

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PARASITOLOGIA

**Teste e padronização de alvos de proteínas recombinantes
para o diagnóstico da doença de Chagas**

Ana Carolina Paes Martins Lanna

Belo Horizonte – MG

Março de 2015

Ana Carolina Paes Martins Lanna

**Teste e padronização de alvos recombinantes de proteínas
para o diagnóstico da doença de Chagas**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito à obtenção do título de Mestre em Parasitologia.

Área de Concentração: Imunoparasitologia

Orientador: Alexandre Ferreira Marques

Coorientadora: Daniella Castanheira Bartholomeu

Belo Horizonte – MG

Março de 2015

043 Lanna, Ana Carolina Paes Martins.
Teste e padronização de alvos recombinantes de proteínas para o diagnóstico da doença de Chagas [manuscrito] / Ana Carolina Paes Martins Lanna. – 2015.

72 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Alexandre Ferreira Marques. Co-orientadora: Daniella Castanheira Bartholomeu.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas.

1. Chagas, Doença de – Diagnóstico - Teses. 2. Proteínas recombinantes – Teses. 3. Teste imunoenzimático – Teses. 4. Parasitologia – Teses. I. Marques, Alexandre Ferreira. II. Bartholomeu, Daniella Castanheira. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 576.88/.89

Aos meus pais, Nelma e Fernando pelo amor incondicional.

Ao meu marido Wellington pela enorme motivação.

*E à minha madrinha Carol por nunca ter poupado
esforços para me ajudar nessa caminhada.*

*"O correr da vida embrulha tudo. A vida é assim:
esquenta e esfria, aperta e daí afrouxa, sossega e
depois desinquieta. O que ela quer da gente
é coragem..."*

- Guimarães Rosa

Agradecimentos

À minha família que representa toda minha base e apoiou todas as minhas escolhas. Em especial, ao meu marido Wellington que vivenciou cada momento com muito otimismo e motivação. E a minha pequena Laís, companheira inseparável, presente em todos os momentos da escrita deste trabalho.

Ao professor Alexandre Marques, pela orientação e dedicação pelo trabalho.

À professora Daniella Castanheira Bartholomeu e Ricardo Fujiwara não pouparem atenção, bons conselhos como também pela disponibilidade tanto do laboratório quanto de equipamentos tornando este projeto possível.

Aos professores, funcionários e ao Departamento de Pós-graduação em Parasitologia que ajudaram na minha formação.

À CNPQ pelo auxílio financeiro.

Aos membros da banca pela disponibilidade e pela avaliação do meu trabalho.

Aos queridos amigos do LIGP: Michele, Mariana, Tiago, João, Sebastião, Pedro, PG, Rodrigo Baptista, Rodrigo de Lourdes, Gabi, Daniel, Lilian, Ana Luiza, Anny Caroline, Thais, Guilherme, Fernandão, Lu Maria, Natalia Resende, Laila, Jéssica, Natalia Satchiko, Ana Clara, Livia, Luiza, Denise, Chiara, Hugo e Carol Leão. Obrigada a todos pela boa convivência, e deixarem os dias mais leves, mesmo nos dias mais desgastantes.

Sumário:

Lista de figuras	vii
Lista de tabelas	viii
Resumo	ix
Abstract.....	xi
1. Introdução.....	1
1.1. O <i>Trypanosoma cruzi</i> e a doença de Chagas	1
1.2. As fases e as formas clínicas da doença de Chagas	5
1.3. O polimorfismo genético do <i>Trypanosoma cruzi</i>	7
1.4. O diagnóstico da doença de Chagas.....	10
2. Justificativa.....	14
3. Objetivos.....	16
3.1. Objetivo geral.....	16
3.2. Objetivos específicos	16
4. Materiais e Métodos	17
4.1. Lista dos Reagentes.....	17
4.2. Cultivo de <i>T. cruzi</i>	18
4.3. Extração do DNA genômico de <i>T. cruzi</i>	18
4.4. Desenho de <i>primers</i> para a amplificação de genes específicos	18
4.5. Predição de epítomos de célula B	20
4.6. Reação em cadeia da polimerase (PCR)	20
4.7. Análise do padrão de amplificação dos genes em gel de agarose.....	21
4.8. Purificação dos amplicons em gel de agarose.....	21
4.9. Ligação dos amplicons ao vetor de clonagem pGEM®-T.....	21
4.10. Transformação de bactérias por eletroporação e análise dos transformantes	22
4.11. Obtenção dos plasmídeos recombinantes	23
4.12. Digestão dos vetores de clonagem com enzimas de restrição	23

4.13. Ligação ao vetor de expressão pET28a-TEV	23
4.14. Sequenciamento das amostras clonadas em pET28a-TEV	25
4.15. Indução da expressão das proteínas recombinantes	25
4.16. Lise das bactérias e teste de solubilidade das proteínas recombinantes	26
4.17. Eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS	26
4.18. Purificação de proteína recombinante por cromatografia de afinidade	27
4.19. Soroteca de pacientes chagásicos e com leishmaniose	27
4.20. ELISA (<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>)	28
4.21. Análise Estatística	28
5. Resultados	30
5.1. Seleção das proteínas para expressão heteróloga	30
5.2. Predição de epitopos de células B nas proteínas selecionadas	31
5.3. Amplificação e clonagem dos genes de <i>T. cruzi</i> para expressão heteróloga das proteínas recombinantes	33
5.4. Expressão heteróloga de proteínas recombinantes em <i>E. coli</i>	36
5.5. Purificação da proteína recombinante Tc170	39
5.6. ELISA da proteína recombinante Tc170	41
5.7. Busca por ortólogos em <i>Leishmania infatum</i> da proteína Tc170 e identificação de epitopos de células B em comum	44
6. Discussão	47
7. Referências Bibliográficas	54

Lista de figuras

Figura 1) Transmissão e o ciclo do *Trypanosoma cruzi*.

Figura 2) As fases clínicas da doença de Chagas.

Figura 3) Relação filogenética entre as seis linhagens de *T. cruzi* (TcI-TcIV).

Figura 4) Mapa esquemático do vetor pGEM-T.

Figura 5) Mapa esquemático do vetor pPET-28-TEV.

Figura 6) Predição de epitopos lineares de célula B das proteínas recombinantes.

Figura 7) Análise eletroforética em gel de agarose 1% dos produtos de amplificação dos genes que codificam as proteínas-alvos.

Figura 8) Clivagem do plasmídeo pGEM-T contendo os insertos de interesse para subclonagem no vetor de expressão pET-28a-TEV.

Figura 9) SDS-PAGE das expressões das proteínas recombinantes Tc10 e Tc170.

Figura 10) Avaliação da solubilidade da proteína Tc170 após indução em bactéria.

Figura 11) Purificação por cromatografia de afinidade da proteína Tc170.

Figura 12) Frações da purificação por cromatografia de afinidade da proteína Tc170.

Figura 13) Reatividade de diferentes quantidades da proteína recombinante Tc170 em experimentos de ELISA realizados com os *pools* de soros de pacientes humanos chagásicos crônicos, com leishmaniose visceral ou não infectados com *T. cruzi* e *Leishmania infantum*, como controle negativo.

Figura 14) Reatividade da proteína Tc170 em experimentos de ELISA com soros individuais de pacientes humanos chagásicos crônicos, com leishmaniose visceral e não infectados com *T. cruzi* e *L. infantum*, como controle negativo.

Figura 15) Alinhamento e predição de epitopos de células B das proteínas Tc170 de *T. cruzi* (Tc00.1047053506577.170) e LinJ.33.0680 de *L. infantum*.

Lista de tabelas

Tabela 1) *Primers* utilizados neste trabalho.

Tabela 2) Condições de ciclagem da PCR

Tabela 3) Tamanho predito das proteínas recombinantes em kDa e o número de aminoácidos.

Resumo

A doença de Chagas, também conhecida como tripanossomíase americana, é causada pelo agente etiológico *Trypanosoma cruzi*, parasito hemoflagelado, unicelular e heteroxeno. É uma doença endêmica na América Latina e emergente em países da Europa e Estados Unidos. A fase aguda da doença dura aproximadamente de 10 a 90 dias após a infecção e é caracterizada por alta carga parasitária, o que permite que o seu diagnóstico seja realizado por exames diretos. Após 12 semanas, a infecção evolui para a fase crônica, que apresenta baixa parasitemia e altos títulos de IgG contra antígenos do parasito. Por esta razão, o diagnóstico na fase crônica é realizado através de ensaios imunoenzimáticos tais como Imunofluorescência indireta, hemaglutinação indireta e ELISA. Entretanto, para a realização destes testes, são utilizados extratos brutos ou semi-purificados das formas epimastigotas, sendo este estágio evolutivo do parasito encontrado apenas no inseto vetor e não no hospedeiro vertebrado. Não obstante, os testes diagnósticos para a doença de Chagas na fase crônica geram discussões por muitas vezes se mostrarem inconclusivos, ambíguos ou contraditórios devido as possíveis reações cruzadas com outros organismos da família Tripanosomatidae, como *Leishmania* sp e a espécie não patogênica para o hospedeiro vertebrado *Trypanosoma rangeli*. Na tentativa de aprimorar o diagnóstico da doença de Chagas, diversas proteínas recombinantes são hoje o foco de várias pesquisas por apresentarem uma boa sensibilidade e especificidade. Neste trabalho, o nosso grupo selecionou quatro proteínas possivelmente conservadas entre as diferentes cepas deste parasito, que não estão presentes no proteoma predito de espécies do gênero *Leishmania*, e que apresentam um alto *score* de predição de epitopo de célula B pelo programa BepiPred. Dentre as quatro proteínas selecionadas: Tc10, Tc30, Tc80 e Tc170, a última foi expressa de forma recombinante em bactérias BL-21 Star, sendo em seguida utilizada em experimentos de ELISA contra o soro de pacientes chagásicos crônicos, pacientes com leishmaniose visceral e indivíduos saudáveis, como controle. No entanto, o ELISA realizado com o *pool* de soros apontou uma maior reatividade desta proteína com pacientes infectados com *Leishmania infantum*. Tal fato sugere que apesar das proteínas selecionadas não estarem presentes no proteoma de espécies do gênero *Leishmania*, peptídeos ortólogos entre os dois organismos estão presentes nesta proteína. Para averiguar a reação da proteína Tc170 com soros individuais de pacientes de ambas as enfermidades assim como também com soros de indivíduos não infectados, foi

realizado um ensaio de ELISA, que demonstrou que a proteína Tc170 apresentou uma sensibilidade de 84,21% e uma especificidade de 80% entre os soros de pacientes chagásicos, pacientes infectados com *Leishmania infantum*, com relação a humanos saudáveis. Entretanto, esta proteína não é aconselhada para o diagnóstico da doença de Chagas por apresentar uma sensibilidade de apenas 25,64% e uma especificidade de 94,73% entre pacientes chagásicos e pacientes com leishmaniose visceral. Portanto, é necessário a busca de novos alvos devem ser realizadas na tentativa de obter uma proteína com maior sensibilidade e especificidade e que diferencie o *T. cruzi* de outros patógenos da mesma família.

Abstract

Chagas disease (CD), also known as American trypanosomiasis, is caused by the unicellular hemoflagellate parasite *Trypanosoma cruzi*. CD is an endemic disease in Latin America and emerging infectious disease in US and Europe. The acute phase of the disease lasts around 10 to 90 days after infection and is characterized by high parasitic load, which allows the diagnosis to be made by direct examination. At the chronic phase, that chagasic patient has a low parasitaemia and high titers of IgG against parasite antigens, hence, the diagnosis of Chagas' disease is attained by conventional serological tests such as indirect immunofluorescence, indirect hemagglutination, and ELISA. However, to perform these tests, raw or semi-purified extracts of epimastigote form are used as antigen, and this evolutionary stage of the parasite is only found in the insect vector and not in the vertebrate host. In addition, diagnostic for Chagas disease in the chronic phase may be inconsistent owing to the possible cross-reactions with sera from patients affected by other endemic diseases such as leishmaniasis. In attempt to improve the diagnosis of Chagas disease, a number of recombinant proteins, is now the focus of several studies once they have shown enhancement regarding the sensitivity and specificity. In this work, our group selected four proteins: Tc10, Tc30, Tc80 and Tc170 possibly conserved among different strains of this parasite, which are not present in the predicted proteome of *Leishmania* species, and that have a high epitope prediction score for B cell by BepiPred program. Among the four selected proteins, the protein termed Tc170 was recombinantly expressed in BL-21 Star bacteria and then used for ELISA experiments against sera from chronic chagasic patients. Sera from patients with visceral leishmaniasis and from healthy individuals were used as control. Thus, ELISA carried out with the pooled sera from patients infected with *Leishmania infantum* showed higher reactivity with Tc170 protein. This suggests that despite the selected proteins are not present in the proteome of *Leishmania* species, orthologous peptides between the two forms are present in this protein. We also tested the reaction of the protein Tc170 with individual sera of patients as well with the controls. The results showed that the protein Tc170 had a sensitivity of 84.21% and a specificity of 80% in pool of sera from Chagas patients compared with controls. However, based in our results with distinct test serum, this protein is not suggested for the diagnosis of Chagas disease by presenting a sensitivity of only 25,64% and a specificity of 94,73% among patients with Chagas disease and visceral

leishmaniasis. Therefore, search for new targets should be performed in an attempt to obtain a protein with higher sensitivity and specificity, differentiating the *T cruzi* from other pathogens of the same family.

1. Introdução

Mais de um bilhão de pessoas no mundo são afetadas por doenças tropicais, que são consideradas negligenciadas pela Organização Mundial de Saúde por serem endêmicas nos países pobres, em desenvolvimento e terem uma íntima relação com más condições sanitárias, de moradia e com conflitos sociais. Tais patologias causadas por parasitos, vírus e bactérias, são responsáveis por 534.000 mortes por ano e 57 milhões de anos perdidos por incapacidade, de acordo com o indicador DALY (*Disability Adjusted Life Years*) (KAPPAGODA & PA, 2014).

A doença de Chagas é uma doença infecciosa causada pelo parasito hemoflagelado, *Trypanosoma cruzi*. De acordo com os dados de 2014 da Organização Mundial de Saúde, estima-se que essa doença afete aproximadamente de 7 a 8 milhões de pessoas no mundo, principalmente na América Latina, onde a doença de Chagas é considerada endêmica (<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>). Por haver escassez evidente nos investimentos do ponto de vista farmacêutico e governamental nos países onde essa parasitose é endêmica, a doença de Chagas é classificada como negligenciada pela Organização Mundial de Saúde, pois ainda causa uma expressiva taxa de mortalidade e morbidade em países pobres e em desenvolvimento (JR et al., 2010).

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

A história natural da doença de Chagas iniciou-se há milhares de anos. O *Trypanosoma cruzi* estava restrito nos ambientes selvagens e mantinha o seu ciclo biológico entre os animais silvestres. Com a entrada do homem nestes ambientes para a exploração da agricultura extensiva e pecuária, a doença de Chagas mudou o seu perfil epidemiológico e passou a ser considerada uma zoonose, pois com o deslocamento dos animais silvestres, os triatomíneos passaram a colonizar habitações humanas (COURA, 2007a) (COURA, 2014).

Descoberta em 1909 pelo médico Carlos Chagas na cidade de Lassance, Minas Gerais, a doença se espalhou progressivamente na América Latina, afetou milhares de pessoas nas áreas rurais o que gerou grandes impactos na saúde pública

devido à acentuada morbidade e mortalidade (SCHOFIELD; JANNIN; SALVATELLA, 2006) (SCHMIDT et al., 2009).

O ciclo biológico do *T. cruzi* é de alta complexidade e apresenta estágios distintos ao longo da sua vida tanto no hospedeiro vertebrado quanto no hospedeiro invertebrado (Figura 1). Trata-se de um organismo heteróxico (COURA, 2007). O hospedeiro invertebrado são insetos hematófagos, pertencentes à ordem Hemiptera, família Reduviidae e sub-família Triatominae, conhecidos popularmente como barbeiros. A infecção no hospedeiro invertebrado ocorre quando o triatomíneo ingere sangue do hospedeiro vertebrado que contenha as formas tripomastigotas sanguíneas. No intestino médio do triatomíneo ocorrerão algumas modificações na morfologia do *T. cruzi* até que o parasito assuma a forma epimastigota, que são as formas replicativas encontradas apenas no inseto. Algumas das formas epimastigotas irão se diferenciar em formas tripomastigotas e outras continuarão se replicando no inseto vetor. As que se modificarem em tripomastigotas poderão se diferenciar posteriormente em formas infectantes: as tripomastigotas metacíclicas, que representam o estágio infectante no hospedeiro vertebrado. Os hospedeiros vertebrados suscetíveis à infecção por *T. cruzi* consistem em mamíferos de diversas classes tais como marsupiais, quirópteros, roedores, edentados e o homem (SCHMIDT et al., 2009).

Durante o repasto sanguíneo dos triatomíneos, as formas tripomastigotas metacíclicas são liberadas nas fezes e podem ser interiorizadas pelo homem, através de uma injúria tecidual nos arredores do sítio da picada, como também pode ser carregado pelo próprio indivíduo no ato de coçar a região e posteriormente levar a mão à boca ou aos olhos (CHAGAS, 1909). As tripomastigotas são capazes de invadir diversos tipos de células (FERNANDES et al., 2011). Após a invasão ocorrerá a diferenciação do parasito em formas especializadas em replicação intracelular, as formas amastigotas. A replicação ocorre por fissão binária e novas amastigotas são produzidas até o completo esgotamento da célula hospedeira. Ocorre, portanto, o extravasamento do parasito já modificado em formas tripomastigotas que invadirão novas células (COURA, 2007).

Durante o processo infeccioso no homem podem ocorrer sinais clínicos característicos da doença de Chagas. As tripomastigotas metacíclicas ao penetrarem na mucosa ocular podem gerar uma reação inflamatória conjuntiva com edema unilateral de ambas as pálpebras denominado sinal de Romana. No sítio da transmissão, onde o

triatomíneo realizou o repasto sanguíneo também podem acontecer em qualquer parte da pele uma reação no tecido subcutâneo com edema local, endurecimento, congestão vascular e infiltrado celular conhecido como chagoma de inoculação (JR; et al., 2010) (Figura 1).

