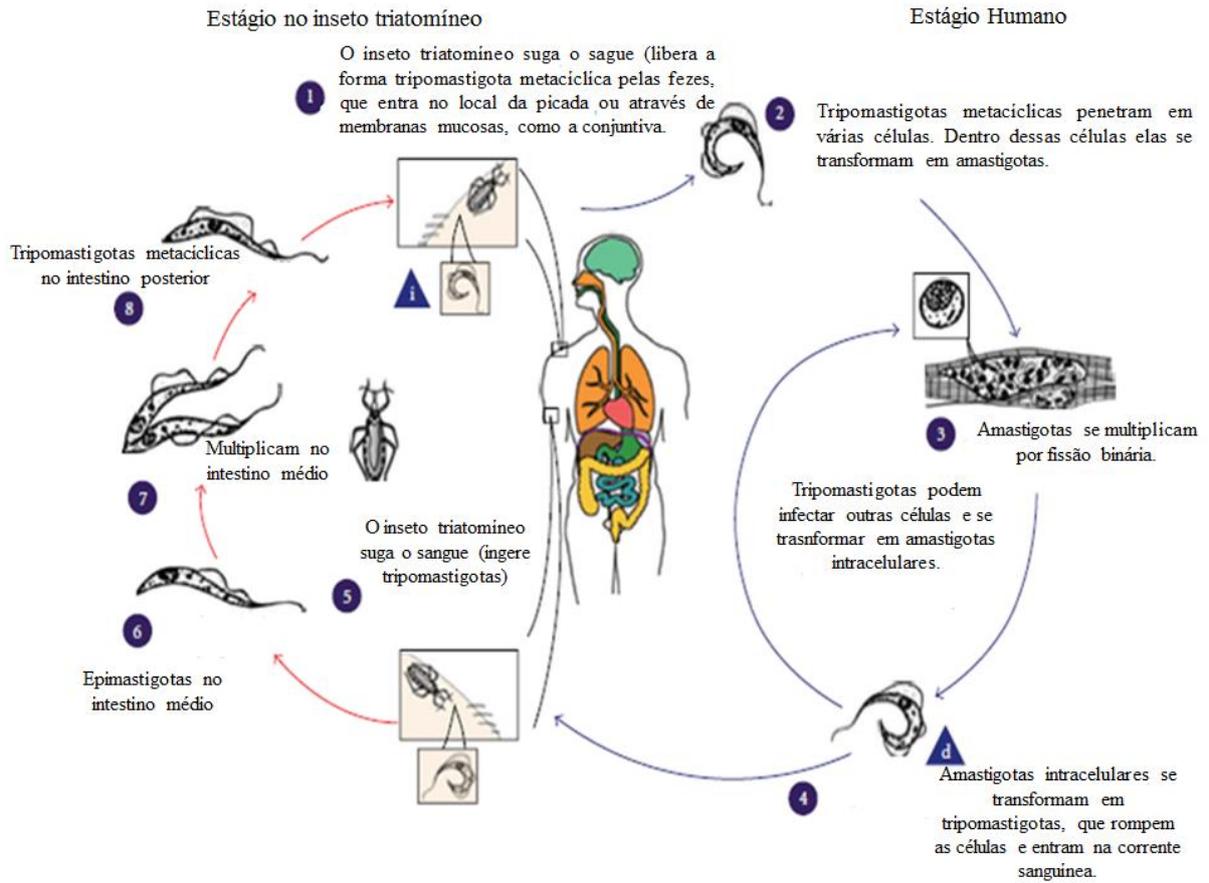


Figura 2: **Ciclo de vida do *T. cruzi* no hospedeiro vertebrado e invertebrado.** Adaptado de De Souza, De Carvalho e Barrias, 2010.

### 1.3 Doença de Chagas e resposta imune na infecção pelo *T. cruzi*

Nos estágios iniciais da infecção pelo *T. cruzi*, a resposta imune inata exerce um papel crucial no controle da replicação do parasito. Ocorre ativação de macrófagos, células dendríticas e células NK induzindo a produção de citocinas como IL-12, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  e moléculas efetoras, o que permite controle da infecção. Os receptores *Toll like* (TLRs), através dos quais o sistema imune reconhece e responde rapidamente a micróbios, atuam como mediadores centrais da ativação do sistema imune inato durante a infecção pelo parasito, acionando vias dependentes de MyD88 e TRIF como proteínas adaptadoras transdutora dos sinais recebidos pelos TLRs. A primeira, é capaz de transduzir sinais por meio de todos os TLRs conhecidos, com exceção do TLR3, enquanto que proteínas TRIF são empregadas por TLR2 e TLR4.

Proteínas tipo mucinas ancoradas por Glicosilfosfatidilinositol (GPI) e GPI livres (GPIL), por exemplo, são agonistas para TLR, induzindo a produção de citocinas pró-inflamatórias por macrófagos. O DNA genômico do parasito também é capaz de estimular resposta via TLR, podendo ativar macrófagos e células dendríticas através dos domínios CpG presentes no seu DNA por meio de TLR9.

As citocinas produzidas durante a imunidade inata fazem a ligação com a imunidade adquirida, na qual há polarização de uma resposta do tipo Th1 por células CD4+, com ativação de células CD8+ e células B. As células CD4+ e CD8+ são capazes de produzir IFN- $\gamma$ , que ativa mecanismos microbicidas dos macrófagos, causando a destruição de parasitos fagocitados. Por outro lado, as células CD8+ possuem atividade citotóxica, causando a destruição de células contendo as formas intracelulares do parasito. Por fim, as células B produzem anticorpos da classe IgG, importantes na lise e opsonização das formas extracelulares do parasito (Junqueira *et al.*, 2010). Um desenho esquemático da resposta imune é apresentado na figura 3.

Estudos demonstram que muitas proteínas do *T. cruzi* são apresentadas ao sistema imune via moléculas de MHC classe I para reconhecimento por células CD8+, como é o caso das proteínas ancoradas por GPI e principalmente membros da família de proteínas trans-sialidases (Martin e Tarleton, 2004). A importância das células CD8+ na resposta a infecção pelo *T. cruzi* vem sendo apontada por diferentes estudos, demonstrando controle da infecção através da produção de IFN- $\gamma$

e da sua atividade citotóxica (De Alencar *et al.*, 2009). Além disso, já foi demonstrada que a depleção dessas células em camundongos aumenta a susceptibilidade à infecção pelo *T. cruzi* (Tarleton, 1990; Tarleton *et al.*, 1992).

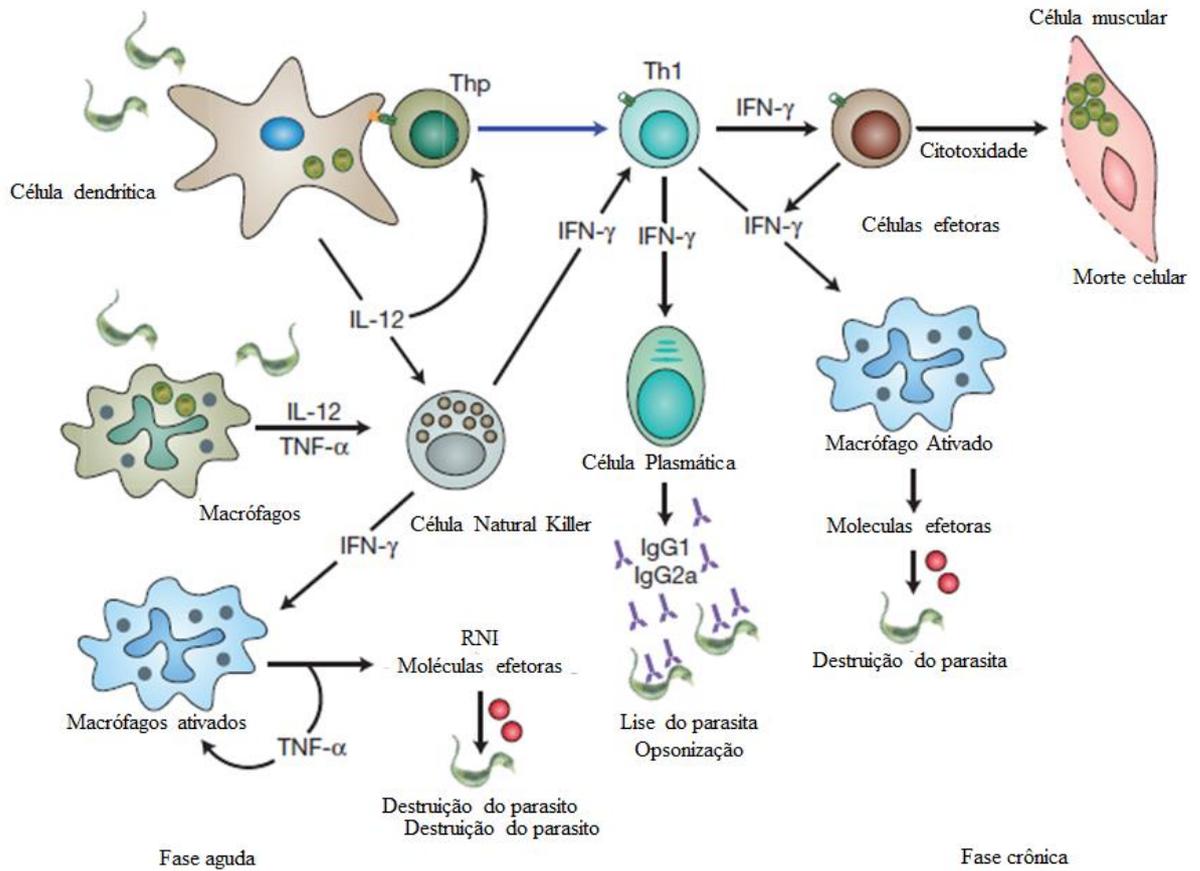


Figura 3: **Representação esquemática da resposta imunológica durante a infecção pelo *T. cruzi*.** Citocinas e células envolvidas na resposta imune ao protozoário *T. cruzi*. Adaptado de Junqueira *et al.*, 2010.

#### 1.4 Antígenos de superfície do *T. cruzi*

Os principais componentes da superfície do *T. cruzi* são as proteínas do tipo mucina, presentes nas diferentes formas de desenvolvimento do parasito. Trata-se de glicoproteínas ancoradas por GPI, cuja porção peptídica apresenta entre 50-200 aminoácidos, sendo ricos em serina e treonina, que são sítios aceptores para o-glicosilação, processo este realizado pela enzima N-acetilglucosamina a partir de precursores UDP-GlcNAc. Os carboidratos são responsáveis por até 60% da massa dessas moléculas, sendo importantes no processo de interação com receptores e conferindo uma característica hidrofílica e estendida às proteínas. As mucinas do *T. cruzi* (TcMUC) podem ser classificadas em dois grupos: TcMUCI, cuja porção peptídica contém repetições em *tandem* dos aminoácidos serina, prolina e lisina e TcMUCII, que não possuem repetições. Membros das TcMUCI possuem variações na porção N-terminal, gerando hipervariabilidade nessa região. Por outro lado, uma característica importante das TcMUCII é que seus genes estão próximos no genoma aos genes de uma outra família de proteínas de superfície denominada: MASPs (*mucin-associated surface protein*). MASPs são pequenas e variáveis proteínas de superfície ancoradas a GPI e codificadas por uma superfamília multigênica e polimórfica presente somente em *T. cruzi* (Buscaglia *et al.*, 2006; Bartholomeu *et al.*, 2009).

*T. cruzi* e algumas outras espécies do gênero *Trypanosoma* possuem uma grande família de proteínas de superfície que desempenha um papel de grande importância biológica para o parasito, denominada “trans-sialidase” (Buscaglia *et al.*, 2006).

Todos os membros da família das trans-sialidasas (TS) possuem o motivo VTVxNVxLYNR conservado, havendo mais de 1400 genes que codificam para os mesmos. Oito grupos de TS já foram descritos, sendo quatro deles melhores caracterizados (Freitas *et al.*, 2011). O grupo I contém TS com atividade enzimática. O grupo II é composto por glicoproteínas de superfície tais como TSA-1, gp82 e ASP-2, relacionadas a processos de adesão e invasão, presentes nas formas tripomastigotas e amastigotas do parasito e ancoradas por GPI. O grupo III inclui a proteína FL-160, que inibe a via clássica e alternativa do complemento. E TsTc13, cuja função não é conhecida, é o representante do grupo IV (Freitas *et al.*, 2011; Chiurillo *et al.*, 2016).

A estrutura das trans-sialidases que possuem atividade enzimática, expressas pelas formas tripomastigotas do parasito, consiste de um domínio catalítico no N-terminal e repetições de aminoácidos na porção C-terminal. Essas repetições são denominadas SAPA e compostas pelos aminoácidos DSSAH(S/G)TPSTP(A/V), que se repetem em número variável de vezes (Fig 4). As formas epimastigotas do parasito expressam TS com atividade enzimática, contudo sem a presença das repetições SAPA e não são ancoradas por GPI, como ocorre com as formas infectivas (Frasch, 2000; Dc-Rubin e Schenkman, 2012).



Figura 4: **Estrutura geral de uma TS de tripomastigota de *T. cruzi*.** Na porção N-terminal está representado o peptídeo sinal (quadrado cinza, esquerda) e o domínio catalítico da enzima. As repetições SAPA são representadas na porção C-terminal, próxima a ancora GPI (quadrado cinza, direita). Adaptado de Rubin-De-Celis *et al.*, 2006.

A trans-sialidase é considerada um fator de virulência do *T. cruzi* e tem como função transferir resíduos de ácido siálico de glicoconjugados do hospedeiro para mucinas na superfície do parasito, podendo também ser liberada na corrente sanguínea por ação da fosfolipase C (figura 5).

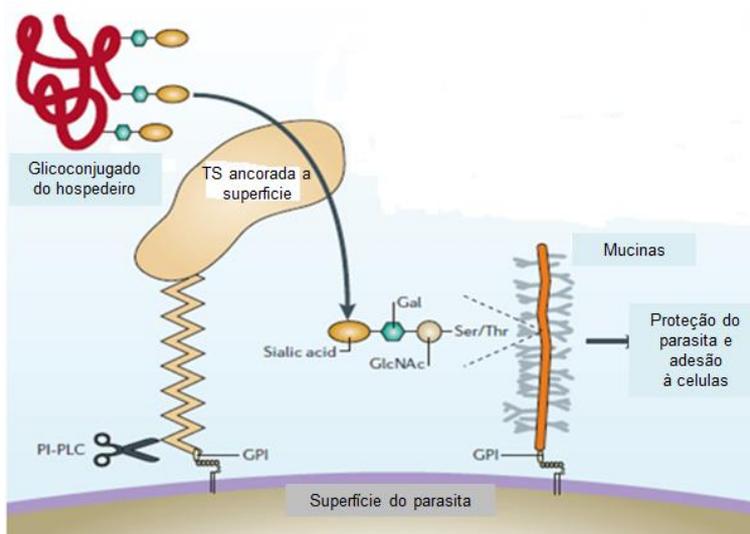


Figura 5: **Representação da atividade da trans-sialidase.**

Adaptado de Rubin-De-Cells *et al.*, 2006.

Rubin-De-cells *et al.* (2006) demonstraram que formas metacíclicas, as quais expressam muito menos TS ativas, quando transfectadas com o gene de TS de formas tripomastigotas, apresentam maior capacidade de escape do vacúolo parasitóforo e maior capacidade de diferenciação em formas amastigotas em comparação com formas metacíclicas não transfectadas. Com relação a resposta imune, Freire-de-Lima *et al.* (2010) demonstrou que a TS compromete a resposta imune através da resialilação de moléculas na superfície de células TCD8<sup>+</sup>, impedindo a resposta dessa célula e favorecendo a infecção. Além disso, o sialoglicofenótipo, associado a atividade desta enzima, estaria relacionado à resistência ao sistema complemento e invasão da célula hospedeira visto que invasão de células deficiente em ácido siálico é reduzida em comparação com células normais (Schenkman, Vandekerckhove e Schenkman, 1993; Tomlinson *et al.*, 1994).