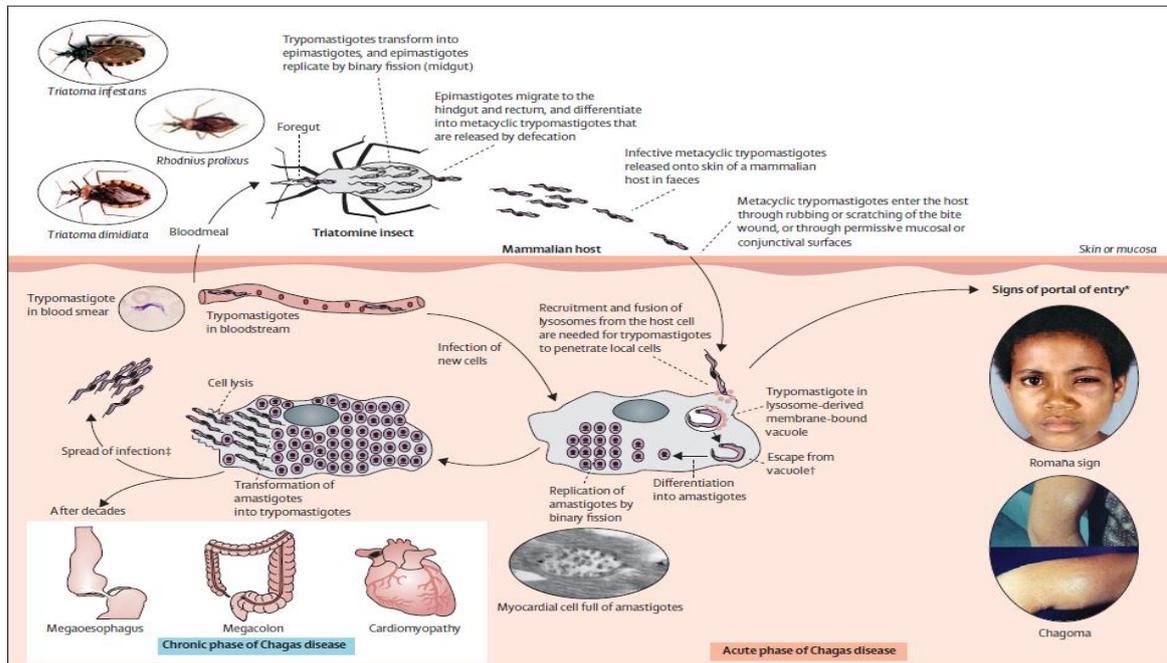


Figura 1: Principal mecanismo de transmissão e o ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi* em seus hospedeiros invertebrados, no homem e os sinais clínicos da doença de Chagas (JR; RASSI; MARIN-NETO, 2010).

Nas últimas décadas governos da Argentina, Bolívia, Brasil, Chile e Uruguai promoveram medidas de controle que foram muito efetivas para alterar o perfil epidemiológico da doença de Chagas na América Latina. Conhecido como Iniciativa Cone Sul, estes países tiveram como objetivo interromper a transmissão tendo como o foco a eliminação do principal vetor responsável pela transmissão, o *Triatoma infestans*, como também a melhoria das moradias e o controle dos bancos de sangue. Porém a transmissão vetorial da doença de Chagas pelo *Triatoma infestans* ainda permanece em outros países da América Latina principalmente na Bolívia e Paraguai. No Brasil a transmissão acontece através de outras espécies (CARLOS; DIAS, 2007). Para um

cenário futuro no controle, a Iniciativa Cone Sul visa englobar quais espécies de triatomíneos envolvidos no processo de infecção do *T. cruzi* através da caracterização das espécies domésticas, peridomésticas e silvestres de triatomíneos, como também estabelecer a relação entre os triatomíneos que podem colonizar casas e as espécies que podem transmitir a doença de Chagas sem a necessidade de fundar colônias domésticas. Estes riscos não podem ser ignorados e exigem vigilância no controle seletivo dos vetores (SCHOFIELD; et al., 2006).

Existem outras formas de transmissão da doença de Chagas que devem ser consideradas. Apesar de ser obrigatório, o monitoramento dos bancos de sangue pode ser insuficiente devido à precariedade na triagem. A fragilidade das triagens pode ser atribuída aos diversos problemas no quadro do diagnóstico da doença. Por essa razão, a transfusão sanguínea continua sendo um importante mecanismo de transmissão principalmente nos países não endêmicos (PIERIMARCHI et al., 2013).

A infecção oral por *T. cruzi* é considerada atualmente um dos principais mecanismos de transmissão da doença de Chagas. Alguns surtos da doença de Chagas têm sido relatados pela ingestão acidental do *T. cruzi* em muitas regiões do Brasil (ANDRADE et al., 2011). Uma característica dos surtos da doença de Chagas através da infecção oral deve-se a gravidade dos casos, muitas vezes culminados em morte. A fonte de contaminação desta infecção é conferida a triatomíneos infectados com o *T. cruzi* esmagados juntamente com a cana de açúcar ou frutas durante o preparo de bebidas (YOSHIDA, 2008). Outra forma de infecção é conferida pela a infecção vertical do *T. cruzi*, ou seja, via placentária ou durante a passagem do neonato ao nascer. A transmissão congênita tem sido observada desde a década de 1940, sendo então observada nos países endêmicos. A probabilidade de uma mãe chagásica passar a infecção para o feto parece variar de acordo com as regiões, tal variação pode ocorrer entre 0,5 a 10% (COURA, 2007, 2015) (KEMMERLING; BOSCO; GALANTI, 2010).

Contudo, a vigilância epidemiológica da doença de Chagas deve consistir de estudos contínuos sobre os seguintes aspectos: (1) a ocorrência da doença, (2) o ambiente no qual ocorre à transmissão, (3) os mecanismos de transmissão, (4) avaliação dos riscos de adaptação dos triatomíneos em contextos domésticos e peridomésticos, (5) controle de transmissão por diversos mecanismos, tais como vetorial, transfusão de sangue, infecção oral, entre outros menos frequentes (COURA, 2013).

1.2. As fases e as formas clínicas da doença de Chagas

As características biológicas das cepas de *T. cruzi* envolvidas com a infecção e particularmente com o tropismo do parasito, podem se relacionar com a forma clínica que o individuo poderá desenvolver (COURA, 2007a). A partir de análises genéticas de diferentes isolados de *T. cruzi*, Dutra e colaboradores (2005) demonstram que a população do parasito é extremamente polimórfica e que tal plasticidade gênica parece exercer um forte caráter em relação às manifestações clínicas. O estado imunológico do hospedeiro é também um fator importante no curso da infecção. Uma resposta do tipo Th1, somado a produção de IL-12 e IFN- γ é fundamental para orquestrar a fase aguda da infecção. IFN- γ induz a produção de oxido nítrico que age de maneira letal nos parasitos, entretanto, este instrumento imunológico apenas contém a infecção quanto a replicação de *T. cruzi*, sendo assim, o parasito permanece no organismo com uma carga parasitária menor. A infecção seguirá para a fase crônica devido à persistência do *T. cruzi* (DUTRA; ROCHA; TEIXEIRA, 2005).

O prognóstico da doença de Chagas dependerá da forma clínica na qual a enfermidade vai se manifestar durante o ciclo evolutivo. Na fase aguda, por exemplo, sabe-se que crianças na primeira infância estão mais suscetíveis a estabelecer um quadro mais grave, com insuficiência cardíaca aguda, miocardite e meningite. Por esta razão, o prognóstico não é favorável quando se trata da doença de Chagas congênita. Transmitido verticalmente, a infecção pelo *T. cruzi* leva a abortos, nascimentos prematuros, lesões de fígado, baço, coração e comprometimento no sistema nervoso central do neonato, o que pode promover sequelas irreversíveis no desenvolvimento da criança (COURA, 2007a).

A fase aguda da doença tem a durabilidade de 10 a 90 dias após a infecção pelo parasito. Pode exibir sintomas inespecíficos ou pode não manifestar sintomas. Reações inflamatórias com presença de células mononucleadas na pele ou mucosa onde as formas infectantes penetraram podem gerar o sintoma específico conhecido como sinal de Romanã ou chagoma de inoculação, conforme mencionado anteriormente. Porém, em alguns casos podem ocorrer sintomas inespecíficos como febre, diarreia, dores musculares, sonolência, distúrbios respiratórios e em casos mais graves,

meningite, o que pode dificultar o diagnóstico. A forma indeterminada na fase crônica é praticamente assintomática, geralmente encontram-se focos de infiltrado inflamatório no miocárdio e redução de células cardíacas, porém insuficientes para apresentar manifestações clínicas. São considerados pacientes com a forma indeterminada aqueles que comprovadamente estão infectados com *T. cruzi*, nos quais não são detectadas anormalidades clínicas imputáveis à doença (CAMARGOS et al., 2000), embora alguns indivíduos possam desenvolver as formas cardíacas e/ou digestivas tardiamente (MARIN-NETO et al., 2002). Quando sintomática, a doença de Chagas na fase crônica é caracterizados por infiltrados mononucleares inflamatórios, diferentes graus de fibrose e baixa parasitemia (RIBEIRO et al., 2012).

A forma cardíaca da doença de Chagas certamente é a mais expressiva manifestação, tanto por sua frequência e quanto pela sua gravidade. Geralmente são características observadas entre a segunda e quarta década de vida do paciente chagásico e aproximadamente entre cinco a quinze anos após a infecção inicial. Os sinais e sintomas de cardiopatia chagásica crônica são: arritmia, insuficiência cardíaca, auricular-ventricular e bloqueios de ramo e tromboembolismo (COURA, 2007a). A maioria das mortes decorrentes da infecção chagásica ocorre devido à falha congestiva do coração (CAMARGOS et al., 2000) (ARAÚJO et al., 2000). Na forma digestiva, manifestações clínicas podem resultar a perda do peristaltismo do esôfago e cólon causado pela destruição dos plexos mesentéricos, que, conseqüentemente, desencadearão desenvolvimento do megaesôfago e megacólon. Apesar de em casos isolados, durante a fase aguda da doença, podem ocorrer espasmos e perda do peristaltismo, acompanhados do alargamento do esôfago (COURA, 2007a). Conforme a Figura 2, as fases clínicas da doença de Chagas se dividem em infecção aguda e infecção crônica. O pico de parasitemia é obtido durante a infecção aguda e decresce com a infecção crônica.

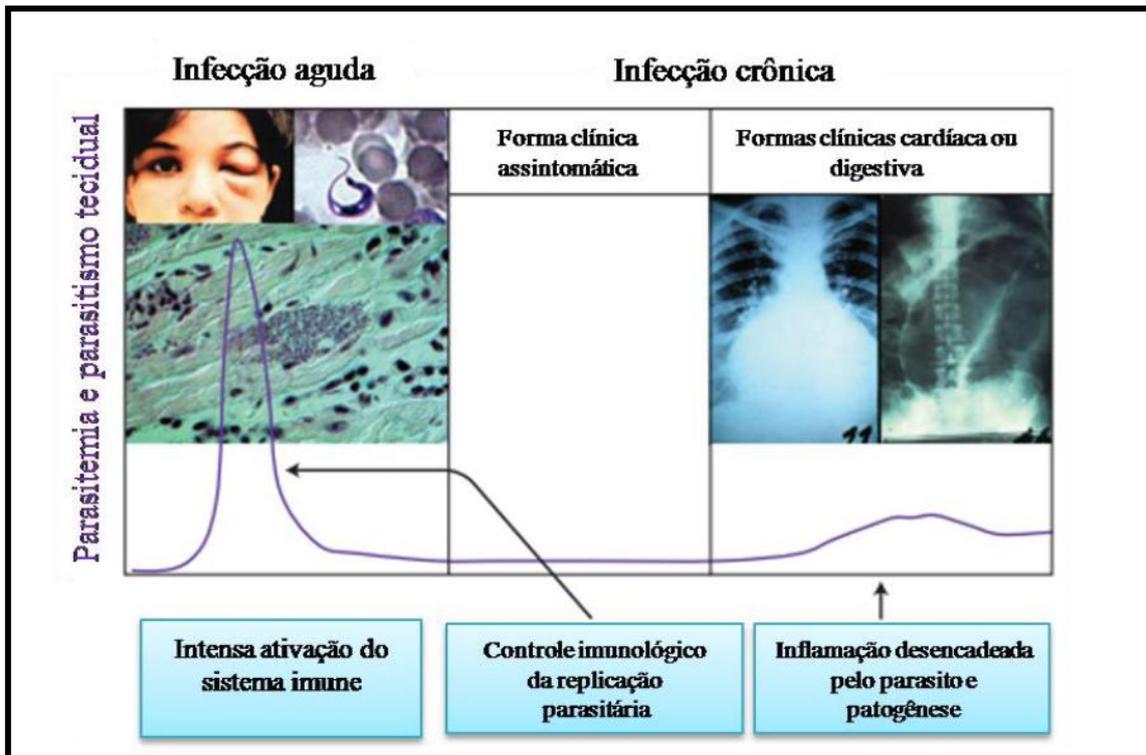


Figura 2: Fases clínicas da doença de Chagas (adaptado de Junqueira et al., 2010).

O prognóstico de cada fase varia consideravelmente de um caso para o outro. Pacientes com lesões mínimas como bloqueio discreto do ramo ventricular unifocal tendem a permanecer sem sintomas ao longo de vários anos e morrem por outras razões inerentes a enfermidade de Chagas. Outro grupo de pacientes que apresentam taquicardia acentuada, arritmia, extrassístole multifocal, fibrilação auricular e insuficiência cardíaca grave possuem um prognóstico complicado com relação à doença. E um terceiro grupo de pacientes, com um ligeiro aumento da área cardíaca e alguns achados eletrocardiográficos como manifestações clínicas, possuem um prognóstico incerto (COURA, 2007a).

1.3. O polimorfismo genético do *Trypanosoma cruzi*

A espécie *Trypanosoma cruzi* é composta por subpopulações genéticas de origem clonal da Ordem kinetoplastida. As cepas ou isolados de *T. cruzi* exibem marcadores fenotípicos variáveis, como a taxa de multiplicação, tropismo tecidual e resistência à drogas (UMEZAWA et al., 1999).

Para facilitar a comunicação entre os pesquisadores, a nomenclatura destas cepas, atualmente foi dividida em seis DTUs (*Discrete Typing Units*), denominados de TcI a TcVI (ZINGALES et al., 2009). Esta categorização considera a estrutura populacional, a filogeografia e a eco-epidemiologia do parasito, em associação com os diferentes genótipos dos hospedeiros, ecótopos e ciclos de transmissão (HERRERA, 2014); (ZINGALES et al., 2012). Os conceitos de DTUs e evolução clonal foram gerados no âmbito da pesquisa evolutiva em *T. cruzi* e a potencial troca genética ainda está presente. Além disso, alguns ciclos geográficos de transmissão sugerem a existência de recombinação genética que ocorre dentro de DTUs de *T. cruzi* (GUHL et al., 2002). Dentro das cepas de *T. cruzi*, as DTUs devem ser consideradas como famílias e não como um único clone (ANDRADE et al., 2011). As subdivisões genéticas de *T. cruzi*, atualmente aceitas para a divisão de DTUs, possuem origem híbrida, ou seja, possuem dois ancestrais, como pode ser observado na Figura 3.

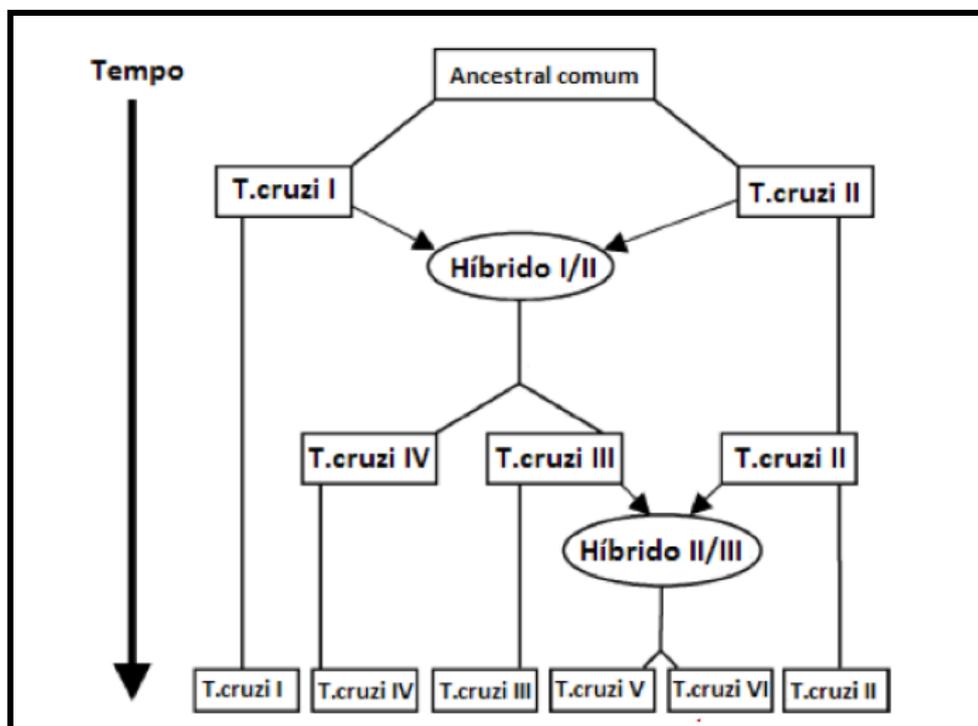


Figura 3: Relação filogenética entre as seis linhagens de *T. cruzi* (TcI-TcIV). Neste modelo, as linhagens TcI e TcII originaram TcIII e TcIV em um evento ancestral de hibridização, seguida por uma nova hibridização recente entre TcII e TcIII para gerar TcV e TcVI (adaptado de ZINGALES et al., 2012).

TcI é a DTU de *T. cruzi* mais abundante na América, sendo encontrada tanto no ciclo silvestre quanto no ciclo doméstico. Este subgrupo está presente do norte da América do Sul a América Central e sua patogenia está fortemente associada a forma cardíaca. Na região amazônica existem apenas alguns focos isolados na bacia amazônica. Nos Estados Unidos, TcI pode ser encontrado nas infecções dos ambientes silvestres do estado do Alabama (ROELLIG et al., 2013). As cepas do grupo TcI tais como Colombiana e Silvio apresentam-se com pouca taxa de variação genética e um genoma reduzido com relação as outras cepas de subgrupos distintos como Esmeraldo TcII e CL Brener TcIV. A taxa de divergência entre TcI e TcII é mensurada por um período de 88 e 37 milhões de anos, respectivamente, baseado no estudo do rDNA (ZINGALES et al., 1999). TcII é predominantemente encontrada nas regiões central e sul da América do Sul e sua patogenia está relacionada às formas cardíacas, digestivas ou ambas as formas. Este subgrupo de *T. cruzi* foi isolado do ambiente doméstico de transmissão, possui vetores e hospedeiros provenientes de fragmentos da Mata Atlântica, principalmente primatas (MACEDO et al., 2004). No Brasil, TcIII está associado ao ambiente selvagem no qual infecções humanas foram raramente relatadas. O principal hospedeiro relatado no ciclo para esta DTU é a espécie *Dasypus novemcinctus* (ZINGALES et al., 2012). TcV e TcIV são híbridos muito semelhantes associados com a doença de Chagas no sul e centro da América do Sul. TcIV mostra um padrão semelhante de distribuição na América do Sul ao TcIII, com exceção do Chaco, onde parece estar ausente. Nas regiões do Cone Sul, onde o *T. infestans* é o principal vetor de *T. cruzi*, para as linhagens TcII, TcV e TcVI. TcII predomina no leste e centro do Brasil, enquanto, TcV está presente na Argentina, Bolívia, e Paraguai, e TcVI no Gran Chaco (SOLARI et al., 1992).

Os avanços no entendimento da estrutura populacional do *T. cruzi* facilitam a comunicação entre pesquisadores que buscam melhorar o conhecimento específico nas áreas de eco-epidemiologia, patogenicidade da doença e biologia geral (ZINGALES et al., 2009).