### **1.5 Antígenos do *T. cruzi* contendo repetições de aminoácidos**

As repetições SAPA presentes na TS não estão relacionadas a atividade catatífica, mas parecem contribuir para sua virulência. Buscaglia *et al.* (1999) demonstraram que a presença dessas repetições aumentam a meia vida da enzima no sangue, assim prolongando sua persistência e atividade no hospedeiro.

Análises de genômica comparativa também sugerem o mesmo com relação a essas repetições, pois foi visto que o CL Brener, clone derivado de uma cepa virulenta do *T. cruzi*, apresenta genes codificantes para TS contendo um maior número de repetições SAPA do que o clone CL14, um clone avirulento deste parasito (figura 6 A). Esse dado foi confirmado por *Southern blot*, utilizando o DNA genômico de ambos parasitos digeridos por diferentes enzimas de restrição e empregando-se uma sonda específica para a região repetitiva, demonstrando forte hibridização com DNA de CL Brener e um fraco sinal em CL-14 (figura 6 B), confirmando os dados *in silico* (Neto, 2013).

Em outras proteínas do *T. cruzi* que também possuem sequências repetitivas de aminoácidos é possível observar uma correlação entre a maior quantidade de sequências repetitivas e virulência da cepa do parasita (Pais *et al.*, 2008). Muitos desses motivos são alvos da resposta imune, sendo por isso alguns deles empregados em testes sorodiagnósticos (Frasch *et al.*, 1991). No entanto, a resposta contra esses domínios não tem sido correlacionado com proteção. As repetições SAPA, por exemplo, são imunodominantes e especula-se que essas impeçam a produção de

anticorpos contra o domínio catalítico da TS, prevenindo a inibição da atividade da enzima e contribuindo para a infecção (Frasch, 2000).

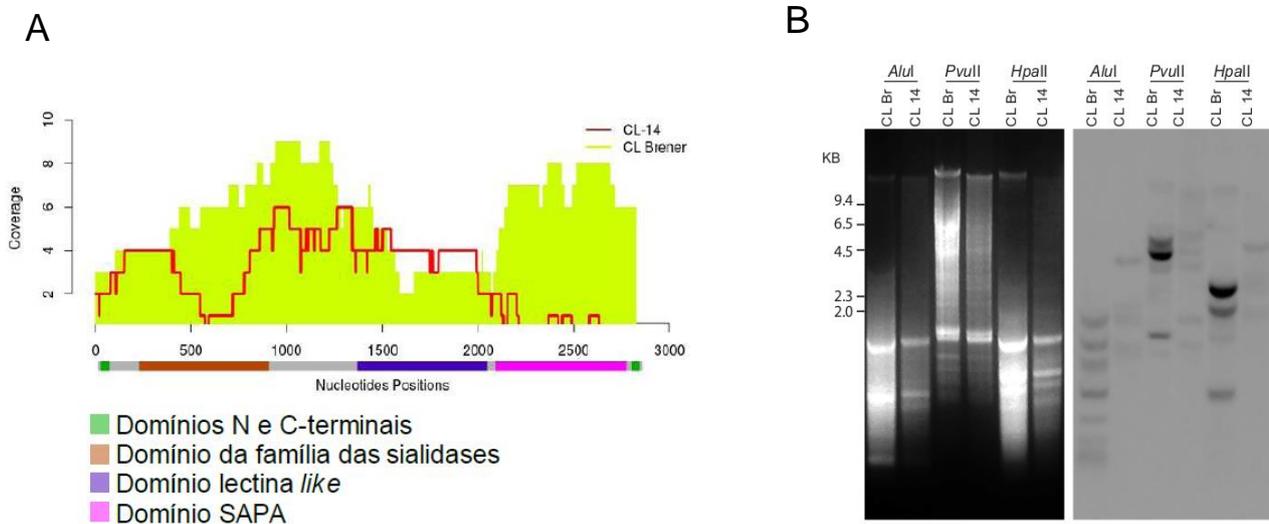


Figura 6: **Comparação genômica entre os genes de TS de CL Brener e CL-14.** A- Análise *in silico* demonstrando a cobertura pelas *reads* genômicas de CL Brener e CL-14. B- Análise por Southern blot das sequências codificadoras de repetições SAPA. O gel a esquerda é uma eletroforese de fragmentos de digestão do DNA genômico dos clones CL Brener e CL-14 digeridos com as enzimas *AluI*, *PvuII* e *HpaII*. A direita, está o resultado do *Southern blot*, utilizando o DNA genômico de CL Brener e CL-14 digeridos pelas enzimas e hibridizado com sonda específica para as repetições SAPA (Neto, 2013).

Por meio de um *immunoscreening* de uma biblioteca de expressão de formas amastigotas do *T. cruzi*, utilizando soro de pacientes com doença de Chagas foram identificadas proteínas do parasito alvos da resposta imune. As proteínas ribossômicas foram as mais frequentemente detectadas e de todas as proteínas identificadas no estudo, 70% correspondem à proteínas com sequências de aminoácidos repetitivos (figura 7). Uma das proteínas identificadas foi denominada TcL7a, por possuir alta homologia com outras proteínas ribossômicas L7a eucarióticas. No entanto, a L7a encontrada no *T. cruzi* contém repetições de aminoácidos não encontradas em outros eucariotos (Darocho *et al.*, 2002). No intuito de avaliar o papel dessas sequências de aminoácidos repetitivos sobre o sistema imune foram geradas as proteínas L7a recombinantes na forma completa, expressando apenas o motivo repetitivo, TcL7aRep, e expressando apenas a região não repetitiva denominada TcL7a $\Delta$ Rep.

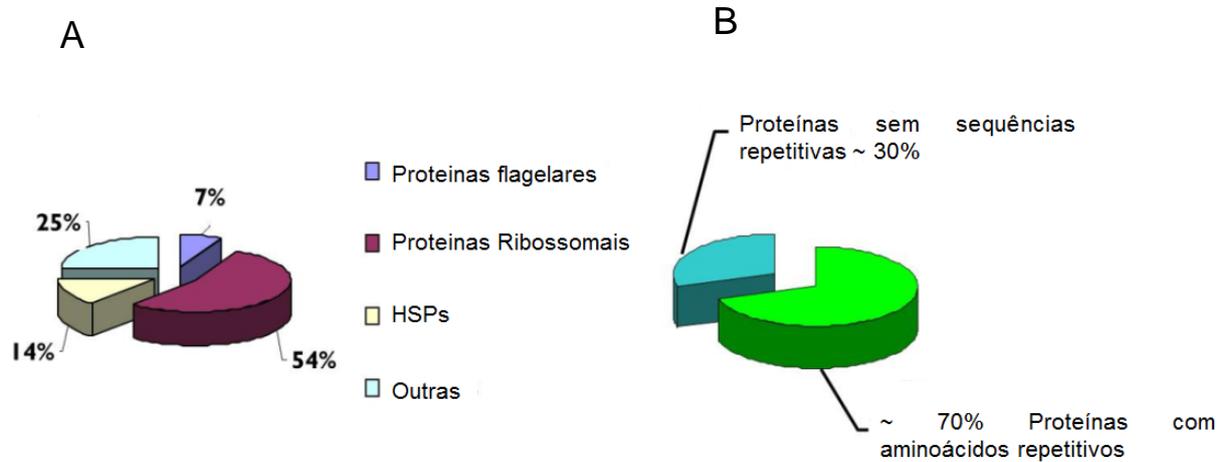


Figura 7: **Immunoscreening** de uma biblioteca de cDNA de formas amastigotas do *T. cruzi* após incubação com soro de pacientes com doença de Chagas. 50 clones que reagiram foram caracterizados, determinando parcialmente sua sequência: (A) 54% destes clones pertencem a proteínas ribossômicas e (B) 70% são compostos de repetições de aminoácidos. Adaptado de Darocha *et al.*, 2002.

Experimentos de imunizações com essas proteínas demonstraram que a imunização com somente a porção repetitiva e posterior desafio com formas tripomastigotas do *T. cruzi* causou a exacerbação da parasitemia quando comparado ao grupo controle não imunizado, levando a morte dos animais imunizados 25 dias após o desafio (figura 8). Em conjunto com outros dados da literatura, esse resultado sugere que o motivo repetitivo poderia modular negativamente a resposta imune, favorecendo a infecção pelo parasito (Valente, 2014, dissertação de mestrado).

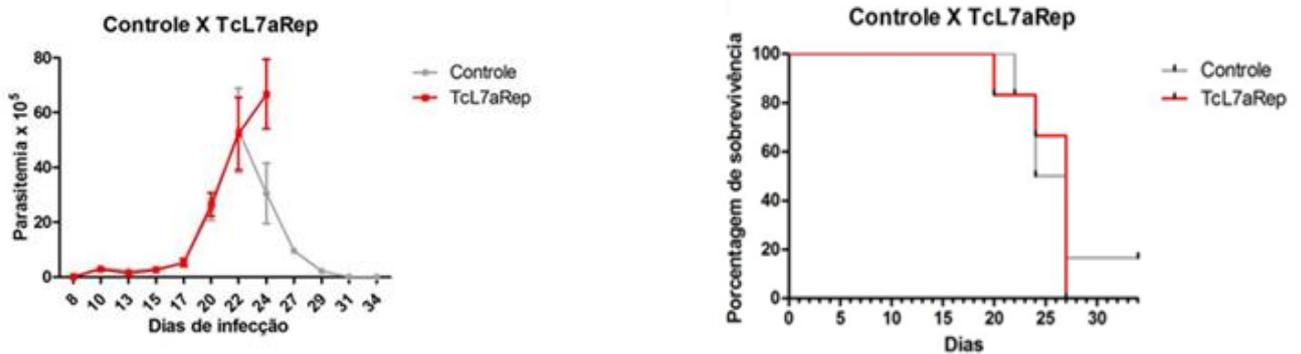


Figura 8: Parasitemia e mortalidade de camundongos imunizados com TcL7aRep e desafiados com formas tripomastigotas de *T. cruzi* (Valente, 2014).

Além do *T. cruzi* outros parasitos conhecidos por evadir a resposta imune como o *Plasmodium* spp e *Leishmania* spp, contém proteínas com sequências repetitivas de aminoácidos, fortalecendo a hipótese de que essa característica representa um sistema de escape da resposta imune para diferentes parasitos (Mckean *et al.*, 1997; Goto, Carter e Reed, 2008; Mendes *et al.*, 2013).

### 1.6 Diagnóstico da doença de Chagas

O diagnóstico da doença de Chagas deve correlacionar os dados epidemiológicos, clínicos e laboratoriais. Na fase aguda é realizado pela demonstração da presença do parasito no sangue, devido a elevada parasitemia dessa fase. Entretanto, devido a baixa parasitemia e parasitismo tecidual observados com o progresso da doença de chagas, os testes sorológicos são mais sensíveis no diagnóstico do que os testes parasitológicos, como o exame direto, xenodiagnóstico e hemocultura. A fase aguda pode ser confirmada indiretamente pela presença de anticorpos da classe IgM contra o *T. cruzi*, contudo, reações cruzadas com o fator reumatóide podem acontecer (Ostermayer e Castro, 1997; Cançado, 1999);

O diagnóstico da fase crônica é realizado pela detecção de anticorpos da classe IgG específicos para o *T. cruzi*. Os testes convencionais utilizados para o diagnóstico da doença de Chagas são imunofluorescência indireta (IFA), hemaglutinação indireta (HAI) e ELISA, sendo recomendado o uso de dois desses testes em paralelo, pela combinação de um teste de alta especificidade com outro de alta sensibilidade

(Cançado, 1999). Entretanto, de forma geral, as desvantagens apresentadas por esses testes são leitura subjetiva, alto custo de aparelhos e suprimentos e baixa reprodutibilidade, como no caso da HAI. Além disso, a pesquisa de antígenos específicos de faz necessária, visto a ocorrência de reações cruzadas entre *T. cruzi* e *Leishmania* (Junqueira, 2008).

Testes diagnósticos baseados em peptídeos recombinantes purificados ou sintéticos são empregados possuindo sensibilidade e especificidade aceitáveis. Estratégias empregando proteínas recombinantes contendo diferentes epítomos também tem sido utilizadas, apresentando alta especificidade (Duthie *et al.*, 2015). Uma característica notável de antígenos do *T. cruzi* é o fato de que muitos deles contêm sequências repetitivas de aminoácidos. Como já mencionado, muitos desses motivos são alvos da resposta imune, constituindo assim indicadores importantes de infecção, sendo possível vislumbrar sua utilização para testes diagnósticos da doença de Chagas (Vergara *et al.*, 1991; Goto, Carter e Reed, 2008; Pais *et al.*, 2008; Duthie *et al.*, 2015). Resultados promissores foram obtidos com a mistura dos antígenos CRA (antígeno repetitivo citoplasmático) e FRA (antígeno repetitivo flagelar) (Frasch *et al.*, 1991).

Neste trabalho propomos o desenvolvimento de um novo teste diagnóstico para doença de Chagas, empregando proteínas contendo sequências repetitivas de aminoácidos e fazendo uso de ferramentas da nanobiotecnologia.

### **1.7 Nanotecnologia e sua utilização em testes diagnósticos**

A nanociência é o estudo dos fenômenos e da manipulação de materiais em escala nanométrica (entre 1-100nm). Trabalhar nessa escala de tamanho é vantajoso, pois propriedades observadas em tamanho micro ou macrométricas podem apresentar-se de forma diferenciada por materiais em escala nanométrica, como a tolerância à temperatura, a variedade de cores, as alterações da reatividade química e a condutividade elétrica. A área que foca no desenvolvimento de sistemas em nanoescala é chamada nanotecnologia, possuindo grandes utilidades em diferentes aplicações, como por exemplo, para a geração de sensores biológico, em terapias, imagem e diagnósticos médicos (P´erez-Juste *et al.*, 2005; Yu e Irudayaraj, 2007; Ferreira e Rangel\*, 2009; Morilla e Romero, 2015).

Biossensores são dispositivos nos quais podem ser incorporadas diversas biomoléculas, como por exemplo, uma enzima, um anticorpo, uma proteína, DNA, para poder medir de modo seletivo determinadas substâncias. O desenvolvimento de biossensores é muito importante para o diagnóstico de doenças, através da detecção, monitoramento e caracterização de interações celulares. Vários grupos de pesquisa já desenvolvem biossensores ópticos em escala micro/nanométrica explorando propriedades únicas de nanoestruturas do ouro e da prata, que dependem do tamanho e forma das mesmas (Yu e Irudayaraj, 2007).

As características ópticas atribuídas às nanopartículas metálicas, por exemplo, são muito exploradas. Na presença do campo eletromagnético da luz, os elétrons livres oscilam coletivamente num processo denominado Ressonância de Plasmon de Superfície Localizada (*LSPR*). No caso de partículas esféricas de 10-nm, a excitação dos elétrons pela luz incidente gera um pico de absorção próximo a 520nm para partículas de ouro e de aproximadamente 370nm para partículas de prata. Por outro lado, no caso de nanobastões, a oscilação de elétrons ocorre tanto no eixo curto quanto no eixo longo do bastão, gerando dois picos de absorção, um referente a oscilação dos elétrons no eixo transversal e outro referente a oscilação dos elétrons no eixo longitudinal. Biossensores fundamentados nessa propriedade dos nanobastões baseiam-se no fato que a absorção é afetada por mudanças dielétricas ao redor desses materiais, que podem ocorrer devido a interação de ligantes com as nanopartículas, sendo possível obter informações sobre eventos de ligações sobre essas estruturas (Yu e Irudayaraj, 2007; Jain *et al.*, 2008). Assim é possível identificar, por exemplo, eventos de ligação de antígenos aos nanobastões e interações de anticorpos a esse complexo em testes sorodiagnósticos, tendo como base os picos de absorção referentes ao nanobastão somente.

## 1. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

- Expressar e purificar a trans-sialidase do *T. cruzi* bem como suas versões truncadas para o desenvolvimento de testes diagnósticos para a doença de Chagas.