1.4. O diagnóstico da doença de Chagas

O diagnóstico da doença de Chagas apresenta diferentes abordagens de acordo com a fase que a infecção se encontra. Na fase aguda da doença de Chagas, parasitas circulam na corrente sanguínea. Portanto, o diagnóstico laboratorial é baseado na observação do parasito no sangue do indivíduo infectado (GOMES; LORENA; LUQUETTI, 2009). A hemocultura, o xenodiagnóstico e a PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) também podem ser utilizados para a pesquisa do parasito no sangue do paciente infectado durante a fase aguda, porém raramente apresentam-se positivos, exceto em pacientes com HIV ou imunodeprimidos (RIBEIRO et al., 2012). A PCR tem seu emprego restrito na rotina diagnóstica devido ao fato de ser um método laborioso, contamina-se facilmente e exige uma infraestrutura dispendiosa, necessita de tecidos de pacientes, sujeitando os mesmos à biópsias e processos invasivos (PORTELA-LINDOSO, et al., 2003).

Durante a fase crônica, ensaios imunoenzimáticos são amplamente utilizados no diagnóstico da doença de Chagas. Os testes sorológicos mais utilizados para o diagnóstico da doença são: imunofluorescência indireta, hemaglutinação indireta e ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) (UMEZAWA et al., 2004). Desde que seguido de boas práticas laboratoriais e utilizando-se kits de boa qualidade, os testes apresentados podem apresentar uma boa sensibilidade e especificidade. (UMEZAWA et al., 2004) (DA SILVEIRA; UMEZAWA; LUQUETTI, 2001). No entanto, vários relatos têm demonstrado que os resultados podem ser inconclusivos ou duvidosos dependendo do ensaio comercial utilizado (AFONSO; EBELL; TARLETON, 2012; ANGÉLICA et al., 2003; GRUBER; ZINGALES, 1993; GUHL et al., 2002).

Os primeiros testes sorológicos para esta parasitose eram realizados utilizando-se extratos antigênicos inteiros ou semipurificado de epimastigotas de *T. cruzi*, forma não-infectiva do parasito. (DA SILVEIRA; UMEZAWA; LUQUETTI, 2001). Quando são utilizados kits comerciais, são considerados “resultados inconclusivos” aqueles que apresentam reações não claramente positivas ou negativas. É possível observar resultados com uma boa eficiência em detectar anticorpos provenientes de kits comerciais disponibilizados no mercado, quando soros com altos títulos de anti-*T. cruzi* são testados. Entretanto, possuem resultados questionáveis

quando os kits são utilizados com soros que apresentam baixos títulos (CABALLERO et al., 2007).

Outro fator importante a ser considerado é que os testes sorológicos para a doença de Chagas podem apresentar reações cruzadas com o soro de pacientes infectados com outros organismos da família Trypanosomatidae, tais como *Trypanosoma rangeli* e *Leishmania* spp. Conseguir alvos específicos afim de reduzir estes resultados ambíguos tem sido um dos maiores desafios de aprimoramento de diagnósticos para essas enfermidades causadas por organismos tão próximos filogeneticamente (CABALLERO et al., 2007).

Um grande desafio para medicina diagnóstica é a determinação do estado de saúde real de um indivíduo em relação a uma doença quando o teste padrão ouro não existe ou seu uso é limitado (PEREIRA et al., 2012). Devido ao fato de não existir nenhum teste de referência para a doença de Chagas, a Organização Mundial da Saúde (OMS) recomenda que para o diagnóstico de um indivíduo deva-se utilizar dois testes convencionais com base em diferentes princípios e detecção de antígenos diferentes. (AFONSO; EBELL; TARLETON, 2012). No caso de resultados ambíguos ou discordantes, uma terceira técnica deve ser utilizada. (AFONSO; EBELL; TARLETON, 2012).

Nos últimos anos, a tecnologia de DNA recombinante tem sido utilizada para isolar e caracterizar antígenos de *T. cruzi*. A avaliação de alguns antígenos definidos têm demonstrado resultados promissores para o diagnóstico da doença de Chagas (CABALLERO et al., 2007). Este advento tem permitido a produção em grande escala de antígenos de *T. cruzi* altamente puros. O uso de peptídeos lineares ou ramificados que reagem com epitopos de célula B tem demonstrado resultados favoráveis para o diagnóstico da doença de Chagas. A utilização destes antígenos recombinantes tem como o principal objetivo evitar discordâncias nos resultados dos testes atualmente utilizados, como a baixa especificidade que favorece reações cruzadas com outros organismos como *Leishmania infantum* e *Trypanosoma rangeli*, como também com certas doenças auto-imune (GOMES; LORENA; LUQUETTI, 2009). Por esta razão, os testes diagnósticos que utilizam extratos brutos ou semi-purificados estão sendo substituídos por antígenos purificados, como GP90 kDa, GP72 kDa, GP25 kDa e PG55 kDa (UMEZAWA et al., 1999).

Saez-Alquézar e colaboradores (2000), desenvolveram um teste diagnóstico denominado “INNO-LIA Chagas assay”. Os antígenos que o grupo utilizou para este teste foram a proteína recombinante Tc24 ou peptídeos derivados desta proteína: Ag 39, TcD, SAPA, MAPA, CRA e FRA. Este ensaio demonstrou uma excelente sensibilidade e especificidade (98,3% e 98,1% respectivamente). Entretanto, os altos custos para a execução e a dificuldade de análise dificultaram a viabilidade (SAEZ-ALQUÉZAR et al., 2000).

As mucinas que revestem a superfície das formas tripomastigotas sanguíneas (tGPI-mucinas) possuem epitopos altamente imunogênicos capazes de produzirem anticorpos anti- α -Gal (DE MARCHI et al., 2011). Proteínas recombinantes derivadas das mucinas “*Trypomastigote small surface antigen*” (TSSA) de TcI (TSSA I) e TcVI (TSSA VI) foram testadas por Marchi e colaboradores (2011). Este grupo utilizou soros de pacientes brasileiros e chilenos infectados com *T. cruzi* e como controle negativo, foi utilizado soro de pacientes infectados com outras parasitoses, tanto com helmintos ou protozoários, incluindo leishmaniose visceral e leishmaniose tegumentar. Dentre o conjunto de proteínas testadas, apenas a TSSA VI apresentou uma sensibilidade de 86,9% e uma especificidade de 97,4% (DE MARCHI et al., 2011).

Em 2012, Ferrer e colaboradores testaram tanto técnicas imunológicas quanto moleculares para o diagnóstico da doença de Chagas na fase aguda e na fase crônica em pacientes da Venezuela. De maneira geral, na fase aguda, a sensibilidade a partir de abordagens sorológicas apresentou-se com 62%. Os testes moleculares apresentaram com um resultado de 76,9%. Em contrapartida, para a fase crônica, foi observado um aumento significativo em relação aos testes sorológicos que apresentaram uma sensibilidade de 95,2%, um valor bem superior aos 23,8% obtidos nos testes moleculares para esta fase (FERRER et al., 2012).

Apesar de várias proteínas recombinantes e peptídeos sintéticos terem sido testados nas últimas décadas, é de extrema importância o descobrimento de novos alvos no aprimoramento do diagnóstico para a doença de Chagas (COURA; BORGES-PEREIRA, 2010). Importantes critérios devem ser abordados para considerar um antígeno como um bom candidato no diagnóstico de infecção pelo *T. cruzi*. Estes requisitos são:

- 1) O antígeno deve estar presente em todas as cepas de *T. cruzi*, ou seja, em todas as DTUs, e nas diferentes áreas endêmicas nas quais as cepas ocorrem.
- 2) Não estar presentes em outros organismos a fim de evitar reações cruzadas.
- 3) Devem ser bastante antigênicos em populações humanas e se manifestarem nas diferentes formas clínicas que a doença possa se apresentar.
- 4) Os antígenos devem ser estáveis e seus testes devem ser de fácil execução (DE MARCHI et al., 2011).

2. Justificativa

O diagnóstico preciso da doença de Chagas é essencial, não apenas para direcionar o tratamento adequado ao indivíduo infectado, como também é indispensável para a triagem de bancos sanguíneos, pois a transfusão de sangue e os transplantes de órgãos são hoje importantes mecanismos de transmissão da doença em países não endêmicos. Realizar uma triagem eficiente dos bancos sanguíneos é fundamental no controle da doença, uma vez que existe alta taxa de migração de pessoas provenientes de áreas endêmicas destinadas a países onde não ocorre a transmissão vetorial. Embora nas últimas décadas o conhecimento em relação à doença de Chagas tenha crescido, os métodos de diagnóstico continuam sendo um grande desafio, pois muitos dos métodos de identificação da infecção apresentam problemas. Por essa razão, faz-se necessário o desenvolvimento de testes que apontem um diagnóstico diferencial e fidedigno da doença. Não obstante, o polimorfismo genético do *T. cruzi*, somado às características imunológicas do hospedeiro, podem definir desde as manifestações clínicas da doença quanto ao prognóstico, assim como estas variações podem interferir nos laudos diagnósticos.

Para este trabalho, o ELISA foi selecionado para testar a viabilidade de alvos proteicos no diagnóstico da doença de Chagas. Estes alvos foram selecionados a partir da predição de epitopos de células B com a utilização dos dados gerados no projeto genoma de *T. cruzi*. A escolha por ELISA como teste padrão foi devido à sua facilidade de execução, por permitir a análise de várias amostras e por ser menos dispendioso, aumentando assim a viabilidade para ser utilizado em testes diagnósticos em larga escala.

É de grande valia o aperfeiçoamento dos testes diagnósticos para evitar resultados inconclusivos. Com o advento tecnológico do DNA recombinante, é possível produzir antígenos específicos e sensíveis, através da expressão heteróloga de genes de *T. cruzi* para o refinamento do diagnóstico da doença de Chagas, como também o monitoramento do curso da infecção. Para a predição de epitopos, a tecnologia do DNA recombinante conta com o auxílio de programas de bioinformática, que promovem e sugerem possíveis alvos que poderão ser padronizados desde que testados previamente com técnicas de biologia molecular. Tais alvos devem possuir epitopos comuns a todas as cepas de *T. cruzi*, mas que devem estar ausentes em outros organismos da família Trypanosomatidae. Apesar de testes de epitopos selecionados por bioinformática

sugerirem bons alvos, estes requererem esforços e testes para serem considerados bons alvos.

Portanto, a descoberta de novas proteínas recombinantes pode melhorar a qualidade do diagnóstico da doença de Chagas. Tais alvos poderão ser utilizadas no diagnóstico específico da doença como também poderão aprimorar a sensibilidade em amostras de pacientes provenientes de diferentes áreas endêmicas da América Latina, sendo de extrema importância para o correto controle desta enfermidade.

3. Objetivos

3.1. Objetivo geral

Obter proteínas recombinantes para serem testadas como alvos no diagnóstico específico da doença de Chagas, através de ensaios de ELISA que apresentam boa sensibilidade e especificidade.

3.2. Objetivos específicos

- 1- Obter proteínas recombinantes através da expressão heteróloga de genes de *Trypanosoma cruzi* de interesse imunológico;
- 2- Testar estas proteínas recombinantes em ensaios de ELISA contra o soro de pacientes infectados com *Trypanosoma cruzi* e *Leishimania infantum*;
- 3- Validar a eficiência das proteínas como antígenos no diagnóstico específico da doença de Chagas.

4. Materiais e Métodos

4.1. Lista dos Reagentes

Acrilamida/Bis-acrilamida 40% - Bio-Rad;
Agarose ultrapure – Life Technologies;
Anti-IgG humano conjugado com peroxidase – SIGMA ALDRICH;
Azul de bromofenol – SIGMA ALDRICH;
Brometo de Etídio – Bio-Rad;
Buffer ligase- PROMEGA
Carbonato de sódio – SIGMA ALDRICH;
Cloreto de cálcio P.A.-A.C.S. – Synth;
Cloreto de magnésio – Synth;
Cloreto de potássio P.A. – Synth
Cloreto de sódio P.A. – Synth;
Extrato de levedura – Biorigin;
GeneRuler 1 kb DNA Ladder – Fermentas;
GoTaq DNA Polymerase 5X – Promega;
Green GoTaq®Reaction Buffer – Promega;
Imidazol- Sigma;
IPTG – Life Technologies
Kit PureLink™ Quick Gel Extraction – Life Technologies;
Kit Wizard Genomic DNA Purification – Promega
Kit PureLink Quick Plasmid Miniprep – Life Technologies
Persulfato de Amônio - Amresco;
pGEM®-T – Promega;
Platinum Taq High Fidelity – Life Technologies;
T4 DNA Ligase – Promega;
Taq DNA polimerase – Phoneutria ;
TEMED - Sigma;
Tris base - Sigma;
Tween 20 U.S.P. – Synth;
Uréia P.A. – Vetec.

4.2. Cultivo de *T. cruzi*

Epimastigotas de *T. cruzi* do clone CL Brener (TcIV) foram cultivadas a 28 °C em meio LIT (10 g/L de infuso de fígado; 4 g/L NaCl; 400 mg/L KCl; 8 g/L Na₂HPO₄; 1 g/L glicose; 5 g/L triptose; 10 mL de hemina a 0,2% em NaOH (p/v); pH 7,2) suplementado com 10% de soro fetal bovino (previamente inativado a 56 °C por 30 min), acrescido de penicilina a 100 U/mL e estreptomicina a 100 µg/mL (Camargo, 1964). As culturas foram repicadas em intervalos de 3-5 dias mediante inóculos de 1x10⁶ células/mL até a fase logarítmica de crescimento, quando a densidade celular for de aproximadamente 1x10⁷ células/mL.

4.3. Extração do DNA genômico de *T. cruzi*

Culturas de epimastigotas de *T. cruzi* do clone CL Brener, em fase logarítmica de crescimento, totalizando 10⁸ células, foram utilizadas para a extração do DNA genômico. Após centrifugação a 2.000xg, por 10 min, os parasitos foram lavados duas vezes com tampão PBS 1x (132 mM NaCl; 3 mM KCl; 8 mM Na₂HPO₄; 1,5 mM KH₂PO₄; pH 7,2) e a extração foi realizada utilizando o *Wizard Genomic DNA Purification Kit* (Promega), de acordo com as recomendações do fabricante. As amostras de DNA extraídas foram quantificadas em espectrofotômetro NanoDrop Spectrophotometer ND-1000 e a sua qualidade avaliada por eletroforese em gel de agarose 0,8% em tampão TAE 1x, contendo 0,5 µg/mL de brometo de etídio.

4.4. Desenho de *primers* para a amplificação de genes específicos

Primers específicos foram desenhados para a amplificação dos genes de *T. cruzi*, que foram utilizados na expressão heteróloga em *Escherichia coli*. Os genes que expressam as proteínas Tc00.1047053506577.170 (hypothetical protein, conserved), Tc00.1047053508411.30 (hypothetical protein, conserved), Tc00.1047053506479.10 (hypothetical protein, conserved) e Tc00.1047053509427.80 (hypothetical protein, conserved) podem ser acessados no banco de dados TriTrypDB (<http://tritrypdb.org>). A lista dos *primers* utilizados está disponível na Tabela 1. Devido a sua grande extensão, a

proteína Tc00.1047053508411.30 (hypothetical protein, conserved), foi dividida em três fragmentos, denominados Tc30.1, Tc30.2 e Tc30.3

Sítios de restrição foram adicionados na extremidade 5' de cada *primer* para facilitar a transferência dos amplicons entre os vetores de clonagem pGEM[®]-T (Promega) e de expressão pET28a-TEV (CeBiME, Campinas/SP).

Tabela 1: Primers utilizados neste trabalho. O número de identificação (ID) de cada gene no banco de dados de *T. cruzi* (TriTrypDB), assim como o tamanho dos amplicons, a sequência dos primers, as temperaturas de *melting* (Tms) e as enzimas de restrição adicionadas a cada *primer* estão indicadas na tabela. As sequências em vermelho correspondem aos sítios para enzimas de restrição. As regiões sublinhadas representam os códon de terminação. A orientação de anelamento dos primers está indicado pelas letras Fw (direto) e Rv (reverso).

ID do gene (TriTryp DB)	Amplicon	Orientação	Sequência do <i>primer</i>	Tm	Sítio de Restrição
<u>Tc00.1047053506577.170</u>	1383 pb	Fw	GCTAGCATGTCTTTAGAGCCTCGC	55,4°C	NheI
		Rv	GAGCTC <u>TCA</u> ACTCAGAAAAACATTTTG	56,9°C	SacI
<u>Tc00.1047053508411.30</u>	1280pb	Fw	GCTAGCATGAGTCATCAGGCGAAGG	63,2°C	NheI
		Rv	GAGCTC <u>CGGAATCTTCTT</u> CACTCGA	62,4°C	SacI
	975pb	Fw	GCTAGCCACTGACTATGCCGCCTC	61,2°C	NheI
		Rv	GAGCTC <u>TCCTGGTTTGGCGT</u> CCC	68,3°C	SacI
	960pb	Fw	GCTAGCCACTGACTATGCCGCCTC	60,2°C	NheI
		Rv	GAGCTC <u>CTATTGA</u> ACTCGCCGCCG	62,7°C	SacI
<u>Tc00.1047053506479.10</u>	1950 pb	Fw	GCTAGCATGGCGCTTTCCCG	64,4°C	NheI
		Rv	AAGCTT <u>TCATTCCGGTGGT</u> GCTGG	66,7°C	HindIII
<u>Tc00.1047053509427.80</u>	633 pb	Fw	GCTAGCATGGTAATCACGGAAGCACA	61,3°C	NheI
		Rv	AAGCTT <u>TCACCGCCATCGC</u> ACATCTA	64,3°C	HindIII

4.5. Predição de epítomos de célula B

Para averiguar *in silico* a antigenicidade das proteínas selecionadas para a expressão heteróloga, a sua sequência proteica completa foi submetida aos programas BepiPred (<http://www.cbs.dtu.dk/services/BepiPred/>) (Larsen *et al.*, 2006) para a predição de epítomos lineares de célula B, e IUPred (<http://iupred.enzim.hu/>) para a predição de desordem (ausência de estrutura secundária) (Dosztányi, 2005).

4.6. Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Para a amplificação dos genes de interesse foram realizadas reações de PCR com aproximadamente 100 ng de DNA genômico das formas epimastigotas provenientes das cepas CL Brener de *T. cruzi*. Foram utilizados o tampão *Green GoTaq®Reaction Buffer* (Promega) 1x, 200 µM de dNTP; 10 pmol de cada um dos *primers forward* e *reverse* (que foram sintetizados especialmente para esta reação); e 1,25 U de *Platinum Taq Hight fidelity* (Life Technologies), em um volume final de 30 µL de reação. O programa utilizado para a amplificação dos genes por PCR está descrito na Tabela 2.

Tabela 2: Condições de ciclagem da PCR. O programa abaixo foi utilizado para a amplificação dos alvos Tc10, Tc30.1, Tc30.2, Tc30.3, Tc 80 e Tc170.