### 2.2 Objetivos específicos

- Obter clones do gene de trans-sialidase codificando a sequência completa e suas versões truncadas com ausência das repetições e com somente as repetições SAPA;
- Obter a expressão das proteínas recombinantes em bactéria;
- Purificar as proteínas recombinantes expressas em bactéria;
- Testar a ligação de antígenos recombinantes correspondentes aos motivos repetitivos das proteínas TcL7a e Trans-sialidase em nanobastões de ouro.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 3.1 Amplificação das sequências de DNA referentes a TS completa, TS sem SAPA e TS-SAPA

As sequências de DNA correspondentes as três proteínas foram amplificadas e clonadas no vetor de expressão pET21a. Para isso, iniciadores foram desenhados a partir da sequência da trans-sialidase (número de acesso no *TritypDB*: Tc00.1047053509495.30), contendo sítios para as enzimas de restrição XhoI e NheI. Foram sintetizados 4 iniciadores diferentes para amplificar as três proteínas: TS completa, que corresponde a proteína com a porção catalítica do N-terminal e as repetições da porção C-terminal; TS sem SAPA, com a porção catalítica e ausência das repetições; e TS-SAPA, compreendendo as repetições SAPA da porção C-terminal (figura 9 A). Para a proteína completa o par de iniciadores utilizado foi 5'-GCTAGCATGCTCTGCCCCAGCGAGCCC-3' e 5'-CTCGAGGGGCAAATCAAACCGTAC-3', capaz de gerar um produto de 2673 pb. Para amplificar a proteína sem as repetições SAPA os iniciadores empregados foram 5'-GCTAGCATGCTCTGCCCCAGCGAGCCC-3' e 5'-CTCGAGCATGTGTGCTTCCGTGCC-3' gerando um produto de 1941 pb. Por fim, para amplificar a região correspondente as repetições SAPA, o par de iniciadores utilizado foi 5'-GCTAGCATGGACAGCAGCAGCGACAG-3' e 5'-CTCGAGGGGCAAATCAAACCGTAC-3', gerando um produto de 747 pb (figura 8).

Após PCR, os produtos foram analisados em gel de agarose como descrito (Ausubel *et al.*, 2007). Após a clonagem em vetor TOPO-TA (Invitrogen) as três sequências foram clivadas do vetor TOPO com as enzimas de restrição XhoI e NheI, cujos sítios foram inseridos nos iniciadores, e ligadas, com o auxílio da T4 DNA ligase, ao vetor de expressão pET21a (Invitrogen), previamente digerido com as mesmas enzimas.

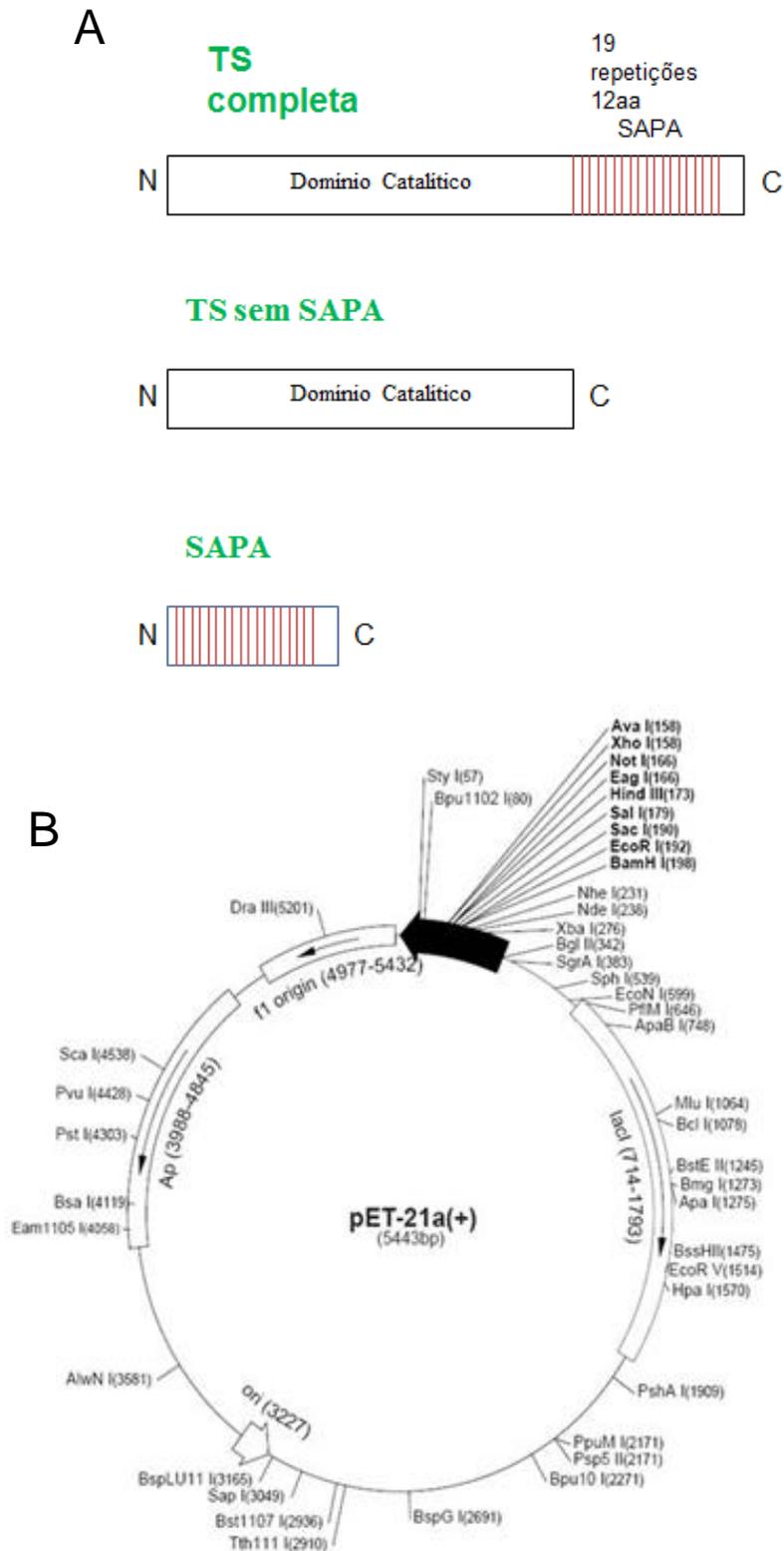


Figura 9: **Desenho esquemático da construção das três proteínas recombinantes. (A)** TS completa, TS sem SAPA e TS-SAPA. **(B)** Vetor de expressão utilizado - pET21a.

## 3.2 Indução em bactéria e análise da expressão das proteínas recombinantes

### 3.2.1 Transformação bacteriana, indução e teste de solubilidade das proteínas recombinantes em bactérias BL21 Star™(DE3)

Aproximadamente 10ng dos vetores de expressão pET21a contendo as sequências referentes às proteínas TS completa, TS sem SAPA e TS-SAPA foram utilizados para transformar bactérias quimiocompetentes BL21 Star™(DE3). As bactérias e os plasmídeos foram incubados no gelo por 30 min e em seguida receberam choque térmico a 42°C por 50 seg. Os tubos foram mantidos no gelo por 2 minutos, sendo posteriormente adicionado 400µl de meio de cultura 2XYT (0,4g Tripitona; 0,25g Extrato de levedura; 0,125g NaCl) sem antibiótico e incubado a 37°C por 1 hora sob agitação (37°C a 180 rpm - C25 Incubator). Após esse tempo, 200 µL do transformado foi plaqueado em meio de cultura 2XYT com 1,5% de ágar e antibiótico ampicilina (100 µg/mL) cobrindo toda a área da placa. Essas foram então incubadas *overnight* a 37°C para o crescimento das bactérias que incorporaram o plasmídeo e adquiriram resistência ao antibiótico.

Para indução das proteínas recombinantes foi realizado o pré-inóculo da TS completa, TS sem SAPA e TS-SAPA. Para isso, várias colônias isoladas referentes a transformação com os respectivos insertos foram adicionadas num volume pequeno de meio 2XYT com ampicilina, ficando sob agitação a 37° até atingir a densidade óptica (OD) de 0,5 a 600 nm. Para o inóculo, foi realizado uma diluição do pré-inóculo na proporção de 1:20 num volume maior do meio 2XYT com ampicilina e incubados sob agitação até atingir a OD de 0,6 a 600 nm. Uma alíquota de 1 mL foi coletado para posterior análise da fração não induzida e no restante da cultura foi adicionado 0,5mM de IPTG, que então foi deixado sob agitação durante 4 horas para indução das proteínas recombinantes. Após esse período, uma alíquota de 1 mL foi coletada para análise da fração induzida. O restante da cultura foi centrifugados a 14.000 rpm por 5 min a 4°C, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* referente a cultura foi armazenado a -80°C. Para confirmação da indução das proteínas, as alíquotas coletadas foram centrifulgadas e os *pellets* ressuspendidos em 75µl de água e 25µL de tampão de amostra (Tris-HCl 62,5 mM pH 6,8; Glicerol 10%; SDS 2%; β-Mercaptoetanol 5%; Azul de Bromofenol 0,00125%), fervidos por

10 min e submetidos a eletroforese em SDS-PAGE como descrito por Ausubel *et al.* (2008).

Após a confirmação da indução das proteínas recombinantes, os *pellets* correspondentes as culturas das proteínas TS completa e TS-SAPA foram ressuspensos em tampão de ligação Histrap (20 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 500 mM NaCl, 30 mM de Imidazol pH 7,4). Todos os *pellets* foram homogeneizados e lisados usando o Homogeneizador EmulsiFlex-C3 (Avestin) de acordo com as instruções do fabricante. O produto da lise foi centrifugado a 16.000 g por 20 min a 4°C, obtendo as frações solúveis (sobrenadante) e insolúveis (*pellet*), sendo coletada uma alíquota de cada fração. Esse material foi ressuspendido em tampão de amostra, fervido e submetido a eletroforese em SDS-PAGE para análise da solubilidade das proteínas.

### 3.2.2 Transformação bacteriana, indução e teste de solubilidade da TS-completa em *E. coli ArcticExpress (DE3)*

Aproximadamente 10ng dos vetores de expressão pET21a contendo a sequência referente a proteína TS completa foi utilizada para transformar bactérias ArcticExpress eletrocompetentes. Essas foram incubadas com o respectivo plasmídeo sendo submetidas a um choque em eletroporador Micropulser (Bio-Rad). Após o choque, foi adicionado 300µl de meio de cultura 2XYT sem antibiótico e incubado a 37°C por 1 hora sob agitação (180 rpm - C25 Incubator). Após esse tempo, 200 µL do transformado foi plaqueado em meio de cultura 2XYT com 1,5% de ágar contendo os antibióticos ampicilina (100 mg/mL) e gentamicina a 20 µg/mL, cobrindo toda a área da placa. Essas foram então incubadas *overnight* a 37°C para o crescimento das bactérias que incorporaram o plasmídeo, adquirindo a resistência aos antibióticos.

Para indução da TS completa nessa bactéria, o pré-inóculo foi realizado utilizando uma única colônia da placa, deixando a cultura crescer *overnight*. Para o inóculo, foi realizada uma diluição de 1:50 a partir deste pré-inóculo utilizando um volume maior do meio 2XYT sem antibióticos. Essa cultura foi incubada por 3 horas a 30°C sob agitação atingindo uma OD por volta de 0,4 a 600 nm. Uma alíquota de 1 mL foi coletado para posterior análise da fração não induzida e o restante da cultura foi transferida para agitadores com temperaturas mais baixas, entre 10–13°C,

deixando por um período de cerca de 10 minutos para equilibrar a cultura. Posteriormente, o IPTG foi adicionado a cultura, numa concentração final de 1mM e incubado na mesma temperatura por 24 horas. Após esse período, uma alíquota de 1 mL foi coletada para análise da fração induzida. O restante da cultura foi centrifugado a 14.000 rpm por 5 min a 4°C, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* referente a cultura foi armazenado a -80°C. Para confirmação da indução da proteína, as alíquotas coletadas foram centrifugadas e os *pellets* ressuspensos em 75µL de água e 25µL de tampão de amostra (Tris-HCl 62,5 mM pH 6,8; Glicerol 10%; SDS 2%; β-Mercaptoetanol 5%; Azul de Bromofenol 0,00125%), fervidos por 10 min e submetidos a eletroforese em SDS-PAGE.

Após a confirmação da indução da TS completa, o *pellet* correspondente à indução foi ressuspensionado em tampão de ligação Histrap (20 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 500 mM NaCl, 30 mM de Imidazol pH 7,4), sendo homogeneizados e lisados usando o Homogeneizador EmulsiFlex-C3 (Avestin) de acordo com as instruções do fabricante. O produto da lise foi centrifugado a 16.000 g por 20 min a 4°C, obtendo as frações solúvel (sobrenadante) e insolúvel (*pellet*), sendo coletada uma alíquota de cada fração. Esse material foi ressuspensionado em tampão de amostra, fervido e submetido a eletroforese em SDS-PAGE para análise da solubilidade da proteína.

### 3.2.3 *Western blot com anticorpo Anti-histidina com as proteínas TS completa e TS-SAPA*

Para confirmação da expressão das proteínas recombinantes, o extrato induzido total das proteínas TS completa e TS-SAPA foram incubados com anticorpos anti-histidina, visto que as proteínas são expressas em fusão com uma cauda de histidina. Para isso, as alíquotas coletadas dos extratos induzidos foram submetidos a eletroforese em SDS-PAGE em gel 10 e 12,5%, respectivamente e transferidos para membranas de nitrocelulose. Após transferência, as membranas foram bloqueadas em PBS-T contendo 5% de leite por 1 hora. Posteriormente, foram realizadas as incubações das membranas com o anticorpo primário (anti-histidina) diluídos em solução de bloqueio 1% (PBS-T + 1% de leite) e incubados em temperatura ambiente *overnight*. As membranas foram lavadas com PBS-T e incubadas por 1 hora com o anticorpo secundário, anti-IgG conjugado a peroxidase,

diluído em bloqueio 1%. Após lavagens, a membrana foi submetida a reação de quimioluminescência usando o reagente Luminata (Millipore).

#### 3.2.4 Purificação, quantificação e espectrometria de massas da TS-SAPA

A proteína TS-SAPA, correspondente aos motivos repetitivos da TS, foi purificada em coluna de níquel (His Trap GE HealthCare), utilizando o cromatógrafo ÄKTA Prime Plus (GE Healthcare). A eluição das proteínas foi realizada com solução contendo 30 mM de fosfato de sódio, 500 mM NaCl e 500 mM de imidazol, pH 7,4. As frações coletadas foram submetidas a SDS-PAGE 12,5% para análise da pureza. Para remoção de contaminantes das amostras, as frações foram submetidas a centrifugação em filtros Vivaspin (GE), com poro de 30KDa. Essa proteína foi quantificada por gel SDS-PAGE com o auxílio de concentrações conhecidas de BSA. A massa dessa proteína foi confirmada por análise em espectrômetro de massas no aparelho Autoflex III (Bruker Daltonics, Alemanha), com o *software* Flex Control 2.4.30.0 (Bruker Daltonics, Alemanha).

### 3.3 Western blot com o soro de camundongos infectados com *T. cruzi*

Para verificar se a proteína TS-SAPA é reconhecida pelo soro de camundongos infectados pelo *T. cruzi*, a proteína purificada foi submetida a eletroforese em SDS-PAGE em gel 12,5% e transferida para membrana de nitrocelulose. Esta foi incubada com o soro diluídos em solução de bloqueio 1% na proporção de 1:200 e incubados em temperatura ambiente *overnight*. Após lavagens, foi realizada a incubação com o anti-IgG conjugado a peroxidase também diluído em bloqueio 1%, na proporção de 1:1000. Após lavagens, a membrana foi submetida a reação de quimioluminescência usando o reagente Luminata (Millipore).

### 3.4 Análise do reconhecimento da proteína TcL7aRep por soro de pacientes com doença de chagas

Placas de 96 poços foram sensibilizadas com 100ng/ poço da proteína TcL7aRep diluída em tampão carbonato 0,1M (NaHCO<sub>3</sub> e Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>; pH 9.6) e

incubadas por 18 horas a 4°C. Após esse período, o conteúdo foi retirado e a placa foi lavada 4 vezes com PBS-T (PBS 1X + 0,05% Tween 20) e após secagem, foi bloqueada com tampão de bloqueio (PBS 1X acrescido de 5% de leite em pó desnatado) durante 2 horas a temperatura ambiente. Após o tempo de bloqueio, o conteúdo foi descartado e a placa foi lavada 4 vezes com PBS-T. As amostras de soro de paciente infectado e não infectado foram diluídas na proporção de 1:200 no tampão de bloqueio 3%, aplicadas nos poços e incubadas por 1 hora a temperatura ambiente. O conteúdo foi retirado e a placa foi lavada 4 vezes com PBS-T e após secagem foi realizada a incubação com o anti-IgG humano conjugado a peroxidase, diluído em bloqueio 3%, na proporção de 1:10000. A placa foi mantida a 37°C por uma hora. Após este tempo a placa foi lavada 4 vezes com PBS-T e em seguida foi revelada com a solução *TMB One solution* (Promega). A placa foi mantida a temperatura ambiente e protegida da luz até o aparecimento da cor azul. A reação foi parada utilizando solução de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> na diluição de 1:20. A absorvância foi quantificada em leitor de ELISA a 450nm.

### **3.5 Funcionalização com nanopartículas de Ouro**

A funcionalização das nanopartículas de ouro foi realizada em conjunto com alunos do laboratório do professor Flávio da Fosca do Departamento de Microbiologia do ICB, com o qual fazemos colaboração, seguindo um protocolo já padronizado em seu laboratório. O processo de funcionalização consiste da ligação das nanopartículas com algum tipo de molécula. Inicialmente foi realizada a funcionalização de nanobastões de ouro com ácido lipóico. Este passo consistiu da mistura do ácido lipóico com uma solução de nanopartículas de ouro. Essa mistura foi incubada em ultrassonicador por 30 segundos a 50°C e por 3 horas a 30°C. Esse material foi submetido a várias centrifugações, com recuperação do sobrenadante e novas centrifugações com o mesmo para evitar ao máximo perda de material. A amostra foi centrifugada a 5600g por 10 minutos, a 4°C, sendo também realizadas lavagens do *pellet* com água de injeção, sendo ressuspensionado por último em 1,5mL de água. Para cada 500mL desta solução foi adicionado 10µL de uma solução de EDAC/NHS, sendo homogenizado em ultrassonicador por 30 minutos. Após esse passo, a mistura foi separada para adição das proteínas. Os testes de

funcionalização foram realizados com as proteínas TS-SAPA, TcL7aRep e BSA nas concentrações de 2,8µg, 4,6 µg, 9,2 µg e 13,8 µg para todos os casos. Essas amostras foram mantidas em ultrassonicador, por 1h, em baixas temperaturas. A confirmação da ligação foi realizada após leitura das amostras em leito de ELISA, numa faixa de comprimento de onda entre 400-950nm e análise gráfica pelo programa Origin.

## **4. RESULTADOS**

### **4.1 Amplificação das sequências correspondentes a trans-sialidase e suas versões truncadas**

Como descrito em materiais e métodos, as sequências correspondentes à trans-sialidase e suas versões truncadas foram amplificadas usando os pares de primers específicos para cada versão da proteína. Na figura 10 é possível observar num gel de agarose 1%, as bandas de DNA referentes a cada proteína. Nas canaletas 1, 2 e 3 observa-se a presença das bandas do tamanho esperado para a TS completa (TSC), TSSS (TS sem o motivo SAPA) e TS-SAPA (TS contendo somente o motivo SAPA), com 2673 pb, 1941 pb e 747 pb, respectivamente. Para verificar possíveis contaminações dos primers utilizados em cada reação, foram feitos os respectivos controles negativos, onde não foi adicionada nenhuma sequência como molde para ser amplificada.

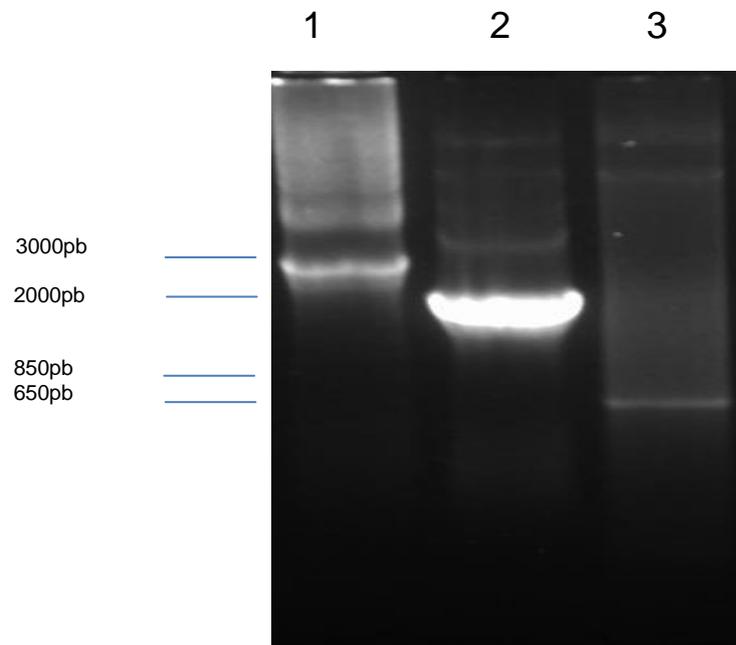


Figura 10: **Amplificação das sequências correspondentes a trans-sialidase e suas versões truncadas.** Produtos das PCRs referentes a TSC (canaleta 1), TSSS (canaleta 2) e TS-SAPA (canaleta 3) separados em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo.

## **4.2 Clonagem dos genes da TS e suas versões truncadas em vetor pET-21a para expressão das proteínas recombinantes**

As sequências referentes a cada proteína foram ligadas no vetor de expressão, o pET-21a, e bactérias XL1-Blue foram transformadas. A confirmação da clonagem foi realizada por PCR de colônia, digestão e sequenciamento. Na figura 11 A, é possível observar o produto referente a PCR de diferentes colônias para os três insertos, após transformação bacteriana. Os clones nos quais os fragmentos amplificados apresentaram a banda de tamanho esperado para cada inserto foram selecionados. Para TSC foi escolhida o clone 3; TS sem SAPA, os clones 6 e 7 e SAPA 11 e 12. Após cultivo dos respectivos clones, procedeu-se com a digestão com enzimas de restrição. Na figura B, observa-se a digestão com Xba e XhoI, que foram empregadas conjuntamente devido a compatibilidade de tampão, permitindo liberação dos insertos com alguns nucleotídeos do vetor. Por fim, a confirmação da clonagem no pET-21a foi realizada por meio de sequenciamento e análise do mesmo pelo programa BioEdit, confirmando-se a clonagem dos diferentes insertos no pET-21a. Em posse dos plasmídeos, foi promovida a multiplicação dos mesmos em bactérias XL1-Blue e posteriormente esses foram utilizados para transformação de bactérias de BL21 Star (DE3) e ArcticExpress (DE3), que foram as bactérias utilizadas para indução de proteína nesse trabalho.

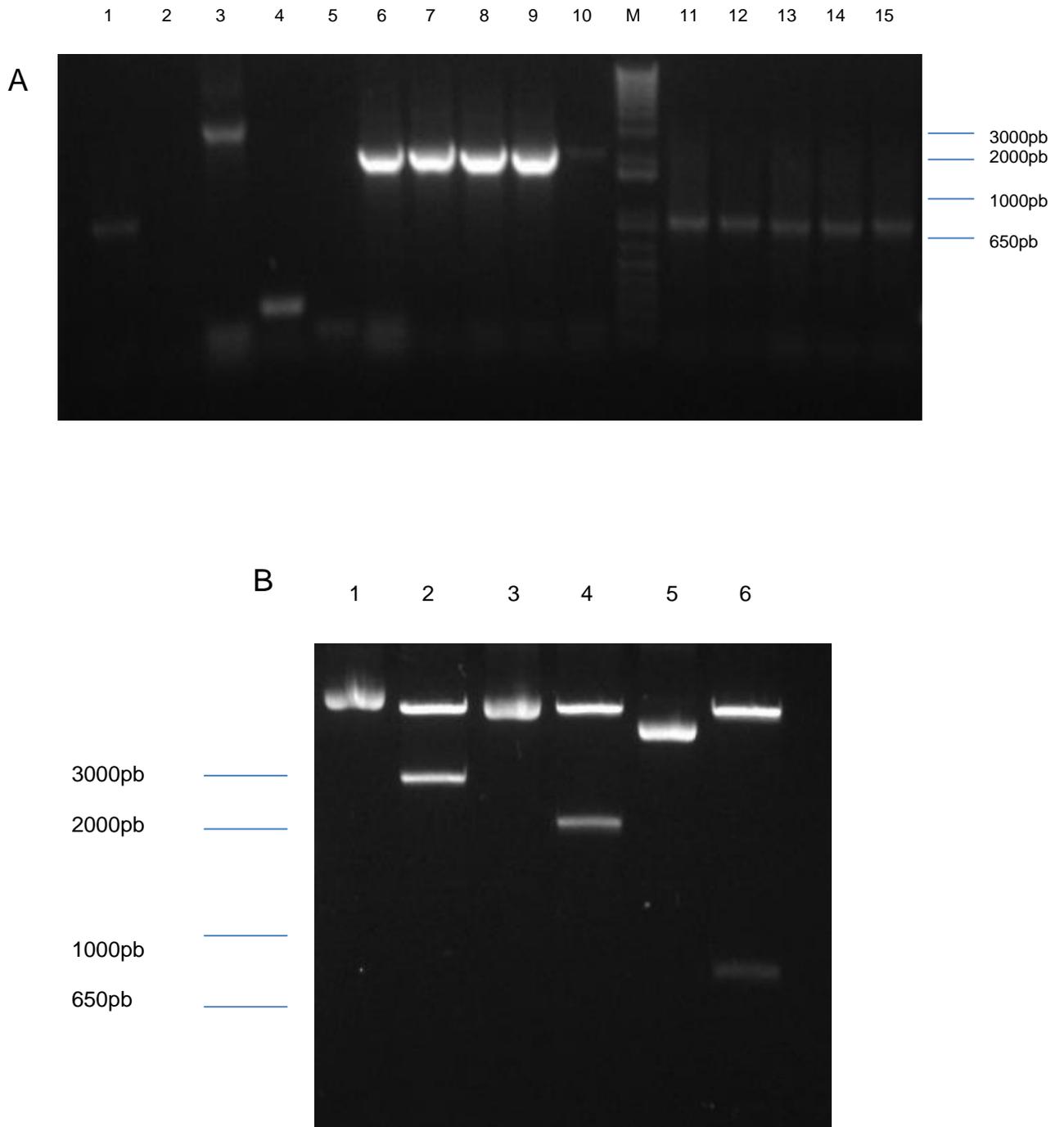


Figura 11: **Análise da clonagem dos insertos referentes a TS e suas versões no vetor pET-21a.** A- PCR de colônia com bactérias XL1-Blue utilizando primer T7 *forward* e *reverse* de 5 clones de TS completa (1-5), TS sem SAPA (6-10) e TS-SAPA (11-15). B- Gel com as digestões do pET-21a ligado aos insertos da TS completa (1 e 2), TS sem SAPA (3 e 4) e TS-SAPA (5 e 6) antes e depois da adição das enzimas de restrição XbaI e XhoI, respectivamente. Gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo.

As proteínas recombinantes foram expressas em bactérias BL21 Star como descrito em materiais e métodos e alíquotas dos extratos não induzidos (sem adição de IPTG) e induzidos (com IPTG) foram aplicadas em gel de poliacrilamida para análise da indução. As bandas referentes a indução das três proteínas estão apontadas na figura 12. Em A é mostrado a expressão da proteína completa, a qual possui uma massa molecular estimada de aproximadamente 98Kda. Na figura B é apresentado a indução da TS sem SAPA, com uma massa molecular predita de aproximadamente 72Kda. Em ambos casos é possível observar a superexpressão das proteínas nas frações induzidas, migrando no gel de acordo com a massa esperada. Por outro lado, na indução da TS-SAPA, não foi observado nenhuma banda superexpressa com a massa molecular predita para a mesma, de 25KDa. No entanto, uma banda contendo aproximadamente o dobro da massa esperada para TS-SAPA foi observada após eletroforese do extrato induzido (figura C). Em virtude disso, nós hipotetizamos que a TS-SAPA estaria migrando como dímero no gel.

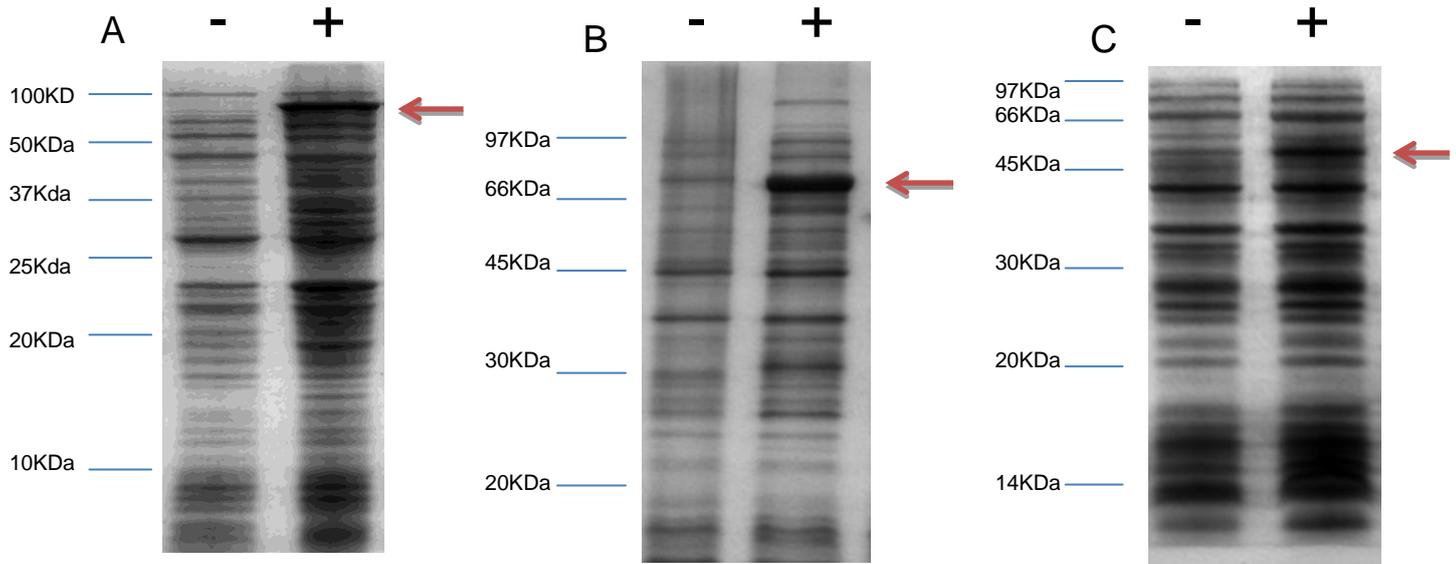


Figura 12: **Indução das proteínas recombinantes em bactéria *E. coli* BL21 Star.** Gel de poliacrilamida corado com Azul de *Comassie*, contendo extratos protéicos de culturas de bactérias antes (-) e após (+) a adição de IPTG. As setas indicam as bandas correspondentes às proteínas recombinantes sendo: (A) TS completa com peso teórico de 94kDa em SDS-PAGE 10%; (B) TS sem SAPA com peso teórico de 78kDa em SDS-PAGE 10%; (C) TS-SAPA com peso teórico de 25kDa em SDS-PAGE 12,5%.