Passo	Temperatura	Tempo
1	94°C	5 minutos
2	94°C	1 minuto
3	65°C	1 minuto
4	68°C	2 minutos
5	Ir ao passo 2	Repetir 35 vezes
6	68°C	10 minutos
7	4°C	Forever

4.7. Análise do padrão de amplificação dos genes em gel de agarose

Após a amplificação dos insertos por PCR, os amplicons obtidos foram analisados no gel de agarose 1% a 100 V em tampão TAE 1X (4,8g/L Tris-base pH8,0; 1,14mL ácido acético glacial; 2mL EDTA 0,5M) e brometo de etídio (0,3 µg/µL). Para verificar o peso molecular de cada amplicon, foi aplicado na primeira canaleta do gel o padrão molecular GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Fermentas).

4.8. Purificação dos amplicons em gel de agarose

Após serem identificadas no gel de agarose, as bandas de interesse foram removidas do gel, utilizando-se uma lâmina de bisturi. O pedaço do gel excisado foi colocado em tubo de 1,5 ml e submetido a purificação utilizando o kit *PureLink™ Quick Gel Extraction & PCR Purification Combo kit* (Life Technologies) de acordo com as recomendações do fabricante.

4.9. Ligação dos amplicons ao vetor de clonagem pGEM®-T

Os amplicons purificados foram ligados no vetor pGEM®-T (Promega) (Figura 4). Este vetor possui um gene de resistência a ampicilina que permite selecionar as bactérias transformantes, ou seja, que receberam o plasmídeo. Além disso, o pGEM-T possui extremidades *overhangs* 3'-T, que permite a ligação ao vetor de produtos de PCR, aos quais foram adicionados pela DNA polimerase uma desoxiadenosina na extremidade 3', de maneira independente do DNA molde. A ligação dos amplicons ao vetor foi realizada através da incubação por 16 horas à 4 °C, com a enzima T4-DNA ligase (Promega), seguindo as instruções do fabricante.

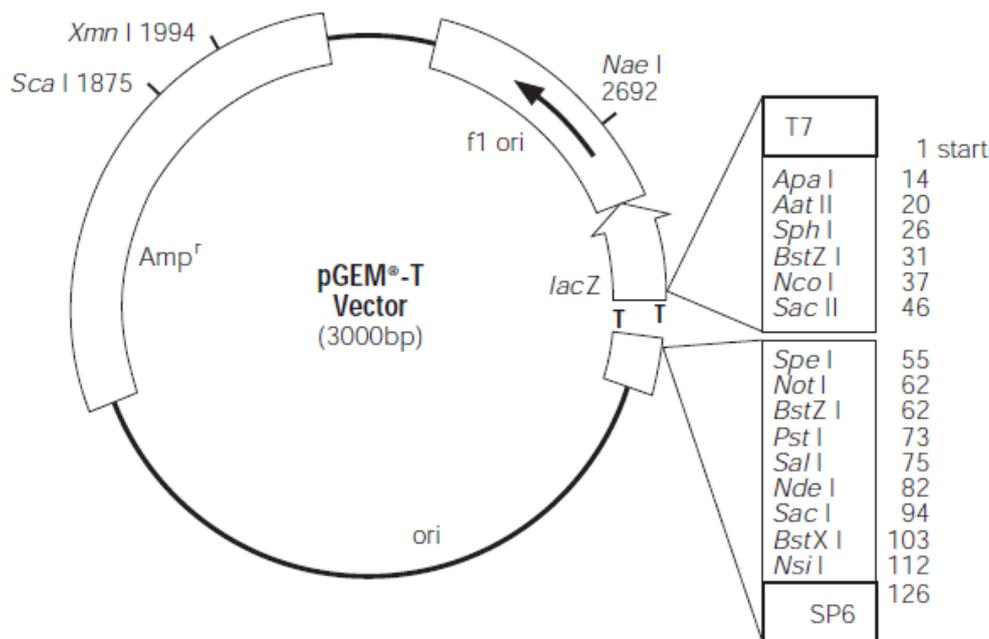


Figura 4: Mapa esquemático do vetor pGEM®-T (Promega). Estão demonstrados no mapa o gene de resistência à ampicilina (Amp^r), a região do sítio múltiplo de clonagem com seus sítios de clivagem por enzimas de restrição e as extremidades *overhangs* 3'-T para ligação ao vetor de produtos de PCR.

4.10. Transformação de bactérias por eletroporação e análise dos transformantes

As células eletrocompetentes de *Escherichia coli* XL1-Blue (Phoneutria) e BL21 Star foram transformadas por eletroporação adicionando-se 2,5 μ L da reação de ligação do inserto ao vetor de clonagem a 50 μ L de células eletrocompetentes em um microtubo. As amostras foram ser transferidas para *Micro Pulser Cuvettes* (Bio-Rad) de 0,1 cm, e submetidas a um pulso (1,8 kV) em um eletroporador *MicroPulser* (Bio-Rad).

Após eletroporar, foram adicionados 300 μ L do meio de cultura 2xYT líquido (1,6% de bacto-triptona, 1% de extrato de levedura, e 0,5% de NaCl, pH 7,4), seguido por incubação durante uma hora a 37 °C em agitação a 180 rpm (rotações por minuto) para permitir a expressão do gene de resistência ao antibiótico presente nos vetores. As amostras foram plaqueadas em placas de Petri contendo meio de cultura sólido 2xYT-ágar 1,5% com ampicilina (100 μ g/mL) para a transformação de bactérias com o vetor pGEM®-T (Promega). Para transformação de bactérias realizadas com o vetor pET28a-TEV o antibiótico utilizado foi a kanamicina (50 μ g/mL).

As placas ficaram incubadas na estufa por um período entre 12 a 16 horas para o crescimento de colônias isoladas. Após o período de incubação foram realizadas reações de PCR de colônia para a confirmação da clonagem. Para o vetor pGEM®-T, o *primer* utilizado foi o M13, enquanto para o vetor pET28a-TEV, o *primer* utilizado foi o T7. A análise e validação da clonagem foram realizadas por eletroforese em gel de agarose 1%.

4.11. Obtenção dos plasmídeos recombinantes

Os clones considerados positivos após a eletroforese foram inoculados em 5 ml de meios líquido 2xYT com o antibiótico específico para cada vetor. O inóculo permaneceu incubado no período entre 12 a 16 horas no shaker à 37 °C sob agitação de 180 rpm. Após o crescimento, as bactérias foram aliqüotadas em glicerol 40% e armazenadas a -80 °C. A extração dos DNA plasmidial foi realizada utilizando o kit *PureLink Quick Plasmid Miniprep Kit* (Life Technologies), de acordo com as recomendações do fabricante.

4.12. Digestão dos vetores de clonagem com enzimas de restrição

Os plasmídeos pGEM®-T contendo os insertos foram submetidos a dupla digestão com as enzimas de restrição específicas para cada amplicon, seguindo o programa padronizado: 12 horas à 37 °C, para a digestão com as endonucleases, 65 °C para inativação das enzimas e 4 °C para interromper a inativação e manter as amostras em condições ideais. Após a digestão, as amostras foram submetidas à análise por eletroforese em gel de agarose 1%.

4.13. Ligação ao vetor de expressão pET28a-TEV

O vetor de expressão pET28a-TEV, produzido pelo Centro de Biologia Molecular e Estrutural (CeBiME) em Campinas (SP), possui um gene que confere resistência à kanamicina, tornando-se possível selecionar quais colônias positivas foram transformadas. Além disso, este vetor possui uma região denominada de HIS-tag, que

consiste em seis repetições da trinca de nucleotídeos “CAT”, que codifica para o aminoácido histidina. Desta maneira, o vetor soma à proteína recombinante expressa, uma cauda de 6 resíduos de histidina, denominada His-tag, que será posteriormente utilizada para a purificação por afinidade da proteína recombinante (Figura 5).

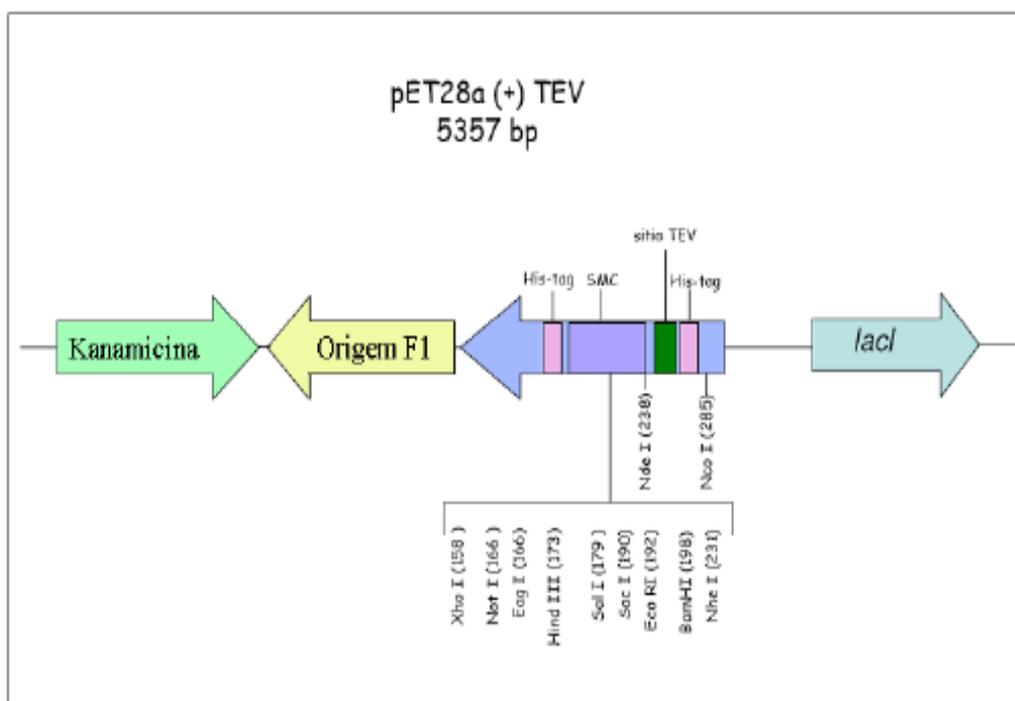


Figura 5: Mapa esquemático do vetor pET28a-TEV. Estão demonstrados no mapa o gene de resistência à kanamicina e a região do sítio múltiplo de clonagem (SMC) com seus sítios de clivagem por enzimas de restrição.

As extremidades coesivas provenientes da digestão com as enzimas de restrição, permitiu a ligação entre os fragmentos obtidos do pGEM-T fossem agora ligados ao vetor de expressão pET28a-TEV, previamente digerido com as mesmas enzimas de restrição. Esta ligação ocorreu através da incubação por 4 °C por 16 horas utilizando-se a enzima T4 DNA Ligase (Promega) em um tampão específico (Tris-HCl 30mM (pH 7,8 a 25 °C), MgCl₂ 10 mM, DTT 10 mM e ATP 10 mM). Após ser incubado, a ligação foi transformada por eletroporação em bactérias da linhagem BL-21Star.

Para a confirmação de colônias positivamente transformadas, foi realizado um teste de PCR, o qual foi avaliado em gel de agarose 1,5%, corado com brometo de etídio.

4.14. Sequenciamento das amostras clonadas em pET28a-TEV

Os clones que se mostrarem positivos no resultado da PCR foram sequenciados pela empresa MacroGen (Coréia do Sul), pelo sequenciador *ABI Prism®3730xl DNA Analyser* (Applied Biosystems). Utilizou-se o *primer T7 Forward* e *T7 Reverse* para a montagem da reação. As sequências fornecidas foram processadas pelo Sequence Scanner v1.0 para a retirada de sequências de baixa qualidade e sequência do vetor. Em seguida as sequências foram analisadas para pesquisa de homologia pelo programa BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) contra o banco de dados “*Nucleotide collection (nr/nt)*” do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*), para identificação dos genes clonados.

4.15. Indução da expressão das proteínas recombinantes

Foram inoculadas em 3 ml de meio 2xYT com kanamicina (50 µg/mL) as colônias positivas isoladas de BL-21Star contendo o plasmídeo pET28a-TEV e o inserto de interesse. Os inóculos foram incubados no shaker à 37 °C sob agitação de 180 rpm. Após este período, os inóculos foram diluídos 1:20 em 10 ml do meio 2xYT/kanamicina (50µg/mL) e incubados a 37 °C a 180 rpm até atingirem DO600 (densidade óptica) de 0,6. A expressão das proteínas recombinantes foi induzida através da adição de 1 mM IPTG (Life Technologies), sendo a cultura, incubada por 3 horas a 37 °C a 180 rpm. Após a indução com IPTG, a cultura foi centrifugada a 3000 rpm, por 30 minutos a 4 °C em centrífuga Eppendorf 5804R para a precipitação das bactérias. O conteúdo centrifugado foi congelado em nitrogênio líquido e armazenada a -80 °C.

4.16. Lise das bactérias e teste de solubilidade das proteínas recombinantes

Os sedimentos celulares que estavam mantidos no freezer -80 °C foram previamente descongelados no gelo e imediatamente resuspendidos em 4,95 mL de PBS (NaCl 137 mM; KCl 2,7 mM; Na₂HPO₄ 10 mM; KH₂PO₄ 1,8 mM; pH 7,4) para cada 50 mL de cultura, na presença de Lisozima (100 µg/mL). As amostras, após a homogeneização foram incubadas no gelo por 30 minutos para a ação da lisozima. Após o tempo de incubação, as alíquotas foram submetidas a cinco ciclos de congelamento no nitrogênio líquido e descongelamento no banho-maria a 37 °C. Posteriormente, as amostras foram passadas exaustivamente em seringas de insulina (1mL/cc,261/2 G, 13x0,45) para fragmentação de seu DNA genômico. Em seguida, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 14.000 rpm (Eppendorf 5804R) e tiveram suas frações separadas. É considerada uma proteína solúvel, aquela que está localizada no sobrenadante e proteína insolúvel, aquela proteína que se encontra presente no pellet.

Após a separação das frações proteicas contidas no pellet e sobrenadante, realizou-se uma análise em eletroforese gel de poliacrilamida-SDS para a avaliação da solubilidade da proteína recombinante. Uma vez que a proteína considerada insolúvel no teste de solubilidade, adicionou-se ao tampão de ressuspensão 8 M de uréia para torná-la solúvel e viável para a purificação.

4.17. Eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS

O gel de poliacrilamida-SDS permitiu a visualização das proteínas, através da separação por eletroforese, para verificar se houve ou não expressão. A sua preparação é feita em dois passos utilizando-se géis de diferentes concentrações. O gel de separação 12,5% foi preparado utilizando Tris-HCl 1,5 M pH 8,8 e SDS 0,01%; persulfato de amônio 0,5 v/v e TEMED 0,05 v/v. Após a polimerização do gel de separação, foi preparado o gel de concentração, utilizando-se o tampão Tris-HCl 0,5 M pH 6,8. As amostras obtidas na indução e no teste de solubilidade foram adicionadas tampão de amostra (SDS 10%; Tris-HCl 0,5 mM pH 6,8; azul de Bromofenol 1%; 2-β-mercaptoetanol 5%; glicerol 10%), fervidas durante 10 minutos para desnaturação das proteínas e aplicadas no gel para separação por eletroforese. A técnica foi realizada em tampão de corrida Tris-HCl 25 mM; glicina 192 mM; SDS 0,1% e pH 8,3; à voltagem

constante de 200 V. Após a corrida, os géis foram corados por incubação por 2-16 horas com a solução de Coomassie Blue (Coomassie Brilliant Blue G-250 0,25%; metanol 50%; ácido acético 10%), e então, foram descorados em solução contendo metanol 30% e ácido acético 10%.

4.18. Purificação de proteína recombinante por cromatografia de afinidade

A purificação da proteína recombinante foi realizada por cromatografia de afinidade, utilizando a coluna HisTrap HP de 5 mL (GE Healthcare), no sistema ÄKTAprime plus (GE Healthcare). A coluna HisTrap possui em seu interior uma matriz de níquel-sefarose, que se baseiam em esferas de agarose contendo em sua superfície íons Ni^{+2} imobilizados. A proteína recombinante expressa no vetor pET28a-TEV apresenta uma cauda de histidina em sua região N-terminal, isto só é possível devido as seis repetições da trinca de nucleotídeos “CAT”, que codifica para o aminoácido histidina no vetor. O aminoácido histidina possui uma grande afinidade pelo íons Ni^{+2} , ficando a proteína que possui a cauda de histidina retida por afinidade na coluna durante a purificação.

O extrato proteico do lisado bacteriano contendo a proteína recombinante foi aplicado na coluna HisTrap HP de 5 ml (GE Healthcare) para a adesão da proteína recombinante. Para eliminar proteínas endógenas da bactéria, a coluna foi previamente lavada com 10 volumes da coluna de tampão A (fosfato de sódio 20 mM; NaCl 500 mM; imidazol 30 mM). A eluição da proteína recombinantes foi realizada através do gradiente crescente de tampão B (fosfato de sódio 20 mM; NaCl 500 mM; imidazol 500 mM), partindo de 0% de concentração e atingindo 100% em 10 mL de corrida. O imidazol compete com a cauda de histidina pela ligação ao níquel na coluna, liberando a proteína recombinante da matriz e permitindo sua obtenção na fração eluída. Todas as frações obtidas foram analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS.

4.19. Soroteca de pacientes chagásicos e com leishmaniose

Foram utilizadas neste trabalho uma soroteca de pacientes infectados com *T. cruzi*, cedida pela Professora Lucia Maria da Cunha Galvão do Centro de Ciências da

Saúde/UFRN, e consiste em 9 soros de pacientes chagásicos, tipados, infectados com parasitos do grupo TcII, e 10 soros de indivíduos não infectados.

A segunda soroteca é composta de 39 amostras de pacientes com leishmaniose visceral, infectados por *Leishmania infantum*, provenientes de Montes Claros, Minas Gerais, que foram cedidas pelo Professor Ricardo Toshio Fujiwara do Departamento de Parasitologia/UFMG. Estes soros foram utilizados para averiguar a ocorrência de reação cruzada da proteína recombinante com os soros de pacientes com leishmaniose.

4.20. ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*)

Foram realizados ensaios de ELISA utilizando a proteína Tc170 recombinante sintetizada. Placas de ELISA Half Área (Greiner-Bio-One) foram sensibilizadas por 12-16 horas a 37°C com diferentes quantidades de antígeno, variando de 0,125 a 2 µg/well, diluídos em 25 µL de água Milli-Q autoclavada. Após a sensibilização, a placa foi bloqueada com 150 µL de PBS acrescido de 5% de BSA durante 1 hora a 37 °C. Após o bloqueio, toda a solução dos poços foi removida por aspiração. A seguir, 50 µL dos soros diluídos 1:100 a 1/800 em PBS com BSA 2,5% foram adicionados aos poços e incubados a 37 °C por 1 hora. As placas foram lavadas 4 vezes com a solução de lavagem (PBS-0,05% Tween20) e 50 µL do anticorpo anti-IgG humano diluído 1:2.000 em PBS-BSA 2,5% foi adicionado. Após a incubação a 37 °C por 1 hora, as placas foram novamente lavadas por quatro vezes com a solução de lavagem, e 100 µL da solução reveladora, contendo ácido cítrico 0,1 M, Na₂PO₄ 0,2 M, OPD 0,05% (SIGMA) e H₂O₂ 0,1% foram adicionados. As placas foram incubadas a 37 °C ao abrigo de luz por 15 minutos com a solução reveladora, quando a reação foi interrompida pela adição de 50 µL de H₂SO₄. A absorbância resultante foi lida em leitor de ELISA (Biotek) a 492 nm. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

4.21. Análise Estatística

As análises estatísticas foram realizadas com a utilização do *software* Prism 5.0 e o Microsoft Excel 2007. Para cada triplicata de cada soro utilizado em todos os

experimentos de ELISA, foram calculados os valores das médias, dos desvios padrão e erros padrão.