### **4.3 Avaliação da expressão das proteínas recombinantes por meio de western blots com anticorpo anti-His**

No intuito de confirmar a expressão das proteínas recombinantes as quais estão em fusão com uma cauda de histidina, o extrato total induzido foi incubado com anticorpo monoclonal anti-histidina e o anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado a enzima peroxidase foi utilizado como anticorpo secundário. Como representado na figura 13 (A) houve reconhecimento da banda superexpressa e do tamanho esperado para TS completa pelo anticorpo anti-histidina, confirmando expressão dessa proteína por western blot.

Com relação a TS-SAPA, observa-se o reconhecimento de diferentes bandas pelo anti-histidina tanto no extrato não induzido quanto no induzido. No entanto, é possível observar que no extrato induzido houve o reconhecimento de uma banda que não aparece no extrato não induzido, figura 13 (B). A banda reconhecida tem aproximadamente o dobro da massa predita para esta proteína, demonstrando que esta pode ser a TS-SAPA em forma de dímero, como já se suspeitava. Para confirmação desse dado, espectrometria de massas foi realizada.

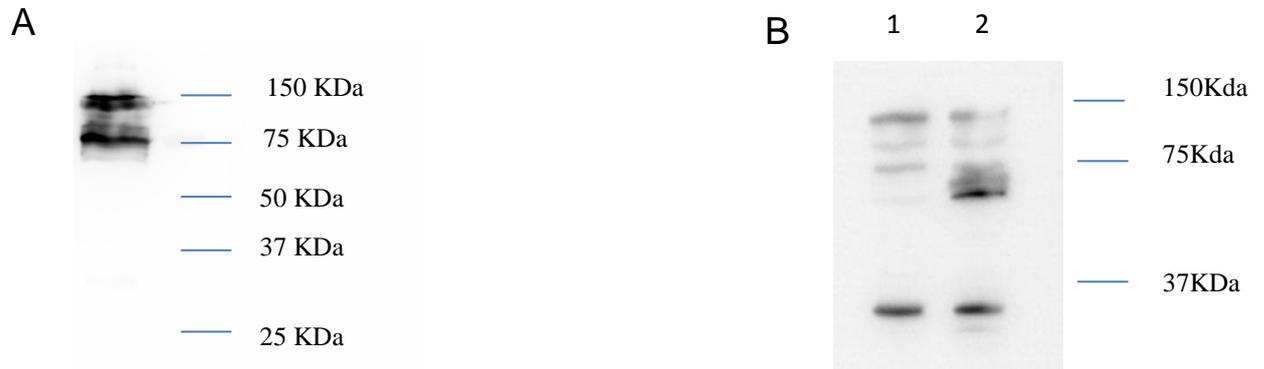


Figura 13: **Western blot com anticorpo anti-histidina com as proteínas TS completa e TS-SAPA.**

A- O extrato total induzido de TS completa foi carregado em gel de poliacrilamida 10% e transferido para membrana de nitrocelulose. A mesma foi incubada com anticorpo anti-histidina, na diluição de 1:2000 e anti-IgG de camundongo conjugado a peroxidase, diluído na proporção de 1:3000. B- O extrato total não induzido (canaleta 1) e induzido (canaleta 2) de TS-SAPA foi carregado em gel de poliacrilamida 12,5% e após transferência para membrana de nitrocelulose esta foi incubada com anticorpo anti-histidina na diluição de 1:2500 e anti-IgG de camundongo conjugado a peroxidase, na diluição de 1:5000.

#### 4.4 Teste de solubilidade das proteínas recombinantes em *E. coli* BL21 Star

Após análise da expressão das proteínas recombinantes, foram realizados testes de solubilidade, conforme descritos em materiais e métodos. Como pode ser observado na figura 14 (A) após eletroforese das frações solúvel e insolúvel, a banda referente a TS completa apresentou-se totalmente no *pellet*, sendo então insolúvel quando induzida em bactérias BL21 Star, necessitando ser solubilizada.

No caso da TS-SAPA, após o protocolo de lise e eletroforese em SDS-PAGE com as amostras obtidas, fica demonstrada que a mesma apresenta-se nas duas frações, tanto no sobrenadante (fração solúvel), quanto no *pellet* (fração insolúvel), em quantidades aproximadamente iguais, sendo possível utilizar a fração solúvel para a purificação desta proteína (figura 14 B).

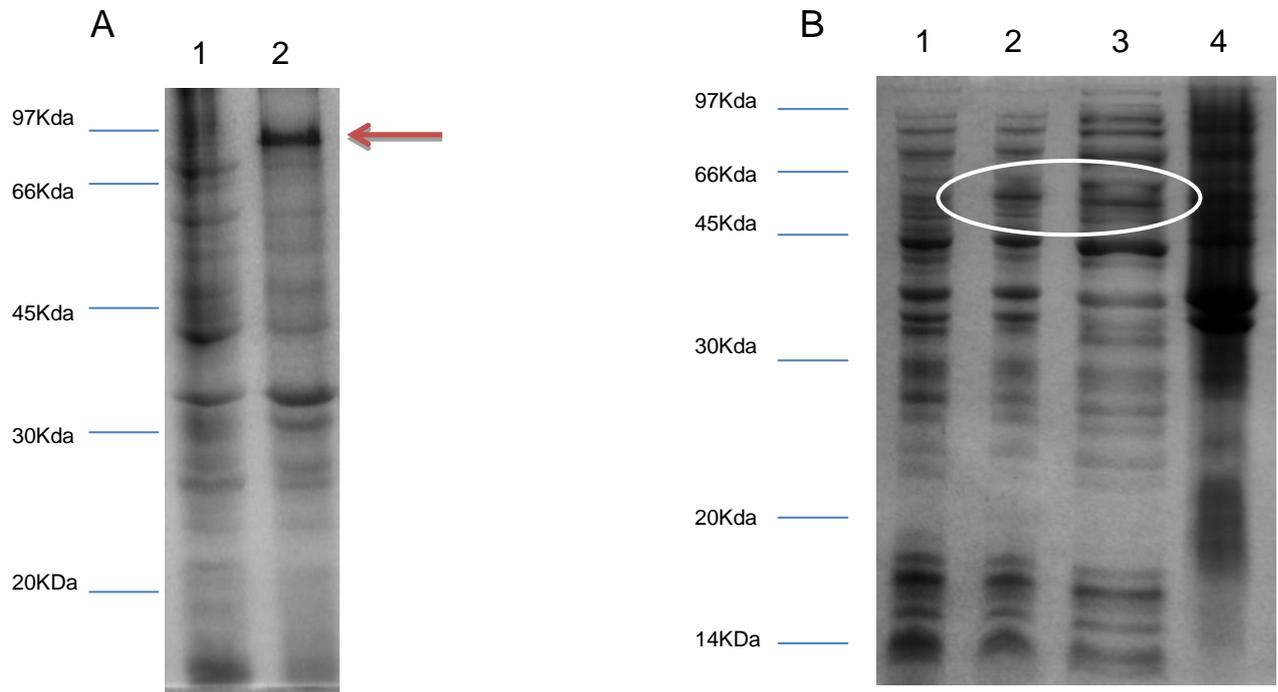


Figura 14: **Teste de solubilidade com TS completa e TS-SAPA.** SDS-PAGE corado com azul de comassie A- Fração solúvel (canaleta 1) e insolúvel (canaleta 2) da TS completa, após indução em bactérias *E. coli* BI21 Star. B- Extratos não induzido e Induzido de TS-SAPA (canaletas 1 e 2, respectivamente) com frações solúvel e insolúvel após lise das bactérias nas canaletas 3 e 4, respectivamente.

#### **4.5 Indução e teste de solubilidade da TS completa na cepa de *E. coli* ArcticExpress (DE3)**

Como a TS completa apresentou-se insolúvel quando induzida em BI21 e no intuito de obter um produto mais solúvel, bactérias ArcticExpress, que de forma geral apresentam um bom rendimento de proteína solúvel, foram transformadas como descrito em materiais e métodos e a indução da proteína foi feita com IPTG. Na figura 15 A é demonstrado a eletroforese das frações não induzida e induzida, sendo possível observar a presença da banda referente a TS completa no extrato induzido. Após lise dessas bactérias o teste de solubilidade demonstrou melhoria na solubilidade da proteína, com 50% da proteína apresentando-se agora na fração solúvel (figura 15 B). Em posse desses dados pretende-se em experimentos futuros realizar a purificação da TS completa a partir da fração solúvel, após indução em bactérias ArcticExpress (DE3).

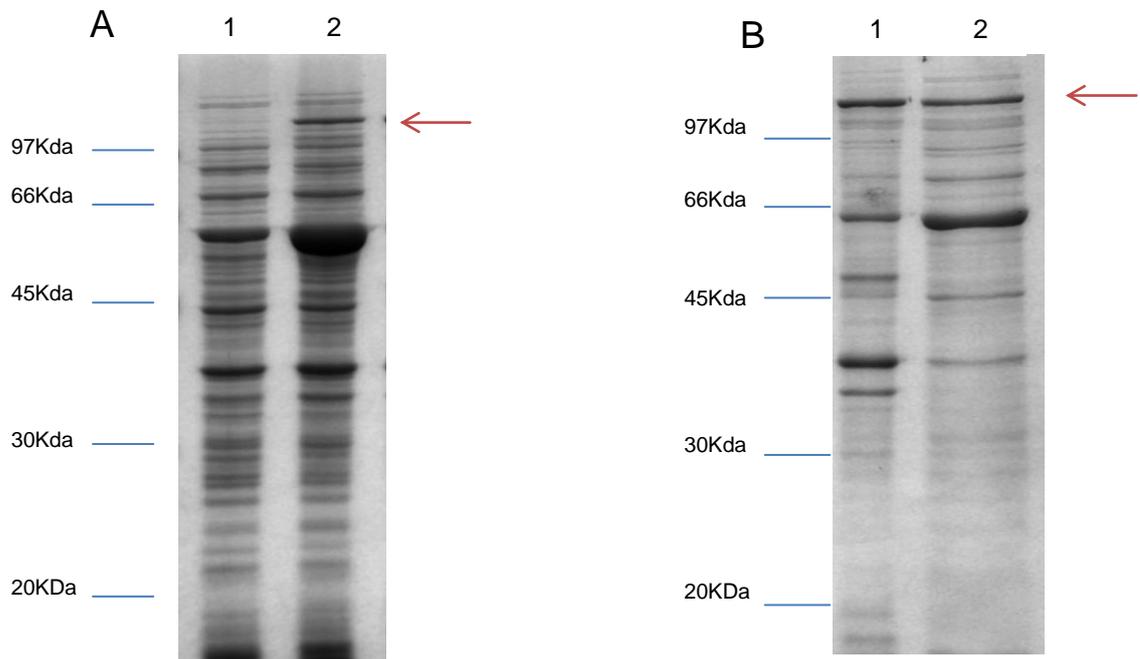


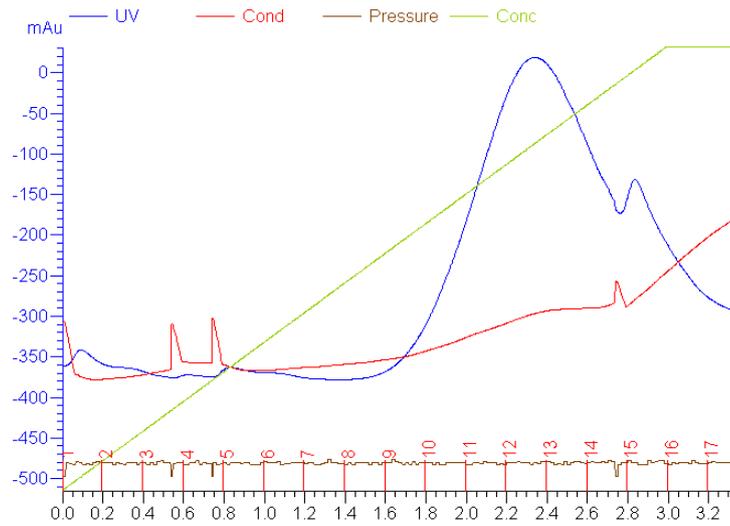
Figura 15: **Indução e teste de solubilidade de TS completa em bactérias *E. coli* ArcticExpress (DE3).** A- gel de poliacrilamida 10% com extratos não induzido (canaleta 1) e induzido total (canaleta 2) de TS completa, a seta aponta a banda referente a proteína. B- Frações insolúvel (canaleta 1) e solúvel (canaleta 2) de TS completa, demonstrando presença da proteína nas duas frações.

#### **4.6 Purificação da TS-SAPA e análise por espectrometria de massas**

Após verificar que a TS-SAPA apresenta-se parcialmente solúvel, o sobrenadante foi escolhido para purificação através de cromatografia de afinidade, utilizando o cromatógrafo ÄKTA Prime Plus e empregando-se colunas de níquel. Na figura 16 (A) está representada a cromatografia gerada no processo de purificação, onde é possível observar o pico referente a proteína eluída com concentrações crescentes de imidazol. Para analisar a pureza das frações eluídas realizou-se a eletroforese das amostras, sendo possível observar a presença de diferentes bandas no gel, com rendimento maior, no entanto, daquela a qual se acredita ser a TS-SAPA com massa de aproximadamente 50KDa (figura 16 B).

Com o intuito de obter um produto mais puro, as amostras foram submetidas a filtração em colunas vivaspan, sendo possível eliminação de contaminantes (Figura 17 A). Por fim, para confirmar se a banda observada com o dobro da massa é referente TS-SAPA, foi realizada espectrometria de massas, onde foi identificada a TS-SAPA, contendo a massa molecular próxima a predita inicialmente para a mesma, de 24 KDa (Figura 17 B).

A



B

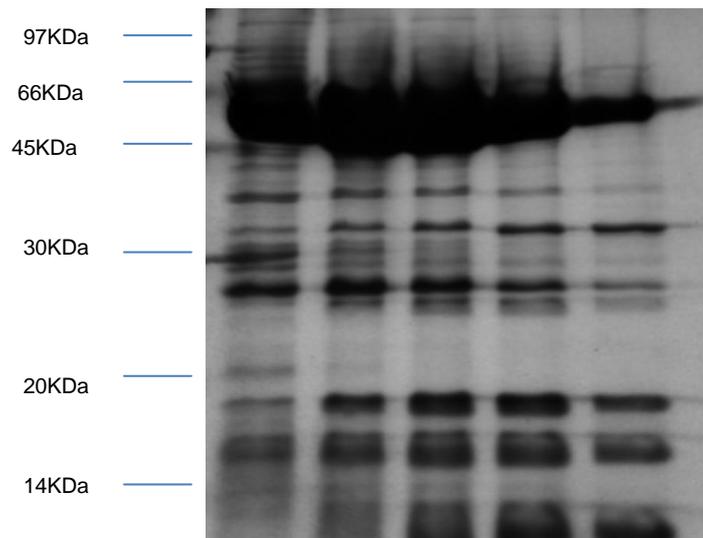


Figura 16: **Purificação TS-SAPA.** A- Gráfico gerado pelo programa *Histidine-tagged protein purification* do cromatógrafo ÄKTA Prime Plus com absorvância no eixo Y e o tempo no eixo X. A linha azul representa a absorvância da proteína na coluna, a vermelha mostra a condutância e a verde as concentrações crescentes de imidazol. B- gel poliacrilamida 10% com as frações coletadas no processo de purificação.