O cálculo da sensibilidade e especificidade da proteína recombinante foi feito da seguinte forma:

Sensibilidade: Define-se como a fração dos resultados positivos no teste entre aqueles que possuem a doença, é calculada através da expressão: $S = VP / VP + FN$, onde S é a sensibilidade, VP (Valor positivo) corresponde ao número de soros de pacientes infectados com *T. cruzi* que apresentaram valor de absorbância acima do *cutoff* determinado para a proteína recombinante, e FN (Falso Negativo) corresponde ao número de soros de pacientes infectados com *T. cruzi* que apresentaram reatividade abaixo do *cutoff* determinado para o antígeno.

Especificidade: Define-se como a fração dos soros não infectados com *T. cruzi* que obtiveram resposta negativa no teste, é calculada através da expressão: $E = VN / VN + FP$, onde E é a especificidade, VN (Valor Negativo) corresponde ao número de soros de indivíduos não infectados com *T. cruzi* que não possuem reatividade acima do *cutoff* e FP (Falso Positivo) corresponde ao número de soros de indivíduos não infectados com *T. cruzi* que se encontraram acima do valor de *cutoff*.

O valor de *cutoff* definido neste trabalho corresponde a média dos resultados dos indivíduos não infectados com *T. cruzi* acrescida de 3 desvios padrões destes mesmos resultados.

5. Resultados

5.1. Seleção das proteínas para expressão heteróloga

Para a seleção de proteínas de *T. cruzi* com potencial uso no diagnóstico sorológico da doença de Chagas, o nosso grupo previamente selecionou peptídeos possivelmente conservados entre as diferentes linhagens deste parasito, através de análises *in silico* do proteoma predito da cepa CL Brener. Os critérios para a seleção dos peptídeos foram que eles não estivessem presentes no proteoma predito de espécies do gênero *Leishmania* e que apresentassem um alto *score* de predição de epitopo de célula B pelo programa BepiPred (LARSEN; LUND; NIELSEN, 2006). Este algoritmo prediz a probabilidade de cada aminoácido de uma sequência ser um epitopo de célula B e atribui um *score* a este resultado. Os 450 peptídeos com maior *score* de BepiPred foram triados por *immunoblotting* com o soro de camundongos C57BL/6 cronicamente infectados com as cepas Colombiana (TcI), Y (TcII) e CL Brener (TcVI) de *T. cruzi*, tendo como controle negativos camundongos infectados com *T. rangeli* ou não infectados (REIS-CUNHA et al., 2014). Para esta dissertação de mestrado, foram selecionadas três proteínas que continha peptídeos que apresentaram uma alta reatividade no experimento de *immunoblotting*: Tc00.1047053506479.10 (*hypothetical protein, conserved*), Tc00.1047053508411.30 (*hypothetical protein conserved*) e Tc00.1047053506577.170 (*hypothetical protein, conserved*).

Uma outra proteína que também foi utilizada neste trabalho foi a Tc00.1047053509427.80 (*hypothetical protein, conserved*) por apresentar uma sequência peptídica (PepMAF) que mimetiza o carboidrato antigênico α -gal, (MERCHANT et al., 1998) (APOSTOLOPOULOS; SANDRIN; MCKENZIE, 1999) um epitopo abundantemente presente em proteínas de superfície das formas tripomastigotas de *T. cruzi* (SOUTO-PADRON et al., 1994). O epitopo α -gal (Gal α 1-3Gal β 1-(3)4GlcNAc-R) é sintetizado em glicolipídeos e glicoproteínas de mamíferos não-primatas e macacos do Novo Mundo pela enzima α -1,3-galactosiltransferase (α -1,3-GT). Em humanos e macacos do Velho Mundo, este epitopo está ausente porque o gene de α -1,3-GT está inativado nos primatas ancestrais do Velho Mundo (COIRAS et al., 2008). Em vez disso, os humanos e macacos do Velho Mundo produzem o anticorpo anti-gal, que interage especificamente com epitopos α -gal e constitui 1% de imunoglobulinas circulantes (GALILI, 2005).

5.2. Predição de epítomos de células B nas proteínas selecionadas

Após a seleção das proteínas que seriam expressas de forma recombinante em bactéria, foi realizada a determinação *in silico* de sua antigenicidade. Para isso, a sequência completa de cada proteína selecionada foi submetida ao programa BepiPred, para a predição de epítomos lineares de célula B. Como pode ser observado na Figura 6, todas as proteínas apresentaram diversos epítomos lineares de célula B.

(a) Tc10

MGAFPSHDTPELFYTTFVPRPSTETQVEVCLVPLLPRFNDTHKKAKRKLNDILSRRGND
1,019 1,145 0,587

PPPAAATPSGTTTPGSATASANSRRTETTSGGPIVDCIIASNDPFFLVKVKDAIISSDAL
1,827

LGNKPHIKKKLTPDLPSASAAGSATEMNTSHHHQQQSTSHSSPVPLLRPVPPFAVCILD
1,052

INPSNESSATSKSHSHLNRAQONIAANSGNVLI IKGHLQIVGFISCCGRPVHLINPA
1,364 0,636

TFTKTQALGGGGSSAYSSHTGIGDSKKPSIPVLDVIFDDVEAHGYLTESVLLASLAFR
1,089

KQFVNSSALYPAEDRDVEASFDYMERLQLRIILQHNNYRELRFYSQYALLDMIKELR
0,887

MHETAPPHFSMYENHLGEYGLEVTFSNKFLGLWLRIVENKMRVDSVKGQHIRCNTIDFLQ
0,749

ERQRLMQERHDSGAFLEEEEDERLYGGSLLASTLKQWLLKGSQSALQQAQLAAAQQMI
0,799

MPPTSGTATTAANFWSHMPMTFMGAPPGWPTNVMPFNAAATS I PLMPGQQQQFMFPGSR
1,215 1,110 0,608

PQLQYASPQTTLPGASPFSSPPGLHVLS PATSSYGVAARGVPPQQILYVLPGGPIAQSS
1,090 0,828

AMPHAPTATAAYPPGAAPPMYFAQPPTYGVPYSSYMFSQPPATAPAPPE
1,270 1,927

(b) Tc30

MSHQAKELFRVNV SRGSAADNPSTASVTAHSSFKGGSTSPWSSPLAAGSETQGNLAEKTL
1,325 1,142

PRTPSGATLLHESQRQEKDQONHHHQPNVRTAPNSSVLSLRFESPSFVMFRPHTPPRI
1,151

RPTSELPPTRDATSVLRGMPTVLKASDDTLHDVPPARPPQAPAQPRGLDALHTIDTSTHET
1,338 1,312

RAASQAAMPVSSTVAVMGEEKTVRSNICRVCSLCGISVILVGTVEHQQQWNEHVDSWAH
0,846 0,682

QRNVQLRALARRDDFISMES TDVASSPPLSQGMIRTLGDISASPVLLQKEEASAMAI SPL
1,253

RAIFFPHR ADGIQADEDIFSPHEKRRGNVSPTAAPSHVFKELFDEENLAATPDAKSNEED
0,984 1,341

HVDICRKEERPDALWKVGSRRRRKAMLRD KRGGESSRLAERTSEVVSVNERGLSRVKKIP
0,778 0,982

HTDYAASSEHSGSASPRRERQLECTLAKFLIQEGRQLLACFRRWFNFVLRMMSDSSLL
1,137

IRAS SKRGPAAADLVEEAFS AVSAKPKCGEESLLHSSAVTLE EKREDAALPAAPSHIEND
1,068 0,847

QOREDQMLNKTATGDGEREGPFMASRVKDEFAHF IG SSSSSSVEMEMARTDVSWYVHRTVR
1,052 0,784

PLHRGSGGGSGEGLRTPPWESDTSIEEMLSTLTPALQERVRAVL SGEPERSRAFPKTSEA
1,430 1,054

LNIIRYP SLGPNLSPGGPRVLDTDGNHSISSSFMAHV TRSGSGDVMQGI IDPQKSSSS
1,133 1,862

FSTHAGPIGRRPTGGDAKPGNQEVPILMDVEAL LNFPSPAELSGMPPLRQEEPLGRLSGE
1,473 1,014

TAPVEVRDSPSHLRRQK SLEGYQKASSEEKPSPPSKICDFI GQDGDEKTDSAPHASFF
1,705

SQPSVPRQRGEQEGSPSWRQAWREE LDVGKDGANEFEKGIPGEYYCYNDAYHRVLD PT
1,341 0,999

CEEYDARGRRLPIFFVRRSTRTRAFSTRRLIAT TRPKSPLGPGRLNPYCSVCVARYFLI
0,646 1,237

FVDEYMRPI TVTPRRQRGASGGNGEAHTCACPGRSARSSPSRGMRDAFTRKK ALQSPRRT
1,160

SSWERQDSSFPSPLPHSFPLAM KSDSTGATTSGHASASPKLVSAA QLGDSKAPETSQDPV
1,122 1,151 1,686

PEENKRLRRLERDLRRRVKSLWREL PQCRGSQQWVDYLTSLKEVLQMLEALRSAASVQ
0,639

(c) Tc80

MVITEAHWESQWNMNDMWTRGFERLKKSSLLFYFLQEYLMGNKYQCFNADILWFAAAG

AAVQSRVSAVLFFLHFPCTSAVCFRVYSHVFPFVASFAYMQAHAHDAQNIALSMDDRQ

SFLCWFSSAAFFCGH EEERDTGRGSTAFPSFCVQRTACSMIALKSST ARHIDAARGERRF
1,369 0,473

FSAVGARDCAFARELALLRVCVSSVDVRWR

(d) Tc170

MSLEPRLYHVEQQIQHLSKQVGLLKQLITTEVTDLRKNMEQQVAEVKQVVMYQDRLYQER
MSKLEVRIQQQLSEFCLHLARS TGHVS PSVALIPTGM VAAPAEVRTLEQFT ASETINRRTP
0,789 0,508
DGDENEENQNEEMKD VNGIIETIQDRINTIYDFYTVSTIDIFHPTMTLSHF SRMVKDCQ
1,509
LCGLSQGTSTELLWMAVMRSLNKRHHKQLDNVQNRGITLGN QVSTEQ RKKLFAFQRLEAI
0,817
PKEWFG EALYILAMEKRRLRLLPDGSTIIDTV SSLDEKPK DIFLSFLLYHIFPYVDA AIE
0,874
EKQRS QGLVFHLGLGI NGEDNSGF FSTVSNLIQSYKTD AVASVVK EFIGRIKESY NSAIR
0,745 0,900
TAQGY HSTMMNLDGFVEVARRHLLLPLIHKPDLRHIFLYCCA VE KEKHPETEEGNI SVGT
0,451 1,422
FLLALYQLADRIYGDSL MRKK FPTPEAR MKRLLAKMFFLS
0,926

Figura 6: Predição de epitopos lineares de célula B das proteínas recombinantes, utilizando o programa BepiPred. Em (A) está representada a sequência de aminoácidos da proteína Tc10; em (B), da proteína Tc30; em (C) Tc80; e (D) Tc170. Os resíduos de aminoácidos que constituem os epitopos de células B estão sublinhados e indicados em azul. Abaixo de cada epitopo está a média do seu valor de *score*. A média foi calculada baseada no valor de *score* de cada resíduo de aminoácido ser um epitopo de célula B. Quanto maior o valor do *score* maior a confiabilidade do epitopo predito.

5.3. Amplificação e clonagem dos genes de *T. cruzi* para expressão heteróloga das proteínas recombinantes

Após a seleção das proteínas-alvos para serem expressas de forma recombinante em *E. coli*, foram desenhados *primers* para amplificação da região codificadora desses genes, desde o ATG inicial até o seu códon de terminação, com exceção da proteína Tc30 que possui 3420 pb de tamanho. Para este alvo, a amplificação e clonagem só foi possível a partir do desenho de *primers* intermediários, capazes de fragmentar este alvo em três partes, que posteriormente receberam os nomes de Tc30.1, Tc30.2 e Tc30.3. Foram também adicionados às extremidades 5' dos *primers* os sítios de restrição para as enzimas *NheI* (*primer forward*) e *SacI* ou *HindIII* (*primer*

reverse) para facilitar a transferência dos amplicons entre os vetores de clonagem, pGEM-T (Promega), e de expressão, pET28a-TEV (CeBiME, Campinas/SP).

Para a amplificação por PCR, foi utilizada a enzima *Platinum Taq High Fidelity* (Life Technologies) e o DNA genômico do clone CL Brener de *T. cruzi*, como molde. Após a separação eletroforética em gel de agarose, foi observado que todas as amplificações dos genes, que codificam para as proteínas-alvos, apresentaram bandas de tamanho esperado, condizente com o banco de dados (Figura 7).

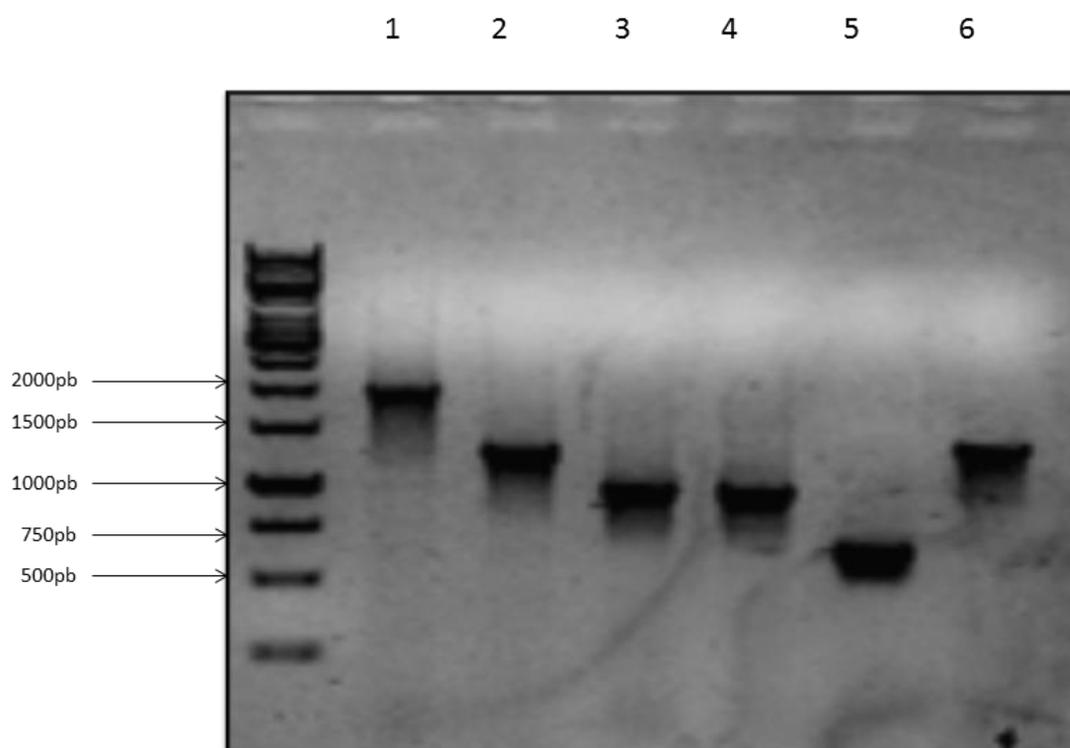
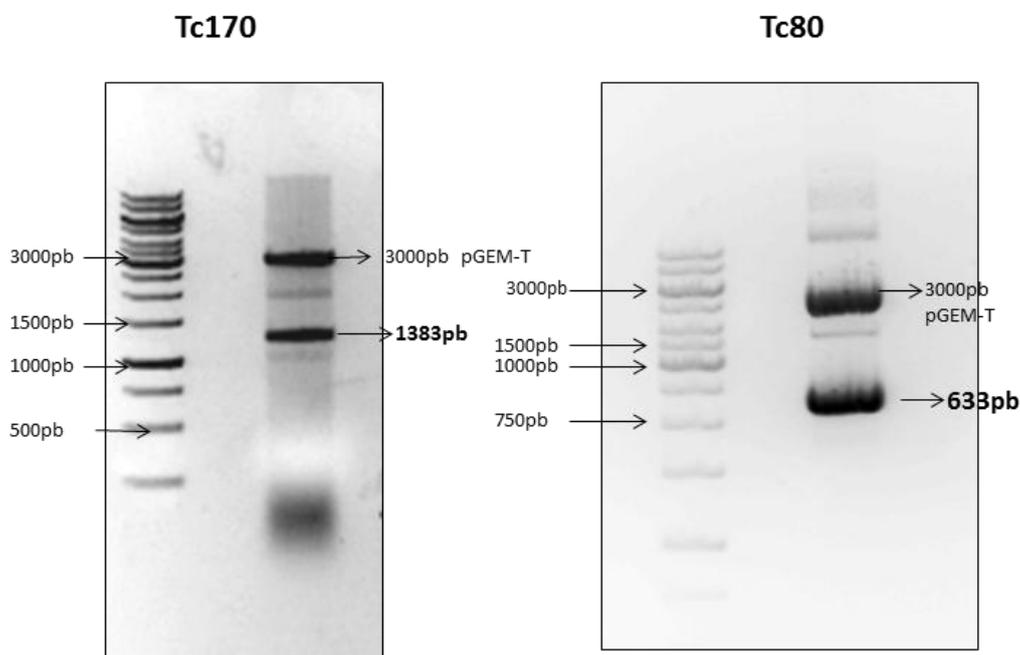


Figura 7: Análise eletroforética em gel de agarose 1% dos produtos de amplificação dos genes que codificam as proteínas-alvos. As bandas de tamanho esperado foram amplificadas por PCR, utilizando *primers* específicos para cada alvo. Em (1) Tc10 (1950pb), (2) Tc30.1 (1280pb), (3) Tc30.2 (975pb), (4) Tc30.3 (960pb), (5) Tc 80 (633 pb) e (6) Tc 170 (1383 pb). O padrão de peso molecular está indicado à esquerda.

Após a amplificação, esses genes foram purificados do gel de agarose,

clonados no vetor pGEM-T (Promega) e utilizados na transformação de *E. coli* XL1-Blue. Após seleção das bactérias transformantes e extração do DNA plasmidial, os plasmídeos contendo os insertos de Tc10 e Tc80 foram digeridos com as enzimas de restrição *NheI* e *HindIII*, enquanto os plasmídeos contendo Tc30.1, Tc30.2, Tc30.3 e Tc170 foram clivados com as enzimas *NheI* e *SacI*, para a liberação dos insertos com as extremidades coesivas de cada enzima (Figura 8).