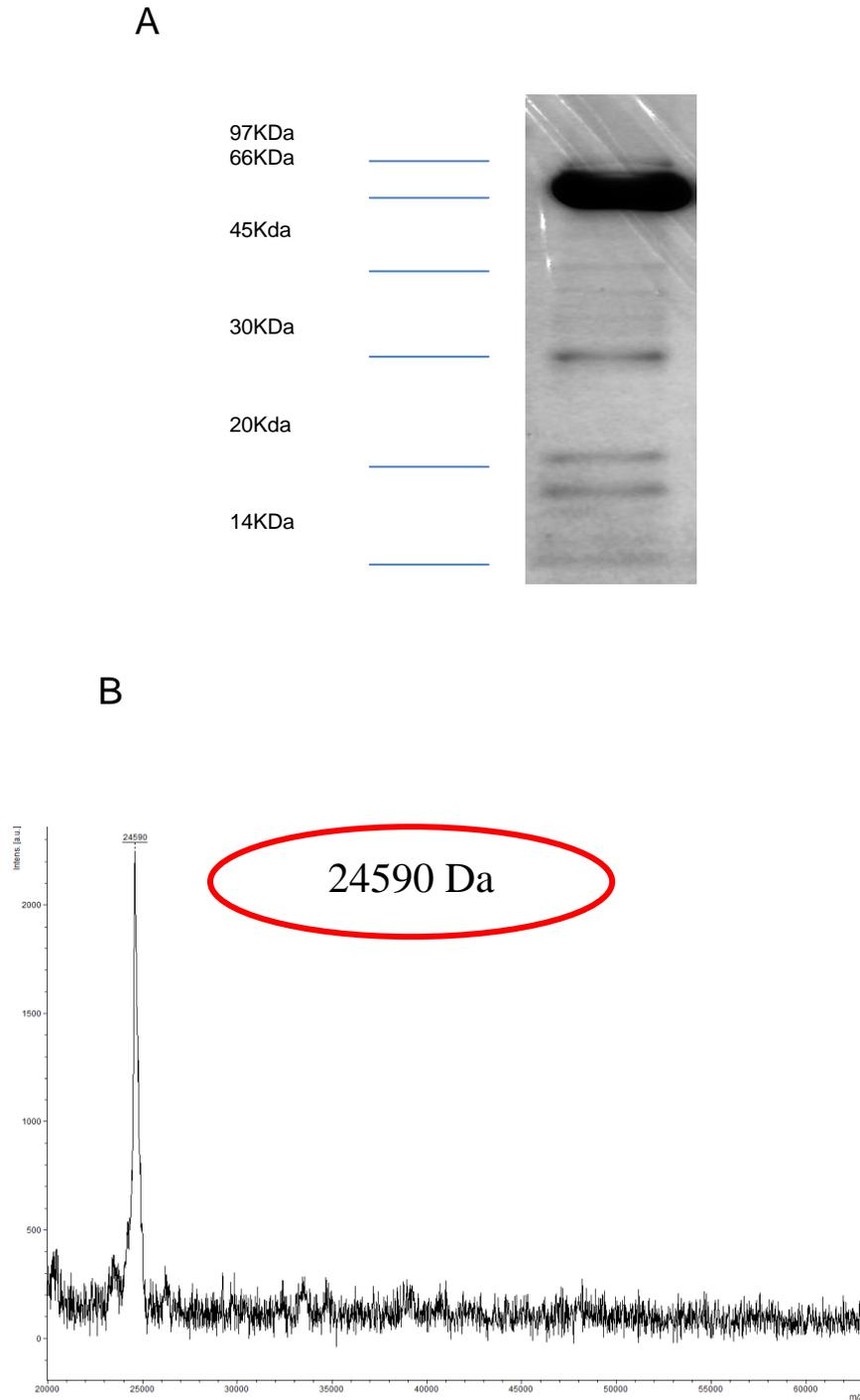


Figura 17: **Análise da proteína TS-SAPA.** A- Gel de poliacrilamida 10% corado com azul de Comassie mostrando uma banda predominante correspondente a TS-SAPA após filtração em filtros vivaspan. B- Espectrometria de massas, demonstrando a massa molecular de 24590Da de TS-SAPA.

#### 4.7 Western blot com soro de camundongos infectados com *T. cruzi*

Para avaliar se camundongos infectados com o *T. cruzi* desenvolvem resposta contra as repetições SAPA a proteína foi incubada com soro de camundongos infectados e a produção de anticorpos IgG e IgM foram analisados. Como pode ser observado na figura 18, a proteína TS-SAPA foi reconhecida por soro de camundongo infectado, havendo tanto anticorpos da classe IgM (A) quanto IgG (B) contra a mesma.

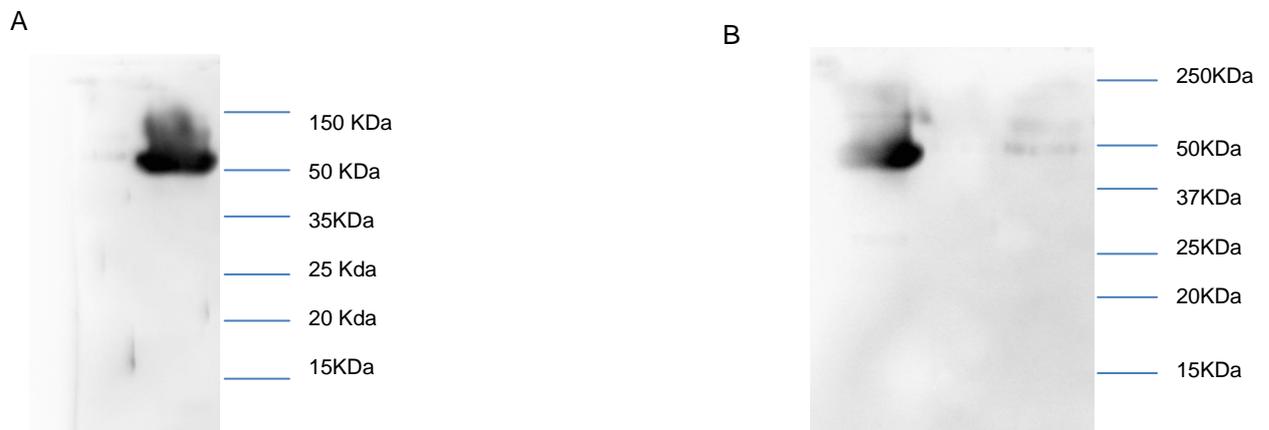


Figura 18: Reconhecimento de TS-SAPA pelo soro de camundongo infectado com *T. cruzi*. A- Dosagem de IgM (A) e IgG (B). Diluição do soro- 1:250 e secundário conjugado a peroxidase-1:1000.

#### 4.8 ELISA com TcL7aRep e soro de paciente com doença de chagas

O teste de Elisa foi realizado com as sequências repetitivas da TcL7a, outra proteína do *T. cruzi* já descrita em sessões anteriores. Após sensibilização das placas com 100ng dessa proteína, foi realizada sua incubação com soro de paciente não infectado e infectado com doença de Chagas. Como demonstrado na figura 19, houve reconhecimento da proteína pelo pool de soro de pacientes infectados, demonstrado pela dosagem de IgG no soro dos mesmos. Indicando que as repetições da TcL7a são alvos da resposta imune.

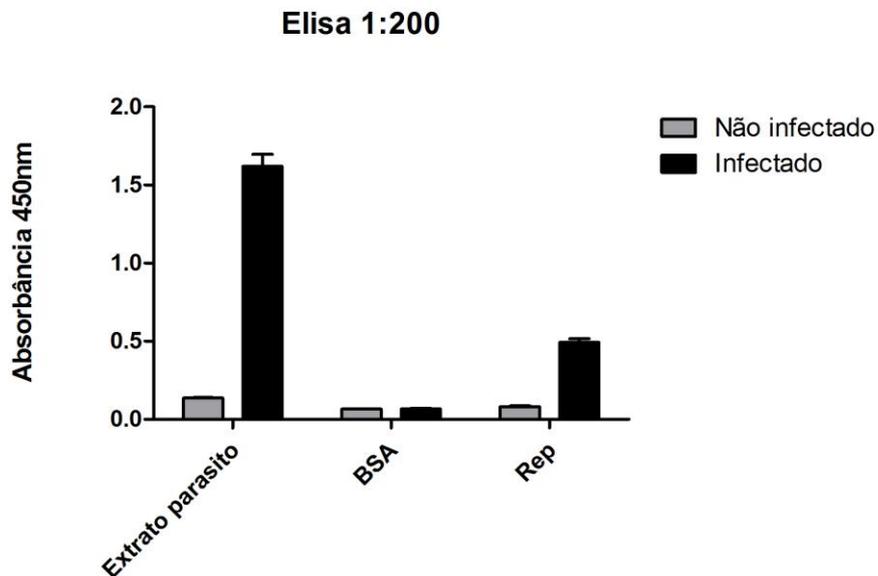
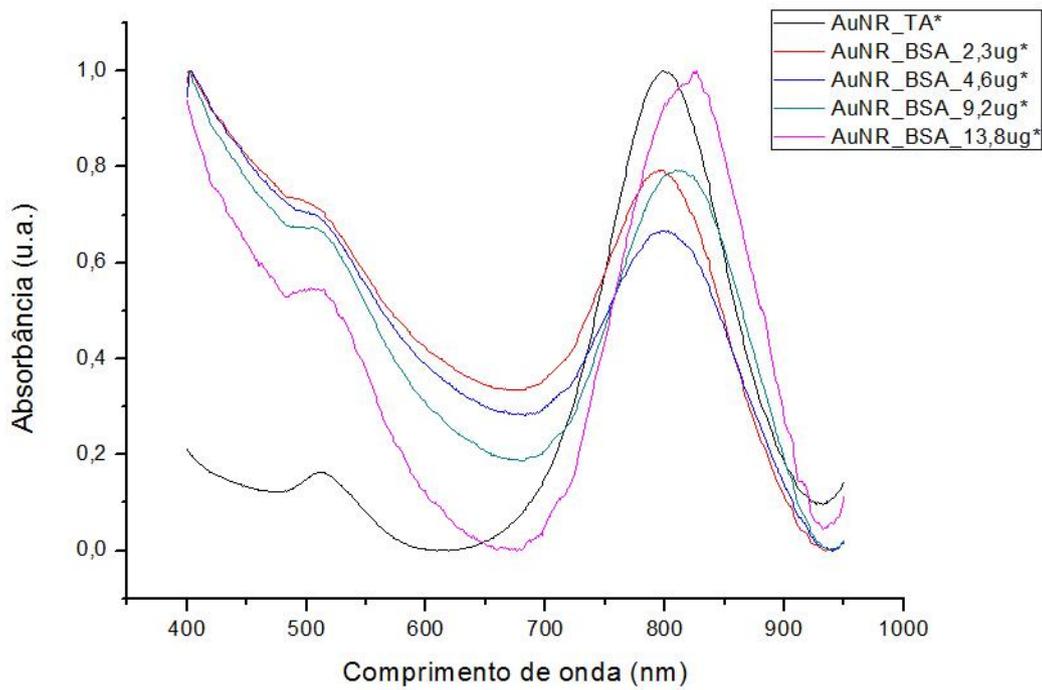


Figura 19: **Elisa com TcL7aRep.** Soro de pacientes não infectados e infectados com o *T. cruzi* foram testados contra a TcL7aRep (Rep), o extrato total do parasito e BSA foram usados como controles positivo e negativo, respectivamente. A diluição usada dos soros foi 1:200 e do anticorpo secundário 1:10000.

#### 4.9 Ligação dos antígenos em nanopartículas de ouro

Como já mencionado, temos como proposta desenvolver um teste diagnóstico para a doença de Chagas, utilizando ferramentas da nanotecnologia. Para isso, pretendemos utilizar o motivo repetitivo de duas proteínas do *T. cruzi*, da TcL7a e da trans-sialidase, pois essas repetições parecem ser alvos da resposta imune, podendo constituir bons indicadores da infecção. Assim, em colaboração com o professor Flávio da Fonseca do Departamento de Microbiologia do ICB/UFMG, pretendemos testar a utilização das repetições ligadas a nanobastões de ouro, AuNR (do inglês *gold nanorods*) em testes sorod diagnósticos, baseado na propriedade de LSPR, já explicada anteriormente. Para isso, foi inicialmente realizada a funcionalização das nanopartículas de ouro com o ácido lipóico, sendo possível observar sua ligação nas nanopartículas através do deslocamento da curva no gráfico para a direita (*red shift*), em relação a nanopartícula sozinha, indicando haver ligantes ao redor dos nanobastões (grupo AuNR\_TA em todas as funcionalizações). A partir da ligação do ácido lipóico pode ser realizada a funcionalização com as proteínas de interesse cujas ligações são também verificadas graficamente por meio de um deslocamento da curva em relação a nanopartícula funcionalizada com ácido lipóico. Na figura 20 A, observa-se a funcionalização de nanopartículas de ouro com diferentes concentrações de BSA, um grupo que servirá como controle negativo em experimentos posteriores. Na figura 20 B é demonstrada uma interação bem significativa do BSA na concentração de 13,8µg, visualizado pelo deslocamento da curva correspondente para a direita (*red shift*).

A



B

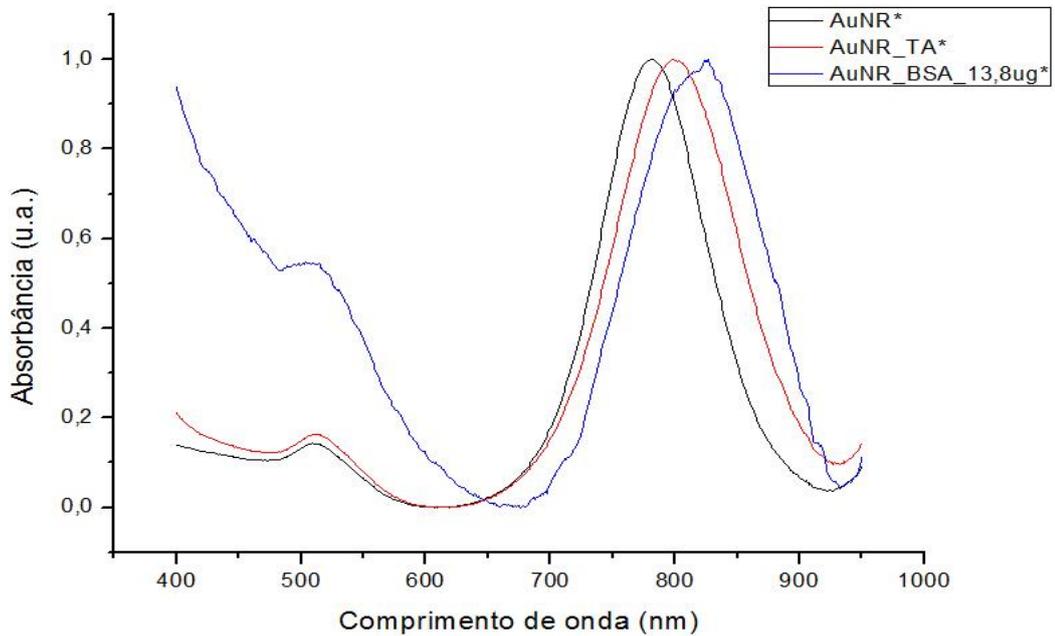


Figura 20: **Funcionalização de nanobastões de ouro com BSA.** A- Sobreposição das curvas referentes a funcionalização com ácido lipóico (AuNR\_TA\*) e diferentes concentrações de BSA.. B – Interação do BSA na concentração de 13,8µg.

Na figura 21, observa-se a funcionalização com diferentes concentrações de TS-SAPA onde é demonstrado deslocamento da curva em todas as concentrações usadas, produzindo importante *red shift*.

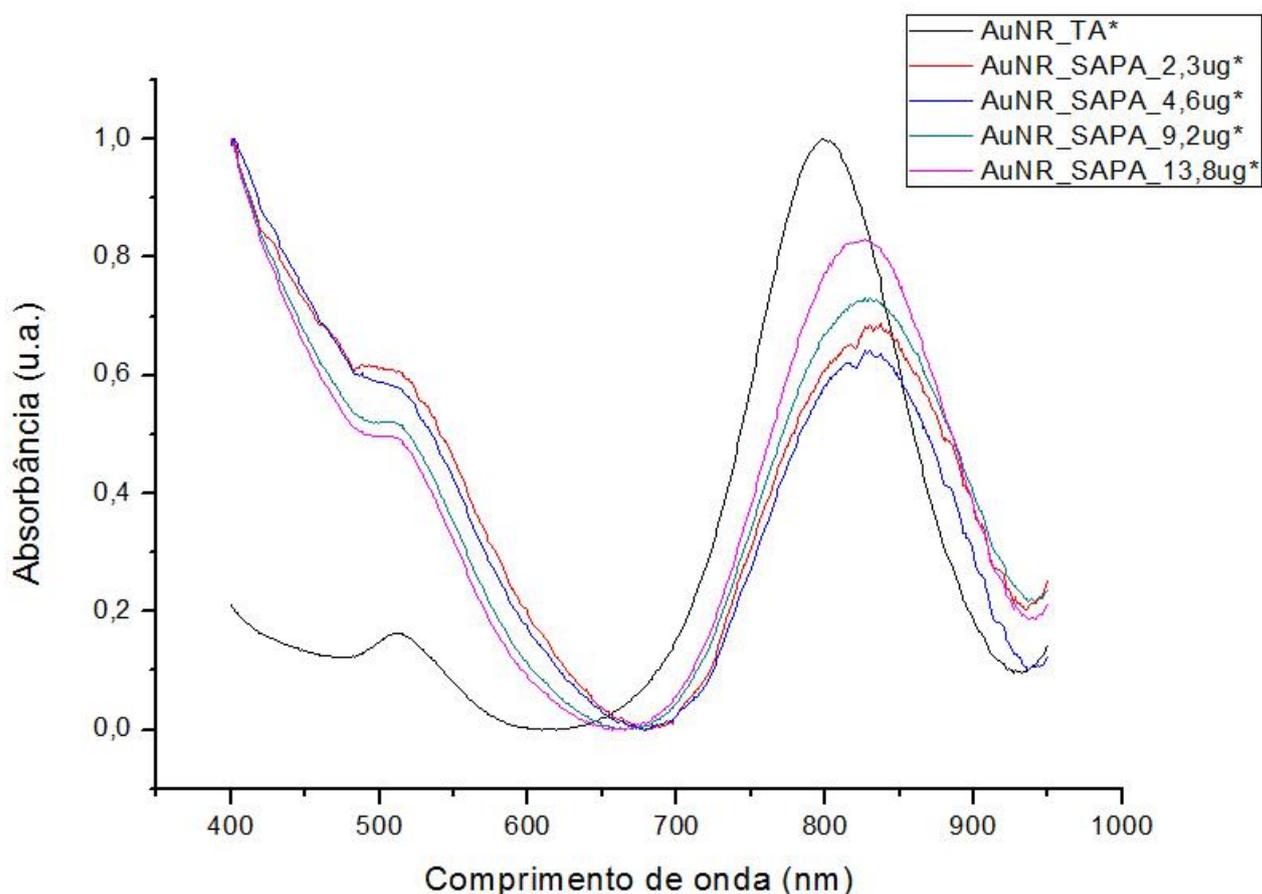
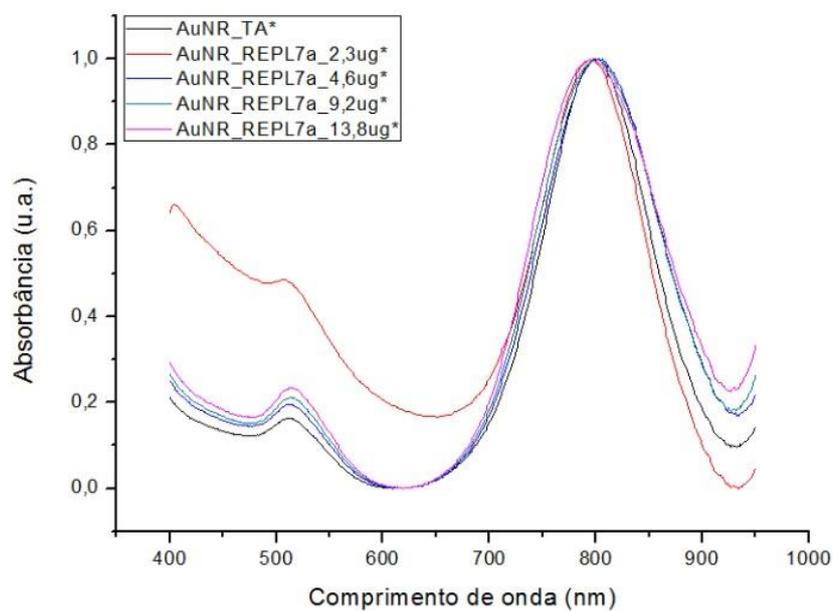


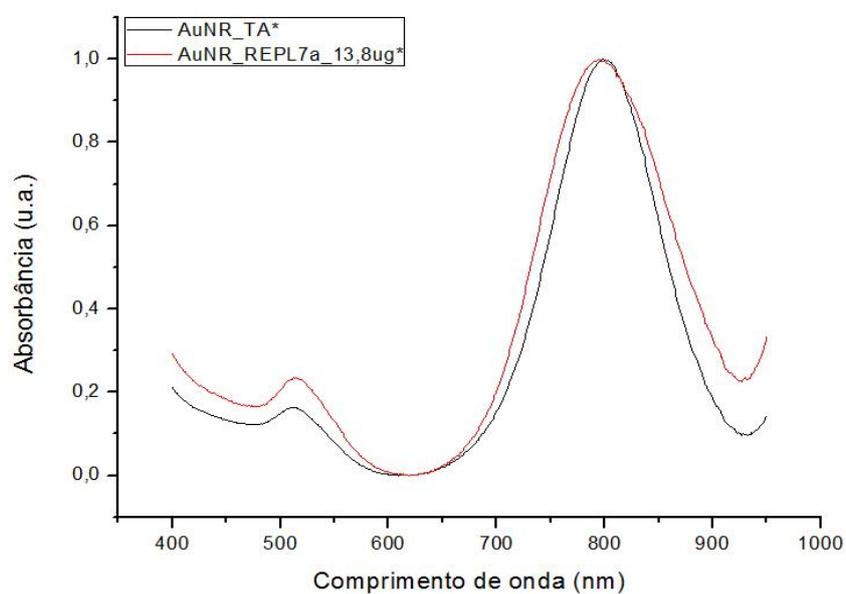
Figura 21: **Funcionalização de nanobastões de ouro com TS-SAPA.** Sobreposição das curvas do AuNR\_TA e diferentes concentrações de TS-SAPA.

A funcionalização da TcL7aRep é mostrada na figura 22, onde não foram observadas interações significativas nas concentrações utilizadas (figura A), sendo possível perceber, entretanto, uma alteração sutil no perfil gráfico em relação ao grupo AuNR-TA. Apesar de não ser possível observar um deslocamento importante para nenhum dos lados, a alteração no perfil gráfico gerada por esta proteína, melhor observado na maior concentração, indica alteração no padrão de ressonância, gerando modificações muito sensíveis no gráfico de absorção, demonstrando interação da proteína com a nanopartícula (figura B).

A



B



**Figura 22: Funcionalização de nanobastões de ouro com TcL7aRep.** A- Sobreposição das curvas do AuNR\_TA e diferentes concentrações de TcL7aRep. B- Interação da TcL7aRep na concentração de 13,8 $\mu$ g

## 5. Discussão

O ácido siálico é um monossacarídeo de 9 carbonos, carregado negativamente, presente na superfície de células de mamíferos incluindo as hemácias. É uma aquisição tardia no processo de evolução, estando presentes em organismos multicelulares. Dessa forma, organismos como *T. cruzi* são incapazes de sintetizar esta molécula (Cazzulo e Frasch, 1992; Freire-De-Lima *et al.*, 2015). Contudo, a aquisição de ácido siálico na superfície deste parasito é feita por meio da ação da “trans-sialidase”, uma enzima que transfere resíduos de ácido siálico de glicoconjugados do hospedeiro para mucinas na superfície do parasito, processo relacionado a invasão da célula hospedeira. Um epítipo denominado Ssp3 presente em algumas moléculas do *T. cruzi*, por exemplo, quando sialilados, parecem mediar adesão e invasão da célula hospedeira (Frasch, 1994).

Como já descrito anteriormente, a região catalítica desta enzima está na porção N-terminal, enquanto as repetições em *tandem*, denominadas SAPA, estão na C-terminal. Muitas outras proteínas do *T. cruzi* também apresentam sequências repetitivas de aminoácidos em sua composição, sendo uma característica notável em muitos de seus antígenos, tanto de superfície quanto antígenos intracelulares (Ibañez *et al.*, 1988; Darocha *et al.*, 2002). Estudos já demonstraram que muitos desses motivos são alvos da resposta imune, apresentando imunodominância em relação a outras porções da proteína (Vergara *et al.*, 1991; Cazzulo e Frasch, 1992; Wrightsman *et al.*, 1994).

Uma hipótese muito discutida na literatura acerca da função dessas repetições refere-se às mesmas como parte das estratégias utilizadas pelos parasitos para evadir o sistema imune do hospedeiro. Isso aconteceria através da indução precoce de anticorpos não protetores contra epítopos presentes nessas regiões e atraso ou supressão na produção de anticorpos protetores contra porções não repetitivas da proteína, atuando assim como imunomoduladores e favorecendo a persistência do parasito no hospedeiro (Cazzulo e Frasch, 1992; Frasch, 1994; Wrightsman *et al.*, 1994). No caso das repetições SAPA, sugere-se que anticorpos são gerados contra as mesmas, sendo produzidos antes mesmo daqueles contra a porção enzimática, prevenindo a resposta contra a mesma (Cazzulo e Frasch, 1992; Frasch, 1994).

Por outro lado, foi visto que o soro de animais imunizados com a trans-sialidase com deleção das repetições SAPA não foi capaz de inibir a atividade da trans-sialidase, ocorrendo o contrário com o soro de animais imunizados com a proteína contendo as repetições. Esses dados indicam que as repetições SAPA presentes na trans-sialidase contribuem para a produção de anticorpos inibitórios contra a porção catalítica da enzima (Buscaglia *et al.*, 1998), o que pode representar um mecanismo do parasito para manter um equilíbrio com o hospedeiro. Assim, para evadir o sistema imune do hospedeiro e conseguir se multiplicar, inicialmente, o parasito induz uma resposta imune não protetora contra as repetições imunodominantes, e posteriormente, as mesmas repetições favorecem a geração de uma resposta imune protetora, garantindo a sobrevivência do hospedeiro e conseqüentemente a persistência do parasito nos seus tecidos. Ruiz Diaz *et al.* (2015) demonstrou que a trans-sialidase recombinante contendo as repetições SAPA é capaz de induzir uma regulação negativa (*downregulation*) das células Th1, induzidas durante a resposta imune contra o parasito ou em respostas alheias ao mesmo, causando um desvio para o padrão de resposta para o tipo Th2, gerando um estado de equilíbrio que garante a sobrevivência do parasito no hospedeiro.

A família das TS, codificada por mais de 1000 genes, apresenta 2 grupos correspondentes a duas isoformas no parasito: um grupo com atividade enzimática, a qual possui uma tirosina na posição 342 e outro cataliticamente inativo, que possui uma histidina na mesma posição. Apesar da atividade enzimática da TS exercer um papel de grande importância no processo de invasão e infecção pelo parasito, a forma inativa da enzima também parece desempenhar um papel de grande importância nesse processo, mesmo sem catalisar a transferência de ácido siálico (Dc-Rubin e Schenkman, 2012). Fontanella *et al.* (2008) demonstrou que tanto a trans-sialidase recombinante na forma ativa quanto na forma inativa possuem papel protetor durante a infecção pelo parasita.

Assim, levando em consideração os trabalhos já citados, a trans-sialidase constituiria um bom candidato para elaboração de uma vacina contra a doença de chagas, desde que produzidas sem as repetições SAPA, visto que essas podem ser importantes no processo de evasão do sistema imune do hospedeiro.

Além do papel sobre o sistema imunológico, muitos desses motivos repetitivos atuam como estabilizadores proteicos, como verificado por Buscaglia *et al.* (1999), como também domínios que favorecem interações proteína-proteína. A

produção de proteínas quiméricas ligadas à diferentes regiões repetitivas de distintas proteínas do *T. cruzi*, resultou no aumento da meia vida dessas proteínas, tanto por repetições obtidas de proteínas intracelulares quanto de proteínas de superfície, como as repetições SAPA presentes na trans-sialidase. A quantidade de repetições também parece influenciar nesse processo de estabilização e consequentemente virulência, parecendo ser requerido um número mínimo das mesmas para promover seus efeitos (Buscaglia *et al.*, 1998; Buscaglia *et al.*, 1999). De fato, o número de repetições pode variar entre diferentes cepas e mesmo dentro de uma mesma cepa do parasito (Cazzulo e Frasch, 1992).

No intuito de demonstrar o papel das repetições SAPA presentes na trans-sialidase e sua influência no processo de infecção, foram expressas versões recombinantes da trans-sialidase: na forma completa, com a deleção das repetições e a porção C-terminal contendo os motivos repetitivos. Essas foram expressas em sistema bacteriano em fusão com cauda de histidina. Como mostrado nos géis de indução, todas as versões da proteína foram expressas em bactéria, sendo possível observar as bandas referentes as mesmas migrando no gel de acordo com suas massas moleculares preditas. Porém, no caso da TS-SAPA, o resultado observado na eletroforese em SDS-PAGE não correspondeu à massa predita, sendo observado o dobro da massas esperada. Resultados de espectrometria de massas indicam se tratar de um dímero formado por esta proteína.

Os testes de solubilidade demonstraram que a TS completa apresentou-se totalmente insolúvel quando expressa em bactéria *E. coli* BL21 Star (DE3). Proteínas recombinantes expressas em sistema bacteriano podem agregar-se em estruturas conhecidas como corpos de inclusão, que correspondem à agregados de proteína insolúvel. Essas dificuldades na obtenção de proteínas recombinantes solúveis são bem descritas na literatura. A redução da taxa de expressão, através da diminuição da concentração de IPTG ou da temperatura de crescimento das bactérias pode constituir estratégias úteis para aumentar a solubilidade de proteínas de acordo com o manual da empresa que comercializa o vetor pET21a (Novagem). Foram feitas várias tentativas de mudanças nos protocolos de expressão com o objetivo de obter as proteínas TS completa e TS sem SAPA de forma solúvel em *E. coli*. Entretanto nenhum desses protocolos resultou em aumento da solubilidade. A utilização de cepas de bactérias mais específicas para esse fim também representam boas alternativas. As bactérias *E. coli* ArcticExpress, por exemplo, empregadas para a

indução da TS completa, são próprias para cultivo em baixas temperaturas e co-expressam chaperoninas, que auxiliam o enovelamento da proteína, aumentando o rendimento de proteína solúvel (Manual Agilent Technologies). Com a utilização dessa cepa, estamos conseguindo obter a TS completa de forma solúvel e esse teste será feito também com a TS sem SAPA.

A TS-SAPA, por outro lado, apresentou-se parcialmente solúvel quando expressas em bactérias BL21 Star, procedendo-se com a purificação a partir da fração solúvel. Após purificação da proteína TS-SAPA, experimentos para avaliar seu reconhecimento por soro de animais infectados foram realizados. Foi observado que tanto anticorpos da classe IgM quanto IgG são induzidos contra as repetições SAPA em infecções agudas do *T. cruzi* no modelo animal. Dados já existentes na literatura demonstram um maior reconhecimento da trans-sialidase por soros de humanos na fase aguda em relação a fase crônica, o que pode indicar um importante papel desta proteína em fases iniciais da infecção (Affranchino *et al.*, 1989). Ainda não temos dados sobre o reconhecimento da repetição SAPA recombinantes por soro de paciente na fase crônica, mas tendo em vista que as repetições são alvos da resposta imune, pretendemos testá-la para utilização em testes diagnósticos para a doença de Chagas.

Por outro lado, as repetição da proteína TcL7a foram reconhecidas pelo *pool* de soro de pacientes na fase crônica da doença de Chagas, demonstrado em ensaios de ELISA. No entanto, dados de imunização indicam que as mesmas repetições não são capazes de induzir uma resposta humoral em modelo animal (Valente, 2014). Assim, uma outra abordagem para a utilização dessas repetições refere-se a utilização das mesmas no desenvolvimento de testes sorodiagnósticos para doença de Chagas.