Em seguida, as bandas correspondentes a estes insertos foram purificadas a partir do gel de agarose e subclonadas no vetor para expressão em *E. coli*, pET28a-TEV (CeBiME, Campinas/SP), que possibilita a expressão de proteínas contendo uma cauda de histidina na porção N-terminal. Estes plasmídeos foram utilizados na transformação de *E. coli* BL-21 Star, que é uma cepa específica para a expressão heteróloga. A clonagem foi confirmada por PCR de colônia e sequenciamento, utilizando *primers* específicos para o vetor.



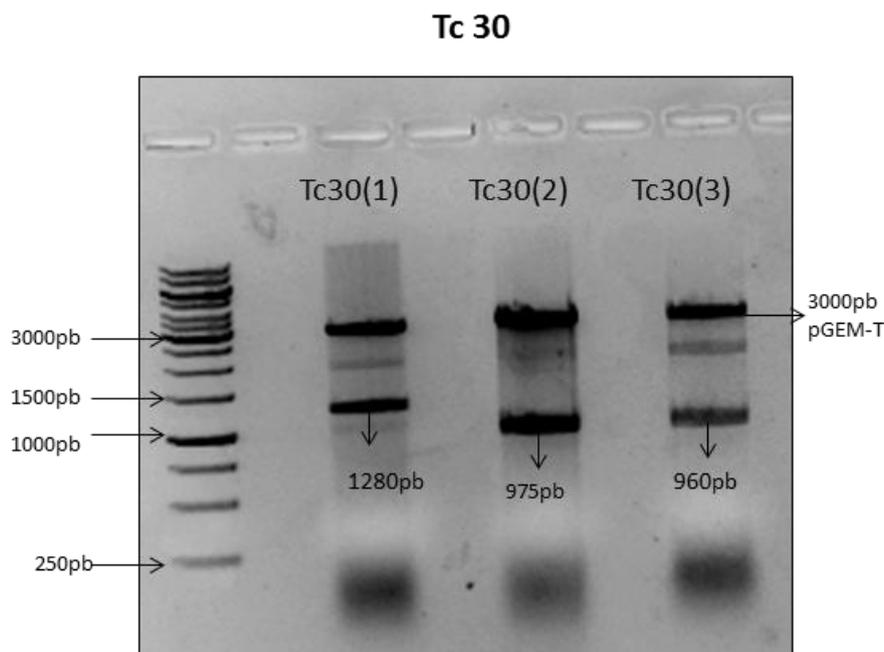


Figura 8: Clivagem do plasmídeo pGEM-T contendo os insertos de interesse para subclonagem no vetor de expressão pET-28a-TEV. As bandas resultantes das digestões do vetor pGEM-T contendo os genes de *T. cruzi*: Tc80, com as enzimas *NheI* e *HindIII*, e Tc30.1, Tc30.2, Tc30.3 e Tc170, com as enzimas *NheI* e *SacI*, podem ser visualizadas em gel de agarose 1%. A banda de 3000 pb presente em todas as canaletas corresponde ao vetor pGEM-T linearizado, enquanto as bandas de 1383pb, 633pb, 1280pb, 975pb e 960pb correspondem, respectivamente, aos genes que codificam para Tc170, Tc80, Tc30(1), Tc30(2) e Tc 30(3).

5.4. Expressão heteróloga de proteínas recombinantes em *E. coli*

As células competentes de *E. coli*, linhagem BL-21 Star, foram transformadas com o plasmídeo pET28a-TEV, contendo os genes de interesse, e a indução da expressão das proteínas recombinantes foi realizada pela adição de IPTG. A indução do promotor T7, que controla a expressão de genes clonados no vetor pET28a-TEV, é realizada pelo IPTG ao se ligar no repressor *lac*, sintetizado a partir do gene *lacI*.

Foram coletadas frações da cultura imediatamente antes e logo após 3 horas ou 16 horas da adição de IPTG para averiguar a ocorrência da expressão. As alíquotas de extratos proteicos das culturas de bactérias expressando as proteínas recombinantes

foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) 12,5%. Os tamanhos esperados para as proteínas recombinantes foram obtidos através da predição, utilizando o programa *ProtParam tool* (<http://web.expasy.org/protparam/>), do *SIB - Swiss Institute of Bioinformatics* (Tabela 3).

Tabela 3: Tamanho predito das proteínas recombinantes em kDa e o número de aminoácidos.

Proteína Recombinante	Peso predito em kDa	Número de aminoácidos
Tc10	70,665	649
Tc30.1	46,024	1280
Tc30.2	34,251	975
Tc30.3	36,259	960
Tc80	24,560	210
Tc170	52,933	460

Após coloração dos géis de poliacrilamida com *Coomassie Blue*, pode ser observada a banda de indução da proteína Tc170, após 3 h da adição do IPTG (Figura 9). Neste mesmo gel, foi também testada a expressão da proteína Tc10. No entanto, diferentemente de Tc170, não foi observada expressão da proteína Tc10 após 3 horas ou 16 horas da adição do IPTG. O mesmo foi observado para a proteína Tc80 e para os três fragmentos da proteína Tc30. Portanto, novos experimentos, variando as condições de indução, como tempo e temperatura, além do sistema de expressão, são necessários para a obtenção dessas proteínas recombinantes.

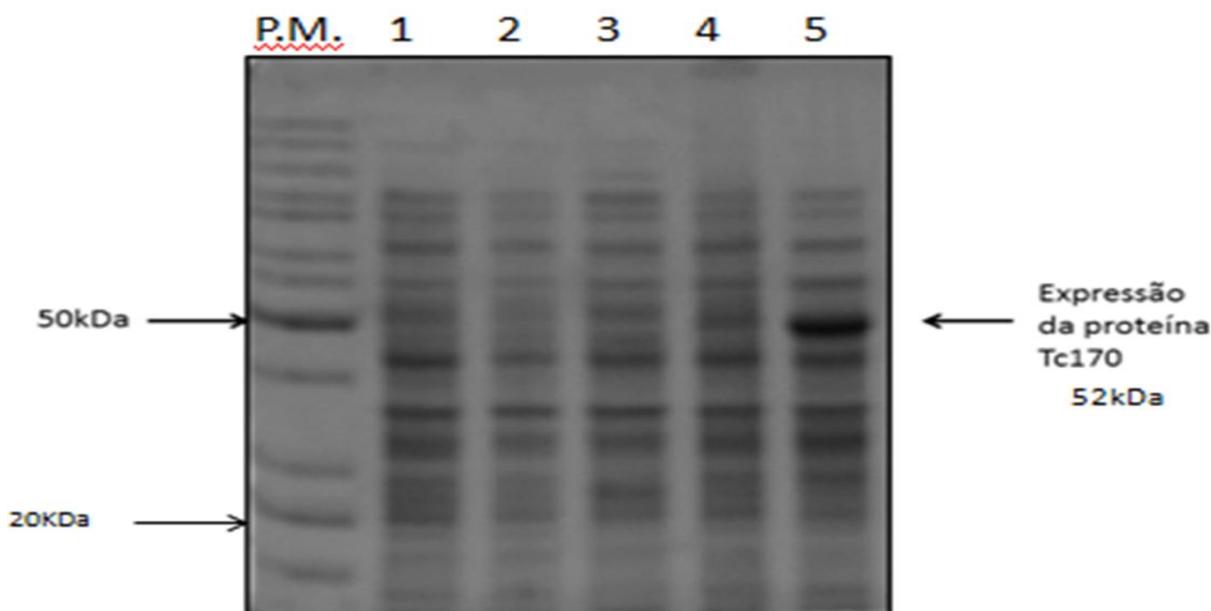


Figura 9: SDS-PAGE das expressões das proteínas recombinantes Tc10 e Tc170.

Os extratos bacterianos, contendo o plasmídeo pET28a-TEV com genes Tc10 e Tc170, antes (0 h) e após (3 h ou 16 h) a indução com IPTG, foram submetidos a análise eletroforética em géis de poliacrilamida 12,5%, sob condições desnaturantes, e corados com *Coomassie Blue*. Foi observada apenas a banda de indução da proteína Tc170 de aproximadamente 53 kDa. No entanto, não foi observada a expressão da proteína Tc10 nos tempos 3 h ou 16 h. O padrão de peso molecular está indicado à esquerda. A seta indica a banda de indução nos géis. (1) Tc10, zero hora, (2) Tc10 3 horas, (3) Tc10, zero hora, (4) Tc10, 16 horas – over-nigth, (5) Tc170, zero hora, (6) Tc170, 3 horas.

Após a expressão, as bactérias foram lisadas por choque térmico, as frações solúveis e insolúveis do lisado foram separadas por centrifugação e analisadas em gel de poliacrilamida 12,5% para verificar em qual fração a proteína recombinante Tc170 estava presente. De acordo com a Figura 10, a proteína Tc170 encontra-se no pellet, sendo esta, portanto, insolúvel. Para solubilizar a proteína e, posteriormente, utilizá-la na purificação por cromatografia de afinidade foi necessário ressuspende-la em tampão com 8 M de uréia.

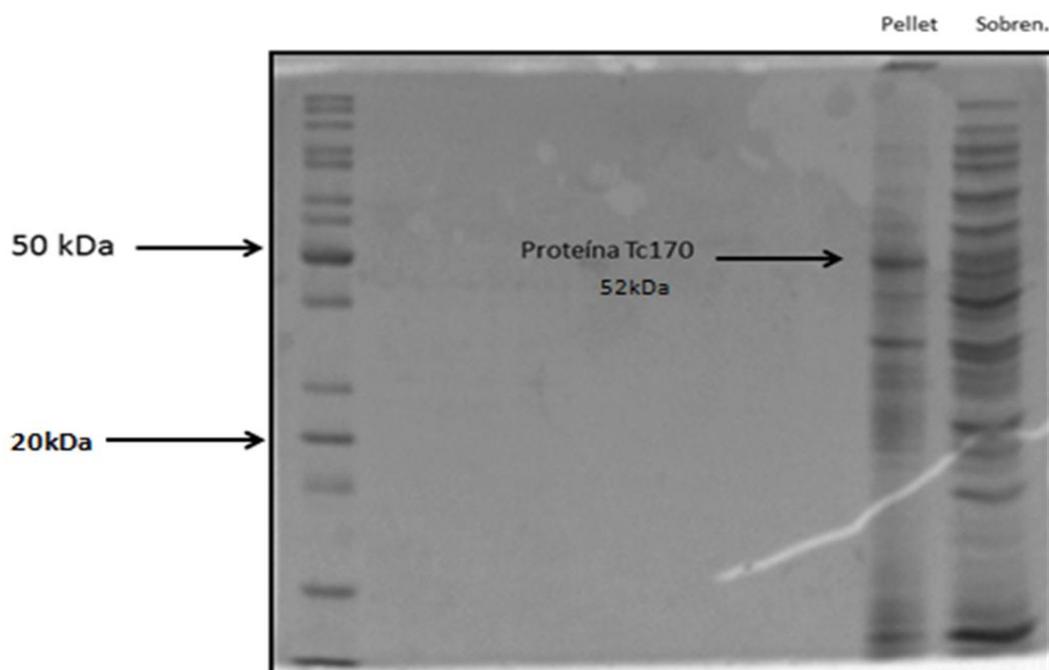


Figura 10: Avaliação da solubilidade da proteína Tc170 após indução em bactéria.

A cultura de bactéria expressando a proteína recombinante Tc170 foi lisada e a fração solúvel (sobrenadante) e insolúvel (pellet) foram analisadas por SDS-PAGE 12,5%, corados com *Coomassie Blue*. O padrão de peso molecular está indicado à esquerda. A seta indica a banda da proteína Tc170 no gel.

5.5. Purificação da proteína recombinante Tc170

A fração solúvel do lisado bacteriano que, após o tratamento de 8 M de uréia, continha a proteína recombinante Tc170 foi submetida a purificação por cromatografia de afinidade em coluna HisTrap HP de 5 mL (GE Healthcare Life Sciences) no aparelho ÄKTA Prime Plus (GE Healthcare).

A coluna HisTrap HP apresenta em seu interior uma matriz de níquel-sefarose, que consiste em espirais de agarose recobertas com o íon bivalente Ni^{2+} . A expressão de proteínas no vetor pET28a-TEV adiciona a extremidade N-terminal da proteína seis resíduos de histidina, um aminoácido que apresenta grande afinidade por íons bivalentes. Quando o lisado bacteriano atravessa a matriz da coluna HisTrap HP, as proteínas recombinantes que contêm cauda de histidina ficam retidas na coluna, enquanto as proteínas endógenas da bactéria são lavadas e descartadas. Para a eluição das proteínas recombinantes, foi utilizado um tampão contendo 500 mM de imidazol,

um sal que interage fortemente com o níquel, e, portanto compete com a proteína recombinante pela ligação a este íon bivalente, liberando-a da coluna (Figura 11).

Tc170

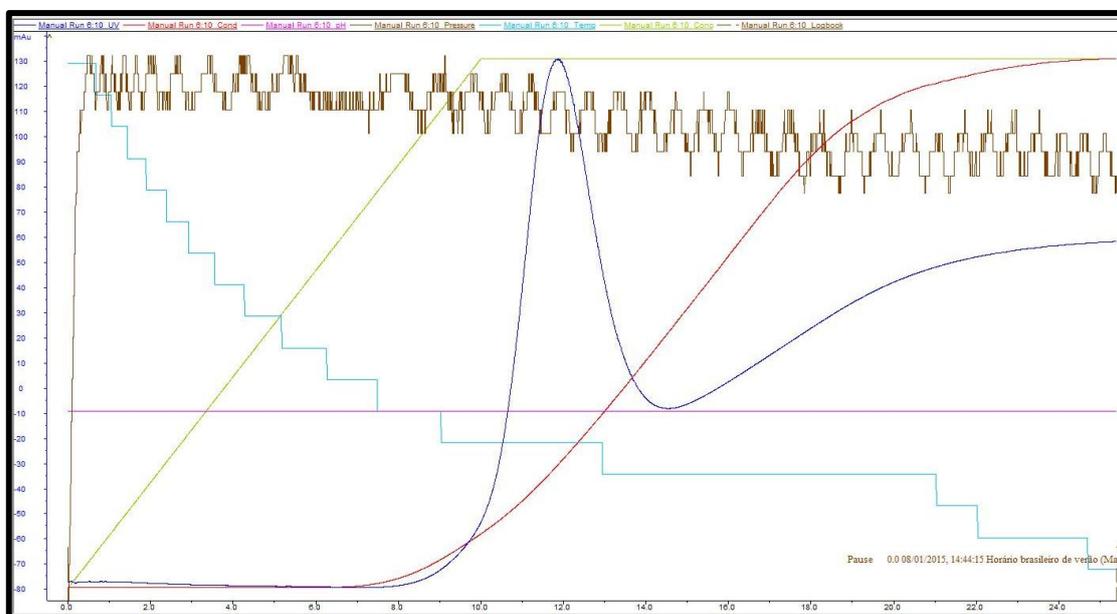


Figura 11: Purificação por cromatografia de afinidade da proteína Tc170. No eixo das ordenadas está evidenciado a escala de valores de mili unidades de absorvância (mAu) de UV do material eluído da coluna de afinidade Histrap HP de 5 mL. No eixo das abscissas, em preto está a quantidade de mL de tampão de eluição que já passou pela coluna de afinidade, e em vermelho estão o número das frações de 1,3 mL coletadas durante a purificação para a obtenção da proteína recombinante. A linha azul escura corresponde a absorvância em mAu do material eluído. A linha em verde corresponde a concentração de imidazol no tampão de eluição, que inicia com uma concentração de 30 mM e cresce em escala linear até atingir o platô em 500 mM. A linha em vermelho corresponde à condutância do tampão utilizado na eluição, que é correspondente a quantidade de sal na solução. A linha azul clara corresponde à temperatura do sistema. A linha em marrom corresponde à pressão do sistema.

Para analisar a qualidade da purificação, as frações proteicas purificadas 10 a 13 foram submetidas ao fracionamento em gel SDS-PAGE 12,5%. Em concordância com o gráfico da Figura 11, foi possível identificar no gel a proteína Tc170 com um bom grau de pureza nas quatro frações analisadas (Figura 12).

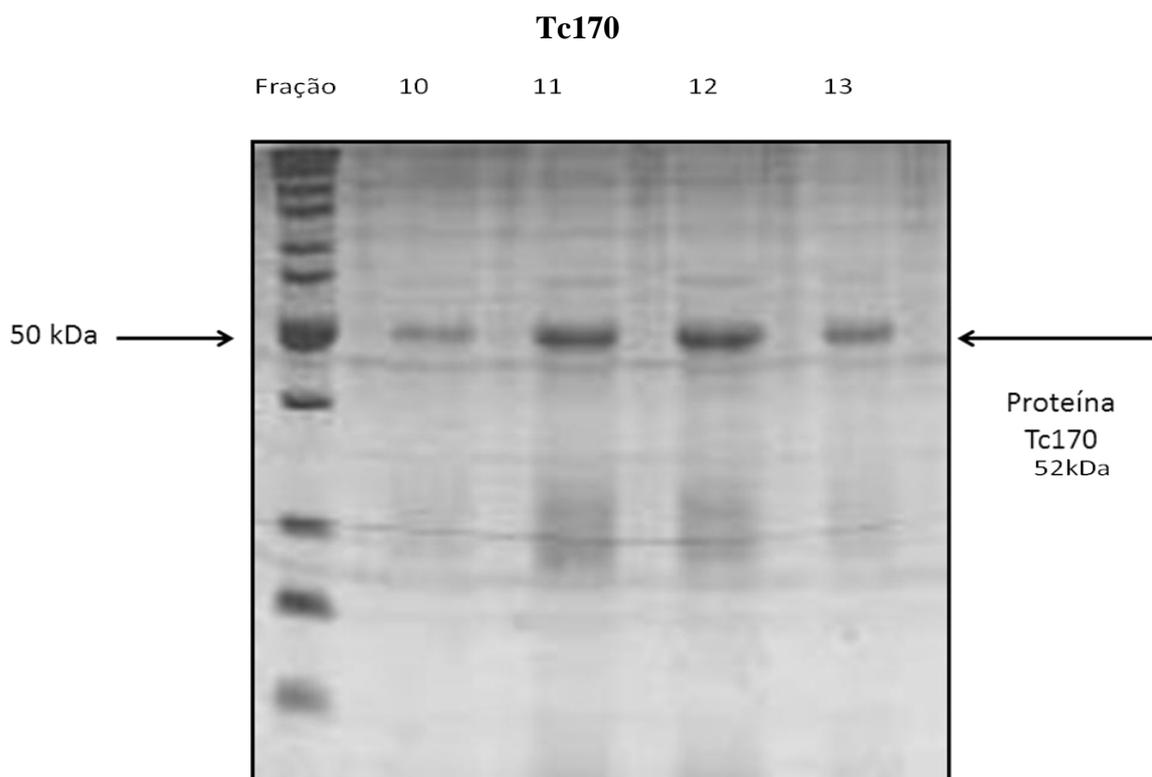


Figura 12: Frações da purificação por cromatografia de afinidade da proteína Tc170. Os números acima de cada canaleta correspondem às frações coletadas na purificação por cromatografia de afinidade, referentes ao gráfico da Figura 11. Todas as quatro frações foram reunidas e utilizada nos ensaios de ELISA. kDa = kiloDaltons.