O teste sorodiagnóstico proposto neste trabalho representa uma inovação no teste diagnóstico para a doença de Chagas, fazendo uso de ferramentas da nanotecnologia. As nanopartículas de metal representam sistemas muito sensíveis, devido ao forte campo elétrico em sua superfície, sendo que propriedades como absorção e espalhamento são potencializadas nesses materiais. Essas características vêm sendo exploradas, por exemplo, no diagnóstico e terapia do câncer. Huang *et al.* (2006) demonstrou ser possível identificar e distinguir claramente entre células malignas e não malignas através do espalhamento de luz vermelha em campo escuro pelos nanobastões de ouro, empregando para isso

nanopartículas conjugadas a anticorpos específicos. Além disso, foi observada nesse mesmo trabalho a possibilidade de destruição das células malignas, aplicando-se certa quantidade de energia sobre as mesmas, através de exposição a laser em 800nm.

Outras propriedades desses materiais também são exploradas em biossensores como a mudança de coloração observada em soluções contendo nanopartículas agregadas e não agregadas de ouro, apresentando grande sensibilidade, como observado por (De La Rica e Stevens, 2012) (2012). No teste desenvolvido, utilizando uma plataforma de ELISA e empregando nanopartículas de ouro, foi possível a detecção de concentrações muito baixas de antígenos e distinção a “olho nu” entre testes positivos e negativos.

No presente trabalho, a propriedade de Ressonância de Plasmon de superfície foi explorada no intuito de gerar um teste sorodiagnóstico para doença de chagas, utilizando para isso nanopartículas de ouro em forma de bastão. Para isso, um protocolo de biofuncionalização já padronizado foi seguido, sendo feita inicialmente a funcionalização dos nanobastões com ácido lipóico. Essa etapa se faz necessária pois é o passo de substituição do CTAB, molécula tóxica incluída no processo de síntese dos nanobastões e pode ser feita com diferentes compostos que possuam grupamento tiol, que permite ligação com o átomo de ouro, formando uma monocamada ao redor dos nanobastões (P´Erez-Juste *et al.*, 2005). Devido a sensibilidade apresentada pelos nanomateriais, é possível identificar essa interação através da mudança no espectro após leitura em UV visível, sendo possível observar um deslocamento da curva referente ao complexo nanobastão-ácido lipóico para a direita (*red shift*), indicando a ligação.

Diferentes moléculas podem então ser ligadas a este complexo num segundo passo de funcionalização onde diferentes abordagens de interação podem ser utilizadas. A figura 23 apresenta um desenho esquemático de uma funcionalização usando anticorpos como biomolécula, para exemplificar.

No nosso caso, as biomoléculas empregadas foram motivos repetitivos de proteínas do *T. cruzi*, que fazem interações covalentes com o ácido lipóico ligado ao nanobastão. Assim como já foi citado anteriormente, a interação pode ser identificada pela mudança no espectro.

Como mostrado nas figuras 20-22 a proteína TS-SAPA interage com os nanobastões, sendo bem notório o deslocamento da curva referente a proteína em

relação ao complexo AuR\_TA, indicando ligação nos nanobastões. Por outro lado, a TcL7aRep, não demonstrou um deslocamento tão evidente quanto este, no entanto alterou, mesmo que de forma sutil, o perfil gráfico, quando comparado ao complexo AuR-TA. O deslocamento para direita ou para esquerda de um espectro acontece devido às cargas resultantes dessa interação. Se uma proteína provoca deslocamento para ambos os lados, ela pode estar de fato fazendo uma interação sem que possamos observar uma modificação muito evidente no gráfico, ou seja, sem, produzir um *shift* significativo pra um lado específico, como ocorreu no caso da TS-SAPA. Outros testes de funcionalização com essas proteínas são necessários para otimização do processo. Em uma etapa posterior, iremos testar a interação do completo AuR-TA-proteína com soro de paciente para analisar o padrão resultante no espectro e se a detecção de anticorpos no soro de pacientes com doença de Chagas é possível utilizando essa metodologia.



## 6. Referências bibliográficas

AUSUBEL et al. Current Protocols in molecular biology. v.1. Board, 2007.

AUSUBEL et al. Current Protocols in molecular biology. v.2. Board, 2008.

AFFRANCHINO, J. L. et al. Identification of a Trypanosoma cruzi antigen that is shed during the acute phase of Chagas' disease. **Mol Biochem Parasitol**, v. 34, n. 3, p. 221-8, May 1989. ISSN 0166-6851. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2499788> >.

BARTHOLOMEU, D. C. et al. Genomic organization and expression profile of the mucin-associated surface protein (masp) family of the human pathogen Trypanosoma cruzi. **Nucleic Acids Res**, v. 37, n. 10, p. 3407-17, Jun 2009. ISSN 1362-4962. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19336417> >.

BUSCAGLIA, C. A. et al. Tandem amino acid repeats from Trypanosoma cruzi shed antigens increase the half-life of proteins in blood. **Blood**, v. 93, n. 6, p. 2025-32, Mar 1999. ISSN 0006-4971. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10068675> >.

BUSCAGLIA, C. A. et al. The repetitive domain of Trypanosoma cruzi trans-sialidase enhances the immune response against the catalytic domain. **J Infect Dis**, v. 177, n. 2, p. 431-6, Feb 1998. ISSN 0022-1899. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9466532> >.

BUSCAGLIA, C. A. et al. Trypanosoma cruzi surface mucins: host-dependent coat diversity. **Nat Rev Microbiol**, v. 4, n. 3, p. 229-36, Mar 2006. ISSN 1740-1526. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16489349> >.

CANÇADO, J. R. Criteria of Chagas disease cure. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 94 Suppl 1, p. 331-5, 1999. ISSN 0074-0276. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10677750> >.

CAZZULO, J. J.; FRASCH, A. C. SAPA/trans-sialidase and cruzipain: two antigens from Trypanosoma cruzi contain immunodominant but enzymatically inactive domains. **FASEB J**, v. 6, n. 14, p. 3259-64, Nov 1992. ISSN 0892-6638. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1426764> >.

Chagas, C. (1909) Nova tripanozomíase humana. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 1,159-218

CHIURILLO, M. A. et al. The diversity and expansion of the trans-sialidase gene family is a common feature in Trypanosoma cruzi clade members. **Infect Genet Evol**, v. 37, p. 266-74, Jan 2016. ISSN 1567-7257. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26640033> >.

DAROCHA, W. D. et al. Characterization of cDNA clones encoding ribonucleoprotein antigens expressed in Trypanosoma cruzi amastigotes. **Parasitol Res**, v. 88, n. 4, p. 292-300, Apr 2002. ISSN 0932-0113. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11999014> >.

DC-RUBIN, S. S.; SCHENKMAN, S. T. Trypanosoma cruzi trans-sialidase as a multifunctional enzyme in Chagas' disease. **Cell Microbiol**, v. 14, n. 10, p. 1522-30, Oct 2012. ISSN 1462-5822. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22747789> >.

DE ALENCAR, B. C. et al. Perforin and gamma interferon expression are required for CD4+ and CD8+ T-cell-dependent protective immunity against a human parasite, Trypanosoma cruzi, elicited by heterologous plasmid DNA prime-recombinant adenovirus 5 boost vaccination. **Infect Immun**, v. 77,

n. 10, p. 4383-95, Oct 2009. ISSN 1098-5522. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19651871> >.

DE SOUZA, W.; DE CARVALHO, T. M.; BARRIAS, E. S. Review on Trypanosoma cruzi: Host Cell Interaction. **Int J Cell Biol**, v. 2010, 2010. ISSN 1687-8884. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20811486> >.

DUTHIE, M. S. et al. Multi-epitope proteins for improved serological detection of Trypanosoma cruzi infection and Chagas Disease. **Diagn Microbiol Infect Dis**, Nov 2015. ISSN 1879-0070. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26658314> >.

FERREIRA, H. S.; RANGEL\*, M. D. C. **NANOTECNOLOGIA: ASPECTOS GERAIS E POTENCIAL DE APLICAÇÃO EM CATÁLISE**. Instituto de Química, Universidade Federal da Bahia, Campus Universitário de Ondina, 40170-280 Salvador - BA, Brasil. 32: 1860-1870 p. 2009.

FRASCH, A. C. Trans-sialidase, SAPA amino acid repeats and the relationship between Trypanosoma cruzi and the mammalian host. **Parasitology**, v. 108 Suppl, p. S37-44, 1994. ISSN 0031-1820. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8084653> >.

FRASCH, A. C. Functional diversity in the trans-sialidase and mucin families in Trypanosoma cruzi. **Parasitol Today**, v. 16, n. 7, p. 282-6, Jul 2000. ISSN 0169-4758. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10858646> >.

FRASCH, A. C. et al. Comparison of genes encoding Trypanosoma cruzi antigens. **Parasitol Today**, v. 7, n. 6, p. 148-51, Jun 1991. ISSN 0169-4758. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15463477> >.

FREIRE-DE-LIMA, L. et al. The trans-sialidase, the major Trypanosoma cruzi virulence factor: Three decades of studies. **Glycobiology**, v. 25, n. 11, p. 1142-9, Nov 2015. ISSN 1460-2423. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26224786> >.

FREITAS, L. M. et al. Genomic analyses, gene expression and antigenic profile of the trans-sialidase superfamily of Trypanosoma cruzi reveal an undetected level of complexity. **PLoS One**, v. 6, n. 10, p. e25914, 2011. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22039427> >.

GOTO, Y.; CARTER, D.; REED, S. G. Immunological dominance of Trypanosoma cruzi tandem repeat proteins. **Infect Immun**, v. 76, n. 9, p. 3967-74, Sep 2008. ISSN 1098-5522. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18625739> >.

IBAÑEZ, C. F. et al. Multiple Trypanosoma cruzi antigens containing tandemly repeated amino acid sequence motifs. **Mol Biochem Parasitol**, v. 30, n. 1, p. 27-33, Jul 1988. ISSN 0166-6851. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3135494> >.

JAIN, P. K. et al. Noble metals on the nanoscale: optical and photothermal properties and some applications in imaging, sensing, biology, and medicine. **Acc Chem Res**, v. 41, n. 12, p. 1578-86, Dec 2008. ISSN 1520-4898. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18447366> >.

JUNQUEIRA, A.C.V. International meeting: new diagnostic tests are urgently needed to treat patients with Chagas disease. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 41, n. 3, p. 315-9, 2008 May-Jun 2008. ISSN 0037-8682. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18719818> >.

JUNQUEIRA, C. et al. The endless race between *Trypanosoma cruzi* and host immunity: lessons for and beyond Chagas disease. **Expert Rev Mol Med**, v. 12, p. e29, 2010. ISSN 1462-3994. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20840799> >.

Manual ArcticExpress Competent Cells and ArcticExpress (DE3) Competent Cells. Agilent Technologies, Inc. 2010

Manual Novagem. Pet System manual. 11th Edition

MARTIN, D.; TARLETON, R. Generation, specificity, and function of CD8+ T cells in *Trypanosoma cruzi* infection. **Immunol Rev**, v. 201, p. 304-17, Oct 2004. ISSN 0105-2896. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15361249> >.

MCKEAN, P. G. et al. Diversity in repeat-containing surface proteins of *Leishmania major*. **Mol Biochem Parasitol**, v. 86, n. 2, p. 225-35, Jun 1997. ISSN 0166-6851. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9200128> >.

MEDICINES, M. S. F. C. F. A. T. E. International meeting: new diagnostic tests are urgently needed to treat patients with Chagas disease. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 41, n. 3, p. 315-9, 2008 May-Jun 2008. ISSN 0037-8682. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18719818> >.

MENDES, T. A. et al. Repeat-enriched proteins are related to host cell invasion and immune evasion in parasitic protozoa. **Mol Biol Evol**, v. 30, n. 4, p. 951-63, Apr 2013. ISSN 1537-1719. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23303306> >.

MORILLA, M. J.; ROMERO, E. L. Nanomedicines against Chagas disease: an update on therapeutics, prophylaxis and diagnosis. **Nanomedicine (Lond)**, v. 10, n. 3, p. 465-81, Feb 2015. ISSN 1748-6963. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25707979> >.

NETO, R. P. D. M. **Genômica Comparativa para Identificação de Fatores de Virulência no *Trypanosoma cruzi***: Tese de doutorado do programa de pós graduação em Bioinformática da Universidade Federal de Minas Gerais 2013.

OSTERMAYER, A. L.; CASTRO, A. M. D. **Diagnóstico sorológico da doença de chagas**: FIOCRUZ 1997.

PAIS, F. S. et al. Molecular characterization of ribonucleoproteic antigens containing repeated amino acid sequences from *Trypanosoma cruzi*. **Microbes Infect**, v. 10, n. 7, p. 716-25, Jun 2008. ISSN 1286-4579. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18538614> >.

PÉREZ-JUSTE, J. et al. **Gold nanorods: Synthesis, characterization and applications**. Coordination Chemistry Reviews 2005.

RASSI, A.; MARIN-NETO, J. A. Chagas disease. **Lancet**, v. 375, n. 9723, p. 1388-402, Apr 2010. ISSN 1474-547X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20399979> >.

RUBIN-DE-CELIS, S. S. et al. Expression of trypomastigote trans-sialidase in metacyclic forms of *Trypanosoma cruzi* increases parasite escape from its parasitophorous vacuole. **Cell Microbiol**, v. 8, n. 12, p. 1888-98, Dec 2006. ISSN 1462-5814. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16824037> >.

SCHENKMAN, R. P.; VANDEKERCKHOVE, F.; SCHENKMAN, S. Mammalian cell sialic acid enhances invasion by *Trypanosoma cruzi*. **Infect Immun**, v. 61, n. 3, p. 898-902, Mar 1993. ISSN 0019-9567. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8381772> >.

TARLETON, R. L. Depletion of CD8+ T cells increases susceptibility and reverses vaccine-induced immunity in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. **J Immunol**, v. 144, n. 2, p. 717-24, Jan 1990. ISSN 0022-1767. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2104903> >.

TARLETON, R. L. Immune system recognition of *Trypanosoma cruzi*. **Curr Opin Immunol**, v. 19, n. 4, p. 430-4, Aug 2007. ISSN 0952-7915. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17651955> >.

TARLETON, R. L. et al. Susceptibility of beta 2-microglobulin-deficient mice to *Trypanosoma cruzi* infection. **Nature**, v. 356, n. 6367, p. 338-40, Mar 1992. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1549177> >.

TOMLINSON, S. et al. Role of sialic acid in the resistance of *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes to complement. **J Immunol**, v. 153, n. 7, p. 3141-7, Oct 1994. ISSN 0022-1767. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8089492> >.

VALENTE, B. M. **Antígenos contendo repetições de aminoácidos como fatores de virulência na infecção pelo *Trypanosoma cruzi***: Dissertação de mestrado do programa de pós graduação em Bioquímica e Imunologia da Universidade Federal de Minas Gerais 2014.

VERGARA, U. et al. Assay for detection of *Trypanosoma cruzi* antibodies in human sera based on reaction with synthetic peptides. **J Clin Microbiol**, v. 29, n. 9, p. 2034-7, Sep 1991. ISSN 0095-1137. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1774331> >.

WHO: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>. Acesso em: 05/01/2016.

WRIGHTSMAN, R. A. et al. Identification of immunodominant epitopes in *Trypanosoma cruzi* trypomastigote surface antigen-1 protein that mask protective epitopes. **J Immunol**, v. 153, n. 7, p. 3148-54, Oct 1994. ISSN 0022-1767. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7522250> >.

YU, C.; IRUDAYARAJ, J. Quantitative evaluation of sensitivity and selectivity of multiplex nanoSPR biosensor assays. **Biophys J**, v. 93, n. 10, p. 3684-92, Nov 2007. ISSN 0006-3495. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17660314> >.

ZINGALES, B. et al. The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: rationale, epidemiological relevance and research applications. **Infect Genet Evol**, v. 12, n. 2, p. 240-53, Mar 2012. ISSN 1567-7257. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22226704> >.