5.6. ELISA da proteína recombinante Tc170

Para verificar a eficiência da proteína recombinante purificada Tc170 para o diagnóstico da doença de Chagas, foram realizados experimentos de ELISA utilizando 9 soros de pacientes chagásicos, 39 com leishmaniose visceral e 10 humanos saudáveis. Primeiramente, para verificar a reatividade da proteína Tc170 por ELISA, foram preparados *pools* de soros destes três grupos e testados com diferentes quantidades da proteína recombinante (Figura 13).

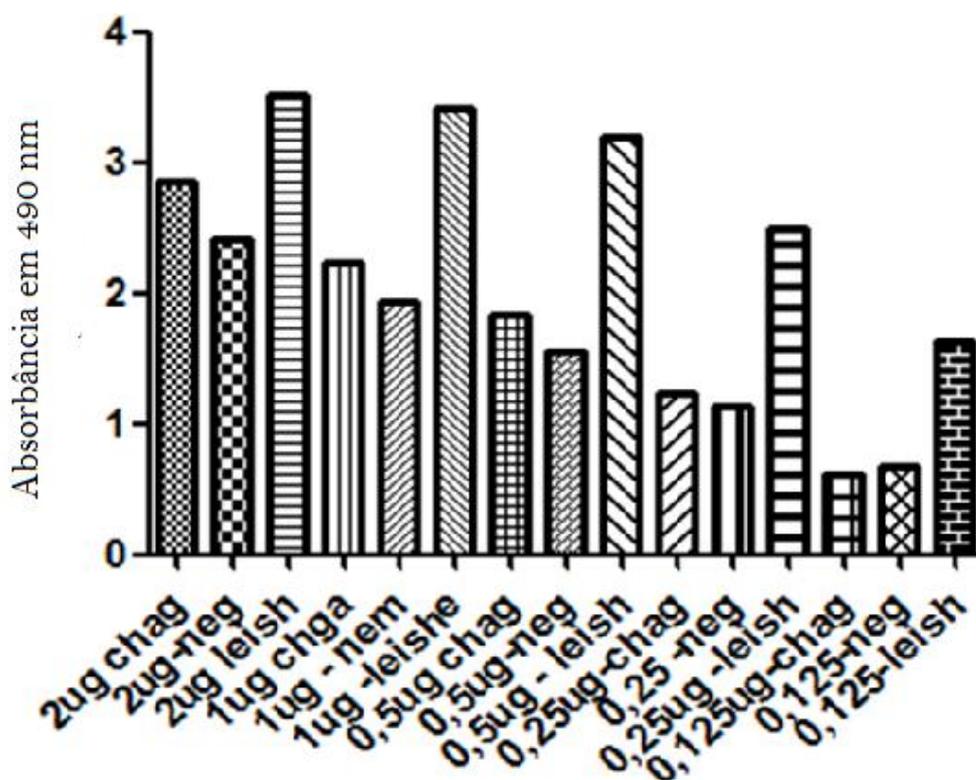


Figura 13: Reatividade de diferentes quantidades da proteína recombinante Tc170 em experimentos de ELISA realizados com os *pools* de soros de pacientes humanos chagásicos crônicos, com leishmaniose visceral ou não infectados com *T. cruzi* e *L. infantum*, como controle negativo. No eixo das ordenadas, estão representadas as absorbâncias lidas em 490 nm resultante do experimento. No eixo das abscissas, estão representados o *pool* de cada soro e a quantidade de proteína recombinante utilizada para sensibilizar a placa de ELISA. Cada coluna no gráfico corresponde à média das triplicatas.

No entanto, como pode ser observado na Figura 13, o *pool* de soros dos pacientes com leishmaniose visceral, infectados com *L. infantum*, apresentou maior reatividade com a proteína recombinante Tc170, independente da quantidade de proteína utilizada no experimento de ELISA, em comparação com o *pool* de soros dos pacientes chagásicos e dos indivíduos não infectados.

Para verificar este resultado outro experimento de ELISA foi realizado. Desta vez, soros individuais de pacientes com leishmaniose visceral, pacientes com doença de Chagas e de humanos não infectados foram utilizados para testar a

reatividade de 0,25 μ g da proteína Tc170 (Figura 14).

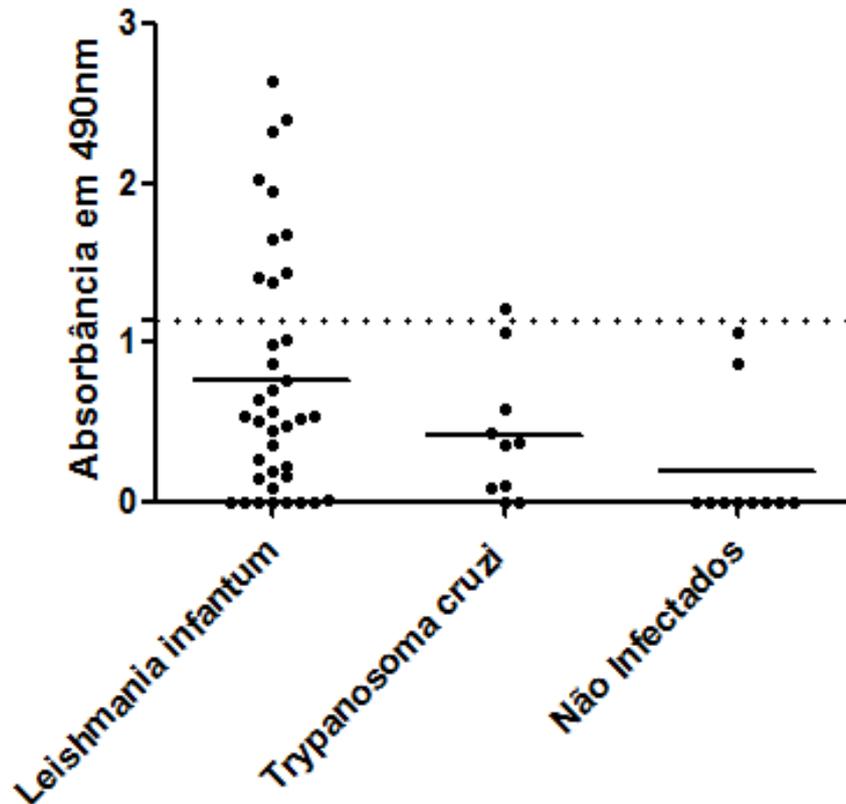


Figura 14: Reatividade da proteína recombinante Tc170 em experimentos de ELISA com os soros individuais de pacientes humanos chagásicos crônicos, com leishmaniose visceral ou não infectados com *T. cruzi* e *L. infantum*, como controle negativo. No eixo das ordenadas, estão representadas as absorbâncias lidas em 490 nm resultante do experimento. No eixo das abscissas, a coluna “*Leishmania infantum*” corresponde aos soros individuais de 39 pacientes com leishmaniose visceral, enquanto que a coluna “*Trypanosoma cruzi*” corresponde a 9 soros de pacientes chagásicos crônicos sabidamente infectados com *T. cruzi* do subgrupo TcII. Como controle negativo, foram utilizados 10 soros de indivíduos saudáveis, representados na coluna “não infectados”. Cada ponto no gráfico corresponde à média de triplicatas. A linha pontilhada corresponde ao ponto de corte (*cutoff*) do experimento.

A partir deste experimento de ELISA com soros individuais de pacientes, pode ser observado que 10 soros de pacientes infectados com *L. infantum* apresentaram valores de absorbância acima do *cutoff*, enquanto apenas 1 soro de pacientes infectados

com *T. cruzi* apresentou valores de absorvância acima do ponto de corte. Portanto, apesar de não apresentar uma separação satisfatória entre *L. infantum* e *T. cruzi*, a proteína Tc170 foi capaz de separar os pacientes com leishmaniose visceral dos não infectados, com uma sensibilidade de 25,64% e uma especificidade de 94,73%. Com relação aos soros de pacientes chagásicos tanto a sensibilidade, quanto a especificidade, foi de 80% com relação aos humanos não infectados.

5.7. Busca por ortólogos em *Leishmania infantum* da proteína Tc170 e identificação de epítopos de células B em comum

Como já descrito por diversos autores, o diagnóstico da doença de Chagas depara-se com a problemática das reações cruzadas com outros parasitos pertencentes à família Trypanosomatidae (UMEZAWA; LUQUETTI, 2001).

Uma vez que os experimentos de ELISA apresentaram reação cruzada quando testado com o soro de pacientes com leishmaniose visceral, infectados com *Leishmania infantum*, busca por ortólogos da proteína Tc170 foi realizada, utilizando o algoritmo BLASTp do banco de dados TriTrypDB (<http://tritrypdb.org>). Este banco de dados disponibiliza o acesso aos genomas de organismos da família Trypanosomatidae. Atualmente, este sistema integra conjuntos de dados de *Leishmania braziliensis*, *L. infantum*, *L. major*, *L. tarentolae*, *Trypanosoma brucei*, *T. cruzi*, entre outros (ASLETT et al., 2010).

Foi identificado apenas uma proteína, a LinJ.33.0680, codificada pelo genoma de *L. infantum*, que é ortóloga a proteína Tc170 de *T. cruzi*. Os genes que codificam essas proteínas estão em sintenia nos respectivos genomas. A porcentagem de identidade e o alinhamento entre essas duas proteínas foram realizados utilizando o programa CLUSTALW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>). Tc170 apresenta apenas 24% de identidade com a proteína LinJ.33.0680, que possui 489 aminoácidos e não apresenta uma função conhecida, sendo classificada com uma proteína hipotética no banco de dados TriTrypDB. O alinhamento entre essas duas proteínas está indicado na Figura 15.

Para verificar se as proteínas Tc170 e LinJ.33.0680 apresentam epítopos de células B em comum que justifiquem a presença de reação cruzada nos experimentos de

predição de epítopos de células B foi realizada através do programa BepiPred. Em vermelho estão indicados os epítopos preditos de células B para a proteína Tc170 e em azul estão indicados os epítopos da proteína LinJ.33.0680.

Como pode ser observado na Figura 15, as proteínas Tc170 e LinJ.33.0680 compartilham alguns resíduos de aminoácidos conservados ou com cadeias laterais com propriedades fortemente similares que foram preditos como epítopos de células B, o que poderia justificar a presença de reação cruzada nos experimentos de ELISA, quando utilizado soros de pacientes chagásicos e com leishmaniose visceral. Portanto, a proteína Tc170 não constitui um alvo ideal para o diagnóstico da doença de Chagas.

Dessa forma, buscas por novos alvos que apresentem reatividade apenas para epítopos presentes no *T. cruzi* e não apresentem reações cruzadas com outros parasitos pertencentes à família Trypanosomatidae devem ser realizadas.

6. Discussão

A iniciativa Cone Sul criada em 1991 por governos de países da América Latina apresentou um sucesso satisfatório no controle da doença de Chagas nas áreas endêmicas. O principal foco das medidas da iniciativa foi o combate do principal inseto vetor responsável pelo maior número de transmissões, o *Triatoma infestans*. Em 1997, a Organização Pan Americana de Saúde (PAHO) e da Organização Mundial de Saúde (OMS), concederam ao Uruguai um certificado de completa eliminação do *T. infestans*, sendo este um importante marco de sucesso da implementação da iniciativa neste país (COURA, 2013). Devido ao significativo declínio na transmissão da doença, existem áreas nas quais não ocorre o risco de infecção da doença de Chagas por via vetorial. Portanto, devido a progressiva diminuição nas taxas de infecções, o número de pessoas infectadas com a doença declinou para entorno de 7 a 8 milhões de pessoas, segundo dados de 2014 da Organização Mundial de Saúde. Na década de 1990, 100 milhões de pessoas viviam em áreas de risco de contrair a doença, atualmente, o número de indivíduos permanentes nessas regiões, reduziu e passou para 40 milhões (SCHOFIELD; JANNIN; SALVATELLA, 2006). Entretanto, fatores sociais, somados a interesses políticos ainda inviabilizam o sucesso do controle em alguns países da América Latina. Apenas no Equador, na Nicarágua, no Paraguai e no Panamá, o controle da doença de Chagas é uma medida de controle sob a supervisão da autoridade nacional. Nos outros países, o encargo do controle é empregado individualmente aos estados e municípios, o que dificulta um diálogo entre as medidas realizadas e as medidas a serem empregadas. Tal desacordo, não viabiliza formas coordenadas de controle entre o conjunto de países participantes da Iniciativa Cone Sul (SCHOFIELD; JANNIN; SALVATELLA, 2006) (GÜRTLER et al., 2005).

Na Venezuela, *Rhodnius prolixus* é predominantemente intradomiciliar. Possui uma alta taxa de reprodução, alimentam-se do sangue do hospedeiro vorazmente e defecam em um curto intervalo de tempo (HERRERA, 2014). Em algumas regiões do México, Colômbia, Venezuela, Equador e Peru, encontra-se o *T. infestans*, o *T. dimidiata* e o *R. prolixus* que possuem estreita participação no ciclo de transmissão do *T. cruzi* (ESPINOZA; BORRÁS; ABAD-FRANCH, 2014).

Em 2006, o Brasil recebeu do PAHO o certificado da erradicação da

transmissão da doença via *T. infestans*. Entretanto, em algumas áreas da região norte e nordeste ainda existem vetores em potencial para a transmissão, o que sugere que apesar dos esforços manifestados no controle, novos casos de transmissão do *T. cruzi* poderão ocorrer no país ainda por muitos anos (DA NÓBREGA; DE ARAÚJO; VASCONCELOS, 2014).

Nas últimas décadas, milhares de emigrantes provenientes de países endêmicos foram morar nos EUA. Muitos destes, oriundos de países da América Central, onde a incidência do *T. cruzi* é alta. Uma pesquisa realizada em Washington, D.C., revelou que 5% dos 205 nicaraguenses e dos emigrantes de São Salvador, estavam infectados com o *T. cruzi*. Seguindo esta análise estatística, os dados sugerem que aproximadamente de 50.000 à 100.000 emigrantes nascidos na América latina que vivem nos EUA estão infectados com o *T. cruzi* (RASSI; MARCONDES DE REZENDE, 2012). Na Europa, devido ao fluxo migratório, de pessoas provenientes de regiões endêmicas, houve um aumento no número de casos. A falta de medidas de controle eficazes, o desconhecimento sobre a doença e falta de preparo de países não endêmicos, favoreceu outros mecanismos de transmissão tais como a doença de Chagas congênita e principalmente a infecção por transfusões sanguíneas (JR; RASSI; MARINETO, 2010). Em grandes cidades como Bogotá, Buenos Aires, Caracas, Rio de Janeiro, Santiago e São Paulo, os índices de soropositividade para a doença de Chagas oscilam entre 0,5% e 2%. Estes números se tornam ainda mais alarmantes em regiões hiper endêmicas da Bolívia, onde a prevalência supera 20% e pode chegar a até 63% (Pereira *et al.*, 2012). Tais fatos corroboram com abordagens de suma importância para as medidas de controle como também amplia o leque para relevantes questões no que se diz respeito a uma nova afirmação quanto a epidemiologia da doença.

Para a manutenção e o progresso das medidas de controle, deve-se realizar de maneira efetiva a triagem dos bancos sanguíneos, principalmente dos doadores de sangue provenientes de áreas endêmicas. Uma vez que, o controle da doença de Chagas é um desafio para a saúde pública em muitos países endêmicos, devido ao acesso limitado ao diagnóstico e ao tratamento (COURA, 2013).

Na fase aguda da doença de Chagas o diagnóstico pode ser executado pela detecção do parasito usando métodos parasitológicos diretos como esfregaços sanguíneos, hemocultura ou xenodiagnóstico. Durante a fase crônica da doença, o

diagnóstico é realizado pela presença de anticorpos no soro através de testes sorológicos (GOMES; LORENA; LUQUETTI, 2009)(GOMES; LORENA; LUQUETTI, 2009). Na forma crônica, a doença caracteriza-se pelo baixo nível da parasitemia e alto nível de anticorpos IgG anti-*T. cruzi*. Por esta razão, o diagnóstico na fase crônica deve ser realizado através de ensaios sorológicos, no entanto, estes podem apresentar algumas limitações (REIS-CUNHA et al., 2014).

Um grande impasse que fomenta discordâncias no diagnóstico da doença de Chagas se deve a sensibilidade e especificidade dos testes sorológicos. A possibilidade de reações cruzadas com outros organismos da família Trypanosomatidae nestes ensaios geram discussões entorno da veracidade dos resultados que podem se mostrar inconclusivos principalmente com espécies do gênero *Leishmania* (JR; RASSI; MARIN-NETO, 2010). A tecnologia do DNA recombinante tem sido utilizada para isolar antígenos dominantes para infecções humanas. Alguns destes antígenos têm demonstrado resultados promissores com relação ao diagnóstico da doença de Chagas (UMEZAWA et al., 1999). O uso destas metodologias possui uma grande vantagem de não necessitar do cultivo e manutenção de cultura de parasitos para a obtenção dos antígenos, o que evita o risco de infecção por acidente de laboratório assim como não precisa de equipamentos específicos para o cultivo de parasitos. Entretanto, alguns antígenos recombinantes ou peptídeos sintéticos podem exibir trechos de aminoácidos que se assemelhem a outros organismos, resultando, desta forma, nas reações cruzadas que não são desejadas para o diagnóstico. Por essa razão, estas reações devem ser interpretadas com cautela (SAEZ-ALQUÉZAR et al., 2000).

Um teste denominado “INNO-LIA Chagas Assay” proposto em 1999 por Saez-Alquézar e colaboradores, utilizaram proteínas recombinantes e peptídeos sintéticos na busca de novos alvos para a doença de Chagas. Tc24, Ag39, TcD, SAPA, MAPA, CRA e FRA demonstraram uma excelente sensibilidade e especificidades, porém tornou-se inviável a utilização destes alvos na rotina, devido aos altos custos (SAEZ-ALQUÉZAR et al., 2000). Ao propor um novo imunoblot, denominado “Abbott imunoblot”, Cheng e colaboradores, obtiveram uma excelente sensibilidade e especificidade com a utilização dos seguintes antígenos recombinantes: “FP3 (derivado de domínios de TcR27 e FCaBP)”, “FP6 (derivado de TcR39 e FRA)”, “FP10 (derivado de SAPA e MAP)” e TcF (derivado de PEP-2, TcD, TcE e TcLo1.2)”. Estes antígenos não apresentaram reações cruzadas com *Leishmania* nem com diversos outros

patógenos como protozoários ou helmintos intestinais, vírus da hepatite A, sífilis e rubéola (Cheng *et al.*, 2007) Ensaio de imunoblot utilizando extratos de antígenos secretados de tripomastigotas provenientes da cepa Y (TESA), tem sido proposto por demonstrarem uma boa performance em pacientes chagásicos na fase aguda ou infecções congênitas por *T. cruzi* (GOMES; LORENA; LUQUETTI, 2009). Gupta e colaboradores, testaram os antígenos TcG1, TcG2, e TcG4 em soros de pacientes chagásicos, clinicamente caracterizados. Estes antígenos demonstram-se possíveis candidatos vacinais para a doença, como também alvos para diagnóstico. Os resultados demonstraram que quando utilizados em conjunto no ELISA multiplex, estes antígenos apresentam uma sensibilidade de 93% e especificidade de 98% (GUPTA *et al.*, 2013) Estudos envolvendo os dissacarídeos α -Gal e β -Gal como um epítipo imunodominante estão sendo avaliados para ensaios diagnóstico da doença de Chagas. Os resíduos imunodominantes de α -Gal são muito abundantes e estimulam uma alta resposta protetora anti- Gal α , em soros de pacientes chagásicos (ASHMUS *et al.*, 2013).

Desta forma, neste trabalho, foram selecionadas três proteínas alvos de *T. cruzi* com potencial uso no diagnóstico sorológico da doença de Chagas, que possuíam peptídeos possivelmente conservados entre as diferentes linhagens deste parasito presentes no proteoma predito da cepa CL Brener e ausentes no proteoma predito de espécies do gênero *Leishmania*, e que apresentassem um alto *score* de predição de epítipo de célula B pelo programa BepiPred (LARSEN *et al.*, 2006). As três proteínas escolhidas, Tc00.1047053506479.10, Tc00.1047053508411.30 e Tc00.1047053506577.170 foram também selecionadas por terem peptídeos que apresentaram uma alta reatividade no experimento de *immunoblotting* realizado previamente em nosso laboratório (REIS-CUNHA *et al.*, 2014). A utilização das proteínas recombinantes ao invés de apenas os peptídeos foi escolhida, devido ao fato dos peptídeos apresentarem pequeno tamanho, o que dificulta a aderência nas placas de ELISA e, quando aderem, podem bloquear os epítipos de interesse.

Uma outra proteína que também foi utilizada neste trabalho foi a Tc00.1047053509427.80, escolhida por possuir uma sequência peptídica (PepMAF) que mimetiza o carboidrato antigênico α -gal, um epítipo abundantemente presente na superfície das formas infectantes de *T. cruzi* (SOUTO-PADRON *et al.*, 1994). Humanos e macacos do Velho Mundo são incapazes de produzir este epítipo, devido ao gene que codifica a enzima α -1,3-galactosiltransferase estar inativo. Ao invés disso,

produzem o anticorpo anti-gal, que interage especificamente com epitopos α -gal (GALILI, 2005). Resultados preliminares obtidos em nosso laboratório, mostraram que soros de camundongos imunizados com epítipo gal reconheceram a sequência peptídica da Tc80 (dados não mostrados).

Para cada uma das quatro proteínas selecionadas foi encontrada no genoma de CL Brener apenas uma cópia adicional, que é devido ao caráter híbrido dessa cepa (ZINGALES et al., 2012). CL Brener pertence ao subgrupo TcIV, que é resultante de um evento de hibridização recente entre os subgrupos TcII e TcIII, de forma que seu genoma engloba dois haplótipos diferentes, denominados de *Esmo-like* derivado do subgrupo TcII e *Non-Esmo-like* derivado do subgrupo TcIII (Zingales et al., 2012).

Todos os quatro genes selecionados, codificam para proteínas hipotéticas de *T. cruzi* (TritypDB), que ainda não foram utilizadas em outros testes diagnósticos da doença de Chagas. A seleção destas proteínas hipotéticas foi possível, pois foi levada em consideração apenas a ocorrência de epítipos preditos *in silico* e a sua conservação nos dois haplótipos de CL Brener, e não se o gene já possuía uma função conhecida.

Após os genes selecionados de *T. cruzi* serem amplificados por PCR, utilizando *primers*, que continha em suas extremidades 5' sítios para enzimas de restrição, eles foram clonados no vetor pGEM-T e subclonados no vetor de expressão pET-28a-TEV. Este vetor de expressão adiciona à extremidade N-terminal das proteínas uma cauda de histidina, contendo seis resíduos deste aminoácido, o que facilita a purificação da proteína recombinante por cromatografia de afinidade com colunas de níquel. Diferentemente de outras *tags* comumente utilizadas, como MBP e GST, que necessitam ser clivadas das proteínas recombinantes maduras devido ao seu grande tamanho, a cauda de histidina pode ser mantida nas proteínas recombinantes maduras sem comprometer ensaios imunológicos como o ELISA, devido ao seu pequeno tamanho.

O vetor pET-28a-TEV, contendo os insertos de interesse, foram transformados em bactérias *E. coli* eletrocompetentes da linhagem BL-21Star para a expressão das proteínas recombinantes. Esta bactéria apresenta em seu genoma uma mutação no gene da RNase E, resultando na produção de menores níveis de RNases endógenas, que leva a menor degradação do RNA, conseqüentemente, aumentando a estabilidade dos transcritos resultantes da expressão da proteína recombinante e a

quantidade de proteína obtida ao final do experimento.

Apesar de inúmeras tentativas de expressar as proteínas de interesse, foi possível obter de forma recombinante apenas a proteína Tc170. Novos experimentos de indução, utilizando outras linhagens de bactéria ou mesmo de leveduras, como a *Pichia pastoris*, além de alterações nas condições de crescimento e indução, serão ainda realizados. Como alternativas tentaremos a indução da produção dessas proteínas na bactéria *E. coli* linhagem C41, utilizada na expressão de proteínas tóxicas, em bactérias contendo o plasmídeo pRARE (Novagen), que expressa os RNAs transportadores (tRNAs) que são raros para bactérias *E. coli*; e em bactérias da linhagem *Arctic Express* (Agilent Technologies), que expressam proteínas solúveis a baixas temperaturas (12 °C), além de expressar chaperoninas Cpn60 e Cpn10 derivadas de bactérias psicrófilicas que auxiliam no correto dobramento das proteínas recombinantes (FERRER et al., 2003).

Para testar se a proteína recombinante Tc170 constitui um bom alvo para diagnóstico da doença de Chagas, foram realizados experimentos de ELISA, utilizando soros de pacientes chagásicos na fase crônica, soros de pacientes com leishmaniose visceral, para verificar a presença de reação cruzada, e soros de indivíduos saudáveis, como controle negativo. No entanto, após a realização dos ELISAs tanto com *pool* de soros, quanto com soros individuais, a proteína Tc170 apresentou reação cruzada com os soros de pacientes com leishmaniose visceral, infectados com *L. infantum*.

Para verificar se a proteína recombinante Tc170 possui ortólogos em *Leishmania infantum*, buscas no banco de dados do TritypDB foram realizadas. Foi encontrada uma proteína com 24% de identidade com a Tc170, a LinJ.33.0680. Após a predição de epítopos de células B em ambas as proteínas, foram observadas que elas compartilham em epítopos preditos de células B alguns resíduos de aminoácidos idênticos e alguns aminoácidos com cadeia lateral com propriedades fortemente similares, o que poderia explicar a ocorrência de reações cruzadas nos experimentos de ELISA. Portanto, a proteína Tc170 não se mostrou promissora como alvo para uso no diagnóstico da doença de Chagas.

Um dos maiores desafios dos testes sorológicos para a doença de Chagas é a presença de reações cruzadas com o soro de pacientes infectados com outros organismos da família Trypanosomatidae, tais como espécies do gênero *Leishmania* e

Trypanosoma rangeli. A proximidade entre os gêneros *Trypanosoma* e *Leishmania*, ambos pertencentes a família Trypanosomatidea, tem sido discutida por diversos grupos de pesquisa. Tais discussões baseiam-se na comparação dos caracteres imunológicos, bioquímicos e as similaridades celulares entre os gêneros (FERREIRA et al., 2014).

Portanto, busca por alvos mais específicos, que possam reduzir a presença de reação cruzada, mantendo ainda uma alta sensibilidade e especificidade é de extrema importância para o aprimoramento de diagnósticos para essa parasitose (CABALLERO et al., 2007).

7. Referências Bibliográficas

- AFONSO, A. M.; EBELL, M. H.; TARLETON, R. L. A systematic review of high quality diagnostic tests for Chagas disease. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 6, n. 11, p. e1881, jan. 2012.
- ANDRADE, S. G. et al. Biological, biochemical and molecular features of *Trypanosoma cruzi* strains isolated from patients infected through oral transmission during a 2005 outbreak in the state of Santa Catarina, Brazil: Its correspondence with the new *T. cruzi* taxonomy consensu. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 106, n. December, p. 948–956, 2011.
- ANGÉLICA, AA. et al. Doença de Chagas crônica : do xenodiagnóstico e hemocultura à reação em cadeia da polimerase Chronic Chagas ' disease : from xenodiagnosis and hemoculture to polymerase chain reaction. v. 37, n. 1, p. 107–115, 2003.
- APOSTOLOPOULOS, V.; SANDRIN, M. S.; MCKENZIE, I. F. C. Carbohydrate/peptide mimics: Effect on MUC1 cancer immunotherapy. **Journal of Molecular Medicine**, v. 77, p. 427–436, 1999.
- ARAÚJO, M. S. et al. A combination of benznidazole and ketoconazole enhances efficacy of chemotherapy of experimental Chagas' disease. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 45, p. 819–824, 2000.
- ASHMUS, R. A et al. Potential use of synthetic α -galactosyl-containing glycotopes of the parasite *Trypanosoma cruzi* as diagnostic antigens for Chagas disease. **Organic & biomolecular chemistry**, v. 11, p. 5579–83, 2013.
- ASLETT, M. et al. TriTrypDB : a functional genomic resource for the Trypanosomatidae. v. 38, n. October 2009, p. 457–462, 2010.
- CABALLERO, Z. C. et al. Evaluation of serological tests to identify *Trypanosoma cruzi* infection in humans and determine cross-reactivity with *Trypanosoma rangeli* and *Leishmania* spp. **Clinical and vaccine immunology : CVI**, v. 14, n. 8, p. 1045–9, ago. 2007.
- CAMARGOS, E. R. S. et al. Infection with different *Trypanosoma cruzi* populations in rats: Myocarditis, cardiac sympathetic denervation, and involvement of digestive organs. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 62, n. 5, p. 604–612, 2000.
- CARLOS, J.; DIAS, P. Southern Cone Initiative for the elimination of domestic populations of *Triatoma infestans* and the interruption of transfusional Chagas disease . Historical aspects , present situation , and perspectives. v. 102, p. 11–18, 2007.
- COIRAS, M. et al. Application of proteomics technology for analyzing the interactions between host cells and intracellular infectious agents. **Proteomics**, v. 8, p. 852–873, 2008.

- COURA, J. R. Chagas disease : what is known and what is needed – A background article. v. 102, n. August, p. 113–122, 2007a.
- COURA, J. R. Chagas disease: what is known and what is needed--a background article. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102 Suppl , n. August, p. 113–122, 2007b.
- COURA, J. R. Chagas disease : control , elimination and eradication . Is it possible ? v. 108, n. December, p. 962–967, 2013.
- COURA, J. R. The main sceneries of Chagas disease transmission. The vectors, blood and oral transmissions - A comprehensive review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 00, n. October 2014, p. 00–00, 2014.
- COURA, J. R.; BORGES-PEREIRA, J. Acta Tropica Chagas disease : 100 years after its discovery . A systemic review &. v. 115, p. 5–13, 2010.
- DA NÓBREGA, A. A.; DE ARAÚJO, W. N.; VASCONCELOS, A. M. N. Mortality Due to Chagas Disease in Brazil According to a Specific Cause. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 91, n. 3, p. 528–533, 2014.
- DA SILVEIRA, J. F.; UMEZAWA, E. S.; LUQUETTI, A O. Chagas disease: recombinant Trypanosoma cruzi antigens for serological diagnosis. **Trends in parasitology**, v. 17, n. 6, p. 286–91, jun. 2001.
- DE MARCHI, C. R. et al. Evaluation of a recombinant Trypanosoma cruzi mucin-like antigen for serodiagnosis of Chagas' disease. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 18, n. 11, p. 1850–1855, 2011.
- DUTRA, W. O.; ROCHA, M. O. C.; TEIXEIRA, M. M. The clinical immunology of human Chagas disease. **Trends in Parasitology**, v. 21, n. 12, p. 581–587, 2005.
- ESPINOZA, N.; BORRÁS, R.; ABAD-FRANCH, F. Chagas Disease Vector Control in a Hyperendemic Setting: The First 11 Years of Intervention in Cochabamba, Bolivia. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 4, 2014.
- FERNANDES, M. C. et al. Trypanosoma cruzi subverts the sphingomyelinase-mediated plasma membrane repair pathway for cell invasion. **The Journal of experimental medicine**, v. 208, n. 5, p. 909–921, 2011.
- FERREIRA, L. R. et al. New insights about cross-reactive epitopes of six trypanosomatid genera revealed that Crithidia and Leptomonas have antigenic similarity to L. (L.) chagasi. **Acta Tropica**, v. 131, p. 41–46, 2014.
- GALILI, U. The ??-gal epitope and the anti-Gal antibody in xenotransplantation and in cancer immunotherapy. **Immunology and Cell Biology**, v. 83, p. 674–686, 2005.
- GOMES, Y. M.; LORENA, V. M. B.; LUQUETTI, A. O. Diagnosis of Chagas disease : what has been achieved ? What remains to be done with regard to diagnosis and follow up studies ? v. 104, n. June, p. 115–121, 2009.

- GRUBER, A; ZINGALES, B. **Trypanosoma cruzi: characterization of two recombinant antigens with potential application in the diagnosis of Chagas' disease.** *Experimental parasitology*, mar. 1993. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8467895>>
- GUHL, F. et al. Molecular characterization and diagnosis of trypanosoma cruzi and T. rangeli. **Archives of medical research**, v. 33, n. 4, p. 362–70, 2002.
- GUPTA, S. et al. Antigenicity and Diagnostic Potential of Vaccine Candidates in Human Chagas Disease. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 1, 2013.
- GÜRTLER, R. E. et al. Incidence of Trypanosoma cruzi infection among children following domestic reinfestation after insecticide spraying in rural northwestern Argentina. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 73, n. 1, p. 95–103, 2005.
- HERRERA, L. Trypanosoma cruzi , the causal agent of Chagas disease : boundaries between wild and domestic cycles in Venezuela. v. 2, n. November, p. 1–4, 2014.
- JR, A. R.; RASSI, A.; MARIN-NETO, J. A. Chagas disease. **The Lancet**, v. 375, n. 9723, p. 1388–1402, 2010.
- KAPPAGODA, S.; PA, J. Systematic reviews reviews Prevention and control of neglected tropical diseases : overview of randomized trials , systematic reviews and meta-analyses. n. August 2013, p. 356–366, 2014.
- KEMMERLING, U.; BOSCO, C.; GALANTI, N. Infection and invasion mechanisms of Trypanosoma cruzi in the. p. 307–316, 2010.
- LARSEN, J. E. P.; LUND, O.; NIELSEN, M. Improved method for predicting linear B-cell epitopes. **Immunome research**, v. 2, p. 2, 2006.
- MACEDO, A. M. et al. Trypanosoma cruzi : Genetic Structure of Populations and Relevance of Genetic Variability to the Pathogenesis of Chagas Disease. v. 99, n. February, p. 1–12, 2004.
- MARIN-NETO, J. A. et al. Forma Indeterminada da Moléstia de Chagas . Proposta de Novos Critérios de Caracterização e Perspectivas de Tratamento Precoce da Cardiomiopatia. v. 79, n. n° 6, p. 623–627, 2002.
- MERCHANT, A M. et al. 1998 Nature Publishing Group <http://www.nature.com/naturebiotechnology>. **Group**, v. 16, p. 291–294, 1998.
- PEREIRA, G. D. A. et al. A General Latent Class Model for Performance Evaluation of Diagnostic Tests in the Absence of a Gold Standard : An Application to Chagas Disease. v. 2012, 2012.
- PIERIMARCHI, P. et al. Rapid Chagas diagnosis in clinical settings using a multiparametric assay. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 75, p. 381–389, 2013.

- RASSI, A.; MARCONDES DE REZENDE, J. American trypanosomiasis (Chagas disease). **Infectious disease clinics of North America**, v. 26, n. 2, p. 275–91, jun. 2012.
- REIS-CUNHA, J. L. et al. Genome-wide screening and identification of new *Trypanosoma cruzi* antigens with potential application for chronic Chagas disease diagnosis. **PloS one**, v. 9, n. 9, p. e106304, jan. 2014.
- RIBEIRO, A. L. et al. Diagnosis and management of Chagas disease and cardiomyopathy. **Nature Reviews Cardiology**, v. 9, n. 10, p. 576–589, 2012.
- ROELLIG, D. M. et al. Genetic variation and exchange in *Trypanosoma cruzi* isolates from the United States. **PloS one**, v. 8, n. 2, p. e56198, jan. 2013.
- SAEZ-ALQUÉZAR, A. et al. Serological confirmation of Chagas' disease by a recombinant and peptide antigen line immunoassay: INNO-LIA Chagas. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 2, p. 851–854, 2000.
- SCHMIDT, V. I. O. L. et al. Chagas' Disease as a Foodborne Illness. v. 72, n. 2, p. 441–446, 2009.
- SCHOFIELD, C. J.; JANNIN, J.; SALVATELLA, R. The future of Chagas disease control. **Trends in Parasitology**, v. 22, n. 12, p. 583–588, 2006.
- SOLARI, A et al. Characterization of Chilean, Bolivian, and Argentinian *Trypanosoma cruzi* populations by restriction endonuclease and isoenzyme analysis. **Experimental parasitology**, v. 75, p. 187–195, 1992.
- UMEZAWA, E. S. et al. Evaluation of recombinant antigens for serodiagnosis of Chagas' disease in South and Central America. **Journal of clinical microbiology**, v. 37, n. 5, p. 1554–60, maio 1999.
- UMEZAWA, E. S. et al. Serodiagnosis of Chronic and Acute Chagas' Disease with *Trypanosoma cruzi* Recombinant Proteins : Results of a Collaborative Study in Six Latin American Countries. v. 42, n. 1, p. 449–452, 2004.
- UMEZAWA, E. S.; LUQUETTI, A. O. Chagas disease : recombinant *Trypanosoma cruzi* antigens for serological diagnosis. v. 17, n. 6, p. 286–291, 2001.
- YOSHIDA, N. *Trypanosoma cruzi* infection by oral route. How the interplay between parasite and host components modulates infectivity. **Parasitology International**, v. 57, p. 105–109, 2008.
- ZINGALES, B. et al. Epidemiology, Biochemistry and Evolution of *Trypanosoma cruzi* Lineages Based on Ribosomal RNA Sequences. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94, p. 159–164, 1999.
- ZINGALES, B. et al. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: Second revision meeting recommends TcI to TcVI. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. November, p. 1051–1054, 2009.

ZINGALES, B. et al. Infection , Genetics and Evolution The revised Trypanosoma cruzi subspecific nomenclature : Rationale , epidemiological relevance and research applications. v. 12, p. 240–253, 2012.